

Полимераза β ограничивает скорость репарации одноцепочечных разрывов ДНК

Поздняков Е.М., Корнейчук А.Д., Рогачёва А. В., Васильев Г.А.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Аннотация. Разрывы, возникающие в ДНК и нарушающие её целостность, являются серьёзной угрозой для жизни клетки. Для их восстановления в клетке существует специальная система репарации, включающая в себя множество различных ферментов. Однако точные механизмы этого процесса в настоящее время до сих пор остаются неясными. В данной статье мы рассмотрели одноцепочечные разрывы ДНК, опираясь на уравнение Михаэлиса – Ментен и используя квазиравновесное приближение. Была разработана схема взаимодействия участников системы репарации, и для её проверки построена вычислительная модель в программном обеспечении COPASI. В результате работы была получена кинетика восстановления ДНК, а также были аппроксимированы известные экспериментальные данные. Мы показали, что в логарифмической шкале график зависимости концентрации полностью восстановленной ДНК от времени близок к сигмоиде. Было также показано, что ферментативная реакция полимеразы является ограничивающим фактором для скорости восстановления ДНК, а скорость работы $LIG3\alpha$ ограничена скоростью работы предшествующих ей ферментов. Являясь регулирующим звеном системы репарации ДНК, полимеразы оказывают управляющее влияние на поведение модели. В свою очередь, кинетические параметры для ферментов PARP1, PNKP и $LIG3\alpha$ должны обеспечивать скорости ферментативных реакций большие, чем скорость работы полимеразы.

Ключевые слова: репарация ДНК, кинетика Михаэлиса – Ментен, одноцепочечный разрыв, эксцизионная репарация, полимеразы, моделирование.

ВВЕДЕНИЕ

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) постоянно подвергается воздействию повреждающих факторов, таких как ионизирующее излучение (солнечная радиация, излучение земных радиоактивных элементов, таких как ^{137}Cs и ^{60}Co) [1, 2], химические вещества, содержащие активные формы кислорода [3], экстремальные температуры [4] и ультразвук [5]. Среди различных типов повреждений ДНК наиболее опасными являются одноцепочечные и двухцепочечные разрывы, нарушающие целостность ДНК [6]. Для сохранения стабильности генома подобные нарушения должны быть немедленно и эффективно устранены.

Разрывы ДНК могут возникать в результате повреждения фосфодиэфирных связей или азотистых оснований [6]. Основными типами являются одноцепочечный разрыв (ОЦР) [7] и двухцепочечный разрыв (ДЦР) [8].

Одноцепочечные разрывы (ОЦР) – это повреждения одной цепи двойной спирали ДНК. Обычно такого рода повреждения сопровождаются потерей одного нуклеотида и повреждением 5'- и/или 3'-концов ДНК в месте разрыва [9]. Постоянное присутствие хромосомных ОЦР без надлежащей репарации представляет собой серьёзную угрозу стабильности генома и выживанию клеток. Невосстановленные ОЦР в пролиферирующих клетках могут приводить к блокировке или схлопыванию вилок

репликации ДНК во время S фазы клеточного цикла, что, возможно, приводит к образованию ДЦР [3].

Базовый состав системы репарации включает: фермент, распознающий поврежденный участок и вносящий рядом с ним разрывы (ДНК-хеликаза), фермент, удаляющий поврежденный участок (ДНКаза), ДНК-полимеразу, ДНК-лигазу и ДНК-гликозилазы [10].

В настоящее время точные механизмы ОЦР до сих пор остаются неясными. Для выявления ключевых регуляторов этих систем был разработан ряд моделей. Авторы исследования [11] рассмотрели *in vivo* одноцепочечные разрывы ДНК в клетках HeLa, спровоцированные гамма-облучением с использованием ^{137}Cs , и попытались описать полученные результаты с помощью кинетической модели, основанной на законе действующих масс.

Система репарации ОЦР играет важную роль во многих процессах, связанных с делением клетки: старением [12], развитием онкологических заболеваний [13] и др. [3]. Таким образом, понимание ее механизмов имеет огромное значение для развития медицины.

При рассмотрении экспериментальных графиков, демонстрирующих зависимость доли восстановленной ДНК от времени, можно заметить, что зависимость в начале процесса близка к линейной, а затем выходит на насыщение [11]. Это, казалось бы, противоречит идее о том, что ДНК в процессе репарации переходит через множество состояний и сшивается лишь на последнем этапе. Действительно, если эксперимент фиксирует лишь конечное состояние ДНК, то ее количество не будет расти до тех пор, пока не будут пройдены все предшествующие состояния, т.е. график должен представлять собой сигмоиду. Наша модель показала, что зависимость действительно близка к сигмоидальной, но из-за крайне низкой скорости работы полимеразы длина левой ветви сигмоиды оказывается гораздо меньше длины правой ветви. По этой причине левая ветвь становится трудноразличимой на экспериментальном графике.

ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ

Известно, что в репарации одноцепочечных повреждений ДНК участвует огромное количество белков: PNKP обрабатывает 3'- и 5'-концы для последующих стадий процесса; различные ДНК-полимеразы ($\text{POL}\beta/\delta/\epsilon$) заполняют пробелы в ДНК, а затем лигаза ($\text{LIG1}/3\alpha$) сшивает цепь ДНК [11]. Известны два пути репарации ОЦР: восстановление с короткой заплаткой (*short-patch repair*) [14] и с длинной заплаткой (*long-patch repair*) [15]. При репарации с короткой заплаткой ферменты просто заполняют пробел ОЦР. Во время восстановления с длинной заплаткой удаляется неповрежденная часть цепи (несколько нуклеотидов) рядом с ОЦР (что требует привлечения нескольких дополнительных белков), а затем заполняется весь пробел. Кроме того, известно несколько белков, которые участвуют в процессе репарации, но не взаимодействуют с ОЦР напрямую. Среди них наиболее заметными являются PARP1 и XRCC1. PARP1 строит каркас из поли-АДФ-рибозы (PAR) вокруг точки разрыва. Этот каркас рекрутирует белок XRCC1, который, по-видимому, не обладает ферментативной активностью, но служит якорем (белком каркаса) для других ОЦР-белков, таких как $\text{LIG3}\alpha$ и PNKP [6].

Поли(АДФ-рибозо)полимеразы (PARP) представляют собой суперсемейство ферментов, которые используют НАД⁺ для модификации самих себя и других белков с помощью моно- или поли(АДФ-рибозы) [16]. PARP-1 является одним из ключевых участников раннего распознавания ОЦР; он также участвует во многих других процессах, включая репликацию ДНК [17], транскрипцию [18], ремоделирование хроматина [19] и гибель клеток [20]. Два гомологичных мотива цинковых пальцев,

расположенных на его NH₂-конце, способны распознавать и связываться с различными поврежденными структурами ДНК [18].

X-ray cross-complementing group 1 (XRCC1) представляет собой белок массой 70 кДа с тремя функциональными доменами. Белок XRCC1 вносит большой вклад в репарацию одноцепочечных разрывов в клетках млекопитающих благодаря своей способности взаимодействовать со множеством ферментов системы репарации ДНК [21].

Одной из первостепенных функций PAR, по-видимому, является рекрутирование XRCC1 на сайт ОЦР [11]. Предполагается взаимодействие PAR и с некоторыми другими белками (такими как POL β или LIG3 α); однако экспериментальные данные по этой теме неясны и обычно предполагают, что такие взаимодействия, если они существуют, не являются необходимыми для системы репарации ОЦР. Иногда также высказываются предположения о том, что PARP1 напрямую активирует несколько белков ОЦР (PNKP, POL β , LIG3 α) [6], но экспериментальные данные показывают, что отсутствие PARP1 не оказывает значительного воздействия на активность этих белков [11]. Поэтому мы предполагаем, что основная роль PARP1 заключается в построении каркаса PAR на сайте ОЦР, в то время как PAR необходим для рекрутирования XRCC1.

Все описанные взаимодействия и ферментативные реакции приведены на схеме (рис. 1).

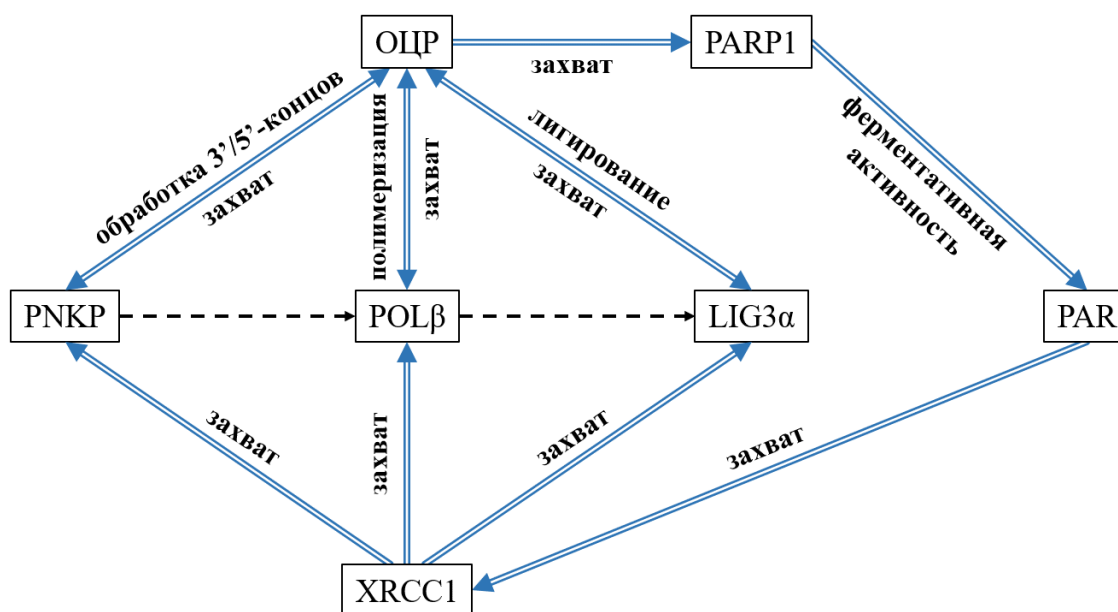


Рис. 1. Предполагаемая схема системы репарации ОЦР с короткой заплаткой.

Большинство белков, описываемых в модели, наблюдались одновременно на одном сайте ОЦР [11]. Это свидетельствует о том, что разные белки системы репарации взаимодействуют с разными частями сайта ОЦР и не конкурируют друг с другом. Следовательно, нет необходимости описывать отщепление фермента после того, как он сыграл свою роль в процессе репарации ОЦР.

Было показано, что XRCC1 образует комплекс с PNKP, POL β и LIG3 α [21]. Однако все эти ферменты сами по себе обладают некоторым сродством к ОЦР. Чтобы отразить это в нашей модели, мы предположили, что каждый из ферментов может взаимодействовать либо с сайтом ОЦР, либо с XRCC1, либо с ними обоими.

Восстановление ОЦР обычно длится от десятков до сотен минут [11], в то время как для всех белков, рассматриваемых в модели, равновесие между ОЦР и раствором достигается в течение нескольких секунд. Это позволяет предположить, что в любой

момент времени для каждого белка, участвующего в процессе репарации, система «ОЦР-раствор» находится в состоянии равновесия.

Модель основана на традиционной кинетике Михаэлиса – Ментен, т.е. скорость реакции линейно зависит от концентрации комплекса.

Превращения ДНК в модели происходят следующим образом (рис. 2): фермент PNKP обрабатывает повреждения на 3'/5'-концах (пришивает или отрезает фосфатную группу), которые не позволяют произвести полимеризацию ДНК. После этого полимеразы связывается с ДНК и достраивает отсутствующий участок. Наконец, лигаза сшивает 3'-конец достроенной ДНК с 5'-концом остальной ДНК.

Помимо этого, в модели также присутствует фермент PARP1, который пришивает поли-АДФ-рибозу (PAR) к поврежденному участку ДНК. С PAR связывается белок XRCC1, который способен связывать PNKP, полимеразу и лигазу, тем самым увеличивая их аффинность к сайту повреждения.

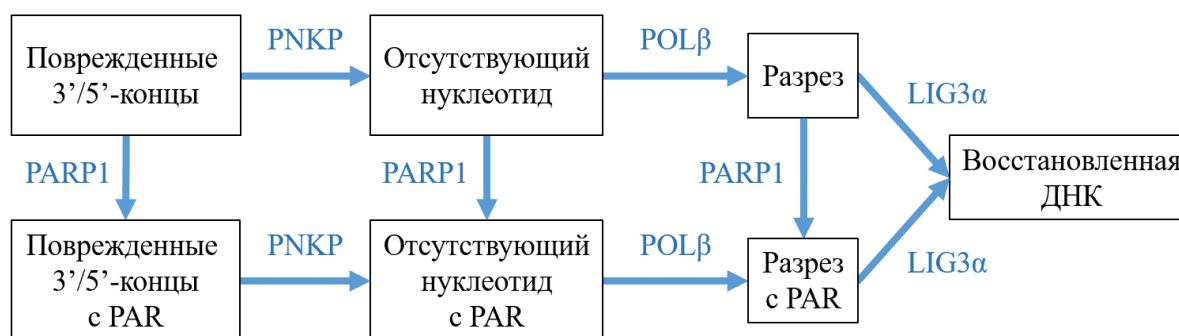


Рис. 2. Схема превращений ДНК в рамках модели.

Целью исследования является проверка гипотезы о том, что механизмы системы репарации ОЦР подчиняются предложенной схеме, изображенной на рисунке 2. Для проверки данной гипотезы была построена вычислительная модель.

МЕТОДЫ

Для описания всех превращений ДНК было использовано уравнение Михаэлиса – Ментен, которое в общем случае имеет вид:

$$\frac{d[P]}{dt} = V_{\max} \frac{[S]}{K + [S]}, \quad (1.1)$$

где $[S]$ – концентрация субстрата, $[P]$ – концентрация продукта, V_{\max} – максимальная скорость ферментативной реакции, K – константа Михаэлиса или константа диссоциации в зависимости от выбранного приближения.

Поскольку времена репарации одноцепочечного разрыва и эксцизионной репарации составляют часы [11], а выравнивание концентрации ферментов в ядре происходит гораздо быстрее, мы использовали квазиравновесное приближение. В таком случае в уравнении Михаэлиса – Ментен используется константа диссоциации:

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}, \quad (1.2)$$

где k_{+1} – скорость образования фермент-субстратного комплекса, k_{-1} – скорость распада фермент-субстратного комплекса.

Максимальная скорость реакции определяется по формуле:

$$V_{\max} = k_{cat} [E]_0, \quad (1.3)$$

где k_{cat} – каталитическая константа, $[E]_0$ – общая концентрация фермента.

Константы диссоциации в случае, когда ДНК связана с поли-АДФ-рибозой и способна связать XRCC1, оценивались нами по формуле:

$$K_{Enzyme+XRCC1} = \frac{1 + [XRCC1]_0 K_{XRCC1}}{K_{Enzyme} + [XRCC1]_0 K_{XRCC1} K_{Enzyme-XRCC1}} \quad (1.4)$$

где $K_{Enzyme+XRCC1}$ – эффективная константа диссоциации фермента и PAR-ДНК, K_{XRCC1} – константа диссоциации XRCC1 и ДНК, связанной с PAR, K_{Enzyme} – константа диссоциации фермента и поврежденной ДНК, $K_{Enzyme-XRCC1}$ – константа диссоциации фермента и XRCC1.

Итоговая система состоит из 7 уравнений и имеет вид:

$$\begin{aligned} \frac{dX_{ED}}{dt} &= -V_{PNKP} \frac{X_{ED}}{K_{PNKP} + X_{ED}} - V_{PARP1} \frac{X_{ED}}{K_{PARP1} + X_{ED}}, \\ \frac{dX_{MN}}{dt} &= V_{PNKP} \frac{X_{ED}}{K_{PNKP} + X_{ED}} - V_{POL} \frac{X_{MN}}{K_{POL} + X_{MN}} - V_{PARP1} \frac{X_{MN}}{K_{PARP1} + X_{MN}}, \\ \frac{dX_{Inc}}{dt} &= V_{POL} \frac{X_{MN}}{K_{POL} + X_{MN}} - V_{LIG} \frac{X_{Inc}}{K_{LIG} + X_{Inc}} - V_{PARP1} \frac{X_{Inc}}{K_{PARP1} + X_{Inc}}, \\ \frac{dX_{ED}^{PAR}}{dt} &= -V_{PNKP} \frac{X_{ED}^{PAR}}{K_{PNKP+XRCC1} + X_{ED}^{PAR}} + V_{PARP1} \frac{X_{ED}}{K_{PARP1} + X_{ED}}, \\ \frac{dX_{MN}^{PAR}}{dt} &= V_{PNKP} \frac{X_{ED}^{PAR}}{K_{PNKP+XRCC1} + X_{ED}^{PAR}} - V_{POL} \frac{X_{MN}^{PAR}}{K_{POL+XRCC1} + X_{MN}^{PAR}} + V_{PARP1} \frac{X_{MN}}{K_{PARP1} + X_{MN}}, \\ \frac{dX_{Inc}^{PAR}}{dt} &= V_{POL} \frac{X_{MN}^{PAR}}{K_{POL+XRCC1} + X_{MN}^{PAR}} - V_{LIG} \frac{X_{Inc}^{PAR}}{K_{LIG+XRCC1} + X_{Inc}^{PAR}} + V_{PARP1} \frac{X_{Inc}}{K_{PARP1} + X_{Inc}}, \\ \frac{dX_{IntDNA}}{dt} &= V_{LIG} \frac{X_{Inc}}{K_{LIG} + X_{Inc}} + V_{LIG} \frac{X_{Inc}^{PAR}}{K_{LIG+XRCC1} + X_{Inc}^{PAR}}. \end{aligned} \quad (1.5)$$

Здесь переменными X с различными индексами обозначены концентрации молекул ДНК, у которых есть соответствующие особенности, как то: X_{ED} – повреждение 3'/5'-концов (End Damage), X_{MN} – отсутствие нуклеотида (Missing Nucleotide), X_{Inc} – разрез (Incision), X_{IntDNA} – восстановленная ДНК (Intact DNA). Наличие верхнего индекса PAR указывает на то, что с данной формой ДНК связана поли-АДФ-рибоза (в случае восстановленной ДНК наличие поли-АДФ-рибозы уже не имеет значения, поэтому X_{IntDNA} включает в себя как ДНК, связанную с PAR, так и ДНК, PAR не имеющую). V_{Enzyme} – максимальная скорость соответствующего фермента, K_{Enzyme} – константа диссоциации фермента и поврежденной ДНК, $K_{Enzyme+XRCC1}$ – эффективная константа диссоциации фермента и PAR-ДНК. Параметры, присутствующие в модели, и их использованные значения приведены в таблице 1.

Моделирование производилось с использованием программного обеспечения COPASI, предназначенного для численного моделирования биохимических процессов. При построении кинетики процесса использовался детерминистический решатель LSODA с относительной устойчивостью 10^{-6} и абсолютной устойчивостью 10^{-12} .

Таблица 1. Параметры модели репарации одноцепочечного разрыва ДНК

Параметр	Описание	Значение	Источник
K_{PARP1}	Константа диссоциации фермента PARP1	6 нМ	[22]
V_{PARP1}	Максимально возможная скорость ферментативной реакции PARP1	$20 \text{ мкМ} \cdot 0.48 \text{ с}^{-1} = 9.6 \text{ мкМ/с}$	[23], [24]
K_{PNKP}	Константа диссоциации фермента PNKP	25 нМ	Предположено в данной работе
$K_{PNKP+XRCC1}$	Константа диссоциации фермента PNKP при наличии белка XRCC1; оценена, как было описано ранее (1.4)	13.1 нМ	[25]
V_{PNKP}	Максимально возможная скорость ферментативной реакции PNKP	$20 \text{ мкМ} \cdot 0.45 \text{ с}^{-1} = 9 \text{ мкМ/с}$	[26],[27]
K_{POL}	Константа диссоциации полимеразы	25 нМ	[28]
$K_{POL+XRCC1}$	Константа диссоциации полимеразы при наличии белка XRCC1; оценена, как было описано ранее (1.4)	14.3 нМ	[28]
V_{POL}	Максимально возможная скорость ферментативной реакции полимеразы	$19.8 \text{ нМ} \cdot 0.01 \text{ с}^{-1} = 0.198 \text{ нМ/с}$	[29], [30]
K_{LIG}	Константа диссоциации лигазы	400 нМ	[31]
$K_{LIG+XRCC1}$	Константа диссоциации лигазы при наличии белка XRCC1; оценена, как было описано ранее (1.4)	300 нМ	[32]
V_{LIG}	Максимально возможная скорость ферментативной реакции лигазы	$100 \text{ нМ} \cdot 0.57 \text{ с}^{-1} = 57 \text{ нМ/с}$	[33]
X_{ED0}	Начальная концентрация ДНК с повреждениями на 3'/5'-концах; начальные концентрации прочих форм ДНК были приняты равными нулю		

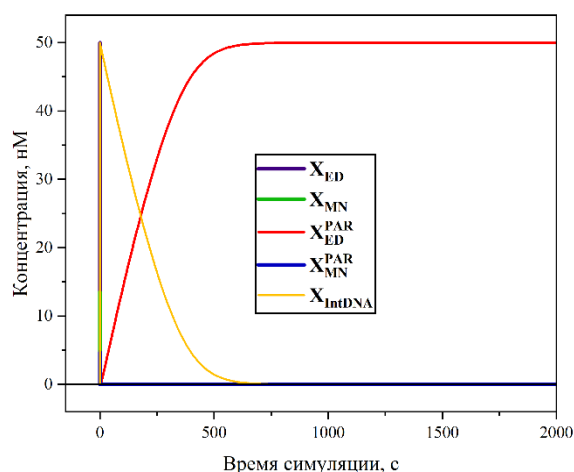
В эксперименте начальная концентрация повреждений ДНК часто не может быть измерена, поэтому при аппроксимации экспериментальных данных начальная концентрация поврежденной ДНК подбиралась при помощи встроенной функции COPASI Parameter Estimation. Этот же инструмент использовался для определения константы диссоциации полимеразы бета в одном из исследований. Благодаря использованию уравнения Михаэлиса – Ментен кинетика процесса монотонно зависит

от начальной концентрации поврежденной ДНК и константы диссоциации полимеразы. Это позволило нам использовать метод градиентного спуска (tolerance 10^{-6}).

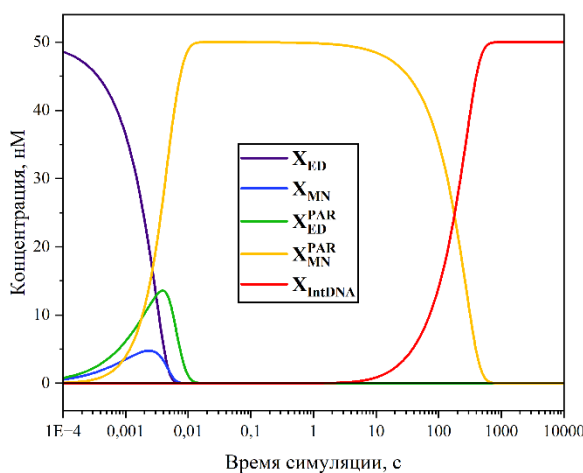
РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате работы программы были получены зависимости концентраций участников системы репарации от времени, а также были аппроксимированы экспериментальные данные из статей [11, 31].

Рассмотрим зависимость концентрации восстановленной ДНК от времени. Восстановлению разрыва в цепи предшествует серия реакций (обработка 3'- и 5'-концов, полимеризация ДНК, и т. д.), совершаемая большим количеством ферментов системы репарации, которая обязана занимать определенное время, из чего можно сделать предположение, что кривая изменения концентрации восстановленных разрывов ДНК должна иметь сигмоидальный вид. Однако экспериментальные данные (рис. 4, [11]) на первый взгляд не подтверждают данное предположение, демонстрируя линейную зависимость вблизи нуля.



А



Б

Рис. 3. Пример результатов моделирования. Зависимость концентраций некоторых состояний ДНК системы от времени. Фиолетовый – ДНК с повреждениями на 3'/5'-концах; синий – ДНК с отсутствующим нуклеотидом; зеленый – PAR-ДНК с повреждениями на 3'/5'-концах; желтый – PAR-ДНК с отсутствующим нуклеотидом; красный – восстановленная ДНК. Результат одной и той же симуляции приведен в линейной (А) и логарифмической (Б) шкалах по времени. Начальная концентрация поврежденной ДНК была взята равной 50 нМ.

На графике (рис. 3,А) представлены зависимости концентраций некоторых состояний ДНК от времени, рассчитанные с помощью нашей модели (начальная концентрация ДНК

с повреждениями на 3'/5' концах равна 50 нМ). Как видно, большую часть симуляции наблюдаются лишь лишенная нуклеотида ДНК в комплексе с PAR и восстановленная ДНК, в то время как прочие формы ДНК почти полностью отсутствуют. При этом концентрация X_{MN}^{PAR} очень резко возрастает в самом начале симуляции, а концентрация исправленной ДНК линейно растет вблизи нуля, что соответствует экспериментальным данным (рис. 4, [11], рис. 5 [35]).

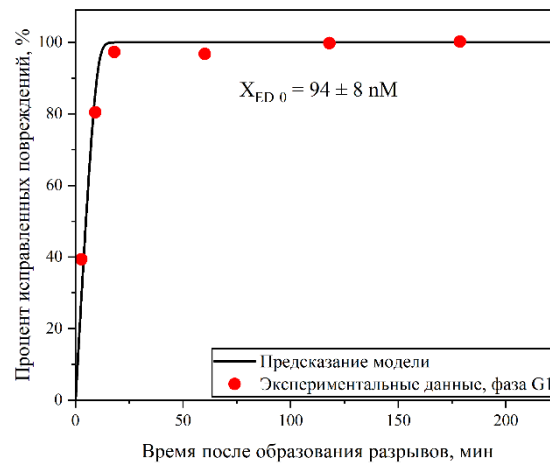
Совершенно иная картина предстает перед нами, если построить тот же график в логарифмической шкале по времени (рис. 3,Б). Как видно, в первые миллисекунды симуляции происходит резкий спад концентрации ДНК в начальном состоянии, рост концентрации лишенной нуклеотида ДНК, связанной с PAR, а также наблюдаются пики некоторых промежуточных состояний ДНК. При этом в первую секунду симуляции концентрация полностью исправленной ДНК близка к нулю, и график зависимости ее концентрации от времени в логарифмической шкале близок к сигмоиде. Наблюдаемый эффект можно объяснить следующим образом: ферменты PNKP и LIG3 α имеют высокие активности (0.45 и 0.57 с⁻¹, соответственно), в то время как полимеразы бета имеет низкую активность (порядка 0.01 с⁻¹) и концентрацию (19.8 нМ против 20 мкМ и 100 нМ у PNKP и лигазы). Из-за этого именно ферментативная реакция полимеразы является ограничивающим фактором для скорости восстановления ДНК. Поэтому реакция, катализируемая PNKP, происходит с огромной скоростью, и ДНК почти сразу переходит в состояние X_{MN} , требующее полимеразы. Когда же полимеразы пришивает отсутствующий нуклеотид, лигаза также с огромной скоростью сшивает ДНК, окончательно ее восстанавливая. Таким образом, скорость работы лигазы ограничена скоростью появления ДНК, требующей лигирования, а концентрация такой ДНК всегда мала, поскольку она появляется медленно и почти сразу же восстанавливается лигазой.

Мы еще не говорили про роль PARP1 в системе репарации, но, как мы можем видеть из изменения концентраций X_{ED} , X_{MN} , X_{ED}^{PAR} и X_{MN}^{PAR} (рис. 3,Б), основная активность этого фермента также приходится на первую секунду после возникновения повреждения, и почти вся ДНК, лишенная нуклеотида, оказывается сразу связанной с PAR.

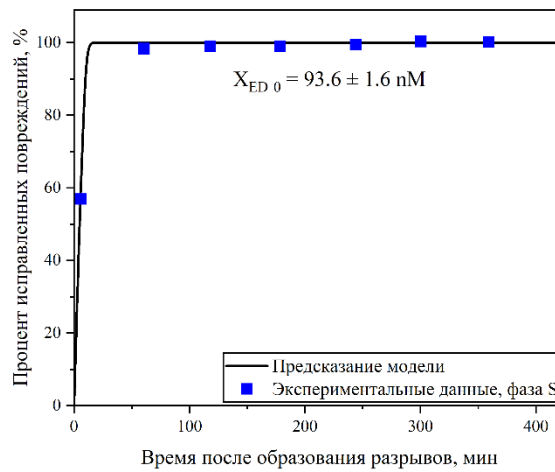
В эксперименте начальная концентрация повреждений ДНК часто не может быть измерена, из-за чего этот параметр необходимо оценивать по динамике репарации ДНК. Это верно, например, в случае, описанном Godon et al. [11]. В статье рассматривается репарация ДНК после облучения лазером, которое может вызывать как самостоятельные одноцепочечные разрывы, так и повреждение оснований, требующее эксцизионной репарации [34]. Тем не менее, графики зависимости количества целой ДНК от времени также имеют линейный характер вблизи нуля, что указывает на то, что аппарат эксцизионной репарации тоже работает с высокой скоростью и ограничен лишь полимеразой. Это позволяет использовать нашу модель для описания процессов репарации ОЦР и эксцизионной репарации, протекающих одновременно, поскольку времена образования ДНК, лишенной нуклеотида, имеют в них, по всей видимости, один порядок, гораздо меньший порядка времен работы полимеразы.

Поскольку концентрация ДНК является подбираемым параметром в модели, а в эксперименте известна лишь относительная концентрация, экспериментальные данные были нормированы (и выражены в процентах для удобства).

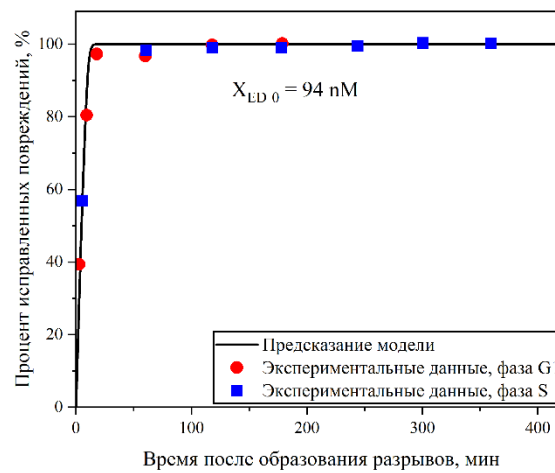
Была произведена попытка воспроизвести экспериментальные данные из статьи Godon et al. [11] при помощи построенной модели (рис. 4,А–В) путем подбора начальной концентрации поврежденной ДНК (все кинетические параметры фиксированы и имеют найденные в литературе значения). Как видно из рисунков 4,А–В, модель с высокой точностью воспроизводит экспериментальные данные для клеток фазах G1 и S. Можно заметить, что полученные значения концентрации поврежденной ДНК для данных G1 и S фаз совпадают друг с другом в пределах погрешностей, что соответствует одинаковым условиям облучения клеток, достигнутым в эксперименте.



А

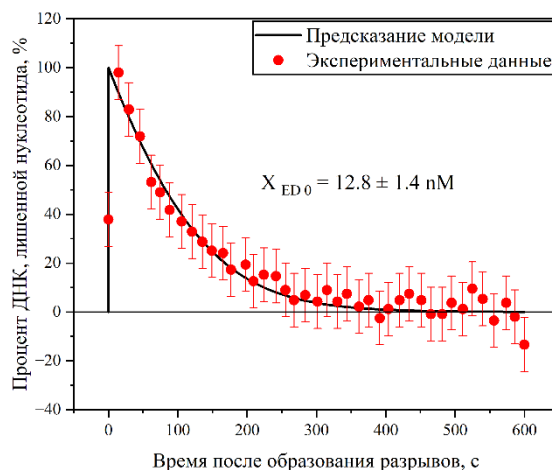


Б

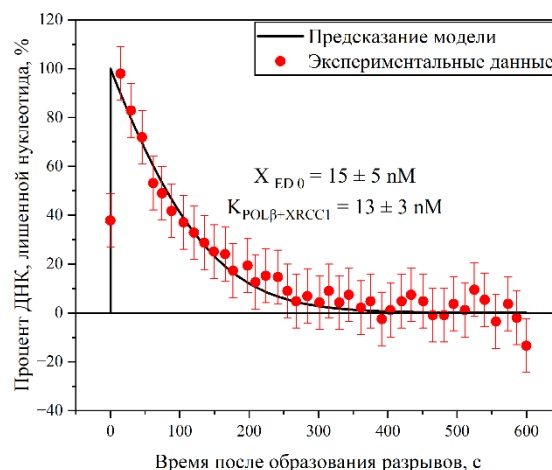


В

Рис. 4 Аппроксимация экспериментальных данных, взятых из [11], построенной нами моделью. Зависимость нормированного количества восстановленной ДНК от времени. **(А)** Эксперимент в фазе G1. **(Б)** Эксперимент в фазе S. **(В)** Оба набора экспериментальных данных и результат симуляции при начальной концентрации ДНК 94 нМ.



А



Б

Рис. 5 Аппроксимация экспериментальных данных, взятых из [35], построенной моделью. Зависимость нормированного количества полимеразы β , связанной с поврежденной ДНК, от времени. (А) Аппроксимация подбором начальной концентрации поврежденной ДНК. (Б) Аппроксимация подбором начальной концентрации поврежденной ДНК и константы диссоциации полимеразы с PAR-ДНК.

В статье Koczor et al. [35] были получены экспериментальные данные о количестве полимеразы бета, связанной с поврежденной ДНК, в зависимости от времени, прошедшего после образования повреждений. В рамках используемого нами квазиравновесного приближения концентрация связанной с ДНК полимеразы пропорциональна количеству ДНК, лишенной сахара. Поэтому по количеству связанной полимеразы мы можем судить о количестве ДНК, лишенной сахара. Это позволяет произвести аппроксимацию экспериментальных данных при помощи построенной нами модели (рис. 5).

Поскольку полимеразы имеют аффинность к неповрежденной ДНК [36], за ноль в экспериментальных данных было взято плато, на которое выходит количество связанной с ДНК полимеразы. Построенная нами модель предсказывает, что количество ДНК, лишенной нуклеотида и связанной с поли-АДФ-рибозой, в некоторый момент приближается к общему количеству всей поврежденной ДНК (рис. 5,А), поэтому при нормировании за 100 % была взята экспериментальная точка с наибольшей концентрацией. Проведенные манипуляции позволили нам провести сравнение экспериментальных данных с данными модели.

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как видно из рисунка 5,А, построенная модель позволяет с хорошей точностью воспроизвести экспериментальные данные. Как говорилось ранее, значения коэффициента диссоциации ферментов при наличии белка XRCC1 были оценены в данной работе по формуле (1.4). Чтобы проверить достоверность этой формулы, приведенные экспериментальные данные были использованы для подбора константы диссоциации полимеразы (рис. 5,Б) (при этом также подбиралась начальная концентрация поврежденной ДНК, поскольку это значение неизвестно). Определенное таким образом значение $K_{POL+XRCC1}$ составило 13 ± 3 нМ против определенного нами по формуле 14.3 нМ. Как видно, значения совпадают в пределах погрешности. Таким образом, используемая формула позволила получить верное значение эффективной константы диссоциации полимеразы и ДНК, связанной с PAR.

Согласно полученным результатам, полимеразы бета оказываются регулирующим звеном системы репарации ДНК, и ее параметры будут являться управляющими параметрами модели. На фоне POL β параметры для PARP1, PNKP и LIG имеют меньшее влияние и основное требование к ним для корректной аппроксимации экспериментальных данных – обеспечивать достаточно высокие скорости соответствующих ферментативных реакций. Это позволяет использовать предложенную модель для описания одновременно протекающих процессов восстановления ОЦР и эксцизионной репарации, поскольку времена достижения состояния ДНК, лишенной нуклеотида, имеют в них, по всей видимости, один порядок, гораздо меньший порядка времен работы полимеразы.

На данный момент модель имеет определённые ограничения. Во-первых, для наиболее полной и корректной аппроксимации экспериментальных данных нужно учитывать участников системы эксцизионной репарации ДНК (и вводить соответствующие уравнения и параметры). Во-вторых, модель является гомогенной в пространстве, что не позволяет исследовать пространственную динамику репарации ДНК. В-третьих, модель имеет существенный риск перепараметризации из-за малой чувствительности формы экспериментальной кривой к изменению некоторых из параметров. Наконец, в модели используется квазиравновесное приближение, однако скорости работы ферментов PARP1 и PNKP достаточно велики.

Тем не менее, уже на данный момент модель способна корректно описывать кинетику репарации ДНК [11, 35] (рис. 4, 5) и предсказывать начальную концентрацию поврежденной ДНК, которую сложно достоверно определить при проведении эксперимента.

Дальнейшие перспективы развития модели касаются, в первую очередь, её исследования с помощью методов нелинейной динамики (например, проведении бифуркационного анализа). Также возможно заложить в неё физические и геометрические параметры и законы, что позволит исследовать пространственную динамику репарации ДНК.

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов выражает благодарность Свешниковой А.Н. за консультации по данной научной работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sutherland B.M., Bennett P.V., Sidorkina O., Laval J. Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks. *Biochemistry*. 2000. V. 39. № 27. P. 8026–8031. doi: [10.1021/bi9927989](https://doi.org/10.1021/bi9927989)

2. Plumb M.A., Smith G.C.M., Cunniffe S.M.T., Jackson S.P., O'NEILL P. DNA-PK activation by ionizing radiation-induced DNA single-strand breaks. *Int. J. Radiat. Biol.* 1999. V. 75. № 5. P. 553–561. doi: [10.1080/095530099140195](https://doi.org/10.1080/095530099140195)
3. Caldecott K.W. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat. Rev. Genet.* 2008. V. 9. № 8. P. 619–631. doi: [10.1038/nrg2380](https://doi.org/10.1038/nrg2380)
4. Yao C.-L., Somero G.N. The impact of acute temperature stress on hemocytes of invasive and native mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus californianus*): DNA damage, membrane integrity, apoptosis and signaling pathways. *J. Exp. Biol.* 2012. V. 215. № 24. P. 4267–4277. doi: [10.1242/jeb.073577](https://doi.org/10.1242/jeb.073577)
5. Miller D.L., Reese J.A., Frazier M.E. Single strand DNA breaks in human leukocytes induced by ultrasound *in vitro*. *Ultrasound Med. Biol.* 1989. V. 15. № 8. P. 765–771. doi: [10.1016/0301-5629\(89\)90117-8](https://doi.org/10.1016/0301-5629(89)90117-8)
6. Abbotts R., Wilson D.M. Coordination of DNA single strand break repair. *Oxidative DNA Damage Repair*. 2017. V. 107. P. 228–244. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.039](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.039)
7. Caldecott K.W. DNA single-strand breaks and neurodegeneration. *DNA Repair*. 2004. V. 3. № 8. P. 875–882. doi: [10.1016/j.dnarep.2004.04.011](https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.04.011)
8. Provasek V.E., Mitra J., Malojirao V.H., Hegde M.L. DNA Double-Strand Breaks as Pathogenic Lesions in Neurological Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 9. doi: [10.3390/ijms23094653](https://doi.org/10.3390/ijms23094653)
9. Caldecott K.W. DNA single-strand break repair. *Experimental Cell Research*. 2014. V. 329. № 1. P. 2–8. doi: [10.1016/j.yexcr.2014.08.027](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.08.027)
10. Fortini P., Dogliotti E. Base damage and single-strand break repair: Mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair*. 2007. V. 6. № 4. P. 398–409. doi: [10.1016/j.dnarep.2006.10.008](https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.008)
11. Godon C., Cordelières F.P., Biard D., Giocanti N., Mégnin-Chanet F., Hall J., Favaudon V. «PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. *Nucleic Acids Res.* 2008. V. 36. № 13. P. 4454–4464. doi: [10.1093/nar/gkn403](https://doi.org/10.1093/nar/gkn403)
12. Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993. V. 90. № 17. P. 7915–7922. doi: [10.1073/pnas.90.17.7915](https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.7915)
13. Pooley K.A., Baynes C., Driver K.E., Tyrer J., Azzato E.M., Pharoah P.D.P., Easton D.F., Ponder B.A.J., Dunning A.M. Common Single-Nucleotide Polymorphisms in DNA Double-Strand Break Repair Genes and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2008. V. 17. № 12. P. 3482–3489. doi: [10.1158/1055-9965.EPI-08-0594](https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0594)
14. Dianov G., Price A., Lindahl T. Generation of single-nucleotide repair patches following excision of uracil residues from DNA. *Mol. Cell. Biol.* 1992. V. 12. № 4. P. 1605–1612. doi: [10.1128/mcb.12.4.1605-1612.1992](https://doi.org/10.1128/mcb.12.4.1605-1612.1992)
15. Frosina G., Fortini P., Rossi O., Carrozzino F., Raspaglio G., Cox L.S., Lane D.P., Abbondandolo A., Dogliotti E. Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 16. P. 9573–9578. doi: [10.1074/jbc.271.16.9573](https://doi.org/10.1074/jbc.271.16.9573)
16. Pascal J.M. The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage. *DNA Repair*. 2018. V. 71. P. 177–182. doi: [10.1016/j.dnarep.2018.08.022](https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.022)
17. Gibson B.A., Kraus W.L. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 13. № 7. P. 411–424. 2012. doi: [10.1038/nrm3376](https://doi.org/10.1038/nrm3376)
18. Kraus W.L., Hottiger M.O. PARP-1 and gene regulation: Progress and puzzles. *Molecular Aspects of Medicine*. 2013. V. 34. № 6. P. 1109–1123. doi: [10.1016/j.mam.2013.01.005](https://doi.org/10.1016/j.mam.2013.01.005)
19. Waldman M., Nudelman V., Shainberg A., Abraham N.G., Kornwoski R., Aravot D., Arad M., Hochhauser E. PARP-1 inhibition protects the diabetic heart through activation

- of SIRT1-PGC-1 α axis». *Exp. Cell Res.* 2018. V. 373. № 1. P. 112–118. doi: [10.1016/j.yexcr.2018.10.003](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.10.003)
20. Wang Y., Luo W., Wang Y. PARP-1 and its associated nucleases in DNA damage response. *DNA Repair.* 2019. V. 81. P. 102651. doi: [10.1016/j.dnarep.2019.102651](https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102651)
 21. Whitehouse C.J., Taylor R.M., Thistlethwaite A., Zhang H., Karimi-Busheri F., Lasko D.D., Weinfeld M., Caldecott K.W. XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell.* 2001. V. 104. № 1. P. 107–117. doi: [10.1016/s0092-8674\(01\)00195-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00195-7)
 22. Sukhanova M.V., Abrakhi S., Joshi V., Pastre D., Kutuzov M.M., Anarbaev R.O., Curmi P.A., Hamon L., Lavrik O.I. Single molecule detection of PARP1 and PARP2 interaction with DNA strand breaks and their poly(ADP-ribosylation) using high-resolution AFM imaging. *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. № 6. P. e60. doi: [10.1093/nar/gkv1476](https://doi.org/10.1093/nar/gkv1476)
 23. Simonin F., Poch O., Delarue M., de Murcia G. Identification of potential active-site residues in the human poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 12. P. 8529–8535. doi: [10.1016/S0021-9258\(18\)52907-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)52907-0)
 24. Bell N.A.W., Haynes P.J., Brunner K., de Oliveira T.M., Flocco M.M., Hoogenboom B.W., Molloy J.E. Single-molecule measurements reveal that PARP1 condenses DNA by loop stabilization. *Sci. Adv.* 2021. V. 7. № 33. doi: [10.1126/sciadv.abf3641](https://doi.org/10.1126/sciadv.abf3641)
 25. London R.E. The structural basis of XRCC1-mediated DNA repair. *DNA Repair.* 2015. V. 30. P. 90–103. doi: [10.1016/j.dnarep.2015.02.005](https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.02.005)
 26. Aceytuno R.D., Pielt C.G., Havali-Shahriari Z., Edwards R.A., Rey M., Ye R., Javed F., Fang S., Mani R., Weinfeld M. et al. Structural and functional characterization of the PNKP-XRCC4-LigIV DNA repair complex. *Nucleic Acids Res.*, V. 45. № 10. P. 6238–6251. 2017. doi: [10.1093/nar/gkx275](https://doi.org/10.1093/nar/gkx275)
 27. Srivastava P., Sarma A., Chaturvedi C.M. Targeting DNA repair with PNKP inhibition sensitizes radioresistant prostate cancer cells to high LET radiation. *PLOS ONE.* 2018. V. 13. № 1. P. e0190516. doi: [10.1371/journal.pone.0190516](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190516)
 28. Moor N.A., Vasil'eva I.A., Anarbaev R.O., Antson A.A., Lavrik O.I. Quantitative characterization of protein-protein complexes involved in base excision DNA repair. *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. № 12. P. 6009–6022. doi: [10.1093/nar/gkv569](https://doi.org/10.1093/nar/gkv569)
 29. Kumar A., Reed A.J., Zahurancik W.J., Daskalova S.M., Hecht S.M., Suo Z. Interlocking activities of DNA polymerase β in the base excision repair pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2022. V. 119. № 10. P. e2118940119. doi: [10.1073/pnas.2118940119](https://doi.org/10.1073/pnas.2118940119)
 30. Sokhansanj B.A., Rodrigue G.R., Fitch J.P., Wilson III D.M. A quantitative model of human DNA base excision repair. I. mechanistic insights. *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. № 8. P. 1817–1825. doi: [10.1093/nar/30.8.1817](https://doi.org/10.1093/nar/30.8.1817)
 31. Cotner-Gohara E., Kim I.-K., Hammel M., Tainer J.A., Tomkinson A.E., Ellenberger T. Human DNA ligase III recognizes DNA ends by dynamic switching between two DNA-bound states. *Biochemistry.* 2010. V. 49. № 29. P. 6165–6176. doi: [10.1021/bi100503w](https://doi.org/10.1021/bi100503w)
 32. Hammel M., Rashid I., Sverzhinsky A., Pourfarjam Y., Tsai M.-S., Ellenberger T., Pascal J.M., Kim I.-K., Tainer J.A., Tomkinson A.E. An atypical BRCT-BRCT interaction with the XRCC1 scaffold protein compacts human DNA Ligase III α within a flexible DNA repair complex. *Nucleic Acids Res.*, 2021. V. 49. № 1. P. 306–321. doi: [10.1093/nar/gkaa1188](https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1188)
 33. McNally J.R., O'Brien P.J. Kinetic analyses of single-stranded break repair by human DNA ligase III isoforms reveal biochemical differences from DNA ligase I. *J. Biol. Chem.* 2017. V. 292. № 38. P. 15870–15879. doi: [10.1074/jbc.M117.804625](https://doi.org/10.1074/jbc.M117.804625)
 34. Ward J.F. Nature of Lesions Formed by Ionizing Radiation. In: *DNA Damage and Repair: Volume 2: DNA Repair in Higher Eukaryotes*. Eds. J.A. Nickoloff, M.F. Hoekstra. Totowa, NJ: Humana Press, 1998. P. 65–84. doi: [10.1007/978-1-59259-455-9_5](https://doi.org/10.1007/978-1-59259-455-9_5)

35. Koczor C.A, Saville K.M., Andrews J.F., Clark J., Fang Q., Li J., Al-Rahahleh R.Q., Md Ibrahim, McClellan S., Makarov M.V., Migaud M.E., Sobol R.W. Temporal dynamics of base excision/single-strand break repair protein complex assembly/disassembly are modulated by the PARP/NAD(+)/SIRT6 axis. *Cell Rep.* 2021. V. 37. № 5. P. 109917. doi: [10.1016/j.celrep.2021.109917](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109917)
36. Howard M.J., Horton J.K., Zhao M.-L., Wilson S.H. Lysines in the lyase active site of DNA polymerase β destabilize nonspecific DNA binding, facilitating searching and DNA gap recognition. *J. Biol. Chem.* 2020. V. 295. № 34. P. 12181–12187. doi: [10.1074/jbc.RA120.013547](https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013547)

Рукопись поступила в редакцию 13.01.2023, переработанный вариант поступил 25.06.2023.
Дата опубликования 05.08.2023.

===== MATHEMATICAL MODELING =====

Polymerase β Limits the Rate of DNA Single-Strand Break Repair

Pozdnyakov E.M., Korneichuk A.D., Rogacheva A.V., Vasilev G.A.

Moscow State University M.V. Lomonosov, Moscow, Russia

Abstract. Breaks that appear in DNA and violate its integrity are a serious threat to the life of the cell. There is a special repair system for their recovery, which includes many different enzymes. However, the exact mechanisms of this process are currently still unclear. In this article, we considered single-strand discontinuities based on the Michaelis–Menten equation and using the quasi-equilibrium approximation. A scheme of interaction between the mechanisms of the reparation system was developed and a computational model was built in the COPASI software to verify it. As a result of the work, the dependences of the concentrations of the participants in the repair system were obtained, and the known experimental data were also approximated. We observed that the plot with a logarithmic scale of fully corrected DNA concentration versus time is close to a sigmoid. We obtained that, the polymerase enzymatic reaction is the limiting factor for the rate of DNA repair and the rate of ligase operation is limited by the rate of DNA appearance. Being a regulatory link in the DNA repair system, polymerase and its parameters exert a control influence on the rest of the model parameters. In turn, the parameters for PARP1, PNKP, and LIG3 α should provide rates of enzymatic reactions higher than the rate of polymerase operation.

Key words: DNA repair, Michaelis–Menten kinetics, single strand break, base excision repair, POLbeta, model.