

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
НОВОСИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. Н.Н. ВОРОЖЦОВА
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ОВЧЕРЕНКО СЕРГЕЙ СЕРГЕЕВИЧ

**ДИНАМИКА ПРОНИКНОВЕНИЯ БЕЛКА RL2 В КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА
И ОТКРЫТИЯ – ЗАКРЫТИЯ ПАР ОСНОВАНИЙ ДНК,
СОДЕРЖАЩИХ 8-ОКСОГУАНИН,
ПО ДАННЫМ МЕТОДОВ МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА**

Специальность 1.3.17 — Химическая физика, горение и взрыв,
физика экстремальных состояний вещества

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
Кандидат химических наук
Шернюков Андрей Владимирович

Новосибирск – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	18
1.1 Внутренне неупорядоченные белки	18
1.1.1 Казеины.....	21
1.1.2 Рекомбинантный аналог лактапина RL2.....	23
1.2 Изучение внутренне неупорядоченных белков методами магнитного резонанса	25
1.2.1 ЯМР спектроскопия.....	25
1.2.1.1 Отличия между глобулярными белками и IDP на спектрах ЯМР	26
1.2.1.2 Остаточная вторичная структура IDP по данным химических сдвигов	28
1.2.1.3 Динамика основной цепи белка по данным ^{15}N R_1 , R_2 и ^1H - ^{15}N NOE	29
1.2.1.4 Остаточная третичная структура IDP по данным PRE	35
1.2.2 ЭПР спектроскопия.....	40
1.2.2.1 Динамика белков по данным стационарной спектроскопии ЭПР	40
1.2.2.2 Определение пространственной структуры белка по данным PELDOR	43
1.3 Эксцизионная репарация оснований	45
1.3.1 8-оксогуанин.....	45
1.3.2 Репарация повреждения 8-оксогуанин	46
1.4 Динамика открытия-закрытия пар оснований в ДНК. Катализируемый протонный обмен	47
1.5 Заключение	49
ГЛАВА 2. ПОВЕДЕНИЕ RL2 В РАСТВОРЕ И В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ПО ДАННЫМ МЕТОДОВ МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА.....	51
2.1 Введение.....	51
2.2 Экспериментальная часть.....	52
2.2.1 Особенности структуры и организации RL2 в растворе по данным методов магнитного резонанса.....	52

2.2.2 Поведение RL2 в клетках A549 в процессе его проникновения по данным ЭПР и конфокальной микроскопии	54
2.3 Особенности структуры и организации RL2 в растворе по данным методов магнитного резонанса	58
2.3.1 Влияние pH на агрегацию RL2 в растворе по данным ЭПР	58
2.3.2 Влияние pH на спектры ЯМР RL2	60
2.3.3 Отнесение сигналов ЯМР основной цепи RL2 в растворе	62
2.3.4 Динамика основной цепи RL2 в растворе по данным ^{15}N R ₁ , R ₂ , ^1H - ^{15}N NOE	66
2.3.5 Остаточная третичная структура RL2 в растворе по данным PRE	68
2.4 Поведение RL2 в клетках A549 в процессе его проникновения по данным ЭПР и конфокальной микроскопии	69
2.4.1 Введение в RL2 спиновых меток для внутриклеточных экспериментов ЭПР	69
2.4.2 Поведение sRL2 в культуральной среде для инкубирования клеток	72
2.4.3 Проникновение sRL2 в клетки A549 по данным ЭПР	75
2.4.4 Локализация флуоресцентного конъюгата RL2 ₂ в клетках A549 по данным конфокальной микроскопии	78
2.4.5 Влияние ингибитора эндоцитоза на проникновение sRL2 в клетки A549	81
2.4.6 Кинетика разрушения агрегатов RL2 ₂ в клетках A549	83
2.5 Заключение	85
ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИНАМИКИ ОТКРЫТИЯ – ЗАКРЫТИЯ ПАР ОСНОВАНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ПОВРЕЖДЕНИЕ 8-ОКСОГУАНИН	86
3.1 Введение	86
3.2 Экспериментальная часть	88
3.2.1 Адаптация последовательности CLEANEX-PM для измерения констант скорости обмена иминопотонов с протонами воды	90
3.2.2 Отнесение сигналов ^1H ЯМР иминопотонов	95
3.2.3 Расчет величин $k_{\text{в}}$	97
3.3 Константы скоростей и равновесия процесса открытия – закрытия пар оснований, содержащих 8-оксогуанин	98

3.4 Термодинамические параметры плавления дуплексов ДНК.....	105
3.5 Заключение	110
РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	112
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АББРЕВИАТУР И ТЕРМИНОВ.....	113
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	116
ПРИЛОЖЕНИЕ	133

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Intrinsically disordered proteins (IDP) – белки с внутренней (или естественной) неупорядоченностью (далее «внутренне неупорядоченные белки») составляют крайне важный класс белков эукариот, поскольку они широко распространены, участвуют в таких важных биологических процессах, как передача сигналов и регуляция, имеют прямое отношение к развитию онкологических заболеваний, диабету, а также вовлечены в процессы развития наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний – болезней Альцгеймера и Паркинсона. Поэтому изучение свойств таких белков представляет особый интерес. Упорядоченные белки в процессе денатурации могут потерять свои вторичную и третичную структуры, в то время как во внутренне неупорядоченных белках стабильная вторичная или третичная структура отсутствует исходно. Однако IDP могут принимать структуру частично или полностью, взаимодействуя с молекулами-мишенями. Такой переход от неупорядоченного состояния к упорядоченному позволяет IDP специфически связываться более чем с одной молекулой-мишенью. Несмотря на то, что во внутренне неупорядоченных белках отсутствует стабильная вторичная и третичная структуры, участки IDP могут иметь разную степень разупорядоченности, так что некоторые участки могут иметь склонность к образованию структуры, также называемые участками с остаточной структурой IDP. Поскольку предполагается, что именно такие участки IDP выступают в качестве начальных контактов с молекулами-мишенями, облегчая последующее связывание более гибких участков, выявление более упорядоченных участков IDP, обладающих остаточной структурой, представляет наибольший интерес. Наиболее информативным методом высокого разрешения при изучении внутренне неупорядоченных белков является спектроскопия ЯМР, поскольку метод позволяет на уровне индивидуальных остатков аминокислот измерять динамику основной цепи IDP и выявлять более упорядоченные участки белка. Кроме того, введение в белок парамагнитной спиновой метки позволяет применить подход, при котором с помощью метода ЯМР можно установить структурную организацию IDP в растворе и, следовательно, выявить участки с остаточной третичной структурой IDP.

RL2 представляет собой рекомбинантный аналог фрагмента человеческого к-казеина – белка, выделенного из человеческого молока. Казеины из числа первых белков, признанных функциональными, но неупорядоченными. Поэтому, так же как и к-казеин, RL2 может быть отнесен к IDP. Ранее было установлено, что белок RL2 способен эффективно проникать как в раковые, так и в нормальные клетки человека, вызывая гибель раковых клеток и при этом не

проявляя цитотоксическую активность по отношению к нормальным клеткам. К настоящему моменту успешно завершены доклинические испытания препарата Лактаптин, действующим веществом которого является белок RL2. Систематические исследования цитотоксического действия RL2 показали, что одной из мишеней RL2 является белок внешней мембраны митохондрии TOM70. Связывание RL2 с TOM70 приводит к подавлению синтеза АТФ и индуцирует гибель опухолевых клеток. Однако не изученным остается вопрос, какие участки RL2 ответственны за его связывание с белками-мишенями, в том числе с TOM70. Кроме того, не до конца ясны детали механизма проникновения RL2 в клетки человека. Между тем, доставка внутрь клетки биологически активных молекул является одним из важнейших этапов в процессе терапевтического воздействия многих лекарств. Таким образом, ответы на выше поставленные вопросы могут указать на возможный путь дальнейшего улучшения противоопухолевых свойств RL2, а также могут оказаться полезными при разработке новых лекарственных препаратов на основе RL2. Учитывая природу RL2 как внутренне неупорядоченного белка, в представленной диссертационной работе с применением методов магнитного резонанса были исследованы особенности структуры и организации RL2 в растворе, а также способ проникновения RL2 в живые клетки человека и дальнейшее поведение RL2 непосредственно в живых клетках.

ДНК, будучи важнейшим биополимером, играющим ключевую роль в передаче и регуляции генетической информации, может относительно легко повреждаться. Так, например, активные формы кислорода, возникающие в результате внутреннего метаболизма клеток или в результате внешних факторов, таких как ионизирующее или УФ излучение, могут приводить к окислению азотистого основания гуанина до 8-оксо-7,8-дигидрогуанина (8-оксогуанин, охoG). 8-оксогуанин является одним из наиболее распространенных окислительных повреждений ДНК, наличие которого приводит к её дестабилизации, а также к возникновению мутаций, при которых пара гуанин – цитозин (G:C) заменяется на пару тимин – аденин (A:T). Обильное количество таких мутаций может привести к развитию рака. Будучи напротив аденина в последовательности ДНК 8-оксогуанин образует неправильную пару охoG:A. Чтобы предотвратить мутационные изменения ДНК, вызванные наличием 8-оксогуанина, специальные ферменты репарации распознают его и либо вырезают охoG из пар охoG:C (гликозилазы – человеческая OGG1 и бактериальная FPG), либо удаляют A из пар охoG:A (гликозилазы – бактериальная MutY и человеческая MUTYH). До сих пор не ясным остается, существует ли на раннем этапе общий механизм распознавания охoG этими гликозилазами. В целом для гликозилаз ДНК предполагаются два альтернативных друг другу механизма раннего распознавания повреждённых оснований: 1) активный механизм, при котором фермент при

взаимодействии с ДНК способствует разрыву водородных связей в паре оснований и сопутствующему выворачиванию поврежденного основания из ДНК для его захвата; 2) пассивный механизм, при котором фермент захватывает повреждённое основание во внеспиральном положении в процессе спонтанного открытия пар оснований, когда водородные связи между основаниями разрушаются и поврежденное основание на короткое время оказывается вне спирали ДНК. Предполагается, что процесс спонтанного открытия-закрытия пар оснований ДНК может определять тип механизма раннего распознавания повреждений гликозилазами ДНК. Так, например, пассивный механизм раннего распознавания может быть обусловлен бóльшей склонностью поврежденного основания по сравнению с неповрежденным находиться во внеспиральном положении. Таким образом, несмотря на значимость динамики процесса открытия – закрытия пар оснований для ответа на вопрос о существовании общего механизма раннего распознавания охoG структурно отличающимися гликозилазами ДНК, текущее количество экспериментальной информации по динамике открытия – закрытия пар, содержащих охoG, весьма ограничено. Хотя в литературе можно найти работы, посвященные изучению динамики открытия – закрытия пары охoG:C, [1 , 2] ни динамика открытия – закрытия пары охoG:A, ни влияние контекста нуклеотидной последовательности ДНК на динамику открытия – закрытия пар с охoG до сих пор не исследовались. В представленной диссертационной работе изучена динамика открытия – закрытия пар охoG:C и охoG:A, содержащих повреждение 8-оксогуанин, а также аналогичных пар G:C и G:A, содержащих гуанин, в разных нуклеотидных последовательностях ДНК. Результаты работы имеют существенное значение для понимания механизмов раннего распознавания 8-оксогуанина гликозилазами ДНК.

Таким образом, в диссертационной работе исследованы два класса объектов, имеющих отношение к проблеме онкологических заболеваний: белок RL2 – основной компонент противоопухолевого препарата Лактаптин и мутагенное повреждение ДНК, 8-оксогуанин, наличие которого может привести к развитию рака при неправильном осуществлении репарации ДНК. Для изучения использовались методы магнитного резонанса ЯМР и ЭПР, которые позволяют при наблюдении за ядерными или электронными спинами изучать различные процессы молекулярных движений и структурных изменений в широкой временной шкале. При этом результаты исследованных в диссертационной работе динамических процессов: динамика основной цепи RL2, динамика проникновения RL2 в клетки человека, динамика открытия – закрытия пар оснований ДНК, содержащих 8-оксогуанин – являются важными для понимания противоопухолевых свойств белка RL2 и для понимания раннего распознавания 8-оксогуанина в репарации ДНК.

Степень разработанности темы исследования

Будучи внутренне неупорядоченными белками, все казеины склонны к образованию аморфных агрегатов, также называемых казеиновыми мицеллами. [3 , 4 , 5] Известно, что к-казеины содержат N-концевую нейтрально заряженную гидрофобную часть, называемую пара-к-казеином, стимулирующую ассоциацию молекул к-казеина в казеиновые мицеллы, а также высоко заряженную гидрофильную C-концевую часть, называемую макропептидом к-казеина, экспонированную наружу и формирующую гибкие "волоски" на поверхности казеиновых мицелл, препятствующих дальнейшей агрегации к-казеина. [3 , 6 , 7] RL2 представляет собой рекомбинантный аналог фрагмента человеческого к-казеина и первичная последовательность RL2 включает, как участок, относящийся к пара-к-казеину, так и участок, относящийся к макропептиду к-казеина. [8] По этой причине, поведение RL2 в растворе должно быть схожим с поведением к-казеина: RL2 должен обладать склонностью к формированию агрегатов в растворе. Кроме того, подобно тому, как к-казеины склонны формировать мультимерные формы, стабилизированные дисульфидными связями [9 , 10], RL2 способен образовывать ковалентные гомодимеры, благодаря наличию остатка цистеина в первичной последовательности RL2. Методом электрофореза в полиакриламидном геле было показано, что RL2 состоит из смеси мономера и димера, а исследование методом жидкостной хроматографии выявило наличие нековалентных высокомолекулярных агрегатов RL2. [8] Таким образом, RL2 в растворе для исследований ЯМР представляет собой сложную систему, состоящую из мономера, димера и агрегатов. При этом агрегаты белков ввиду их большой молекулярной массы обычно не наблюдаются в спектрах ЯМР из-за быстрой спиновой релаксации ядер (R_2). Это обстоятельство подразумевает поиск условий для проведения экспериментов ЯМР, при которых большая часть белка не находится в агрегированном состоянии. Также ввиду присутствия в растворе сразу двух форм RL2 – димера и мономера проводимое исследование методом ЯМР усложняется необходимостью соотнесения наблюдаемых сигналов в спектрах ЯМР с соответствующими формами RL2.

Для отслеживания методом ЭПР поведения RL2 в живых клетках человека при физиологических значениях температуры от спиновых меток, вводимых в белок, требуется высокая резистентность к действию биовосстановителей, присутствующих в клетках. Подходящими спиновыми метками могут быть метки на основе нитроксильных радикалов со стерически экранированным радикальным центром. [11 , 12 , 13] Примененная в диссертационной работе спиновая метка на основе стерически экранированного нитроксильного радикала, хотя и была ранее предложена в работе [14] в качестве оптимальной

для проведения внутриклеточных экспериментов ЭПР, ни разу не тестировалась в экспериментах внутри клеток. Таким образом, проведенные ЭПР исследования RL2, конъюгированного со спиновой меткой, внутри клеток человека могут обеспечить хороший задел для последующего применения этой спиновой метки во внутриклеточных экспериментах ЭПР спин-меченных биомолекул.

Динамику процесса открытия – закрытия пар азотистых оснований традиционно исследуют, применяя формализм катализируемого протонного обмена [15], который базируется на наблюдении процесса химического обмена иминопотонов, участвующих в образовании водородных связей между парами оснований, с протонами воды. Ранее было показано, что даже в случае концевых пар модельного дуплекса ДНК обмен иминопотоном с протонами воды протекает через так называемое открытое состояние пары. [16] В открытом состоянии водородные связи между парой оснований разрушены и основание, несущее иминопотон, вывернуто из спирали ДНК более чем на $\sim 30^\circ$. [17, 18] Таким образом, поскольку химический обмен иминопотоном с протонами воды связан с процессом раскрытия-закрытия пар оснований, информацию о кинетике этого процесса можно извлечь из зависимости константы скорости обмена k_{ex} иминопотоном с протонами воды от концентрации добавляемого внешнего акцептора протонов. Характерные значения величин k_{ex} для иминопотонов в ДНК попадают в чувствительный диапазон методики ЯМР переноса намагниченности с протонов воды и успешно могут быть измерены при разных значениях концентрации добавляемого внешнего акцептора протонов. При этом среди известных подходов переноса намагниченности с воды, а именно WEX [19], WEX II [20], MEXICO [21], и 2D NOESY/EXSY [22], подход CLEANEX-PM [23, 24] позволяет извлекать более точные значения k_{ex} , поскольку в этом подходе предусмотрена компенсация влияния внутримолекулярной кросс-релаксации и спиновой диффузии. Изначально методика CLEANEX-PM [23, 24] была разработана для изучения обмена в белковых молекулах. Частотный диапазон применимости CLEANEX-PM определяется мощностью (gB_1) импульса используемого спин-лока, продолжительность которого в экспериментах достигает 100 миллисекунд и больше. В спектрах ЯМР дуплексов ДНК сигналы от иминопотонов азотистых оснований могут находиться на расстоянии большем, чем 10 м.д. от сигнала протонов воды, что для постоянных магнитных полей B_0 выше, чем 500 МГц, приводит к необходимости увеличения мощности импульса выше допустимых значений, безопасных для приборов ЯМР. Таким образом, для измерения констант скорости обмена k_{ex} иминопотонов требовалась адаптация подхода CLEANEX-PM, которая успешно была реализована в диссертационной работе.

Цели и задачи исследования

Целью диссертационной работы является изучение процессов, протекающих с белком RL2 при его нахождении в растворе и в живых клетках человека, а также определение параметров динамики процесса открытия-закрытия пар оснований ДНК, содержащих повреждение 8-оксогуанин.

Для достижения целей работы были поставлены следующие задачи:

- Определить динамику основной цепи RL2 и выявить более упорядоченные участки основной цепи белка с помощью ^{15}N релаксационных экспериментов ЯМР. Получить данные об остаточной структуре RL2 в растворе с помощью метода парамагнитного усиления релаксации. Соотнести получаемые результаты ЯМР с соответствующими формами RL2 – димером и мономером.
- Разработать методику проведения экспериментов ЭПР на живых клетках человека и исследовать поведение белка RL2 в клетках аденокарциномы легких человека A549 в процессе его проникновения.
- Адаптировать подход CLEANEX-PM для измерения констант скорости обмена k_{ex} иминопротонов с протонами воды. Применить полученный протокол CLEANEX-PM и при разных концентрациях добавляемого внешнего акцептора протонов измерить значения k_{ex} иминопротонов для набора дуплексов ДНК, содержащих пары оснований G:A, G:C, oхoG:A и oхoG:C. Обработать полученные данные, применяя формализм катализируемого протонного обмена, и получить кинетические параметры процесса открытия-закрытия исследуемых пар оснований.
- Получить кривые плавления исследуемых дуплексов ДНК, извлечь термодинамические параметры плавления и установить влияние наличия пар с 8-оксогуанином на стабильность дуплексов ДНК.

Научная новизна работы

Показано, что N-концевой участок незаменимый для проявления цитотоксической активности RL2 является наиболее упорядоченным в белке и вовлечен в формирование остаточной третичной структуры RL2. Установлено, что RL2 проникает в клетки человека, преимущественно находясь в агрегированном состоянии, при этом внутри клеток человека агрегаты RL2 распадаются на отдельные белковые молекулы. Установлено, что клетки аденокарциномы легких человека A549 способны накапливать в себе RL2.

Показана применимость спиновой метки на основе нитроксильного радикала с тетраэтильными заместителями для проведения экспериментов ЭПР в живых клетках человека на спин-меченных биомолекулах при их микромолярных концентрациях при физиологических значениях температуры.

С точки зрения разработки импульсных последовательностей для проведения экспериментов ЯМР был создан протокол с адаптацией CLEANEX-PM, позволяющий измерять константы скорости обмена иминопотонов с протонами воды k_{ex} , который одновременно включает в себя 1) применение блока спин-лока на частоте, расположенной в центре диапазона между резонансами иминопотонов и резонансом протонов воды; 2) учет компенсации неравного нагрева образца за счет разной длительности блока спин-лока; 3) учет зависимости стационарной намагниченности протонов воды от длительности применяемого блока спин-лока, что позволяет избежать искажений в измеряемые значения k_{ex} и, следовательно, повысить точность получаемых величин k_{ex} .

Были получены кинетические константы скоростей открытия и закрытия для пары охoG:A, отсутствующие в литературе, а также исследован вопрос о влиянии нуклеотидной последовательности ДНК на динамику открытия – закрытия пар 8-оксогуанина с аденином и цитозином. Установлено, что динамика пары 8-оксогуанин – аденин очень сильно отличается от динамики пары 8-оксогуанин – цитозин. В первом случае 8-оксогуанин оказывается более доступным во внеспиральном положении в ДНК, что позволяет белкам репарации захватывать повреждение для дальнейшего исправления. Во втором случае 8-оксогуанин оказывается даже менее доступным во внеспиральном положении в ДНК, чем гуанин, который находится в паре с цитозином. Таким образом, во втором случае ферменты репарации должны активно задействовать свои метастабильные конформеры для принудительного выворачивания 8-оксогуанина из спирали ДНК для дальнейшего исправления повреждения. Таким образом, полученные результаты имеют существенное значение для понимания механизмов раннего распознавания 8-оксогуанина гликозилазами ДНК и хорошо согласуются с тем, что пары охoG:A и охoG:C исправляются двумя совершенно разными белками репарации.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты диссертационной работы по изучению особенностей структуры и организации RL2 в растворе, а также по исследованию проникновения RL2 в клетки человека, могут стать основой для дальнейшего улучшения противоопухолевых свойств RL2, а также могут быть полезными при разработке новых лекарственных препаратов на основе RL2.

Разработанная методика проведения длительных экспериментов ЭПР в живых клетках человека при физиологических значениях температуры с применением спиновой метки на основе нитроксильного радикала со стерически экранированным радикальным центром может успешно использоваться научным сообществом при изучении свойств биополимеров непосредственно в живых клетках.

Разработанный протокол ЯМР с адаптацией CLEANEX-PM может быть полезен широкому кругу исследователей, занимающихся изучением процессов в биомолекулах, связанных с обменом лабильных протонов с протонами воды.

Методология и методы исследования

Основными методами исследования в диссертационной работе являются методы, основанные на спектроскопиях ЯМР и ЭПР. Для исследования структуры и организации RL2 в растворе применялись методы стационарного ЭПР, двойного электрон-электронного резонанса (DEER), проводились двумерные и трехмерные импульсные эксперименты ЯМР тройного резонанса ^1H , ^{13}C и ^{15}N , а также применялся метод парамагнитного усиления релаксации (PRE). Для исследования поведения RL2 в клетках человека в процессе его проникновения проводились эксперименты стационарного ЭПР, а также конфокальной микроскопии. При исследовании динамики открытия – закрытия пар оснований использовалась методология катализируемого протонного обмена в совокупности с измерением констант скорости обмена иминопотонов с протонами воды, применяя разработанный протокол ЯМР с адаптацией CLEANEX-PM, который подробно описан в экспериментальной части к 3 главе. Для определения термодинамических параметров плавления дуплексов ДНК и отнесения сигналов ^1H иминопотонов дополнительно проводились одномерные и двумерные эксперименты ЯМР ^1H .

Положения, выносимые на защиту

- 1) В растворе RL2 образует водорастворимые агрегаты («казеиновые мицеллы»), нерегистрируемые в ЯМР, количество которых зависит от кислотности среды. Однако введение в RL2 спиновых меток позволяет зарегистрировать агрегаты RL2 методом ЭПР. Регистрируемой в ЯМР формой RL2 является мономер.
- 2) По данным многомерной спектроскопии ЯМР RL2 является внутренне неупорядоченным белком. Мономерная форма белка включает N-концевой участок (1-43 а.о.), который по данным ^{15}N релаксационных экспериментов ЯМР является наиболее упорядоченным. В участке на N-конце (1–63 а.о.) наблюдается остаточная третичная структура.

- 3) Димеры RL2 образуют агрегаты в культуральной среде, которые, проникая в живые опухолевые клетки аденокарциномы легких человека A549, распадаются на отдельные белковые молекулы.
- 4) Спиновая метка на основе нитроксильного радикала с тетраэтильными заместителями является эффективным зондом для проведения экспериментов ЭПР в течение более 10 часов в живых клетках человека при физиологических температурах на биомолекулах при их микромолярных концентрациях.
- 5) Адаптация CLEANEX-PM позволяет измерять константы скорости обмена иминопротонов ДНК с протонами воды. Основание 8-оксогуанин на 3–4 порядка более доступно в своем внеспиральном положении в ДНК, будучи в паре с аденином по сравнению с парой с цитозином. При этом в паре с цитозином доступность 8-оксогуанина меньше доступности гуанина. Дестабилизация дуплекса ДНК с парой 8-оксогуанин – цитозин происходит за счет дестабилизации соседних с ней пар оснований.

Личный вклад автора

Автор участвовал в постановке задач, разработке плана исследований, обсуждении результатов и подготовке текста публикаций по теме диссертации. Весь экспериментальный материал по ЭПР и ЯМР спектроскопии был получен и обработан непосредственно автором или непосредственно с его участием. Протокол с адаптацией CLEANEX-PM был разработан автором совместно с научным руководителем. Все образцы RL2, однородно обогащенные изотопами ^{15}N , ^{13}C - ^{15}N , а также с введенными спиновыми метками, были предоставлены автору к.б.н. Чинак Ольгой Александровной (ИХБФМ СО РАН). Эксперименты DEER ЭПР на образце RL2 проведены д.ф.-м.н. Крумкачевой Олесей Анатольевной (МТЦ СО РАН). Эксперименты конфокальной микроскопии проведены к.м.н. Чечушковым Антоном Владимировичем (ИХБФМ СО РАН). Проведенное титрование акцептора протонов 2,2-дифторэтиламина выполнено к.х.н. Антоном Валентиновичем Ендуткиным (ИХБФМ СО РАН). Образцы спиновых меток были предоставлены к.х.н. Добрыниным Сергеем Александровичем и к.х.н., доцентом Кирилюком Игорем Анатольевичем (НИОХ СО РАН). В постановке основных целей и задач диссертационного исследования принимали участие к.б.н. Чинак Ольга Александровна, чл.-корр. РАН, д.б.н., доцент Жарков Дмитрий Олегович (ИХБФМ СО РАН), к.х.н. Шернюков Андрей Владимирович, д.ф.-м.н., профессор Багрянская Елена Григорьевна (НИОХ СО РАН).

Апробация работы

Результаты и выводы диссертационной работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на международных и всероссийских научных конференциях, а также на школах молодых ученых:

1. S.S. Ovcherenko, A.V. Shernyukov, O.A. Chinak, A.S. Fomin, E.A. Sviridov, V.A. Richter, E.G. Bagryanskaya, The Dynamics of Lactaptin in solution by NMR // 15-th International School-Conference Spinus 2018. Magnetic resonance and its applications, Saint Petersburg, 2018 (стендовый доклад).
2. С.С. Овчеренко, Динамика основной цепи пептида Лактаптина по данным ¹⁵N релаксационных измерений и HETNOE // 56-я международная научная студенческая конференция: материалы секции Физические методы в естественных науках, Новосибирск, 2018 (устный доклад).
3. A.V. Shernyukov, S.S. Ovcherenko, O.A. Chinak, V.A. Richter, E.G. Bagryanskaya, The Dynamics of Lactaptin in solution by NMR and PRE // XXVIIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS 2018), Ireland, 2018 (стендовый доклад).
4. S.S. Ovcherenko, A.V. Shernyukov, O.A. Chinak, V.A. Richter, E.G. Bagryanskaya, Studying lactaptin using NMR relaxation experiments and PRE // III International conference "Spin physics, spin chemistry and spin technology" (SPCT-2018), Novosibirsk, 2018 (стендовый доклад).
5. S.S. Ovcherenko, Studying intrinsically disordered protein lactaptin by PRE // V International school for young scientists. Magnetic Resonance and Magnetic Phenomena in Chemical and Biological Physics, St. Petersburg region, 2018 (стендовый доклад).
6. С.С. Овчеренко, Изучение динамики основной цепи и структурных особенностей RL2 методом ЯМР // 57-я международная научная студенческая конференция: материалы секции Физические методы в естественных науках, Новосибирск, 2019 (устный доклад).
7. S.S. Ovcherenko, A.V. Shernyukov, O.A. Chinak, E.A. Sviridov, V.M. Golyshev, A.S. Fomin, I.A. Pyshnaya, E.V. Kuligina, V.A. Richter, E.G. Bagryanskaya, Structural and aggregation features of a human k-casein fragment with antitumor and cell-penetrating properties // ISMAR EUROMAR JOINT CONFERENCE 2019, Germany, 2019 (стендовый доклад).
8. S.S. Ovcherenko, A.V. Shernyukov, O.A. Chinak, E.A. Sviridov, V.M. Golyshev, A.S. Fomin, I.A. Pyshnaya, E.V. Kuligina, V.A. Richter, E.G. Bagryanskaya, Structural and Aggregational Features of Intrinsically Disordered Peptide RL2 -Human Milk K-Casein Fragment with Antitumor and Cell Penetrating Properties // International Conference "Magnetic Resonance - Current State and Future Perspectives", Kazan, 2019 (стендовый доклад).
9. С.С. Овчеренко, Проникновение неупорядоченного белка в клетки человека: мониторинг в реальном времени по ЭПР. // 58-я международная научная студенческая

конференция: материалы подсекции “Химическая и биологическая физика”, Новосибирск, 2020 (устный доклад).

10. E. G. Bagryanskaya, S. S. Ovcherenko, O. A. Chinak, O. A. Krumkacheva, S. A. Dobrynin, V. M. Tormyshev, I. A. Kirilyuk «EPR Study of Intrinsically Disordered Proteins in Cell» International conference and workshop "Modern development of magnetic resonance 2020", Kazan, September 28-October 2, 2020 (плeнарный доклад).

11. С.С. Овчеренко, О.А. Чинак, А.В. Чечушков, С.А. Добрынин, И.А. Кирилук, О.А. Крумкачева, В.А. Рихтер, Е.Г. Багрянская, Механизм проникновения неупорядоченного белка RL2: мониторинг по ЭПР и по конфокальной микроскопии XXXIII Симпозиум «Современная химическая физика», Туапсе, 2021 (устный доклад).

12. E. Bagryanskaya, S. Ovcherenko, O. Chinak, O. Krumkacheva, S. Dobrynin, I. Kirilyuk Gentle Delivery of Stable Nitroxide Into Cells: Real Time Monitoring by EPR ISMAR2021 (on-line), (г. Токио, Япония, 2021), (устный доклад).

13. S. Ovcherenko, O. Chinak, A. Chechushkov, S. Dobrynin, I. Kirilyuk, O. Krumkacheva, V. Richter, E. Bagryanskaya, Uptake of RL2 by Human lung cancer cells: monitoring by EPR and confocal microscopy Euromar2021 (on-line), (г. Любляна, Словения, 2021) (устный доклад).

14. S.S. Ovcherenko, A.V. Shernyukov, D.M. Nasonov, A.V. Endutkin, D.O. Zharkov, E.G. Bagryanskaya, Kinetics of Base Pair Opening-Closing Process in DNA Duplex Containing OxoG:C Pair and OxoG:A Mismatch. 2022 International Voevodsky Conference. Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes, Novosibirsk, 2022 (устный доклад).

15. D. Nasonov, S. Ovcherenko, A. Shernyukov, A. Endutkin, D. Zharkov, E. Bagryanskaya, Base-pair opening and closing kinetics in DNA duplex containing oxoG:A mismatch. MODERN DEVELOPMENT OF MAGNETIC RESONANCE 2022, Kazan, 2022 (стендовый доклад).

16. Д. Насонов, С. Овчеренко, А. Шернюков, А. Ендуткин, Д. Жарков, Е. Багрянская, Влияние окислительного повреждения охoG на стабильность дуплексов ДНК. Современные проблемы органической химии СПОХ-2023, Новосибирск, 2023 (стендовый доклад).

17. С.С. Овчеренко, Д.М. Насонов, А.В. Шернюков, А.В. Ендуткин, Д.О. Жарков, Е.Г. Багрянская, Динамика открытия пар оснований охoG:C и охoG:A по данным методики ЯМР переноса намагниченности с воды. Научная конференция молодых ученых по тематикам вирусологии, молекулярной биологии, биофизики, биотехнологии и биоинформатики (OpenBio-2023), р. п. Кольцово, 2023 (устный доклад).

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 3 статьи в научных рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК:

1. Structural and aggregation features of a human κ -Casein fragment with antitumor and cell-penetrating properties / Chinak O.A., Shernyukov A.V., **Ovcherenko S.S.** et al. // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, № 16. – P. 2919. DOI: 10.3390/molecules24162919

2. Uptake of Cell-Penetrating Peptide RL2 by Human Lung Cancer Cells: Monitoring by Electron Paramagnetic Resonance and Confocal Laser Scanning Microscopy / **Ovcherenko S.S.**, Chinak O.A., Chechushkov A.V. et al. // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, № 18. – P. 5442. DOI: 10.3390/molecules26185442

3. Dynamics of 8-Oxoguanine in DNA: Decisive Effects of Base Pairing and Nucleotide Context / **Ovcherenko S.S.**, Shernyukov A.V., Nasonov D.M. et al. // *Journal of the American Chemical Society* – 2023. – Vol. 145, № 10. – P. 5613-5617. DOI: 10.1021/jacs.2c11230

Степень достоверности результатов исследований

Достоверность результатов и выводов диссертационной работы обеспечена применением современного экспериментального оборудования и специализированных программ обработки экспериментальных данных, активно используемых мировым научным сообществом. Все полученные результаты и выводы многократно проверялись авторами на отсутствие противоречий и на согласованность с известными литературными данными, а также проходили проверку рецензентами при публикации материалов диссертационной работы в известных цитируемых научных журналах.

Соответствие специальности 1.3.17 – «Химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества»

Диссертационная работа соответствует п. 1 «химическая и спиновая динамика элементарных процессов, экспериментальные методы исследования химической структуры и динамики химических превращений», п. 5 «химические механизмы реакций и управление реакционной способностью, спиновая динамика и спиновая химия, экспериментальные методы исследования химической, энергетической и спиновой динамики» паспорта специальности 1.3.17 «Химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества» для физико-математической отрасли науки.

Объем и структура работы

Диссертационная работа состоит из оглавления, введения, трех глав, результатов и выводов, списка сокращений аббревиатур и терминов, списка используемой литературы и приложения. Полный объем диссертационной работы составляет 140 страниц с 54 рисунками и 7 таблицами. Список литературы включает 203 наименований.

Благодарности

Автор выражает благодарность своему научному руководителю к. х. н. Шернюкову Андрею Владимировичу, а также д.ф.-м.н., профессору Багрянской Елене Григорьевне за многочисленные наставления, ценные советы при проведении исследований и оформлении экспериментальных данных, за плодотворное обсуждение полученных результатов, а также за возможность реализации в научной среде.

Автор благодарен к.б.н. Чинак Ольге Александровне и чл.-корр. РАН, д.б.н., доценту Жаркову Дмитрию Олеговичу за весомый вклад в реализацию диссертационной работы. Также автор выражает благодарность д.ф.-м.н. Крумкачевой Олесе Анатольевне за помощь в проведении экспериментов ЭПР и в моделировании спектров ЭПР, к.м.н. Чечушкову Антону Владимировичу за проведенные исследования конфокальной микроскопии, к.х.н. Антону Валентиновичу Ендуткину за проведенное титрование ДФЭА, к.х.н. Добрынину Сергею Александровичу и к.х.н. Кирилюку Игорю Анатольевичу за предоставленные образцы спиновых меток и нитроксильных радикалов.

Автор благодарит сотрудников лаборатории магнитной радиоспектроскопии НИОХ СО РАН, в частности Насонова Дмитрия Михайловича, к.х.н. Асанбаеву Наргиз Байузаковну, к.ф.-м.н. Пархоменко Дмитрия Александровича, к.ф.-м.н. Ломанович Константина Александровича, к.ф.-м.н. Марьясова Александра Георгиевича, за оказанные помощь и поддержку при выполнении диссертационной работы, а также за создание атмосферы для плодотворной работы.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Внутренне неупорядоченные белки

Ранее доминировала точка зрения, что функция любого белка определяется его пространственной структурой, которая кодируется в первичной последовательности аминокислотных остатков. Эта концепция начала активно развиваться с момента представления Эмилем Фишером гипотезы «ключ замок» для описания функции ферментов [25 , 26]. Согласно гипотезе специфичность любого фермента к его субстратам определяется специфической формой активного центра молекулы фермента, которая точно соответствует форме молекулы субстрата. Гипотеза о том, что из пространственной структуры белка следует его функция, подтверждалась работами Мирского и Полинга [27] и Сиань Ву [28], посвященными теоретическому описанию процессов денатурации и коагуляции белков и обобщающие набор экспериментальных данных. Среди таких данных, например, можно выделить корреляцию между потерей активности пепсина и количеством денатурированного белка. [29] Примечательно, что ни Сиань Ву ни Мирский и Полинг, не сославшись на работу Фишера, пришли к одному и тому же выводу о том, что функция белка (или его нативные свойства) зависит от его пространственной структуры (уникально определенной конфигурации). В работе [30] Каруш подытожил, что наблюдаемые свойства сывороточных альбуминов конкурентно связываться с субстратами различной формы связаны с существованием в растворе набора схожих по энергии «конфигураций» белка, каждая из которых отвечает за связывание с конкретной молекулой субстрата. Это явление Каруш назвал «конфигурационной адаптивностью». Независимо от Каруша несколько позднее Кошланд представил гипотезу об «индуцированном соответствии», которая по прежнему предполагает, что для функции белка важна его пространственная структура, которая при этом обладает гибкостью и способна подстраиваться под структуру субстрата для его эффективного связывания. При этом субстрат также обладает гибкостью, что позволяет ему связываться с ферментом [31 , 32]. Таким образом, «конфигурационная адаптивность» и «индуцированное соответствие» стали первыми предположениями о том, что для функции белка важны его существенные конформационные изменения. При этом до конца неисследованным оставался вопрос о том, происходит ли конформационное изменение белка в процессе его связывания с субстратом или же в этом процессе субстрат связывается с наиболее подходящей конформацией среди ансамбля структур. Подтверждение модели «индуцированного соответствия», предполагающей конформационное изменение белка при его связывании с субстратом, впервые было получено в работах [33 , 34], посвященных изучению структуры конформаций дрожжевой гексокиназы в свободном и в

связанном с глюкозой и с глюкозо-6-фосфатом состояниях методами рентгеноструктурного анализа (РСА) и малоуглового рентгеновского рассеяния (МРР). Впоследствии модель Кошланда получила название модели «рука перчатки». [35]

С накоплением экспериментальных данных набором физико-химических методов стало понятно, что не все белки при физиологических условиях обладают заданной пространственной структурой. Так, например, в одной из ранних работ [36], исследуя структуру фосвитина методами дисперсии оптического вращения (ДОВ) и кругового дихроизма (КД), был сделан вывод о том, что фосвитин при физиологических условиях обладает неупорядоченной структурой. Немного позже то же самое заключение в отношении фосвитина было сделано на основании данных метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР). [37] Методы ДОВ и КД, дающие информацию о структуре белка в целом, не позволяют идентифицировать локальные неупорядоченные участки белка. Первым методом, активно используемым для обнаружения таких локальных участков, стал метод РСА. Поскольку в методе важно, чтобы рентгеновские лучи рассеивались когерентно, наличие неупорядоченных участков из-за их вариативного расположения среди молекул белка приводили к тому, что на карте электронной плотности возникали области недостающей электронной плотности, относящиеся к атомам неупорядоченных участков белка. Так, при исследовании структуры нуклеазы золотистого стафилококка методом РСА два участка белка были идентифицированы как неупорядоченные. [38] При исследовании белка вируса табачной мозаики методом РСА было обнаружено, что на карте электронной плотности не проявлялись атомы участков, важных для функционирования белка. [39] Практически одновременно с применением метода РСА для обнаружения неупорядоченных участков белка начали появляться работы по установлению таких участков, применяя метод ЯМР. В одной из первых таких работ [40], сравнивая протонные спектры ЯМР гистона H5 и образованного из него пептида GH5 (22-100 а.о.), по совпадающим характерным областям спектра (6–9 м.д., 0–0.8 м.д) было установлено, что третичная структура, наблюдаемая в H5, полностью содержится в пептиде GH5, в то время как N-концевой (1-21 а.о.) и C-концевой (101 – 185 а.о.) участки являются неупорядоченными. С развитием многомерной ЯМР спектроскопии появилась возможность устанавливать структуру белка в растворе, что позволило находить в белках неупорядоченные участки, которые тем не менее являются функциональными [41]. В дальнейшем многомерная ЯМР спектроскопия позволила обнаружить белки, неупорядоченные от начала и до конца, но при этом являющиеся функциональными. [42, 43]. Таким образом, принимая во внимание обнаружение внутренне неупорядоченных белков (англ. *Intrinsically disordered proteins – IDPs*) и неупорядоченных участков в белках (англ. *Intrinsically disordered regions – IDRs*) парадигма «первичная

последовательность → пространственная структура → функция белка» нуждалась в пересмотре.

С открытием IDP и белков с IDR научный интерес был сфокусирован на установлении функций таких белков и на изучении процессов, где они задействованы. Было показано, что IDP участвуют в процессах регуляции. Так, например белок p21 ингибирует циклинзависимые киназы (Cdk), которые участвуют в регуляции клеточного цикла. [44] Было установлено, что N-концевой участок p21 принимает определенную стабильную конформацию при образовании комплекса с Cdk2, в то время как в свободном состоянии p21 является полностью неупорядоченным. На основании того, что p21 связывает и ингибирует целое множество циклинзависимых киназ (A-Cdk2, E-Cdk2, D-Cdk4), был сделан вывод, что переход от неупорядоченного к упорядоченному состоянию позволяет p21 по-разному специфически связываться с отличающимися по структуре белками. [43] Было показано, что IDP участвуют в регуляции трансляции. Так, 4E-связывающие белки 4E-BP1 и 4E-BP2 ингибируют трансляцию, связываясь с фактором инициации трансляции eIF4E. Установлено, что в свободном состоянии белки 4E-BP1 и 4E-BP2 являются полностью неупорядоченными, при этом за связывание с eIF4E ответственен лишь короткий центральный участок в 4E-BP1 и 4E-BP2. При связывании с eIF4E белки 4E-BP1 и 4E-BP2 остаются неупорядоченными за исключением упомянутого выше короткого участка. [42 , 45] Было обнаружено, что IDP вовлечены в процессы развития наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний – болезней Альцгеймера и Паркинсона. Например, IDP человеческий α -синуклеин широко распространен в пресинаптических окончаниях. Его агрегация в амилоидные фибриллы является ключевым этапом на пути развития болезни Паркинсона. [46 , 47 , 48] Другим примером является IDP тау-белок, который способствует сборке и стабилизации микротрубочек, необходимых для правильного функционирования нейронов. Гиперфосфорилирование тау-белка приводит к образованию из него нейрофибриллярных клубков, приводящих к гибели нейронов, развитию болезни Альцгеймера. [47 , 49 , 50] На сегодняшний день среди функций IDP и белков с IDR выделяют регуляцию транскрипции и трансляции, передачу клеточных сигналов, фосфорилирование белков, регуляцию сборки больших мультибелковых комплексов. [51 , 52] Кроме того, шапероны белков и РНК также являются белками с IDR. [53]

Как видно выше, IDP и белки с IDR составляют крайне важный класс белков и ответственны за выполнение определенных функций, где важно присутствие неупорядоченных участков. Примечательно, что IDP и белки с IDR широко распространены в клетках эукариот и по самым скромным подсчетам составляют порядка 15–45% среди всех белков эукариот. [51] Для такого большого количества белков создаются специальные базы данных, одна из которых

база данных IDEAL. [54] На текущий момент известно, что по составу остатков аминокислот IDP и участки IDR сильно отличаются от упорядоченных белков. Предполагается, что остатки аминокислот, способствующие образованию упорядоченной структуры, являются Trp, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val, Cys и Asn, в то время как IDP и участки IDR обогащены остатками Ala, Arg, Gly, Gln, Ser, Glu, Lys и Pro. [55] Таким образом, по аналогии с тем, что в первичной последовательности закодирована структура белка можно сделать вывод, что из первичной последовательности IDP и IDR следует их неупорядоченность. По этой причине, неупорядоченность белка активно прогнозируется по его первичной последовательности. [56]

1.1.1 Казеины

Белки молока, казеины – одни из числа первых белков, которые были признаны функциональными, но неупорядоченными. [57 , 58] Если глобулярные белки в целом более гидрофобны и менее заряжены при физиологических значениях pH, то IDP, наоборот, как правило, обладают меньшей гидрофобностью и большим зарядом при таких значениях pH. [59] Это позволяет IDP принимать развернутые конформации белка в растворе и препятствует ассоциации между молекулами IDP за счет электростатического отталкивания. Однако казеины содержат так называемые «липкие последовательности» аминокислотных остатков, богатые Pro и Gln, стимулирующие белок – белковые взаимодействия, которые по большей степени малоспецифичны к первичной последовательности белка. [5 , 60] Кроме того, богатые Pro и Gln первичные последовательности казеинов способны образовывать конформацию левозакрученной полипролиновой спирали PP-II, наличие которой также стимулирует белок-белковые взаимодействия. [5 , 61] Таким образом, в норме все казеины образуют аморфные агрегаты, также называемые казеиновыми мицеллами. Эти агрегаты позволяют транспортировать фосфат кальция, который практически нерастворим в воде, и, таким образом, решать задачу биоминерализации мягких и твердых тканей. Среди основных драйверов формирования казеиновых мицелл выделяют 1) большое количество слабых гидрофобных взаимодействий между казеинами и 2) образование кальций-фосфатных мостиков между фосфорилированными остатками аминокислот (Рисунок 1). [4 , 5 , 62] При этом к-казеины в отличие от других типов казеинов плохо фосфорилируются и остаются в фазе раствора при повышенных концентрациях Ca^{2+} , в то время как α - и β -казеины при таких концентрациях Ca^{2+} выпадают в осадок. [4 , 63] Таким образом, основным драйвером формирования казеиновых мицелл из к-казеина являются гидрофобные взаимодействия. Помимо формирования казеиновых мицелл некоторые казеины способны при физиологических условиях образовывать

токсичные амилоидные фибриллы. Среди таких белков бычий к-казеин [64] и бычий α_{S2} -казеин [65]. Однако добавление к любому из них бычьего α_{S1} -казеина или бычьего β -казеина ингибирует образование амилоидных фибрилл, обеспечивая формирование казеиновых мицелл. [65 , 66] Предполагается, что каждый из казеинов за счет неспецифических взаимодействий с другими казеинами способен в некоторой степени ингибировать образование из них амилоидных фибрилл и стимулировать формирование казеиновых мицелл, тем самым проявляя функции шаперонов по отношению к другим казеинам. [5]

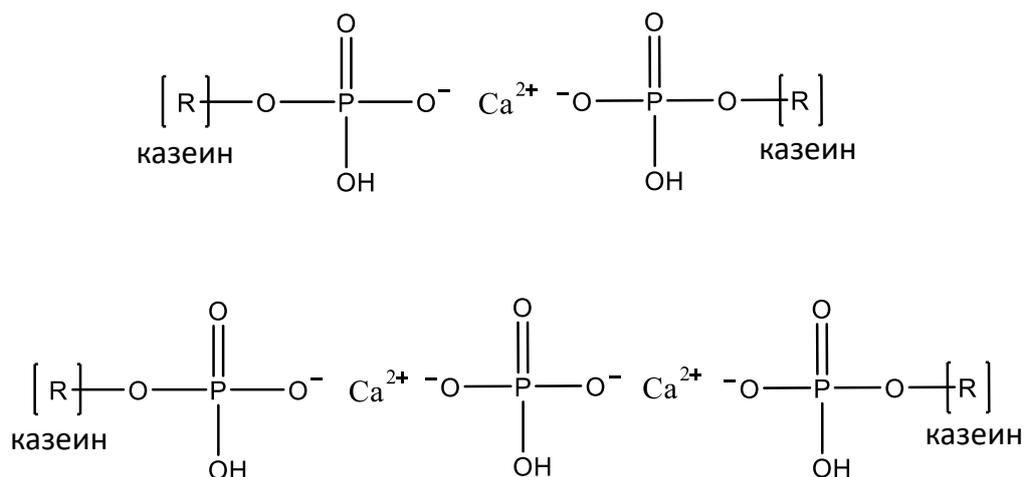


Рисунок 1 – Примеры образования кальций-фосфатных мостиков между казеинами.

Помимо гидрофобных взаимодействий и образования кальций-фосфатных мостиков, как оказалось, для формирования стабильных казеиновых мицелл в молоке важно наличие к-казеина. Так, было обнаружено, что наличие к-казеина стабилизирует казеиновые мицеллы в присутствии Ca^{2+} . [63] При этом содержание к-казеина в мицелле обратно коррелирует с её размером: чем больше содержание к-казеина, тем меньше размер мицеллы. [67 , 68] Установлено, что к-казеины преимущественно находятся на поверхности казеиновых мицелл, формируя поверхностный стабилизирующий слой казеиновой мицеллы. [3 , 67 , 69 , 70] Известно, что к-казеины состоят из N-концевой нейтрально заряженной гидрофобной части, также называемой пара-к-казеин, а также высоко заряженного гидрофильного C-концевого участка, называемого макропептидом к-казеина. Поэтому предполагается, что пара-к-казеин за счет гидрофобных взаимодействий стимулирует ассоциацию к-казеинов с мицеллами, в то время как C-концевой макропептид, экспонированный наружу и формирующий гибкие "волоски" на поверхности мицелл [3], предотвращает последующий рост мицеллы. Таким образом, к-казеин выступает в качестве терминатора роста казеиновой мицеллы, и поэтому его расположение на поверхности казеиновых мицелл возникает естественным образом. [4 , 6 , 7]

Казеины в отличие от глобулярных белков обладают низкой консервативностью остатка Cys. Например, среди α_{S1} -казеинов остаток Cys присутствует в первичных последовательностях

α_{S1} -казеинов мышей и крыс, но отсутствует в α_{S1} -казеинов кроликов и коров, при этом в α_{S1} -казеине человека присутствует целых три остатка Cys. Наибольшей консервативностью среди казеинов млекопитающих обладает остаток Cys у N-концевого участка к-казеинов, который варьируется положениями 29, 30 и 31 в первичной последовательности к-казеинов. [71] Наличие остатков Cys в казеинах приводит к появлению межмолекулярных дисульфидных связей между казеинами и к формированию мультмерных форм казеинов. Так, например, в казеиновых мицеллах коровьего молока обнаружены гомомультимерные формы бычьего к-казеина, образованные дисульфидными связями между остатками Cys31, Cys108 (Рисунок 2). [9] В казеиновых мицеллах человеческого молока обнаружены гетеромультимерные формы человеческого к-казеина, образованные дисульфидными связями между остатком Cys30 к-казеина и тремя остатками Cys α_{S1} -казеина (Рисунок 2). [72] Хотя роль дисульфидных мостиков в структуре казеиновых мицелл до сих пор остается до конца неизученной, однако предполагается, что гомомультимерные и гетеромультимерные формы к-казеинов способствуют им обволакивать поверхности казеиновых мицелл для их дальнейшей стабилизации. [10, 71]

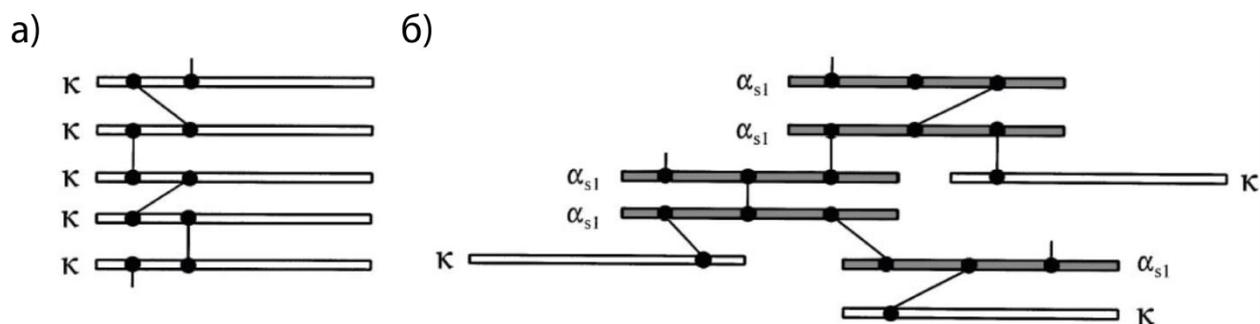


Рисунок 2 – Схематическое изображение гомомультимерной формы бычьего к-казеина (а) и гетеромультимерной формы человеческого к-казеина (б). Закрашенные кружки обозначают положения остатков Cys, а линии их соединяющие – дисульфидные связи. Обозначения k и α_{S1} означают молекулы к-казеинов и α_{S1} -казеинов, соответственно. Рисунок адаптирован из [10].

1.1.2 Рекомбинантный аналог лактапина RL2

Ранее в лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН из человеческого молока был выделен пептид массой 8.6 кДа, являющийся фрагментом человеческого к-казеина и составляющий его первичную последовательность 57-130 а.о. Этот пептид показал апоптотическую активность по отношению к клеткам аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 в культуре и был назван лактапином. [73] В этой же лаборатории были сконструированы плазмиды, позволяющие получать рекомбинантные аналоги лактапина в *E.*

coli. Так были получены рекомбинантные аналоги RL1 и RL2, составляющие 66-134 а.о. и 24-134 а.о. первичной последовательности человеческого к-казеина, соответственно. Помимо участков первичной последовательности к-казеина у RL1 и RL2 в положении первого аминокислотного остатка находится Met, необходимый для трансляции в клетках прокариот, а также на С конце находится участок GGSНННННН, включающий полигистидиновую последовательность, необходимую для её координации ионами металлов в аффинной хроматографии и, таким образом, для эффективного выделения RL1 и RL2 из лизата *E. coli*. RL2 включает полную последовательность а.о. лактапина и содержит единственный остаток Cys, являющийся высококонсервативным среди к-казеинов млекопитающих. Благодаря наличию Cys рекомбинантный аналог RL2 образует -S-S- ковалентно связанные гомодимеры и представляет собой смесь мономера и димера в схожих количествах. [8] Поскольку RL2 также содержит N-концевой гидрофобный участок к-казеина, который ответственен за образование казеиновых мицелл из к-казеина, то предполагается что RL2, так же как и к-казеин, способен образовывать аморфные агрегаты. Было показано, что инкубация клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 с 60 мкг/мл RL1 или RL2 в течение 72 часов приводит к уменьшению жизнеспособности клеток MCF-7 на ~10% и 60% в культуре, соответственно. Таким образом, участок 24-65 а.о. человеческого к-казеина, присутствующий в RL2 и ответственный за димеризацию и предположительно агрегацию RL2, но отсутствующий в RL1, является важным для цитотоксической активности RL2. Кроме того, в аналогичном эксперименте было показано, что RL2 не уменьшает жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток MSC в культуре. [8]

При изучении активности RL2 к раковым опухолям мышей в экспериментах *in vivo* было обнаружено, что внутривенная инъекция 5-50 мг/кг RL2 в течение 3-5 дней существенно замедляет рост опухолей без проявления явных побочных эффектов и эта терапия позволяет в 1.5 раза увеличить продолжительность жизни мышей с трансплантированными раковыми клетками. Было также показано, что терапия RL2 существенно подавляет развитие метастазов в печени, образованных клетками гепатомы печени мышей HA-1. [74] Было обнаружено, что RL2 в разной степени проявляет цитотоксическую активность к раковым клеткам человека *in vitro*. Так, например, наиболее чувствительными к действию RL2 оказались клетки рака молочной железы MCF-7 и MDA-MB-231, в то время как клетки аденокарциномы прямой кишки SW837, клетки рака легких A549, а также клетки эпидермальной карциномы гортани Нер-2 оказались более резистентными к действию RL2. [8, 75] При этом для мышей с трансплантированными человеческими клетками MDA-MB-231 терапия RL2, описанная в [74], замедляла рост опухолей в среднем на 43% без заметного токсического воздействия на мышей. [75] К

настоящему моменту успешно завершены доклинические испытания препарата Лактаптин, действующим веществом которого является RL2. [76]

Было выявлено, что RL2 эффективно проникает, как в опухолевые, так и в нормальные клетки человека: на клетках MCF-7 и MSC, инкубированных с конъюгатом RL2 – флуоресцентный краситель TAMRA, была показана внутриклеточная локализация конъюгата RL2, в то время как при инкубации клеток с TAMRA внутриклеточная локализация красителя не была выявлена. При этом RL2 был обнаружен в клетках даже после 24 часов инкубации клеток и в следовых количествах после 48 часов инкубации клеток. [75] Примечательно, что несмотря на проникновение в раковые (MCF-7) и в нормальные (MSC) клетки человека, RL2 проявляет цитотоксичность только к раковым клеткам. [8] Обнаружено, что при проникновении в клетки рака молочной железы человека MDA-MB-231 RL2 локализуется на митохондриях, как в мономерной, так и в димерной форме, связывается с белком внешней мембраны митохондрии TOM70, который является ключевым для функционирования митохондрий, и, таким образом, подавляет выработку АТФ, за которой следует гибель клетки. Предполагается, что подавление выработки АТФ приводит к метаболическому перепрограммированию клеток и поскольку для разных типов раковых клеток, а также для нормальных клеток, метаболизм отличается, это может объяснить различающуюся чувствительность клеток к цитотоксическому действию RL2. [77]

1.2 Изучение внутренне неупорядоченных белков методами магнитного резонанса

1.2.1 ЯМР спектроскопия

IDP в растворе представляют собой большое количество схожих по энергии конформеров белка. Каждая молекула IDP подвержена постоянному переходу от одного конформера к другому. Некоторые из конформеров IDP могут обладать элементами вторичной структуры. Поэтому, несмотря на то, что в IDP отсутствуют хорошо определенная вторичная и третичная структуры, IDP обладают участками со склонностью к образованию вторичной структуры, также называемыми участками с остаточной вторичной структурой. Среди внутренне неупорядоченных белков остаточная структура IDP в растворе в целом коррелирует с вторичной структурой этих же IDP в связанном состоянии с белками-мишенями и поэтому предполагается, что участки белка с остаточной структурой могут служить в качестве начальных точек связывания с белками-мишенями, облегчая последующее связывание более гибких участков IDP. Предполагается, что такой механизм связывания позволяет IDP

специфически связываться более чем с одной мишенью. [78 , 79] При этом, как было показано на примере гомологов внутренне неупорядоченного трансактивирующего домена р53 в растворе, отличия в остаточной структуре гомологов IDP превышают отличия в первичной последовательности, в то время как динамика основной цепи среди гомологов р53 практически не меняется. [80] Таким образом, по-видимому, динамика основной цепи IDP обладает большей консервативностью, чем первичная последовательность или остаточная структура, и, следовательно, её изучение представляет наибольший интерес.

ЯМР является одним из наиболее информативных методов высокого разрешения при изучении внутренне неупорядоченных белков, поскольку ЯМР позволяет на уровне остатков аминокислот измерять динамику основной цепи белка в растворе, а также определять участки основной цепи IDP, обладающие остаточной вторичной структурой. Кроме того, введение в белок парамагнитной спиновой метки позволяет применить подход усиления парамагнитной релаксации (PRE) в спектроскопии ЯМР и зарегистрировать структурную организацию IDP в растворе в радиусе до 25 Å от парамагнитного центра спиновой метки. [81 , 82 , 83].

1.2.1.1 Отличия между глобулярными белками и IDP на спектрах ЯМР

Отличия в динамике и в структурной организации между IDP и глобулярными белками непосредственно влияют на получаемые параметры ЯМР. По этой причине наиболее распространенные подходы ЯМР к изучению глобулярных белков становятся ограниченно применимыми или неприменимыми вовсе при изучении IDP. Например, из-за отсутствия стабильной заданной пространственной структуры белка эксперименты ^1H - ^1H NOE, которые являются основным источником получения структурной информации для глобулярных белков, ограниченно применимы при изучении IDP. Среди важных отличий между глобулярными белками и IDP является возможность для глобулярных белков ввести единое время корреляции вращения белка как целого, тогда как IDP можно характеризовать лишь локальными эффективными временами корреляции вращения, которые в среднем оказываются меньше тех, которые получаются для упорядоченных белков схожего размера. Отличия в динамике оказывают значительное влияние на значения химических сдвигов сигналов ЯМР и релаксационных параметров. Так, при получении спектра ЯМР IDP за счет усреднения среди конформеров белка разброс в химических сдвигах, получаемый из-за разного локального окружения ядер, существенно уменьшается, приводя к частичному перекрытию сигналов. С другой стороны, бóльшая гибкость и подвижность IDP в растворе оказывают существенное влияние на релаксацию ядер. Если обмен между конформерами IDP может приводить к

уширению сигналов ЯМР, то быстрые локальные движения в IDP наоборот, приводят к уменьшению скорости спиновой релаксации и сужению линий ЯМР, улучшая спектральное разрешение (Рисунок 3) [82].

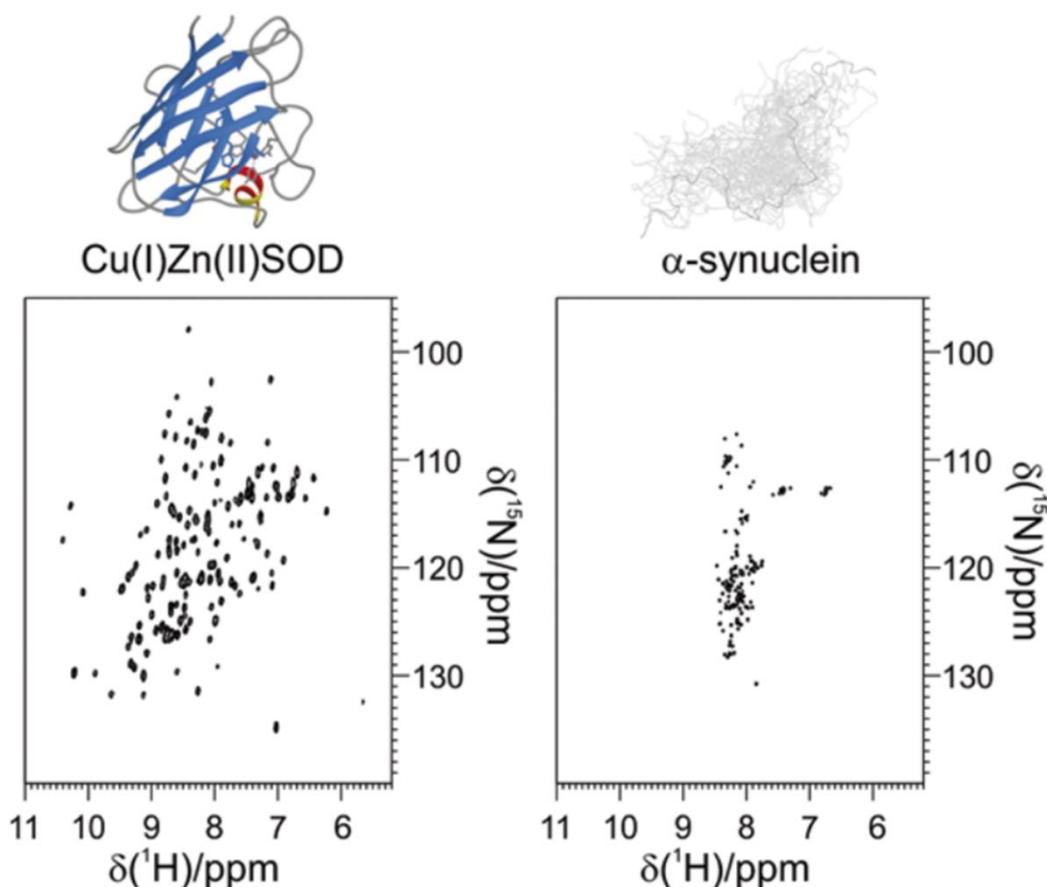


Рисунок 3 –Характерный вид спектров ^1H – ^{15}N HSQC глобулярных белков (слева) и IDP (справа) на примере упорядоченного белка – Cu/Zn–супероксиддисмутаза и внутренне неупорядоченного белка – α –синуклеина. Рисунок взят из [82].

Другим существенным различием между глобулярными белками и IDP, напрямую влияющим на качество спектров ЯМР, является высокая доступность воды ко всем лабильным протонам IDP, в том числе к амидным протонам основной цепи белка, регистрируемым в спектрах ^1H – ^{15}N HSQC. За счет высокой доступности воды при физиологических значениях температуры и pH обмен амидных протонов белка с протонами воды приводит к уширению, если не к исчезновению, кросс-пиков амидных протонов в спектрах ^1H – ^{15}N HSQC. По этой причине в литературе большинство работ, посвященных изучению IDP методом ЯМР, выполнены при пониженных температурах и слабо-кислых значениях pH – условиях, позволяющих существенно замедлить скорость обмена амидных протонов с протонами воды. Важно отметить, что к настоящему моменту уже существуют подходы ЯМР к изучению IDP в физиологических условиях, которые опираются на корреляционные ^{13}C – ^{15}N эксперименты ЯМР с регистрацией на ядрах ^{13}C . Поскольку ядра ^{13}C не участвуют в процессе обмена с

растворителем, можно получить хорошего качества корреляционные спектры ^{13}C - ^{15}N ЯМР внутренне неупорядоченных белков в физиологических условиях. Также такие эксперименты ЯМР позволяют достичь лучшего спектрального разрешения по сравнению с ^1H - ^{15}N HSQC [82, 84]. Однако поскольку гиромагнитное отношение ядер ^{13}C в ~ 4 раза меньше гиромагнитного отношения ядер ^1H , эксперименты ЯМР с регистрацией на ядрах ^{13}C оказываются гораздо менее чувствительными, чем эксперименты ЯМР с регистрацией на ядрах ^1H . Поэтому при отсутствии специального криодатчика ЯМР, оптимизированного для регистрации на ядрах ^{13}C , позволяющего увеличить чувствительность получаемых спектров, зачастую при исследованиях IDP проводят эксперименты ^1H - ^{15}N HSQC.

1.2.1.2 Остаточная вторичная структура IDP по данным химических сдвигов

Величины химических сдвигов ядер зависят от локального окружения этих ядер в макромолекуле. Для набора глобулярных белков было обнаружено, что значения химических сдвигов ядер ^1H , ^{13}C , ^{15}N основной цепи белка коррелируют с тем, в каком типе вторичной структуры находится аминокислотный остаток. [85] Имея однородно обогащенный ^{13}C , ^{15}N образец белка, становится возможным измерить значения химических сдвигов ядер $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N , $^1\text{H}^{\alpha}$, $^{13}\text{C}'$, $^{13}\text{C}^{\alpha}$, $^{13}\text{C}^{\beta}$ основной цепи, которые в разной степени чувствительны к геометрии основной цепи и, таким образом, несут в себе информацию о вторичной структуре белка. Для установления элементов вторичной структуры белка измеренные химические сдвиги сравнивают с прогнозируемыми для ситуации полностью неупорядоченной основной цепи, так называемой модели «случайной катушки» (англ. *random coil*). [86] По величине отклонения измеренного химического сдвига от прогнозируемого для модели «случайной катушки» можно сделать вывод о типе вторичной структуры. Так, например, было показано, что это отклонение отрицательно для $^{13}\text{C}^{\alpha}$ и положительно для $^{13}\text{C}^{\beta}$, если аминокислотный остаток находится в β -листе и, наоборот, это отклонение положительно для $^{13}\text{C}^{\alpha}$ и отрицательно для $^{13}\text{C}^{\beta}$, если аминокислотный остаток расположен в α -спирали. [87]

В случае IDP в растворе химические сдвиги являются результатом усреднения среди конформеров белка, обменивающихся друг с другом на масштабах времен вплоть до миллисекунд. [81] Поэтому, если часть конформеров в одном и том же участке белка образует одни и те же элементы вторичной структуры, то наблюдаемые в спектрах ЯМР химические сдвиги ядер этого участка будут тем ближе к значениям характерным для элементов вторичной структуры, чем больше доля конформеров белка их образующих. Таким образом, в случае IDP в растворе величины химических сдвигов несут в себе информацию об остаточной вторичной

структуре белка. Однако поскольку для IDP разница между измеряемыми величинами химических сдвигов и прогнозируемыми для модели «случайной катушки» является малой, то основная сложность в определении остаточной вторичной структуры IDP заключается в правильном задании точных значений химических сдвигов «случайной катушки». Между тем, в литературе отличия в таблицах значений химических сдвигов «случайной катушки», экспериментально определяемых на разных модельных коротких пептидах и используемых разные подходы к их обсчету, могут вносить существенные искажения при выявлении участков IDP со склонностью к образованию вторичной структуры. [88] В частности для точного выявления участков IDP с остаточной структурой важно различать вклады от остаточной структуры и первичной последовательности в химические сдвиги ядер. Поэтому современные подходы обсчета величин химических сдвигов «случайной катушки» учитывают влияние предыдущего и последующего аминокислотного остатка в первичной последовательности на получаемые значения химических сдвигов. [89 , 90] Кроме того, для точного выявления участков IDP с остаточной структурой химические сдвиги «случайной катушки» необходимо калибровать на те же самые значения температуры и pH, в которых проводились эксперименты ЯМР и извлекались значения химических сдвигов ядер основной цепи IDP. [81]

1.2.1.3 Динамика основной цепи белка по данным ^{15}N R_1 , R_2 и ^1H - ^{15}N NOE

Биополимеры представляют собой динамические объекты, в которых протекают процессы на разных временных шкалах и, поскольку эти процессы влияют на подвижность магнитных ядер, таких как ^1H , ^{13}C , ^{15}N , это приводит к наведению флуктуаций локального магнитного поля в месте расположения ядерных спинов. Молекулярные движения происходят на разных временных шкалах и вызываемые флуктуации магнитного поля также характеризуются разными временными масштабами. Параметром, характеризующим скорость флуктуаций магнитного поля, а значит и скорость наблюдаемых в ЯМР динамических процессов в биомолекулах, является временем корреляции τ_c . Флуктуации магнитного поля приводят к спиновой релаксации ядер, временными параметрами которой являются величины T_1 и T_2 . T_1 является характерным временем возврата разницы населенностей энергетических уровней системы спинов к термически равновесному значению. Таким образом, T_1 связано с процессом обмена энергии между спиновыми состояниями и остальными степенями свободы системы, называемыми решеткой, и называется временем спин-решеточной релаксации. T_2 является характерным временем потери спиновой когерентности и называется временем спин-спиновой релаксации. Поскольку флуктуации магнитного поля определяют скорость спиновой

релаксации ядер $R_1 = 1/T_1$ и $R_2 = 1/T_2$, то величины R_1 и R_2 зависят от времени корреляции τ_c , поэтому, измеряя параметры релаксации, можно получить информацию о динамических процессах, наблюдаемых в биомолекулах, на разных временных масштабах.

Как уже было отмечено выше, изучение динамики основной цепи IDP представляет наибольший интерес, поскольку она наиболее точно воспроизводится среди гомологов IDP, [80] а также её изучение позволяет определить участки основной цепи IDP с меньшей мобильностью и, следовательно, большей упорядоченностью. Поскольку считается, что связывание IDP с белками мишенями стартует именно с более упорядоченных участков IDP, выявление таких участков представляет наибольший интерес. [78, 79]

Проведение релаксационных экспериментов ЯМР на ядрах азота ^{15}N амидных групп основной цепи белка (Рисунок 4) – рядовой способ получения информации о динамике основной цепи белка в диапазоне времен пикосекунд-наносекунд. В частности величины ^{15}N R_2 также чувствительны к процессам конформационного обмена, которые протекают на масштабе времен микросекунд-миллисекунд, поэтому измерение величин ^{15}N R_2 позволяет получить информацию и о таких процессах. Для ядер азота ^{15}N основной цепи белка основными механизмами спиновой релаксации являются релаксация за счет анизотропии химического сдвига ядер ^{15}N (вклад CSA – chemical shift anisotropy) и релаксация, обусловленная диполь-дипольным взаимодействием между соседними ядрами ^{15}N и ^1H (Рисунок 4) (вклад DD – dipole-dipole interaction). Поскольку суммарная спиновая релаксация ядер определяется суммой вкладов от различных механизмов релаксации, можно записать: $R_1 = R_1^{DD} + R_1^{CSA}$; $R_2 = R_2^{DD} + R_2^{CSA} + R_{EX}$, где $R_{1,2}^{DD}$ и $R_{1,2}^{CSA}$ – вклады в величины $R_{1,2}$ обусловленные механизмами релаксации DD и CSA, соответственно, а величина R_{EX} – вклад в наблюдаемую релаксацию R_2 от процессов обмена (например, обмена амидных протонов с протонами воды [91]). Поскольку ближайшее молекулярное окружение ядер азота ^{15}N в основной цепи белка является схожим и связь между ядрами ^{15}N и ^1H везде можно считать одинаковой, то вклады CSA и DD будут слабо различаться для ядер ^{15}N основной цепи белка, расположенных в разных аминокислотных остатках. Поэтому регистрируемые различия в параметрах релаксации ядер ^{15}N основной цепи связаны с отличием в локальной динамике. [81, 82, 92, 93]

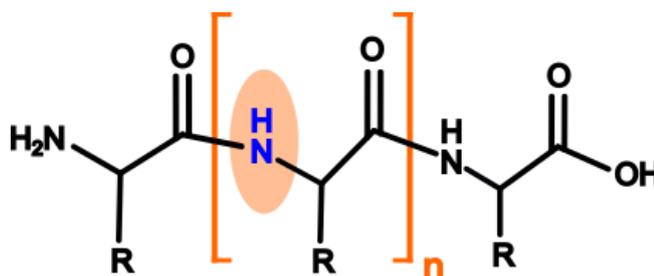


Рисунок 4 – Схематическое изображение основной цепи белка

Согласно теории релаксации Редфилда [94] для системы связанных спинов ^1H - ^{15}N спиновая релаксация вызывается флуктуациями магнитного поля, создаваемыми молекулярными движениями, на частотах ω_N , ω_H , $\omega_H - \omega_N$, $\omega_H + \omega_N$ и при нулевой частоте, где $\omega_{H,N}$ – Ларморовские частоты ядер ^1H и ^{15}N . При этом, предполагая стохастическую природу молекулярных движений, эти движения описываются распределением по частотам, также называемым функцией спектральной плотности $J(\omega)$. В простом виде, рассматривая флуктуации поля, вызванные сферически симметричным жестким ротатором, $J(\omega)$ представляется в виде:

$$J(\omega) = \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \quad (1)$$

где τ_c – время корреляции флуктуаций магнитного поля, вызванных вращением вектора связи NH амидной группы основной цепи белка в предположении изотропного вращения. Каждая амидная группа основной цепи белка характеризуется своим временем τ_c , которое зависит от подвижности аминокислотного остатка в полипептидной цепи. Характерный вид функции спектральной плотности $J(\omega)$ согласно уравнению (1) при отличающихся временах τ_c представлен на рисунке 5.

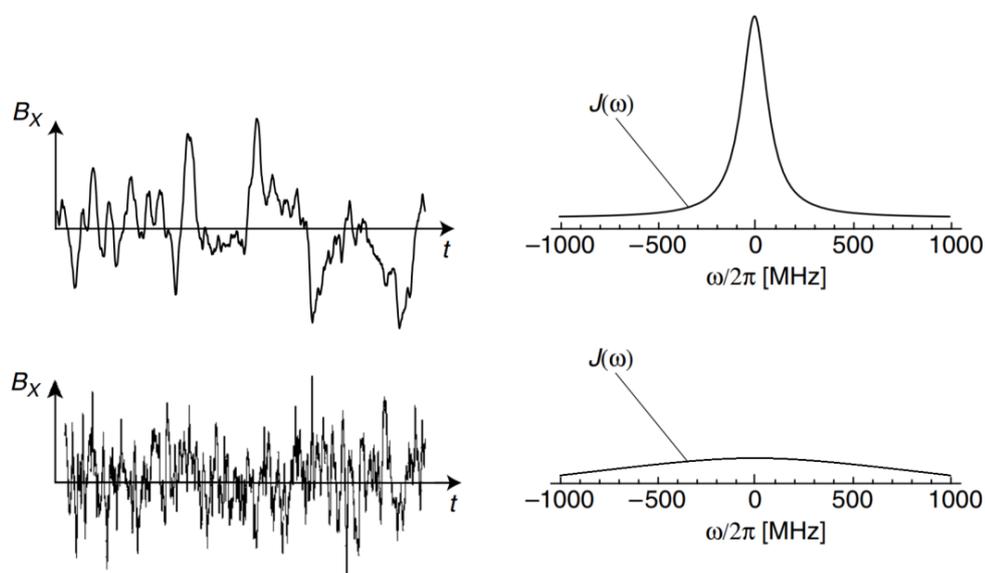


Рисунок 5 – Вид функции спектральной плотности $J(\omega)$ согласно уравнению (1) (справа) для случая медленных ($\tau_c = 2.0$ нс, сверху) и быстрых ($\tau_c = 0.2$ нс, снизу) флуктуаций магнитного поля B_x . Рисунок адаптирован из [95].

Таким образом, параметры спиновой релаксации ядер ^{15}N основной цепи белка определяются линейной комбинацией значений функций спектральной плотности при упомянутых выше частотах [92, 93, 96, 97]:

$$R_1 = R_1^{DD} + R_1^{CSA} = d[J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + c[J(\omega_N)] \quad (2.1)$$

$$R_2 = R_2^{DD} + R_2^{CSA} + R_{EX} =$$

$$= \frac{d}{2}[4J(0) + J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + \frac{c}{6}[3J(\omega_N) + 4J(0)]$$

$$+ R_{EX}$$

$$\sigma_{NH} = d[6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)] \quad (2.3)$$

где R_1 , R_2 – константы скорости спин-решеточной и спин-спиновой релаксации ядер ^{15}N , а σ_{NH} – константа скорости диполь-дипольной кросс коррелированной спиновой релаксации между ядрами ^{15}N и ^1H . Уравнения (2.1-2.3) приведены в системе СИ, поэтому величины d и c в системе СИ выражаются как: $d = \frac{1}{4} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{(\gamma_H \gamma_N \hbar)^2}{\langle r_{NH}^6 \rangle}$, $c = \frac{(\omega_N \Delta\sigma)^2}{3}$ – где μ_0 – магнитная проницаемость вакуума; γ_H и γ_N – гиромагнитные отношения ядер ^1H и ^{15}N , соответственно; \hbar – приведенная постоянная Планка, r_{NH} – расстояние между ядрами ^1H и ^{15}N (длина вектора связи NH); ω_N – Ларморовская частота ядра ^{15}N , $\Delta\sigma$ – значение анизотропии химического сдвига ^{15}N в предположении аксиальной симметрии тензора химического сдвига, которое для ядер ^{15}N основной цепи белка лежит в диапазоне от -160 м.д. до -170 м.д. [98]. Значения R_1 и R_2 можно измерить экспериментально, тогда, как значение σ_{NH} рассчитывается из экспериментально определяемых величин R_1 и параметра стационарного гетероядерного $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ NOE (англ. *nuclear Overhauser effect*) через соотношение [82, 93, 96]:

$$NOE = 1 + \frac{\sigma_{NH}}{R_1} \frac{\gamma_H}{\gamma_N} = 1 + \frac{1}{R_1} \frac{\gamma_H}{\gamma_N} d[6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)] \quad (3)$$

Как видно из уравнений (2.1-2.2) и (3), экспериментально определяемые параметры ^{15}N R_1 , R_2 и $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ NOE имеют явную полевую (B_0) зависимость в виде ω_N в величине c , а также неявную, выраженную величинами $J(\omega_N)$, $J(\omega_H)$, $J(\omega_H - \omega_N)$ и $J(\omega_H + \omega_N)$. Поскольку в уравнениях (2.1-2.2) и (3) три экспериментально определяемых параметра (^{15}N R_1 , R_2 и $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ NOE) зависят от пяти неизвестных значений функции спектральной плотности ($J(0)$, $J(\omega_N)$, $J(\omega_H)$, $J(\omega_H - \omega_N)$, $J(\omega_H + \omega_N)$), то для количественного определения динамики основной цепи – извлечения значений $J(\omega_i)$ и/или τ_C для амидных групп основной цепи, необходимо либо проводить серию экспериментов ЯМР по измерению ^{15}N R_1 , R_2 и $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ NOE в двух или нескольких отличающихся полях B_0 , либо делать упрощающее допущение о явном виде функции спектральной плотности $J(\omega)$. Среди упрощающих допущений наиболее часто применяется формализм Липари-Сзабо [99, 100], согласно которому вращение вектора связи NH амидных групп основной цепи белка можно разбить на вращение белка как целого и на

внутреннее вращение вектора связи NH в молекулярной системе координат. Согласно этому формализму функция спектральной плотности имеет следующий вид:

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[\frac{S^2 \tau_M}{1 + (\omega \tau_M)^2} + \frac{(1 - S^2) \tau}{1 + (\omega \tau)^2} \right] \quad (4.1)$$

$$\tau^{-1} = \tau_M^{-1} + \tau_e^{-1} \quad (4.2)$$

где τ_M – общее время корреляции вращений белка как целого, τ_e – эффективное время корреляции, задаваемое вращениями вектора связи NH в молекулярной системе координат, S – параметр порядка. S^2 измеряет степень ограничения пространства для положений вектора связи в молекулярной системе координат. Если предположить, что вектор связи диффундирует в конусе с углом θ (Рисунок 6), который задается отклонением крайнего положения вектора связи от его равновесной ориентации, то значение S^2 будет определяться соотношением [99]:

$$S^2 = \frac{1}{4} (\cos(\theta) * (1 + \cos(\theta)))^2 \quad (4.3)$$

Таким образом, применение формализма Липари-Сзабо позволяет свести пять неизвестных значений функции спектральной плотности $J(\omega)$ к трем неизвестным – τ_M , τ_e и S^2 , которые однозначно могут быть определены по экспериментально измеренным параметрам ^{15}N R_1 , R_2 и $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ NOE через уравнения (2.1-2.2) и (3). Поскольку для IDP невозможно ввести единое время корреляции вращения белка как целого (τ_M), то и подход Липари-Сзабо в исходном виде нельзя применить при анализе релаксационных параметров ^{15}N основной цепи IDP. Однако предлагается, что в модифицированном виде подход Липари-Сзабо можно применить в случае IDP, если заменить глобальное время корреляции вращений белка τ_M на эффективное время сегментной корреляции IDP, τ_E , которое определяет персистентные длины движений сегментов полипептидной цепи белка. [82]

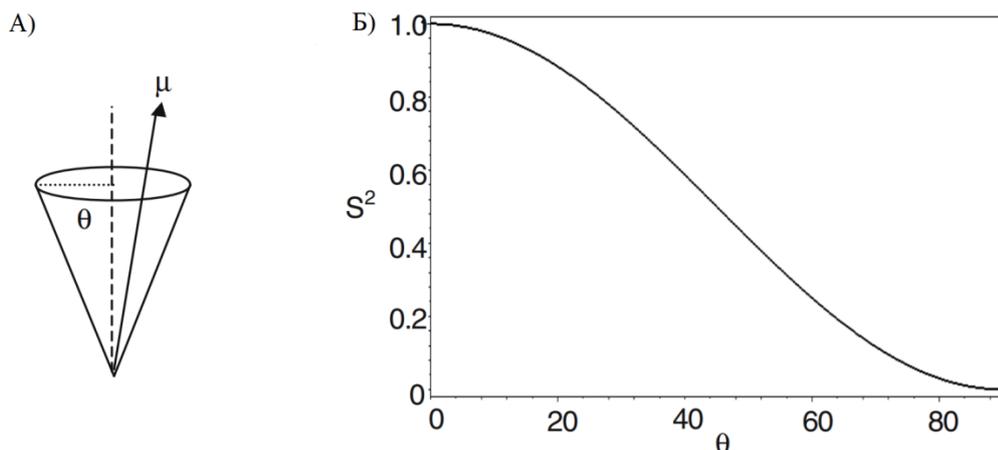


Рисунок 6 – А) Иллюстрация диффузионного вращения вектора связи μ в конусе с углом θ , образованным равновесным и крайним положениями вектора μ . Б) График зависимости значений параметра S^2 от θ согласно уравнению (4.3). Рисунок адаптирован из [101].

Ещё одним часто используемым подходом к уменьшению количества неизвестных в уравнениях (2.1-2.2) и (3) является подход отображения пониженной спектральной плотности (англ. *reduced spectral density mapping*) [92 , 93 , 102], который оказывается валидным при обработке релаксационных параметров ^{15}N основной цепи ИДР. [103] В этом подходе предполагается, что функция спектральной плотности при больших значениях частот ω_H , $\omega_H - \omega_N$, $\omega_H + \omega_N$ принимает схожие значения $J(\omega_H) \approx J(\omega_H - \omega_N) \approx J(\omega_H + \omega_N)$. Поэтому любая линейная комбинация $J(\omega_H)$, $J(\omega_H - \omega_N)$ и $J(\omega_H + \omega_N)$ представляется в виде $\alpha J(\beta\omega_H)$, где α и β – коэффициенты:

$$6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N) = 5J(\beta_1\omega_H) \quad (5.1)$$

$$6J(\omega_H + \omega_N) + J(\omega_H - \omega_N) = 7J(\beta_2\omega_H) \quad (5.2)$$

$$J(\omega_H - \omega_N) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_N) = 13J(\beta_3\omega_H) \quad (5.3)$$

Далее, предполагая вид функции спектральной плотности: $J(\omega) = \frac{\lambda_1}{\omega^2} + \lambda_2$, где λ_1 и λ_2 – параметры, можно получить значения коэффициентов β_i : $\beta_1 = 0.870$; $\beta_2 = 0.921$; $\beta_3 = 0.955$. [102] Таким образом, уравнения (2.1-2.2) и (3) упрощаются:

$$R_1 = d[3J(\omega_N) + 7J(0.921\omega_H)] + c[J(\omega_N)] \quad (6.1)$$

$$R_2 = \frac{d}{2}[4J(0) + 3J(\omega_N) + 13J(0.955\omega_H)] + \frac{c}{6}[3J(\omega_N) + 4J(0)] + R_{EX} \quad (6.2)$$

$$NOE = 1 + \frac{1}{R_1} \frac{\gamma_H}{\gamma_N} d[5J(0.87\omega_H)] \quad (6.3)$$

где, учитывая, что $J(\omega) \propto 1/\omega^2$, значения $J(0.921\omega_H)$ и $J(0.955\omega_H)$ могут быть выражены через $J(0.87\omega_H)$, используя соотношение: $J(\varepsilon\omega_H) = (0.87/\varepsilon)^2 J(0.87\omega_H)$, где $\varepsilon = 0.921$ или

0.955. Таким образом, из уравнений (6.1-6.3) по экспериментально определяемым параметрам ^{15}N R_1 , R_2 и $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ NOE можно однозначно извлечь значения функции спектральной плотности $J(\omega)$ в величинах частот 0 , ω_N , $0.87\omega_H$ для каждой амидной группы NH основной цепи белка.

Приведенные выше подходы позволяют количественно определить динамику основной цепи белка по получаемым величинам $J(\omega_i)$ и τ_C , которые характеризуют флуктуации магнитного поля в месте расположения ядер ^{15}N основной цепи белка и, следовательно, характеризуют локальную динамику молекулярных движений основной цепи. Однако для выявления более упорядоченных участков IDP достаточно определить сами релаксационные параметры ^{15}N R_1 , R_2 и $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ NOE основной цепи белка, учитывая их зависимости от времени корреляции τ_C (Рисунок 7). При этом, как видно из рисунка 7, особой чувствительностью к быстрым локальным движениям, характеризуемым диапазоном значений $10^{-10} - 10^{-8}$ (с) τ_C , обладают значения стационарного гетероядерного $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ NOE, которые монотонно возрастают от отрицательных значений до значения 0.9 по мере уменьшения степени подвижности аминокислотного остатка в основной цепи белка.

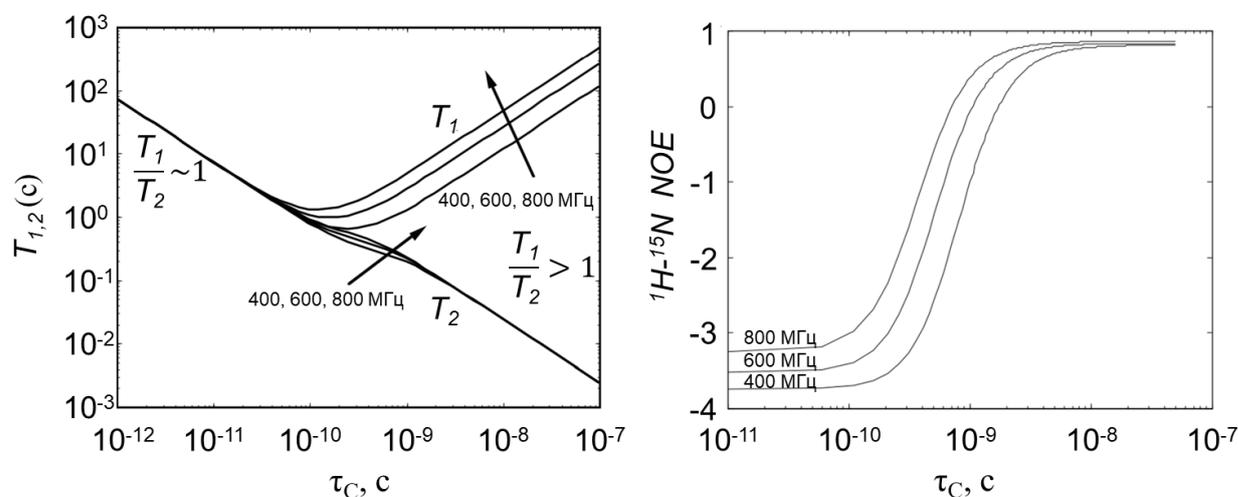


Рисунок 7 – Схематическая зависимость параметров ^{15}N T_1 , T_2 (слева) и стационарного гетероядерного $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ NOE (справа) от времени корреляции τ_C во внешних магнитных полях B_0 , характеризуемых протонными резонансными частотами 400 МГц, 600 МГц и 800 МГц при учете механизмов CSA и DD релаксации ядер ^{15}N . Рисунок адаптирован из [104].

1.2.1.4 Остаточная третичная структура IDP по данным PRE

Парамагнитное усиление релаксации (англ. *paramagnetic relaxation enhancement* – PRE) в спектроскопии ЯМР на текущий момент является одним из наиболее часто применяемых

методов установления взаимодействий дальнего порядка во внутренне неупорядоченных белках. [105 , 106 , 107 , 108] Суть метода заключается в селективном введении в биомолекулу парамагнитного центра, который приводит к появлению дополнительного диполь-дипольного механизма спиновой релаксации ядер, обусловленного взаимодействием парамагнитного центра и пространственно близко расположенных ядер. Примечательно, что влияние парамагнитного центра распространяется на ядра ^1H , находящиеся на расстояниях вплоть до 25 Å от места расположения парамагнитного центра, что намного превышает характерные расстояния, определяемые из экспериментов $^1\text{H} - ^1\text{H}$ NOESY, которые не превышают значения 6 Å. [82] В качестве парамагнитного центра для экспериментов PRE на биомолекулах *in vitro* зачастую применяют спиновую метку на основе нитроксильного радикала, MTSL (S-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)-methyl-methanesulfonothioate), которая селективно взаимодействует с тиольными S-H группами и связывается с биомолекулой с образованием дисульфидной S-S связи. Поскольку тиольной группой в белках обладают только остатки цистеина, то обычно добиваются наличия в белке только одного остатка цистеина путем замены остальных остатков цистеина на остатки серина методами генной инженерии. Наличие единственного остатка цистеина в модифицированном белке гарантирует селективное введение спиновой метки MTSL в определенный сайт белка. При этом, получая серию модифицированных белков, в которых единственный остаток цистеина расположен в разных сайтах белка, позволяет ввести MTSL в эти сайты и установить все взаимодействия дальнего порядка в IDP. [107 , 109]

Поскольку суммарная скорость спиновой релаксации определяется суммой вкладов от всех механизмов релаксации, то для результирующих констант скоростей релаксации R_1^* и R_2^* ядерных спинов можно записать:

$$R_1^* = R_1 + \Gamma_1 \quad (7.1)$$

$$R_2^* = R_2 + \Gamma_2 \quad (7.2)$$

где $R_{1,2}$ – константы скоростей релаксации ядерных спинов при отсутствии эффекта PRE, $\Gamma_{1,2}$ – вклады в константы скоростей релаксации ядерных спинов, обусловленные эффектом PRE. В рамках теории релаксации Соломона-Бломбергена [110 , 111 , 112] величины $\Gamma_{1,2}$ для ядер ^1H могут быть выражены следующими уравнениями:

$$\Gamma_1 = \frac{1}{4} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{(\gamma_H \gamma_e \hbar)^2}{\langle r^6 \rangle} 3J_{SB}(\omega_H) \quad (8.1)$$

$$\Gamma_2 = \frac{1}{8} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{(\gamma_H \gamma_e \hbar)^2}{\langle r^6 \rangle} (4J_{SB}(0) + 3J_{SB}(\omega_H)) \quad (8.2)$$

где μ_0 – магнитная проницаемость вакуума; γ_H и γ_e – гиромагнитные отношения ядра ^1H и электрона, соответственно; \hbar – приведенная постоянная Планка, r – расстояние между ядром ^1H и неспаренным электроном, которое в рамках теории предполагается фиксированным; ω_H – Ларморовская частота ядра ^1H ; $J_{SB}(\omega)$ – функция спектральной плотности в предположении изотропного вращения вектора, соединяющего наблюдаемое ядро ^1H и неспаренный электрон, имеющая следующий вид:

$$J_{SB}(\omega) = \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \quad (8.3)$$

где $\tau_c = (\tau_r^{-1} + \tau_e^{-1})^{-1}$, τ_r – время вращательной корреляции вектора, соединяющего неспаренный электрон и наблюдаемое ядро ^1H , которое обычно оценивается сверху как время вращательной корреляции спин-меченного упорядоченного белка τ_R ; τ_e – время продольной релаксации электронного спина, которое обычно при нормальных условиях в случае нитроксильных радикалов больше чем 10^{-7} с. [113] Для большинства упорядоченных белков, структуры которых могут быть идентифицированы методом ЯМР, как правило справедливо $\tau_R \leq 0.1\tau_e$ и поэтому τ_c определяется значением τ_R . [105]

Уравнения (8.1-8.2) легко выводятся из выражений (2.1-2.2) для R_1^{DD} и R_2^{DD} путем замены в (2.1-2.2) величин для ^{15}N на величины для ^1H и также замены величин для ^1H на величины для неспаренного электрона. При этом, поскольку γ_e в 657 раз больше γ_H , то справедливо выражение $\omega_e \gg \omega_H$, а также, поскольку τ_c является достаточно большим, то при стандартных значениях поля B_0 ЯМР справедливо выражение: $(\omega_e \tau_c)^2 \gg 1$. Поэтому вклады $J_{SB}(\omega_e - \omega_H)$, $J_{SB}(\omega_e + \omega_H)$ и $J_{SB}(\omega_e)$ пренебрегаются и не учитываются при расчете $\Gamma_{1,2}$ в уравнениях (8.1-8.2). Важным допущением в уравнениях (8.1-8.2) является фиксация вектора, связывающего неспаренный электрон и наблюдаемое ядро ^1H , в молекулярной системе координат. Однако известно, что большинство спиновых меток вводятся в сайты белка через гибкие линкеры, содержащие несколько одинарных ковалентных связей, вдоль которых может вращаться спиновая метка. В дополнение к этому ядра ^1H могут находиться в высоко мобильных участках белка, что справедливо, например, в случае IDP. Поэтому, чтобы учесть вращения спиновой метки относительно глобулярного белка, а также локальную динамику ядер ^1H , применяя формализм Липари-Сзабо [99, 100], уравнения (8.1-8.2) далее можно модифицировать согласно работам [114, 115, 116, 117].

Стандартным подходом к выявлению эффекта PRE на релаксацию ядер является получение разности констант скоростей спиновой релаксации наблюдаемых ядер между парамагнитным и диамагнитным образцом: $\Gamma_1 = R_1^* - R_1$ и $\Gamma_2 = R_2^* - R_2$. [114] Такое вычитание позволяет убрать все общие для обоих состояний образца (диамагнитного и парамагнитного)

механизмы спиновой релаксации ядер, оставляя только вклад, обусловленный влиянием парамагнитного центра. Поскольку, как видно из (8.1-8.2), эффект PRE квадратично зависит от гиромагнитного отношения ядра, то наибольшее влияние парамагнитного центра будут испытывать ядра ^1H . Кроме того, в уравнениях (8.1-8.2) предполагается точечное диполь-дипольное взаимодействие между ядерным спином и спином неспаренного электрона, что является справедливым в случае ядер ^1H , но не выполняется в случае ядер ^{13}C и ^{15}N , для которых доминирующим вкладом в спиновую релаксацию оказывается взаимодействие со спиновой плотностью неспаренного электрона, делокализованной на $2p_z$ орбиталях гетероядер. [118] Таким образом, эффект PRE преимущественно рассматривается на ядрах ^1H . При этом при анализе величин $^1\text{H } R_1$ и $^1\text{H } R_2$ большей достоверностью обладают значения $^1\text{H } R_2$, поскольку, как было обнаружено в работе [114], величины $^1\text{H } R_1$ (но не $^1\text{H } R_2$) сильно зависят от локальной подвижности ядер ^1H . В частности, например, в присутствии локальных движений, характеризуемых $\tau_c < 1/\omega_H$, значение $^1\text{H } R_1$ может оказаться в 5 раз больше, чем при отсутствии этих локальных движений. Кроме того, на величину $^1\text{H } R_1$ влияют эффекты кросс-релаксации от соседних ядер, а также в случае амидных протонов эффекты обмена с протонами воды. По этим причинам, применяя метод PRE, предпочтение отдают экспериментам по выявлению значений $^1\text{H } R_2$.

Альтернативный подход применения метода PRE, также называемый «измерением по единственной временной точке», предполагает сравнение пары спектров HSQC (обычно ^1H - ^{15}N HSQC), один из которых получен для парамагнитного образца биомолекулы, а другой для диамагнитного образца этой же биомолекулы. [81 , 119 , 120] В этом подходе важным требованием является Лоренцева форма линии сигналов по ^1H оси. Тогда высота Лоренцевых пиков при прямом измерении ^1H будет прямо пропорциональна $1/R_2$ или $1/R_2^*$ (обозначения такие же, как в (7.2)) для диамагнитного и парамагнитного образца, соответственно: $I_{para}^0 \sim 1/R_2^*$, $I_{dia}^0 \sim 1/R_2$, где I_{para}^0 и I_{dia}^0 – высоты одного и того же сигнала ^1H в парамагнитном и диамагнитном образце, соответственно. В спектре ^1H - ^{15}N HSQC при полном периоде τ (~9.9 мс) переноса когерентности ^1H блока INEPT (англ. *Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer*) этот же сигнал будет прямо пропорционален $\exp(-R_2\tau)$ или $\exp(-R_2^*\tau)$ для диамагнитного и парамагнитного образца, соответственно. Таким образом, для высот кросс-пиков в спектрах ^1H - ^{15}N HSQC справедливы выражения: $I_{para}(\tau) = I_{para}^0 \cdot \exp(-R_2^*\tau)$; $I_{dia}(\tau) = I_{dia}^0 \cdot \exp(-R_2\tau)$, откуда для отношения высоты сигнала в спектре ^1H - ^{15}N HSQC парамагнитного образца к высоте этого же сигнала в спектре ^1H - ^{15}N HSQC диамагнитного образца можно получить следующее выражение:

$$\frac{I_{para}(\tau)}{I_{dia}(\tau)} = \frac{R_2}{R_2 + \Gamma_2} \exp(-\Gamma_2 \tau) \quad (9.1)$$

Для того чтобы выражение (9) выполнялось, важно обеспечить в эксперименте ^1H - ^{15}N HSQC наличие достаточно длительной релаксационной задержки T_{rep} между сканами, чтобы гарантировать одинаковый уровень намагниченности ядер ^1H для парамагнитного и диамагнитного образца перед началом записи каждого скана в эксперименте ^1H - ^{15}N HSQC, поскольку, как показано в уравнениях (7.1) и (8.1) скорость восстановления спиновой системы до исходного состояния будет различна для парамагнитного и диамагнитного образцов. Однако, как правило, релаксационные задержки в экспериментах HSQC выставляются в диапазоне значений 0.8-2 с, что является недостаточным для полного восстановления продольной намагниченности ядер ^1H . Поэтому, чтобы учесть неполную продольную релаксацию ядер ^1H выражение (9.1) необходимо модифицировать в следующий вид [120]:

$$\frac{I_{para}(\tau)}{I_{dia}(\tau)} = \frac{1 - \exp\left(-(R_1 + \Gamma_1)T_{rep}\right)}{1 - \exp(-R_1 T_{rep})} \frac{R_2}{R_2 + \Gamma_2} \exp(-\Gamma_2 \tau) \quad (9.2)$$

где величина Γ_1 может быть выражена через Γ_2 из уравнений (8.1-8.2). Помимо широко применяемого подхода «измерения по единственной временной точке» также существует подход «измерения по двум временным точкам», который в целом позволяет извлекать более точные значения ^1H Γ_2 . [120]

Метод PRE на сегодняшний день остается одним из наиболее эффективных инструментов ЯМР для изучения остаточной третичной организации IDP в растворе. [105 , 106 , 107 , 108] При этом, учитывая динамическую природу внутренне неупорядоченных белков, а также зависимость от r^{-6} (где r – расстояние от неспаренного электрона до наблюдаемого ядра) эффекта PRE, количественный анализ экспериментальных данных метода PRE сильно затруднен. [121] Однако даже качественная картина, получаемая отношением $I_{para}(\tau)/I_{dia}(\tau)$, позволяет получить информацию о контактах дальнего порядка между участками основной цепи IDP. [107 , 109] Так, например, в полностью неупорядоченном белке, задаваемом моделью «случайной катушки», влияние PRE будут испытывать лишь ядра, находящиеся в непосредственной близости (10 – 15 а.о. с каждой стороны) от сайта с введенной парамагнитной спиновой меткой. Если же в IDP присутствуют участки белка расположенные в первичной последовательности дальше, чем 10 – 15 а.о., от сайта, в который введена спиновая метка, но находящиеся пространственно близко к этому сайту и попадающие в диапазон расстояний до 25 Å от парамагнитного центра спиновой метки, то ядра ^1H таких участков белка будут испытывать эффект PRE (Рисунок 8). [81] Важным моментом в применении метода PRE

является выбор сайта в белке и подходящей спиновой метки, которая при введении в этот сайт не будет нарушать динамику основной цепи белка и структурную организацию IDP в растворе. Таким критериям удовлетворяет спиновая метка MTSL, хорошо зарекомендовавшая себя при обнаружении контактов дальнего порядка в IDP методом PRE. [107 , 109] При этом для выявления контактов дальнего порядка в IDP обычно получают отношения $I_{para}(\tau)/I_{dia}(\tau)$ для пиков амидных групп NH основной цепи белка из спектров $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC спин-меченного белка до и после перевода спиновой метки в диамагнитное состояние.

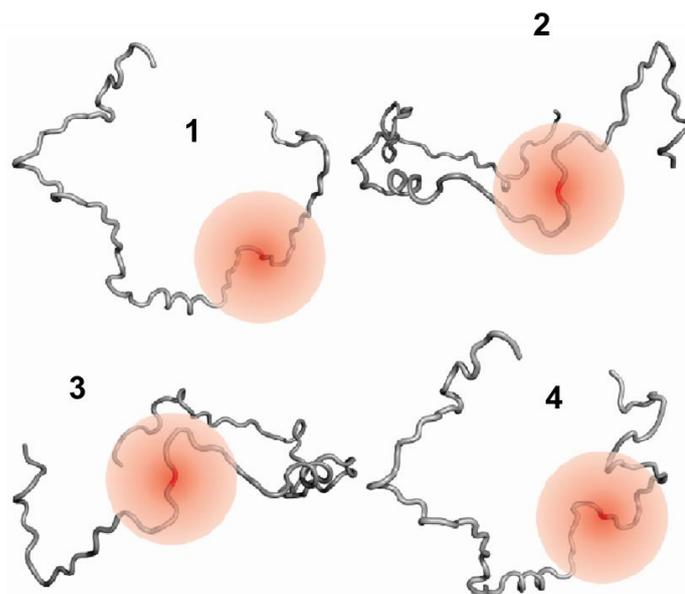


Рисунок 8 – Иллюстрация различных конформеров IDP с введенным парамагнитным центром. Красным кружком обозначена пространственная область, при попадании в которую ядра ^1H испытывают эффект PRE. Конформеры 2 и 3 образуют контакты дальнего порядка, тогда как конформеры 1 и 4 таких контактов не образуют. Рисунок адаптирован из [81].

1.2.2 ЭПР спектроскопия

1.2.2.1 Динамика белков по данным стационарной спектроскопии ЭПР

Спектроскопия ЭПР в сочетании с сайт направленным введением спиновых меток в биомолекулу является одним из наиболее чувствительных методов определения структуры и динамики биополимеров в растворе и в клетках и в том числе подходит для изучения свойств IDP. [122 , 123 , 124] Так, динамика парамагнитного центра спиновой метки на масштабах времен пикосекунд – микросекунд, определяемая из спектров стационарного ЭПР при комнатной температуре, в основном зависит от трех типов молекулярных движений: 1) динамики линкера и вращений парамагнитного центра вдоль ковалентных связей в линкере, 2)

локальной динамики сайта, в который введена спиновая метка, 3) глобальных движений макромолекулы как целого (в случае глобулярных белков) или глобальных движений сегментов полипептидной цепи (в случае IDP) (Рисунок 9). [124] Поэтому, хоть и косвенным путем, определение динамики спиновой метки методом стационарной ЭПР спектроскопии позволяет получить информацию о динамике спин-меченного белка в растворе и в клетках, а также информацию об олигомерном состоянии этого белка, поскольку динамика олигомера и мономера в целом должны отличаться.

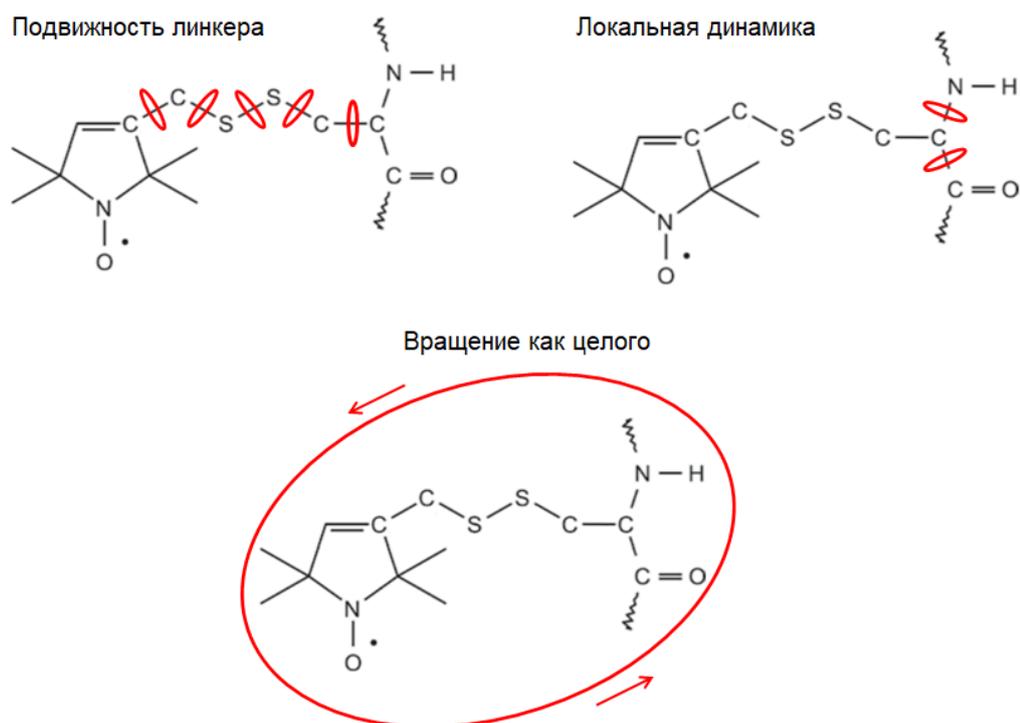


Рисунок 9 – Иллюстрация основных типов молекулярных движений, определяющих динамику спиновой метки, на примере спиновой метки MTSL, введенной в сайт белка.

В случае спиновых меток на основе нитроксильных радикалов (^{14}N) спектр стационарного ЭПР в X диапазоне частот (10 ГГц) в пределе быстрых вращений нитроксильного радикала состоит из трех линий поглощения, обусловленных сверхтонким взаимодействием (СТВ) электрона со спином ядра ^{14}N ($I = 1$). Так как СТВ в нитроксильных радикалах имеет анизотропную часть, спектр ЭПР чувствителен к ориентации спиновой метки во внешнем магнитном поле B_0 . Вращения спиновой метки частично или полностью усредняют анизотропию СТВ и g -тензора, что приводит к изменению формы спектра ЭПР (Рисунок 10). При временах корреляции вращений спиновой метки τ_c меньше 10 пс любая анизотропия усредняется, и спектр ЭПР представляет собой три линии поглощения одинаковой интенсивности (Рисунок 10. (а)). С другой стороны, при τ_c больше 1 мкс анизотропия во временной шкале ЭПР не усредняется и спектр ЭПР представляет собой суперпозицию

спектров, полученных от всех ориентаций спиновой метки относительно внешнего магнитного поля B_0 (Рисунок 10. (е)). Таким образом, метод стационарного ЭПР является чувствительным к вращательной диффузии спиновой метки и позволяет получать информацию о динамике парамагнитного центра в диапазоне времен пикосекунд – микросекунд. [124]

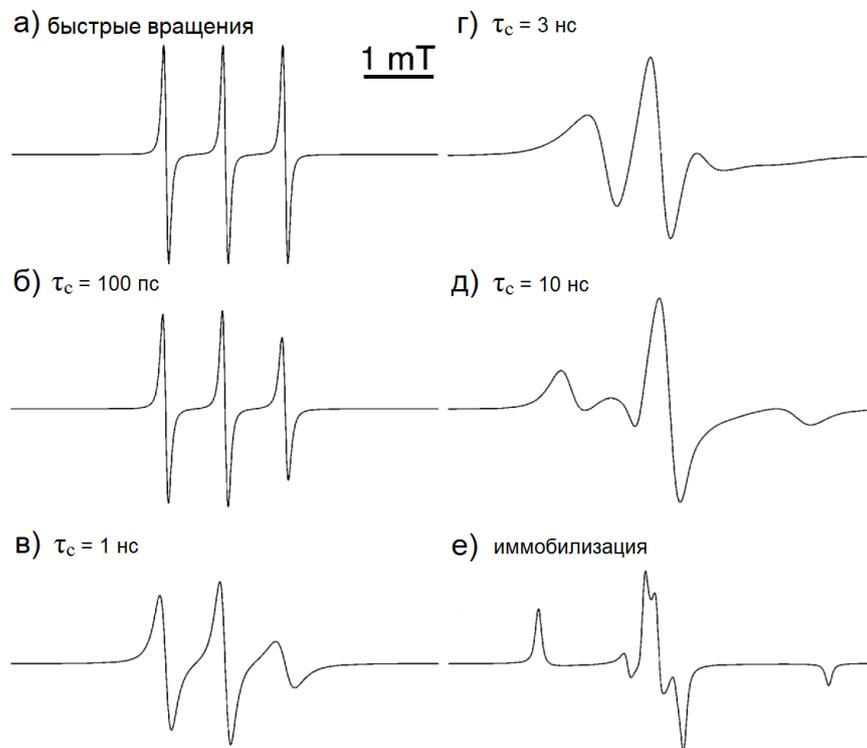


Рисунок 10 – Форма спектра ЭПР в X диапазоне частот при разных временах корреляции вращений спиновой метки τ_c . а) Режим быстрого вращения, который приводит к усреднению анизотропии СТВ и g -тензора. б - д) Режим медленного вращения, который приводит к частичному усреднению анизотропии СТВ и g -тензора. е) режим иммобилизации, когда анизотропия СТВ и g -тензора не усредняются. Рисунок адаптирован из [124].

Спиновые метки на основе нитроксильных радикалов имеют явные преимущества среди остальных типов спиновых меток, поскольку они обладают меньшим размером и, следовательно, вносят меньшие искажения в нативную конформацию биомолекулы, а также такие спиновые метки являются малотоксичными. Кроме того, стабильные спиновые зонды на основе нитроксильных радикалов востребованы в ЭПР-томографии и магнитно-резонансной томографии в качестве контрастных агентов. Для проведения экспериментов стационарной спектроскопии ЭПР в клетках важно, чтобы спиновые метки были резистентными к действию биовосстановителей, которые легко восстанавливают большинство нитроксильных радикалов до гидросиламинов. [14] Было показано, что объемные заместители (большого размера, чем метильные группы), примыкающие к радикальному центру нитроксильного радикала, за счет стерического экранирования радикального центра могут существенно замедлять процесс биовосстановления нитроксильных радикалов. [11 , 12 , 13] Таким образом, подходящими

спиновыми метками для экспериментов стационарной спектроскопии ЭПР в клетках могут стать спиновые метки на основе стерически экранированных нитроксильных радикалов.

1.2.2.2 Определение пространственной структуры белка по данным PELDOR

Наличие диполь-дипольного взаимодействия между спинами электронов позволяет измерять расстояния между радикальными центрами спиновых меток, введенных в биомолекулу, в диапазоне значений 2 – 8 нм, применяя импульсные методы ЭПР и, таким образом, получать информацию о структуре биомолекулы. [125] Диполь-дипольное взаимодействие является полностью анизотропным и зависит как от расстояния между электронными спинами, так и от ориентации вектора, связывающего их, относительно внешнего магнитного поля B_0 . Поэтому наличие быстрой вращательной диффузии спиновых меток приводит к усреднению диполь-дипольного взаимодействия до нуля и к потере возможности измерять расстояния между электронными спинами. Таким образом, для измерения расстояний в дважды спин-меченных биомолекулах важна иммобилизация биомолекул. Наиболее рядовым способом обеспечения иммобилизации биомолекул является проведение экспериментов импульсного ЭПР в водно-глицериновых растворах при гелиевых или азотных температурах, обеспечивающих состояние замороженного раствора. [126] Более изящным способом иммобилизации биомолекул является иммобилизация на поверхности частиц геля, что позволяет проводить измерения расстояний при физиологических значениях температуры. [127] При расстояниях меньше 2 нм диполь-дипольное взаимодействие превышает неоднородную ширину линии спектра ЭПР, вызванную в том числе неразрешенными константами СТВ. В этом случае значения расстояний могут быть определены напрямую из стационарного спектра ЭПР. Когда расстояния между спиновыми метками превышают 2 нм, уширение в стационарном спектре ЭПР за счет диполь-дипольного взаимодействия становится гораздо меньше неоднородного уширения, из-за чего извлечение информации о расстояниях между спиновыми метками напрямую из стационарного спектра ЭПР становится невозможным.

Методы импульсного ЭПР, 3-ех импульсный электрон-электронный двойной резонанс (англ. *Pulse Electron-electron Double Resonance – PELDOR*) [128] или его аналог – 4-ех импульсный двойной электрон-электронный резонанс (англ. *Double Electron-Electron Resonance – DEER*) [129], позволяют определить величину диполь-дипольного взаимодействия между двумя электронными спинами, откуда можно извлечь информацию о распределении расстояний в диапазоне величин 2 – 8 нм между парамагнитными центрами в дважды спин-меченных

биомолекулах. В методе PELDOR (Рисунок 11) подаются СВЧ импульсы на двух частотах: частоте накачки ν_B и частоте наблюдения ν_A . В случае спиновых меток на основе нитроксильных радикалов, у которых эхо-детектируемый спектр имеет ширину ~ 180 МГц, имеется возможность возбуждать разные участки спектра на частотах ν_B и ν_A с неперекрывающимися профилями возбуждения. Таким образом, можно различать спины А и Б, отвечающие резонансным частотам ν_A и ν_B . Двух импульсная последовательность на частоте наблюдения ν_A генерирует для спинов А сигнал спинового эха в момент времени 2τ . π -импульс, подаваемый на частоте накачки ν_B , переворачивает спины Б. Инверсия спинов Б приводит к изменению локального магнитного поля спинов А и, как следствие, к изменению их ларморовской частоты на величину ω_{DD} , отвечающую диполь-дипольному взаимодействию между спинами А и Б. Таким образом, при изменении ларморовской частоты не происходит полной рефокусировки когерентности спинов А в момент времени 2τ , а возникает набег фазы, равный $\omega_{DD}(\tau - T)$ для взаимодействующих спинов А и Б, где T время между $\pi/2$ импульсом на частоте ν_A и π -импульсом на частоте ν_B (Рисунок 11). Таким образом, варьирование значения T приводит к появлению модуляции интенсивности сигнала эха $V \sim \cos(\omega_{DD}(\tau - T))$ с частотой ω_{DD} . Поскольку ω_{DD} имеет зависимость от r^{-6} , где r – расстояние между двумя взаимодействующими электронными спинами, то из зависимости V от T , можно извлечь распределение расстояний между парой спиновых меток в биомолекуле и, таким образом, получить информацию о структуре биомолекулы. [130, 131]

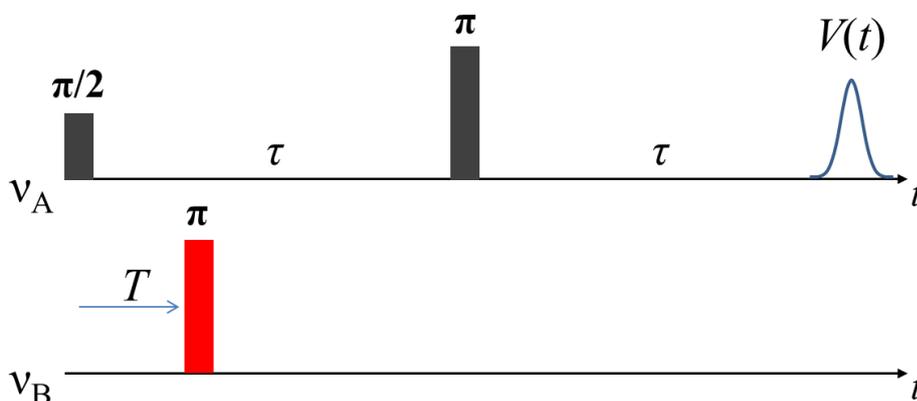


Рисунок 11 – Иллюстрация импульсной последовательности эксперимента PELDOR.

1.3 Эксцизионная репарация оснований

1.3.1 8-оксогуанин

Одним из наиболее распространенных продуктов окисления ДНК является 8-оксо-7,8-дигидрогуанин (8-оксогуанин, охoG), повреждение ДНК, возникающее в результате модификации гуанина активными формами кислорода (Рисунок 12) [132 , 133 , 134]. В клетках человека 8-оксогуанин встречается в соотношении примерно одно повреждение на миллион нормальных гуанинов. Это соотношение возрастает в несколько раз при окислительном стрессе и поэтому 8-оксогуанин зачастую используют в качестве биомаркера окислительного стресса, отражающего повреждение нуклеиновых кислот [134 , 135 , 136]. Ввиду склонности ДНК-полимераз включать дезоксиаденозинмонофосфат напротив 8-оксогуанина в ДНК, наличие 8-оксогуанина приводит к мутациям вида G:C→T:A [137]. Эти мутации преобладают в “мутационных подписях” (англ. *mutational signatures*) SBS18 и SBS36, часто встречающихся в раковых клетках человека [138 , 139]. Примечательно, что небольшое изменение структуры гуанина, затрагивающее лишь положения C8 и N7 (Рисунок 12), оказывает значительное влияние на структуру ДНК. Так, в свободном дезоксинуклеозиде из-за стерического отталкивания между атомом O⁸ карбоксильной группы и 5' гидроксильной группой 8-оксогуанин преимущественно принимает *син*-конформацию [140]. Водородное связывание с цитозином в двухцепочечной ДНК стабилизирует 8-оксогуанин в *анти*-конформации (Рисунок 13) [141 , 142], несмотря на стерический фактор, который ослабляется вследствие локальной перестройки сахарофосфатного остова: меняется конформация фосфатной группы с VI на VII [143 , 144]. Однако при вращении вокруг гликозидной связи 8-оксогуанин может образовать с аденином Хугстиновскую пару охoG(*син*):A(*анти*) (Рисунок 13) [140 , 145 , 146]. Результаты моделирования молекулярной динамики показывают, что будучи напротив аденина 8-оксогуанин спонтанно переходит из *анти*- в *син*-конформацию, но остается в *анти*-конформации будучи напротив цитозина [147]. Таким образом, введение 8-оксо группы в гуанин термодинамически дестабилизирует пару G:C, но стабилизирует неправильную пару G:A [148]. Также известно, что наличие 8-оксогуанина в ДНК способствует её изгибу [149], но при этом увеличивает её торсионную жесткость [150].

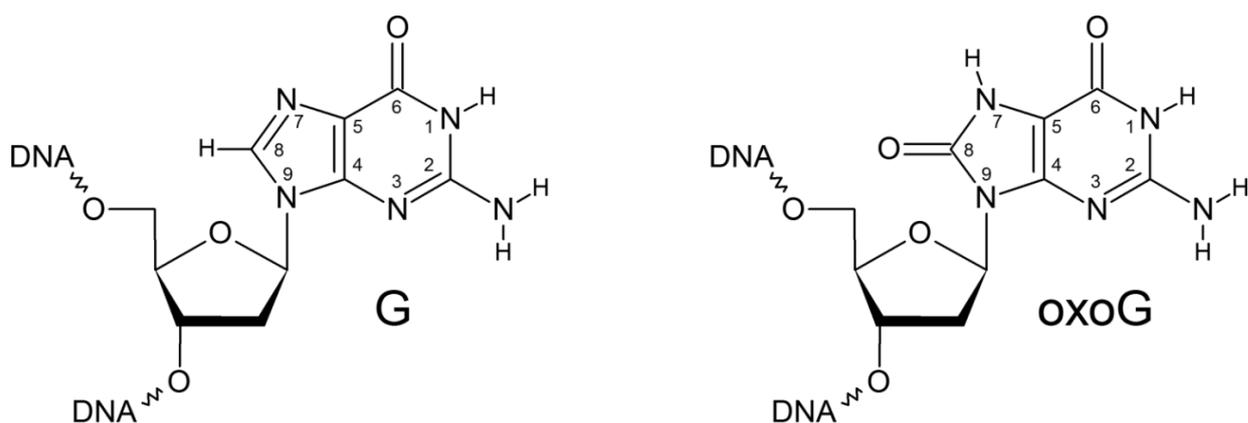


Рисунок 12 – Структурные формулы гуанина (G) и 8-оксогуанина (охоG) в ДНК.

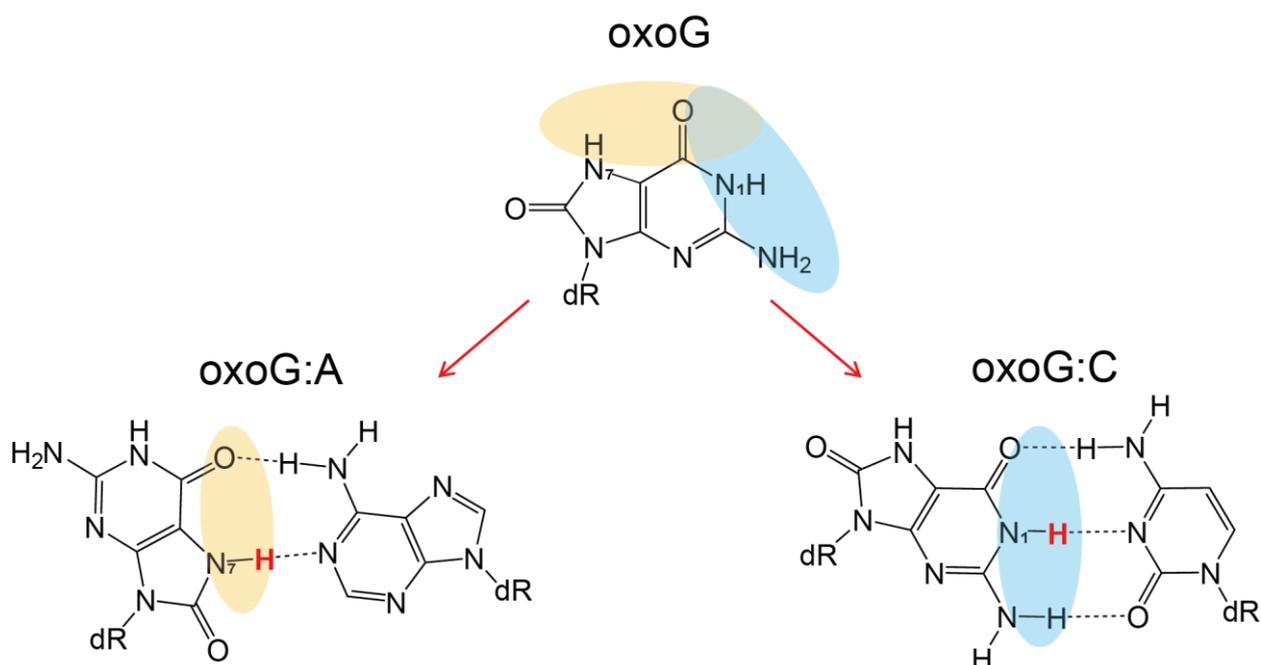


Рисунок 13 – Структурные формулы Хугстиновской пары oxoG:A и Уотсон-Криковской пары oxoG:C. Красным цветом обозначены иминопротоны, участвующие в водородном связывании. В случае пары oxoG:A образующим водородную связь является иминопротон N7-H, а в паре oxoG:C – иминопротон N1-H.

1.3.2 Репарация повреждения 8-оксогуанин

Для того чтобы предотвратить мутационные изменения ДНК, вызванные наличием 8-оксогуанина, живые организмы обладают специальными ферментами репарации, которые распознают и вырезают это поврежденное основание из ДНК. В клетках человека таким ферментом репарации является 8-оксогуанин-ДНК-N-гликозилаза (OGG1), тогда как в бактериях эту роль выполняет формамидопиримидин-ДНК-N-гликозилаза (FPG, или MutM) [151, 152]. Несмотря на их общую специфичность к субстрату, OGG1 и FPG не являются

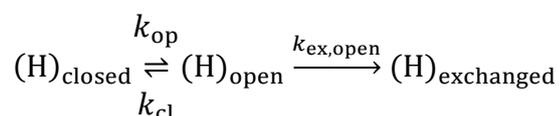
гомологами и принимают совершенно разные структуры [153 , 154]. Другой фермент репарации, бактериальный MutY или его гомолог – человеческий MUTYH, распознает пару охoG:A и вырезает основание A, тем самым запуская цикл репарации, который в конечном итоге восстанавливает первоначальную пару G:C [151 , 152]. До сих пор неизвестно имеют ли эти ферменты какой-либо общий механизм распознавания 8-оксогуанина. Расчетные, кинетические и структурные данные позволяют предположить, что распознавание 8-оксогуанина начинается в момент, когда ферменты образуют комплекс с поврежденной парой, при котором OGG1 и FPG задействуют свои метастабильные конформеры, которые способствуют выворачиванию 8-оксогуанина из спирали ДНК в карман активного центра фермента [153 , 155 , 156 , 157 , 158 , 159 , 160 , 161 , 162 , 163 , 164 , 165]. В частности, предполагается, что меньшая стабильность поврежденной пары по сравнению с неповрежденной может играть ключевую роль при распознавании повреждения ферментами на раннем этапе и, таким образом, FPG, выгибая пару охoG:C, облегчает её открытие [158 , 162 , 166]. Однако сильно отличающаяся модель распознавания повреждений была предложена для урацил-ДНК-гликозилазы (UNG), которая распознает и удаляет урацил из ДНК: измерения констант скоростей открытия и закрытия пар оснований методом ЯМР показали, что UNG не ускоряет процесс открытия пар, но замедляет процесс закрытия пар, тем самым предполагая пассивный механизм распознавания повреждения, при котором UNG связывается с парой оснований и ждет её спонтанного открытия, чтобы проверить на наличие повреждения [167 , 168 , 169 , 170].

Несмотря на кажущуюся значимость динамики открытия и закрытия пар оснований для понимания механизма распознавания 8-оксогуанина ферментами, текущее количество экспериментальной информации по динамике пар с этим повреждением весьма ограничено. Результаты измерений констант скоростей открытия и закрытия пар охoG:C и G:C методом ЯМР показали, что скорость открытия и время жизни открытого состояния для обеих пар очень схожи и приблизительно на 2 порядка ниже, чем для пары U:A [2 , 171]. Однако ни динамика пары охoG:A, ни влияние самой последовательности ДНК на динамику пар с 8-оксогуанином до сих пор не исследовались.

1.4 Динамика открытия-закрытия пар оснований в ДНК. Катализируемый протонный обмен

Константы скоростей открытия и закрытия пар оснований можно получить, применяя формализм катализируемого протонного обмена, разработанного М. Эйгеном [15]. Этот подход

базируется на наблюдении процесса обмена иминопотонов с протонами растворителя, то есть воды. В рамках модели “локального разворачивания” (англ. local unfolding or breathing model) [172] обмен является двухстадийным и происходит в индивидуальной паре оснований, где не учитывается влияние соседних пар. Будучи в закрытом состоянии пара оснований связана водородными связями, и доступность иминопотона для растворителя сильно ограничена. В рамках данной модели обмен не может произойти из закрытого состояния, а достигается при спонтанном открытии пары, когда водородные связи обрываются и основание, содержащее иминопотон, выворачивается наружу из спирали ДНК. Действительно, даже в случае концевых пар в ДНК было показано, что процесс обмена иминопотоном с протонами воды протекает только в так называемом открытом состоянии пары, в котором водородные связи между спаренными основаниями разрушены. [16] Кинетическая схема реакции обмена иминопотоном с протонами растворителя является следующей:



где k_{op} и k_{cl} – константы скоростей открытия и закрытия, соответственно, пары оснований, $k_{\text{ex,open}}$ – константа скорости обмена из открытого состояния. В случае, когда равновесие между открытым и закрытым состояниями сильно смещено в сторону закрытого состояния, что является свойственным для пар оснований двухцепочечной ДНК, эффективная константа скорости обмена иминопотоном с протонами растворителя, k_{ex} , может быть выражена через k_{op} , k_{cl} и $k_{\text{ex,open}}$:

$$k_{\text{ex}} = \frac{k_{\text{op}} \times k_{\text{ex,open}}}{k_{\text{cl}} + k_{\text{ex,open}}} \quad (10)$$

Константа скорости обмена из открытого состояния $k_{\text{ex,open}}$ линейно зависит от концентрации добавляемого акцептора протонов или также называемого катализатора обмена В согласно уравнению:

$$k_{\text{ex,open}} = \alpha \times (k_0 + k_{\text{B}}[\text{B}]) \quad (11)$$

где k_{B} – константа скорости переноса иминопотоном от изолированного нуклеотида к акцептору протонов В, αk_0 – константа скорости обмена из открытого состояния в отсутствие катализатора обмена, α – стерический фактор, учитывающий отличия между константами скоростей переноса к акцептору протонов от изолированного нуклеотида и от пары оснований в открытом состоянии в ДНК. Предполагается, что α лежит в диапазоне значений 0.1–10 и обычно принимается равным 1 в случае, когда в качестве катализатора обмена применяют аммиак [173]. Подстановка (11) в (10) дает уравнение:

$$k_{\text{ex}} = \frac{k_{\text{op}} \times \alpha \times (k_0 + k_{\text{B}}[\text{B}])}{k_{\text{cl}} + \alpha \times (k_0 + k_{\text{B}}[\text{B}])} \quad (12)$$

Аппроксимация зависимостью (12) эффективной константы скорости обмена k_{ex} от концентрации катализатора обмена В позволяет в качестве параметров извлечь константы скоростей открытия и закрытия пары оснований. Когда $k_{\text{cl}} \gg k_{\text{ex,open}}$ (режим обмена EX₂), что достигается при низких концентрациях катализатора В, уравнение (12) можно переписать:

$$k_{\text{ex}} = \frac{k_{\text{op}} \times \alpha \times (k_0 + k_{\text{B}}[\text{B}])}{k_{\text{cl}}} = K'_{\text{eq}} \times (k_0 + k_{\text{B}}[\text{B}]) \quad (13)$$

где $K'_{\text{eq}} = \alpha K_{\text{eq}} = \alpha k_{\text{op}} / k_{\text{cl}}$ – кажущаяся константа равновесия процесса открытия закрытия пары оснований, которая может быть получена при аппроксимации данных $k_{\text{ex}}([\text{B}])$ уравнением (13). Напротив, когда $k_{\text{cl}} \ll k_{\text{ex,open}}$ (режим EX₁), что выполняется при высоких концентрациях катализатора В, эффективная константа скорости обмена k_{ex} достигает своего максимального значения равного $k_{\text{ex}} = k_{\text{op}}$ и обмен происходит при каждом событии открытия пары оснований, то есть обмен лимитируется процессом открытия пары. Величины K'_{eq} и k_{op} строго определяют кажущуюся константу скорости закрытия пары: $k'_{\text{cl}} = k_{\text{cl}} / \alpha = k_{\text{op}} / \alpha K_{\text{eq}} = k_{\text{op}} / K'_{\text{eq}}$. Таким образом, зависимость (12), охватывающая оба предельных режима, позволяет извлечь константу скорости открытия k_{op} , кажущуюся константу скорости закрытия k_{cl} / α и кажущуюся константу равновесия αK_{eq} .

1.5 Заключение

Белок RL2 является многообещающим потенциальным лекарством против рака. Понимание свойств RL2, как в растворе, так и в клетках, а также понимание того, каким способом он проникает в клетки человека и какие участки первичной последовательности являются ответственными за его взаимодействие с ТОМ70, может оказаться важным для потенциального улучшения противоопухолевых свойств RL2, а также при разработке лекарственных препаратов на основе RL2. Первая часть диссертационной работы посвящена изучению особенностей структуры и организации RL2 в растворе методами ЯМР и ЭПР, а также изучению методом ЭПР механизма проникновения RL2 в клетки человека.

Вторая часть диссертационной работы посвящена изучению кинетики раскрытия-закрытия пар, содержащих распространенное повреждение ДНК, 8-оксогуанин, обладающее высоким мутационным потенциалом, и сравнению её с кинетикой, получаемой для нормальных пар, применяя формализм катализируемого протонного обмена и адаптированный протокол

ЯМР CLEANEX-PM. В этой части работы обсуждается роль кинетики раскрытия-закрытия поврежденных пар оснований в ДНК в узнавании этих повреждений ферментами репарации – гликозилазами ДНК.

ГЛАВА 2. ПОВЕДЕНИЕ RL2 В РАСТВОРЕ И В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ПО ДАННЫМ МЕТОДОВ МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

2.1 Введение

Как показано в литературном обзоре, казеины из числа первых белков, признанных функциональными, но неупорядоченными [57, 58]. Поскольку RL2 представляет собой рекомбинантный аналог фрагмента человеческого к-казеина, то, так же как и к-казеин является IDP, RL2 предположительно может быть отнесен к IDP. По этой причине стандартные методики установления структуры глобулярных белков методом ЯМР ограниченно применимы или неприменимы вовсе при изучении структуры RL2 в растворе. В данной части работы мы изучили динамику основной цепи RL2, измеряя релаксационные параметры ^{15}N R_1 , R_2 и ^1H – ^{15}N NOE амидных групп основной цепи белка, чтобы выявить более упорядоченные участки RL2, поскольку предполагается, что такие участки IDP формируют первичные контакты с белками-мишенями, и, следовательно, важны для проявления биологической функции IDP. [78, 79] Мы также применили метод усиления парамагнитной релаксации (PRE), чтобы установить остаточную третичную структуру RL2 в растворе. Определение остаточной третичной структуры RL2 в растворе, а также выявление более упорядоченных участков RL2 в дальнейшем могут помочь ответить на вопрос, как именно RL2 взаимодействует с белком-мишенью TOM70. Кроме того, поскольку к-казеины склонны образовывать казеиновые мицеллы, мы изучили склонность RL2 формировать агрегаты в растворе при разных значениях pH, применяя метод ЭПР с предварительным введением спиновой метки MTSL в единственный остаток цистеина RL2.

Ранее было обнаружено, что RL2 эффективно проникает как в опухолевые, так и нормальные клетки человека. [75] Из анализа методами проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии влияния ингибиторов различных путей эндоцитоза на проникновение конъюгата RL2 с 5(6)-карбокситетраметилпроламином в клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и MDA MB 231 *in vitro* было установлено, что RL2 проникает в клетки частично по пути динаминнезависимого пиноцитоза и по пути, альтернативному эндоцитозу, который предположительно является путем прямого проникновения белка RL2 через плазматическую мембрану клетки. [174] Однако полного установления механизма проникновения RL2 в клетки человека не было. Также не изученным оставался вопрос о том, в какой форме RL2 находится в клетках, учитывая склонность RL2 формировать агрегаты. Мы изучили поведение RL2 в клетках аденокарциномы легких человека A549 в процессе его проникновения при физиологических значениях температуры, применяя

метод ЭПР. Для внутриклеточных экспериментов ЭПР от спиновых меток, вводимых в биомолекулу, требуется высокая устойчивость к биовосстановителям, присутствующим в клетках. Подходящими спиновыми метками для подобных экспериментов могут стать метки на основе стерически экранированных нитроксильных радикалов. [11 , 12 , 13] Ранее, в работе [14] были получены и охарактеризованы стерически экранированные радикал **2**, а также спиновая метка **1** на основе радикала **2** (Рисунок 2.1). Хотя в работе для радикала **2** была продемонстрирована высокая устойчивость к восстановлению аскорбиновой кислотой *in vitro* [14], метка **1** ни разу не тестировалась во внутриклеточных ЭПР исследованиях спин-меченных биомолекул. Таким образом, применяя спиновую метку **1**, мы с одной стороны изучили поведение RL2 в опухолевых клетках человека A549 в процессе его проникновения, а с другой стороны проверили применимость спиновой метки **1** для внутриклеточных экспериментов ЭПР.

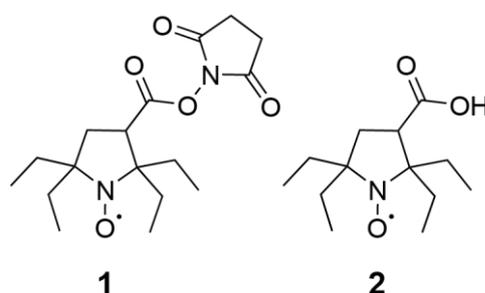


Рисунок 2.1 – Структурные формулы спиновой метки **1** и нитроксильного радикала **2**.

2.2 Экспериментальная часть

2.2.1 Особенности структуры и организации RL2 в растворе по данным методов магнитного резонанса

Процедуры экспрессии и очистки однородно обогащенных изотопами ^{15}N и ^{13}C образцов RL2, а также процедуры введения метки MTSL в RL2 и в $[\text{U-}^{15}\text{N}]\text{-RL2}$ были выполнены к.б.н. Чинак Ольгой Александровной (ИХБФМ СО РАН).

Экспрессия и очистка $[\text{U-}^{15}\text{N}$, $^{13}\text{C}]\text{-RL2}$ и $[\text{U-}^{15}\text{N}]\text{-RL2}$. Образцы RL2 однородно обогащенные изотопами ^{15}N или ^{15}N и ^{13}C были выделены из клеток E.coli, выращенных в средах (^{15}N , 98%) и (^{13}C , 98%; ^{15}N , 98%) с добавлением 3 мМ Na_2HPO_4 , 2.5 мМ KH_2PO_4 , 1 мМ NaCl и ампициллина 150 мг/л. Осадок клеток выделяли из культуральной среды и суспензировали в буфере для лизиса. RL2 выделяли методом аффинной хроматографии с

использованием сефарозы Imac. Все буферы содержали 0.1 М Tris-HCl (pH 7.5), 2 М мочевины, 10 мМ β-меркаптоэтанола. Далее проводили диализ RL2 против воды.

Спин-мечение [U-¹⁵N]-RL2 парамагнитной спиновой меткой MTSL. 1.5 мг RL2 было растворено в буферном растворе (4 М гуанидин гидрохлорид, 20 мМ ЭДТА, 0.1 М Tris-HCl pH 6.0). Далее добавлялся 1000 кратный избыток трис (2-карбоксииэтил)фосфин гидрохлорида – ТСЕР. После 3 часов инкубации при 55°C удаляли ТСЕР, используя концентратор Amicon Ultra 15 с отсечкой 3 кДа (Millipore, Берлингтон, штат Массачусетс, США). Затем RL2 инкубировали с 135 кратным избытком спиновой метки MTSL в течение ночи при 50°C. Далее непрореагировавшую часть спиновой метки и компоненты буфера удаляли, используя концентратор с отсечкой 3 кДа.

Приготовление образцов ЯМР. Образцы [U-¹⁵N, ¹³C]-RL2 и [U-¹⁵N] RL2-MTSL растворяли в смеси H₂O – D₂O (в соотношении 9 к 1) в 20 мМ ацетатном буфере (pH 3.9) и в 20 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 3.9), соответственно. Образцы [U-¹⁵N, ¹³C]-RL2 и [U-¹⁵N]-RL2 при pH~3.5 также были растворены в смеси H₂O – D₂O (в соотношении 9 к 1) с последующим титрованием HCl, отслеживая воспроизводимость спектров ¹H – ¹⁵N HSQC. Ко всем образцам в качестве эталонного стандарта для прямой и непрямой калибровки химических сдвигов было добавлено 50–100 мкМ моноватриевой соли 4,4-диметил-4-силапентан-1-сульфоновой кислоты (DSS).

Регистрация спектров ЯМР. Спектры ЯМР регистрировались при температуре 20.1 °C на спектрометре Bruker Avance AV-600 (¹H 600.30 МГц; ¹³C 150.95 МГц; ¹⁵N 60.83 МГц, Bruker Spectrospin, Карлсруэ, Германия), с использованием 5 мм {¹⁵N, ¹³C}¹H тройного резонансного z-градиентного датчика. Эксперименты с двойным и тройным резонансом проводились для отнесения сигналов основной цепи белка. Применялись следующие импульсные последовательности 2D: ¹⁵N-TOCSY, ¹⁵N-NOESY, ¹H-¹⁵N HSQC, 3D: CBCANH, CBCA(CO)NH, HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA. Для измерения релаксационных параметров амидных групп основной цепи RL2 использовались стандартные импульсные программы Bruker из библиотеки встроенной в программу Topspin 2.8 (T₁: hsqct1etf3gpsi.2; T₂: hsqct2etf3gpsi; HETNOE: hsqcnoef3gpsi). Для измерений значений T₁ релаксационные задержки в импульсной последовательности были выставлены 50 мс, 110 мс, 180 мс, 256 мс, 346 мс, 460 мс, 600 мс, 1.2 с, и 1.8 с и для измерений значений T₂ задержки были выставлены 0 мс, 16 мс, 33 мс, 49 мс, 66 мс, 98 мс, и 147 мс, соответственно. При регистрации спектров HETNOE, резонансы протонов насыщали в течение 5 секунд с помощью последовательности жестких 120° импульсов (длительностью 14.3 мкс), разделенных временными промежутками 5 мс. Все

спектры ЯМР обрабатывали с помощью программы Bruker Topspin и анализировали с помощью программы CCPNMR2 [175].

Приготовление образцов RL2-MTSL. Получение и обработка данных ЭПР. Спектры ЭПР в X-диапазоне частот регистрировали с использованием коммерчески доступного ЭПР-спектрометра Bruker EMX (9 ГГц, Bruker Spectrospin, Карлсруэ, Германия). Спин-меченный образец RL2-MTSL (5×10^{-4} М), предоставленный к.б.н. Чинак Ольгой Александровной (ИХБФМ СО РАН), растворяли в буферном растворе, состоящем из 50% D₂O и 50% дейтероглицерина (D8-глицерина) при pH 3.9, а также при pH 7.5 с добавлением 150 мМ NaCl. Растворы помещали в капилляр диаметром 0.5 мм для получения спектров ЭПР при температурах 300 К и 132 К. Внешнее магнитное поле модулировали с частотой 100 кГц и амплитудой модуляции 1 Гс. Мощность микроволнового излучения была установлена на значение 2.0 мВт. Константа времени 20.48 мс. Моделирование спектров ЭПР выполнялось с помощью программного пакета Easy Spin (www.easyspin.org, версия 5.2.28) [176, 177].

2.2.2 Поведение RL2 в клетках A549 в процессе его проникновения по данным ЭПР и конфокальной микроскопии

Процедуры хроматографического выделения димеров RL2, приготовления образцов sRL2, приготовления образцов клеток A549, инкубированных с sRL2, а также оценка жизнеспособности клеток при проведении экспериментов ЭПР были выполнены к.б.н. Чинак Ольгой Александровной (ИХБФМ СО РАН).

Процедуры получения и обработки данных конфокальной микроскопии были выполнены к.м.н. Чечушковым Антоном Владимировичем (ИХБФМ СО РАН), пробоподготовка для экспериментов конфокальной микроскопии была сделана к.б.н. Чинак Ольгой Александровной (ИХБФМ СО РАН).

Хроматографическое выделение димеров RL2. Димеры выделяли из RL2, используя гель-фильтрацию на Superdex 200 (GE Healthcare, Стокгольм, Швеция) в растворе 0.15 М NaCl, 50 мМ NaAc (pH 5.5) при отсутствии восстанавливающих агентов. Затем буфер удалялся в концентраторе Amicon Ultra 15 с отсечкой 10 кДа (Millipore, Берлингтон, штат Массачусетс, США). Молекулярная масса димеров оценивалась методом SDS-PAGE при отсутствии восстановителей (Рисунок 2.2).

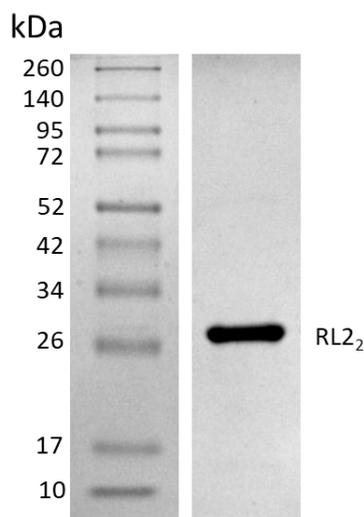


Рисунок 2.2 – SDS-PAGE: слева – маркер 4-20% TRIS-glycine SDS-PAGE; справа – выделенный димер RL2 (RL₂)

Приготовление образцов sRL2. N-Гидроксисукцинимидная группа спиновой метки **1** позволяет ей вступать в реакцию с аминами с последующим ковалентным связыванием нитроксильного радикала по положению аминокислотной группы макромолекулы. Таким образом, метка **1** может вводиться в положения остатков лизина (Рисунок 2.3). Процедура приготовления образцов RL₂, спин меченных меткой **1** по положениям остатков лизина была следующей: реакционную смесь, содержащую растворы 0.5 мМ RL₂, 5 мМ спиновой метки **1**, 55 мМ Трис-НСl (рН 7) и 15% ДМСО, инкубировали при 25°С в течение 7 часов. Учитывая гидрофобность спиновой метки **1** и склонность RL₂ к агрегации, несвязавшаяся метка **1** извлекалась из агрегатов RL₂, используя гуанидин гидрохлорид, с последующей гель-фильтрацией sRL₂ на колонке с сорбентом Sephadex G-25. Концентрацию спиновых меток в образцах sRL₂ измеряли методом ЭПР-спектроскопии, а концентрацию белка определяли с использованием спектрофотометрического метода Брэдфорда.

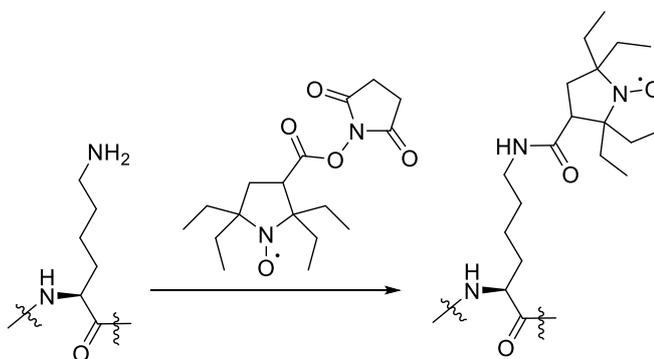


Рисунок 2.3 – Схема мечения боковой цепи остатка лизина спиновой меткой **1**.

Приготовление образцов клеток A549 инкубированных с sRL2. Клетки A549 высевали в матрасик для культивирования T25 в плотности 8×10^5 клеток / лунку за 24 часа до эксперимента ЭПР. Спустя 24 часа культуральную среду удаляли из лунок, клетки промывали раствором PBS. В культуральной среде DMEM, содержащей пенициллин, стрептомицин, амфотерицин, L-глутамин, растворяли sRL2 (5.5 мкМ RL2₂, 22 мкМ **1** или 0.5 мкМ RL2₂, 2 мкМ **1**) или радикал **2** (2 мкМ), который добавляли к клеткам и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Затем культуральную среду отбирали для анализа на ЭПР. Клетки дважды промывали раствором PBS и инкубировали при 37 °С с 300 мкл раствора 0,05% трипсина-ЭДТА для гидролиза sRL2, локализованного на поверхности клеток, а также открепления клеток от культурального матрасика. Процесс отделения клеток контролировали с помощью микроскопа. Для инактивации трипсина в клетки добавляли среду DMEM, содержащую 10% эмбриональной бычьей сыворотки, пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В и L-глутамин. Суспензию клеток центрифугировали в течение 4 минут при 900 g. Супернатант удаляли, а клетки промывали раствором PBS и центрифугировали в тех же условиях; процедура была повторена дважды. Затем для всех экспериментов с клетками A549 4 мкл клеточного осадка аккуратно помещали в капилляр для измерений ЭПР.

В случае эксперимента с азидом натрия клетки A549 также высевали и инкубировали в течение 24 часа и также после промывали раствором PBS. Затем DMEM с 1% NaN₃ добавляли к клеткам. После инкубации в течение 30 минут исходная среда заменялась на DMEM с добавлением 1% NaN₃ и sRL2 (1.34 мкМ RL2₂, 4.69 мкМ **1**). Последующие процедуры с клетками были такими же, как описано выше. Для аналогичного эксперимента ЭПР, но без добавления азид натрия, процедура приготовления клеток A549 была такая же, как описано выше.

Получение и обработка данных ЭПР sRL2 в A549. Спектры ЭПР в X-диапазоне регистрировали с использованием коммерческого ЭПР-спектрометра Bruker EMX (9 ГГц, Bruker Spectrospin, Карлсруэ, Германия) и резонатора Bruker ER4119HS. Во всех экспериментах внешнее магнитное поле модулировалось с частотой 100 кГц и, где не оговорено обратное, с амплитудой модуляции 1 Гс. Во всех экспериментах ЭПР мощность микроволнового излучения была выставлена на 2 мВт. Для определения спиновой концентрации во всех экспериментах в качестве внешнего стандарта использовался образец 0.1 мМ спиновой метки **1** в воде. Эксперименты ЭПР на образцах клеток A549 инкубированных с sRL2 проводились при температуре 35 °С, стабилизация которой обеспечивалась цифровой системой контроля температуры Bruker, ER 4131VT. Моделирование спектров ЭПР выполнялось с помощью программного пакета Easy Spin (www.easyspin.org, версия 5.2.28) [176, 177].

Жизнеспособность клеток при проведении экспериментов ЭПР. Клетки A549, инкубированные с 5.5 мкМ и 0.5 мкМ sRL2 (среднее отношение 1 к RL2₂ равно 4) частично отбирались, чтобы оценить жизнеспособность клеток в течение проведения экспериментов ЭПР. Отобранные образцы клеток выдерживали при температуре 37°C с трипановым синим (4,4'-бис(1-гидрокси-8-амино-3,6-дисульфонафталиназо)-3,3'-диметилбифенила динатриевая соль) – красителем, избирательно окрашивающим мертвые клетки. Подсчет мертвых и живых клеток показал, что для двух описанных выше экспериментов ~95% клеток остаются живы спустя 6.5 часов с момента окончания инкубации клеток с sRL2, однако 100% клеток оказываются мертвыми спустя 24 часа. По нашим данным инкубация клеток A549 в течение 48 часов в культуральной среде DMEM с 28 мкМ RL2 приводит к гибели лишь 50% клеток. Таким образом, низкая жизнеспособность клеток A549 при проведении экспериментов ЭПР не является следствием цитотоксической активности sRL2, а определяется условиями проведения экспериментов: образцы клеток для экспериментов ЭПР представляли собой клеточный осадок с минимальным количеством раствора натрий-фосфатного буфера. В последующих двух экспериментах ЭПР, где A549 инкубировали с 1.34 мкМ sRL2 (среднее отношение 1 к RL2₂ равно 3.5) с добавлением и без добавления азида натрия, клеточные осадки специально разбавляли раствором натрий-фосфатного буфера в объемном отношении 1 к 1. Подсчет мертвых и живых клеток для обоих случаев показал, что 99% клеток остаются живыми спустя 10 часов и 27% клеток остаются живыми спустя 24 часа с момента окончания инкубации клеток A549 с sRL2.

Получение и обработка данных конфокальной микроскопии. Клетки A549 помещали в чашки Петри μ -Dish 35 мм (ibiTreat, США) за 18 часов до проведения экспериментов конфокальной микроскопии. Клетки промывали раствором PBS и инкубировали в течение 30 минут в среде DMEM, содержащей L-глутамин, антибиотики и 1 мкМ конъюгата RL2₂ с родаминовым красителем, приготовление которого осуществляли по методике, описанной в работе [174]. После инкубации клетки дважды промывали раствором PBS и в течение 20 минут обрабатывали LysoSensor Green DND-189, затем дважды промывали раствором PBS и обрабатывали в DMEM в течение 15 минут флуоресцентным красителем Hoechst 33342, окрашивающим ядра живых клеток. Затем исходную среду заменяли на среду DMEM, содержащую 10% эмбриональной бычьей сыворотки, пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В и L-глутамин. Полученные образцы клеток исследовали методом конфокальной микроскопии, используя лазерный сканирующий микроскоп, оснащенный модулем для нагрева образцов (Carl Zeiss, Йена, Германия). Изображения получали, применяя иммерсионный

масляный объектив с линейным увеличением 63х. Для визуализации изображений применялись программы ZEN black edition (Carl Zeiss, Германия) и CellProfiler [178].

2.3 Особенности структуры и организации RL2 в растворе по данным методов магнитного резонанса

2.3.1 Влияние pH на агрегацию RL2 в растворе по данным ЭПР

Первичная последовательность RL2 представляет собой последовательность из 121 аминокислотного остатка (Таблица 2.1). Поскольку RL2 включает в себя бóльшую часть последовательности человеческого к-казеина, то, так же как и к-казеин, RL2 обладает богатыми Pro и Gln «липкими последовательностями», стимулирующими белок-белковые взаимодействия. [5] Поэтому от RL2, так же как от к-казеинов, следует ожидать формирование казеиновых мицелл.

Таблица 2.1 – Последовательность аминокислотных остатков RL2 в однобуквенном представлении. Выделенные цветом остатки аминокислот – остатки пролина (бирюзовым) и глутамина (фиолетовым), а также остаток цистеина (синим).

MN**Q**K**Q**P**A**C**H**E NDER**P**F**Y****Q**K**T** A**P****Y**V**P**M**Y**Y**V**P NS**Y**P**Y**Y**G**T**N**L **Y****Q**R**R**P**A**I**A**I**N** (1-50)
 N**P****Y**V**P**R**T**Y**Y**A N**P**A**V**V**R**P**H**A**Q** I**P****Q**R**Q**Y**L**P**N**S H**P**P**T**V**V**R**R**P**N** L**H**P**S**F**I**A**I**P**P** (51-100)
 K**K**I**Q**D**K**I**I**I**P** T**I**G**G**S**H**N**N**N**N**N H (101-121)

Применяя метод ЭПР, была изучена склонность мономера RL2 формировать агрегаты при 1) кислом значении pH и в условиях 2) нейтрального значения pH в присутствии ионной силы. Для этого образец RL2, меченный спиновой меткой MTSL по положению Cys8 (RL2-MTSL), приготавливался в условиях ацетатного буфера (pH = 3.9), а также в водном растворе с pH = 7.5 и 150 mM NaCl (см. экспериментальную часть). Спектры ЭПР этих образцов, регистрируемые при температурах 300 К и 132 К, приведены на рисунке 2.4. При моделировании спектров ЭПР при 300 К (Рисунок 2.4 А, В) в качестве фиксированных параметров моделирования за исключением времени корреляции вращения τ брались те, которые были получены при моделировании спектра ЭПР RL2-MTSL в условиях замороженного раствора (Рисунок 2.4 Б). При pH = 3.9 и 300 К в спектре ЭПР (Рисунок 2.4 А) обнаружено наличие двух спектральных компонент: одна с долей спинов ~96% была отнесена к RL2-MTSL (время корреляции вращения $\tau = 1.95$ нс), другая с долей спинов ~4% – к спиновой метке MTSL, не связанной с RL2 (время корреляции вращения $\tau = 0.27$ нс).

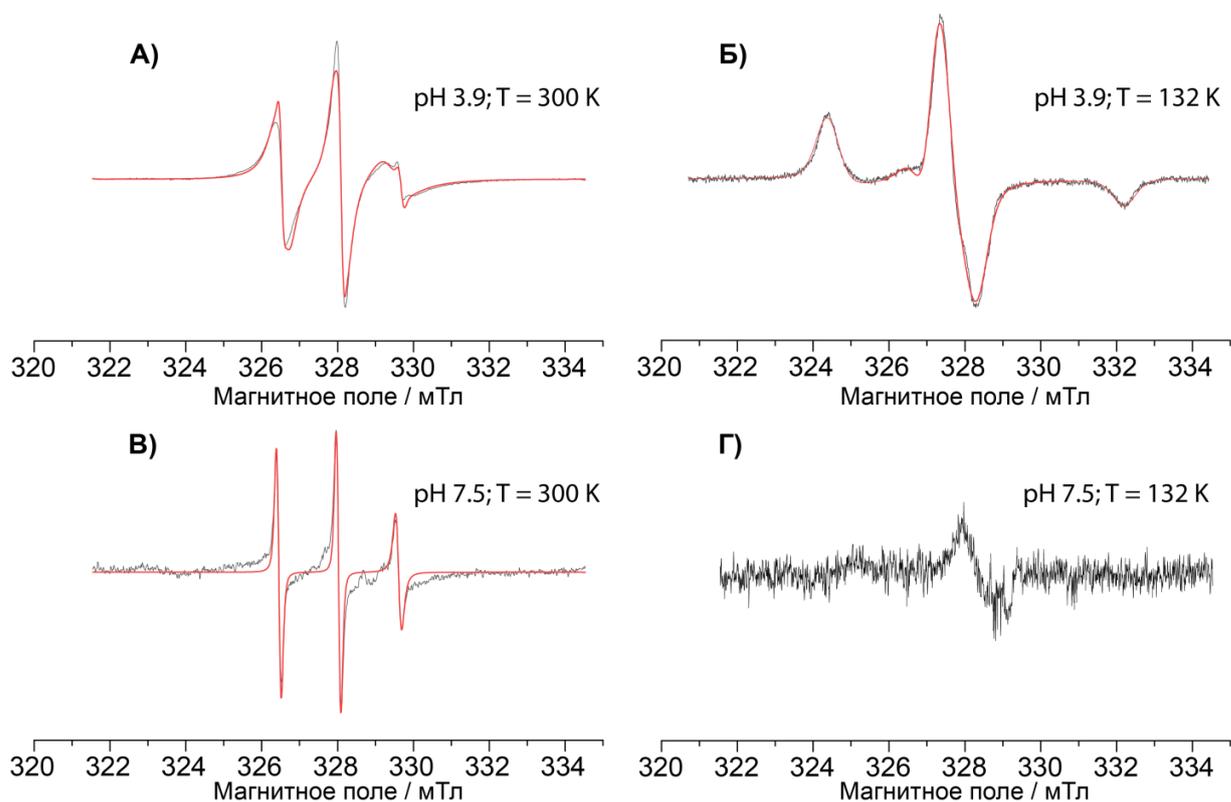


Рисунок 2.4 – Спектры ЭПР (черным цветом) образцов RL2-MTSL (концентрация спинов в каждом случае 4×10^{-4} М), приготовленных в растворе 50% D₂O и 50% дейтероглицерина при условиях (А) и (Б) рН = 3.9, ацетатный буфер; (В) и (Г) рН = 7.5, 150 мМ NaCl. Спектры ЭПР получены при температурах Т = 300 К (А) и (В), Т = 132 К (Б) и (Г). Моделирования (красным цветом) экспериментальных спектров ЭПР (А-В) выполнены со следующими параметрами: $g_{xx} = g_{yy} = 2.0071$, $g_{zz} = 2.0022$, $A_{xx} = A_{yy} = 0.5$ мТл, $A_{zz} = 3.7$ мТл. Спектр (Б) моделировался, предполагая твердотельный вид спектра. Спектры (А) и (В) моделировались, предполагая режим заторможенного изотропного вращения. В спектре (А) на фоне основной спектральной компоненты (~96% спинов) с временем корреляции вращения $\tau = 1.95$ нс присутствует спектральная компонента (~4% спинов) с временем корреляции вращения $\tau = 0.27$ нс. Малоинтенсивная спектральная компонента в (А) полностью воспроизводится (в том числе по интенсивности) в спектре (В).

Спектры стационарного ЭПР образцов RL2-MTSL, приготовленных в условиях кислого и нейтрального значения рН, сильно отличаются (Рисунок 2.4). При температуре 300 К видно, как при изменении значения рН от 3.9 до 7.5 (с добавлением ионной силы в виде 150 мМ NaCl) спектральная компонента, относящаяся к RL2-MTSL, значительно уширяется, в то время как компонента, относящаяся к спиновой метке MTSL, не связанной с белком, остается неизменной (Рисунок 2.4 А, В). При температуре 132 К большая часть интенсивности спектра ЭПР образца RL2-MTSL при рН = 3.9 не воспроизводится в спектре ЭПР образца RL2-MTSL при рН = 7.5 (Рисунок 2.4 Б, Г). Таким образом, по-видимому, спектральная компонента, относящаяся к RL2-MTSL, в образце с рН = 7.5 и 150 мМ NaCl является сильно уширенной и не наблюдается в спектрах ЭПР ни при 132 К, ни при 300 К (Рисунок 2.4 Г). Уширение спектра ЭПР, как правило, свидетельствует о наличии обменного взаимодействия между электронными спинами

и/или о наличии дополнительных механизмов спиновой релаксации. При формировании агрегатов из RL2-MTSL спиновые метки могут оказаться пространственно близко по отношению друг к другу, что в свою очередь может привести и к появлению обменного взаимодействия между электронными спинами и к ускорению спиновой релаксации по диполь-дипольному механизму.

Для этих же образцов RL2-MTSL мы провели эксперименты импульсного двойного электрон-электронного резонанса DEER (4ех импульсный аналог PELDOR) при температуре 80 К (данные не представлены). Как оказалось, для образца RL2-MTSL при pH = 3.9 не было выявлено наличие диполь-дипольных осцилляций в зависимости V(T) DEER (см. 1.2.2.2 *Определение пространственной структуры белка по данным PELDOR*), что хорошо согласуется с тем, что при pH = 3.9 большинство молекул RL2-MTSL не находится в агрегированном состоянии. С другой стороны получить зависимость V(T) DEER для образца RL2-MTSL при pH = 7.5 и 150 мМ NaCl не удалось из-за слишком короткого времени электронной спиновой релаксации T₂, что можно объяснить как наличием обменного взаимодействия между электронными спинами, так и наличием большого распределения диполь-дипольных взаимодействий, ускоряющих электронную спиновую релаксацию. Таким образом, результаты экспериментов DEER согласуются с результатами стационарного ЭПР (Рисунок 2.4) и ясно свидетельствуют о том, что бóльшая часть мономерного RL2 переходит в агрегированное состояние при переходе от кислых значений pH в область физиологических значений pH. Такое поведение хорошо согласуется с поведением к-казеинов в растворе при физиологических условиях, где они склонны к образованию агрегатов, также называемых казеиновыми мицеллами. [63 , 179]

2.3.2 Влияние pH на спектры ЯМР RL2

Агрегаты белков ввиду их большой молекулярной массы являются «невидимыми» в спектрах ЯМР. Поскольку как показано выше при физиологических условиях в растворе RL2 образует агрегаты, то необходимо было подобрать оптимальные условия записи спектров ЯМР, где бóльшая часть белка не находится в агрегированном состоянии. Таким условием на величину pH, как показано выше, может быть диапазон значений pH = 3.5 – 4.0. Действительно, спектр ЯМР ¹H-¹⁵N HSQC образца RL2 однородно обогащенного изотопом ¹⁵N ([U-¹⁵N]-RL2) при pH = 7.0 оказался плохого качества: помимо влияния агрегации, сказывающейся на потере общей интенсивности спектра ЯМР, большинство сигналов ¹H-¹⁵N амидных групп RL2 отсутствуют в спектре ¹H-¹⁵N HSQC из-за обмена амидных протонов с протонами воды

(Рисунок 2.5 А). По мере того, как образец $[U-^{15}N]$ -RL2 был оттитрован до значения $pH = 3.5$, скорость обмена протонов амидных групп с протонами растворителя уменьшилась, и отсутствующие кросс-пики проявились в спектре $^1H-^{15}N$ HSQC (Рисунок 2.5 Б). Таким образом, спектры ЯМР хорошего качества для RL2 были достигнуты при значениях pH близких к 4 и при температуре $20.1\text{ }^\circ\text{C}$.

Как показано в литературном обзоре, IDP в растворе обладают характерным видом спектра $^1H-^{15}N$ HSQC, где сигналы амидных протонов IDP сосредоточены в узком спектральном диапазоне 1-1.5 м.д. и обладают гораздо меньшими значениями ширины линий, по сравнению с картиной, наблюдаемой для глобулярных белков. [180] Кроме того, поскольку все амидные протоны основной цепи IDP в целом одинаково хорошо доступны растворителю, они одинаково эффективно обмениваются с протонами растворителя. По малой величине дисперсии химических сдвигов 1H и малой величине ширины линий по оси 1H в спектре $^1H-^{15}N$ HSQC образца $[U-^{15}N]$ -RL2 при $pH = 3.5$ (Рисунок 2.5 Б), а также по тому, что при $pH = 7.0$ отсутствует большинство сигналов амидных протонов из-за их обмена с протонами воды (Рисунок 2.5 А), можно сделать вывод, что RL2 является IDP.

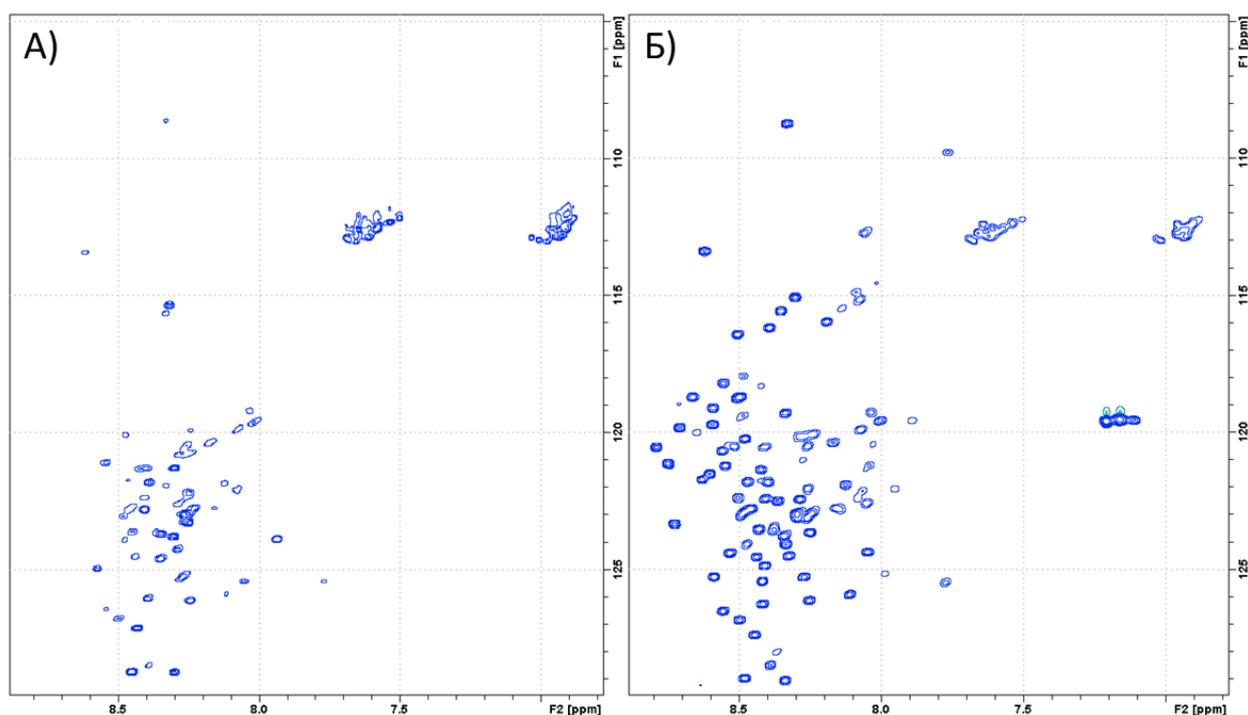


Рисунок 2.5 – Спектры $^1H-^{15}N$ HSQC образца $[U-^{15}N]$ -RL2 при $20.1\text{ }^\circ\text{C}$ и $pH = 7.0$ (А) или $pH = 3.5$ (Б).

Как правило, влияние pH на структурные особенности не агрегирующих IDP является небольшим до тех пор, пока величина pH не приближается к изоэлектрической точке PI белка. [181] Поскольку экспериментально измеренная величина PI RL2 составляет 8.0 (данные не представлены), то следует ожидать, что структурные особенности отдельных молекул RL2 при

кислых значениях pH и при pH = 7.0 не будут сильно отличаться. Таким образом, условия pH = 3.5–3.9 и температуры 20.1 °C были выбраны как наиболее оптимальные для получения хорошего качества спектров ЯМР и дальнейшей характеристики особенностей структуры RL2 в растворе.

2.3.3 Отнесение сигналов ЯМР основной цепи RL2 в растворе

С целью выявления более упорядоченных участков основной цепи RL2 в растворе мы измерили релаксационные параметры T_1 , T_2 ядер ^{15}N и ^1H - ^{15}N NOE амидных групп NH основной цепи белка. Как было показано в литературном обзоре, получение этих параметров – один из рядовых способов определения динамики основной цепи IDP в растворе. Предварительно необходимо было соотнести кросс-пики в спектре ^1H - ^{15}N HSQC с индивидуальными амидными группами NH основной цепи RL2. Для проведения процедуры отнесения сигналов выполнялась серия трехмерных экспериментов ЯМР CBCA(CO)NH, CBCANH, HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, а также двумерных экспериментов ЯМР ^{15}N -TOCSY, ^{15}N -NOESY, ^1H - ^{15}N HSQC для образцов RL2, однородно обогащенных изотопами ^{15}N и ^{13}C ($[\text{U-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -RL2), в условиях водного раствора с pH = 3.5 и ацетатного буфера (pH = 3.9). По полученным спектрам было выполнено последовательное отнесение сигналов ЯМР основной цепи RL2. При такой процедуре отнесения сигналы i -ого аминокислотного остатка соотносятся с сигналами $(i - 1)$ -ого и, поэтому, зная первичную последовательность RL2, можно однозначно соотнести кросс-пики в спектрах ЯМР с ядрами индивидуальных аминокислотных остатков в первичной последовательности RL2. Таким образом, были получены значения химических сдвигов индивидуальных ядер ^1H , ^{15}N и ^{13}C основной цепи белка (приложение Таблицы П.1 – П.2). Выполненное отнесение в спектрах ^1H - ^{15}N HSQC для образцов $[\text{U-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -RL2 при pH = 3.5 и pH = 3.9 было перенесено на спектры ^1H - ^{15}N HSQC образцов $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -RL2 при pH = 3.5 и $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -RL2-MTSL (RL2, однородно обогащенный изотопом ^{15}N и меченный по положению Cys8 спиновой меткой MTSL) при pH = 3.9. (Рисунки 2.6 и 2.7).

Среди 121 аминокислотного остатка первичной последовательности RL2 20 являются остатками пролина, в которых отсутствуют амидные группы NH и поэтому в спектре ^1H - ^{15}N HSQC нет соответствующих кросс-пиков остатков пролина. Кроме того, в N-концевом остатке Met вместо NH группы находится группа NH_2 , сигналы которой вынесены за спектральный диапазон кросс-пиков NH амидов. Поэтому ожидалось, что в спектре ^1H - ^{15}N HSQC RL2 в идеале должны проявиться 100 кросс-пиков от NH групп основной цепи RL2. Однако, как

показано на рисунке 2.6, помимо основных отнесенных кросс-пиков в спектре $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC присутствуют также дополнительные кросс-пики с меньшей интенсивностью. Из-за того, что эти пики являются малоинтенсивными, сделать для них процедуру последовательного отнесения не получилось. Причина появления дополнительных пиков может заключаться в наличии минорных конформеров RL2 за счет *цис*-конформаций остатков пролина. Действительно, поскольку кросс-пики в спектрах ЯМР для IDP являются усредненными для набора конформеров белка (см. Литературный обзор), обменивающихся друг с другом на масштабах времен меньших, чем характерное время получения одного скана в спектрах ЯМР (~ 1-10 с), то наличие дополнительных пиков в спектрах ЯМР может свидетельствовать о наличии дополнительных конформеров белка, которые если и находятся в обмене с основными конформерами белка, то характерное время обмена значительно превышает время получения одного скана в спектрах ЯМР. Если в глобулярных белках за счет стерических затруднений образование *цис*-конформаций остатков пролина затруднено, то в IDP за счет большей подвижности и гибкости основной цепи белка остатки пролина более склонны принимать *цис*-конформацию, на которую может приходиться более 10% среди всех остатков пролина. При этом характерное время обмена между *цис*- и *транс*-конформациями остатков пролина в IDP находится в диапазоне значений 10^2-10^3 с. [182] Поэтому, наличие *цис*-конформаций остатков пролина RL2 будет приводить к появлению дополнительных кросс-пиков в спектрах ЯМР. Учитывая, что первичная последовательность RL2 состоит из 20 остатков пролина, то вероятность появления дополнительных кросс-пиков за счет *цис*-конформаций остатков пролина является высокой. В литературе схожая ситуация наблюдалась при отнесении резонансов ^1H , ^{13}C , ^{15}N неупорядоченного фрагмента белка человеческого эмерина (67-170 а.о.). В этом фрагменте находятся 6 остатков пролина. [183] Более того, для участка человеческого казеина (108-125 а.о.) или что то же самое для участка RL2 (86-103 а.о.), содержащего 4 остатка пролина, при отнесении сигналов ^1H ЯМР малоинтенсивные пики тоже были обнаружены и их отнесение также сделать не удавалось. Авторы приписали появление малоинтенсивных пиков к наличию минорных конформеров пептида. [184]

Важно отметить, что основные конформеры RL2, проявляемые в спектрах ЯМР в виде наиболее интенсивных сигналов, для которых было выполнено отнесение, содержат исключительно остатки пролина, находящиеся в *транс*-конформации, поскольку химические сдвиги $^{13}\text{C}^\beta$ всех остатков пролина (за исключением тех, которые находятся в положениях 82 и 99 а.о. первичной последовательности RL2) попадают в диапазон значений 31.5 – 32.2 м.д. типичных для *транс*-конформации. [185] Для остатков пролина в положениях 82 и 99 а.о. RL2 из-за их расположения в участках Pro-Pro стандартная процедура последовательного отнесения

с выполненными трехмерными и двумерными экспериментами ЯМР не позволяла отнести сигналы ядер $^{13}\text{C}^\beta$ этих участков и, следовательно, невозможно было установить в какой из двух конформаций (*цис* или *транс*) находятся эти остатки пролина в основных конформерах RL2.

Поскольку RL2 в растворе присутствует как в виде мономера (14 кДа), так и -S-S-ковалентно связанного гомодимера (28 кДа) в схожих количествах [8], то ожидалось, что в спектрах ^1H - ^{15}N HSQC будут проявляться сигналы от обеих форм RL2. Однако количество интенсивных сигналов согласуется с наличием в спектрах ^1H - ^{15}N HSQC [U- ^{13}C , ^{15}N]-RL2 только одной из форм. При этом выполненное отнесение удалось перенести на спектр ^1H - ^{15}N HSQC диамагнитного образца [U- ^{15}N]-RL2-MTSL (Рисунок 2.7 (Б)), где заведомо присутствует только мономерная форма белка, поскольку метка MTSL, связанная с RL2 через единственный остаток Cys8, предотвращает самопроизвольное образование гомодимеров RL2. При этом малоинтенсивные кросс-пики также были обнаружены в спектре ^1H - ^{15}N HSQC диамагнитного образца [U- ^{15}N]-RL2-MTSL и поэтому они не могут быть отнесены к димерной форме RL2. Таким образом, регистрируемой в спектрах ЯМР формой RL2 является мономер и дальнейшее определение структурных особенностей RL2 в растворе было выполнено для мономерной формы белка. Вероятно, зарегистрировать димер RL2 в спектрах ЯМР не удастся из-за его большей молекулярной массы (28 кДа), что приводит к гораздо более быстрой релаксации ядер, из-за чего сигналы в ЯМР от димера RL2 сильно уширены. Другой причиной не проявления кросс-пиков димера RL2 в спектрах ЯМР может оказаться то, что димер RL2 по сравнению с мономерной формой является более склонным к образованию агрегатов и поэтому преимущественно находится в агрегированном состоянии RL2 «невидимом» для ЯМР.

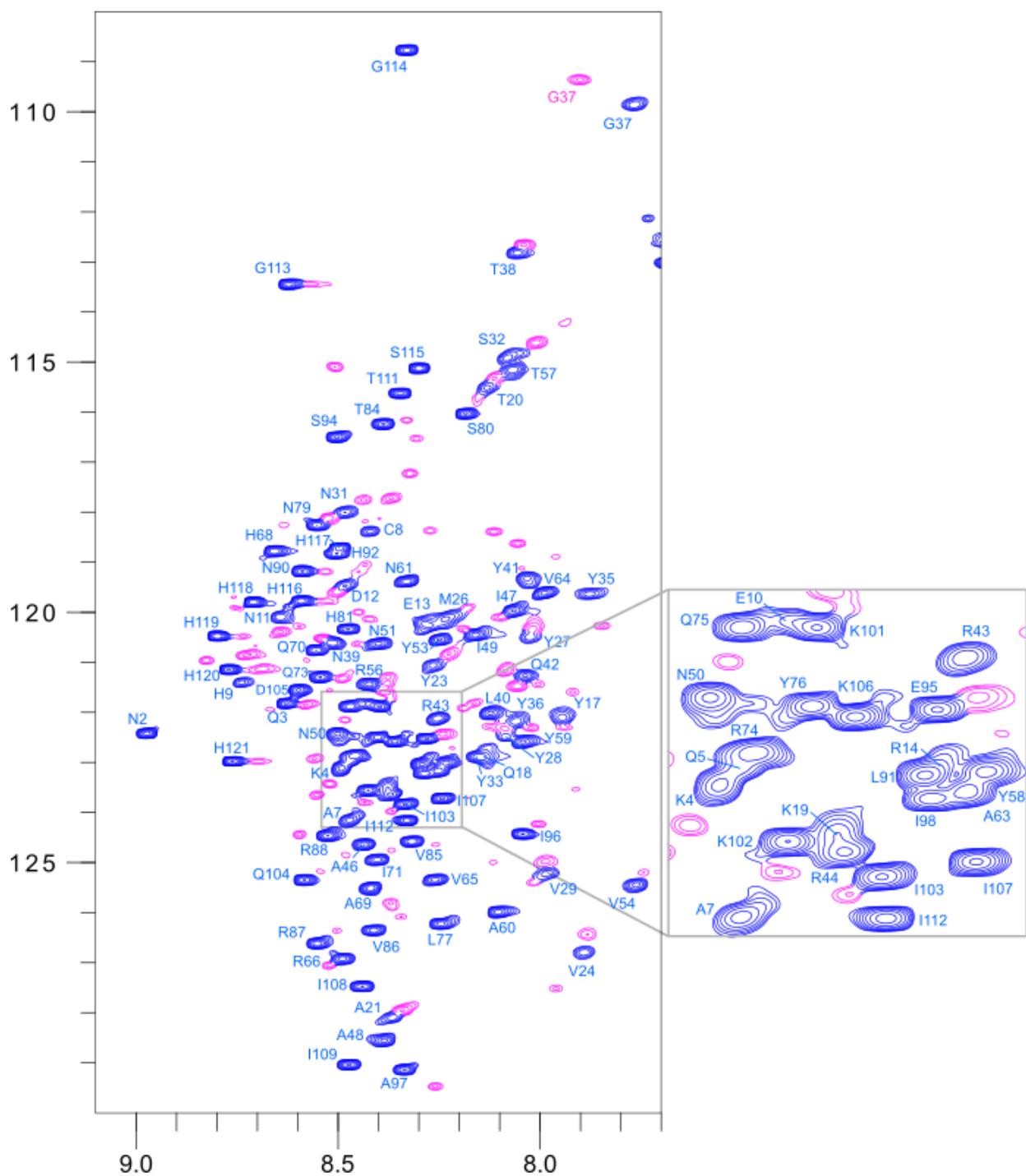


Рисунок 2.6 – Спектр ^1H - ^{15}N HSQC образца $[\text{U-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -RL2 при $\text{pH} = 3.5$ и температуре $20.1\text{ }^\circ\text{C}$. Синим цветом показаны отнесенные пики, фиолетовым цветом отмечены дополнительные пики.

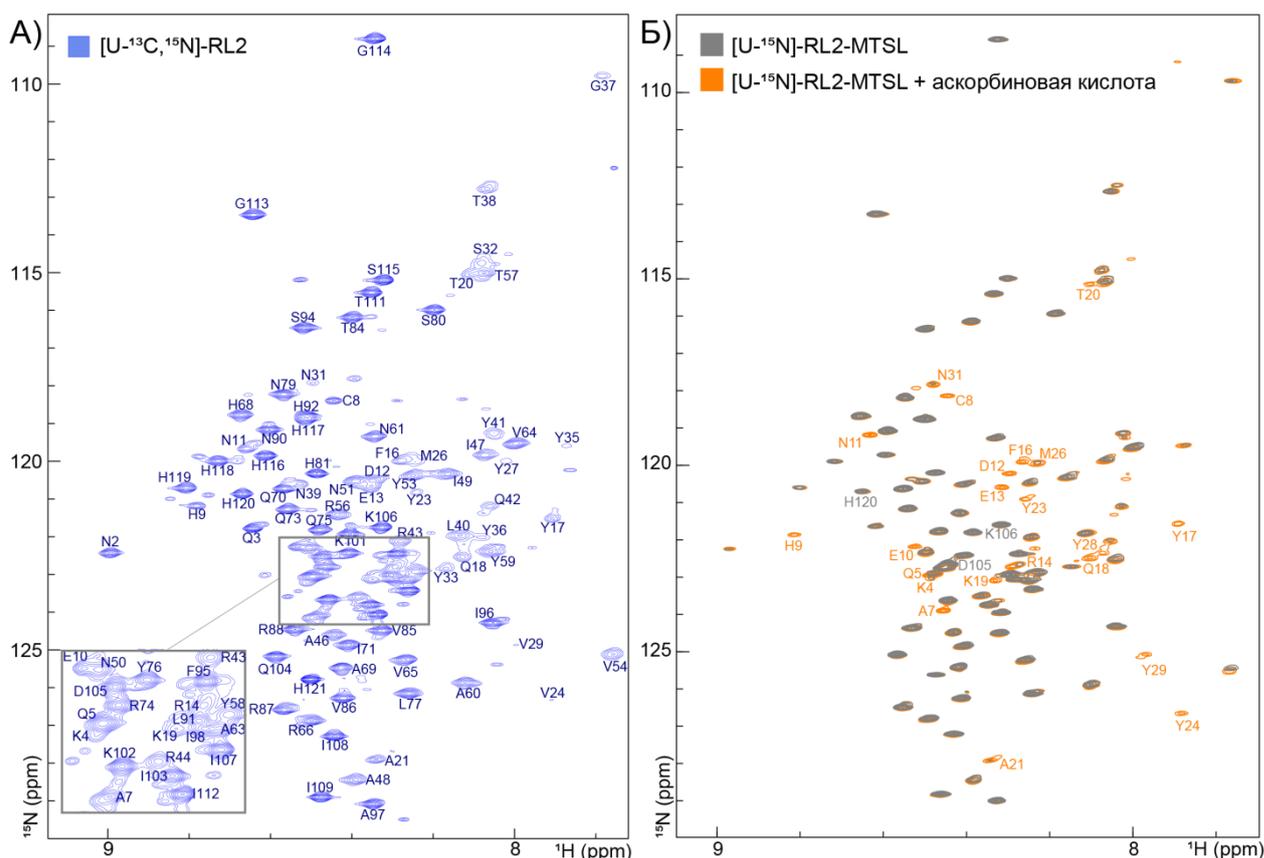


Рисунок 2.7 – Спектры ЯМР ^1H - ^{15}N HSQC образцов **А)** $[\text{U}-^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]\text{-RL2}$ (ацетатный буфер, pH 3.9) (с приведенным отнесением пиков), **Б)** $[\text{U}-^{15}\text{N}]\text{-RL2-MTSL}$ (ацетатный буфер, pH 3.9) до (серые пики) и после восстановления спиновой метки (оранжевые пики) аскорбиновой кислотой.

2.3.4 Динамика основной цепи RL2 в растворе по данным ^{15}N R_1 , R_2 , ^1H - ^{15}N NOE

Релаксационные параметры T_1 , T_2 ядер ^{15}N и ^1H - ^{15}N NOE амидных групп NH основной цепи RL2 были измерены для образцов диамагнитного $[\text{U}-^{15}\text{N}]\text{-RL2-MTSL}$ (ацетатный буфер, pH = 3.9) и $[\text{U}-^{15}\text{N}]\text{-RL2}$ (водный раствор, pH = 3.5). Как оказалось, динамика в пс-нс временном диапазоне для RL2 меченного меткой MTSL и немодифицированного RL2 почти полностью совпадает, о чем говорят почти идентично воспроизводящиеся значения ^{15}N T_1 , T_2 и ^1H - ^{15}N NOE основной цепи RL2 (Рисунок 2.8). Отличия в динамике в области полигистидиновой последовательности на С-конце мы связываем с отличием в значениях pH (3.5 против 3.9), а также с возможным влиянием ацетатного буфера, в то время как отличия в области участков, расположенных в первичной последовательности близко к остатку Cys8 (1-2 а.о. с каждой стороны), наиболее вероятно вызваны наличием/отсутствием метки MTSL. Также стоит отметить, что спектры ^1H - ^{15}N HSQC диамагнитного образца $[\text{U}-^{15}\text{N}]\text{-RL2-MTSL}$ и образца $[\text{U}-^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]\text{-RL2}$ при pH = 3.9 (Рисунок 2.7) являются почти идентичными. Таким образом, можно

сделать вывод о том, что наличие метки MTSL в положении Cys8 в RL2 приводит к минимальным искажениям динамики основной цепи RL2, а также к минимальным возмущениям естественных конформаций RL2 в растворе.

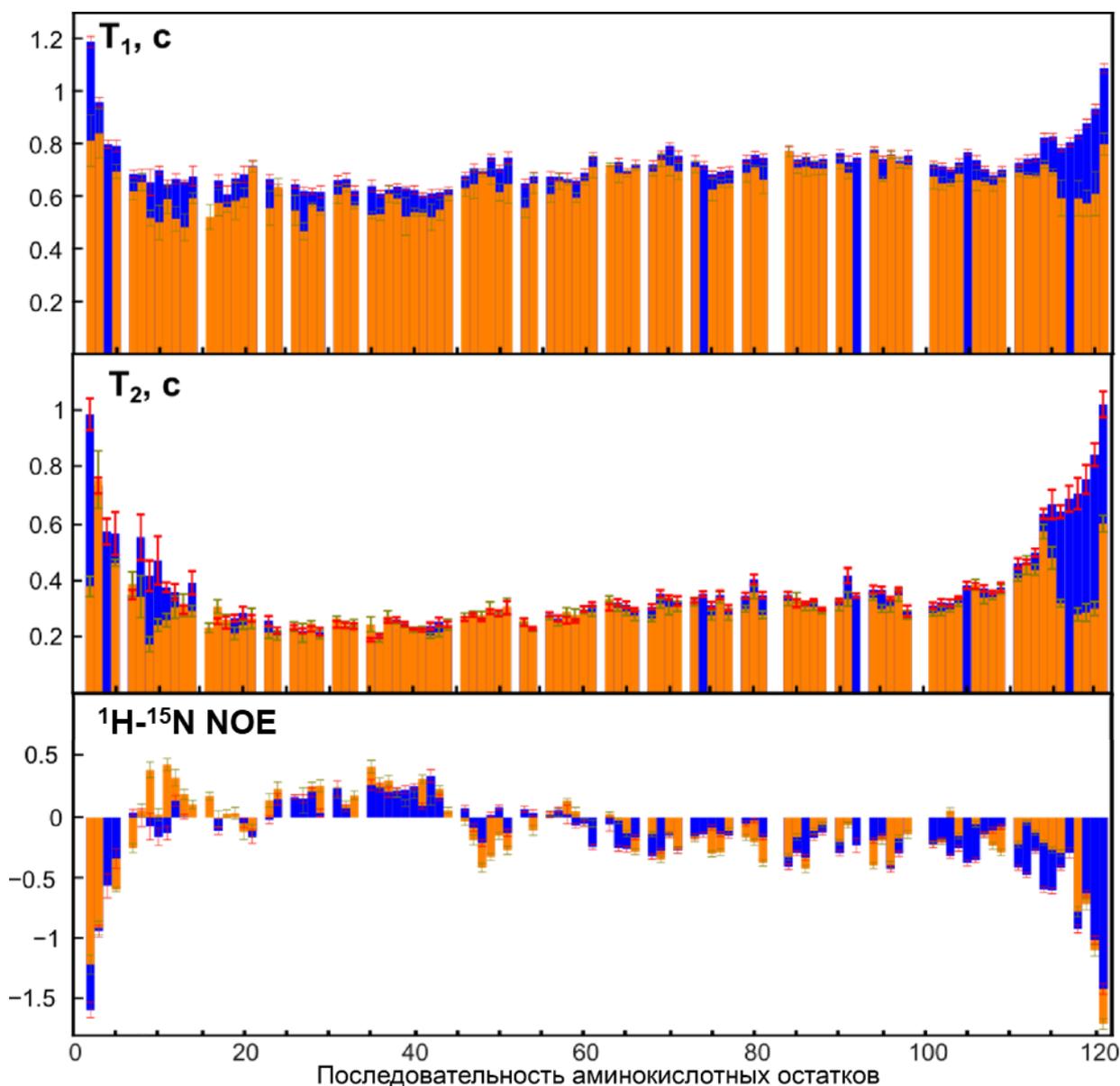


Рисунок 2.8 – Сводная диаграмма значений ^{15}N T_1 , T_2 , и $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ NOE основной цепи RL2 для образцов $[\text{U}-^{15}\text{N}]$ RL2 (водный раствор, pH~3.5, синие столбики) и диамагнитного $[\text{U}-^{15}\text{N}]$ -RL2-MTSL (ацетатный буфер, pH = 3.9, оранжевые столбики).

Как видно из данных релаксационных параметров (Рисунок 2.8), участок RL2 на N-конце, включающий в себя 1–43 а.о., является более упорядоченным по сравнению с остальной частью белка, о чем свидетельствуют положительные значения $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ NOE, а также минимальные значения времени ^{15}N T_2 (см. Литературный обзор, Рисунок 7). Примечательно, что именно на величину этого участка отличаются первичные последовательности аминокислотных остатков RL1 и RL2. Как было показано в работе [8], терапия RL2 позволяет значительно уменьшить жизнеспособность клеток аденокарциномы молочной железы человека

MCF-7 в культуре, тогда как аналогичная терапия RL1 не приводит к сколько-нибудь значительному эффекту спада жизнеспособности клеток MCF-7 в культуре. Поэтому, наличие участка 1–43 а.о. в RL2 является важным условием для цитотоксической активности RL2 по отношению к раковым клеткам. Поскольку предполагается, что более упорядоченные участки IDP выступают в качестве первоначальных точек связывания с белками-мишенями, облегчая последующее связывание более гибких участков IDP [78, 79], то вероятно более упорядоченный участок 1–43 а.о. RL2 выступает в качестве первоначального сайта связывания RL2 с белком внешней мембраны митохондрии TOM70, что впоследствии приводит к гибели раковых клеток [77]. С другой стороны предположительно отсутствие этого участка в RL1 не позволяет ему связаться с TOM70 и следовательно запустить процессы, приводящие к гибели раковых клеток.

2.3.5 Остаточная третичная структура RL2 в растворе по данным PRE

Мы применили метод PRE с использованием подхода «измерения по единственной временной точке» (см. 1.2.1.4 *Остаточная третичная структура IDP по данным PRE*), чтобы определить, присутствует ли в области более упорядоченного участка RL2 (1–43 а.о.), важного для проявления цитотоксической активности RL2, какая-либо остаточная третичная структура белка. Для этого мы сравнили спектры $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ HSQC образца $[\text{U}-^{15}\text{N}]$ -RL2-MTSL (спиновая метка MTSL введена в положение Cys8) до и после перевода метки MTSL в диамагнитное состояние путем добавления 5 эквивалентов аскорбиновой кислоты (Рисунок 2.7 (Б)). По данным стационарного ЭПР (данные не приведены) добавление аскорбиновой кислоты в образец $[\text{U}-^{15}\text{N}]$ -RL2-MTSL позволило полностью перевести спиновую метку в диамагнитное состояние. Отношения высот пиков I_{para}/I_{dia} индивидуальных NH групп основной цепи RL2, полученные из спектров $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ HSQC парамагнитного и диамагнитного образцов $[\text{U}-^{15}\text{N}]$ -RL2-MTSL, представлены на рисунке 2.9. Поскольку, как видно, влияние метки распространяется на ядра ^1H групп NH основной цепи, расположенные в первичной последовательности RL2 дальше, чем 10–15 а.о. от остатка Cys8, в который введена метка MTSL, это свидетельствует о наличии контактов дальнего порядка в наборе конформеров RL2. [81] Действительно, как видно, метка MTSL оказывает схожее заметное влияние на ядра ^1H групп NH, расположенные в участке 20–40 а.о. первичной последовательности RL2 и не оказывает сколько-нибудь заметного влияния на ядра ^1H групп NH, расположенные в участке 64–121 а.о. RL2 (Рисунок 2.9). Таким образом, результаты PRE демонстрируют наличие контактов дальнего порядка в пределах N-концевого участка 1–63 а.о. RL2 и отсутствие

таковых между N-концевой областью, включающей в себя ~10–15 а.о. с каждой стороны от остатка Cys8, и C-концевой частью 64–121 а.о. RL2. Поэтому N-концевая часть, включающая в себя более упорядоченный участок 1–43 а.о. RL2, обладает остаточной третичной структурой в растворе.

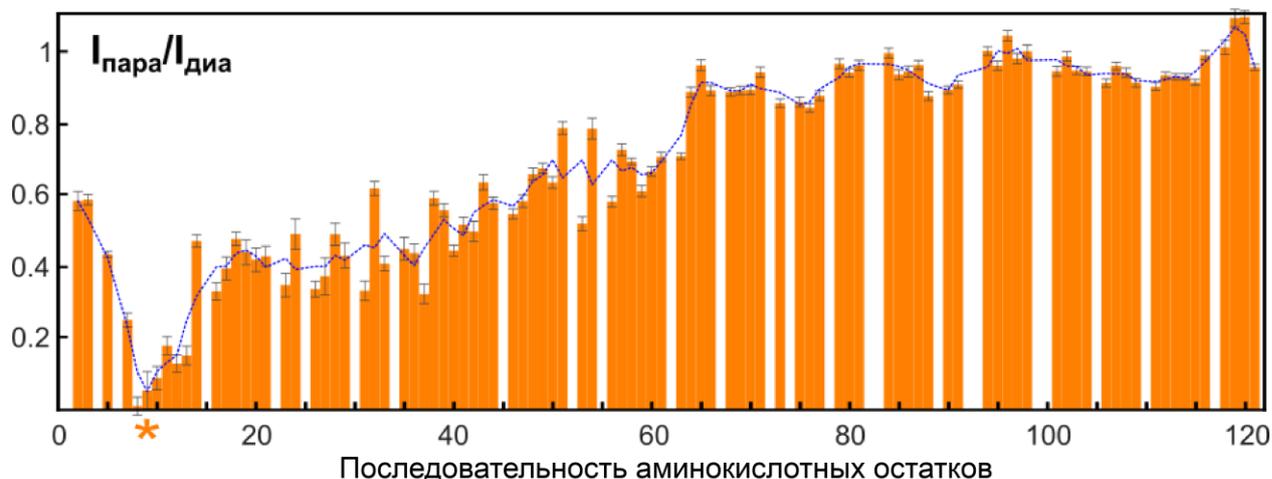


Рисунок 2.9 – Диаграмма отношений высот кросс-пиков I_{para}/I_{dia} , полученных из спектров $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ HSQC парамагнитного (I_{para}) и диамагнитного (I_{dia}) образцов $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -RL2-MTSL. Звездочкой отмечено положение остатка Cys8, в который введена метка MTSL. Синяя пунктирная линия – скользящее среднее по трем точкам – проведена для большей наглядности тренда.

2.4 Поведение RL2 в клетках A549 в процессе его проникновения по данным ЭПР и конфокальной микроскопии

2.4.1 Введение в RL2 спиновых меток для внутриклеточных экспериментов ЭПР

Для изучения методом ЭПР поведения RL2 в клетках аденокарциномы легких человека A549 в качестве объекта исследования был выбран димер RL2 (RL2₂) (Рисунок 2.10), в положения остатков лизина которого вводилась спиновая метка **1** (Рисунок 2.3). Как видно (Рисунок 2.10, Таблица 2.1), первичная последовательность RL2 содержит пять остатков лизина, два из которых являются соседними (101 а.о. и 102 а.о.). Поскольку, как показано выше, RL2 является IDP, спиновые метки, введенные в разные положения белка, будут испытывать схожую динамику и, следовательно, будут иметь одинаковый спектр ЭПР. Среднее количество спиновых меток **1** на молекулу RL2₂ можно варьировать при процедуре введения метки **1** в RL2₂, если менять кратность избытка **1** к RL2₂ и длительность инкубации RL2₂ с **1** (см. экспериментальную часть). Образцы RL2₂ с различным количеством введенных спиновых меток **1** мы обозначаем как sRL2. Как оказалось, при отношении среднего количества спиновых

меток **1** на молекулу $RL2_2$ равном 8.7 в спектре ЭПР образца sRL2 проявляется уширенная компонента спектра (Рисунок 2.11). Предположительно проявление уширенной компоненты спектра ЭПР связано с наличием обменного взаимодействия и/или дополнительного диполь-дипольного механизма спиновой релаксации для спиновых меток, введенных в остатки Lys101 и Lys102, ввиду их пространственной близости. Так как вклад уширенной компоненты спектра усложняет исследуемую систему и может существенно исказить наблюдаемую картину при экспериментах ЭПР sRL2 в клетках, далее для исследований применялись образцы sRL2 со средним отношением количества спиновых меток **1** на молекулу $RL2_2$, не превышающем 4, при котором уширенная компонента спектра отсутствует (Рисунки 2.11-12).

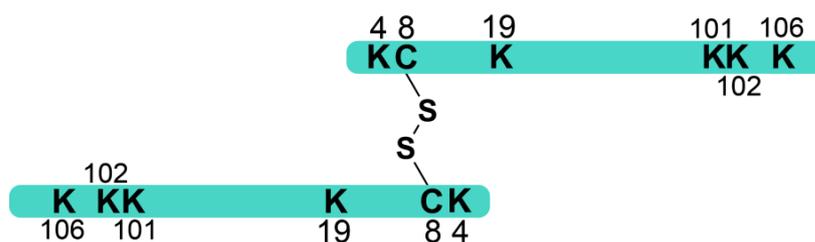


Рисунок 2.10 – Схематическое изображение димеров $RL2$. Буквами обозначены аминокислотные остатки лизина (К) и цистеина (С), а цифрами – их положения в последовательности $RL2$.

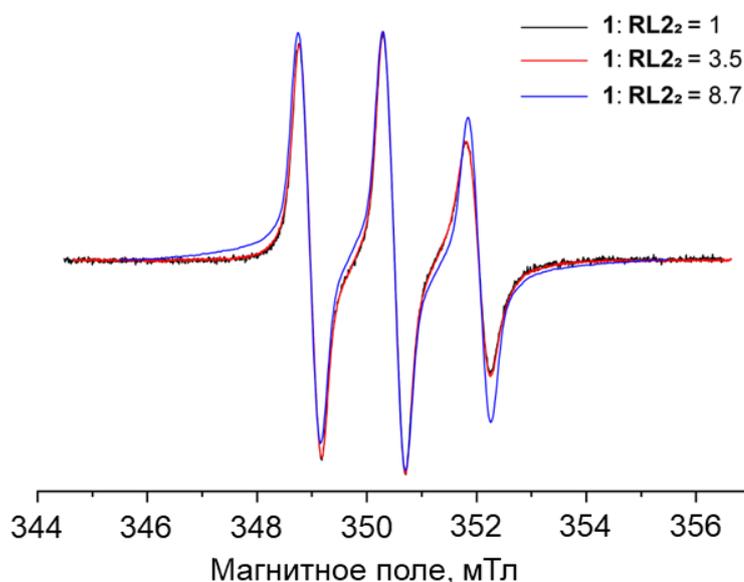


Рисунок 2.11 – Спектры стационарного ЭПР водных растворов образцов sRL2 с различающимся отношением среднего количества введенных спиновых меток на молекулу $RL2_2$. Спектры нормированы на высоту центрального пика и соотносятся с образцами sRL2 со средним отношением **1** к $RL2_2$ равным 1 (черный спектр, концентрация $RL2_2$ 0.3 мМ), 3.5 (красный спектр, концентрация $RL2_2$ 0.16 мМ) и 8.7 (синий спектр, концентрация $RL2_2$ ~ 0.3 мМ, присутствует небольшое количество неотмытых меток, не связанных с белком).

На рисунке 2.12 представлены полученные при комнатной температуре спектры стационарного ЭПР образца sRL2 (среднее отношение **1** к $RL2_2$ равно 4) и радикала **2** (Рисунок

2.1) в воде. Видно, что экспериментальные спектры (Рисунок 2.12, изображены черным цветом) можно хорошо замоделировать (Рисунок 2.12, расчетные спектры изображены красным цветом) с одинаковыми значениями g тензора и схожими значениями тензора СТВ, но разным временем корреляции τ_c . Как и ожидалось, время корреляции τ_c для sRL2 ($\tau_c = 0.50$ нс) оказалось существенно больше, чем таковое для радикала **2** ($\tau_c = 0.06$ нс), учитывая больший молекулярный вес sRL2 по сравнению с **2** и ограничения в степенях свободы, накладываемые на спиновую метку при её введении в белок (см. 1.2.2.1 Динамика белков по данным стационарной спектроскопии ЭПР). Также стоит отметить, что небольшое отличие в значениях тензора СТВ для образцов sRL2 и **2** может быть связано с отличающейся полярностью окружения для спиновой метки **1** в белке и для радикала **2** в растворе. [186] Таким образом, из моделирования спектра ЭПР sRL2 (Рисунок 2.12 (А)) видно, что метка **1** успешно введена в RL2₂, а полученный образец sRL2 полностью отмыт от молекул спиновых меток, непрореагировавших с RL2₂. Обычно в спектрах ЭПР тетраэтильных нитроксильных радикалов проявляется дополнительная константа СТВ на протоне одной из четырех этильных групп. [187, 188, 189] Эта дополнительная константа СТВ также была учтена в нашем моделировании и обозначена в подписи к рисунку 2.12 как A_H .

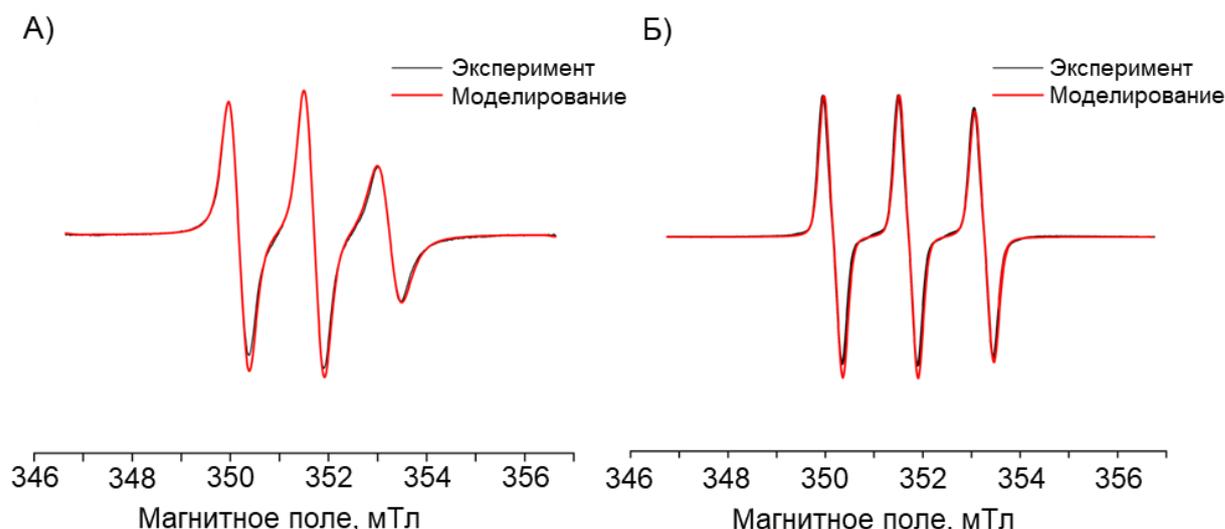


Рисунок 2.12 – Спектры стационарного ЭПР (А) 0.05 мМ водного раствора sRL2 (среднее отношение **1** к RL2₂ равно 4, спиновая концентрация 0.2 мМ), рН~5.5, и (Б) 0.2 мМ радикала **2** в 50 мМ натрий фосфатном буфере, рН 7.2. Спектры получены при комнатной температуре на частоте 9.873 ГГц. Моделирование спектров выполнено в режиме изотропного заторможенного движения ‘chili’. [176, 177] Параметры моделирования: (А) $g = (2.0091 \ 2.0059 \ 2.0018)$; $A_{СТВ} = A_H$ (мТл) (0.30 0.30 4.01) и A_H (мТл) (0.19 0.19 0.19); ширина линии (Gaussian 0.17 мТл, Lorentzian 0.07 мТл); $\tau_c = 5.0 \times 10^{-1}$ нс. (Б) $g = (2.0091 \ 2.0059 \ 2.0018)$; $A_{СТВ} = A_H$ (мТл) (0.30 0.30 4.05) и A_H (мТл) (0.19 0.19 0.19); ширина линии (Gaussian 0.21 мТл, Lorentzian 0.03 мТл); $\tau_c = 6 \times 10^{-2}$ нс.

Поскольку внутриклеточные эксперименты ЭПР проводились при температуре 35 °С (см. экспериментальную часть), то с целью дальнейшего сравнения результатов экспериментов

в клетках и в водном растворе, мы также получили спектры ЭПР для sRL2 и радикала **2** в воде при температуре 35 °С (Рисунок 2.13). При этой температуре величины τ_c ожидаемо оказались меньше тех, которые получены из моделирований спектров ЭПР при комнатной температуре ($\tau_c = 2.8 \times 10^{-1}$ нс против $\tau_c = 5.0 \times 10^{-1}$ нс (для sRL2) и $\tau_c = 4 \times 10^{-2}$ нс против $\tau_c = 6 \times 10^{-2}$ нс для радикала **2**), что указывает на бóльшую мобильность спиновой метки и радикала **2** при более высокой температуре.

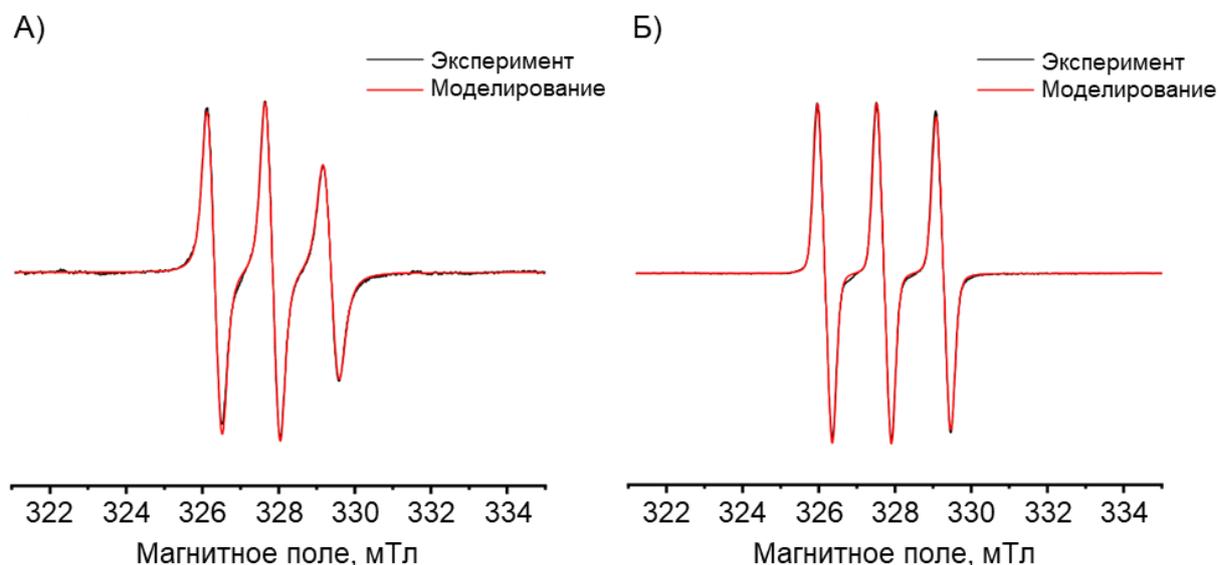


Рисунок 2.13 – Спектры стационарного ЭПР (А) 0.1 мМ водного раствора sRL2 (среднее отношение **1** к RL2₂ равно 3.5), pH~5.5, и (Б) 0.2 мМ радикала **2** в 50 мМ натрий фосфатном буфере, pH 7.2. Спектры получены при температуре 35 °С на частоте 9.231 ГГц. Моделирование спектров выполнено в режиме изотропного заторможенного движения ‘chili’. [176 , 177] Параметры моделирования: (А) $g = (2.0091 \ 2.0059 \ 2.0018)$; $A_{\text{сTB}} = A_N$ (мТл) (0.30 0.30 4.00) и A_H (мТл) (0.19 0.19 0.19); ширина линии (Gaussian 0.19 мТл, Lorentzian 0.08 мТл); $\tau_c = 2.8 \times 10^{-1}$ нс. (Б) $g = (2.0091 \ 2.0059 \ 2.0018)$; $A_{\text{сTB}} = A_N$ (мТл) (0.30 0.30 4.08) и A_H (мТл) (0.19 0.19 0.19); ширина линии (Gaussian 0.22 мТл, Lorentzian 0.03 мТл); $\tau_c = 4 \times 10^{-2}$ нс.

2.4.2 Поведение sRL2 в культуральной среде для инкубирования клеток

Для внутриклеточных экспериментов ЭПР клетки A549 инкубировали с sRL2 в культуральной среде Игла модифицированной Дульбекко – DMEM (англ. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), которая представляет собой одну из базовых культуральных сред, используемых для поддержания роста и жизнеспособности клеток млекопитающих. [190 , 191] Поскольку, как показано выше, RL2 склонен образовывать агрегаты, интересно было проверить, могут ли компоненты культуральной среды спровоцировать агрегацию RL2 прямо перед его проникновением в клетки. Для этого мы отследили кинетику изменения спектра ЭПР sRL2 при его добавлении в DMEM при pH = 6.0 (Рисунок 2.14). Как оказалось, действительно, с

течением времени с момента добавления sRL2 в DMEM белок почти полностью переходит в агрегированное состояние, о чём свидетельствует постепенное уменьшение интенсивности компоненты спектра, относящейся к отдельным молекулам sRL2 в растворе (Рисунок 2.12 (А)), а также постепенный рост интенсивности спектральной компоненты, имеющей форму характерную для более длительного времени корреляции τ_c (см. Литературный обзор, Рисунок 10) и, следовательно, меньшей мобильности спиновой метки. Появление в спектре ЭПР менее мобильной спектральной компоненты мы связываем с формированием агрегатов sRL2. Однако примечательно, что картина формирования агрегатов sRL2 в DMEM сильно отличается от той, которая наблюдалась для RL2-MTSL в водном растворе при достижении значения pH 7.5 и 150 mM NaCl. Если в последнем случае мы не смогли зарегистрировать в спектре ЭПР (Рисунок 2.4 (В)) компоненту, относящуюся к агрегированному состоянию RL2-MTSL, то в случае sRL2 в DMEM почти все агрегаты sRL2 проявились в спектрах ЭПР в виде маломобильной спектральной компоненты, о чем свидетельствует практически неизменное с течением времени значение видимой спиновой концентрации sRL2 в DMEM при меняющемся соотношении между двумя спектральными компонентами sRL2 (Рисунок 2.14 (Б)).

Для большей убедительности того, что мы имеем дело именно с агрегацией sRL2 в DMEM, мы дополнительно провели аналогичные эксперименты ЭПР sRL2 в DMEM при значениях pH = 5.0, 6.9 и 8.0 (Рисунок 2.15). Поскольку, как показано выше (Рисунок 2.4), степень агрегации RL2 зависит от pH, то и соотношение между двумя спектральными компонентами должно меняться при меняющемся pH. Действительно, как видно (Рисунок 2.15), соотношение между спектральными компонентами с увеличением pH меняется в сторону роста вклада малоподвижной спектральной компоненты в итоговый спектр ЭПР. Показательно, что суммарная видимая спиновая концентрация sRL2 при различных pH заметно не отличается, что подтверждает вывод об отсутствии «невидимой» в ЭПР агрегированной формы sRL2 в DMEM. Примечательно, что даже при pH = 5.0 в спектре ЭПР sRL2 в DMEM мы обнаружили наличие малоподвижной компоненты спектра, что говорит о нахождении заметной доли sRL2 в агрегированном состоянии. Этот результат сильно отличается от поведения sRL2 в воде при pH ~ 5.5 (Рисунок 2.12 (А)), где в спектре ЭПР присутствует лишь одна спектральная компонента, относящаяся к неагрегированному состоянию sRL2. Таким образом, по-видимому, взаимодействие sRL2 с компонентами культуральной среды стимулирует его агрегацию, при этом размер образующихся частиц оказывается меньше, чем в случае pH-зависимой самопроизвольной агрегации RL2 (Рисунок 2.4), что проявляется в спектрах ЭПР sRL2 в DMEM в виде появления малоподвижной спектральной компоненты, а также в виде

неизменности видимой суммарной спиновой концентрации, что свидетельствует об отсутствии «невидимых» в ЭПР форм агрегатов sRL2.

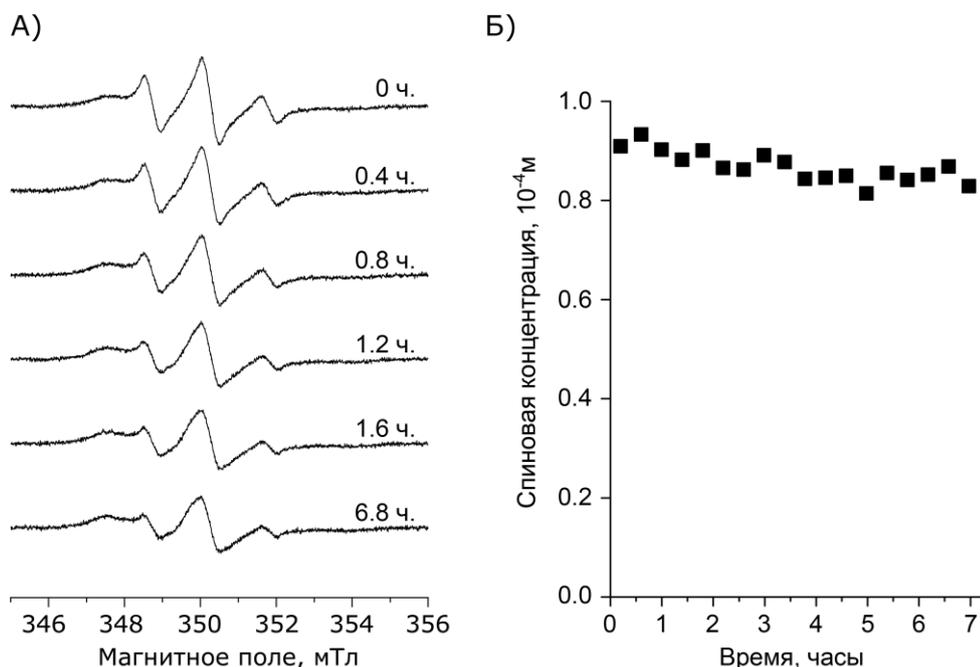


Рисунок 2.14 – А) Спектры ЭПР образца sRL2 (среднее отношение 1 к RL₂ равно 2.4) в DMEM при pH = 6.0, полученные в разные моменты времени, отсчитываемые с момента 5-кратного разбавления водного раствора sRL2 средой DMEM. Спектры получены при комнатной температуре на частоте 9.874 ГГц. Б) Соответствующая спектрам ЭПР, приведенным в А), кинетика спада второго интеграла в единицах спиновой концентрации.

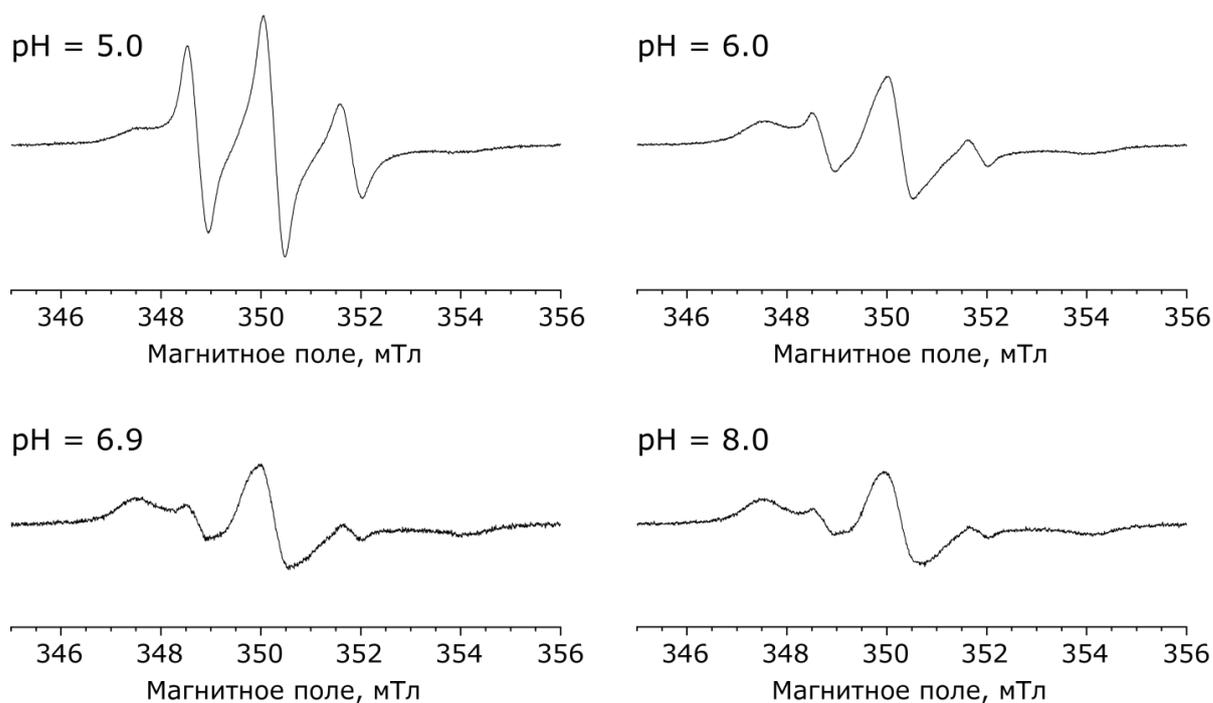


Рисунок 2.15 – спектры ЭПР образца sRL2 (среднее отношение 1 к RL₂ равно 2.4) в DMEM при pH = 5.0, 6.0, 6.9 и 8.0, усредненные за первые 3.5 часа с момента 5-кратного разбавления раствора sRL2 средами DMEM с разными величинами pH. Все спектры получены при комнатной температуре на частоте 9.874 ГГц.

2.4.3 Проникновение sRL2 в клетки A549 по данным ЭПР

Предварительно была выполнена проверка того, что радикал **2** сам по себе не способен проникать в клетки A549. Для этого клетки A549 инкубировали в течение часа в культуральной среде DMEM, содержащей 2 мкМ радикала **2**. В процессе приготовления образцов клеток (см. экспериментальную часть) для растворов культуральной среды до и после инкубирования клеток, а также для растворов, которыми промывали клетки, регистрировали спектры ЭПР (Рисунок 2.16). 4 мкл суспензии промытых клеток помещали в капилляр для экспериментов ЭПР. Как видно, после инкубации клеток не наблюдалось значительных изменений концентрации **2** в культуральной среде (Рисунок 2.16). В спектрах ЭПР суспензии клеток и промывочных растворов не было обнаружено следов нитроксильного радикала **2**, что ясно указывает на то, что нитроксильный радикал **2** не проникает в клетки A549.

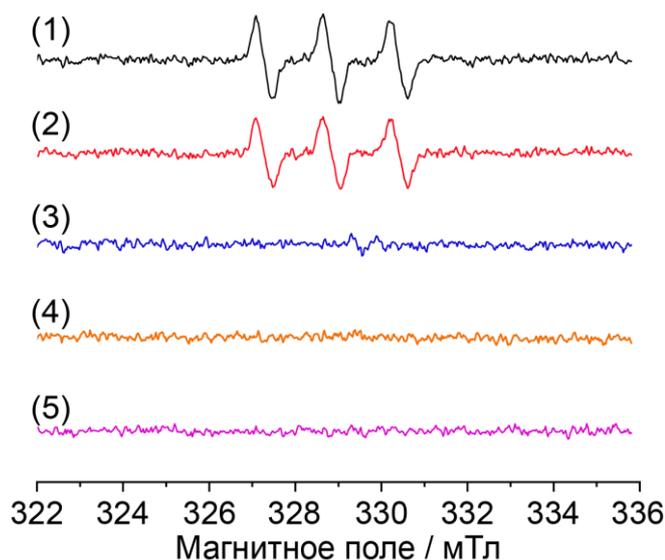


Рисунок 2.16 – Спектры ЭПР (1-2) культуральной среды DMEM с растворенным радикалом **2** до (1) и после (2) инкубации клеток; (3-5) промывочных растворов клеток после процедуры промывки в следующем порядке: (3) – PBS, (4) – раствор трипсина, (5) – PBS. Спектры приведены в одинаковом масштабе. Все измерения проводились при комнатной температуре.

В двух независимых экспериментах клетки A549 инкубировали в культуральной среде, содержащей sRL2 (среднее отношение **1** к RL₂ равно 4) в концентрации 5.5 мкМ (спиновая концентрация 22 мкМ) или в концентрации 0.5 мкМ (спиновая концентрация 2 мкМ). В обоих случаях после часа инкубации клетки промывали, как описано в экспериментальной части, затем 4 мкл суспензии клеток помещали в капилляр для исследований методом стационарного ЭПР. Спектры ЭПР для образцов клеток A549 после их инкубации с sRL2 в двух различных

экспериментах (для большей и меньшей концентрации sRL2 в культуральной среде), зарегистрированные в разные промежутки времени, представлены на рисунке 2.17.

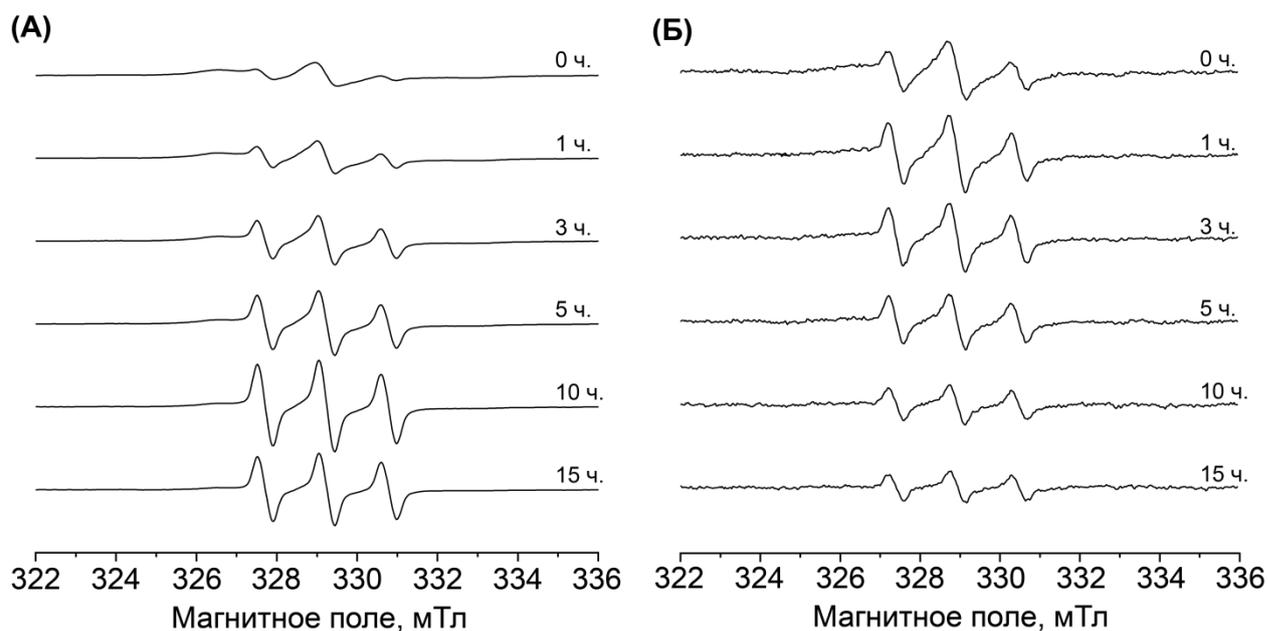


Рисунок 2.17 – Спектры ЭПР для образцов клеток A549, инкубированных в течение часа в культуральной среде с 5.5 мкМ (А) или 0.5 мкМ (Б) sRL2 (среднее отношение 1 к RL2₂ равно 4), зарегистрированные в разные промежутки времени после инкубирования клеток. Спектры в (А) приведены в одном масштабе, спектры в (Б) также приведены в одном масштабе, масштабы между (А) и (Б) различаются. Для обоих случаев приведенные значения времени в часах отсчитываются с момента начала записи первого спектра. Концентрация спинов в образцах клеток в начальный момент времени составила 730 мкМ (А) и 60 мкМ (Б). Спектры получены при температуре 35 °С с константой времени 40.96 мс (А) и 20.48 мс (Б), временем развертки поля 15.82 с (А) и 10.00 с (Б), 512 точек (А, Б), с количеством накоплений 16 (А) и 64 (Б).

Обнаружено, что инкубация A549 с sRL2 приводит к накоплению sRL2 внутри клеток. Так, концентрация спинов в образцах клеток A549, инкубированных в течение часа в культуральной среде объемом ~10 мл с 5.5 мкМ и 0.5 мкМ sRL2 (концентрация спинов – 24 мкМ и 2 мкМ, соответственно) составила 730 мкМ и 60 мкМ, соответственно, что для обоих случаев соответствует ~30 кратному увеличению концентрации спинов внутри клеток по сравнению со средой. Таким образом, клетки A549 способны накапливать в себе RL2₂.

Из рисунка 2.17 видно, что форма спектров ЭПР со временем существенно меняется. Спектры состоят из суперпозиции нескольких компонент, соответствующих разным временам корреляции вращений спиновой метки, и вклады этих компонент меняются со временем. Мы выполнили моделирование полученных спектров ЭПР. Оказалось, что для sRL2 в клетках экспериментальные спектры ЭПР, полученные при различных временах после инкубации клеток, могут быть хорошо воспроизведены расчетными спектрами (Рисунок 2.18 Б, приложение Рисунок П.1) в предположении наличия суперпозиции трех спектральных компонент с разными вкладами (см. Рисунок 2.18 А). Эти три спектральные компоненты (см.

Рисунок 2.18 А) имеют одинаковые значения g -тензоров и очень близкие значения тензоров СТВ, но разные значения времен корреляции вращений τ_c , то есть соответствуют различной мобильности спиновой метки. В начальные моменты времени основной вклад в спектры ЭПР для образцов клеток (Рисунок 2.17) определяется спиновыми метками, характеризующимися сильно заторможенным движением с $\tau_{c1} = 4.77$ нс (Рисунок 2.18 (1)). В конечные моменты времени регистрации в спектрах ЭПР преобладает вклад, характерный для свободной спиновой метки, не связанной с молекулой белка, в растворе со временем $\tau_{c3} = 4.1 \times 10^{-2}$ нс (Рисунок 2.18 (3)). Важно отметить, что значение τ_{c3} сопоставимо со значением времени корреляции τ_c , полученным для спектра радикала **2** в водном растворе (Рисунок 2.13 (Б)). Кроме того, для хорошего согласия расчетных и экспериментальных спектров на протяжении всей кинетики изменения суммарного спектра ЭПР в клетках A549 необходимо также было учитывать вклад компоненты спектра ЭПР со временем корреляции $\tau_{c2} = 2.95 \times 10^{-1}$ нс (Рисунок 2.18 (2)), что с хорошей степенью точности совпадает со времени корреляции sRL2 в водном растворе (Рисунок 2.13 (А)). Подробное обсуждение моделирования спектров ЭПР приводится ниже.

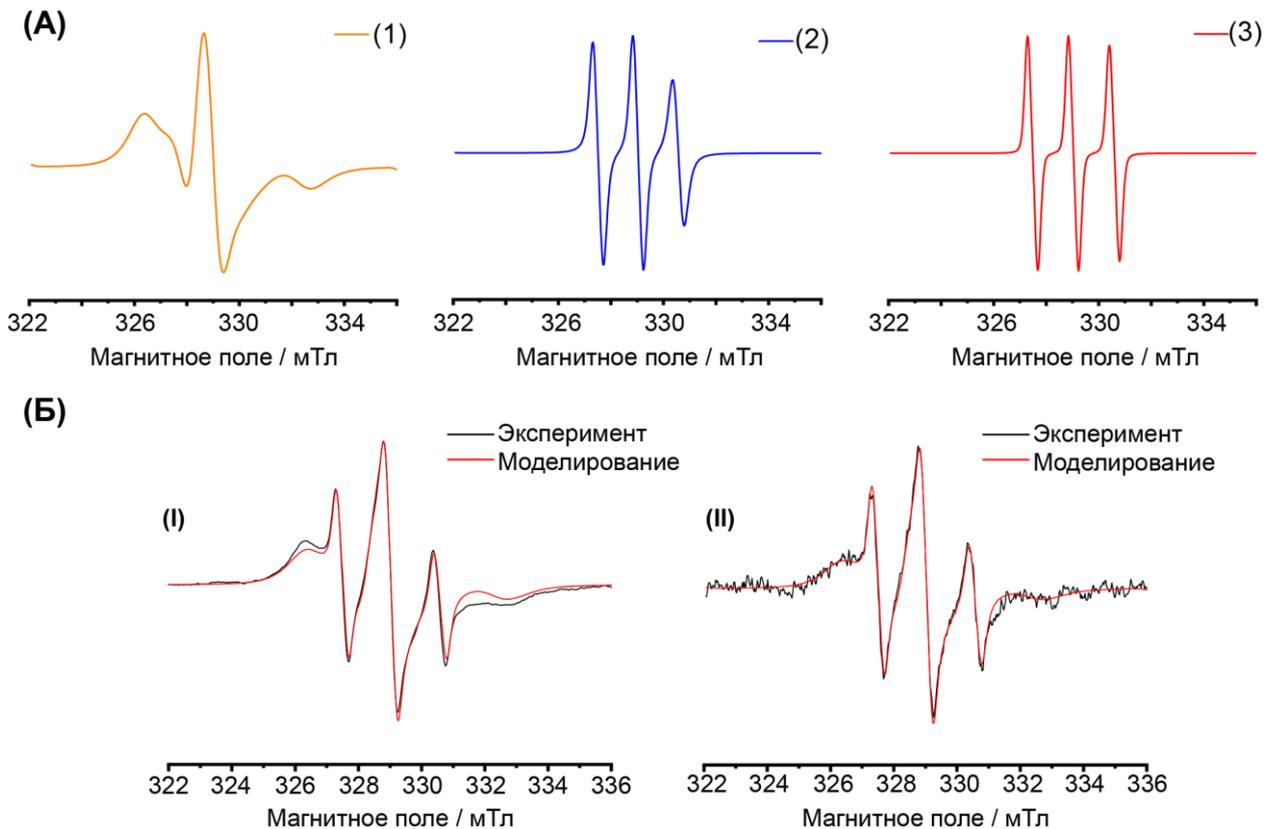


Рисунок 2.18 – (А) (1-3) Расчетные спектры ЭПР. Параметры моделирования: $g_1 = g_2 = g_3 = (2.0091 \ 2.0059 \ 2.0018)$, (1) $A_1(\text{мТл}) = A_N(\text{мТл}) (0.30 \ 0.30 \ 3.90)$ и $A_H(\text{мТл}) (0.19 \ 0.19 \ 0.19)$, $\tau_{c1} = 4.77$ нс; (2) $A_2(\text{мТл}) = A_N(\text{мТл}) (0.30 \ 0.30 \ 4.00)$ и $A_H(\text{мТл}) (0.19 \ 0.19 \ 0.19)$, $\tau_{c2} = 2.95 \times 10^{-1}$ нс; (3) $A_3(\text{мТл}) = A_N(\text{мТл}) (0.30 \ 0.30 \ 4.08)$ и $A_H(\text{мТл}) (0.19 \ 0.19 \ 0.19)$, $\tau_{c3} = 4.1 \times 10^{-2}$ нс. (Б) Экспериментальные спектры ЭПР (черным цветом) для образцов клеток A549 после их инкубации с 5.5 мкМ (I) и 0.5 мкМ (II) sRL2 (среднее отношение **1** к RL₂ равно 4) и

соответствующие моделирования спектров ЭПР (красным цветом). (I) Спектр, зарегистрированный через 2.16 часов с момента извлечения клеток из культуральной среды, содержащей 5.5 мкМ sRL2; (II) Спектр, зарегистрированный через 0.96 часов с момента извлечения клеток из культуральной среды, содержащей 0.5 мкМ sRL2. Соотношение вкладов (1):(2):(3) в моделировании экспериментальных спектров (Б) следующее: (I) 0.877 : 0.076 : 0.047; (II) 0.805 : 0.146 : 0.049.

Моделирование спектров ЭПР (Рисунок 2.18 (А) (1-3)) было выполнено с использованием в качестве начальных параметров те параметры моделирования, которые были получены для спектров образцов sRL2 и **2** в воде (Рисунки 2.12 и 2.13). Видно, что полученные расчетные спектры (2) и (3) хорошо соотносятся со спектрами, полученными для образцов sRL2 и **2** в воде: об этом говорят схожие значения времен корреляции вращений и параметров g и A тензоров. Таким образом, мы предполагаем, что спектр (2) относится к фракции sRL2 с подвижностью, соответствующей водному раствору, а спектр (3) к фракции спин-меченной аминокислоты (или короткого пептида) после расщепления sRL2 ферментами, которые присутствуют внутри клеток. Наименее мобильную спектральную компоненту (1), которая также возникает в спектрах sRL2 в DMEM, мы относим к фракции агрегированного sRL2.

2.4.4 Локализация флуоресцентного конъюгата RL₂ в клетках A549 по данным конфокальной микроскопии

Чтобы понять, где именно локализуется RL₂ в клетках человека A549 в процессе проникновения белка, был синтезирован флуоресцентный конъюгат RL₂ с родаминовым красителем (fRL₂) (см. экспериментальную часть) и было изучено его распределение в клетках по данным конфокальной микроскопии. Клетки A549 инкубировали в течение 30 минут с 1 мкМ fRL₂. Затем клетки обрабатывали синим красителем Hoechst 33342, который окрашивает живые ядра клеток, и LysoSensor Green DND-189 – липофильным индикатором pH, который накапливается в кислых органеллах с pH ниже 5.5, например, в поздних эндосомах и лизосомах. к.м.н. Чечушковым Антоном Владимировичем (ИХБФМ СО РАН) были получены изображения конфокальной микроскопии и выполнен анализ со-локализации сигналов в полученных изображениях.

На рисунке 2.19 показана локализация флуоресцентного конъюгата RL₂ в клетках A549. Результаты расчетов представлены в таблице 2.2. Красные объекты вне клеток (Рисунок 2.19) – это fRL₂, налипший на поверхность чашки Петри (см. экспериментальную часть), на которой располагались клетки во время проведения экспериментов. Как видно на рисунке 2.19, красные объекты внутри клеток, относящиеся к fRL₂, существенно различаются по их размеру. При анализе со-локализации учитывалось перекрытие в изображениях (Рисунок 2.19) красных

сигналов, относящихся к fRL2, и зеленых сигналов. Как показано в таблице 2.2, красные сигналы перекрываются с зелеными менее чем в половине случаев. Мы полагаем, что в первые часы после инкубации клеток большая часть fRL2 может быть обнаружена в ранних эндосомах, которые невидимы из-за их нейтрального значения pH (LysoSensor Green DND-189 не накапливается в таких эндосомах). Через 6 и 24 ч после инкубации клеток, когда ранние эндосомы успевают созреть, некоторые молекулы fRL2 могут находиться в цитоплазме клеток. Это может быть связано с процессами разрыва эндосом или прямого проникновением fRL2. Таким образом, в клетках A549, инкубированных с 1 мкМ fRL2, обнаружена локализация fRL2 в эндосомах клеток, что предполагает проникновение RL2 в клетки A549 по пути эндоцитоза и согласуется с результатами ранней работы по установлению механизма проникновения RL2 в опухолевые клетки человека MCF-7 и MDA-MB-231 [174].

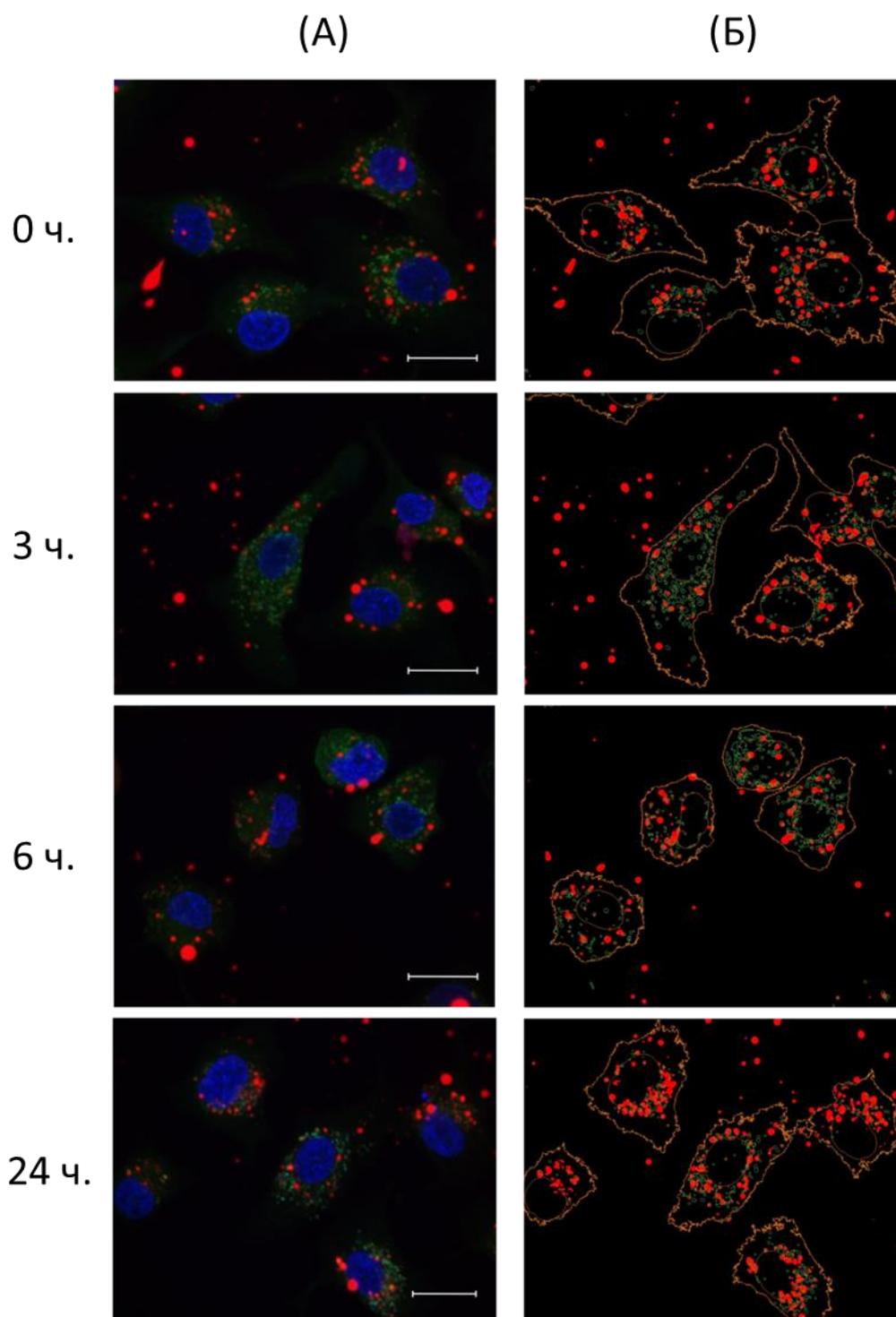


Рисунок 2.19 – Локализация флуоресцентного конъюгата $RL2_2$ в клетках A549. (А) Микроскопический анализ. Шкала 20 мкм. Области локализации Hoechst 33342 внутри ядер клеток – синие, области локализации fRL2 в клетках – красные, лизосомы и эндосомы с рН ниже 5.5 в клетках – зеленые. (Б) Анализ со-локализации (Таблица 2.2). Оранжевые линии обозначают края клеток и ядер, зеленые линии – края эндосом и лизосом, красные сигналы – локализацию fRL2.

Таблица 2.2 – Анализ со-локализации зеленых и красных сигналов внутри клеток A549.

Время, часы	Количество лизосом	Количество объектов RL2	Степень со-локализации, %
0	73 ± 24	27 ± 15	37 ± 10
3	105 ± 56	37 ± 7	41 ± 3
6	72 ± 25	30 ± 14	42 ± 19
24	65 ± 41	46 ± 9	28 ± 15

2.4.5 Влияние ингибитора эндоцитоза на проникновение sRL2 в клетки A549

Известно, что азид натрия (NaN_3) ингибирует выработку аденозинтрифосфата (АТФ) и, поскольку эндоцитоз является АТФ-зависимым процессом [192], добавление азид натрия в среду DMEM при инкубировании клеток A549 с sRL2 должно блокировать формирование эндосом. Чтобы отследить механизм проникновения sRL2 в клетки A549 мы изучили влияние азид натрия на проникновение sRL2 в A549. В двух независимых экспериментах клетки A549 инкубировали в культуральной среде, содержащей 1.34 мкМ sRL2 (среднее отношение 1 к RL2₂ равно 3.5, соответствующая спиновая концентрация 4.69 мкМ) с добавлением и без добавления 1% NaN_3 (см. экспериментальную часть). В обоих случаях после часа инкубации клетки промывали, как описано в экспериментальной части, затем 4 мкл суспензии клеток, разбавленных в 4 мкл раствора PBS, помещали в капилляр для исследований методом стационарного ЭПР.

Спектры ЭПР для образцов клеток A549 после их инкубации с sRL2 в двух описанных выше различных экспериментах, зарегистрированные в разные промежутки времени, представлены на рисунке 2.20 (А, Б). Как видно, добавление азид натрия приводит к ~5 кратному уменьшению спиновой концентрации и, следовательно, ~5 кратному уменьшению концентрации sRL2 в клетках A549. При этом спектры ЭПР в обоих экспериментах хорошо воспроизводятся тремя спектральными компонентами, рассмотренными выше (Рисунок 2.21). Таким образом, можно сделать вывод о том, что основным механизмом проникновения RL2 в клетки A549 является эндоцитоз, однако блокирование эндоцитоза не приводит к полной потере способности RL2 проникать в человеческие клетки. Следовательно, существует путь проникновения RL2 в клетки человека альтернативный эндоцитозу.

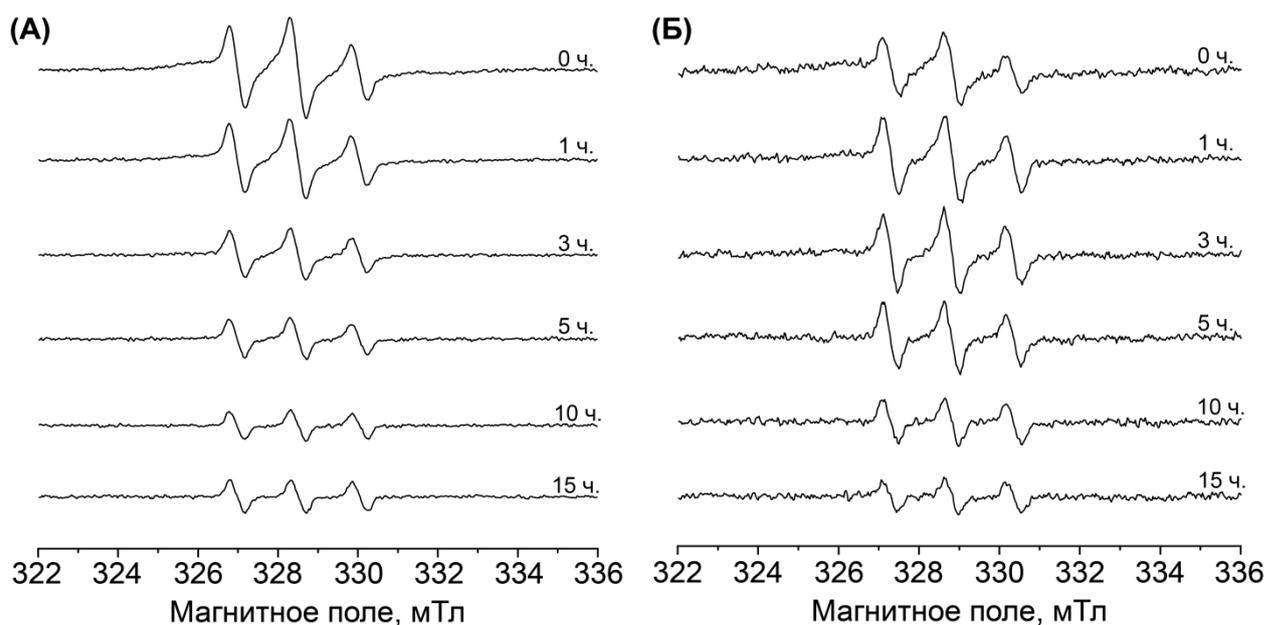


Рисунок 2.20 – Спектры ЭПР образцов клеток A549, инкубированных в течение часа в культуральной среде с 1.34 мкМ sRL2 (среднее отношение 1 к RL2₂ равно 3.5) с добавлением (А) и без добавления (Б) 1% NaN₃, зарегистрированные в разные промежутки времени после инкубирования клеток. Приведенные значения времени в часах отсчитываются с момента начала записи первого спектра. Концентрация спинов в образцах в начальный момент времени составила 87 мкМ (А) и 16 мкМ (Б). Спектры получены при температуре 35 °С на частоте 9.231 ГГц и с мощностью микроволнового излучения 2.0 мВт, временем развертки поля 10.01 с (А, Б), константой времени 20.48 мс (А, Б), 512 точек (А, Б), с количеством накоплений 32 (А) или 64 (Б).

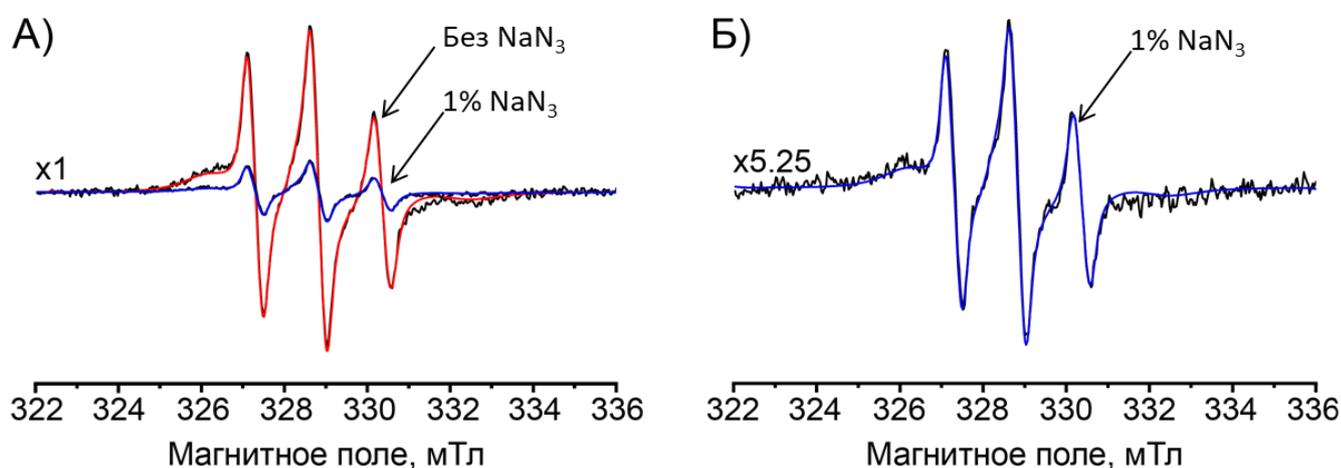


Рисунок 2.21 – Экспериментальные спектры ЭПР (черным цветом) образцов клеток A549 после их инкубации с 1.34 мкМ sRL2 (среднее отношение 1 к RL2₂ равно 3.5) без добавления (А) и с добавлением (А, Б) 1% NaN₃. (А) Сравнение двух экспериментальных спектров, полученных при 1.02 ч. (соответствующий эксперименту без NaN₃) и при 0.97 ч. (соответствующий эксперименту с 1% NaN₃) с момента окончания инкубации клеток с sRL2 при одинаковой концентрации белка. (Б) Тот же спектр, что и в (А), соответствующий эксперименту с 1% NaN₃, в увеличенном в 5.25 раза масштабе. Моделирования экспериментальных спектров (обозначены красным и синим цветом) выполнены с помощью трех рассмотренных выше спектральных компонент ЭПР с их весовым соотношением (1):(2):(3) 0.69:0.28:0.03 (красный спектр, соответствует эксперименту без добавления NaN₃) и 0.72:0.23:0.05 (синий спектр, соответствует эксперименту с 1% NaN₃).

2.4.6 Кинетика разрушения агрегатов RL2₂ в клетках A549

Чтобы проследить кинетику превращения между тремя наблюдаемыми в ЭПР фракциями метки **1** при проникновении sRL2 в клетки человека мы провели моделирование спектров ЭПР для четырех представленных выше экспериментов ЭПР по проникновению sRL2 в A549 (Рисунок 2.17 и 2.20). Рисунок 2.22 отображает зависимости изменения общей интегральной интенсивности спектров ЭПР образцов клеток A549 после их инкубации с sRL2, а также изменение интенсивности отдельных спектральных компонент (1-3) (Рисунок 2.18 (А)). Как видно, низкомолекулярная компонента (1), относящаяся к агрегатам sRL2, постепенно переходит в компоненты (2) и (3), относящиеся к отдельным белковым молекулам sRL2 и к отщепленной спиновой метке в результате белковой деградации, соответственно. Таким образом, можно сделать вывод о том, что агрегаты RL2₂, попадая в клетки человека, разрушаются частично до состояния отдельных белковых молекул RL2, а также до состояния коротких пептидов, учитывая появление компоненты (3). Вероятно, агрегация RL2 стимулирует проникновение белка через эндоцитоз и является важной для способности RL2 проникать в клетки человека (Рисунок 2.23). С другой стороны агрегация RL2 защищает белок от белковой деградации в клетках, что увеличивает вероятность доставки RL2 в его неповрежденном виде до белка-мишени ТОМ70.

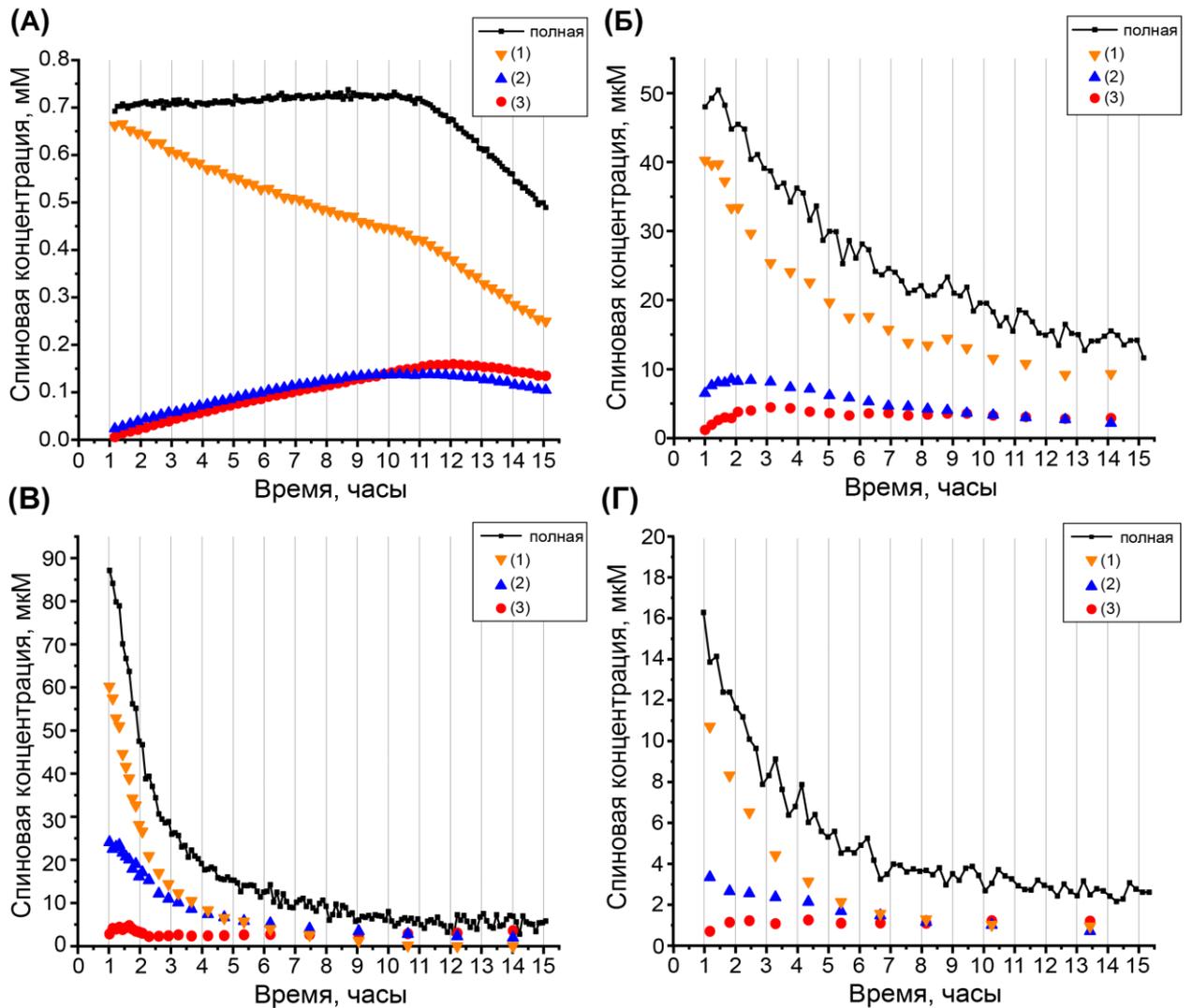


Рисунок 2.22 – Кинетика спада интегральной интенсивности спектров ЭПР для образцов клеток A549 после их инкубации в культуральной среде с (А) 5.5 мкМ и (Б) 0.5 мкМ sRL2 (среднее отношение 1 к RL₂ равно 4), (В, Г) 1.34 мкМ sRL2 (среднее отношение 1 к RL₂ равно 3.5) без добавления (В) и с добавлением (Г) 1% NaN₃. Оранжевые перевернутые треугольники, синие треугольники и красные круги относятся к интегральной интенсивности спектральных компонент (1), (2) и (3) соответственно. Когда полная спиновая концентрация достигала малых значений, моделирования проводились на усредненном наборе экспериментальных спектров ЭПР: (Б) начиная с 7-й точки на графике, моделирование проводилось на наборе из 3, 5 и 7 спектров ЭПР; (В) начиная с 12-й точки на графике, моделирование проводилось на наборе из 3, 5, 7, 9, 15 и 19 спектров ЭПР; (Г) начиная с 1-й точки на графике, моделирование проводилось на наборе из 3, 5, 7, 13 и 17 спектров ЭПР.

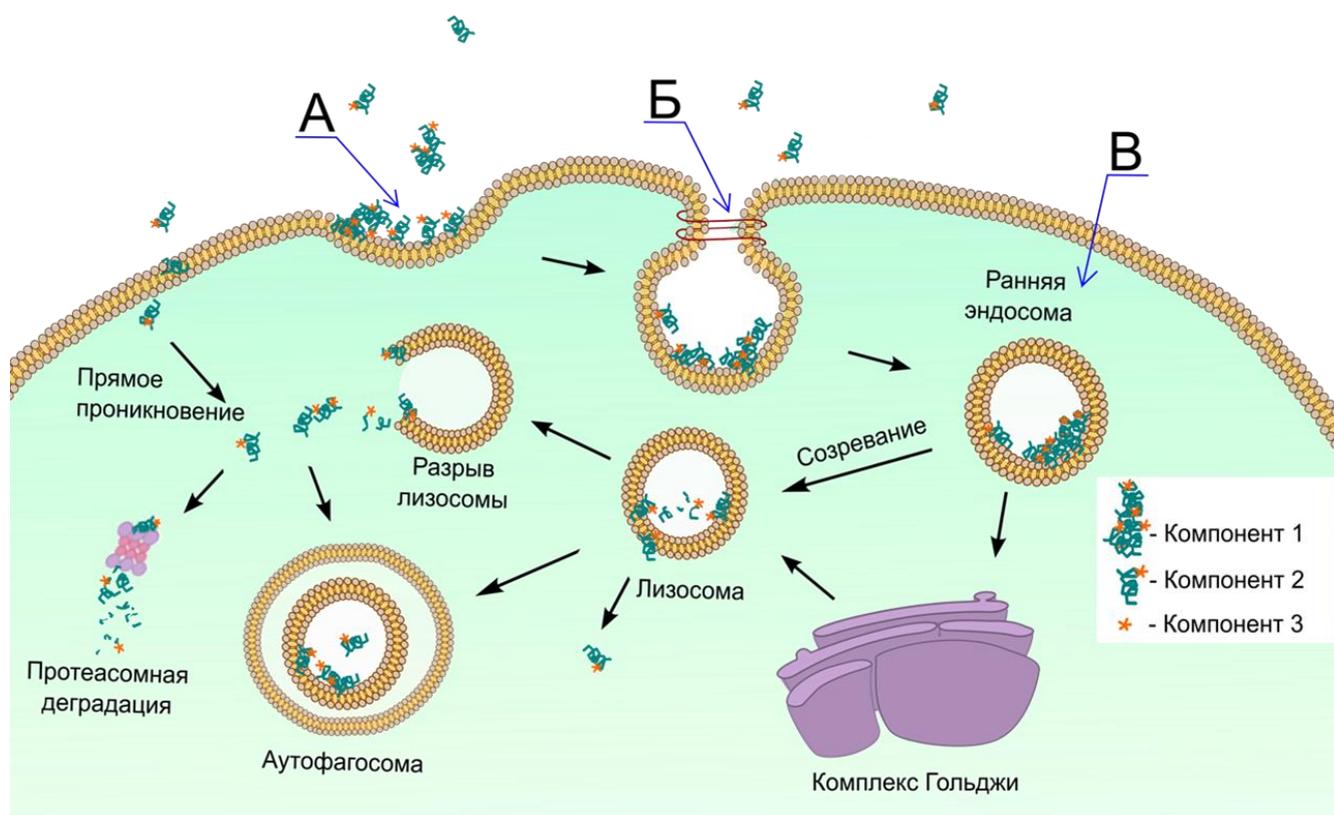


Рисунок 2.23 – Схематическая иллюстрация возможных путей проникновения sRL2 в человеческие клетки. А – инвагинация поверхности плазматической мембраны, Б – образование эндосомы, В – образованная эндосома. Компонент 1 – агрегированный sRL2, компонент 2 – отдельные белковые молекулы sRL2, компонент 3 – спин-меченная аминокислота (или короткий пептид), образованный в результате белковой деградации.

2.5 Заключение

Результаты работы имеют существенное значение для понимания противоопухолевой активности RL2. Так, показано, что участок RL2 (1-43 а.о.), незаменимый для проявления цитотоксической активности белка, является наиболее упорядоченным, а также вовлечен в формирование остаточной структуры RL2 в растворе. Учитывая склонность IDP задействовать свои более упорядоченные участки в качестве первичных контактов связывания с молекулами-мишенями, наиболее вероятно, что участок RL2 (1-43 а.о.) вовлечен в процесс связывания RL2 с белком-мишенью TOM70, что индуцирует гибель опухолевых клеток. Мы установили, что RL2 проникает в клетки человека, будучи в агрегированном состоянии, при этом основной механизм проникновения RL2 в клетки человека A549 является эндоцитоз. Таким образом, наиболее вероятно, что агрегация RL2, стимулируя эндоцитоз, определяет способность белка проникать в клетки человека и, с другой стороны, обеспечивает доставку белковых молекул RL2 в неповрежденном состоянии до белка-мишени TOM70.

ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИНАМИКИ ОТКРЫТИЯ – ЗАКРЫТИЯ ПАР ОСНОВАНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ПОВРЕЖДЕНИЕ 8-ОКСОГУАНИН

3.1 Введение

В природе молекула ДНК представлена в виде различных структурных мотивов, однако в качестве модели для экспериментального изучения повреждений ДНК методом ЯМР обычно применяют дуплексы ДНК, представляющие собой в большинстве случаев классическую двойную спираль. Обычно, выбирая модельный дуплекс ДНК для исследований ЯМР, стараются обеспечить минимальный размер молекулы, но при этом достаточный, чтобы обеспечить свойства длинной двойной цепочки ДНК и, таким образом, исследовать повреждения в наиболее приближенной к реальности модели. В дуплексах ДНК протекают динамические процессы, связанные как с движениями дуплекса как целого, в том числе различными искажениями двойной спирали (скручивание, сжатие или растяжение, и т.д.), так и с локальной подвижностью, связанной с конформационными изменениями внутри нуклеотидов и между связанными парами оснований. [193]

Процесс открытия-закрытия пар оснований в дуплексах ДНК, также называемый “дыханием ДНК”, важен для раннего распознавания повреждений ферментами репарации ДНК: наличие повреждения в паре может сильно влиять на её стабильность и доступность в её открытом состоянии, так что поврежденное основание может оказаться более доступным во внеспиральном положении, чем неповрежденное основание, что является важным для внеспирального распознавания повреждений ферментами репарации ДНК-гликозилазами. В процессе открытия пары оснований иминопротон, ранее участвующий в образовании водородной связи между нуклеотидами, становится доступным растворителю и может свободно обмениваться с протонами воды. Таким образом, применяя формализм катализируемого протонного обмена для этого случая, можно извлечь соответствующие кинетические и термодинамические параметры для процесса открытия-закрытия пары и сравнить их между парой, содержащей повреждение, представляющее интерес, и парой без повреждения.

Эффективную константу скорости обмена k_{ex} иминопротона с протонами воды можно получить методом ЯМР, применяя методику переноса намагниченности с воды, которая позволяет измерять k_{ex} в диапазоне значений, характерном для иминопротонов в двухцепочечной ДНК. Среди хорошо известных подходов переноса намагниченности с воды, таких как WEX [19], WEX II [20], MEXICO [21], и 2D NOESY/EXSY [22], подход CLEANEX-PM [23, 24] является популярным при изучении обмена с водой белковых молекул, поскольку он позволяет для тяжелых молекул с большим значением времени корреляции удобным и

простым способом компенсировать перенос намагниченности, связанный с кросс-релаксацией и, тем самым дает возможность более надежно измерять величину k_{ex} , особенно при небольших значениях скорости обмена. В этом подходе детектируют непосредственно намагниченность протонов, которая была перенесена с протонов воды за счет обмена. Для этого в начале эксперимента с помощью блока селективного градиентного спинового эха насыщают все протоны за исключением протонов воды. Далее используют особый блок спин-лока (англ. *spin-lock*) под названием CLEANEX-PM (англ. аббревиатура Phase-Modulated CLEAN chemical EXchange), который за счет фазовой модуляции последовательности прямоугольных импульсов позволяет добиться компенсации эффектов кросс-релаксации во время его действия, и наблюдаемая в результате интенсивность сигналов является следствием химического обмена с водой. Из наблюдаемой в результате зависимости интенсивности сигналов от изменения длительности импульса спин-лока извлекают кинетическую константу скорости обмена k_{ex} . В исходной имплементации CLEANEX-PM [23, 24] импульс спин-лока подается на резонанс протонов воды и спин-лок способен захватывать все резонансы протонов белка (диапазон химических сдвигов ~ 10 м.д.). Однако в случае иминопротонов азотистых оснований ДНК разница в хим. сдвигах между сигналами иминопротонов и сигналом протонов воды достигает $\Delta\delta \sim 7.5-10.5$ м.д. и в этом случае при допустимой разумной мощности спин-лок уже не способен захватить все обменивающиеся резонансы, и, следовательно, для измерений в ДНК требуется адаптация методики.

Мы модифицировали подход CLEANEX-PM и создали протокол, включающий проведение четырех основных экспериментов ЯМР (см. экспериментальную часть), позволяющих измерить константы скорости обмена k_{ex} иминопротонов с протонами воды. В нашем протоколе CLEANEX-PM блок спин-лока подавался на частоту, расположенную в центре диапазона между резонансами иминопротонов и резонансом протонов воды и, таким образом, профиль возбуждения захватывал и резонансы иминопротонов и резонанс протонов воды. Также в протокол мы включили блок, позволяющий учесть компенсацию неравного нагрева образца за счет разной длительности спин-лока, что позволило улучшить качество извлекаемых данных. Оказалось, что стационарная намагниченность протонов воды прямо перед применением спин-лока зависит от длительности применяемого спин-лока, что может вносить искажения в определяемые величины k_{ex} . Предложенный нами протокол позволяет учесть этот эффект и повысить точность извлекаемых значений k_{ex} .

Мы применили адаптированный подход CLEANEX-PM, чтобы измерить эффективные константы скорости обмена иминопротонов ДНК с протонами воды, и, используя формализм катализируемого протонного обмена (см. 1.4 Динамика открытия-закрытия пар оснований в

ДНК. Катализируемый протонный обмен.) исследовали динамику открытия-закрытия пар оснований охoG:C и охoG:A в разных нуклеотидных последовательностях. Поскольку на динамику пары оснований влияет её укладка с соседними парами в ДНК [194], основываясь на известные значения энергий стэкинг-взаимодействий гуанина в ДНК [195], мы спроектировали нуклеотидные последовательности так, чтобы поместить гуанин и 8-оксогуанин в состояния с наихудшей укладкой C[G/охoG]T и наилучшей укладкой A[G/охoG]G (Рисунок 3.1). Исследуемое основание находилось в 8-ом положении самокомплементарного 12-звенного олигонуклеотида, чтобы минимизировать краевые эффекты [143, 144].

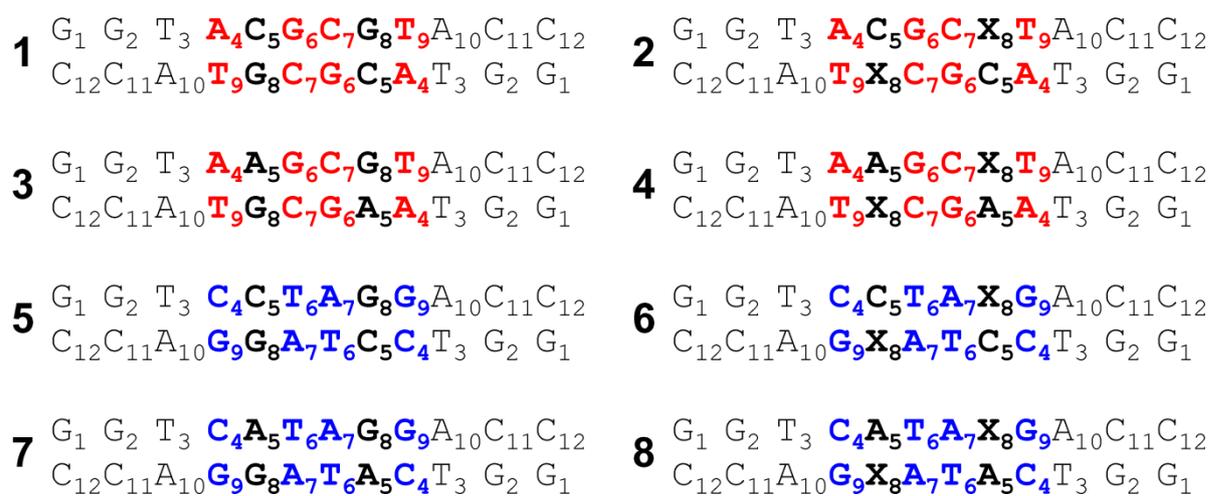


Рисунок 3.1 – Последовательности исследуемых самокомплементарных дуплексов ДНК, в 8-ое положение которых помещены гуанин (G) или 8-оксогуанин (охoG). Красным и синим цветом показаны участки, моделирующие наихудшую и наилучшую, соответственно, укладку.

В данной работе мы получили и сравнили величины констант скоростей открытия, закрытия и константы равновесия процесса открытия-закрытия пар оснований G:A, G:C, охoG:A и охoG:C, помещенных в одни и те же последовательности дуплексов ДНК, которые моделируют наихудшую и наилучшую укладки.

3.2 Экспериментальная часть

Олигонуклеотиды. Все олигонуклеотиды (Рисунок 3.1) были синтезированы в ИХБФМ СО РАН из коммерчески доступных фосфорамидитов (Glen Research, Стерлинг, штат Вирджиния; мономеры охoG приобретены у Nanotech-S, Новосибирск, Россия). Сразу после синтеза олигонуклеотиды очищали методом обращённо-фазовой ВЭЖХ на колонке Hamilton PRP-1 C18 (Hamilton, Рино, штат Невада). Правильные молекулярные массы олигонуклеотидов подтверждались методом масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем в режиме отрицательных ионов. Приготовленные образцы олигонуклеотидов были предоставлены нам

для исследования д.б.н., чл.-корр. РАН Дмитрием Олеговичем Жарковым и к.х.н. Антоном Валентиновичем Ендуткиным.

Приготовление образцов ЯМР. Олигонуклеотиды растворяли в концентрации 2 мМ для получения концентрации 1 мМ дуплексов ДНК в 550 мкл водного раствора, содержащего 27.5 мкл D₂O, 10 мМ натрий-фосфатный буфер (рН 8.0), 50 мМ NaCl, 1 мМ Na₂EDTA, 10 мМ MgCl₂ и 200 мкМ триметилсилилпропансульфонат натрия. Образцы олигонуклеотидов выдерживали при 90°C в течение 5 мин и медленно охлаждали для образования дуплексов ДНК. 2,2-дифторэтиламин (ДФЭА) (CAS RN: 430-67-1, чистота >98.0%) был куплен у Токуо Chemical Industry (Токио, Япония) и оттитрован к.х.н. Антоном Валентиновичем Ендуткиным (ИХБФМ СО РАН) до рН 8.0 путем добавления HCl и измерения рН, используя рН-метр HI 2210 (Hanna Instruments, Вунсокет, штат Род-Айленд). В итоговый образец ДФЭА добавлялся 10 мМ MgCl₂. Полученный образец ДФЭА последовательно добавляли к образцам дуплексов ДНК в концентрациях 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 100 мМ, 150 мМ, 200 мМ, 300 мМ, 500 мМ, 800 мМ, 1000 мМ и 1200 мМ. Концентрация непротонированной формы ДФЭА рассчитывалась как $[ДФЭА_{основание}] = [ДФЭА]/(1 + 10^{pK_a - pH})$.

Эксперименты ЯМР. Все эксперименты ЯМР проводили на спектрометре Bruker Avance 600 МГц (Bruker Spectrospin, Карлсруэ, Германия), оснащенном 5-мм z-градиентным датчиком тройного резонанса $\{^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}\}^1\text{H}$. Для экспериментов по плавлению дуплексов спектры ^1H ЯМР с применением метода подавления сигнала растворителя Perfect Echo Excitation-Sculpting [196] получали при разных температурах. Отнесение сигналов ^1H иминопротонов было выполнено по спектрам ^1H - ^1H NOESY, записанным при 10°C с временем смешивания 200 мс и релаксационной задержкой 3.5 с. Все эксперименты ЯМР для измерения констант скоростей обмена иминопротонов с протонами растворителя проводились при 10°C. Для каждой концентрации ДФЭА записывался набор экспериментов CLEANEX-PM с временами смешивания $\tau = 3$ мс, 5 мс, 7 мс, 10 мс, 15 мс, 20 мс, 30 мс, 40 мс, 50 мс, 60 мс, 80 мс и 95 мс. Константа скорости продольной релаксации резонанса протонов воды R_{1w} измерялась для каждой концентрации добавляемого ДФЭА по эксперименту ЯМР насыщение – восстановление (англ. *saturation recovery*) с временными задержками между двумя импульсами 1 мс, 20 мс, 50 мс, 100 мс, 150 мс, 300 мс, 500 мс, 700 мс, 900 мс, 1 с, 1.2 с, 1.5 с, 2 с, 2.5 с, 3 с, 5 с. Обработка всех спектров ЯМР выполнялась в программе Bruker TopSpin v3.2. Спектральная деконволюция перекрывающихся пиков иминопротонов осуществлялась в программе MagicPlot v2.9.3 (MagicPlot Systems, Санкт-Петербург, Россия).

3.2.1 Адаптация последовательности CLEANEX-PM для измерения констант скорости обмена иминопотонов с протонами воды

Базовый протокол CLEANEX-PM для измерения констант скорости обмена амидных протонов белка с протонами растворителя подробно описан в работе [24]. Мы адаптировали данный протокол для измерения констант скорости обмена иминопотонов ДНК с протонами воды. Импульсная последовательность (I) (Рисунок 3.2) применяется для измерения интенсивности сигнала интересующего иминопотона $I(\tau)$, которая прямо пропорциональна количеству иминопотонов, обменявшихся с протонами воды за время смешивания CLEANEX-PM (время τ). Импульсная последовательность (II) (Рисунок 3.3) позволяет получить термическую интенсивность интересующего иминопотона I^0 . Зависимость отношения $I(\tau)/I^0$ от времени смешивания τ позволяет извлечь эффективную константу скорости обмена k_{ex} (см. Литературный обзор, уравнение (10)), которая соотносится с константой обмена псевдопервого порядка $k_{NH \rightarrow H_2O}$ как $k_{NH \rightarrow H_2O} = X_{H_2O} \times k_{ex}$, где $X_{H_2O} \approx 1$ – мольная доля молекул воды:

$$\frac{I(\tau)}{I^0} = \frac{k_{ex}}{R_{1,app} + k_{ex} - R_{1w,app}} (e^{-R_{1w,app}\tau} - e^{-(R_{1,app} + k_{ex})\tau}) \quad (14)$$

где $I(\tau)$ – интенсивность иминопотона, получаемая после применения импульсной последовательности (I) с временем смешивания τ . I^0 – термическая интенсивность иминопотона, получаемая после применения импульсной последовательности (II). $R_{1,app}$ и $R_{1w,app}$ – смесь констант скоростей продольной и поперечной релаксации интересующих иминопотонов и протонов воды, соответственно.

Импульсные последовательности (I) и (II) включают в себя применение импульса, возвращающего намагниченность протонов воды на ось z параллельную полю B_0 (англ. *water flip back pulse*), что позволяет уменьшить релаксационную задержку до $d_1 = 1$ с [20]. Такой подход позволяет увеличить частоту повторения экспериментов и добиться оптимального соотношения сигнал/шум за приемлемое время. Однако, в этом случае намагниченность протонов воды непосредственно перед применением модуля CLEANEX-PM в последовательности (I) и блока подавления растворителя в последовательности (II) (моменты времени, обозначенные как S и S_0 (Рисунки 3.2, 3.3)) должна отдельно измеряться для правильного расчета величин k_{ex} . Мы измерили стационарную намагниченность протонов воды в эти моменты времени, применяя импульсные последовательности (III) и (IV) (Рисунки 3.4, 3.5). Оказалось, что стационарная намагниченность протонов воды в момент времени S последовательности (I) зависит от времени смешивания τ в модуле CLEANEX-PM. Таким образом, для правильного расчета величин k_{ex} отношение $I(\tau)/I^0$ в уравнении (14)

необходимо помножить на множитель $f(\tau) = I_{w0}/I_w(\tau)$, равный отношению стационарных намагниченностей протонов воды в моменты времени S_0 и S , которые можно измерить, применяя последовательности (IV) и (III), соответственно. Характерный и воспроизводимый вид зависимости множителя $f(\tau)$ от τ показан на рисунке 3.6. Следует отметить, что значения $R_{1,app}+k_{ex}$ для иминопротонов в уравнении (14) являются как минимум на порядок больше значений $R_{1w,app}$. Таким образом, приближение величины $R_{1w,app}$ её предельным значением, константой скорости продольной релаксации R_{1w} , не должно сильно менять извлекаемый параметр k_{ex} при аппроксимации данных. Учитывая все вышеперечисленное, уравнение (14) нужно модифицировать в следующий вид:

$$f(\tau) \frac{I(\tau)}{I^0} = \frac{k_{ex}}{R_{1,app} + k_{ex} - R_{1w}} (e^{-R_{1w}\tau} - e^{-(R_{1,app}+k_{ex})\tau}) \quad (15)$$

где значения R_{1w} были получены из эксперимента ЯМР насыщение – восстановление (англ. *saturation recovery*).

Таким образом, для определения значения константы скорости обмена иминопротона с протонами воды k_{ex} при конкретной концентрации ДФЭА требуется измерение величин I_0 , R_{1w} , а также набора величин $f(\tau)$, $I(\tau)$ при разных временах τ . Аппроксимация полученных данных уравнением (15) позволяет извлечь в качестве параметров значения k_{ex} и $R_{1,app}+k_{ex}$. Пример экспериментально полученной зависимости $f(\tau) \frac{I(\tau)}{I^0}$ от времени τ и её аппроксимации уравнением (15) показан на рисунке 3.7.

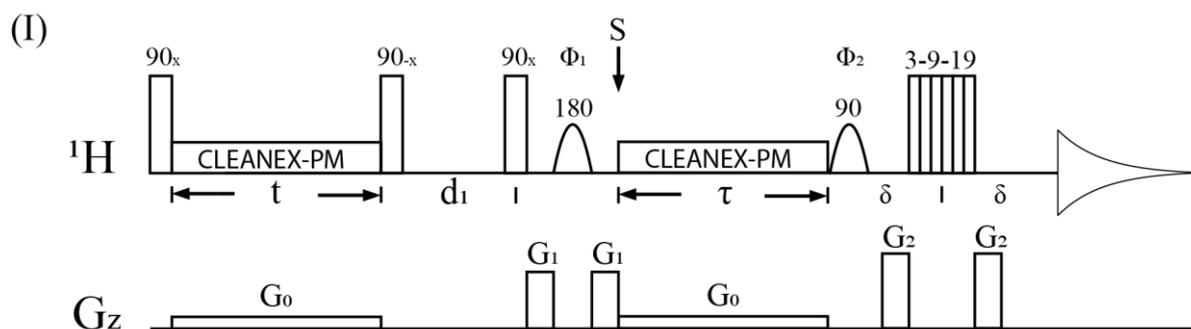


Рисунок 3.2 – Временная диаграмма импульсной последовательности (I) для спектрометра 600 МГц. Прямоугольники по каналу ^1H представляют собой 90° жесткие импульсы. Параболами изображены 180° и 90° прямоугольные импульсы селективные на резонанс воды с длительностью 5 мс. Модуль спин-лока, CLEANEX-PM, [23] представляет собой последовательность прямоугольных импульсов [$135^\circ(x)$ $120^\circ(-x)$ $110^\circ(x)$ $110^\circ(-x)$ $120^\circ(x)$ $135^\circ(-x)$] (мощность импульсов равна той, которая необходима для 90° импульса длительности 36 мкс) с полным временем действия t и τ . Модуль CLEANEX-PM, находящийся перед задержкой d_1 применяется для компенсации нагрева, так чтобы выполнялось условие $t + \tau = 100$ мс. Модуль WATERGATE 3-9-19 [$3\alpha(\varphi) - \tau_0 - 9\alpha(\varphi) - \tau_0 - 19\alpha(\varphi) - \tau_0 - 19\alpha(-\varphi) - \tau_0 - 9\alpha(-\varphi) - \tau_0 - 3\alpha(-\varphi)$ ($26\alpha = 180^\circ$)] [197] с задержкой между импульсами $\tau_0 = 132$ мкс используется для подавления остаточного сигнала протонов воды. Несущая частота выставляется на резонанс

протонов воды для всех импульсов кроме модулей CLEANEX-PM, для которых она выставлялась посередине между областью сигналов иминопотонов и резонансом воды. Напряженность поля (6,9 кГц) импульсов в CLEANEX-PM выбиралась таким образом, чтобы охватить частотный диапазон, включая резонанс воды и область сигналов иминопотонов. G_0 – статический z-градиент, применяемый в течение времени действия модуля CLEANEX-PM с силой градиента 0.1 Г/см., G_1 , G_2 – импульсные z-градиенты со сглаженной прямоугольной формой (называемой SMSQ10.100 в номенклатуре BRUKER), с максимальной силой градиента $G_1 = 7.5$ Г/см, $G_2 = 20$ Г/см и длительностью 1 мс. Релаксационная задержка $d_1 = 1$ с. Количество сканов и фиктивных сканов 16. Фазовые циклы: $\Phi_1 = \{x, y, -x, -y\}$, $\Phi_2 = \{x, -x\}$, $\phi(3-9-19) = \{x, x, x, x, y, y, y, y, -x, -x, -x, -x, -y, -y, -y, -y\}$ и приемника $\{x, -x, x, -x, -x, x, -x, x\}$. В момент времени S измеряется уровень насыщения сигнала ^1H воды (см. текст выше).

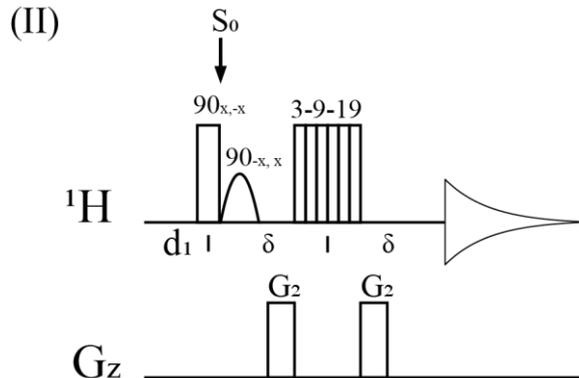


Рисунок 3.3 – Временная диаграмма импульсной последовательности (II) для спектрометра 600 МГц. Прямоугольник по каналу ^1H и парабола представляют собой 90° жесткий импульс и 90° прямоугольный импульс селективный на резонанс воды с длительностью 5 мс, соответственно. Модули WATERGATE 3-9-19 и градиенты G_2 такие же, как в импульсной последовательности (I). Релаксационная задержка $d_1 = 1$ с. Количество сканов и фиктивных сканов 16. Фазовые циклы: $\phi(3-9-19) = \{x, x, y, y, -x, -x, -y, -y\}$ и приемника $\{x, -x, -x, x\}$. В момент времени S_0 измеряется уровень насыщения сигнала ^1H воды (см. текст выше).

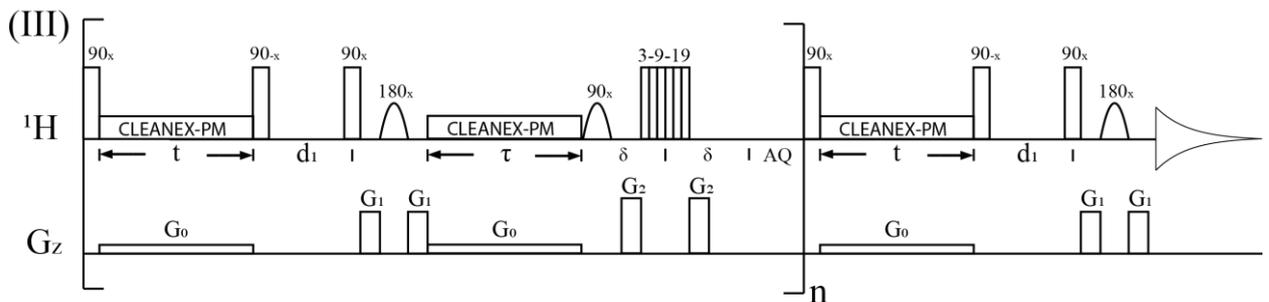


Рисунок 3.4 – Временная диаграмма импульсной последовательности (III) для спектрометра 600 МГц. Мощности и длительности импульсов полностью совпадают с теми, которые в импульсной последовательности (I). Фаза модуля WATERGATE 3-9-19 $\phi = x$. Количество циклов n равно 32. Релаксационная задержка $d_1 = 1$ с. AQ – время записи спада свободной индукции. Количество сканов 1 и количество фиктивных сканов 0.

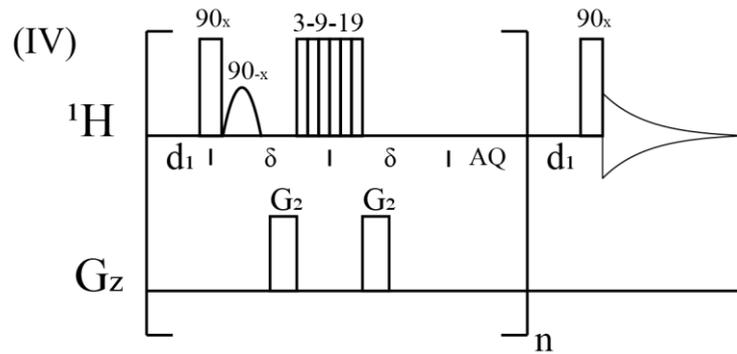


Рисунок 3.5 – Временная диаграмма импульсной последовательности (IV) для спектрометра 600 МГц. Мощности и длительности импульсов полностью совпадают с теми, которые в импульсной последовательности (II). Фаза модуля WATERGATE 3-9-19 $\varphi = x$. Количество циклов n равно 32. Релаксационная задержка $d_1 = 1$ с. AQ – время записи спада свободной индукции. Количество сканов 1 и количество фиктивных сканов 0.

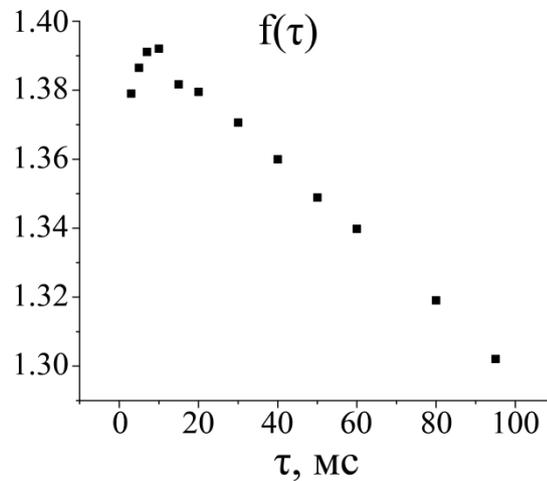


Рисунок 3.6 – Зависимость множителя $f(\tau)$ от времени смешивания τ в эксперименте CLEANEX-PM.

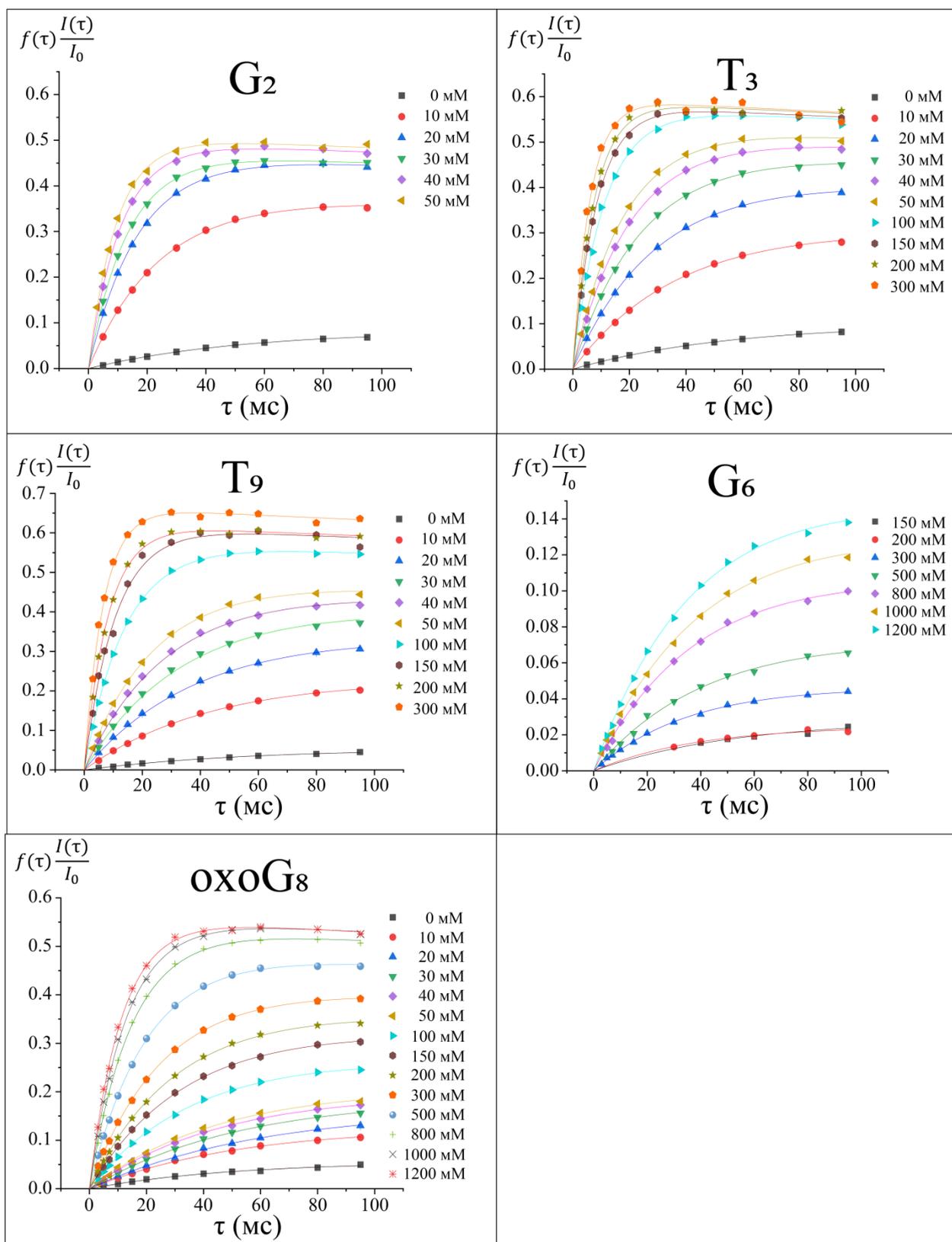


Рисунок 3.7 – Экспериментально полученные зависимости $f(\tau) \frac{I(\tau)}{I_0}$ от времени τ для иминопротонов дуплекса **4** и их аппроксимация уравнением (15) при различных концентрациях добавляемого ДФЭА.

3.2.2 Отнесение сигналов ^1H ЯМР иминопотонов

В предположении, что последовательность исследуемых дуплексов известна заранее, отнесение сигналов иминопотонов может быть выполнено по спектрам ^1H - ^1H NOESY путем сопоставления известной последовательности нуклеотидов и получаемых кросс-пиков между резонансами иминопотонов в спектре ^1H - ^1H NOESY, которые проявляются от иминопотонов, находящихся в соседних парах оснований [198]. В канонических парах Уотсона-Крика резонансы иминопотонов попадают в характерные диапазоны хим. сдвига: 15.0–13.5 м.д. для пары А:Т и 13.5–12.0 м.д. для пары G:C. При этом иминопотоны концевых пар зачастую не видны в спектрах ^1H ЯМР ввиду их быстрого обмена с протонами воды [199].

В образцах дуплексов **1**, **2**, **4** и **5**, **6**, **8** проявились пять отдельных резонансов иминопотонов, два из которых были в характерном диапазоне для А:Т пар и были отнесены к иминопотонам оснований Т, в то время как остальные попадали в характерный диапазон для G:C пар и были отнесены к иминопотонам оснований G или oхoG (Рисунки 3.8, 3.9). Количество видимых резонансов иминопотонов от оснований Т и G/охоG согласуется с тем, что дуплексы являются самокомплементарными (Рисунок 3.1). В дуплексах **1**, **2** и **4** только иминопотоны оснований G₂ и G₆ среди всех остальных иминопотонов могут иметь один кросс-пик (поскольку резонансы от иминопотонов концевых пар не проявились в спектрах ЯМР) с иминопотонами оснований Т₃ и G₈/охоG₈, соответственно, резонансы которых находятся в разных спектральных диапазонах. Таким образом, резонансы иминопотонов G₂ и G₆ в дуплексах **1**, **2** и **4** можно однозначно отнести. В дуплексах **5**, **6** и **8** только иминопотоны G₂ и T₆ могут иметь один кросс-пик и при этом их резонансы находятся в разных спектральных диапазонах, так что их резонансы также можно отнести. У остальных резонансов иминопотонов проявляются два кросс-пика от иминопотонов, находящихся в соседних парах оснований. Таким образом, из отнесения резонансов иминопотонов G₂ и G₆/T₆, зная последовательность дуплекса, можно проделать последовательное отнесение резонансов остальных иминопотонов (Рисунки 3.8, 3.9).

В образце дуплекса **3** проявились только два резонанса иминопотонов, которые лежали в частотном диапазоне характерном для иминопотонов основания G пар G:C, и, следовательно, не могли быть отнесены вышеописанным методом (Рисунок 3.8). Один из двух сигналов сильно уширился при добавлении 10 мМ ДФЭА, что не позволило измерить значение k_{ex} для соответствующего иминопотона при концентрациях ДФЭА ≥ 10 мМ. Однако константа равновесия K'_{eq} , полученная для пары оснований с иминопотонами, которому соответствует второй резонанс, была того же порядка, что и константа равновесия для пары с основанием G₆ в

дуплексах **1**, **2** и **4**. Таким образом, этот резонанс был отнесен к иминопротону основания G_6 . В образце дуплекса **7** проявились только три отдельных резонанса иминопротонов, один из которых попадал в частотный диапазон характерный для иминопротонов основания Т пар А:Т, а два других – в характерный диапазон для иминопротонов оснований G пар G:C. Спектр 1H - 1H NOESY показал наличие кросс-пиков между этими резонансами, которые могут быть отнесены только к фрагменту G_2 - T_3 - G_9 . Различить резонансы от иминопротонов G_2 и G_9 получилось, используя полученные значения k_{op} , k'_{cl} и K'_{eq} , которые значительно отличались для пар с основаниями G_2 и G_9 в дуплексах **5**, **6** и **8**.

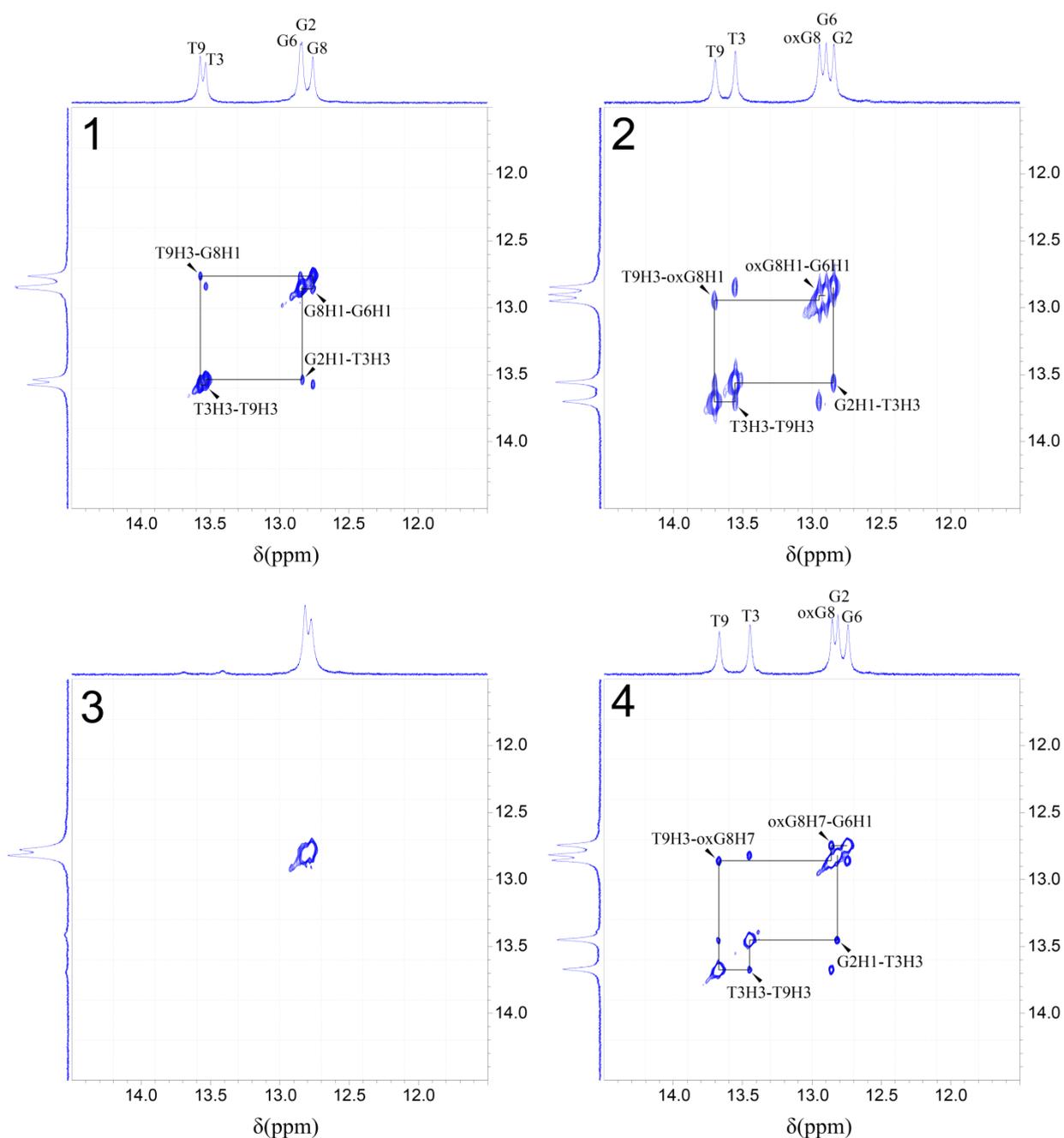


Рисунок 3.8 – Области иминопротонов в спектрах 1H - 1H NOESY и 1H для дуплексов **1–4**. Сплошные линии показывают последовательное отнесение резонансов иминопротонов по полученным кросс-пикам между иминопротонами соседних пар оснований.

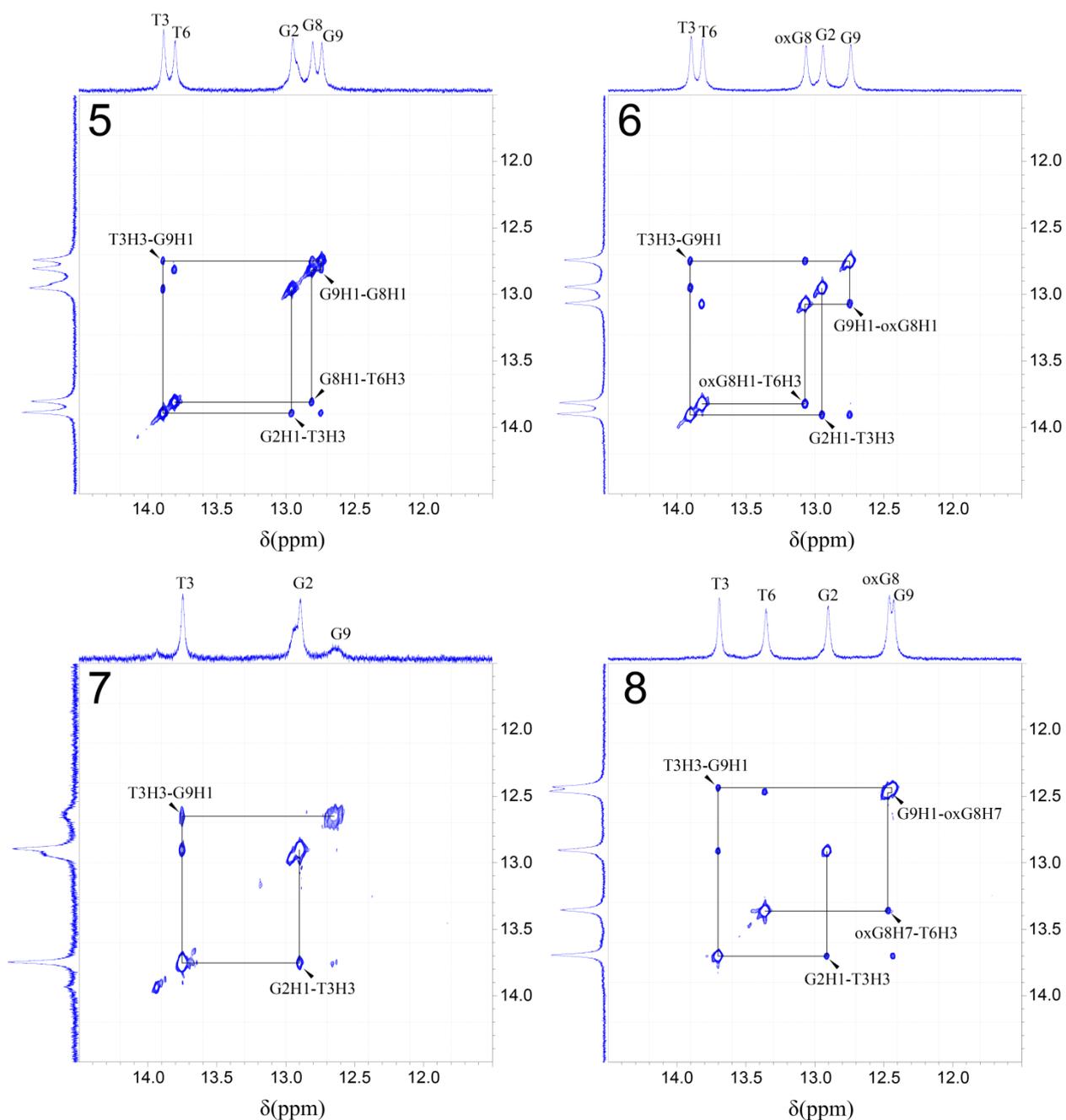


Рисунок 3.9 – Области иминопротонов в спектрах ^1H - ^1H NOESY и ^1H для дуплексов 5–8. Сплошные линии показывают последовательное отнесение резонансов иминопротонов по полученным кросс-пикам между иминопротонами соседних пар оснований.

3.2.3 Расчет величин k_B

Константа скорости переноса иминопротона к катализатору обмена k_B (см. Литературный обзор, уравнение (11)) определяется разностью значений pK_a исследуемого иминопротона (N3–H для Т в паре А:Т, N1–H для G/охоG в парах G/охоG:С, N7–H для охоG в паре охоG:А) и катализатора обмена, а также диффузионно-контролируемой константой

скорости бимолекулярного столкновения между иминопотоном и катализатором обмена, $k_{\text{coll}}: k_{\text{B}} = k_{\text{coll}} / (1 + 10^{pK_{\text{a}}^{\text{NH}} - pK_{\text{a}}^{\text{B}}})$, где $pK_{\text{a}}^{\text{NH}}$ и pK_{a}^{B} – величины pK_{a} иминопотома в свободном нуклеотиде и катализатора обмена, соответственно [173]. Однако эта зависимость не учитывает сдвиг в значении $pK_{\text{a}}^{\text{NH}}$, когда основание, содержащее иминопотон, находится в ДНК по сравнению с тем, когда оно в свободном нуклеотиде, и не учитывает наличие дальнего взаимодействия между иминопотоном в ДНК и катализатором обмена. Учет этих поправок, когда в качестве катализатора обмена выступает нейтральная молекула, такая как ДФЭА, дает следующую модификацию выражения для величины k_{B} [200]:

$$k_{\text{B}} = \frac{k_{\text{coll}}}{1 + f_1 \times 10^{(pK_{\text{a}}^{\text{NH}} + \Delta) - pK_{\text{a}}^{\text{B}}}} \quad (16)$$

где f_1 – множитель, учитывающий потенциал дальнего взаимодействия иминопотома в ДНК и катализатора обмена B , Δ – сдвиг значения pK_{a} исследуемого иминопотома, когда основание находится в ДНК. Согласно [200], мы оценили эти параметры в условиях температуры 10°C и ионной силы 0.05 M NaCl и получили $f_1 = 0.195$ и $\Delta = 0.94$. Также согласно [200], величина константы скорости столкновения $k_{\text{coll}} = 2.85 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ между ДФЭА и иминопотоном, находящимся в ДНК, была оценена при 10°C . Значения pK_{a} иминопотома N3-N основания T ($pK_{\text{a}} = 9.88$) и N1-N основания G ($pK_{\text{a}} = 9.53$) при 10°C были оценены из соответствующих литературных значений pK_{a} при 298 K и энтальпий ионизации [173]. Для основания охоG иминопотоны N1-N и N7-N при 298 K обладают значениями $pK_{\text{a}} = 8.6$ и $pK_{\text{a}} = 11.7$, соответственно [201]. Мы не нашли в литературе значений энтальпий ионизации для иминопотома охоG , поэтому температурная коррекция величины pK_{a} N1-N осуществлялась, используя энтальпию ионизации N1-N для основания G . Такая оценка дала $pK_{\text{a}} = 8.89$ при 10°C для иминопотома N1-N основания охоG . Ввиду отсутствия литературных данных коррекцию величины pK_{a} N7-N на температуру 10°C сделать было невозможно и при расчетах для N7-N применялась величина $pK_{\text{a}} = 11.7$. Используя уравнение (16) с подстановкой всех величин при 10°C , были получены следующие значения k_{B} : $1.95 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (N1-N основания G), $8.76 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (N3-N основания T), $8.34 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (N1-N основания охоG), и $1.33 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (N7-N основания охоG).

3.3 Константы скоростей и равновесия процесса открытия – закрытия пар оснований, содержащих 8-оксогуанин

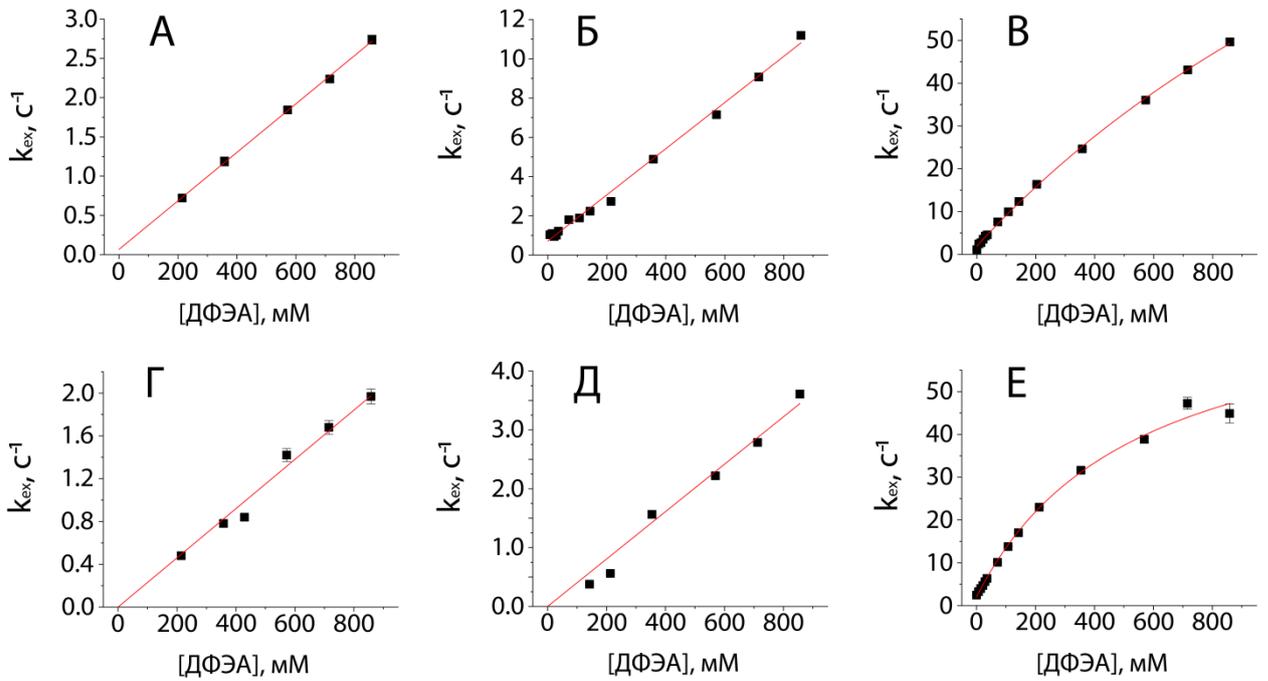
Мы получили значения констант скоростей раскрытия и закрытия, а также константы равновесия процесса открытия – закрытия, для пар оснований в 12-звенных дуплексах ДНК

(нумерация дуплексов в работе соответствует той, которая на рисунке 3.1), применяя формализм катализируемого протонного обмена (см. Литературный обзор, *1.4 Динамика открытия-закрытия пар оснований по данным ЯМР*). В качестве катализатора обмена был выбран 2,2-дифторэтиламин (ДФЭА, DFEA), значение pK_a которого лежит в области физиологических значений pH ($pK_a=7.45$ при 25°C), и его эффективность как катализатора обмена была успешно ранее продемонстрирована [167]. Каталитической формой ДФЭА является основная форма, концентрация которой определяется выражением: $[\text{ДФЭА}_{\text{основание}}] = [\text{ДФЭА}]/(1 + 10^{pK_a - \text{pH}})$, где $[\text{ДФЭА}]$ – полная концентрация добавляемого в исследуемую систему ДФЭА. При исследовании динамики пар оснований все образцы дуплексов ДНК выдерживались при $\text{pH} = 8.0$ и температуре равной 10°C . Величина $pK_a = 7.6$ для ДФЭА при 10°C была взята из литературных данных [167].

Для получения значений k_{op} , k'_{cl} и K'_{eq} мы измерили эффективные константы скорости обмена иминопотонов с протонами воды k_{ex} при различных концентрациях ДФЭА при 10°C (Рисунки 3.10–3.14), применяя модифицированный протокол CLEANEX-PM (см. экспериментальную часть). Полученные зависимости (Рисунки 3.10–3.14) аппроксимировались уравнением (17), где варьируемыми параметрами были величины k_{op} , K'_{eq} и k_0 , тогда как значения k_B для каждого типа иминопотона оценивались из уравнения (16) (см. экспериментальную часть):

$$k_{\text{ex}} = \frac{k_{\text{op}} \times (k_0 + k_B[B])}{\frac{k_{\text{op}}}{K'_{\text{eq}}} + (k_0 + k_B[B])} \quad (17)$$

Зависимости, где реализовывался режим обмена EX_2 , аппроксимировались уравнением (13) (см. Литературный обзор, *1.4 Динамика открытия-закрытия пар оснований по данным ЯМР*), где варьировались параметры K'_{eq} и k_0 . По значениям k_{op} и K'_{eq} вычисляли k'_{cl} . Результаты полученных значений k_{op} , k'_{cl} и K'_{eq} представлены в таблицах 3.1-3.2.



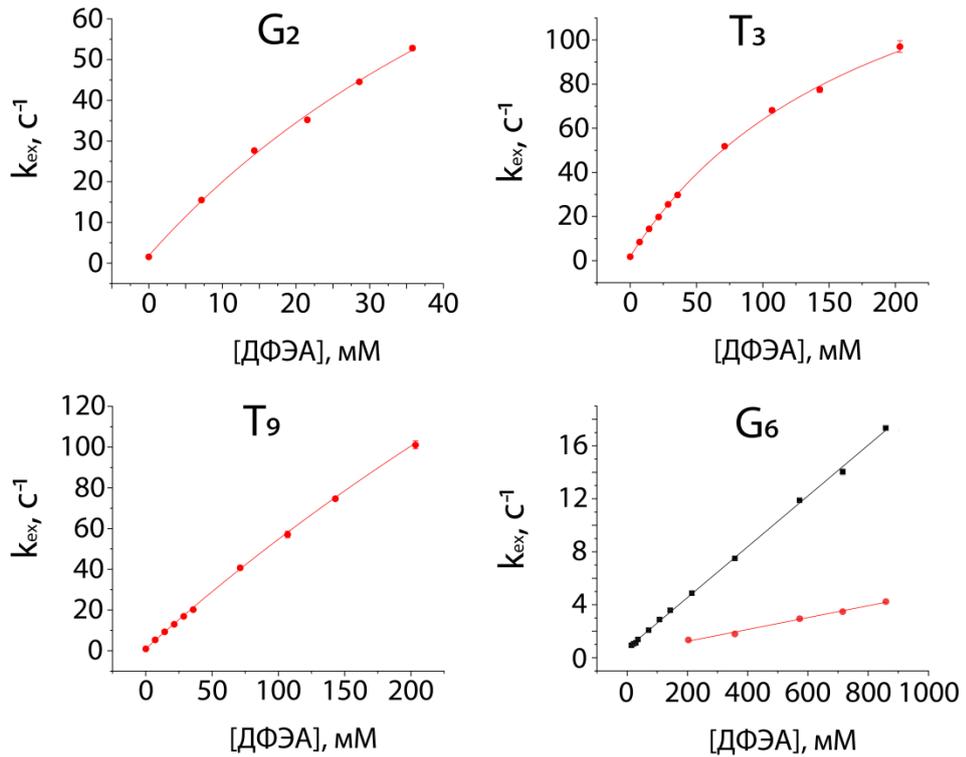


Рисунок 3.12 – Зависимости эффективной константы скорости обмена k_{ex} от концентрации основной формы ДФЭА для иминопротонов (за исключением G₈ и охoG₈) в дуплексах **3** (черные квадраты) и **4** (красные круги). Сплошные кривые показывают аппроксимацию данных уравнением (13) или (17).

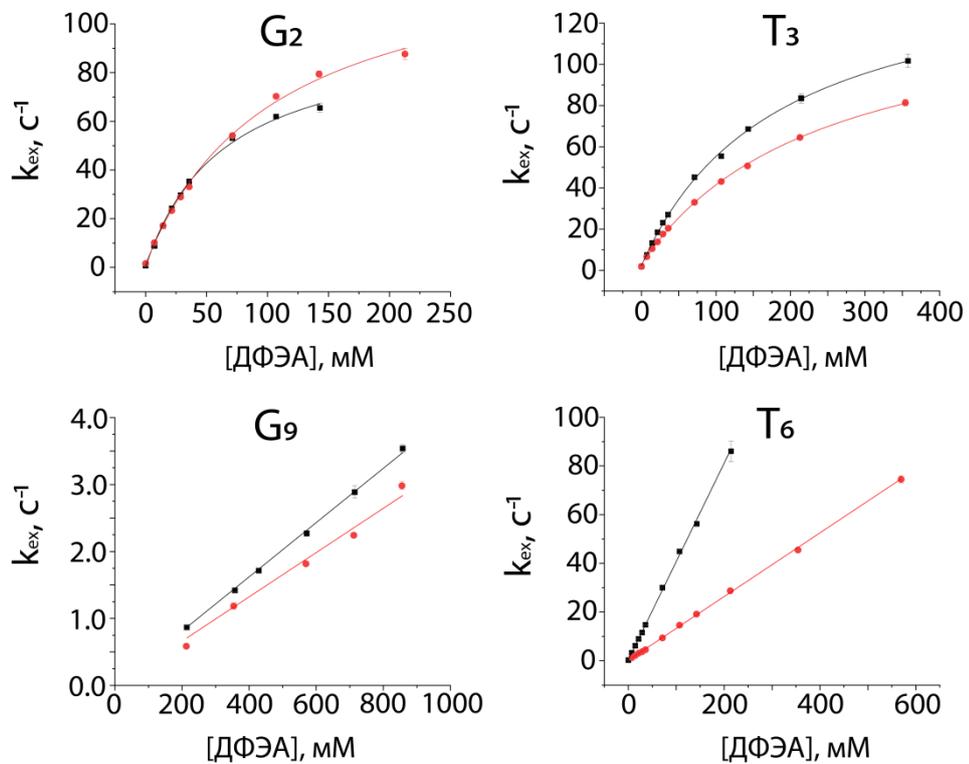


Рисунок 3.13 – Зависимости эффективной константы скорости обмена k_{ex} от концентрации основной формы ДФЭА для иминопротонов (за исключением G₈ и охoG₈) в дуплексах **5** (черные квадраты) и **6** (красные круги). Сплошные кривые показывают аппроксимацию данных уравнением (13) или (17).

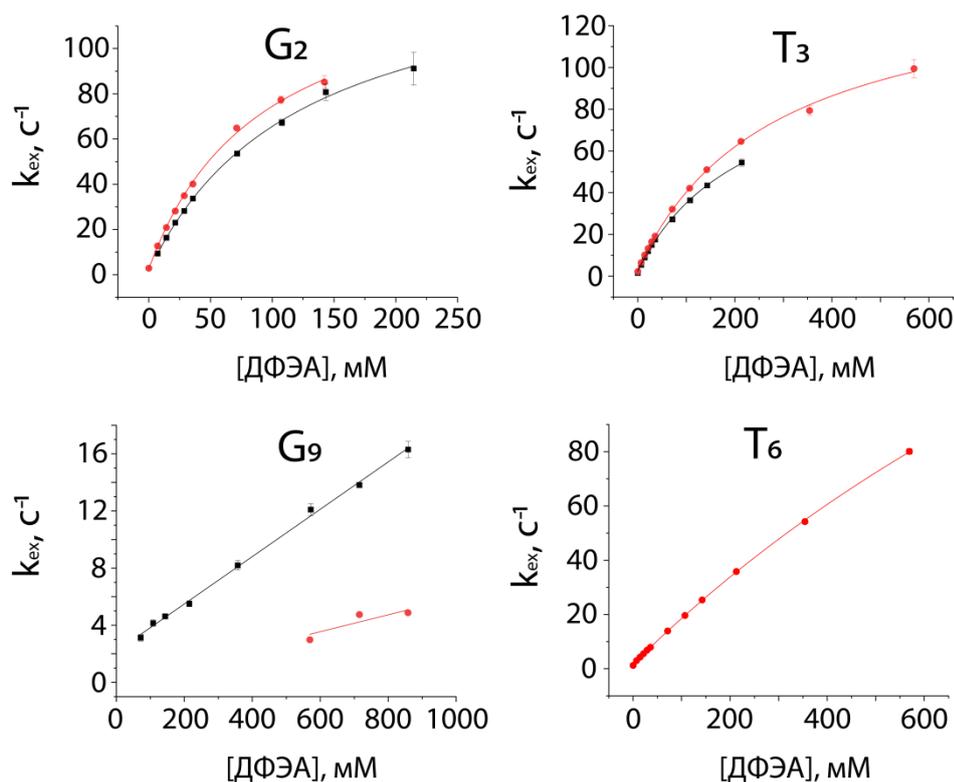


Рисунок 3.14 – Зависимости эффективной константы скорости обмена k_{ex} от концентрации основной формы ДФЭА для иминопротонов (за исключением G_8 и $охоG_8$) в дуплексах **7** (черные квадраты) и **8** (красные круги). Сплошные кривые показывают аппроксимацию данных уравнением (13) или (17).

Таблица 3.1 – Результаты констант скоростей открытия k_{op} , закрытия k'_{cl} и равновесия K'_{eq} процесса открытия – закрытия пар, содержащих основания G_8 и $охоG_8$, в исследуемых дуплексах ДНК^a.

Дуплексы ^b		k_{op}, c^{-1}	$k'_{cl}, \times 10^{-4}, c^{-1}$	$K'_{eq}, \times 10^6$
1	5'-GGTACGC <u>G</u> TACC-3' 3'-CCATGCGCATGG-5'	EX2 ^c	EX2	0.158 ± 0.003
2	5'-GGTACGC <u>X</u> TACC-3' 3'-CCATXCGCATGG-5'	EX2	EX2	0.141 ± 0.003
3	5'-GGTAAGC <u>G</u> TACC-3' 3'-CCATGCGAATGG-5'	n/d ^d	n/d	n/d
4	5'-GGTAAGC <u>X</u> TACC-3' 3'-CCATXCGAATGG-5'	183 ± 17	32 ± 3	574 ± 18
5	5'-GGTCCTAG <u>G</u> ACC-3' 3'-CCAGGATCCTGG-5'	EX2	EX2	0.118 ± 0.009
6	5'-GGTCCTA <u>X</u> GACC-3' 3'-CCAGXATCCTGG-5'	EX2	EX2	0.048 ± 0.003
7	5'-GGTCATA <u>G</u> ACC-3' 3'-CCAGGATAATGG-5'	n/d	n/d	n/d
8	5'-GGTCATA <u>X</u> GACC-3' 3'-CCAGXATAATGG-5'	76 ± 5	7.0 ± 0.8	1080 ± 89

^a Для 8-оксогуанина результаты рассчитывались для иминопротона N1-H в парах $охоG:C$ и для иминопротона N7-H в парах $охоG:A$.

^b X, 8-оксогуанин.

^c EX2, константы скоростей k_{op} и k'_{cl} невозможно было извлечь поскольку константа скорости закрытия значительно превышала константу скорости обмена из открытого состояния пар оснований G₈ и oхoG₈.

^d n/d, константы скоростей k_{op} , k'_{cl} и равновесия K'_{eq} невозможно было получить для иминопротонов G₈ в дуплексах **3** и **7**, поскольку эффективная константа скорости обмена превышала допустимый диапазон значений, получаемых данным методом.

Таблица 3.2 – Результаты констант скоростей открытия k_{op} , закрытия k'_{cl} и равновесия K'_{eq} процесса открытия – закрытия пар оснований (за исключением пар с основаниями G₈ и oхoG₈) в исследуемых дуплексах ДНК.

дуплекс 1	G ₂	T ₃	G ₆	T ₆	G ₉	T ₉
k_{op}, c^{-1}	75 ± 3	182 ± 24	EX2 ^a	n/a ^b	n/a	203 ± 16
$k'_{cl}, 10^{-4} c^{-1}$	69 ± 4	169 ± 29	EX2	n/a	n/a	574 ± 47
$K'_{eq}, \times 10^6$	110 ± 6	108 ± 12	0.11 ± 0.01	n/a	n/a	35.3 ± 0.9
дуплекс 2	G ₂	T ₃	G ₆	T ₆	G ₉	T ₉
k_{op}, c^{-1}	293 ± 38	213 ± 16	EX2	n/a	n/a	590 ± 94
$k'_{cl}, 10^{-4} c^{-1}$	303 ± 43	219 ± 21	EX2	n/a	n/a	1026 ± 167
$K'_{eq}, \times 10^6$	97 ± 5	98 ± 5	0.24 ± 0.01	n/a	n/a	58 ± 2
дуплекс 3	G ₂	T ₃	G ₆	T ₆	G ₉	T ₉
k_{op}, c^{-1}	n/d ^c	n/d	EX2	n/a	n/a	n/d
$k'_{cl}, 10^{-4} c^{-1}$	n/d	n/d	EX2	n/a	n/a	n/d
$K'_{eq}, \times 10^6$	n/d	n/d	0.985 ± 0.009	n/a	n/a	n/d
дуплекс 4	G ₂	T ₃	G ₆	T ₆	G ₉	T ₉
k_{op}, c^{-1}	165 ± 31	188 ± 9	EX2	n/a	n/a	686 ± 81
$k'_{cl}, 10^{-4} c^{-1}$	154 ± 31	172 ± 11	EX2	n/a	n/a	1039 ± 124
$K'_{eq}, \times 10^6$	107 ± 9	109 ± 4	0.23 ± 0.01	n/a	n/a	66 ± 1
дуплекс 5	G ₂	T ₃	G ₆	T ₆	G ₉	T ₉
k_{op}, c^{-1}	97 ± 3	153 ± 3	n/a	EX2	EX2	n/a
$k'_{cl}, 10^{-4} c^{-1}$	123 ± 6	159 ± 6	n/a	EX2	EX2	n/a
$K'_{eq}, \times 10^6$	79 ± 3	96 ± 3	n/a	46.1 ± 0.4	0.208 ± 0.004	n/a
дуплекс 6	G ₂	T ₃	G ₆	T ₆	G ₉	T ₉
k_{op}, c^{-1}	134 ± 6	134 ± 3	n/a	EX2	EX2	n/a
$k'_{cl}, 10^{-4} c^{-1}$	204 ± 15	206 ± 7	n/a	EX2	EX2	n/a
$K'_{eq}, \times 10^6$	66 ± 4	65 ± 2	n/a	14.9 ± 0.2	0.17 ± 0.01	n/a
дуплекс 7	G ₂	T ₃	G ₆	T ₆	G ₉	T ₉
k_{op}, c^{-1}	144 ± 5	107 ± 5	n/a	n/d	EX2	n/a
$k'_{cl}, 10^{-4} c^{-1}$	236 ± 15	190 ± 12	n/a	n/d	EX2	n/a
$K'_{eq}, \times 10^6$	61 ± 3	57 ± 2	n/a	n/d	0.85 ± 0.02	n/a
дуплекс 8	G ₂	T ₃	G ₆	T ₆	G ₉	T ₉
k_{op}, c^{-1}	141 ± 5	145 ± 4	n/a	353 ± 15	EX2	n/a
$k'_{cl}, 10^{-4} c^{-1}$	176 ± 10	242 ± 10	n/a	1731 ± 75	EX2	n/a
$K'_{eq}, \times 10^6$	80 ± 4	60 ± 2	n/a	20.4 ± 0.2	0.30 ± 0.03	n/a

^a EX2, константы скоростей k_{op} и k'_{cl} невозможно было извлечь поскольку константа скорости закрытия значительно превышала константу скорости обмена из открытого состояния пар оснований.

^b n/a, не применимо.

^c n/d, константы скоростей k_{op} , k'_{cl} и равновесия K'_{eq} невозможно было получить, так как эффективная константа скорости обмена превышала допустимый диапазон значений, получаемых данным методом.

В канонических Уотсон-Криковских парах $G_8:C_5$, $охоG_8:C_5$ (дуплексы **1**, **2**, **5**, **6**) мы изучили кинетику обмена иминопотоном N1-Н с протонами воды. Для основания $охоG$ иминопотон N7-Н, который экспонирован в большую бороздку ДНК при образовании пары $охоG:C$, был виден в спектрах 1H ЯМР только в отсутствие ДФЭА при контексте наихудшей укладки $C[охоG]T$ (дуплекс **2**) и полностью невиден при контексте наилучшей укладки $A[охоG]G$ (дуплекс **6**) из-за быстрого обмена с протонами воды. Кинетика обмена иминопотоном N1-Н в парах $G_8:C_5$ и $охоG_8:C_5$ с протонами воды для всех четырех дуплексов ДНК показала наличие зависимости типа EX_2 , при котором константа скорости закрытия пар оснований значительно превышает константу скорости обмена из открытого состояния (см. Литературный обзор, *1.4 Динамика открытия-закрытия пар оснований по данным ЯМР*). Таким образом, для этих пар можно было извлечь только кажущиеся константы равновесия процесса открытия – закрытия, но не сами константы скоростей. В контексте наихудшей укладки $C[G/охоG]T$ пара $охоG:C$ оказалась слегка более стабильной, чем пара $G:C$ ($K'_{eq}=0.141$ для $охоG:C$ против $K'_{eq}=0.158$ для $G:C$ (Таблица 3.1)). В контексте наилучшей укладки $A[G/охоG]G$ обе пары: и $охоG:C$ и $G:C$ оказались более стабильными, чем в контексте наихудшей укладки и разница между их константами равновесия K'_{eq} оказалась более ярко выраженной ($K'_{eq}=0.048$ для $охоG:C$ против $K'_{eq}=0.118$ для $G:C$ (Таблица 3.1)). Таким образом, даже если наличие пары $охоG:C$ дестабилизирует дуплексы ДНК (что подтверждается в работе [148] и нашими результатами, представленными ниже), это происходит не из-за того, что пара $охоG:C$ менее стабильна, чем пара $G:C$, то есть дестабилизация дуплексов происходит не на уровне локальной пары оснований.

Ситуация кардинально отличалась для неправильных пар $G:A$ и $охоG:A$. Иминопотоны N1-Н основания G_8 в парах $G:A$ (дуплексы **3** и **7**) из-за повышенной доступности иминопотоном к растворителю и быстрого обмена с протонами растворителя не были видны в спектрах 1H ЯМР. Единственными иминопотонами, чей обмен с протонами воды удалось измерить в дуплексах **3** и **7** при различных концентрациях ДФЭА, оказались иминопотон N1-Н основания G_6 в дуплексе **3** и иминопотоны оснований G_2 , T_3 и G_9 в дуплексе **7** (Рисунки 3.12, 3.14, Таблица 3.2). С другой стороны иминопотон N7-Н основания $охоG$, участвующий в образовании Хугстиновской пары $охоG:A$, был хорошо виден в спектрах 1H ЯМР для обоих дуплексов: **4** и **8**. Кинетика обмена иминопотоном N7-Н в парах $охоG:A$ с протонами воды (Рисунок 3.10) позволила нам извлечь и константу скорости открытия k_{op} , и константу скорости закрытия k'_{cl} , и константу равновесия K'_{eq} (Таблица 3.1). Константа скорости открытия пары $охоG:A$ была ожидаемо выше для случая наихудшей укладки $C[охоG]T$ по сравнению с наилучшей укладкой $A[охоG]G$ (примерно в 2.4 раза). Однако неожиданно константа скорости

закрытия пары охoG:A в случае наихудшей укладки также оказалась выше примерно в 4.6 раз, чем в контексте наилучшей укладки, что делает пару охoG:A в целом в 1.9 раз более стабильной в контексте C[охoG]T, чем в A[охoG]G. Возможно, что в случае контекста A[охoG]G раскрытие пары охoG:A позволяет граничащим с охoG основаниям A и G формировать стэкинг-взаимодействия поперек зазора, образованного выворотом охoG из спирали ДНК, и препятствовать возврату охoG в исходное положение в спирали ДНК. Примечательно, что по сравнению с парами охoG:C равновесие в парах охoG:A смещено на 3–4 порядка в сторону открытого состояния.

3.4 Термодинамические параметры плавления дуплексов ДНК

Литературные данные калориметрии указывают в целом на эффект дестабилизации двухцепочечной ДНК при наличии пары охoG:C по сравнению с парой G:C [148]. Мы оценили термическую стабильность ДНК дуплексов **1-8** по температурной зависимости химических сдвигов, не обменивающихся с растворителем протонов метильной группы C5 тиминных оснований, что также является стандартной процедурой определения температуры плавления дуплексов T_m [202] – температуры, при которой концентрация одиночных и двойных цепей ДНК совпадают. Для каждого дуплекса метильные группы оснований T₃ и T₆/T₉ показали наличие двух спектрально разрешенных сигнала ¹H ЯМР в характерном диапазоне 1-2 м.д. (Рисунки 3.15-3.16) и для одного из двух сигналов строилась температурная зависимость (Рисунок 3.17). Аппроксимация температурной зависимости делалась в рамках модели двух состояний “всё или ничего” [203], при которой учитываются только состояния дуплекса в полностью расплавленном виде (до олигонуклеотидов) и в полностью нерасплавленном виде. Стандартная процедура аппроксимации включает в себя преобразование получаемой температурной зависимости химического сдвига в температурную зависимость доли одиночных цепей ДНК, находящихся в дуплексном состоянии, α . Зависимость α представляет собой сигмоидоподобную функцию и может быть аппроксимирована выражением $\alpha(T) = 1 - \frac{1}{1 + e^{-A(T - T_m)}}$, где T – температура в Кельвинах, A и T_m (температура плавления дуплекса) – параметры аппроксимации. Однако данная процедура преобразования требует точно определенных параметров левой и правой базовых линий зависимости хим. сдвига от T. Мы использовали альтернативный подход, минуя данное преобразование, и аппроксимировали сразу зависимость хим. сдвига от температуры уравнением (18):

$$\text{chem. shift}(T) = \frac{1}{1 + e^{-A(T-T_m)}} (\Delta aT + \Delta b) + a_{\text{left}}T + b_{\text{left}} \quad (18)$$

где $\Delta a = a_{\text{right}} - a_{\text{left}}$, $\Delta b = b_{\text{right}} - b_{\text{left}}$, $(a_{\text{right}}T + b_{\text{right}})$ и $(a_{\text{left}}T + b_{\text{left}})$ – линейные зависимости правой и левой базовых линий. Следует отметить, что выражение для $\alpha(T)$ остается в силе, а параметры A и T_m в этом выражении такие же, как в уравнении (18). Таким образом, аппроксимация зависимости хим. сдвига от температуры автоматически дает зависимость $\alpha(T)$. Выражение для энтальпии плавления дуплекса можно выразить через зависимость $\alpha(T)$: $\Delta H = 6RT_m^2 (\partial\alpha / \partial T)_{T=T_m} = -\frac{3A}{2}RT_m^2$ [203]. Когда значение ΔH известно и предполагается, что оно не зависит от температуры, можно рассчитать ΔG° и ΔS° . Интегральная форма уравнения Вант-Гоффа дает выражение для константы равновесия $K(T) = K(T_m) \times e^{-\frac{\Delta H}{R}(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m})}$, и, следовательно, выражение для свободной энергии Гиббса $\Delta G^\circ = -RT \ln K(T) = -RT \ln K(T_m) + \Delta H \left(1 - \frac{T}{T_m}\right)$. Соответствующее изменение энтропии можно рассчитать как $T\Delta S^\circ = \Delta H^\circ - \Delta G^\circ$. Полученные значения T_m , ΔH , ΔG° и ΔS° для исследуемых дуплексов представлены в таблице 3.3.

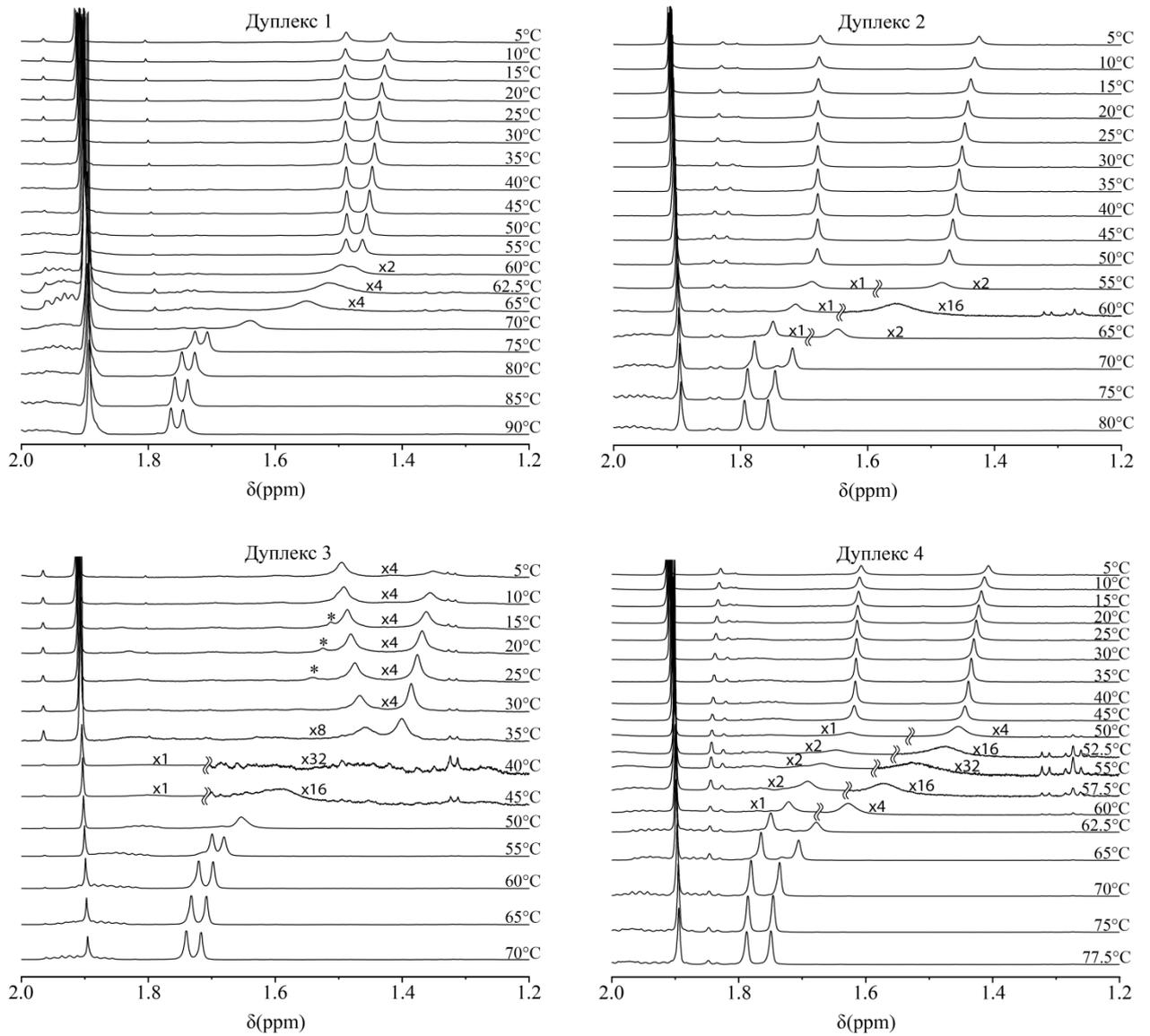


Рисунок 3.15 – Температурные зависимости сигналов ^1H ЯМР метильных протонов C5 тиминных оснований ДНК дуплексов 1-4. Звездочки указывают на остаточные сигналы от протонов C5 тиминных оснований, соответствующие состоянию олигонуклеотида.

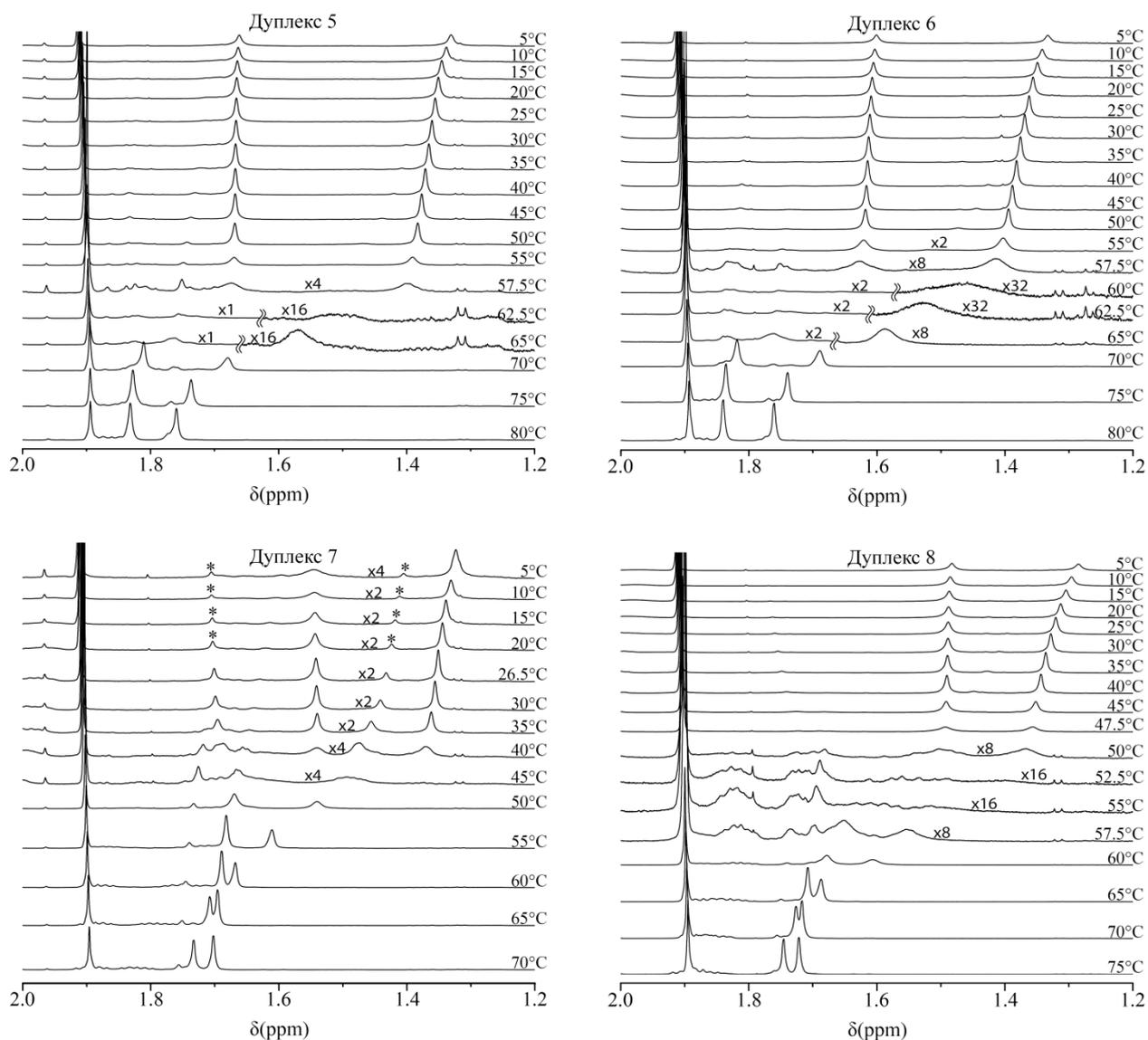


Рисунок 3.16 – Температурные зависимости сигналов ^1H ЯМР метильных протонов С5 тиминных оснований ДНК дуплексов 5-8. Звездочки указывают на остаточные сигналы от протонов С5 тиминных оснований, соответствующие состоянию олигонуклеотида.

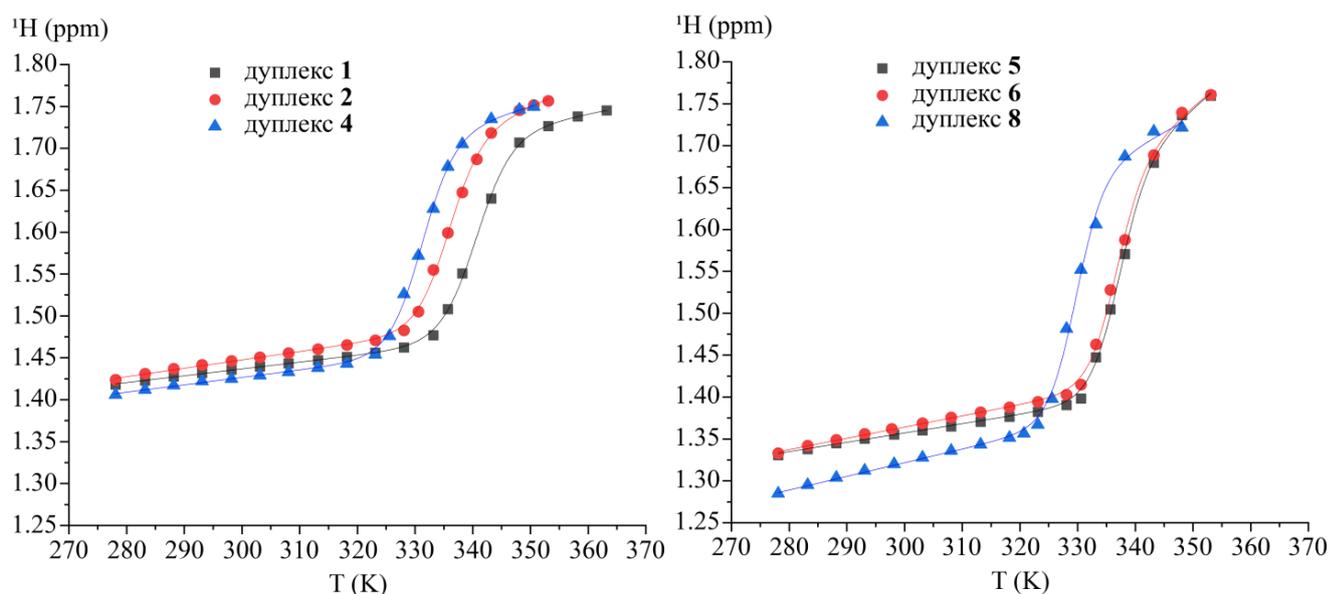


Рисунок 3.17 – Температурные зависимости химического сдвига метильных протонов тиминных оснований для дуплексов ДНК с плохой укладкой (слева) и хорошей укладкой (справа) G₈/охоG₈. Сплошные кривые показывают аппроксимацию данных, представленных на рисунках 3.15-3.16, уравнением (18).

Таблица 3.3 Термодинамические данные плавления дуплексов ДНК, полученные методом ЯМР.

Дуплексы	T_m , К	ΔH , кДж·моль ⁻¹	ΔG°_{298} , кДж·моль ⁻¹	ΔS°_{298} , кДж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹
1	340.6 ± 0.2	466 ± 15	74 ± 2	1.32 ± 0.06
2	335.7 ± 0.4	491 ± 22	71 ± 3	1.41 ± 0.08
4	331.1 ± 0.3	478 ± 19	63 ± 2	1.39 ± 0.07
5	336.9 ± 0.4	556 ± 30	80 ± 4	1.60 ± 0.11
6	336.4 ± 0.3	575 ± 33	81 ± 4	1.66 ± 0.12
8	329.6 ± 0.4	565 ± 41	70 ± 4	1.66 ± 0.15

В целом, наши результаты термодинамики плавления ДНК дуплексов согласуются с калориметрическими данными [148]: наличие в дуплексе пары охоG:C по сравнению с парой G:C немного понижает его термическую стабильность, в то время как наличие охоG:A пары приводит к ещё большей дестабилизации дуплекса (Рисунок 3.17, Таблица 3.3), что видно по соответствующим величинам T_m и ΔG°_{298} . Однако мы обнаружили, что величины T_m и ΔG°_{298} для дуплексов **5** и **6**, которые содержат пары G:C и охоG:C в контексте хорошей укладки, соответственно, совпадают в пределах ошибки определения этих величин. Следует отметить, что в работе [148] калориметрические данные были получены только в дуплексах ДНК с контекстом плохой укладки C[G/охоG]C, поэтому вполне вероятно, что наличие охоG:C пары не всегда приводит к дестабилизации ДНК. Интересно, что значения ΔH для групп дуплексов с плохой укладкой (**1**, **2** и **4**) и хорошей укладкой (**5**, **6** и **8**) в пределах ошибки равны внутри каждой группы и отличаются между группами на величину ~90 кДж·моль⁻¹. В дуплексах **3** и **7** температурная зависимость линий ¹H ЯМР от метильных групп тиминных оснований носила

сложный характер: ниже $\sim 40^\circ\text{C}$ реализовывался режим медленного обмена (т.е. переход между расплавленным и нерасплавленным состояниями дуплекса происходил медленнее, чем время детектирования ЯМР), в то время как выше этой температуры проявлялся режим быстрого обмена. Эта особенность не позволила для образцов дуплексов **3** и **7** сделать простое извлечение термодинамических параметров. С другой стороны, величины констант скоростей обмена иминопотонов с протонами воды (Рисунки 3.12, 3.14, Таблицы 3.1-3.2) для дуплексов **3** и **7** также сильно отличаются от величин, полученных для остальных дуплексов ДНК. Таким образом, наши результаты согласуются с ожидаемой малой стабильностью дуплексов **3** и **7** ввиду наличия пар G:A.

В общем и целом, наши данные показывают, что дестабилизирующий эффект наличия пары охoG:C в дуплексе при условии плохой укладки C[G/охoG]T нельзя объяснить тем, что пара открывается легче по сравнению с неповрежденной парой G:C. Однако равновесия остальных пар оснований, находящихся в центральной части дуплекса **2** (пары G₆:C₇ и T₉:A₄), являются более смещенными в сторону открытого состояния по сравнению с дуплексом **1**, тогда как равновесия околоконцевых пар оснований (пары G₂:C₁₁ и T₃:A₁₀) являются схожими для обоих дуплексов (Таблица 3.2). Мы предполагаем, что локальные конформационные изменения, вызванные наличием пары охoG:C, такие как изменение конформации фосфатной группы с VI на VII, которое уменьшает стерическое отталкивание между O⁸-O^{5'} [143, 144], могут распространяться на соседние нуклеотиды и способствовать коллективному открытию их пар оснований, что в свою очередь дестабилизирует весь дуплекс ДНК. В случае хорошей укладки A[G/охoG]G наличие пары охoG:C не приводит к дестабилизации дуплекса, указывая на то, что такая укладка может компенсировать эффекты стерического отталкивания, связанные с наличием заместителя O⁸.

3.5 Заключение

Результаты работы имеют существенное значение для понимания механизмов раннего распознавания 8-оксогуанина гликозилазами ДНК. Маловероятно, что охoG в паре с C подвергается захвату гликозилазы, будучи вывернутым из спирали ДНК, поскольку даже несмотря на термодинамическую дестабилизацию в ДНК, вносимую наличием охoG, даже в случае плохой укладки охoG пара охoG:C открывается не легче, чем нормальная пара G:C. Таким образом, OGG1 и Fpg должны активно задействовать свои метастабильные конформеры для принудительного выворачивания охoG из спирали ДНК в активные сайты ферментов. С другой стороны, по нашим данным охoG оказывается на несколько порядков более доступным

во внеспиральном положении, когда находится напротив А по сравнению с С, что может способствовать внеспиральному распознаванию повреждения охОГ гликозилазами MutY/MUTYH. Таким образом, предположительно ключевым этапом раннего распознавания 8-оксогуанина ферментами MutY/MUTYH может являться его захват во внеспиральном положении.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Изучение особенностей структуры и организации белка RL2, обладающего противоопухолевой активностью, в растворе с помощью методов магнитного резонанса позволило установить, что при физиологических значениях pH и ионной силы RL2 преимущественно находится в водорастворимых агрегатах, тогда как при кислых значениях pH RL2 преимущественно находится в виде отдельных белковых молекул.

2. Методами многомерной спектроскопии ЯМР показано, что RL2 является внутренне неупорядоченным белком. Установлено, что N-концевой участок белка (1-43 а.о.), который важен для проявления противоопухолевой активности RL2, является наиболее упорядоченным. В участке на N-конце (1-63 а.о.) наблюдается остаточная третичная структура RL2 по данным ЯМР парамагнитного усиления релаксации.

3. Продемонстрирована успешная применимость спиновой метки на основе нитроксильного радикала с тетраэтильными заместителями для проведения длительных экспериментов ЭПР в живых клетках человека на биомолекулах при их микромолярных концентрациях. Установлено, что основным путем проникновения RL2 в клетки человека является эндоцитоз, при котором белок преимущественно проникает в виде агрегатов, которые распадаются на отдельные молекулы внутри клеток.

4. Показано, что модифицированный в работе протокол ЯМР CLEANEX-PM позволяет измерять константы скорости обмена иминопотонов ДНК с протонами воды и может успешно применяться с использованием катализируемого протонного обмена для изучения динамики процесса открытия-закрытия пар оснований ДНК. На основании данных динамики открытия-закрытия пар показано, что основание 8-оксогуанин оказывается на 3-4 порядка более доступным в своем внеспиральном положении в ДНК, когда находится напротив аденина по сравнению с тем, когда 8-оксогуанин напротив цитозина. При этом, будучи напротив цитозина, доступность 8-оксогуанина во внеспиральном положении в ДНК оказывается даже меньше доступности гуанина во внеспиральном положении, когда гуанин напротив цитозина.

5. Дестабилизирующий эффект наличия пары 8-оксогуанин – цитозин в дуплексах ДНК не происходит на уровне индивидуальной пары оснований, а является следствием изменения стабильности пар оснований соседних с парой 8-оксогуанин – цитозин. Показано, что наличие пары 8-оксогуанин – цитозин в ДНК не всегда приводит к её дестабилизации.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АББРЕВИАТУР И ТЕРМИНОВ

IDP, IDR – Intrinsically Disordered Proteins, Intrinsically Disordered Regions – внутренне неупорядоченные белки, неупорядоченные участки

RL1, RL2 – Recombinant Lactaprin analogs – рекомбинантные аналоги лактаприна

A, C, G, T, ohoG – азотистые основания: аденин, цитозин, гуанин, тимин, 8-оксо-7,8-дигидрогуанин

Ala, Arg, Asn, Asp, Val, His, Gly, Gln, Glu, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Tyr, Thr, Trp, Phe, Cys – аминокислоты: аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, валин, гистидин, глицин, глутамин, глутаминовая кислота, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, пролин, серин, тирозин, треонин, триптофан, фенилаланин, цистеин.

OGG1, FPG, UNG – 8-oxoguanine-DNA glycosylase, Formamidopyrimidine-DNA glycosylase, Uracil-DNA glycosylase – 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза, Формамидопиримидин-ДНК-гликозилаза, Урацил-ДНК-гликозилаза

MutY, MUTUH – mutY DNA glycosylase – бактериальная и человеческая MutY-ДНК-гликозилаза

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

УФ – ультрафиолетовое излучение

T_1 , T_2 – время спин-решеточной релаксации, время спин-спиновой релаксации

R_1 , R_2 – константы скорости: спин-решеточной релаксации, спин-спиновой релаксации

R_{1w} , R_{ex} – константа скорости спин-решеточной релаксации протонов воды, вклад в константу скорости спин-спиновой релаксации, обусловленный процессами обмена

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

B_0 , B_1 – напряженность постоянного магнитного поля, напряженность переменного магнитного поля

k_{ex} – константа скорости обмена

NOESY, EXSY – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy / EXchange Spectroscopy – спектроскопия ЯМР на основе ядерного эффекта Оверхаузера / на основе эффектов обмена

HSQC – Hetero-Nuclear Single-Quantum Coherence – гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия ЯМР

TOCSY – TOtal Correlation Spectroscopy – полная корреляционная спектроскопия ЯМР

NOE – Nuclear Overhauser Effect – ядерный эффект Оверхаузера

CLEANEX-PM – phase-modulated CLEAN chemical EXchange – спектроскопия ЯМР на основе фазово-модулированного чистого химического обмена

A549 – клетки аденокарциномы легких человека

MPT – магнитно-резонансная томография

RSA – рентгеноструктурный анализ

MPP – малоугловое рентгеновское рассеяние

ДОВ – дисперсия оптического вращения

КД – круговой дихроизм

PRE – Paramagnetic Relaxation Enhancement – парамагнитное усиление релаксации

Γ_1 , Γ_2 – вклады в константы скоростей спин-решеточной и спин-спиновой релаксации ядерных спинов, обусловленные эффектом PRE

СИ – международная система единиц

CSA, DD – Chemical Shift Anisotropy, Dipole-Dipole interaction – анизотропия химического сдвига, диполь-дипольное взаимодействие

τ_C , τ_M , τ_e – время корреляции флуктуаций магнитного поля, время корреляции вращений белка как целого, эффективное время корреляции, задаваемое вращениями вектора связи NH в молекулярной системе координат

ω_i – ларморовская частота ядра i

$J(\omega)$ – функция спектральной плотности

$J_{SB}(\omega)$ – функция спектральной плотности для изотропного вращения вектора, соединяющего наблюдаемое ядро ^1H и неспаренный электрон

S^2 – квадрат параметра порядка

MTSL – S-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methyl methanesulfonothioate – S-(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-2,5-дигидро-1H-пиррол-3-илметиловыйэфир) метантио-сульфоновой кислоты

INEPT – Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer – метод в спектроскопии ЯМР усиления сигнала нечувствительных ядер за счет переноса поляризации

I_{para} , I_{dia} – высоты сигнала ^1H в парамагнитном и диамагнитном образце

СТВ – сверхтонкое взаимодействие

PELDOR, DEER – Pulse Electron-electron DOuble Resonance, Double Electron-Electron Resonance – 3-ех импульсный электрон-электронный двойной резонанс, 4-ех импульсный двойной электрон-электронный резонанс

k_{op} , k_{cl} – константы скорости открытия и закрытия, соответственно, пар азотистых оснований

k_b – константа скорости переноса иминопрона от изолированного нуклеотида к акцептору протонов

ТСЕР – Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride – трис-(2-карбоксиитил)-фосфин гидрохлорид

DSS – Sodium 4,4-Dimethyl-2-Silapentane-1-Sulfonate – моноватриевая соль 4,4-диметил-4-силапентан-1-сульфоновой кислоты

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis – электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия

PBS – Phosphate-Buffered Saline – натрий фосфатный буфер

а.о. – аминокислотный остаток

м.д. – миллионная доля

ДФЭА, DFEA – 2,2-Difluoroethylamine – 2,2-дифторэтиламин

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium – культуральная среда Игла, модифицированная Дульбекко

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] **Crenshaw C. M.** Hidden in plain sight: subtle effects of the 8-oxoguanine lesion on the structure, dynamics, and thermodynamics of a 15-base pair oligodeoxynucleotide duplex / Crenshaw C. M., Wade J. E., Arthanari H. et al. // *Biochemistry*. – 2011. – Oct 4. – Vol. 50, № 39. – P. 8463.
- [2] **Every A. E.** Opening dynamics of 8-oxoguanine in DNA / Every A. E., Russu I. M. // *Journal of Molecular Recognition*. – 2013. – 2013-04. – Vol. 26, № 4. – P. 175.
- [3] **Griffin M. C. A.** A ¹H-n.m.r. study of casein micelles / Griffin M. C. A., Roberts G. C. K. // *Biochemical Journal*. – 1985. – Vol. 228, № 1. – P. 273.
- [4] **Lucey J. A.** Perspectives on casein interactions / Lucey J. A., Horne D. S. // *International Dairy Journal*. – 2018. – 2018/10/01/. – Vol. 85. – P. 56.
- [5] **Thorn D. C.** Casein structures in the context of unfolded proteins / Thorn D. C., Ecroyd H., Carver J. A. et al. // *International Dairy Journal*. – 2015. – 2015/07/01/. – Vol. 46. – P. 2.
- [6] **Petrova S. Y.** Structure and biological functions of milk caseins / Petrova S. Y., Khlgatian S. V., Emelyanova O. Y. et al. // *Russian Open Medical Journal*. – 2022. – Vol. 11, № 2. – P. 209.
- [7] **Horne D. S.** Casein Interactions: Casting Light on the Black Boxes, the Structure in Dairy Products / Horne D. S. // *International Dairy Journal*. – 1998. – 1998/03/01/. – Vol. 8, № 3. – P. 171.
- [8] **Semenov D. V.** Recombinant Analogs of a Novel Milk Pro-Apoptotic Peptide, Lactaptin, and Their Effect on Cultured Human Cells / Semenov D. V., Fomin A. S., Kuligina E. V. et al. // *The Protein Journal*. – 2010. – 2010/04/01. – Vol. 29, № 3. – P. 174.
- [9] **Rasmussen L. K.** The multimeric structure and disulfide-bonding pattern of bovine kappa-casein / Rasmussen L. K., Højrup P., Petersen T. E. // *Eur J Biochem*. – 1992. – Jul 1. – Vol. 207, № 1. – P. 215.
- [10] **Rasmussen L. K.** Disulphide-linked caseins and casein micelles / Rasmussen L. K., Johnsen L. B., Tsiora A. et al. // *International Dairy Journal*. – 1999. – 1999/03/01/. – Vol. 9, № 3. – P. 215.
- [11] **Wang Y.** Synthesis of Unnatural Amino Acids Functionalized with Sterically Shielded Pyrroline Nitroxides / Wang Y., Paletta J. T., Berg K. et al. // *Organic Letters*. – 2014. – 2014/10/17. – Vol. 16, № 20. – P. 5298.
- [12] **Jagtap A. P.** Sterically shielded spin labels for in-cell EPR spectroscopy: Analysis of stability in reducing environment / Jagtap A. P., Krstic I., Kunjir N. C. et al. // *Free Radical Research*. – 2015. – 2015/01/02. – Vol. 49, № 1. – P. 78.
- [13] **Karthikeyan G.** A Bioresistant Nitroxide Spin Label for In-Cell EPR Spectroscopy: In Vitro and In Oocytes Protein Structural Dynamics Studies / Karthikeyan G., Bonucci A., Casano G. et al. // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2018. – Vol. 57, № 5. – P. 1366.

- [14] **Paletta J. T.** Synthesis and Reduction Kinetics of Sterically Shielded Pyrrolidine Nitroxides / Paletta J. T., Pink M., Foley B. et al. // *Organic Letters*. – 2012. – 2012/10/19. – Vol. 14, № 20. – P. 5322.
- [15] **Eigen M.** Proton transfer, acid-base catalysis, and enzymatic hydrolysis. Part I: Elementary processes / Eigen M. // *Angewandte Chemie International Edition*. – 1964. – 1964-01. – Vol. 3, № 1. – P. 1.
- [16] **Nonin S.** Terminal Base Pairs of Oligodeoxynucleotides: Imino Proton Exchange and Fraying / Nonin S., Leroy J.-L., Gueron M. // *Biochemistry*. – 1995. – 1995/08/22. – Vol. 34, № 33. – P. 10652.
- [17] **Banavali N. K.** Free Energy and Structural Pathways of Base Flipping in a DNA GCGC Containing Sequence / Banavali N. K., MacKerell A. D. // *Journal of Molecular Biology*. – 2002. – 2002/05/24/. – Vol. 319, № 1. – P. 141.
- [18] **Várnai P.** Opening Mechanism of G·T/U Pairs in DNA and RNA Duplexes: A Combined Study of Imino Proton Exchange and Molecular Dynamics Simulation / Várnai P., Canalia M., Leroy J.-L. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2004. – 2004/11/01. – Vol. 126, № 44. – P. 14659.
- [19] **Mori S.** Water exchange filter (WEX filter) for nuclear magnetic resonance studies of macromolecules / Mori S., O'Neil Johnson M., Berg J. M. et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 1994. – 1994-12-01. – Vol. 116, № 26. – P. 11982.
- [20] **Mori S.** Water exchange filter with improved sensitivity (WEX II) to study solvent-exchangeable protons. Application to the consensus zinc finger peptide CP-1 / Mori S., Abeygunawardana C., van Zijl P. C. M. et al. // *Journal of Magnetic Resonance. Series B*. – 1996. – 1996-01. – Vol. 110, № 1. – P. 96.
- [21] **Gemmecker G.** Measurement of fast proton exchange rates in isotopically labeled compounds / Gemmecker G., Jahnke W., Kessler H. // *Journal of the American Chemical Society*. – 1993. – 1993-12-01. – Vol. 115, № 24. – P. 11620.
- [22] **Macura S.** Separation and suppression of coherent transfer effects in two-dimensional NOE and chemical exchange spectroscopy / Macura S., Wüthrich K., Ernst R. R. // *Journal of Magnetic Resonance*. – 1982. – 1982-02-01. – Vol. 46, № 2. – P. 269.
- [23] **Hwang T.-L.** Application of Phase-Modulated CLEAN chemical EXchange spectroscopy (CLEANEX-PM) to detect water–protein proton exchange and intermolecular NOEs / Hwang T.-L., Mori S., Shaka A. J. et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 1997. – 1997-07-02. – Vol. 119, № 26. – P. 6203.
- [24] **Hwang T.-L.** Accurate quantitation of water-amide proton exchange rates using the phase-modulated CLEAN chemical EXchange (CLEANEX-PM) approach with a Fast-HSQC (FHSQC)

- detection scheme / Hwang T.-L., van Zijl P. C. M., Mori S. // *Journal of Biomolecular NMR*. – 1998. – 1998-02. – Vol. 11, № 2. – P. 221.
- [25] **Lemieux R. U.** How Emil Fischer was led to the lock and key concept for enzyme specificity / Lemieux R. U., Spohr U. // *Adv Carbohydr Chem Biochem*. – 1994. – Vol. 50. – P. 1.
- [26] **Fischer E.** Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme / Fischer E. // *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. – 1894. – Vol. 27, № 3. – P. 2985.
- [27] **Mirsky A. E.** On the Structure of Native, Denatured, and Coagulated Proteins / Mirsky A. E., Pauling L. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1936. – Vol. 22, № 7. – P. 439.
- [28] **Wu H.** Studies on denaturation of proteins XIII. A theory of denaturation. / Wu H. // *Chinese Journal of Physiology*. – 1931. – Vol. 5, № 4. – P. 321.
- [29] **Northrop J. H.** CRYSTALLINE PEPSIN : I. ISOLATION AND TESTS OF PURITY / Northrop J. H. // *Journal of General Physiology*. – 1930. – Vol. 13, № 6. – P. 739.
- [30] **Karush F.** Heterogeneity of the Binding Sites of Bovine Serum Albumin / Karush F. // *Journal of the American Chemical Society*. – 1950. – 1950/06/01. – Vol. 72, № 6. – P. 2705.
- [31] **Koshland Jr D.** Enzyme flexibility and enzyme action / Koshland Jr D. // *Journal of cellular and comparative physiology*. – 1959. – Vol. 54, № S1. – P. 245.
- [32] **Koshland D. E.** Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis / Koshland D. E. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1958. – Vol. 44, № 2. – P. 98.
- [33] **McDonald R. C.** Yeast hexokinase in solution exhibits a large conformational change upon binding glucose or glucose 6-phosphate / McDonald R. C., Steitz T. A., Engelman D. M. // *Biochemistry*. – 1979. – Jan 23. – Vol. 18, № 2. – P. 338.
- [34] **Bennett W. S.** Glucose-induced conformational change in yeast hexokinase / Bennett W. S., Jr., Steitz T. A. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1978. – Oct. – Vol. 75, № 10. – P. 4848.
- [35] **Koshland D. E.** Crazy, but correct / Koshland D. E. // *Nature*. – 2004. – Nov 25. – Vol. 432, № 7016. – P. 447.
- [36] **Grizzuti K.** Conformation of the Phosphoprotein, Phosvitin / Grizzuti K., Perlmann G. E. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1970. – 1970/05/25/. – Vol. 245, № 10. – P. 2573.
- [37] **Vogel H. J.** Structure of hen phosvitin: a phosphorus-31 NMR, proton NMR, and laser photochemically induced dynamic nuclear polarization proton NMR study / Vogel H. J. // *Biochemistry*. – 1983. – 1983/02/01. – Vol. 22, № 3. – P. 668.
- [38] **Arnone A.** A High Resolution Structure of an Inhibitor Complex of the Extracellular Nuclease of *Staphylococcus aureus*: I. EXPERIMENTAL PROCEDURES AND CHAIN TRACING / Arnone A., Bier C. J., Cotton F. A. et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1971. – 1971/04/10/. – Vol. 246, № 7. – P. 2302.

- [39] **Bloomer A. C.** Protein disk of tobacco mosaic virus at 2.8 Å resolution showing the interactions within and between subunits / Bloomer A. C., Champness J. N., Bricogne G. et al. // *Nature*. – 1978. – Nov 23. – Vol. 276, № 5686. – P. 362.
- [40] **Aviles F. J.** The conformation of histone H5. Isolation and characterisation of the globular segment / Aviles F. J., Chapman G. E., Kneale G. G. et al. // *Eur J Biochem*. – 1978. – Aug 1. – Vol. 88, № 2. – P. 363.
- [41] **Riek R.** NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231) / Riek R., Hornemann S., Wider G. et al. // *Nature*. – 1996. – Jul 11. – Vol. 382, № 6587. – P. 180.
- [42] **Fletcher C. M.** The interaction of eIF4E with 4E-BP1 is an induced fit to a completely disordered protein / Fletcher C. M., Wagner G. // *Protein Sci*. – 1998. – Jul. – Vol. 7, № 7. – P. 1639.
- [43] **Kriwacki R. W.** Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity / Kriwacki R. W., Hengst L., Tennant L. et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1996. – Oct 15. – Vol. 93, № 21. – P. 11504.
- [44] **Harper J. W.** The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases / Harper J. W., Adami G. R., Wei N. et al. // *Cell*. – 1993. – Nov 19. – Vol. 75, № 4. – P. 805.
- [45] **Fletcher C. M.** 4E binding proteins inhibit the translation factor eIF4E without folded structure / Fletcher C. M., McGuire A. M., Gingras A. C. et al. // *Biochemistry*. – 1998. – Jan 6. – Vol. 37, № 1. – P. 9.
- [46] **Norris E. H.** Alpha-synuclein: normal function and role in neurodegenerative diseases / Norris E. H., Giasson B. I., Lee V. M. // *Curr Top Dev Biol*. – 2004. – Vol. 60. – P. 17.
- [47] **Goedert M.** NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein / Goedert M. // *Science*. – 2015. – Aug 7. – Vol. 349, № 6248. – P. 1255555.
- [48] **Wang C.** Versatile Structures of α -Synuclein / Wang C., Zhao C., Li D. et al. // *Front Mol Neurosci*. – 2016. – Vol. 9. – P. 48.
- [49] **Kolarova M.** Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease / Kolarova M., García-Sierra F., Bartos A. et al. // *Int J Alzheimers Dis*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 731526.
- [50] **Stefanoska K.** Alzheimer's disease: Ablating single master site abolishes tau hyperphosphorylation / Stefanoska K., Gajwani M., Tan A. R. P. et al. // *Science Advances*. – 2022. – Vol. 8, № 27. – P. eabl8809.
- [51] **Tompa P.** Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap / Tompa P. // *Trends Biochem Sci*. – 2012. – Dec. – Vol. 37, № 12. – P. 509.
- [52] **Dyson H. J.** Intrinsically unstructured proteins and their functions / Dyson H. J., Wright P. E. // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2005. – 2005/03/01. – Vol. 6, № 3. – P. 197.

- [53] **Tompa P.** The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones / Tompa P., Csermely P. // *Faseb j.* – 2004. – Aug. – Vol. 18, № 11. – P. 1169.
- [54] **Fukuchi S.** IDEAL: Intrinsically Disordered proteins with Extensive Annotations and Literature / Fukuchi S., Sakamoto S., Nobe Y. et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – Jan. – Vol. 40, № Database issue. – P. D507.
- [55] **Uversky V. N.** Understanding protein non-folding / Uversky V. N., Dunker A. K. // *Biochim Biophys Acta.* – 2010. – Jun. – Vol. 1804, № 6. – P. 1231.
- [56] **Romero P.** Identifying disordered regions in proteins from amino acid sequence / Romero P., Obradovic Z., Kissinger C. et al. // *Proceedings of International Conference on Neural Networks (ICNN'97).* – 1997. – Vol. 1 – P. 90.
- [57] **McMeekin T. L.** MILK PROTEINS† / McMeekin T. L. // *Journal of Food Protection.* – 1952. – 1952/03/01/. – Vol. 15, № 2. – P. 57.
- [58] **Halwer M.** Light-scattering study of effect of electrolytes on alpha- and beta-casein solutions / Halwer M. // *Arch Biochem Biophys.* – 1954. – Jul. – Vol. 51, № 1. – P. 79.
- [59] **Uversky V. N.** Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? / Uversky V. N., Gillespie J. R., Fink A. L. // *Proteins.* – 2000. – Nov 15. – Vol. 41, № 3. – P. 415.
- [60] **Kay B. K.** The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains / Kay B. K., Williamson M. P., Sudol M. // *Faseb j.* – 2000. – Feb. – Vol. 14, № 2. – P. 231.
- [61] **Cubellis M. V.** Properties of polyproline II, a secondary structure element implicated in protein–protein interactions / Cubellis M. V., Caillez F., Blundell T. L. et al. // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* – 2005. – Vol. 58, № 4. – P. 880.
- [62] **Рогожин В.** Биохимия сельскохозяйственной продукции. СПб.: Гиорд. / Рогожин В., Рогожина Т., 2014. СПб.: Гиорд.
- [63] **Waugh D. F.** κ-Casein and the Stabilization of Casein Micelles / Waugh D. F., von Hippel P. H. // *Journal of the American Chemical Society.* – 1956. – 1956/09/01. – Vol. 78, № 18. – P. 4576.
- [64] **Farrell H. M.** Environmental influences on bovine kappa-casein: reduction and conversion to fibrillar (amyloid) structures / Farrell H. M., Jr., Cooke P. H., Wickham E. D. et al. // *J Protein Chem.* – 2003. – Apr. – Vol. 22, № 3. – P. 259.
- [65] **Thorn D. C.** Amyloid Fibril Formation by Bovine Milk α_2 -Casein Occurs under Physiological Conditions Yet Is Prevented by Its Natural Counterpart, α_1 -Casein / Thorn D. C., Ecroyd H., Sunde M. et al. // *Biochemistry.* – 2008. – 2008/03/01. – Vol. 47, № 12. – P. 3926.

- [66] **Thorn D. C.** Amyloid Fibril Formation by Bovine Milk κ -Casein and Its Inhibition by the Molecular Chaperones α S- and β -Casein / Thorn D. C., Meehan S., Sunde M. et al. // *Biochemistry*. – 2005. – 2005/12/01. – Vol. 44, № 51. – P. 17027.
- [67] **Dalgleish D. G.** Size-related differences in bovine casein micelles / Dalgleish D. G., Horne D. S., Law A. J. R. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 1989. – 1989/06/27/. – Vol. 991, № 3. – P. 383.
- [68] **Sullivan R. A.** Distribution of Kappa-Casein in Skim Milk / Sullivan R. A., Fitzpatrick M. M., Stanton E. K. // *Nature*. – 1959. – 1959/02/01. – Vol. 183, № 4661. – P. 616.
- [69] **Walstra P.** Effect of chymosin action on the hydrodynamic diameter of casein micelles / Walstra P., Bloomfield V. A., Wei G. J. et al. // *Biochim Biophys Acta*. – 1981. – Jul 28. – Vol. 669, № 2. – P. 258.
- [70] **McGann T. C.** Composition and size distribution of bovine casein micelles / McGann T. C., Donnelly W. J., Kearney R. D. et al. // *Biochim Biophys Acta*. – 1980. – Jun 19. – Vol. 630, № 2. – P. 261.
- [71] **Bouguyon E.** Disulphide bonds in casein micelle from milk / Bouguyon E., Beauvallet C., Huet J. C. et al. // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2006. – May 5. – Vol. 343, № 2. – P. 450.
- [72] **Rasmussen L. K.** Human α s1-casein: purification and characterization / Rasmussen L. K., Due H. A., Petersen T. E. // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 1995. – 1995/05/01/. – Vol. 111, № 1. – P. 75.
- [73] **Nekipelaya V. V.** Lactaptin is a human milk protein inducing apoptosis of MCF-7 adenocarcinoma cells / Nekipelaya V. V., Semenov D. V., Potapenko M. O. et al. // *Dokl Biochem Biophys*. – 2008. – Mar-Apr. – Vol. 419. – P. 58.
- [74] **Koval O. A.** A novel pro-apoptotic effector lactaptin inhibits tumor growth in mice models / Koval O. A., Fomin A. S., Kaledin V. I. et al. // *Biochimie*. – 2012. – 2012/12/01/. – Vol. 94, № 12. – P. 2467.
- [75] **Koval O. A.** Lactaptin Induces p53-Independent Cell Death Associated with Features of Apoptosis and Autophagy and Delays Growth of Breast Cancer Cells in Mouse Xenografts / Koval O. A., Tkachenko A. V., Fomin A. S. et al. // *PLOS ONE*. – 2014. – Vol. 9, № 4. – P. e93921.
- [76] **Richter V.** Antitumor Potential of Lactaptin / Richter V., Vaskova A., Koval O. et al. // *Biol Med (Aligarh) S*. – 2015. – Vol. 2, № 2.
- [77] **Richter M.** The Recombinant Fragment of Human κ -Casein Induces Cell Death by Targeting the Proteins of Mitochondrial Import in Breast Cancer Cells / Richter M., Wohlfromm F., Kähne T. et al. // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12, № 6. – P. 1427.
- [78] **Tompa P.** The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins / Tompa P. // *FEBS Letters*. – 2005. – 2005/06/13/. – Vol. 579, № 15. – P. 3346.

- [79] **Fuxreiter M.** Preformed Structural Elements Feature in Partner Recognition by Intrinsically Unstructured Proteins / Fuxreiter M., Simon I., Friedrich P. et al. // *Journal of Molecular Biology*. – 2004. – 2004/05/14/. – Vol. 338, № 5. – P. 1015.
- [80] **Borcherds W.** Structural divergence is more extensive than sequence divergence for a family of intrinsically disordered proteins / Borcherds W., Kashtanov S., Wu H. et al. // *Proteins*. – 2013. – Oct. – Vol. 81, № 10. – P. 1686.
- [81] **Kosol S.** Structural Characterization of Intrinsically Disordered Proteins by NMR Spectroscopy / Kosol S., Contreras-Martos S., Cedeño C. et al. // *Molecules*. – 2013. – Vol. 18, № 9. – P. 10802.
- [82] **Brutscher B.** NMR Methods for the Study of Intrinsically Disordered Proteins Structure, Dynamics, and Interactions: General Overview and Practical Guidelines // *Intrinsically Disordered Proteins Studied by NMR Spectroscopy* / Felli I. C., Pierattelli R. – Cham: Springer International Publishing, 2015. – P. 49.
- [83] **Eliezer D.** Distance Information for Disordered Proteins from NMR and ESR Measurements Using Paramagnetic Spin Labels // *Intrinsically Disordered Protein Analysis: Volume 1, Methods and Experimental Tools* / Uversky V. N., Dunker A. K. -- Totowa, NJ: Humana Press, 2012. – P. 127.
- [84] **Gil S.** NMR spectroscopic studies of intrinsically disordered proteins at near-physiological conditions / Gil S., Hošek T., Solyom Z. et al. // *Angew Chem Int Ed Engl*. – 2013. – Nov 4. – Vol. 52, № 45. – P. 11808.
- [85] **Wishart D. S.** Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure / Wishart D. S., Sykes B. D., Richards F. M. // *Journal of Molecular Biology*. – 1991. – 1991/11/20/. – Vol. 222, № 2. – P. 311.
- [86] **Smith L. J.** The concept of a random coil. Residual structure in peptides and denatured proteins / Smith L. J., Fiebig K. M., Schwalbe H. et al. // *Fold Des*. – 1996. – Vol. 1, № 5. – P. R95.
- [87] **Wishart D. S.** The ¹³C Chemical-Shift Index: A simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical-shift data / Wishart D. S., Sykes B. D. // *Journal of Biomolecular NMR*. – 1994. – 1994/03/01. – Vol. 4, № 2. – P. 171.
- [88] **Kjaergaard M.** Disordered proteins studied by chemical shifts / Kjaergaard M., Poulsen F. M. // *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. – 2012. – 2012/01/01/. – Vol. 60. – P. 42.
- [89] **Tamiola K.** Sequence-Specific Random Coil Chemical Shifts of Intrinsically Disordered Proteins / Tamiola K., Acar B., Mulder F. A. A. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2010. – 2010/12/29. – Vol. 132, № 51. – P. 18000.
- [90] **De Simone A.** Accurate Random Coil Chemical Shifts from an Analysis of Loop Regions in Native States of Proteins / De Simone A., Cavalli A., Hsu S.-T. D. et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2009. – 2009/11/18. – Vol. 131, № 45. – P. 16332.

- [91] **Kim S.** Fast hydrogen exchange affects ^{15}N relaxation measurements in intrinsically disordered proteins / Kim S., Wu K.-P., Baum J. // *Journal of Biomolecular NMR*. – 2013. – 2013/03/01. – Vol. 55, № 3. – P. 249.
- [92] **Palmer A. G.** NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules / Palmer A. G. // *Chem Rev.* – 2004. – Aug. – Vol. 104, № 8. – P. 3623.
- [93] **Teng Q.** Protein Dynamics // Structural Biology: Practical NMR Applications / Teng Q. -- Boston, MA: Springer US, 2013. – P. 289.
- [94] **Redfield A. G.** On the Theory of Relaxation Processes / Redfield A. G. // *IBM Journal of Research and Development*. – 1957. – Vol. 1, № 1. – P. 19.
- [95] **Levitt M. H.** Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance. / Levitt M. H.: John Wiley & Sons, 2013.
- [96] **Kay L. E.** Backbone dynamics of proteins as studied by ^{15}N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease / Kay L. E., Torchia D. A., Bax A. // *Biochemistry*. – 1989. – Nov 14. – Vol. 28, № 23. – P. 8972.
- [97] **Abragam A.** The principles of nuclear magnetism. / Abragam A.: Oxford university press, 1961. – № 32.
- [98] **Hiyama Y.** Determination of ^{15}N chemical shift tensor via ^{15}N - ^2H dipolar coupling in Boc-glycylglycyl[^{15}N glycine]benzyl ester / Hiyama Y., Niu C. H., Silverton J. V. et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 1988. – 1988/04/01. – Vol. 110, № 8. – P. 2378.
- [99] **Lipari G.** Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity / Lipari G., Szabo A. // *Journal of the American Chemical Society*. – 1982. – 1982/08/01. – Vol. 104, № 17. – P. 4546.
- [100] **Lipari G.** Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results / Lipari G., Szabo A. // *Journal of the American Chemical Society*. – 1982. – 1982/08/01. – Vol. 104, № 17. – P. 4559.
- [101] **Ishima R.** Protein dynamics from NMR / Ishima R., Torchia D. A. // *Nature Structural Biology*. – 2000. – 2000/09/01. – Vol. 7, № 9. – P. 740.
- [102] **Farrow N. A.** Spectral density function mapping using ^{15}N relaxation data exclusively / Farrow N. A., Zhang O., Szabo A. et al. // *Journal of Biomolecular NMR*. – 1995. – 1995/09/01. – Vol. 6, № 2. – P. 153.
- [103] **Kadeřávek P.** Spectral density mapping protocols for analysis of molecular motions in disordered proteins / Kadeřávek P., Zapletal V., Rabatinová A. et al. // *Journal of Biomolecular NMR*. – 2014. – 2014/03/01. – Vol. 58, № 3. – P. 193.
- [104] **Grzesiek S.** Notes on relaxation and dynamics // Course Notes, EMBO Practical Course on NMR, Heidelberg, 2003.

- [105] **Kosen P. A.** [5] Spin labeling of proteins // *Methods in Enzymology* Academic Press, 1989. -- P. 86.
- [106] **Rezaei-Ghaleh N.** Intrinsically disordered proteins: from sequence and conformational properties toward drug discovery / Rezaei-Ghaleh N., Blackledge M., Zweckstetter M. // *Chembiochem.* – 2012. – May 7. – Vol. 13, № 7. – P. 930.
- [107] **Bibow S.** Structural Impact of Proline-Directed Pseudophosphorylation at AT8, AT100, and PHF1 Epitopes on 441-Residue Tau / Bibow S., Ozenne V., Biernat J. et al. // *Journal of the American Chemical Society.* – 2011. – 2011/10/12. – Vol. 133, № 40. – P. 15842.
- [108] **Allison J. R.** Determination of the Free Energy Landscape of α -Synuclein Using Spin Label Nuclear Magnetic Resonance Measurements / Allison J. R., Varnai P., Dobson C. M. et al. // *Journal of the American Chemical Society.* – 2009. – 2009/12/30. – Vol. 131, № 51. – P. 18314.
- [109] **Mukrasch M. D.** Structural Polymorphism of 441-Residue Tau at Single Residue Resolution / Mukrasch M. D., Bibow S., Korukottu J. et al. // *PLOS Biology.* – 2009. – Vol. 7, № 2. – P. e1000034.
- [110] **Bloembergen N.** Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. Effects of Electron Spin Relaxation / Bloembergen N., Morgan L. O. // *The Journal of Chemical Physics.* – 1961. – Vol. 34, № 3. – P. 842.
- [111] **Bloembergen N.** Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions / Bloembergen N. // *The Journal of Chemical Physics.* – 1957. – Vol. 27, № 2. – P. 572.
- [112] **Solomon I.** Relaxation Processes in a System of Two Spins / Solomon I. // *Physical Review.* – 1955. – 07/15/. – Vol. 99, № 2. – P. 559.
- [113] **Biller J. R.** Frequency dependence of electron spin relaxation times in aqueous solution for a nitronyl nitroxide radical and perdeuterated-tempone between 250MHz and 34GHz / Biller J. R., Meyer V. M., Elajaili H. et al. // *Journal of Magnetic Resonance.* – 2012. – 2012/12/01/. – Vol. 225. – P. 52.
- [114] **Iwahara J.** Ensemble Approach for NMR Structure Refinement against ^1H Paramagnetic Relaxation Enhancement Data Arising from a Flexible Paramagnetic Group Attached to a Macromolecule / Iwahara J., Schwieters C. D., Clore G. M. // *Journal of the American Chemical Society.* – 2004. – 2004/05/01. – Vol. 126, № 18. – P. 5879.
- [115] **Clore G. M.** Elucidating transient macromolecular interactions using paramagnetic relaxation enhancement / Clore G. M., Tang C., Iwahara J. // *Current Opinion in Structural Biology.* – 2007. – 2007/10/01/. – Vol. 17, № 5. – P. 603.
- [116] **Brueschweiler R.** Influence of rapid intramolecular motion on NMR cross-relaxation rates. A molecular dynamics study of antamanide in solution / Brueschweiler R., Roux B., Blackledge M. et al. // *Journal of the American Chemical Society.* – 1992. – 1992/03/01. – Vol. 114, № 7. – P. 2289.

- [117] **Salmon L.** NMR Characterization of Long-Range Order in Intrinsically Disordered Proteins / Salmon L., Nodet G., Ozenne V. et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2010. – 2010/06/23. – Vol. 132, № 24. – P. 8407.
- [118] **Ma L.** Elucidation of the Paramagnetic R1 Relaxation of Heteronuclei and Protons in Cu(II) Plastocyanin from *Anabaena variabilis* / Ma L., Jørgensen A.-M. M., Sørensen G. O. et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2000. – 2000/10/01. – Vol. 122, № 39. – P. 9473.
- [119] **Battiste J. L.** Utilization of Site-Directed Spin Labeling and High-Resolution Heteronuclear Nuclear Magnetic Resonance for Global Fold Determination of Large Proteins with Limited Nuclear Overhauser Effect Data / Battiste J. L., Wagner G. // *Biochemistry*. – 2000. – 2000/05/01. – Vol. 39, № 18. – P. 5355.
- [120] **Iwahara J.** Practical aspects of (1)H transverse paramagnetic relaxation enhancement measurements on macromolecules / Iwahara J., Tang C., Marius Clore G. // *J Magn Reson*. – 2007. – Feb. – Vol. 184, № 2. – P. 185.
- [121] **Ganguly D.** Structural Interpretation of Paramagnetic Relaxation Enhancement-Derived Distances for Disordered Protein States / Ganguly D., Chen J. // *Journal of Molecular Biology*. – 2009. – 2009/07/17/. – Vol. 390, № 3. – P. 467.
- [122] **Goldfarb D.** EPR spectroscopy: fundamentals and methods. / Goldfarb D., Stoll S.: John Wiley & Sons, 2018.
- [123] **Habchi J.** Monitoring structural transitions in IDPs by site-directed spin labeling EPR spectroscopy / Habchi J., Martinho M., Gruet A. et al. // *Methods Mol Biol*. – 2012. – Vol. 895. – P. 361.
- [124] **Drescher M.** EPR in Protein Science / Drescher M. // *EPR Spectroscopy: Applications in Chemistry and Biology* / Drescher M., Jeschke G. -- Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. -- P. 91.
- [125] **Jeschke G.** Distance measurements on spin-labelled biomacromolecules by pulsed electron paramagnetic resonance / Jeschke G., Polyhach Y. // *Phys Chem Chem Phys*. – 2007. – Apr 28. – Vol. 9, № 16. – P. 1895.
- [126] **Joseph B.** Selective High-Resolution Detection of Membrane Protein–Ligand Interaction in Native Membranes Using Trityl–Nitroxide PELDOR / Joseph B., Tormyshev V. M., Rogozhnikova O. Y. et al. // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2016. – Vol. 55, № 38. – P. 11538.
- [127] **Shevelev G. Y.** Physiological-Temperature Distance Measurement in Nucleic Acid using Triarylmethyl-Based Spin Labels and Pulsed Dipolar EPR Spectroscopy / Shevelev G. Y., Krunkacheva O. A., Lomzov A. A. et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2014. – 2014/07/16. – Vol. 136, № 28. – P. 9874.

- [128] **Milov A. D.** Electron-electron double resonance in electron spin echo: Model biradical systems and the sensitized photolysis of decalin / Milov A. D., Ponomarev A. B., Tsvetkov Y. D. // *Chemical Physics Letters*. – 1984. – 1984/09/14/. – Vol. 110, № 1. – P. 67.
- [129] **Pannier M.** Dead-time free measurement of dipole-dipole interactions between electron spins / Pannier M., Veit S., Godt A. et al. // *J Magn Reson*. – 2000. – Feb. – Vol. 142, № 2. – P. 331.
- [130] **Jeschke G.** DeerAnalysis2006—a comprehensive software package for analyzing pulsed ELDOR data / Jeschke G., Chechik V., Ionita P. et al. // *Applied Magnetic Resonance*. – 2006. – 2006/06/01. – Vol. 30, № 3. – P. 473.
- [131] **Chiang Y. W.** The determination of pair distance distributions by pulsed ESR using Tikhonov regularization / Chiang Y. W., Borbat P. P., Freed J. H. // *J Magn Reson*. – 2005. – Feb. – Vol. 172, № 2. – P. 279.
- [132] **von Sonntag C.** Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair: A Chemical Perspective. / von Sonntag C. -- Berlin - Heidelberg: Springer, 2006. -- 523 p.
- [133] **Cadet J.** Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA / Cadet J., Davies K. J. A., Medeiros M. H. G. et al. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2017. – 2017-06. – Vol. 107. – P. 13.
- [134] **Dizdaroglu M.** Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms and measurement / Dizdaroglu M., Coskun E., Tuna G. et al. // *DNA Damage, DNA Repair and Disease* / Dizdaroglu M., Lloyd R. S. -- London: Royal Society of Chemistry, 2021. -- P. 86.
- [135] **Gedik C. M.** Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: Results of an interlaboratory validation study / ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage), Gedik C. M., Collins A. // *FASEB Journal*. – 2005. – 2005-01. – Vol. 19, № 1. – P. 82.
- [136] **Poulsen H. E.** Detection and interpretation of 8-oxodG and 8-oxoGua in urine, plasma and cerebrospinal fluid / Poulsen H. E., Llovera Nadal L., Broedbaek K. et al. // *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. – 2014. – 2014-02. – Vol. 1840, № 2. – P. 801.
- [137] **Zahn K. E.** DNA polymerases provide a canon of strategies for translesion synthesis past oxidatively generated lesions / Zahn K. E., Wallace S. S., Doublé S. // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2011. – 2011-06. – Vol. 21, № 3. – P. 358.
- [138] **Alexandrov L. B.** Signatures of mutational processes in human cancer / Alexandrov L. B., Nik-Zainal S., Wedge D. C. et al. // *Nature*. – 2013. – 2013-08-22. – Vol. 500, № 7463. – P. 415.
- [139] **Viel A.** A specific mutational signature associated with DNA 8-oxoguanine persistence in MUTYH-defective colorectal cancer / Viel A., Bruselles A., Meccia E. et al. // *EBioMedicine*. – 2017. – 2017-06. – Vol. 20. – P. 39.

- [140] **Cho B. P.** ^{15}N nuclear magnetic resonance studies on the tautomerism of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-hydroxyguanosine, and other C8-substituted guanine nucleosides / Cho B. P., Kadlubar F. F., Culp S. J. et al. // *Chemical Research in Toxicology*. – 1990. – 1990-09. – Vol. 3, № 5. – P. 445.
- [141] **Oda Y.** NMR studies of a DNA containing 8-hydroxydeoxyguanosine / Oda Y., Uesugi S., Ikehara M. et al. // *Nucleic Acids Research*. – 1991. – 1991-04-11. – Vol. 19, № 7. – P. 1407.
- [142] **Lipscomb L. A.** X-ray structure of a DNA decamer containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine / Lipscomb L. A., Peek M. E., Morningstar M. L. et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* – 1995. – 1995-01-31. – Vol. 92, № 3. – P. 719.
- [143] **Hoppins J. J.** 8-Oxoguanine affects DNA backbone conformation in the *EcoRI* recognition site and inhibits its cleavage by the enzyme / Hoppins J. J., Gruber D. R., Miers H. L. et al. // *PLoS ONE*. -- 2016. – 2016-10-17. – Vol. 11, № 10. – P. e0164424.
- [144] **Gruber D. R.** Oxidative damage to epigenetically methylated sites affects DNA stability, dynamics, and enzymatic demethylation / Gruber D. R., Toner J. J., Miers H. L. et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – 2018-11-16. – Vol. 46, № 20. – P. 10827.
- [145] **Kouchakdjian M.** NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex. 8-Oxo-7H-dG(*syn*)•dA(*anti*) alignment at lesion site / Kouchakdjian M., Bodepudi V., Shibutani S. et al. // *Biochemistry*. – 1991. – 1991-02-05. – Vol. 30, № 5. – P. 1403.
- [146] **Gannett P. M.** Base pairing of 8-oxoguanosine and 8-oxo-2'-deoxyguanosine with 2'-deoxyadenosine, 2'-deoxycytosine, 2'-deoxyguanosine, and thymidine / Gannett P. M., Sura T. P. // *Chemical Research in Toxicology*. – 1993. – 1993-09. – Vol. 6, № 5. – P. 690.
- [147] **Cheng X.** Dynamic behavior of DNA base pairs containing 8-oxoguanine / Cheng X., Kelso C., Hornak V. et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – 2005-10-12. – Vol. 127, № 40. – P. 13906.
- [148] **Plum G. E.** Influence of the oxidatively damaged adduct 8-oxodeoxyguanosine on the conformation, energetics, and thermodynamic stability of a DNA duplex / Plum G. E., Grollman A. P., Johnson F. et al. // *Biochemistry*. – 1995. – 1995-12-12. – Vol. 34, № 49. – P. 16148.
- [149] **Miller J. H.** 8-Oxoguanine enhances bending of DNA that favors binding to glycosylases / Miller J. H., Fan-Chiang C.-C. P., Straatsma T. P. et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2003. – 2003-05-21. – Vol. 125, № 20. – P. 6331.
- [150] **Barone F.** Structural and dynamic effects of single 7-hydro-8-oxoguanine bases located in a frameshift target DNA sequence / Barone F., Lankas F., Spackova N. et al. // *Biophysical Chemistry*. – 2005. – 2005-10-22. – Vol. 118, № 1. – P. 31.

- [151] **Boiteux S.** Repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: Properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA *N*-glycosylases / Boiteux S., Coste F., Castaing B. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2017. – 2017-06. – Vol. 107. – P. 179.
- [152] **Yudkina A. V.** Reading and misreading 8-oxoguanine, a paradigmatic ambiguous nucleobase / Yudkina A. V., Shilkin E. S., Endutkin A. V. et al. // *Crystals*. -- 2019. – 2019-05-23. – Vol. 9, № 5. – P. 269.
- [153] **Bruner S. D.** Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA / Bruner S. D., Norman D. P. G., Verdine G. L. // *Nature*. – 2000. – 2000-02-24. – Vol. 403, № 6772. – P. 859.
- [154] **Gilboa R.** Structure of formamidopyrimidine-DNA glycosylase covalently complexed to DNA / Gilboa R., Zharkov D. O., Golan G. et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – 2002-05-31. – Vol. 277, № 22. – P. 19811.
- [155] **Fromme J. C.** DNA lesion recognition by the bacterial repair enzyme MutM / Fromme J. C., Verdine G. L. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – 2003-12-19. – Vol. 278, № 51. – P. 51543.
- [156] **Banerjee A.** Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damaged DNA / Banerjee A., Yang W., Karplus M. et al. // *Nature*. – 2005. – 2005-03-31. – Vol. 434, № 7033. – P. 612.
- [157] **Banerjee A.** A nucleobase lesion remodels the interaction of its normal neighbor in a DNA glycosylase complex / Banerjee A., Verdine G. L. // *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* – 2006. – 2006-10-10. – Vol. 103, № 41. – P. 15020.
- [158] **Banerjee A.** Structure of a DNA glycosylase searching for lesions / Banerjee A., Santos W. L., Verdine G. L. // *Science*. – 2006. – 2006-02-24. – Vol. 311, № 5764. – P. 1153.
- [159] **Kuznetsov N. A.** Pre-steady-state kinetic study of substrate specificity of *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase / Kuznetsov N. A., Koval V. V., Zharkov D. O. et al. // *Biochemistry*. – 2007. – 2007-01-16. – Vol. 46, № 2. – P. 424.
- [160] **Kuznetsov N. A.** Kinetic conformational analysis of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase / Kuznetsov N. A., Koval V. V., Nevinsky G. A. et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – 2007-01-12. – Vol. 282, № 2. – P. 1029.
- [161] **Qi Y.** Encounter and extrusion of an intrahelical lesion by a DNA repair enzyme / Qi Y., Spong M. C., Nam K. et al. // *Nature*. – 2009. – 2009-12-10. – Vol. 462, № 7274. – P. 762.
- [162] **Kuznetsov N. A.** Active destabilization of base pairs by a DNA glycosylase wedge initiates damage recognition / Kuznetsov N. A., Bergonzo C., Campbell A. J. et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2015. – 2015-01-09. – Vol. 43, № 1. – P. 272.

- [163] **Li H.** A dynamic checkpoint in oxidative lesion discrimination by formamidopyrimidine–DNA glycosylase / Li H., Endutkin A. V., Bergonzo C. et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – 2016-01-26. – Vol. 44, № 2. – P. 683.
- [164] **Li H.** DNA deformation-coupled recognition of 8-oxoguanine: Conformational kinetic gating in human DNA glycosylase / Li H., Endutkin A. V., Bergonzo C. et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2017. – 2017-02-22. – Vol. 139, № 7. – P. 2682.
- [165] **Shigdel U. K.** The trajectory of intrahelical lesion recognition and extrusion by the human 8-oxoguanine DNA glycosylase / Shigdel U. K., Ovchinnikov V., Lee S.-J. et al. // *Nature Communications*. -- 2020. - 2020-09-07. - Vol. 11, № 1. - P. 4437.
- [166] **Sung R.-J.** Structural and biochemical analysis of DNA helix invasion by the bacterial 8-oxoguanine DNA glycosylase MutM / Sung R.-J., Zhang M., Qi Y. et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – 2013-04-05. – Vol. 288, № 14. – P. 10012.
- [167] **Cao C.** Dynamic opening of DNA during the enzymatic search for a damaged base / Cao C., Jiang Y. L., Stivers J. T. et al. // *Nature Structural and Molecular Biology*. – 2004. – 2004-12. – Vol. 11, № 12. – P. 1230.
- [168] **Cao C.** The catalytic power of uracil DNA glycosylase in the opening of thymine base pairs / Cao C., Jiang Y. L., Krosky D. J. et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2006. – 2006-10-11. – Vol. 128, № 40. – P. 13034.
- [169] **Parker J. B.** Enzymatic capture of an extrahelical thymine in the search for uracil in DNA / Parker J. B., Bianchet M. A., Krosky D. J. et al. // *Nature*. – 2007. – 2007-09-27. – Vol. 449, № 7161. – P. 433.
- [170] **Friedman J. I.** Nontarget DNA binding shapes the dynamic landscape for enzymatic recognition of DNA damage / Friedman J. I., Majumdar A., Stivers J. T. // *Nucleic Acids Research*. – 2009. – 2009-04-01. – Vol. 37, № 11. – P. 3493.
- [171] **Parker J. B.** Dynamics of uracil and 5-fluorouracil in DNA / Parker J. B., Stivers J. T. // *Biochemistry*. – 2011. – 2011-02-08. – Vol. 50, № 5. – P. 612.
- [172] **Englander S. W.** Hydrogen exchange and structural dynamics of proteins and nucleic acids / Englander S. W., Kallenbach N. R. // *Quarterly Reviews of Biophysics*. – 1983. – 1983-11. – Vol. 16, № 4. – P. 521.
- [173] **Guéron M.** Studies of base pair kinetics by NMR measurement of proton exchange / Guéron M., Leroy J.-L. // *Methods in Enzymology*. – 1995. – 1995. – Vol. 261. – P. 383.
- [174] **Chinak O. A.** Penetration of the peptide lactaptin into human cancer cells / Chinak O. A., Fomin A. S., Nushtaeva A. A. et al. // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2016. – 2016/07/01. – Vol. 42, № 4. – P. 361.

- [175] **Vranken W. F.** The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline / Vranken W. F., Boucher W., Stevens T. J. et al. // *Proteins*. – 2005. – Jun 1. – Vol. 59, № 4. – P. 687.
- [176] **Stoll S.** EasySpin: Simulating cw ESR spectra / Stoll S., Schweiger A. // *ESR spectroscopy in membrane biophysics*. – 2007. – Vol. 27. – P. 299.
- [177] **Stoll S.** EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR / Stoll S., Schweiger A. // *J Magn Reson*. – 2006. – Jan. – Vol. 178, № 1. – P. 42.
- [178] **Dao D.** CellProfiler Analyst: interactive data exploration, analysis, and classification of large biological image sets / Dao D., Fraser A. N., Hung J. et al. // *bioRxiv*. – 2016. – P. 057976.
- [179] **Holt C.** Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods / Holt C., Carver J. A., Ecroyd H. et al. // *Journal of Dairy Science*. – 2013. – 2013/10/01/. – Vol. 96, № 10. – P. 6127.
- [180] **Felli I. C.** Intrinsically disordered proteins studied by NMR spectroscopy. / Felli I. C., Pierattelli R.: Springer, 2015.
- [181] **Uversky V. N.** Intrinsically Disordered Protein Analysis: Volume 1, Methods and Experimental Tools. / Uversky V. N., Dunker A. K.: Humana Totowa, NJ, 2012. -- XIV p.
- [182] **Sebák F.** Proline cis/trans Isomerization in Intrinsically Disordered Proteins and Peptides / Sebák F., Szolomájer J., Papp N. et al. // *FBL*. – 2023. – 2023-06-19. – Vol. 28, № 6. – P. 127
- [183] **Samson C.** 1H, 13C and 15N backbone resonance assignment of the intrinsically disordered region of the nuclear envelope protein emerin / Samson C., Herrada I., Celli F. et al. // *Biomolecular NMR Assignments*. – 2016. – 2016/04/01. – Vol. 10, № 1. – P. 179.
- [184] **Plowman J. E.** Structural features of a peptide corresponding to human κ -casein residues 84–101 by 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy / Plowman J. E., Creamer L. K., Liddell M. J. et al. // *Journal of Dairy Research*. – 1999. – Vol. 66, № 1. – P. 53.
- [185] **Shen Y.** Prediction of Xaa-Pro peptide bond conformation from sequence and chemical shifts / Shen Y., Bax A. // *Journal of Biomolecular NMR*. – 2010. – 2010/03/01. – Vol. 46, № 3. – P. 199.
- [186] **Bordignon E.** Membrane Protein Structure and Dynamics Studied by Site-Directed Spin-Labeling ESR / Bordignon E., Steinhoff H.-J. // *ESR Spectroscopy in Membrane Biophysics* / Hemminga M. A., Berliner L. J. -- Boston, MA: Springer US, 2007. – P. 129.
- [187] **Polienko Y. F.** Origin of Long-Range Hyperfine Couplings in the EPR Spectra of 2,2,5,5-Tetraethylpyrrolidine-1-oxyls / Polienko Y. F., Dobrynin S. A., Lomanovich K. A. et al. // *ACS Omega*. – 2023. – 2023/10/17. – Vol. 8, № 41. – P. 38723.
- [188] **Dobrynin S. A.** Synthesis of 3,4-Bis(hydroxymethyl)-2,2,5,5-tetraethylpyrrolidin-1-oxyl via 1,3-Dipolar Cycloaddition of Azomethine Ylide to Activated Alkene / Dobrynin S. A., Glazachev Y.

- I., Gatilov Y. V. et al. // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2018. – 2018/05/18. – Vol. 83, № 10. – P. 5392.
- [189] **Bobko A. A.** EPR and Quantum Chemical Studies of the pH-sensitive Imidazoline and Imidazolidine Nitroxides with Bulky Substituents / Bobko A. A., Kirilyuk I. A., Gritsan N. P. et al. // *Applied Magnetic Resonance*. – 2010. – 2010/12/01. – Vol. 39, № 4. – P. 437.
- [190] **Dulbecco R.** Plaque production by the polyoma virus / Dulbecco R., Freeman G. // *Virology*. – 1959. – 1959/07/01/. – Vol. 8, № 3. – P. 396.
- [191] **Eagle H.** Amino Acid Metabolism in Mammalian Cell Cultures / Eagle H. // *Science*. – 1959. – Vol. 130, № 3373. – P. 432.
- [192] **Plyasova A. A.** Penetration into Cancer Cells via Clathrin-Dependent Mechanism Allows L-Asparaginase from *Rhodospirillum rubrum* to Inhibit Telomerase / Plyasova A. A., Pokrovskaya M. V., Lisitsyna O. M. et al. // *Pharmaceuticals*. – 2020. – Oct. – Vol. 13, № 10. – P. 18.
- [193] **Sathyamoorthy B.** Conformational characterization of duplex DNA with solution-state NMR spectroscopy / Sathyamoorthy B., Sannapureddi R. K. R., Negi D. et al. // *Journal of Magnetic Resonance Open*. – 2022. – 2022/06/01/. – Vol. 10-11. – P. 100035.
- [194] **von Hippel P. H.** Fifty years of DNA "breathing": Reflections on old and new approaches / von Hippel P. H., Johnson N. P., Marcus A. H. // *Biopolymers*. – 2013. – 2013-12. – Vol. 99, № 12. – P. 923.
- [195] **Pyshnyi D. V.** Efficiency of coaxial stacking depends on the DNA duplex structure / Pyshnyi D. V., Goldberg E. L., Ivanova E. M. // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 2003. – 2003-12. – Vol. 21, № 3. – P. 459.
- [196] **Parella T.** Towards perfect NMR: Spin-echo versus perfect-echo building blocks / Parella T. // *Magnetic Resonance in Chemistry*. – 2019. – 2019-01. – Vol. 57, № 1. – P. 13.
- [197] **Sklenář V.** Gradient-tailored water suppression for ^1H - ^{15}N HSQC experiments optimized to retain full sensitivity / Sklenář V., Piotto M., Leppik R. et al. // *Journal of Magnetic Resonance. Series A*. – 1993. – 1993-04. – Vol. 102, № 2. – P. 241.
- [198] **Boelens R.** Sequential assignment of imino- and amino-proton resonances in ^1H NMR spectra of oligonucleotides by two-dimensional NMR spectroscopy. Application to a *lac* operator fragment / Boelens R., Scheek R. M., Dijkstra K. et al. // *Journal of Magnetic Resonance*. – 1985. – 1985-05. – Vol. 62, № 3. – P. 378.
- [199] **Patel D. J.** Proton nuclear magnetic resonance investigations of fraying in double-stranded d-ApTpGpCpApT in H_2O solution / Patel D. J., Hilbers C. W. // *Biochemistry*. – 1975. – 1975-06-17. – Vol. 14, № 12. – P. 2651.
- [200] **Benight A. S.** Melting of a self-complementary DNA minicircle: Comparison of optical melting theory with exchange broadening of the nuclear magnetic resonance spectrum / Benight A. S.,

Schurr J. M., Flynn P. F. et al. // *Journal of Molecular Biology*. – 1988. – 1988-03-20. – Vol. 200, № 2. – P. 377.

[201] **Culp S. J.** Structural and conformational analyses of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine / Culp S. J., Cho B. P., Kadlubar F. F. et al. // *Chemical Research in Toxicology*. – 1989. – 1989-11. – Vol. 2, № 6. – P. 416.

[202] **Taylor J.-S.** ¹H NMR assignment and melting temperature study of cis-syn and trans-syn thymine dimer containing duplexes of d(CGTATTATGC)•d(GCATAATACG) / Taylor J.-S., Garrett D. S., Brockie I. R. et al. // *Biochemistry*. – 1990. – 1990-09-18. – Vol. 29, № 37. – P. 8858.

[203] **Marky L. A.** Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves / Marky L. A., Breslauer K. J. // *Biopolymers*. – 1987. – 1987-09. – Vol. 26, № 9. – P. 1601.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица П.1 – Химические сдвиги образца [U-¹³C, ¹⁵N]-RL2 в условиях водного раствора при pH=3.5 и температуре 20.1 °C.

N		δH	δN	δH^α	$\delta\text{C}'$	δC^α	δC^β
1	Met	-	-	4.15	172.05	55.05	32.61
2	Asn	8.98	122.42	4.77	174.75	-	-
3	Gln	8.63	121.82	4.34	-	55.83	29.59
4	Lys	8.49	123.10	4.30	176.41	56.41	32.88
5	Gln	8.48	122.92	4.63	173.93	53.55	28.94
6	Pro	-	-	4.40	176.49	63.06	31.99
7	Ala	8.47	124.16	4.31	177.61	52.48	19.08
8	Cys	8.42	118.34	4.64	174.54	55.38	41.09
9	His	8.74	121.40	4.74	174.05	55.20	28.79
10	Glu	8.42	121.87	4.36	175.64	56.05	28.73
11	Asn	8.65	120.15	4.70	175.01	53.42	38.65
12	Asp	8.49	119.46	4.72	174.96	52.98	37.86
13	Glu	8.29	120.25	4.36	175.69	55.86	28.52
14	Arg	8.29	123.04	-	-	-	-
16	Phe	-	-	-	175.19	57.93	39.44
17	Tyr	7.95	122.10	4.49	175.06	57.58	38.96
18	Gln	8.14	122.89	4.24	175.27	55.38	29.83
19	Lys	8.38	123.51	4.26	176.65	56.79	32.93
20	Thr	8.13	115.51	4.30	173.80	61.55	69.81
21	Ala	8.37	128.08	4.58	175.36	50.62	18.10
30	Pro	-	-	4.25	176.60	63.21	31.97
31	Asn	8.48	118.06	4.56	174.96	53.70	38.58
32	Ser	8.08	114.92	-	173.63	58.23	63.93
33	Tyr	8.16	122.89	4.73	174.09	55.89	38.40
36	Tyr	-	-	4.51	176.05	57.97	38.86
37	Gly	7.77	109.85	3.89, 3.89	174.08	45.35	-
38	Thr	8.06	112.81	4.35	174.51	61.83	69.78
39	Asn	8.52	120.59	4.68	175.26	53.39	38.52
40	Leu	8.13	122.05	4.18	177.17	55.86	42.17
41	Tyr	8.04	119.34	4.49	175.71	58.00	38.32
42	Gln	8.04	121.29	4.25	175.39	55.89	29.49
43	Arg	8.26	122.12	4.27	175.91	56.06	30.62
45	Pro	-	-	-	176.41	63.07	32.00
46	Ala	8.44	124.65	4.29	177.66	52.50	19.06
47	Ile	8.07	119.95	4.14	175.75	60.95	38.85
48	Ala	8.39	128.53	4.36	177.41	52.35	19.20
49	Ile	8.16	120.45	4.13	175.86	61.13	38.83
50	Asn	8.50	122.46	4.69	174.27	53.03	39.01
51	Asn	8.40	120.62	4.95	173.29	51.20	-

55	Pro	-	-	-	176.76	62.98	32.03
56	Arg	8.42	121.42	4.31	176.37	56.29	30.80
57	Thr	8.07	115.14	4.25	173.81	61.69	69.74
58	Tyr	8.23	123.00	4.51	174.94	57.98	39.16
59	Tyr	8.05	122.59	4.48	174.75	57.52	39.14
60	Ala	8.11	125.99	4.22	176.62	51.97	19.32
61	Asn	8.33	119.38	4.88	173.62	51.12	38.73
62	Pro	-	-	-	176.55	63.38	31.94
63	Ala	8.25	123.17	4.28	177.82	52.56	18.96
64	Val	7.99	119.59	4.07	176.01	62.30	32.63
65	Val	8.26	125.34	4.08	175.81	62.21	32.46
66	Arg	8.49	126.90	4.63	173.99	53.70	30.05
67	Pro	-	-	4.38	176.75	63.06	32.04
68	His	8.66	118.77	4.64	174.09	55.26	28.86
69	Ala	8.42	125.50	4.31	177.51	52.45	19.25
70	Gln	8.56	120.76	4.36	175.78	55.60	29.44
71	Ile	8.40	124.95	4.47	-	58.76	38.55
72	Pro	-	-	4.42	176.76	63.19	32.01
73	Gln	8.54	121.29	4.30	176.11	55.97	29.59
74	Arg	8.46	122.86	4.27	175.84	56.19	30.64
75	Gln	8.47	121.88	4.31	175.27	55.75	29.70
76	Tyr	8.40	122.50	4.61	175.09	57.63	38.87
77	Leu	8.25	126.23	4.62	-	52.55	42.04
78	Pro	-	-	4.33	176.75	63.22	31.90
79	Asn	8.55	118.25	4.65	175.21	53.24	38.52
80	Ser	8.19	116.03	4.39	173.88	58.26	63.87
81	His	8.48	120.30	4.99	171.79	53.29	28.47
83	Pro	-	-	4.53	176.95	63.02	31.92
84	Thr	8.39	116.23	4.30	174.41	61.97	69.72
85	Val	8.32	124.60	4.14	175.76	62.19	32.87
86	Val	8.41	126.34	4.06	175.86	62.29	32.64
87	Arg	8.55	126.62	4.36	175.80	55.88	30.75
88	Arg	8.53	124.46	4.62	174.20	53.91	30.16
89	Pro	-	-	4.38	176.35	63.17	32.02
90	Asn	8.59	119.19	4.65	175.06	52.94	38.48
91	Leu	8.29	123.04	4.28	176.88	55.17	42.38
92	His	8.50	118.83	4.70	172.04	53.06	28.81
93	Pro	-	-	-	176.85	63.23	32.06
94	Ser	8.51	116.51	4.43	173.99	58.19	63.85
95	Phe	8.28	122.55	4.67	174.99	57.73	39.78
96	Ile	8.04	124.41	4.07	174.99	60.51	38.86
97	Ala	8.34	129.13	4.28	177.21	52.16	19.13
98	Ile	8.29	123.22	4.45	-	-	-

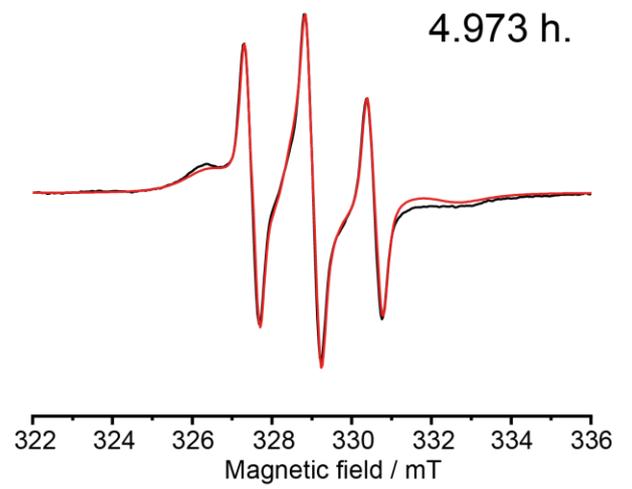
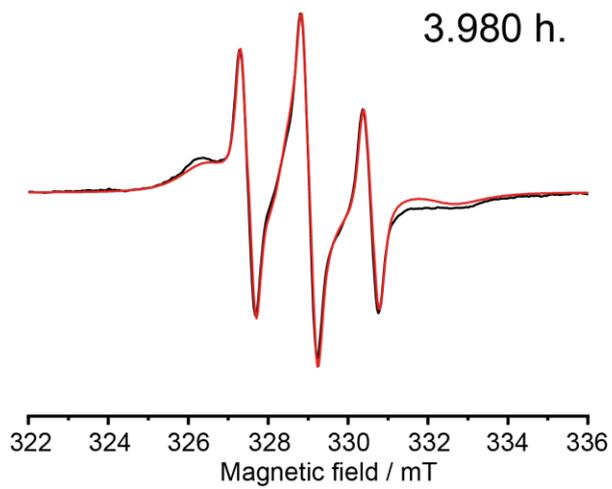
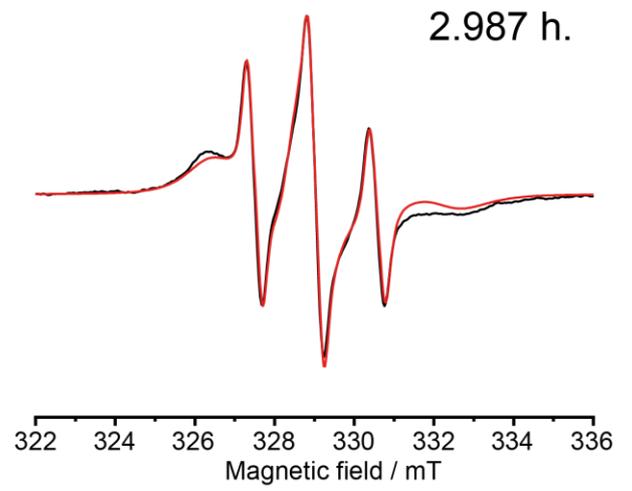
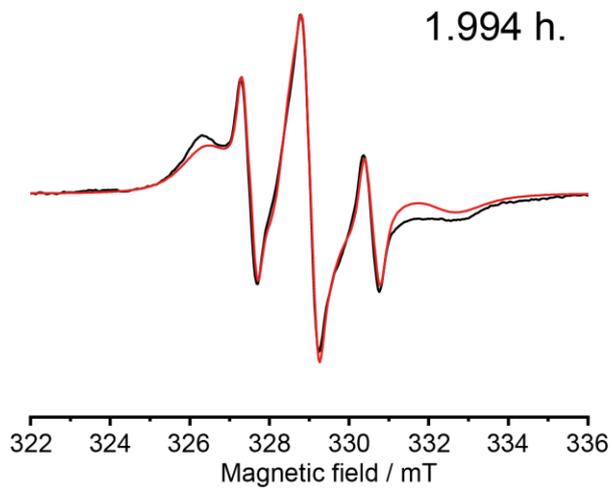
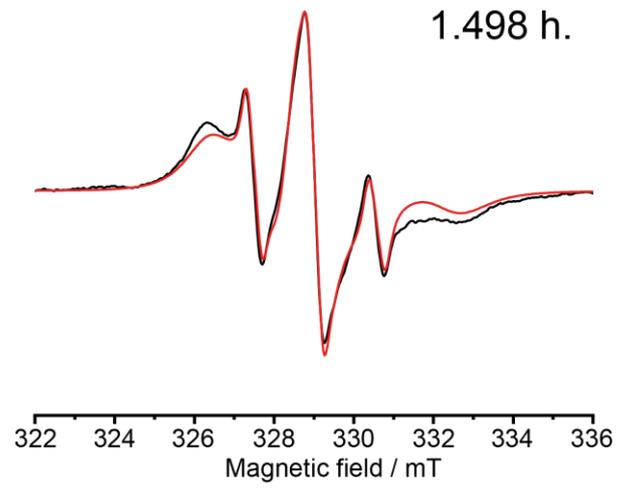
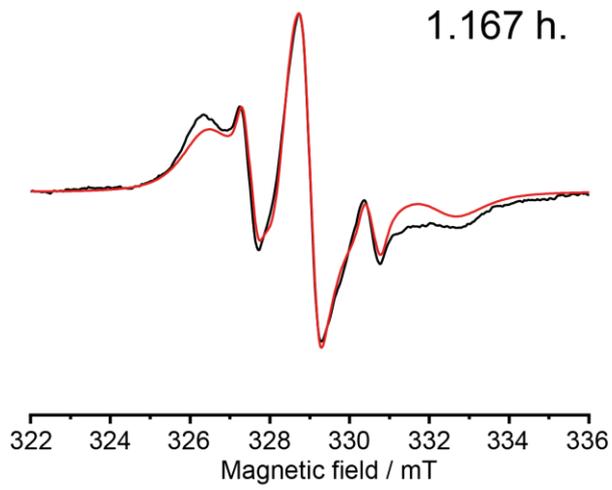
100	Pro	-	-	4.44	176.91	62.76	32.02
101	Lys	8.40	121.90	4.25	176.61	56.34	33.08
102	Lys	8.43	123.56	4.33	176.40	56.25	33.04
103	Ile	8.34	123.83	4.16	176.15	61.02	38.60
104	Gln	8.59	125.35	4.35	175.44	55.62	29.51
105	Asp	8.60	121.56	4.71	174.75	52.86	38.18
106	Lys	8.36	122.58	4.33	176.01	56.31	32.99
107	Ile	8.24	123.72	4.14	175.88	60.97	38.54
108	Ile	8.44	127.48	4.18	175.90	60.46	38.40
109	Ile	8.47	129.04	4.48	-	-	-
110	Pro	-	-	4.47	176.89	63.18	32.18
111	Thr	8.35	115.62	4.32	174.78	61.91	69.72
112	Ile	8.33	124.14	4.20	176.88	61.33	38.66
113	Gly	8.63	113.43	3.99, 3.99	174.77	45.27	-
114	Gly	8.33	108.76	3.97, 3.97	174.36	45.22	-
115	Ser	8.30	115.13	4.35	174.78	58.27	63.68
116	His	8.59	119.76	4.67	174.21	55.13	28.33
117	His	8.50	118.71	4.68	174.16	55.17	28.81
118	His	8.71	119.80	4.70	174.15	55.22	29.03
119	His	8.80	120.48	4.69	173.98	55.29	29.13
120	His	8.77	121.15	4.65	173.87	55.64	29.14
121	His	8.77	122.98	4.67	176.47	55.25	28.82

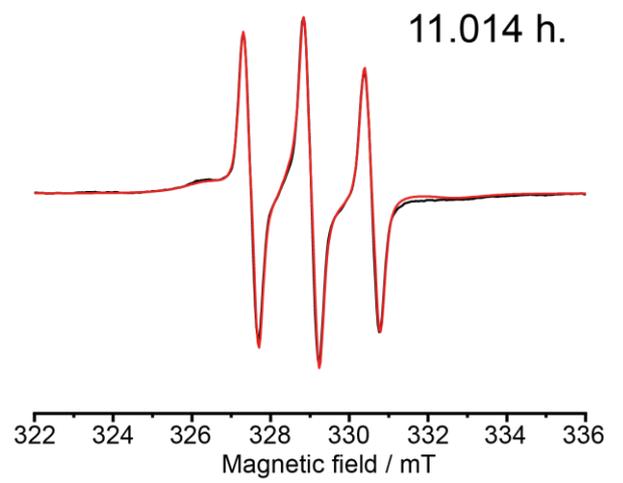
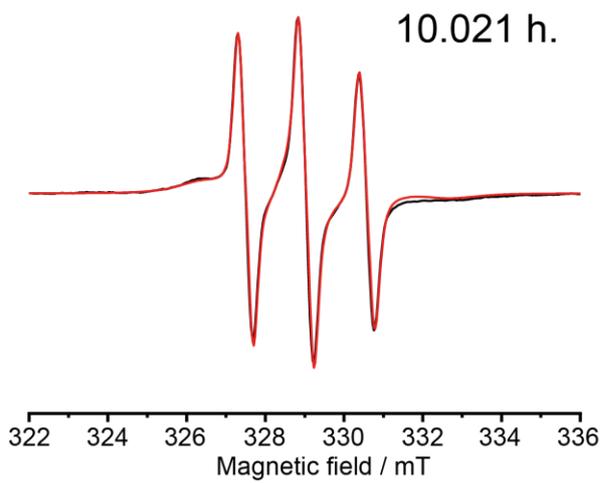
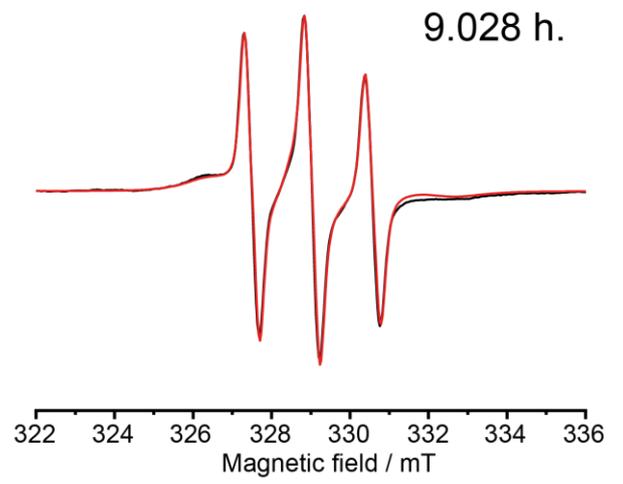
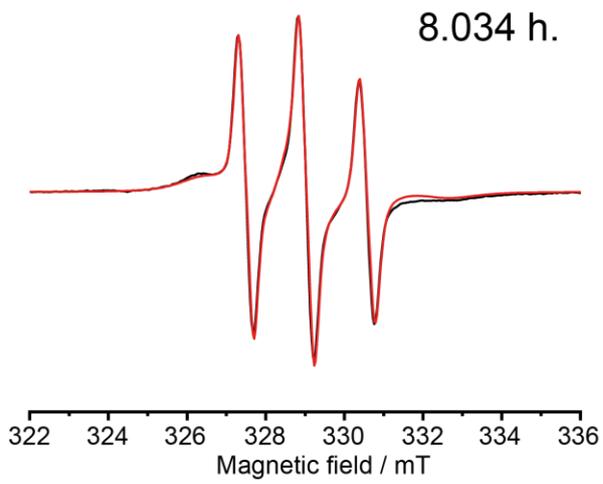
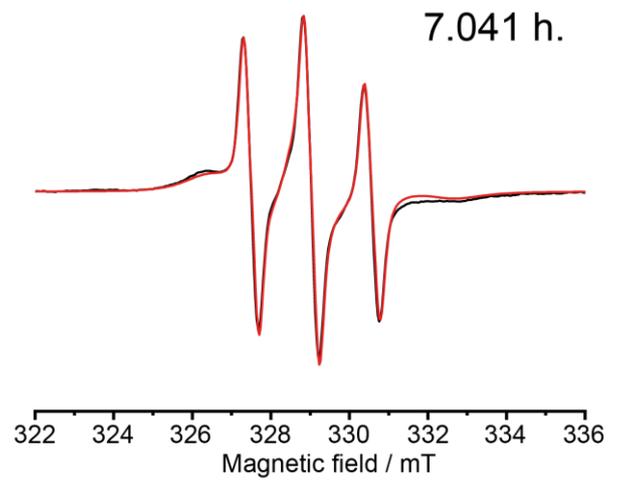
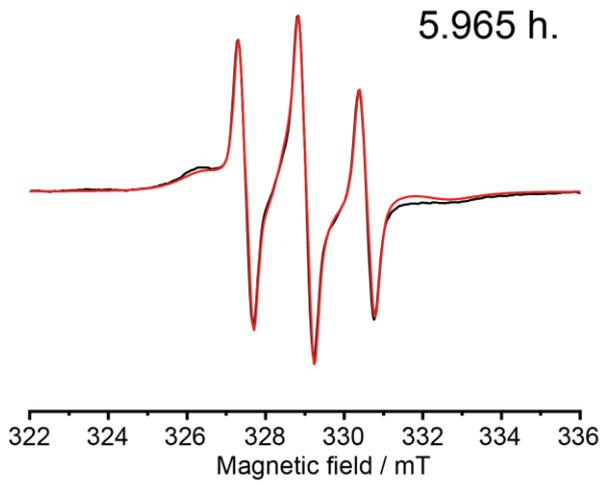
Таблица П.2 – Химические сдвиги образца [U-¹³C,¹⁵N]-RL2 в условиях ацетатного буфера (pH=3.9) и температуры 20.1 °C.

N		δH	δN	δH^α	$\delta\text{C}'$	δC^α	δC^β
1	Met	-	-	-	172.08	55.07	32.81
2	Asn	8.99	122.43	4.80	174.76	53.36	38.84
3	Gln	8.64	121.78	4.34	175.80	55.94	29.62
4	Lys	8.50	123.24	4.30	176.42	56.50	32.96
5	Gln	8.50	123.05	4.62	173.94	53.68	28.92
6	Pro	-	-	-	176.50	63.08	32.10
7	Ala	8.48	124.10	4.31	177.59	52.44	19.23
8	Cys	8.44	118.39	4.64	174.57	55.40	41.12
9	His	8.78	121.19	4.75	174.22	55.40	28.95
10	Glu	8.53	122.27	4.29	175.99	56.57	29.41
11	Asn	8.66	119.67	4.71	174.98	53.41	38.84
12	Asp	8.35	120.52	4.63	175.87	54.19	40.28
13	Glu	8.35	120.66	4.35	176.06	56.14	29.20
14	Arg	8.29	122.79	4.49	174.13	54.40	30.07
15	Pro	-	-	-	176.63	63.17	31.90
16	Phe	8.28	119.99	4.50	175.36	58.04	39.48
17	Tyr	7.91	121.52	4.49	175.11	57.74	38.92
18	Gln	8.13	122.54	4.26	175.41	55.59	29.80
19	Lys	8.35	123.13	4.24	176.68	56.78	33.07
20	Thr	8.11	115.04	4.28	173.80	61.54	69.89

21	Ala	8.34	127.91	4.59	175.36	50.61	18.44
22	Pro	-	-	-	176.31	63.10	31.86
23	Tyr	8.24	120.83	4.53	175.05	57.83	38.82
24	Val	7.91	126.33	4.25	173.31	59.10	33.24
25	Pro	-	-	-	176.42	63.07	31.98
26	Met	8.24	120.02	4.52	175.47	55.60	33.18
27	Tyr	8.03	120.03	-	174.85	57.27	39.05
28	Tyr	-	-	-	174.63	57.73	39.25
29	Val	8.00	124.87	-	173.87	59.36	33.03
30	Pro	-	-	-	176.61	63.26	32.05
31	Asn	8.50	117.93	4.58	174.94	53.69	38.61
32	Ser	8.08	114.75	4.26	173.62	58.15	64.02
33	Tyr	8.17	122.84	4.75	174.13	56.03	38.44
34	Pro	-	-	-	176.06	63.27	31.54
35	Tyr	7.87	119.60	-	175.48	57.85	38.82
36	Tyr	8.08	122.02	4.51	176.05	57.89	38.92
37	Gly	7.78	109.77	3.92	174.05	45.42	-
38	Thr	8.07	112.78	4.36	174.48	61.83	69.87
39	Asn	8.53	120.60	4.68	175.25	53.45	38.62
40	Leu	8.13	121.97	4.19	177.13	55.82	42.27
41	Tyr	8.05	119.25	4.50	175.67	57.98	38.46
42	Gln	8.06	121.19	4.26	175.41	55.74	29.58
43	Arg	8.28	122.11	4.29	175.93	56.13	30.78
44	Arg	8.38	123.59	4.57	173.99	53.94	30.28
45	Pro	-	-	-	176.42	63.04	32.12
46	Ala	8.44	124.60	4.28	177.66	52.54	19.25
47	Ile	8.07	119.84	4.14	175.72	60.81	38.98
48	Ala	8.39	128.45	4.37	177.41	52.33	19.35
49	Ile	8.16	120.34	4.15	175.85	61.12	38.97
50	Asn	8.51	122.29	4.68	174.27	53.11	38.99
51	Asn	8.39	120.53	4.95	173.32	51.25	38.96
52	Pro	-	-	-	176.46	63.25	31.97
53	Tyr	8.25	120.39	4.58	175.25	58.00	38.46
54	Val	7.76	125.12	4.31	173.53	59.31	33.10
55	Pro	-	-	-	176.76	62.95	32.09
56	Arg	8.44	121.41	4.31	176.38	56.24	30.91
57	Thr	8.08	115.01	4.26	173.81	61.70	69.83
58	Tyr	8.24	122.92	4.51	174.97	58.00	39.22
59	Tyr	8.06	122.40	4.47	174.80	57.50	39.21
60	Ala	8.12	125.87	4.23	176.63	52.01	19.46
61	Asn	8.34	119.34	4.88	173.62	51.14	38.86
62	Pro	-	-	-	176.56	63.33	32.11
63	Ala	8.26	123.12	4.27	177.81	52.55	19.15
64	Val	8.00	119.53	4.08	176.01	62.33	32.75
65	Val	8.27	125.26	4.09	175.80	62.15	32.58
66	Arg	8.50	126.88	4.64	174.03	53.77	30.23
67	Pro	-	-	-	176.77	62.99	32.13
68	His	8.67	118.77	4.65	174.11	55.20	29.00
69	Ala	8.43	125.47	4.32	177.51	52.44	19.43
70	Gln	8.57	120.73	4.35	175.78	55.64	29.56

71	Ile	8.41	124.87	4.48	174.66	58.76	38.58
72	Pro	-	-	-	176.77	63.23	32.15
73	Gln	8.56	121.28	4.29	176.13	55.85	29.61
74	Arg	8.46	122.79	4.27	175.84	56.29	30.80
75	Gln	8.48	121.82	4.31	175.28	55.68	29.74
76	Tyr	8.41	122.43	4.60	175.12	57.57	38.97
77	Leu	8.26	126.16	4.62	174.92	52.67	42.03
78	Pro	-	-	-	176.77	63.25	31.93
79	Asn	8.57	118.22	4.66	175.23	53.24	38.61
80	Ser	8.20	115.99	4.40	173.88	58.31	63.82
81	His	8.49	120.33	4.98	171.82	53.33	28.58
83	Pro	-	-	-	176.96	62.97	32.01
84	Thr	8.40	116.19	4.30	174.42	62.15	69.79
85	Val	8.33	124.49	4.15	175.79	62.08	32.92
86	Val	8.42	126.28	4.08	175.88	62.24	32.73
87	Arg	8.57	126.59	4.35	175.80	55.72	30.85
88	Arg	8.54	124.45	4.61	174.24	53.94	30.15
89	Pro	-	-	-	176.38	63.10	32.14
90	Asn	8.60	119.16	4.64	175.09	52.94	38.52
91	Leu	8.30	123.02	4.27	176.88	55.22	42.39
92	His	8.51	118.80	4.98	172.10	53.09	29.01
93	Pro	-	-	-	176.88	63.18	32.28
94	Ser	8.52	116.47	4.43	174.00	58.27	63.80
95	Phe	8.29	122.46	4.69	175.03	57.60	39.90
96	Ile	8.05	124.28	4.07	175.02	60.53	38.89
97	Ala	8.35	129.09	4.29	177.20	52.13	19.20
98	Ile	8.29	123.13	4.44	174.40	58.42	38.68
100	Pro	-	-	-	176.90	62.73	32.16
101	Lys	8.41	121.93	4.25	176.61	56.31	33.23
102	Lys	8.46	123.67	4.33	176.48	56.27	33.15
103	Ile	8.36	123.80	4.16	176.22	61.07	38.66
104	Gln	8.59	125.17	4.34	175.50	55.86	29.54
105	Asp	8.47	122.53	4.59	175.71	54.22	40.56
106	Lys	8.33	121.75	4.32	176.15	56.26	33.11
107	Ile	8.26	123.43	4.14	175.91	61.06	38.50
108	Ile	8.44	127.29	4.19	175.91	60.43	38.41
109	Ile	8.48	128.91	4.49	174.59	58.24	38.34
110	Pro	-	-	-	176.92	63.17	32.22
111	Thr	8.35	115.53	4.33	174.82	61.86	69.83
112	Ile	8.34	124.06	4.21	176.87	61.26	38.71
113	Gly	8.64	113.48	4.00	174.79	45.37	-
114	Gly	8.34	108.81	3.98	174.38	45.31	-
115	Ser	8.32	115.21	4.37	174.79	58.42	63.65
116	His	8.61	119.86	4.67	174.22	55.22	28.49
117	His	8.51	118.88	4.66	174.20	55.26	28.83
118	His	8.73	120.00	4.70	174.21	55.28	29.19
119	His	8.81	120.71	4.70	174.01	55.41	29.12
120	His	8.67	120.87	4.66	173.57	55.55	29.33
121	His	8.50	125.78	4.46	178.95	57.24	29.86





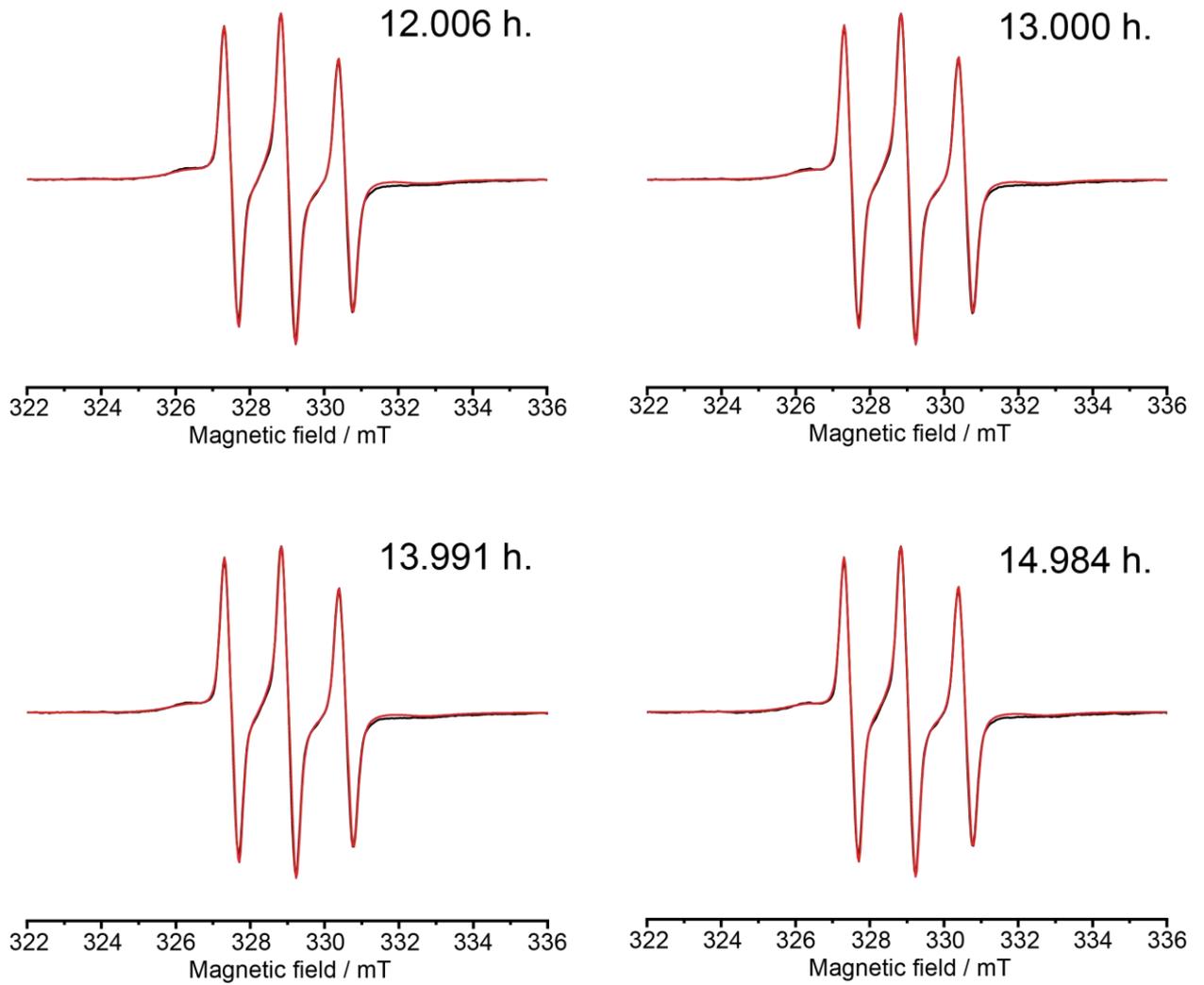


Рисунок П.1 – Экспериментальные спектры ЭПР (черным цветом) образца клеток A549 после их инкубации с 5.5 мкМ sRL2 (среднее отношение 1 к RL₂ равно 4). Значения времени в часах, приведенные на спектрах, отсчитываются с момента окончания инкубации клеток A549 с sRL2. Расчетные спектры (красным цветом) получены суперпозицией трех спектральных компонент (1-3), которые приведены на рисунке 2.18 (А), путем варьирования их весов. Соответствующая кинетика изменения суммарной интегральной интенсивности спектров, а также индивидуальной интегральной интенсивности каждой из трех компонент приведена на рисунке 2.22 (А).