

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ**

На правах рукописи

Коваль Владимир Васильевич

**Динамическая пластичность ДНК-гликозилаз и эндонуклеаз в комплексах с ДНК:
кинетические и структурные особенности**

1.4.9. Биоорганическая химия
1.5.3. Молекулярная биология

Диссертация
на соискание учёной степени
доктора химических наук

Научный консультант:
д.х.н., чл.-корр. РАН Пышный Дмитрий Владимирович

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 5 |
| ВВЕДЕНИЕ | 9 |
| ГЛАВА 1. СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЛИКОЗИЛАЗ С ДНК НА ПРИМЕРЕ ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗЫ OGG1 человека (обзор литературы)..... | 18 |
| 1.1. Пути накопления 8-охоГ в ДНК и их значение в регуляции экспрессии генов | 18 |
| 1.2. Химический механизм действия hOGG1 | 21 |
| 1.3. Структура каталитически неактивного мутанта K249Q hOGG1 | 22 |
| 1.4. Комплекс каталитически активного hOGG1 со «СТОП»-субстратом | 30 |
| 1.5. Изменение структуры hOGG1 при связывании ДНК..... | 34 |
| 1.6. Роль ASP268 в каталитической активности hOGG1 | 40 |
| 1.7. Роль остатков цистеина в функционировании hOGG1 | 45 |
| 1.8. Влияние других аминокислотных остатков на эксцизионную активность OGG1.... | 46 |
| 1.9. Механизм узнавания поврежденного основания..... | 47 |
| 1.9.1. Структурные особенности, влияющие на то, который из ферментов – OGG1 или Fpg осуществит репарацию 8-охоГ | 58 |
| 1.9.2. Узнавание 8-охоА-содержащего ДНК-субстрата..... | 62 |
| 1.9.3. Узнавание и вырезание 2,6-диамино-4-оксо-5-формаимидопиридина (FapyG) 63 | |
| 1.9.4. Устранение кластерных повреждений | 66 |
| 1.10. Структура комплекса hOGG1 с ДНК, без выворачивания 8-охоГ из двойной спирали, имитирующая начальные стадии взаимодействия фермента с мишенью в ДНК 68 | |
| 1.11. Что еще известно о механизме химического взаимодействия hOGG1 с субстратом 71 | |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 76 |
| ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ..... | 79 |
| 2.1. Материалы..... | 79 |
| 2.2. Стандартные буферы и смеси..... | 80 |
| 2.3. Методы..... | 80 |
| 2.3.1. Выделение плазмидной ДНК..... | 80 |
| 2.3.2. ДНК-субстраты для исследования эндонуклеазной активности ферментов | 81 |
| 2.3.3. Синтез и выделение модифицированных олигонуклеотидов | 82 |
| 2.3.3.1. Олигонуклеотиды с апуриновым/апириимидиновым сайтом..... | 82 |

| | |
|--|-----|
| 2.3.3.2. Получение 8-бромгуанина | 82 |
| 2.3.4. Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантного белка hOgg1 | 83 |
| 2.3.5. Экспрессия, выделение и очистка формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы Fpg84 | |
| 2.3.6. Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантного белка hNEIL2 | 85 |
| 2.3.7. Определение концентраций Fpg и hOGG1 и доли активного фермента | 87 |
| 2.3.8. Выделение и очистка рекомбинантного белка Apr1 из <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .87 | |
| 2.3.9. Нарботка, выделение и очистка рекомбинантны белков - эндонуклеазы APE1 дикого типа и ее мутантных форм..... | 89 |
| 2.3.9. Сайт-направленный мутагенез остатка Asn-212 в составе эндонуклеазы APE1 | 90 |
| 2.3.10. Нарботка, выделение и характеристика белка Cas9 | 91 |
| 2.3.11. Электрофорез в системе Лэммли..... | 92 |
| 2.3.12. Определение температуры плавления ДНК-дуплексов..... | 92 |
| 2.3.13. Компьютерное моделирование комплексов hOgg1 с ДНК-субстратами..... | 93 |
| 2.3.14. AP-эндонуклеазная активность эндонуклеазы APE1 | 94 |
| 2.3.15. Определение доли активной эндонуклеазы APE1 при титровании лигандом..... | 94 |
| 2.3.16. Электрофоретический анализ накопления продуктов разрезания [³² P]-меченых ДНК-субстратов эндонуклеазой APE1..... | 95 |
| 2.3.17. Определение величин констант K_M и k_{cat} для WT APE1 по теории графов..... | 98 |
| 2.3.18. Изучение кинетических характеристик взаимодействия APE1 N212D и N212A с ДНК-субстратами, содержащими остаток 2-аминопурина..... | 99 |
| 2.3.19. Исследование стабильности комплексов эндонуклеазы APE1 с продуктами превращения специфических ДНК-субстратов | 99 |
| 2.3.20. Эксперименты по водородно-дейтериевому обмену с последующей масс- спектрометрией hNEIL2 | 100 |
| 2.3.21. Эксперименты по водородно-дейтериевому обмену с последующей масс- спектрометрией SpCas9 и комплекса SpCas9 с sgРНК..... | 102 |
| 2.3.22. Компьютерное моделирование hNEIL2 и Cas9..... | 103 |
| 2.3.22.1 Компьютерное моделирование hNEIL2 | 103 |
| 2.3.22.2. SpCas9, SpCas9-sgРНК и SpCas9-sgРНК-ДНК..... | 104 |
| 2.3.23. Синтез и очистка химерной sgRNA для комплекса Cas9. Оценка нецелевой и целевой активности белка Cas9 на ДНК плазмидных субстратах | 105 |
| 2.3.24. Определение скорости образования комплекса Cas9-sgRNA. | 105 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ..... | 106 |
| 3.1. Взаимодействие ферментов репарации Fpg <i>E. coli</i> и Ogg1 человека с ДНК- субстратами | 106 |
| 3.1.1. Взаимодействие Fpg <i>E. coli</i> с ДНК субстратами | 106 |

| | |
|---|-----|
| 3.1.2. Кинетика узнавания и разрезания субстрата ферментом hOGG1 | 116 |
| 3.1.3. Влияние экзогенного свободного 8-BrG на взаимодействие hOGG1 с ДНК- дуплексами, содержащими AP и 8-охоG поврежденные основания напротив цитидина | 118 |
| 3.1.4. Процессинг повреждений ДНК мутантными формами hOGG1 | 120 |
| 3.1.5. Динамика репарации 8-охоG под действием hOGG1 по данным регистрации FRET 124 | |
| 3.1.6. Структурные маркеры для узнавания 8-оксогуанина в комплексе с 8-охоG- Clamp эндонуклеазой hOGG1 | 131 |
| 3.2. Структурная динамика узнавания субстратов апуриновой/ апириимидиновой эндонуклеазой человека APE1 | 141 |
| 3.2.1. Получение предстационарных кинетических характеристик для взаимодействия APE1 с AP- и F-содержащими субстратами | 143 |
| 3.2.2. Регистрация конформационной динамики AP- и F-содержащих ДНК- субстратов в комплексе с APE1 | 147 |
| 3.2.3. Функциональность остатка Asn212 активного центра APE1 в механизме катализа | 150 |
| 3.2.4. Моделирование методом МД комплекса APE1 с ДНК-дуплексом, содержащим аддукт бенз[а]пирена с гуанином и AP-сайт | 156 |
| 3.2.5. Кинетический механизм конформационных изменений и каталитической активности APE1 в ходе репарации NIR | 159 |
| 3.2.5.1. Использование мутантных форм белка APE1 K98R и NΔ61APE1 для определения кинетического механизма в процессе NIR | 164 |
| 3.3. Кинетические закономерности взаимодействия Apr1 нуклеазы из <i>Saccharomyces cerevisiae</i> с ДНК-субстратами | 176 |
| 3.3.1. Роль остатка His83 эндонуклеазы Apr1 из <i>Saccharomyces cerevisiae</i> в каталитическом выщеплении AP-сайта | 177 |
| 3.3.2. Кинетические и структурные особенности вовлечения эндонуклеазы Apr1 из <i>S. cerevisiae</i> в NIR репарацию | 183 |
| 3.4. Структура NEIL2 человека по данным HDX-MS | 188 |
| 3.5. Конформационные изменения эндонуклеазы Cas9, выявленные методом HDX-MS 196 | |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 210 |
| ВЫВОДЫ | 212 |
| СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ: | 215 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 219 |
| Приложение 1 | 253 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

| | |
|--------------|--|
| 2-aPu | – 2-аминопурин; |
| 8-охоG | – 7,8-дигидро-8-оксогуанин; |
| APe1 | – апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза человека 1; |
| APe2 | – апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза человека 2; |
| Apn1 | – апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 (<i>S. cerevisiae</i>); |
| AP-сайт | - апуриновый/апиримидиновый сайт; |
| ATP | - аденозин-5'-трифосфат; |
| BER | - эксцизионная репарация оснований; |
| BIR | – инцизионная репарация оснований; |
| BSA | – бычий сывороточный альбумин; |
| Cas9 | – эндонуклеаза Cas9 <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| dCMP | – дезоксицитидин-5'-монофосфат; |
| DHU | – 5,6-дигидроуридин; |
| DTT | – дитиотреитол; |
| E3330 | – 3-(2-(5,6-диметокси-3-метил-1,4-бензохиноил))-2-ил-пропеновая кислота; |
| EMSA | – анализ электрофоретической подвижности (гель-шифт); |
| EndoIV (Nfo) | – эндонуклеаза IV; |
| ExoIII (Xth) | – экзонуклеаза III; |
| F | – (3-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)-метил фосфат, тетрагидрофуран; |
| FapyG | – 2,6-диамино-4-оксо-5-формамидопиромидин; |

| | |
|--------|---|
| FEN1 | – флэп–эндонуклеаза 1; |
| F–сайт | – F–содержащий нуклеотид; |
| HEPES | – N–(2–гидроксиэтил)пиперазин–1–этансульфоновая кислота; |
| HDX | – водородно–дейтериевый обмен |
| HDX–MS | – водородно–дейтериевый обмен с последующей масс–спектрометрией |
| IPTG | – изопропил–1–тио– β –D–галактопиранозид; |
| L1 | – рестрикционная эндонуклеаза ретротраспозона L1; |
| LC–MS | – жидкостная хроматография с масс–спектрометрией |
| Lig1 | – ДНК–лигаза 1; |
| Lig3 | – ДНК–лигаза 3; |
| MD | – молекулярная динамика; |
| MMS | – метилметансульфонат; |
| MS | – масс–спектрометрия |
| NEIL | – эндонуклеаза VIII–подобная нуклеаза |
| NEM | – N–этилмалеимид |
| NIR | – инцизионная репарация нуклеотидов; |
| Nth | – ДНК–гликозилаза/ β –лиаза; |
| OGG1 | – 8–оксогуанин–ДНК–гликозилаза; |
| pBQ | – <i>p</i> –бензохинон; |
| PCNA | – ядерный антиген пролиферирующих клеток; |
| PDB | – Protein Data Bank |

| | |
|-------------|---|
| PLIMSTEX | – protein–ligand interactions by mass spectrometry, titration, and H/D exchange (взаимодействия белок–лиганд с помощью масс–спектрометрии, титрования и H/D–обмена) |
| PNKP | – полинуклеотидкиназа/3'–фосфатаза; |
| Pol β | – ДНК–полимераза β ; |
| Ref–1 | – окислительно–восстановительный фактор 1; |
| RFC | – фактор репликации C; |
| RMSD | – среднеквадратическое отклонение |
| RPA | – репликативный белок A; |
| Rrp1 | – белок рекомбинационной репарации 1; |
| SDS | – додецилсульфат натрия |
| sgPHK | – одиночная направляющая РНК эндонуклеазы Cas9 |
| smFRET | – резонансный перенос энергии флуоресценции одиночной молекулы |
| SSB | – одноцепочечный разрыв в ДНК; |
| SUPREX | – stability of unpurified proteins from rates of H/D exchange (стабильность неочищенных белков по скорости обмена H/D) |
| TCEP | – трис(2–карбоксиил)фосфин |
| TEA | – триэтиламин; |
| Tris | – трис–(гидроксиметил)аминометан; |
| Trp | – триптофан; |
| UDG | – урацил–ДНК–гликозилаза; |
| WT | – дикий тип [в отношении фермента]; |

| | |
|-----------------------|---|
| XRCC1 | –фактор, участвующий в репарации повреждений ДНК, вызванных УФ–излучением или алкилирующими агентами; |
| α -dA | – α -аномер 2'-дезоксиаденозина; |
| АФК | – активные формы кислорода; |
| ВЭЖХ | – высокоэффективная жидкостная хроматография; |
| ДНК | – дезоксирибонуклеиновая кислота; |
| дцДНК | – двуцепочечная ДНК |
| ДТТ | – 1,4-дитиотреитол |
| ИПТГ | – изопропил- β -D-тиогалактопиранозид; |
| КД | – круговой дихроизм |
| Крио–ЭМ | – криоэлектронная микроскопия |
| МАЛДИ | – матрично–активированная лазерная десорбция/ионизация |
| ПААГ | – электрофорез в полиакриламидном геле; |
| ПЦР | – полимеразная цепная реакция; |
| Редокс– активность | – окислительно–восстановительная активность; |
| РСА | – рентгеноструктурный анализ; |
| ТЕМЕД | – N,N,N',N' -тетраметилэтилендиамин |
| Трис | – трис(гидроксиметил)аминометан |
| УФ–излучение | – ультрафиолетовое излучение; |
| Фурье–ИК | – инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье |
| ЭДТА | – этилендиаминтетрауксусная кислота; |
| ЯМР | – ядерный магнитный резонанс |

ВВЕДЕНИЕ

Изучение детального механизма и динамических аспектов функционирования ферментов, взаимодействующих с ДНК, является актуальной задачей, решение которой вносит существенный вклад в молекулярную биологию, структурную биологию и энзимологию. Фундаментальные знания о белково-нуклеиновом узнавании в надмолекулярных комплексах позволяют выявлять особенности и закономерности таких взаимодействий, создавать новые терапевтические подходы и использовать ферменты как инструменты исследования и коррекции определенных биологических процессов.

В настоящее время наблюдается интенсивный интерес к детальным механизмам и динамическим аспектам функционирования ферментов, взаимодействующих с ДНК [1–3]. Продвижение в данной области ассоциируется с появлением новых подходов к исследованию динамики биополимеров. К таким подходам относится создание современных установок для изучения кинетики ферментативных реакций, развитие методов компьютерного моделирования, улучшение микроскопических методов для исследования реакций на уровне одной молекулы и другие [4–9]. Среди ДНК-узнающих белков существенный интерес вызывают ферменты репарации ДНК, поскольку примерно 10 тысяч AP-сайтов образуется в каждой клетке человека ежедневно, что является значительной мутагенной нагрузкой для организма [10, 11]. ДНК-узнающие белки репарации относятся к различным структурным типам и участвуют в удалении из ДНК поврежденных нуклеотидов или разрывов цепей.

Белково-нуклеиновое узнавание играет ключевую роль в регуляции экспрессии генов и сохранении стабильности генома. ДНК-связывающие белки, участвующие в репарации, способны быстро и селективно узнавать свои нуклеиновые мишени благодаря способности биополимеров изменять конформацию [12]. ДНК связывающие белки систем репарации представляют собой большую группу белков, относящихся к различным структурным типам, задача которых заключается в удалении из ДНК повреждённых нуклеотидов или устранении разрывов цепей [13–15].

Действие различных эндогенных клеточных метаболитов и внешних факторов может вызывать в ДНК повреждения разного типа, исправляемые разными системами

репарации [16]. В клетках эукариот существует несколько основных способов восстановления структуры ДНК, среди которых важное место занимают эксцизионная репарация оснований (BER) и эксцизионная репарация нуклеотидов (NER) [17–19]. Система BER восстанавливает структурно незначительные повреждения ДНК, которые не приводят к существенному нарушению двойной спирали. Общий механизм BER включает в себя удаление поврежденного азотистого основания, остатка дезоксирибозы и фосфата и последующее восстановление вырезанного нуклеотида репликативным аппаратом клетки. Удаление поврежденного или неправильно спаренного основания осуществляется ДНК-гликозилазами [20–22]. Для восстановления повреждений путем BER необходимо последовательное воздействие двух ферментов: ДНК-гликозилазы и эндонуклеазы. В этом процессе образуются генотоксические промежуточные продукты, такие как AP-сайты и заблокированные 3' концевые группы. Эти интермедиаты требуется дополнительно удалить перед началом репарационного синтеза ДНК [23]. Система NER направлена на удаление из ДНК объемных аддуктов и повреждений, индуцированных УФ-облучением [24, 25].

Повреждения ДНК, находящиеся на расстоянии не более двух витков спирали, относят к кластерным повреждениям. Одним из наиболее часто встречающихся в кластерах повреждений ДНК являются апуриновые/апиримидиновые сайты (AP-сайты), которые на уровне хроматина могут быть источником сшивок ДНК-белок или ДНК-ДНК и двойных разрывов в ДНК [26, 27].

Наряду с системами BER и NER, существует альтернативный вариант репарации – инцизионная репарация нуклеотидов (NIR), протекающая без участия гликозилаз [28]. Преимуществом этого пути является предотвращение образования генотоксичных интермедиатов. Помимо гликозилаз, важное значение в репарации имеют AP-нуклеазы, участвующие как в пути BER, так и в пути NIR. Человеческая AP-нуклеаза APE1 выполняет разрезание дуплексов ДНК, в которых присутствует пара DNU/G, начиная с 5'-конца повреждения. Этот процесс осуществляется независимо от воздействия ДНК-гликозилазы [29]. Структурно-динамическая информация о том, как AP-эндонуклеазы эукариот инициируют взаимодействие с повреждениями ДНК в процессе инцизионной репарации нуклеотидов NIR позволит понять пластичность комплексов ДНК с AP-эндонуклеазами.

Поскольку информация о том, что заставляет ферменты репарации на самых начальных стадиях каталитических циклов инициировать взаимодействие с

локальными небольшими повреждениями в гетероциклах нуклеотидов, расположенных во внутренних областях двойной спирали ДНК, была неполной или отсутствовала вовсе для отдельных ферментов, получение таких знаний было актуальным. По этой причине для важнейших ферментов репарации ДНК: формамидопиримидин-ДНК гликозилазы *Escherichia coli* (Fpg), 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека (hOGG1), апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы 1 человека (APE1), апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы *Saccharomyces cerevisiae* (Apn1), ДНК-гликозилазы человека hNEIL2 молекулярное моделирование и получение структурных характеристик фермент-субстратных комплексов носит актуальный характер [14, 30]. Такая информация вносит существенный вклад в структурную энзимологию, что, в свою очередь, расширяет наши знания о белково-нуклеиновом узнавании в надмолекулярных комплексах. Исследование механизмов репарации кластерных повреждений и их контроля также обладает практической значимостью, поскольку эти механизмы тесно связаны с исправлением повреждений ДНК гетерогенной природы, индуцируемых лучевой и химиотерапией. Возможность регулирования процесса репарации могла бы улучшить эффективность лечения, в том числе и нейродегенеративных заболеваний [31].

Система CRISPR–Cas в настоящее время является доминирующей технологией редактирования генома в исследовательских лабораториях по всему миру благодаря своей эффективности, относительной точности и широкому спектру применения [32]. Cas9 (CRISPR associated protein 9) — это управляемая при помощи РНК-гидов эндонуклеаза, связанная с адаптивной иммунной системой CRISPR у ряда бактерий, в частности у *Streptococcus pyogenes*. Программируемые нуклеазы системы CRISPR–Cas нашли свое применение не только в геномике, они также применяются для создания и оптимизации модифицированных клеточных линий с заданными функциями, для производства белков, в том числе и антител, для разработки терапевтических препаратов и др. [33, 34]. Поэтому вопрос изучения механизмов узнавания и расщепления целевых последовательностей ДНК ферментами системы CRISPR–Cas с целью повышения эффективности их действия остается актуальным.

Целью настоящей работы являлось установление структурно-динамического механизма узнавания ДНК-субстратов и реализации каталитической функции ферментами репарации и ферментами геномного редактирования.

Для достижения цели исследования решались следующие **задачи**:

1. Определить ключевые стадии механизма взаимодействия фермента Fpg *E. coli* при процессинге субстратов различной степени специфичности.
2. Выявить определяющие структурные факторы, влияющие на каталитическую эффективность ДНК-гликозилазы человека hOGG1 при удалении 8-охоG из ДНК-субстратов.
3. Дать структурное описание влияние остатка охоG-Clamp на процесс узнавания 8-оксогуанина в ДНК с помощью hOGG1.
4. Предложить и характеризовать подробный кинетический механизм реакции, катализируемой hAPE1 в процессе BER при взаимодействии с ДНК-субстратами (лигандами), различной степени специфичности.
5. Обосновать детальный механизм реакции расщепления ДНК-субстрата AP-эндонуклеазой человека hAPE1 в процессе инцизионной репарации нуклеотидов (NIR).
6. Получить и верифицировать 3D-структуру эндонуклеазы Apr1 из *S. cerevisiae* на основе данных компьютерного моделирования.
7. Предложить и характеризовать кинетический механизм ферментативной реакции, катализируемой ферментом Apr1 из *S. cerevisiae* при удалении AP-сайтов из ДНК
8. Получить 3D-структуру эндонуклеазы NEIL2 человека в растворе на основе данных по масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена и молекулярного моделирования.
9. Определить ключевые стадии и термодинамические характеристики взаимодействия эндонуклеазы Cas9 из *Streptococcus pyogenes* с дцДНК-субстратом, определяющие скорость реакции расщепления ДНК.
10. Получить и верифицировать динамическую 3D-структуру комплекса эндонуклеазы Cas9 из *S. pyogenes* на основе масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена и данных молекулярного моделирования.

Научная новизна полученных результатов

В настоящей работе для достижения поставленной цели исследования был применен комплексный методологический подход, включающий изучение кинетических характеристик взаимодействия между ферментом и субстратом, моделирование комплексов по методу молекулярной динамики и использования масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена для получения динамических структур. Используемый подход позволил достаточно подробно на структурном уровне описать динамическую подвижность и динамическую пластичность изучаемых комплексов. Структурные основы узнавания в белково-нуклеиновых комплексах были изучены с применением масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена.

Предложен механизм взаимодействия фермента Fpg *E. coli* с ДНК при процессинге субстратов различной степени специфичности.

Установлен кинетический механизм реакции, катализируемой hAPE1 в процессе BER.

Впервые предложено структурное описание влияния остатка ohoG-Clamp на узнавание 8-оксогуанина в ДНК с помощью hOGG1.

Впервые описан детальный кинетический механизм ферментативной реакции, катализируемой hAPE1, в контексте NIR.

Впервые предложена и верифицирована 3D-структура эндонуклеазы Arn1 из *S. cerevisiae*.

Впервые установлено, что для восстановления поврежденной геномной ДНК Arn1 может привлекаться путь NIR в случае функционального отказа ДНК-гликозилазы, что демонстрирует значимость Arn1 для различного типа повреждений, за исключением разрывов ДНК.

В ходе работы впервые структурно охарактеризована ДНК-гликозилаза hNEIL2, уникально специфичная для окисленных пиримидинов в неканонических субстратах ДНК, таких как «ДНК-пузыри» и локальные выпетливания.

Впервые предложена тонкая динамическая структура эндонуклеазы Cas9 из *S. pyogenes* на основе масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена и данных молекулярного моделирования.

Теоретическая и практическая значимость исследования

В настоящей работе проведено исследование ферментов, относящихся к классу гликозилаз и эндонуклеаз в комплексах с каноническими и неканоническими субстратами.

В работе получены новые фундаментальные знания о механизмах активации альтернативных путей репарации с участием Apn1.

Полученные знания о способности к узнаванию и специфическому связыванию AP-сайтов в ДНК мутантными формами фермента APE1 могут быть полезны для разработки новых противогрибковых и противомалярийных агентов, что свидетельствует о практической значимости работы.

При исследовании структурной организации ДНК-гликозилазы hNEIL2 человека, фундаментально значимыми являются результаты, доказывающие, что открытая конформация, вероятно, благоприятна для свободного hNEIL2 в растворе. Подтверждена гипотеза о том, что hNEIL2 является конформационно гибким белком, что может быть связано с его участием в репарации неканонических структур ДНК и/или с участием в функциональных и регуляторных белок-белковых взаимодействиях.

Разработанные и оптимизированные методы для изучения структурной динамики больших белковых комплексов в растворе на примере белков hNEIL2 и его комплексов с субстратами, системы геномного редактирования Cas9 - как свободного фермента, так и его комплексов с одиночной направляющей РНК эндонуклеазы Cas9 (sgRNA) и ДНК-субстратами методом водородно-дейтериевого обмена с использованием масс-спектрометрии (HDX-MS) могут быть применены для характеристики стабильности таких глобулярных структур.

Предложенный в исследовании подход комбинации методов обменной водородно-дейтериевой масс-спектрометрии, моделирования по гомологии и молекулярной динамики может быть использован для предсказания структуры в растворе сложных белково-нуклеиновых и белок-белковых комплексов, что актуально для структурной протеомики в целом. Полученные в исследовании результаты позволяют по-новому оценить природу механизмов взаимодействия

белков с нуклеиновыми кислотами и глубже понять фундаментальные основы процессов, обеспечивающих сохранение стабильности геномов живых организмов.

Основные положения, выносимые на защиту

- Взаимодействие ДНК-гликозилазы Fpg из *E. coli* с ДНК-субстратом, содержащими модифицированные 8-охоG нуклеотиды происходит в четыре элементарные стадии. Предложенные стадии процесса отражают связывание ДНК-субстрата с ферментом, узнавание повреждения с последующей корректировкой структуры ДНК и структуры молекулы фермента для достижения каталитически компетентной конформации. Стадия подстройки ДНК-дуплекса относительно медленная и за ней следуют быстрые стадии ферментативного катализа.
- Аминокислотный остаток Asn212 в hAPE1 выполняет ключевую роль в формировании нуклеофильной частицы, участвующей в процессе гидролиза фосфодиэфирной связи ДНК-субстрата. Введение в положение 212 белка остатка аланина вместо аспарагина существенно влияет на сродство hAPE1 к ДНК-субстрату.
- Скорость расщепления с помощью hAPE1 субстрата, который содержит в последовательности ДНК остаток 5,6-DHU, по пути NIR сравнима по величине со скоростью разрезания с помощью hAPE1 в процессе BER ДНК-субстрата, содержащего AP-сайт. Этот факт подтверждает гипотезу об участии hAPE1 в NIR как о значимом процессе репарации ДНК.
- Внедрение аминокислотной замены Lys98Ala в молекулярную структуру фермента hAPE1 проявляет более выраженное воздействие на катализ в процессе NIR, по сравнению с влиянием на процесс BER.
- Распределение структур для FRET-комплекса ДНК (Cy3/Cy5) с hOGG1 указывает на то, что при изменении геометрии ДНК вследствие её связывания гликозилазой hOGG1 остатки красителей приобретают новые (в сравнении с комплексом без фермента) варианты локализации в малой бороздке и вне дуплекса.

- Добавление в реакционную систему остатка 8-BrG изменяет механизм реакции между 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой hOGG1 человека и ее субстратами 8-охоG и AP-сайтами в ДНК, изменяя скорость γ -элиминирования.
- В активном центре нуклеазы Arn1 из дрожжей остаток His83, координирующий ионы Zn^{2+} в активном центре, играет решающую роль в каталитической стадии разрезания ДНК-субстрата.
- Белок hNEIL2 в свободном состоянии в растворе предпочтительно находится в открытой конформации. Характерная для позвоночных область NEIL2, содержащая протяженную инсерцию в N-концевом домене и отсутствующая в других ДНКгликозилазах, находится в растворе в неструктурированном состоянии.
- В случае коротких дуплексов, содержащих неканонические пары оснований, узнавание и связывание ферментом Cas9 дцДНК-субстратов определяет скорость реакции расщепления ДНК вне зависимости от термодинамических параметров, характеризующих "расплетание" ДНК.

Публикации и апробация результатов работы

Результаты диссертационного исследования представлены в 26 публикациях в рецензируемых журналах, включенных в базы данных Web of Science и Scopus, а также в одном патенте Российской Федерации. Далее перечислены международные и российские научные конференции, на которых были представлены основные результаты работы: 47th FEBS Congress: Together in bioscience for a better future (Тур, Франция, 2023), 3rd International conference on hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (Лондон, Великобритания, 2022), VII съезд биохимиков, молекулярных биологов и физиологов России (Сочи, 2022), 45th FEBS Congress: Molecules of Life: Towards New Horizons (Любляна, Словения, 2021), II Объединенный научный форум «VI съезд физиологов СНГ и VI съезд биохимиков России» (Дагомыс, 2019); 43rd FEBS Congress: Biochemistry Forever (Прага, 2018); VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Москва, 2017); Международная конференция «Химическая биология», посвященная 90-летию академика Д. Г. Кнорре (Новосибирск, 2016), V съезд биохимиков России» (Дагомыс, 2016), 44th Annual Meeting of the European

Environmental Mutagenesis and Genomics Society (Прага, 2015); 38th FEBS Congress (Санкт-Петербург, 2013); 8th International Meeting on Recognition Studies in Nucleic Acids (Шеффилд, Великобритания, 2010); X International Conference on Environmental Mutagens (Флоренция, Италия, 2009).

Личный вклад автора

Результаты исследований были получены автором лично либо его сотрудниками при непосредственном руководстве ими на всех этапах исследования. Во всех опубликованных работах вклад автора является определяющим. Имена соавторов по научным коллективам указаны в соответствующих публикациях. Работы по изучению динамики Fpg и hOGG1 выполнены совместно с Фёдоровой О. С., Кузнецовым Н. А., Невинским Г. А., Ищенко А. А., Лукиной М. В., Жарковым Д. О. ([10], [12], [14], [22-26] – ссылки по списку на стр. 215 - 218); работы по исследованию динамики APE1 и Atp1 выполнены совместно с Федоровой О. С., Тимофеевой Н. А., Канажевской Л. Ю., Дьяконовой Е. С. ([7-8], [11], [13], [15-18], [20-21] – ссылки по списку на стр. 215 - 218); цикл работ по HDX-масс-спектрометрии выполнен совместно с Черноносковым А. А., Ждановой П. В., Барановой С. В., Жарковым Д. О. ([1-4], [6] – ссылки по списку на стр. 215 - 218) Компьютерное моделирование комплексов проведено совместно с Ломзовым А. А. и Ждановой П. В. ([1-11], [13] – ссылки по списку на стр. 215 - 218). Автор активно участвовал в планировании и организации экспериментов, систематизации и анализе экспериментальных данных, подготовке научных публикаций, а также представлении результатов исследований на научных конференциях.

Несколько фрагментов проведенного диссертационного исследования стали отправной точкой для создания новых научных тем, которые продолжают развитие данного научного направления.

ГЛАВА 1. СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЛИКОЗИЛАЗ С ДНК НА ПРИМЕРЕ ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗЫ OGG1 человека (обзор литературы)¹

1.1. Пути накопления охoG в ДНК и их значение в регуляции экспрессии генов

Генетический материал всех живых организмов подвергается постоянному и активному воздействию различных как экзогенных, так и эндогенных факторов. Среди этих факторов можно выделить активные формы кислорода (АФК), высокореакционные клеточные метаболиты, различного типа ксенобиотики, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение и т. д. Воздействие их на ДНК нарушает ее структуру путем окисления, алкилирования, деаминирования, апуринизации и разрыва цепей ДНК. [35–38]. Эти повреждения генетического аппарата обладают цитотоксическими и мутагенными эффектами, способными вызывать различные заболевания [39–42]. В свою очередь, окисление биологических полимеров клетки приводит к ускоренному развитию дегенеративных процессов в организме [43, 44].

Встречаемые чаще всего повреждения ДНК связаны с воздействием активных форм кислорода (АФК), таких как O_2^- (супероксидный ион-радикал), H_2O_2 (пероксид водорода) и $\cdot OH$ (гидроксильный радикал) [45, 46]. В клетках АФК образуются в результате аэробного метаболизма и могут также возникать при воздействии химических агентов, а также УФ- или ионизирующего излучения [47]. Пуриновые основания в ДНК трансформируются главным образом в 7,8-дигидро-8-оксогуанин (8-оксогуанин, охoG) и 5-формаидопиримидиновые производные аденина – 4,6-диамино-5-формаидопиримидин (Фару А) и гуанина – 2,6-диамино-4-окси-5-формаидопиримидин (Фару G) [48, 49]. Активные формы кислорода являются также потенциальным универсальным триггером окислительных повреждений ДНК, общих для нейродегенеративных заболеваний с поздним возрастным началом, т. е. развивающихся при старении человека [50].

¹ В настоящей главе использованы материалы, опубликованные в работе [12] из списка на стр. 215 – 218.

Окисленные основания являются фактором, нарушающим общую стабильность генома [51]. К примеру, в результате ошибки ДНК-полимеразы в первом цикле репликации в синтезированную нить вместо цитозина против 8-оксо-G добавляется аденозин, и образуется пара оксо-G/A. Во втором раунде репликации против А полимеразы встраивает Т. Таким образом, после двух раундов репликации происходит замена G/C → T/A [52, 53].

Для противодействия накоплению 8-охоG в ДНК живых организмов используется специализированная защитная система (т. н. GO-система) [54, 55]. Эта система хорошо изучена у бактерий *Escherichia coli* и включает три фермента: Fpg, или MutM (формапидопиримидин-ДНК-гликозилаза) – специфическая N-гликозилаза/AP-лиаза, удаляющая остатки 8-оксогуанина; MutY (аденин-ДНК-гликозилаза) – специфическая N-гликозилаза, удаляющая остаток аденина напротив 8-оксогуанина; и MutT (8-оксо-2'-дезоксигуанозин-5'-трифосфатпирофосфатаза) – фосфатаза, расщепляющая 8-охо-dGTP. В клетках эукариотических организмов присутствуют структурные или функциональные гомологи вышеназванных прокариотических ферментов [56, 57]. ДНК-гликозилазы инициируют процесс BER.

Из ДНК эукариот остатки 8-оксогуанина (8-охоG) удаляет фермент 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза (OGG1) [58]. Показано, что каждая клетка человека содержит около 50 тысяч молекул OGG1, которые защищают 6×10^9 оснований в геноме от накопления продуктов окисления пуринов [59]. Учитывая этот факт можно заключить, что этот фермент должен обладать уникальной способностью отличать остаток 8-охоG от четырех нормальных гетероциклических оснований и эффективно его удалять.

Помимо вырезания поврежденного основания, часть гликозилаз способны вносить разрывы в цепь ДНК, и такие гликозилазы относят к бифункциональным гликозилазам [60, 61]. Все бифункциональные гликозилазы процессируют цепь ДНК с 3'-конца повреждения (β -лиазная активность), а некоторые бифункциональные гликозилазы также способны расщеплять цепь ДНК с 5'-конца повреждения (δ -лиазная активность). После того как гликозилаза процессирует субстрат, эндонуклеаза вносит разрывы с 3'- и 5'-конца от поврежденного основания в случае монофункциональной гликозилазы или с 5'-конца в случае бифункциональной гликозилазы, проявляющей

только β -лиазную активность. Процесс репарации BER завершается, когда полимераза вставляет комплементарный канонический нуклеотид напротив основания комплементарной цепи, а лигаза сшивает разрыв сахарофосфатного остова.

В клетках человека ген OGG1 локализован в коротком плече хромосомы 3 (3p25/26), в процессе транскрипции с него синтезируются две основные изоформы мРНК, которые кодируют белки, состоящие из 345 и 424 аминокислот, α -hOGG1 и β -hOGG1, соответственно [58, 62–65]. У обеих форм hOGG1 первые 316 аминокислотных остатков совпадают; различаются С-концы белка [58, 62–66]. Анализ локализации в клетке этих форм фермента OGG1 показал, что α -hOGG1 находится в ядрах, а β -hOGG1 – в митохондриях [66]. Ядерный белок α -hOGG1 высоко консервативен и, кроме клеток человека, был охарактеризован в *S. cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* и у млекопитающих [67]. Гомология между дрожжевым и человеческим белком α -hOGG1 достигает 38 %. Белок OGG1 β -типа был обнаружен только в митохондриях клеток человека [67]. Каталитические механизмы и структурные свойства белка OGG1 человека до недавнего времени изучали исключительно для α -hOGG1.

Недавние исследования показали, что 8-охоG и Fapy G служат эпигенетическими метками, а OGG1 модулирует экспрессию генов в клетках, подвергшихся окислительному стрессу [68]. Поскольку известно, что 72% промоторов генов человека гуанин-богатые, роль появления окисленных гуанинов в таких районах генома тяжело переоценить [69]. Окисление гуанина в районах промоторов, потенциально способных образовывать G-квадруплексы, позволяет осуществить структурный сдвиг от В-ДНК к G-квадруплексной структуре [70]. Когда 8-охоG располагался в кодирующей цепи против матричной цепи, эксцизионная репарация оснований приводит к включению/выключению транскрипционного переключателя [71]. Углубленные исследования показали, что взаимодействие OGG1 с его ДНК-субстратом способствует посадке транскрипционных факторов на соответствующие специфические последовательности [72–74]. Современные исследования подтверждают важную роль OGG1 в регуляции транскрипции [75–82]. Для этой новой роли OGG1 были предложены два различных механизма: один связан с эксцизией

оснований, а другой требует только связывания субстрата с OGG1, и оба приводят к конформационной перестройке в прилегающих последовательностях ДНК, обеспечивая доступ транскрипционных факторов к их цис-элементам [83]. Одним из важных оставался вопрос: необходима ли реализация BER ферментом OGG1 для активации экспрессии про-воспалительных генов. Исследование промотора OGG1, наличия окисленных сайтов в самом белке и экспрессии про-воспалительных генов показали, что воздействие TNF α увеличило уровни окислительно модифицированного цистеина (цистеинов) дикой формы OGG1 без ухудшения его связи с промотором и облегчения экспрессии гена. Мутант K249Q с дефицитом эксцизии оказался еще более мощным активатором экспрессии генов, в то время как мутант OGG1 с нарушенным распознаванием/связыванием субстрата - нет. На основе этих данных можно сделать предположение, что взаимодействие OGG1 со своим субстратом в регуляторных регионах с последующей конформационной перестройкой во фланкирующих повреждение последовательностях ДНК является основным способом модуляции экспрессии генов из каскада воспаления. И действительно, было показано, что мыши, у которых отсутствовал ген OGG1, были устойчивы к острому и системному воспалению [74].

1.2. Химический механизм действия hOGG1

Фермент hOGG1 представляет собой бифункциональную ДНК-гликозилазу/ β -лиазу, способную гидролизовать N-гликозидную связь поврежденного основания с образованием свободного 8-охоG, а затем катализировать разрыв 3'-фосфодиэфирной связи. Каталитический механизм действия фермента hOGG1 включает участие аминокислотной группы бокового заместителя остатка K249, который замещает основание 8-охоG в двуспиральной ДНК и способствует элиминированию 3'-фосфодиэфирной связи через промежуточное образование основания Шиффа с C1'-атомом дезоксирибозы (Рис. 1) [84–86]. Ранее Verdine [85] с соавторами показали, что мутантная форма K249Q hOGG1 не обладает каталитической активностью, но сохраняет способность узнавать повреждения в ДНК. Второй химический этап представляет собой разрыв фосфодиэфирной связи у 3'-атома углерода 2'-дезоксирибозного остатка и осуществляется по механизму β -элиминирования (AP-лиазная активность). Хорошо

известно, что эта реакция катализируется свободным гетероциклическим основанием 8-оксогуанином, вырезаемым в первой каталитической стадии и находящееся в активном центре фермента hOGG1 [87].

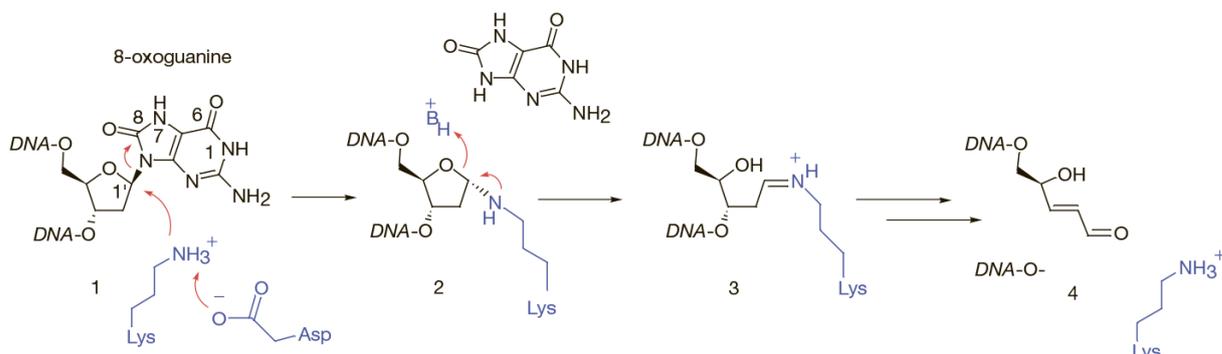


Рисунок 1. Механизм удаления 8-охоG ДНК-гликозилазой hOGG1 [88].

К настоящему моменту база данных трехмерных структур белков RCSB содержит 33 записи для фермента hOGG1. Разрешены и известны структуры hOGG1 в форме свободного фермента [89] и различных комплексов с ДНК: каталитически неактивных мутантов K249Q hOGG1 с охoG-содержащей ДНК [88, 89], N149C с охoG-содержащей ДНК и неповрежденной ДНК [90], D268N с охoG-ДНК и ДНК, содержащей остаток тетрагидрофурана (F-лиганд) – «стоп»-субстрат для hOGG1 [86, 91], комплекс WT hOGG1 с F-лигандом [86]. Помимо вышеупомянутых, изучены структуры ковалентного аддукта hOGG1 с AP-субстратом [87], полученного в результате восстановления основания Шиффа боргидридом натрия, а также комплексов мутантов hOGG1 (H270A, Q315A, Q315F, G42A), содержащих замены аминокислот, участвующих в формировании контактов с 7,8-дигидро-8-оксогуанином [85]. Изучена также структура позднего интермедиата, в котором основание 8-охоG почти полностью вставлено в активный центр, однако последний еще не приобрел конечную каталитически активную конформацию [85].

1.3. Структура каталитически неактивного мутанта K249Q hOGG1

В литературе опубликована первая структура фермента hOGG1 в комплексе с каталитически неактивным мутантом K249Q и 8-охоG-содержащей ДНК [88] (Рис. 2). Такой мутант впоследствии нашел практическое применение для обогащения и

картирования окислительных повреждений в геноме мыши [92]. Ранее в работе [85] было показано, что мутантная форма, в которой Lys249 заменён на глутамин, не обладает каталитической активностью, но сохраняет способность узнавать субстрат. Поскольку в работе [88] не удалось получить пригодные для рентгеноструктурного анализа кристаллы комплекса полноразмерного K249Q hOGG1 с олигонуклеотидным дуплексом, содержащим 8-охоG/C, то с помощью частичного трипсинового гидролиза у белка были удалены неструктурированные amino- и карбокси-концы, а также аминокислоты участка петли 80–82. В результате был закристаллизован комплекс коровьего домена hOGG1, состоящий из последовательности аминокислот 12–325 с 15-звенным олигонуклеотидным дуплексом, содержащим пару 8-охоG/C, и изучена его структура (Рис. 2).

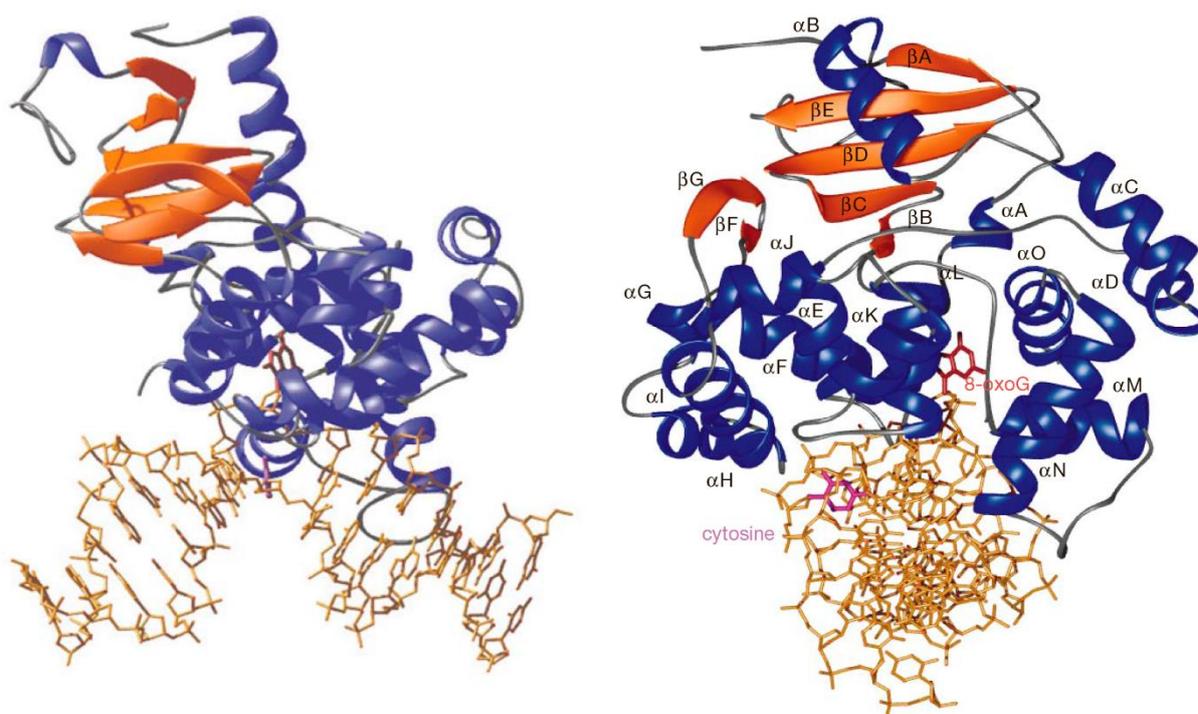


Рисунок 2. Структура комплекса hOGG1-ДНК. Два ортогональных представления комплекса hOGG1-ДНК, на которых белок изображен в виде ленты (синим цветом изображены α -спирали, оранжевым – β -складки, серым – неструктурированные элементы); 15-звенный ДНК-дуплекс окрашен в жёлтый цвет. Основание 8-охоG (красное) полностью вывернуто из спирали ДНК и помещено в карман активного центра белка. Комплементарный ему цитозин (пурпурный) остается в состоянии

стэкинга с основаниями своей цепи. Фермент изгибает ДНК на $\sim 70^\circ$ в плоскости пары оснований 8-охоG·C. Изгиб в ДНК приводит к экспонированию остатка цитозина в бороздку в направлении расположения боковых цепей аминокислот белка, что приводит к образованию специфических контактов [88].

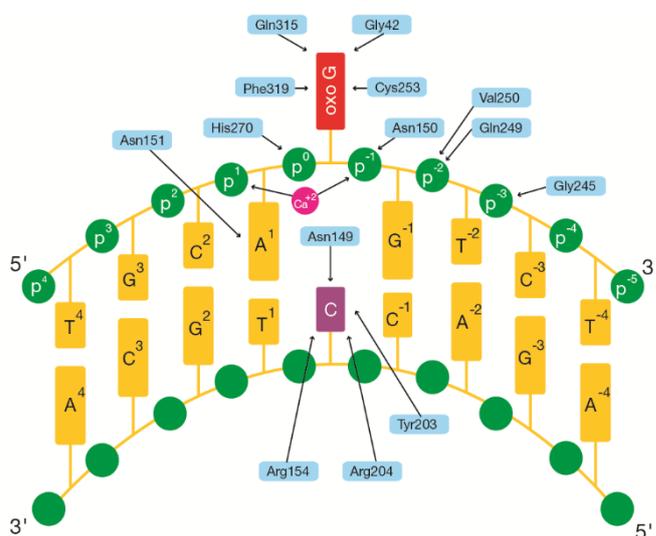
Показано, что укладка белка hOGG1 является типичной для суперсемейства белков репарации ДНК, участвующих в механизме BER, таких как эндонуклеаза III и алкил-ДНК-гликозилаза AlkA из *Escherichia coli* [93]. Белки этого семейства были обнаружены во многих организмах, от бактерий до млекопитающих; они репарируют широкий набор повреждений гетероциклов, возникающих в результате окисления, алкилирования, и дезаминирования ДНК. Характерной чертой данных белков является присутствие структурного элемента в виде «спирали — петли — спирали» (helix-hairpin-helix, HhH) [94], с последующей Gly/Pro-богатой петлей и консервативными остатками Gly, Pro и Asp (HhH-GPD). Структура hOGG1 содержит также два α -спиральных домена, которые являются общими для всех членов этого суперсемейства, и фрагмент антипараллельной β -складчатой структуры, которая есть еще только в алкил-ДНК-гликозилазе AlkA.

Белок прочно связывается с 8-охоG-содержащей цепью ДНК (Рис. 2). Остаток 8-охоG полностью выворачивается из спирали ДНК и помещается в карман активного центра фермента, что согласуется с особенностями аналогичных структур для других членов суперсемейства белков HhH-GPD [84, 94, 95]. Хотя в случае 8-охоG-нуклеотида гетероцикл находится в *syn*-конфигурации относительно гликозидной связи, в активном центре hOGG1 он связывается в *anti*-конформации, именно так, как это должно быть в нормальном ДНК-дуплексе. Вывернутая конформация гликозильного остатка и остова ДНК приводит к тому, что остаток 8-охоG оказывается расположенным далеко от спирали ДНК и погружается глубоко в область активного центра hOGG1.

Взаимодействия hOGG1 с фосфатными группами 8-охоG-содержащей цепи, самим остатком 8-охоG и комплементарным ему цитозином создает суммарную площадь контакта 2.268 \AA^2 . В то время как у большинства ДНК-связывающих белков в области контакта находится много остатков лизина и аргинина для взаимодействия

с фосфатными группами, hOGG1 связывает остов ДНК в почти нейтрально заряженный канал (Рис. 3), в котором расположен один основной остаток - His270. Уникальной особенностью образующегося комплекса является наличие в hOGG1 большого числа α -спиралей, у которых N-концы ориентированы в сторону ДНК (Рис. 2). Такое расположение α -спиралей усиливает спираль – дипольное взаимодействие, делая более вероятным создание дипольных электростатических контактов, а не солевых мостиков при связывании ДНК-субстратов. Только одна из спиралей фермента, α L, действительно контактирует с остовом ДНК. Спираль α L с петлей и спиралью α K образуют консервативный элемент HhN. В дополнение к контакту с фосфатом, который создается спиралью α L и фосфатной группой p^{-2} (Val250 и Gln249), высококонсервативный остаток глицина (Gly245), расположенный в петле, образует водородную связь с фосфатом p^{-3} (см. Рис. 3). Структурный элемент HhN образует контакт с ДНК-субстратом с 3'-стороны от повреждения; в этом месте ДНК-дуплекс почти не отклоняется от В-формы. Следовательно, элемент HhN, главным образом вовлечен в позиционирование дуплекса для ориентации повреждения в сторону кармана активного центра.

А



Б

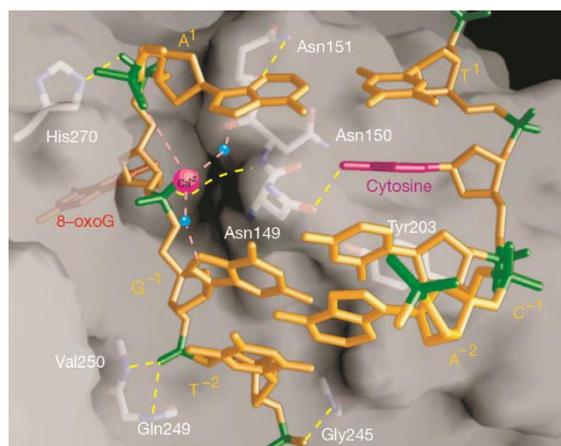


Рисунок 3. Схема взаимодействия оснований ДНК с аминокислотными остатками hOGG1. А. Дуплекс, содержащий пару 8-охоG/C, и взаимодействующие с ним аминокислоты. Б. Поверхность взаимодействия ДНК-дуплекса и фермента hOGG1.

Водородные связи показаны жёлтым пунктиром, координационные связи иона кальция с молекулами воды – розовым. [88].

Взаимодействие фосфатных групп p^{-1} , p^0 и p^1 очень важно для стабилизации нестандартной конформации ДНК-остова в месте расположения повреждения. Вращения вокруг связей, которое необходимо для выворачивания остатка 8-охоG из спирали, вызывают поворот атомов кислорода при фосфате p^{-1} внутрь по направлению к оси спирали, вносят дополнительное напряжение в рибозо-фосфатный остов ДНК. Чтобы ослабить электростатическое отталкивание, вызванное близким расположением фосфатов p^{-1} и p^1 , между ними размещается присутствующий в кристаллизационной среде частично гидратированный ион Ca^{2+} , который координируется напрямую с p^1 и через мостиковую воду – с p^{-1} (Рис. 3). Хотя ион Ca^{2+} , который может замещаться ионом Mg^{2+} в физиологических условиях, непосредственно не взаимодействует с белком, однако его лиганд, молекула воды, образует водородную связь с ДНК, стабилизируя тем самым её вывернутую и изогнутую конформацию.

Комплементарный охоG цитозин находится внутри спирали, однако он практически не образует стэкинга с соседними основаниями из-за изгиба в этом месте цепи ДНК, которое вызывает разворачивание дуплекса в сторону от молекулы фермента. За пределами активного центра конформация ДНК близка к канонической В-форме (Рис. 2).

Область дуплекса, высвобождаемая после выворачивания остатка 8-охоG, заполняется аминокислотными остатками консервативного NNN-элемента (последовательность из трёх расположенных подряд остатков аспарагина), а именно, остатком Asn149, который образует водородную связь между амидным карбонилем бокового заместителя и экзоциклической аминогруппой остатка цитозина комплементарной цепи (Рис. 3Б.). Кроме того, hOGG1 погружает арильное кольцо остатка Tyr203 в пространство между C^0 (комплементарным цитозином) и основанием с 5'-стороны (Рис. 3Б), тем самым убирая стэкинг двух оснований и образуя острый излом в спирали ДНК, что существенно улучшает доступ со стороны малой бороздки

к той части основания, которое участвует в уотсон-криковском взаимодействии. Основание C⁰ также теряет стэкинг с 3'-стороны с соседним основанием (см. на Рис. 3Б основание T¹). Аминокислотные остатки hOGG1 Arg154 и Arg204 перемещаются в сторону C⁰ со стороны малой бороздки; один аргинин располагается сверху, а другой снизу плоскости пиримидинового кольца, и одновременно образуются водородные связи с акцепторными атомами N3 и O2 цитозина C⁰. Эти взаимодействия, по-видимому, являются исключительно сильными и требуют присутствия соседних акцепторных атомов, что является уникальным для цитозина в сравнении с другими гетероциклическими основаниями в ДНК. Следовательно, вместе с взаимодействием между Asn149 и амидным карбонилем цитозина C⁰ между ферментом и комплементарным остатком цитозина может образоваться до пяти водородных связей.

Узнавание остатка 8-охоG в активном центре происходит путем формирования специфических контактов между поврежденным основанием и аминокислотами белка. Фермент узнает уреидный фрагмент 8-охоG, включающий C8-карбонильную группу, атомы N7 и N9. При этом атом N7 образует водородную связь с карбонилем остатка Gly42. Среди всех контактов 8-охоG имеется только одно взаимодействие с Gly42, которого нет у гуанина. Поэтому в работе [88] делается вывод о том, что ответственность за дискриминацию 8-охоG от гуанина несет только одна водородная связь. Необходимо отметить, что критически значимая аминокислота Gly42 помещается в β-складчатом домене, располагающемся в области контакта hOGG1-ДНК.

Кроме упомянутых выше, другие аминокислоты активного центра hOGG1 также участвуют в узнавании 8-охоG. Аминокислоты Phe319 и Cys253 взаимодействуют с π-системой 8-охоG с двух противоположных сторон, образуя сэндвичевую структуру (Рис. 4). Амидная NH₂-группа остатка Gln315 через прочно связанную в активном центре молекулу воды взаимодействуют с атомом O6 основания 8-охоG, а атом кислорода амидной группы Gln315 образует две водородные связи с атомами N1 и N2. Вторая прочно связанная молекула воды также образует водородную связь с атомом O6. Взаимодействие остатков Gln315 и Gly42, а также

связанных в активном центре молекул воды, по своим характеристикам не дают возможность образовывать донорно-акцепторные водородные связи с А, С и Т.

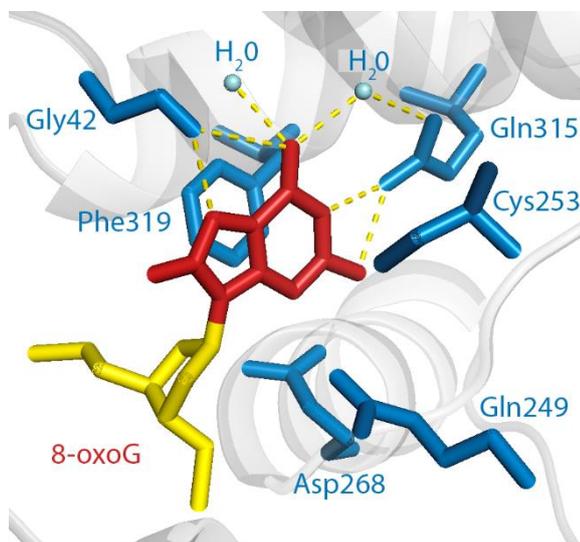


Рисунок 4. Аминокислоты активного центра hOGG1, участвующие в узнавании основания 8-охоG. Визуализация PDB-файла 1EBM [88] с помощью программного пакета PyMOL [96].

Анализ структурных данных позволяет глубже понять роль каталитически важных аминокислотных остатков Lys249 и Asp268. Остаток Lys249 находится на расстоянии ~ 2.5 Å от атома C1' 8-охоG близко от места в активном центре, в которое выворачивается окисленное основание; а остаток Asp268 ориентирован подходящим образом для того, чтобы проводить протонирование/депротонирование Lys249, но не тогда, когда он образует водородную связь с His270. Интермедиат, образовавшийся при атаке дезоксирибозы остатком Lys249, перегруппировывается в основание Шиффа (Рис. 1). Эта перегруппировка требует депротонирования Lys249, возможно, с помощью Asp268, и протонирования атома O1', для чего очень хорошо ориентирован остаток His270. Такая роль остатка His270 хорошо объясняет его инвариантность среди членов суперсемейства Nhh-GPD, поскольку он необходим для катализа стадии образования основания Шиффа.

Таким образом, домен Nhh-GPD ДНК-гликозилаз отвечает за распознавание и удаление поврежденных оснований из ДНК. Активные сайты OGG1 в этом домене

включают Phe319, Gln315, Gly42 и Cys253 для "захвата" 8-охоG; His270, Asn150, Val250, Gln24 и Gly245 для связывания с фосфатным остовом; Asn149, Tyr203, Arg204 и Arg154 для взаимодействия с противоположным цитозином; все вместе они образуют "карман специфичности охоG" [88, 97].

Дополнительные сведения о взаимодействии K249Q мутантной формы OGG1 с ДНК удалось получить авторам [98] применяя новый подход, который они назвали SMADNE (single-molecule analysis of DN**A**-binding proteins from nuclear extracts). Этот метод предназначен для анализа на уровне одной молекулы ДНК-связывающих белков из ядерных экстрактов. SMADNE использует принципы, схожие с принципами предыдущих работ на клеточных экстрактах [99–106], но при этом вносит несколько существенных изменений, что позволяет применять его к клеткам человека и масштабировать на множество белков, связывающих ДНК. Не так давно, эта команда авторов уже продемонстрировала взаимодействие клеточных ферментов UV-DDB с OGG1 для процессинга 8-охоG в процессе BER [107]. Они показали, что в присутствии UV-DDB усиливается расщепление цепи ДНК ферментами OGG1 и APE1 и в 30 раз увеличивается активность застраивания брешей ДНК-полимеразой β . На следующем этапе были получены клетки-продуценты слитого белка OGG1-GFP. В качестве модельного субстрата авторы использовали ДНК длиной 440 пар оснований, где присутствовал лишь один оксогуанин к которому добавляли OGG1-GFP (Рис. 5).

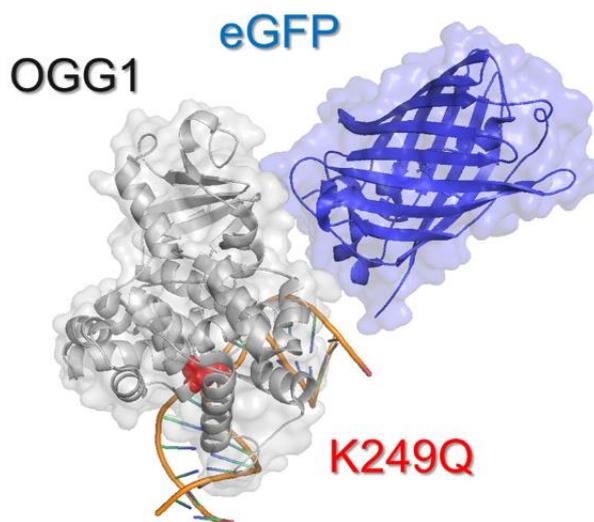


Рисунок 5. Структура каталитически-неактивной формы OGG1 K249Q, несущий флуоресцентный репортерный белок eGFP с ДНК-субстратом.

Было обнаружено, что OGG1 связывался со многими позициями по всей длине ДНК, причем с имеющими окислительное повреждение связывание происходит несколько раз, и эти взаимодействия были длительными (среднее время 2 секунды), а связывание с неповрежденными сайтами вело к краткосрочным взаимодействиям. Полученные данные о продолжительности взаимодействия хорошо согласуются с данными из работы Wallace с соавторами для очищенного фермента Fpg из *E. coli* [108] и исследованием Verdine с соавторами взаимодействия OGG1 для субстрата без повреждений [109]. По сравнению с WT OGG1, eGFP-меченная мутантная форма K249Q связывалась с 8-охоG-содержащим ДНК-субстратом дольше - 8.9 и 183 с, соответственно.

При исследовании роли мутантной формы OGG1 K249Q в регуляции экспрессии генов воспаления показано, что такой мутант с дефицитом функции вырезания основания, оказался еще более мощным активатором экспрессии генов, чем белок дикой формы [83]. В то же время, мутантная форма OGG1 C253A с нарушенным распознаванием/связыванием субстрата [110] не проявляла свойств активатора экспрессии генов. Эти данные позволили предположить, что основным способом модуляции экспрессии генов воспаления является взаимодействие OGG1 со своим субстратом в регуляторных областях с последующей конформационной перестройкой в прилегающей ДНК. В условиях окислительного стресса в клетке, связывание OGG1 с субстратом не сопровождается вырезанием оснований, поскольку OGG1 может временно терять свою ферментативную активность из-за окисления цистеинов, в том числе в активном центре [72, 111–113]. Связывание транзиторно инактивированного OGG1 с субстратом в таких условиях в промоторных областях провоспалительных генов было взаимосвязано с рекрутированием транскрипционных факторов (например, NF-κB и Sp1) и РНК-полимеразы, что приводило к транскрипционной активации провоспалительных генов [72, 73, 80].

1.4. Комплекс каталитически активного hOGG1 со «СТОП»-субстратом

Структура комплекса hOGG1 с ДНК, содержащей остаток тетрагидрофурана (F-лиганд), «стоп»-субстрата для hOGG1, изучена в работе [86]. В полученной структуре в ДНК вместо 8-охоG был введен остаток тетрагидрофурана. Авторы

показали, что нуклеофильная аминогруппа остатка Lys249 направлена в сторону атома C1' дезоксирибозы 8-охоG. Абсолютно консервативный для этого семейства остаток Asp268 [84], по-видимому, активирует депротонирование аминогруппы Lys249. В полученной структуре (PDB ID: 1FN7) Asp268 расположен для этого достаточно далеко от Lys249, расстояние N–O равно 3.7 Å. Более того, остаток Asp268 теряет контакт с His270, который, по-видимому, нужен для образования водородной связи, обнаруженной в структуре K249Q hOGG1 [88]. Отсутствие окисленного основания ДНК, выворачиваемого из цепи и помещаемого в карман активного центра, привело к изменению структуры фермента. Основываясь на полученных данных, в работе был сделан вывод, что, во-первых, 8-охоG-узнающий карман hOGG1 хорошо подогнан под структуру поврежденного основания, позиционируя нужным образом остатки Phe319, His270 и Asp268. Во-вторых, в данной работе роль остатка Asp268, действующего как депротонирующее Lys249 основание, не подтверждена, и не отвергнута. Высказана гипотеза, что этот остаток создает электростатическое поле, стабилизирующее положительный заряд, возникающий на стадии переходного состояния на атомах O1' и C1' дезоксирибозы 8-охоG.

В работе [114] были синтезированы потенциальные инактивирующие субстраты: 8-галогенированные производные 7-деаза-2'-дезоксигуанозина, которые похожи на 8-охоG тем, что принимают *syn*- конформацию (Рис. 6). Однако, в отличие от 8-охоG, 8-галогенированные-7-деаза-dG производные не образовывали стабильных пар оснований с dA в комплементарной цепи ДНК-дуплекса, скорее всего, из-за отсутствия водородной связи с 7-СН.

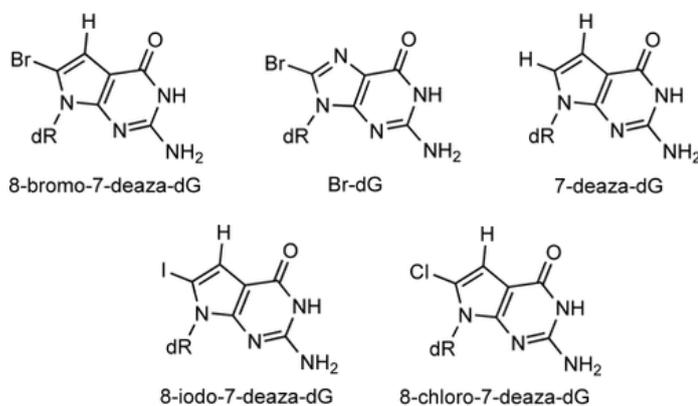


Рисунок 6. Структура галогенсодержащих аналогов 8-охоG.

По сравнению с 8-охоG, Cl- и Br-деза-dG были менее эффективными субстратами для hOGG1, но хорошими субстратами для Fpg. Исследование кинетики ферментативной реакции и эксперименты по связыванию фермента с субстратом показали, что, хотя hOGG1 эффективно связывает аналоги Cl- и Br-деза-dG с низкими значениями K_m , их низкие значения k_{cat} приводят к низкой гликозилазной активности. Учитывая указанные свойства новых аналогов - высокой аффинности связывания и низкой процессивности с hOGG1, такие аналоги можно рассматривать как полноценные “стоп”-субстраты и использовать для конкурентного ингибирования эксцизии охоG ферментом из ДНК-субстрата. При моделировании взаимодействия 8-Cl-деза-dG с активным сайтом hOGG1 можно видеть, что этот аналог хорошо входит в активный сайт, несмотря на то, что Ван-дер-Ваальсовый радиус атома хлора немного больше атома кислорода (Рис. 7).

В свете слабого взаимодействия между Gly42 и 7-СН и делокализации электронной плотности производных 7-деза-dG, сильная водородная связь или локализованная одиночная пара в положении N9, безусловно, играют важную роль в определении эффективности эксцизии путем снижения активационного барьера. С увеличением размера атома в положении 8 в аналогах 7-деза-dG сродство связывания аналога с hOGG1 уменьшается. В частности, I-деза-dG, который имеет больший атом йода и принимает анти-конформацию в активном сайте hOGG1, нарушает соответствующее положение реакции эксцизии из-за стерического столкновения между атомом йода и 5'-фосфодиэфирной связью.

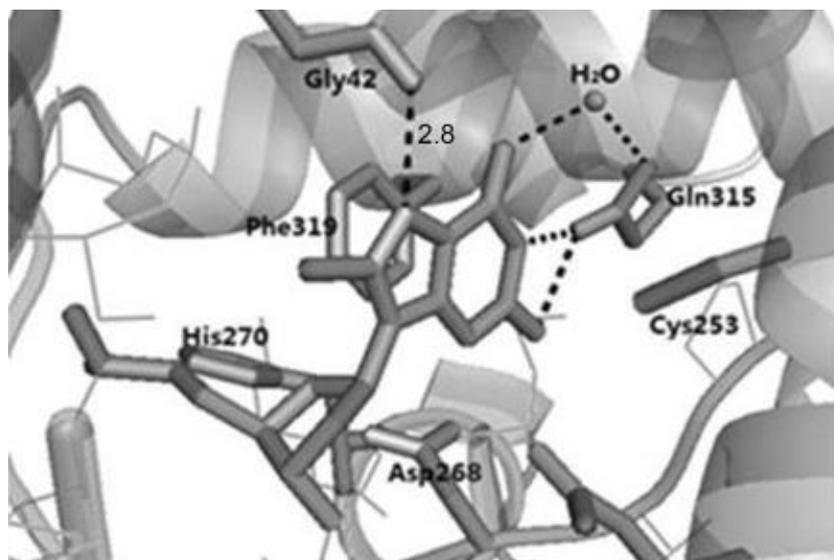


Рисунок 7. Моделирование комплекса C1-деза-dG с hOGG1. Структура была получена на основании структуры, содержащей 8-охо-G нуклеотид в PDB-файле 1EBM [114].

В работе [115] авторы предложили альтернативный подход к исследованию узнающего комплекса - совместную кристаллизацию каталитически компетентного hOGG1, связанного с 2'-фтор-оксогуанин-содержащей ДНК (2'-F-охоG). Такой субстрат также является ингибитором hOGG1, т.е. "СТОП"-субстратом, дестабилизирующим переходное состояние, который не препятствует связыванию hOGG1 с ДНК, но не процессируется ферментом. В этом фтор-содержащем комплексе окисленный сайт 8-охоG распознается остатком Gly42 фермента, а край Уотсон-Криковской пары с 8-охоG, экспонированный в большую бороздку, контактирует с Gln315 и Pro266. Ранее наблюдавшийся солевой мостик между Lys249 и Cys253 отсутствует в описанном фтор-содержащем комплексе, что позволяет предположить, что Lys249 праймирован остатком Cys253 и готов к нуклеофильной атаке на C1' дезоксирибозы 8-охоG. В целом, комплекс hOGG1 с описанным фтор-содержащим субстратом представляет собой первую структуруохоG, определенную для интактного каталитического сайта в hOGG1, и дает дополнительное представление о механизмах гликозилирования субстратов этим ферментом.

1.5. Изменение структуры hOGG1 при связывании ДНК

Кристаллическая структура свободного фермента hOGG1 и его комплекса с 8-охоG-содержащей ДНК, получены в работе [89] с разрешением 2.15 Å. Для формирования комплекса с ДНК использовали каталитически неактивный мутант K249Q. Согласно данным Bjørås M. с соавторами [89], структура фермента hOGG1 существенно различается для свободной формы и связанной в комплексе с 8-оксогуанин-содержащей ДНК (Рис. 8). В узнавании поврежденного основания принимают участие остатки аминокислот Phe319, Cys253, Gly42, Gln43, Phe45 и Gln315. Аминокислоты Phe319 и Cys253 располагаются с противоположных сторон от плоскости 8-охоG, тогда как Gly42, Gln43, Phe45 взаимодействуют с краем большой бороздки, узнавая протонированный атом N7 в 8-охоG. Амидный атом кислорода Gln315 образует водородные связи с N1-имино и N2-амино-группами кольца, участвующего в образовании комплементарных пар. Остаток Phe319 принимает различные конформации в свободной и связанной с ДНК форме hOGG1 (Рис. 8А). В комплексе с ДНК ароматическое кольцо Phe319 располагается почти перпендикулярно той ориентации, которая была у него в свободной форме. У аминокислоты Gln315 в свободном ферменте боковая цепь располагается под ароматическим кольцом остатка Phe319. В связанном с ДНК состоянии амидный атом азота этого остатка вовлекается в образование системы водородных связей, в которой участвует также карбонильный атом кислорода остатка Pro266, располагающийся с другой стороны от кольца 8-охоG (Рис. 8А). В результате конформация фермента существенно меняется, создавая тесный карман для связывания поврежденного основания 8-охоG.

Также в работе [89] была иначе интерпретирована роль остатка His270. Установлено, что конформационные изменения фермента в области кармана, связывающего гетероциклическое основание, сопровождаются изменением ориентации His270, который образует водородные связи с одним атомом азота имидазольного кольца с 5'-фосфатной группой 8-охоG в комплексе с ДНК, а другой атом азота – с карбоксильной группой Asp322 (Рис. 8Б).

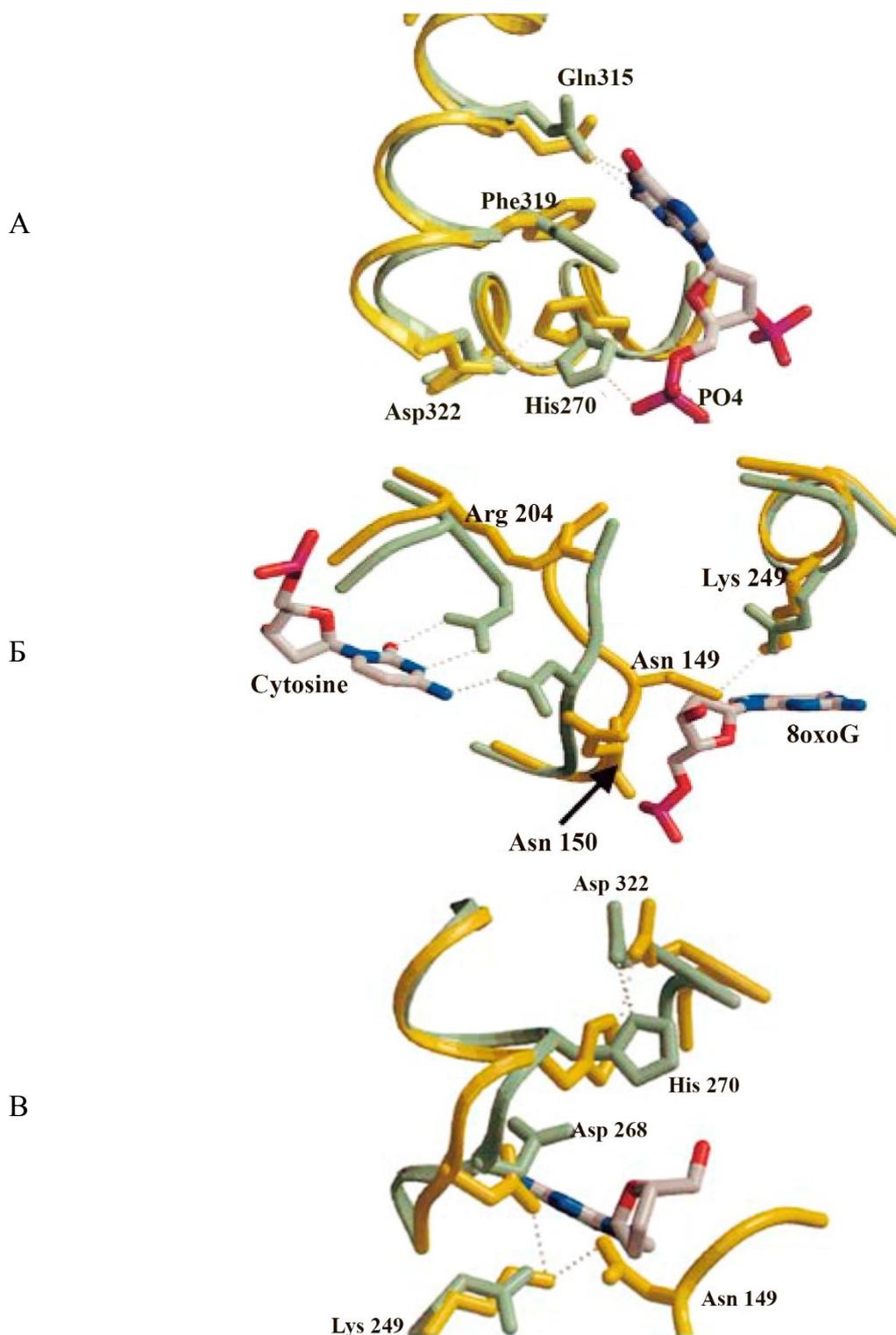


Рисунок 8. Узнавание остатка 8-охоG ферментом hOGG1. Желтым цветом обозначен свободный фермент, а светло-зеленым – связанный с ДНК. А. Конформация His270 в свободной и связанной с ДНК структурах. Участие аминокислот Gln315, Phe319 и Asp322 в образовании кармана для связывания 8охо-G. Б. Участие Asn149 в узнавании

и связывании комплементарного цитозина. В. Конформационные изменения Asp268 и His270 в процессе связывания 8-охо-G [89].

В свободном ферменте хотя и сохраняется одна водородная связь с Asp322, боковая связь His270 поворачивается более чем на 90°, по сравнению со связанной с ДНК конформацией, встраиваясь напротив фенильного кольца Phe319 и образуя два слоя сэндвича, закрытого остатком Gln315. Такое вращение остатка His270 несовместимо с конформациями Phe319 и Gln315, которые необходимы для специфического связывания 8-охоG в комплексе с ДНК. Конформации боковых заместителей аминокислот Phe319 и Gln315 определяются конформацией His270, которая сама в комплексе с 8-охоG-ДНК определяется взаимодействием с 5'-фосфатной группой 8-охоG-нуклеотида. Таким образом, связывание рибозофосфатного остова ДНК определяет конформацию остатка His270, который в свою очередь вызывает конформационные изменения в Phe319 и Gln315, что позволяет окисленному основанию связаться в специфическом кармане.

Следовательно, боковые цепи заместителей в остатках Phe319, Gln315 и His270 действуют как единое целое, переключаясь между закрытым и открытым состояниями при связывании 8-охоG-нуклеотида.

В комплексе фермента hOGG1 с 8-охоG-содержащей ДНК, полипептидная цепь между двумя α -спиралями, С-концом α -спирали 137–146 и N-концом α -спирали 151–167, содержит высоко консервативный триплет из трёх остатков аспарагина NNN (Asn149 – Asn151), который проникает в полость в цепи ДНК, образованную вследствие выворачивания из спирали 8-охоG-нуклеотида в экстра-спиральную конформацию. В составе этого NNN-сегмента находится остаток Asn149, боковая цепь которого ориентирована в сторону ДНК, образуя водородную связь с атомом N4 экзоциклической аминогруппы комплементарного 8-охоG остатка цитозина. В совокупности с водородными связями, образованными гуанидиниевой группой Arg204 с атомами N1 и O2, это обеспечивает уникальный узнающий фрагмент для комплементарного цитозина и играет, по-видимому, главную роль в обеспечении

специфичности по отношению к остатку цитозина в комплементарной цепи, которая характерна для фермента hOGG1 [116].

В свободном ферменте область аминокислот 146–151 принимает конформацию, отличную от таковой в комплексе с ДНК; сдвиг соответствующих атомов достигает 4–9 Å для связанной с ДНК структуры. Наиболее существенные изменения происходят в центре этого сегмента, где боковая цепь остатка Asn149 в свободном ферменте направлена назад в сторону фермента и образует водородные связи между амидным атомом кислорода и ε-аминогруппой каталитического остатка Lys249 (Рис. 8Б). Однако при образовании комплекса с 8-охоG-ДНК этот атом кислорода перемещается на ≈ 9 Å, чтобы осуществить взаимодействие с удаленным остатком цитозина. Остальные остатки аспарагина в триplete NNN, Asn150 и Asn 151, чьи водородные связи в комплексе с ДНК стабилизируют цитозин-узнающий фрагмент белка, в свободном ферменте направлены из комплекса в раствор. Конформация этого внутриспирального пептида в свободном ферменте не подходит для связывания 8-охоG в экстраспиральной конформации. Как встраивание сегмента белка в ДНК, так и встраивание в белок вырезаемого нуклеотида требуют сопутствующих этим процессам перестроек структуры белка.

Одним из важных последствий ре-ориентации остатка His270 в комплексе hOGG1 с 8-охоG-ДНК является небольшое перемещение участка спирали и цепи между Pro266 и Trp272, которое сдвигает боковую цепь Asp268 на расстояние более 1.5 Å по сравнению с её расположением в свободном ферменте (Рис. 8В). Остаток Asp268 каталитически важен как для hOGG1, так и для всех представителей структурного семейства, к которому принадлежит этот белок [65, 117]. Замены остатка Asp268 на аланин или аспарагин приводят к потере гликозилазной и АР-лиазной активностей, однако ДНК-связывающая активность почти не меняется. Остаток Asp268 может депротонировать ε-аминогруппу Lys249. В таком случае, нуклеофильная атака по атому углерода C1' при удаляемом 8охоG существенно упрощена; это подтверждает важность остатка Asp268 для катализа [88]. Структура мутанта K249Q помогла прояснить тонкие особенности этих взаимодействий.

В структуре комплекса hOGG1 с ДНК, содержащей F-лиганд, исследованной этими же авторами в работе [86], остаток Lys249 был удален от карбоксильной группы Asp268, что делает сомнительным предположение о её роли в депротонировании нуклеофила, и, тем самым, указывает на альтернативную функцию этого остатка в стабилизации заряженного переходного состояния дезоксирибозного кольца. Кроме того, в ДНК-связанной структуре карбоксильная группа Asp268 и имидазольная группа His270 достаточно сближены и могут образовать слабую водородную связь, которая также может облегчать, отрыв протона с помощью Asp268, обеспечивая тем самым её косвенное участие в катализе. С другой стороны, в структуре свободного hOGG1 боковые цепи Asp268 и His270 удалены на расстояние $>4 \text{ \AA}$, и расположены совершенно неоптимально для образования между ними водородной связи (Рис. 8B). В противоположность этому, в структуре свободного hOGG1 боковые цепи остатков Lys249 и Asp268 расположены оптимально для образования водородной связи между ϵ -амино- и карбоксильной группами, соответственно, и дополнительной водородной связи между ϵ -аминогруппой Lys249 и атомом кислорода бокового заместителя в Asn149 (Рис. 8B). Конфигурация боковой цепи остатка Lys249 в активном центре соответствует протонированной форме ϵ -аминогруппы, которая стабилизирована нейтральной водородной связью с атомом кислорода амидной группы Asn149 и водородной связью с депротонированным карбоксилем боковой цепи Asp268.

В соответствии с механизмом катализа, предложенном для ферментов OGG1, остаток Lys249 осуществляет нуклеофильную атаку по атому углерода C1' дезоксирибозного кольца, замещая основание 8oxoG и образуя ковалентный интермедиат – основание Шиффа – который может быть зарегистрирован с помощью восстановления двойной связи [93]. Протонированная боковая группа Lys249 в свободном ферменте не способна осуществить такую функцию, которая требует присутствия неподелённой пары электронов, как в нейтральной ϵ -NH₂. Поэтому остаток Lys249 должен быть депротонирован для того, чтобы могла пройти эта реакция, и это может произойти лишь в том случае, если взаимодействия, стабилизирующие протонированное состояние Lys249, исчезают при связывании с субстратом.

Перестройка окружения остатка Lys249 влияет на всю структуру фермента при взаимодействии с субстратом с 8-охоG:C. Такая реорганизация структуры облегчает депротонирование остатка лизина, облегчая нуклеофильную атаку и осуществление каталитического выщепления. Таким образом, связывание с нуклеотидом 8-охоG способствует изменению положения остатка Asp268 через перемещение остатков Phe319 и 270, что приводит к разрыву его ион-парной/водородной связи с Lys249. Параллельно, для того, чтобы осуществить взаимодействие фермента с остатком цитозина комплементарной цепи, происходит выворачивание межспиральной петли и разрыв водородной связи между остатком Lys249 и боковой карбоксильной группой Asn149. Вследствие исчезновения этих нейтрализующих взаимодействий существование протонированной формы ε-аминогруппы Lys249 должно быть невыгодно по сравнению с образованием нейтральной формы в результате отрыва протона карбоксильной группой Asp268, одновременно с его перемещением и исчезновением водородной связи с Lys249.

Таким образом, авторы [93] делают вывод о том, что водородные связи, образованные остатками Asp268 и Asn149 с протонированным атомом азота ε-аминогруппы Lys249, служат триггерными замками в свободном ферменте; одна водородная связь связана с узнаванием 8-охоG, другая – цитозина, и обе должны исчезнуть для того, чтобы фермент был готов к нуклеофильной атаке дезоксирибозы ДНК.

В работе [97] исследовали ферментативную активность мутантных форм hOGG1 в отношении различных повреждений, являющихся субстратами hOGG1 дикого типа: N7-meFapyG, 8-охоG и 8-охоA. Они показали, что WT hOgg1 и мутантная форма Q315A эффективно удаляют N 7 -meFapyG, 8-охоG и 8-охоA из поврежденного ДНК-субстрата. Напротив, мутантные формы hOgg1 H270A, H270L и F319A показали значительно сниженную ДНК-гликозилазную активность в отношении тех же субстратов. 8-охоG ДНК-гликозилазная активность мутантных форм H270A, H270L и F319A были в 160-, 1000- и 200 раз ниже чем у фермента дикого типа, соответственно. Но стоит отметить, что по сравнению с полностью неактивной

мутантной формой K249Q, авторам все же удалось зафиксировать остаточную активность мутантов H270A и F319A.

1.6. Роль ASP268 в каталитической активности hOGG1

Роль остатка аспартата Asp268, участвующего в каталитической стадии hOGG1, была подтверждена в [91]. Для этого в данной работе проводили замены Asp268 на аспарагин (D268N), глутамат (D268E), и глутамин (D268Q). Показано, что Asp268, расположенный на N-конце α -спирали (Рис. 9) выполняет двойственную функцию, катализируя протекание стадий удаления основания и разрыва цепи. Замена этой аминокислоты на аспарагин приводила к сильному замедлению ферментативной активности у D268N hOGG1. Кристаллическая структура указанной мутантной формы была первой полученной структурой hOGG1, с наличием нуклеофильного Lys249 в активном центре и находящейся в нем поврежденной ДНК (8-охоG и THF). Анализ этой структуры позволил авторам предположить, что удаление основания 8-охоG идёт через разрыв гликозидной связи и лишь последующее присоединение Lys249. С другой стороны, замена аспартата на глутамин (D268Q hOGG1) и глутамат (D268E hOGG1) хотя и дестабилизировали структуру (укладку) белка, но к удивлению авторов, не приводили к потере каталитической активности.

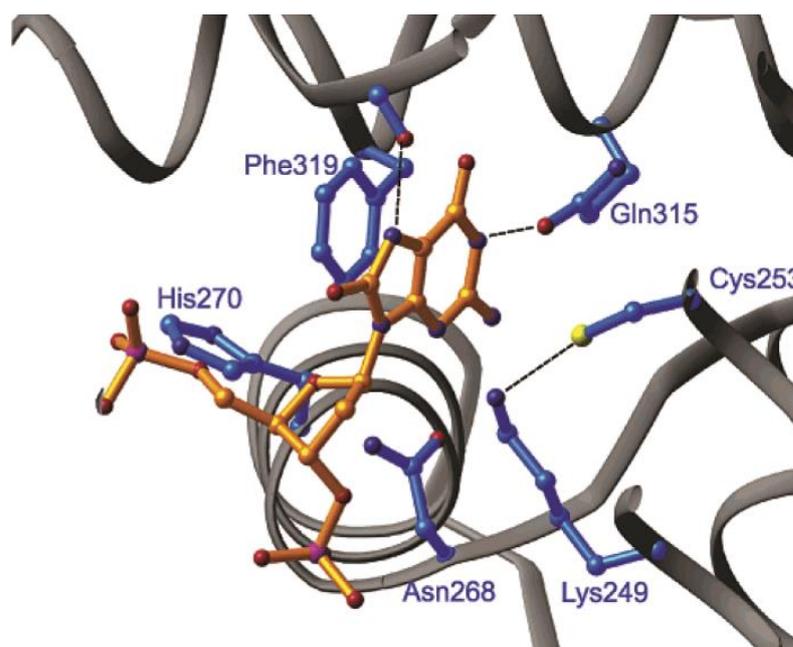


Рисунок. 9. Структура активного центра D268N hOGG1 в составе комплекса с ДНК-дуплексом, содержащим 8-охоG. Визуализация PDB-файла 1N3C [91].

В работе было установлено, что структуры комплексов с ДНК у мутантных по Asp268 форм hOGG1, близки к определенной ранее структуре комплекса мутанта K249Q [88]. Величина среднеквадратичного отклонения координат для структур белковых остовов мутантов hOGG1 D268N и K249Q составляет 0.32 Å, что с уверенностью позволяет говорить о том, что структуры идентичны. Если сравнивать структуры фермента дикого типа и мутанта D268E hOGG1, связанного с THF-аналогом, то величина среднеквадратичного отклонения составляет 0.45 Å, и 0.59 Å для структур WT hOGG1/THF и D268Q hOGG1/THF, соответственно. Это свидетельствует о том, что в этих мутантах в результате замены аминокислот активного центра не происходит глобальных структурных перестроек. Во всех трёх структурах единственные серьезные перестройки происходили в области активного центра, а именно, в положении первых трех аминокислот α -M-спирали (остатки 269, 270 и 271). Во всех трех структурах нуклеофильная ϵ -NH₂-группа Lys249 имеет примерно фиксированное положение в кристалле, хотя она и находится на конце длинной алкильной цепи. В этой структуре ϵ -NH₂-группа аминокислоты Lys249 расположена вблизи атома C1' дезоксирибозы (3.4 Å), однако не на траектории, подходящей для прямой нуклеофильной атаки по гликозидной связи (Рис. 9). Наиболее удивителен факт, что ϵ -аминогруппа Lys249, по-видимому, образует водородную связь с сульфгидрильной группой аминокислоты Cys253, которая наоборот находится на вандер-ваальсовском расстоянии от π -системы основания 8-охоG. Из-за того, что остаток Cys253 расположен над верхней поверхностью рибозы, остатку Lys249 невозможно осуществить контакт с Cys253 при атаке сахара с нижней стороны. В то время как в ферменте дикого типа карбоксильный кислород Asp268 образует водородную связь с боковой цепью остатка His270, в мутанте D268N NH₂-амидная группа Asn268 удалена слишком далеко от остатка His270, чтобы была возможность образовать водородную связь. Отсутствие такого взаимодействия позволяет объяснить сравнительно слабое связывание ДНК с мутантом D268N, поскольку His270 напрямую взаимодействует с фосфатным остовом с 5'-стороны от повреждения. Остальная часть активного центра

и узнающего основание кармана идентична для структур D268N и K249Q hOGG1 связанных с 8-охоG-содержащей ДНК.

Фермент hOGG1 катализирует два последовательных превращения - вырезание основания и затем β -лиазный разрыв цепи, каждое из которых включает множество элементарных стадий (Рис. 1). Хотя достаточно давно известно, какие именно аминокислоты наиболее важны для вырезания основания, а именно, Lys249 и Asp268, роль остатка Asp268 в этом процессе оставалась не до конца ясной. Логично допустить, что Asp268 сопровождает вырезание основания путем депротонирования остатка Lys249, тем самым превращая неактивную катионную форму в нуклеофильный нейтральный амин. Однако против этого свидетельствует тот факт, что остаток Asp, находящийся на конце α -спирали белка, должен быть на несколько порядков величины менее основным; стабильное положение должно полностью препятствовать вращению Asp268 вокруг связи $C^\alpha-C^\beta$ с целью взаимодействия с Lys249. В кристаллической структуре дикого типа фермента в комплексе AP-ДНК [91] показано, что взаимодействие между Asp268 и Lys249 отсутствует. Действительно, только в структуре свободного белка эти два остатка были связаны водородной связью, при этом Asp268 сохраняет свое положение в α -спирали, а Lys249 разворачивается, как на шарнире, чтобы обеспечить с ним контакт [89]. Важно то, что даже при ослабленном кэпинг-взаимодействии и более длинной боковой цепи в мутантном белке D268E боковая цепь остатка Glu не взаимодействует с Lys249. Можно предположить, что если pK_a Lys249 понижается даже ненамного за счет микроокружения, то при этом получается некоторое количество нейтрального амина; этого может быть достаточно, чтобы вызвать разрезание гликозидной связи и удаление основания.

Альтернативное предположение – это электростатическая стабилизация с помощью остатка Asp268 положительного заряда на атоме O4' в переходном состоянии дезоксирибозы в реакции удаления основания [86]. С этой точкой зрения согласуется тот факт, что во всех структурах hOGG1, имеющих в положении 268 остаток Asp, карбоксильный атом кислорода располагается вблизи атома O4' сахаро-фосфатного остова ДНК, примерно на расстоянии 3.2 Å. Вследствие прочного взаимодействия с собственной α -спиралью ориентация боковой цепи Asp268 в

мутанте of D268N почти такая же, как и у аминокислоты Asp268 в ферменте дикого типа. Следовательно, замещение остатком Asn положения 268 приводит к замене отрицательно-заряженного атома кислорода на нейтральную NH₂-группу с той же локализацией в активном центре. Расстояние между амидным азотом остатка Asn268 и атомом O4' дезоксирибозного кольца больше (3.4 Å), чем можно было ожидать для случая водородной связи между этими атомами, однако этого достаточно, чтобы атом O4' отчасти испытывал влияние положительного электростатического поля амидных протонов остатка Asn268. Поэтому авторы указанной работы объясняют эффект замены заряда на противоположный знак от Asp (δ^-) на Asn (δ^+) в положении 268, как способствующий увеличению энергии переходного состояния в реакции удаления основания вследствие увеличения положительного заряда на O4', что приводит к значительному уменьшению скорости этой реакции.

В работе [118] было проведено молекулярно-динамическое исследование белка OGG1 человека в комплексе с ДНК, содержащей пару oхoG:A, и мутантные варианты белка OGG1 в комплексе с ДНК, содержащей пару AP:C. Некоторые аминокислотные остатки моделировали в нестандартных зарядовых состояниях: Cys253 в виде тиолат-аниона, Lys249 с нейтральной ϵ -аминогруппой и Asp268 с нейтральной карбоксильной группой, как описано в работах [88, 90]. Показано, что низкая активность фермента сопровождается снижением заселенности популяций с остатками Lys249 и Asp268, расположенными оптимально для катализа. Будет ли фермент hOGG1 проявлять активность или нет в отношении субстрата - определяет заселенность популяций каталитически компетентных конформеров остатков Lys249 и Asp268 в активном центре фермента.

Резюмируя вышесказанное, необходимо отметить – в работе [91] показано, что форма hOGG1, содержащая замену аспартата Asp268 на аспарагин (D268N), является абсолютно неактивной. Мутации D268Q или D268E, хотя и приводили к менее выгодной конформации фермента, но не снижали каталитическую активность. Полученные данные отвергают высказанное ранее предположение о роли остатка Asp268, как кислотно/основного катализатора hOGG1, однако они подтверждают его участие в формировании заряда на атоме O4' дезоксирибозы при 8-охоG в ходе стадии вырезания основания.

Авторы [119] выяснили, что процесс ассоциации и диссоциации OGG1 с ДНК жестко регулируется консервативным остатком G245, что имеет решающее значение для быстрого привлечения OGG1 к окислительным повреждениям, индуцированным облучением лазером в микродозах. Кроме того, они показали, что остатки Y203, N149 и N150, хотя и участвуют в ранних стадиях зондирования ферментом OGG1 повреждений 8-охоG [97], по-разному регулируют привлечение фермента к окислительным повреждениям. Экспериментально авторами был применен новый метод индукции повреждений ДНК: они создавались локальным лазерным облучением, позволяющим точно определить время и локализацию индукции повреждений по сравнению с другими существующими методиками повреждения ДНК [120]. Мутанты Y203 и N149/N150, участвующие на ранних стадиях инициации и стабилизации вырезания оснований, оказывают кардинально различное влияние на динамическое поведение гликозилазы в ядре. В результате исследования предложена модель, объясняющая влияние изученных мутаций на функционирование комплекса OGG1 с ДНК (Рис. 10).

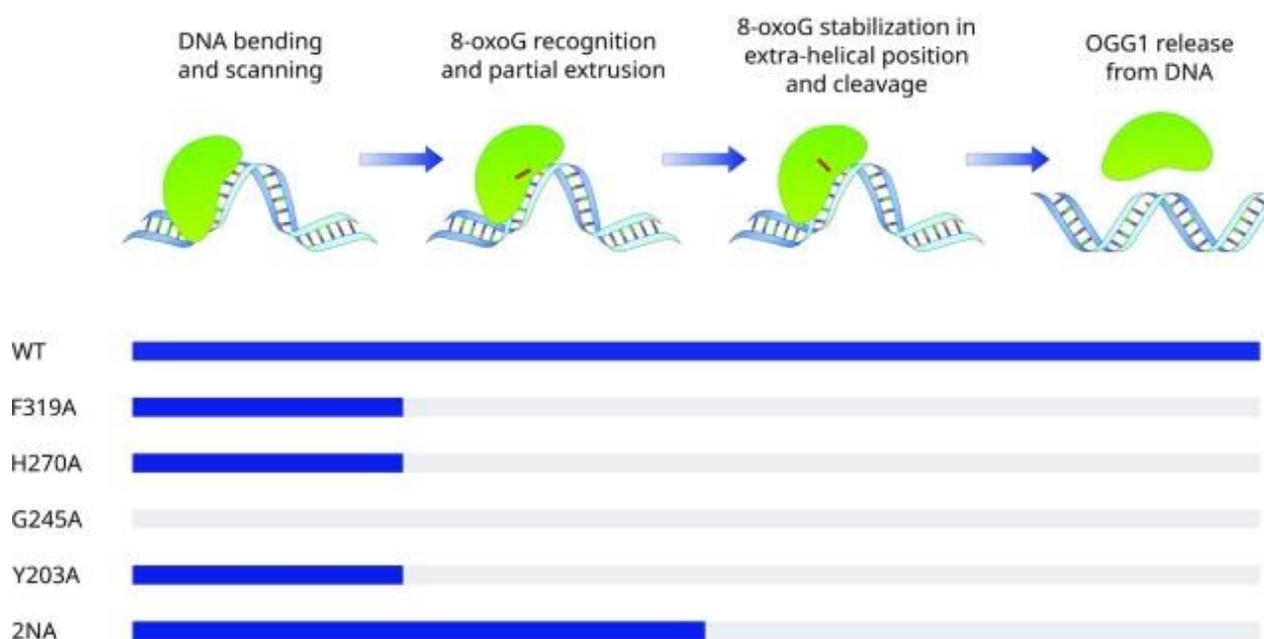


Рисунок 10. Модель, суммирующая влияние мутаций на различные этапы обнаружения и высвобождения 8-охоG ферментом OGG1 [119].

Полученные в работе данные подтвердили показанное ранее, в том числе и в нашей работе [121, 122], что остаток Y203 играет центральную роль в узнавании 8-охоG, и, таким образом, необходим для эффективного привлечения OGG1 к поврежденному основанию.

1.7. Роль остатков цистеина в функционировании hOGG1

hOGG1 дикого типа содержит восемь остатков цистеина. Для того, чтобы понять вклад этих остатков в каталитическую активность hOGG1, Wang с соавторами [123] обрабатывали фермент N-этилмалеимидом (NEM) для блокировки остатков цистеина, и анализировали его гликозилазную активность. Остатки C28 и C75 расположены на N-конце белковой молекулы, а C253 и C255 - на C-конце. Остатки C241, C253 и C255 расположены в высоко консервативном мотиве спираль-шпилька-спираль (Рис. 11).

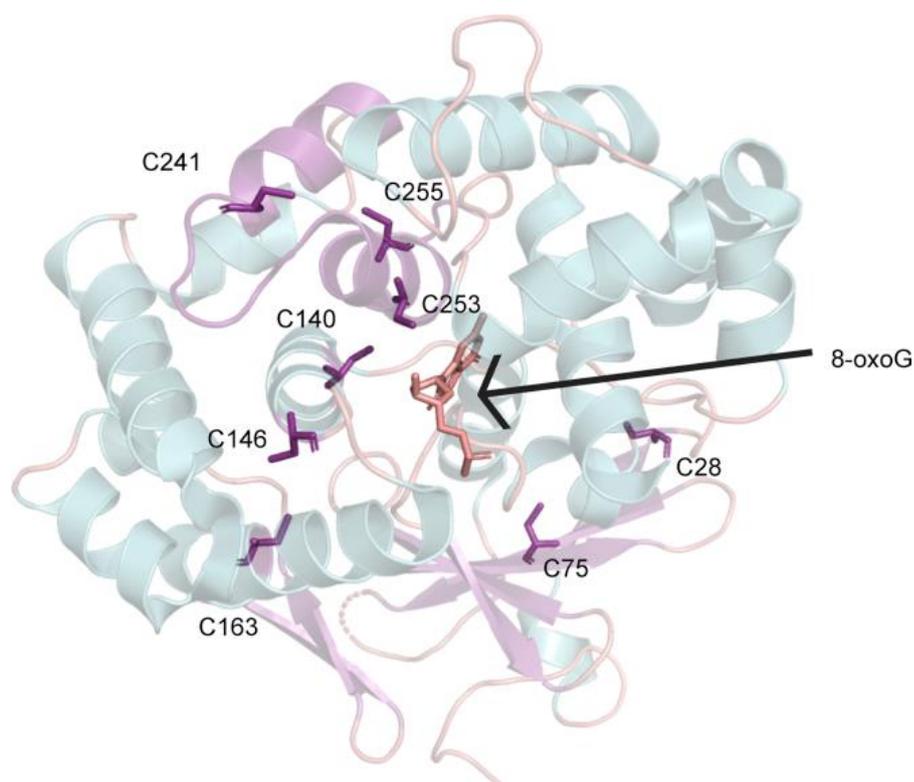


Рисунок 11. Локализация остатков цистеина в трехмерной структуре OGG1. В представленной кристаллической структуре OGG1 (PDB: 2NOL) цистеины отмечены розовым [123].

Для каждой из указанных позиций были получены мутантные формы фермента, содержащие единичные замены цистеина на серин. Серин был выбран в качестве заместителя исходя из сходства по размеру сульфгидрильной (SH) группы в цистеине и гидроксильной (OH) группы в серине. Авторам удалось доказать, что цистеины в OGG1 можно разделить на четыре функциональные категории: необходимые для гликозилазной активности (C146 и C255), необходимые для лиазной активности (C140S, C163, C241, и C253), остатки, обеспечивающие структурную стабильность (C253) и те, для которых функция пока не определена (C28 и C75). Наиболее значительное снижение гликозилазной активности, отмеченное у мутантной формы C255S, характеризовалось уменьшением скорости гликозилирования до $0,004 \text{ с}^{-1}$, в сравнении с $0,5 \text{ с}^{-1}$ у фермента дикого типа и $0,22 \text{ с}^{-1}$ у мутантной формы C146S. И остаток C253, и C255, оба локализуются внутри одной α -спирали, на расстоянии $4,3 \text{ \AA}$ между ними. В работе нашей группы мы также демонстрировали, что замена C253 на лейцин или изолейцин существенно снижает активность hOGG1 [124].

Окислительные модификации остатков цистеина в OGG1 являются обратимыми модификациями, когда фермент функционирует в клетке, и возврат к окислительно/восстановительному балансу исправляет модификацию [72, 80, 111, 112]. Инактивация OGG1 при окислении цистеинов не мешает связыванию с ДНК-субстратом, но блокирует его гликозилазную активность [75, 125]. OGG1 с окисленными цистеинами сохраняет способность распознавать субстрат, изгибать ДНК и выдавливать поврежденное основание в активный карман; однако конформация комплекса фермент/ДНК не приспособлена для эксцизии основания, вероятно, из-за неспособности лизина K249 атаковать C1' дезоксирибозы своей ϵ -аминогруппой, как было подробно рассмотрено ранее нашей обзорной статье [126].

1.8. Влияние других аминокислотных остатков на эксцизионную активность OGG1

В работе [127] были наработаны и очищены 4 мутантных варианта hOGG1 - R46Q, A85S, R154H и S232T и было проведено исследование эффективности таких мутантных форм фермента в репарации и влияние замен на термостабильность. Все

указанные мутантные формы встречаются в природе. Вариант R46Q hOGG1 был впервые обнаружен в клеточной линии рака легкого человека [128] и характеризовался сниженной репарационной активностью по сравнению с диким типом hOGG1 [129, 130]. Вариант R154H hOGG1 возникает в результате соматической мутации; впервые он был обнаружен в клеточной линии рака желудка [131]. Помимо пониженной активности в отношении своего "природного" субстрата 8-охоG, сопряженного с цитозином, R154H hOGG1 также проявляет пониженную специфичность к основанию, находящемуся напротив 8-охоG [88, 129]. Все исследуемые варианты hOGG1 продемонстрировали лишь незначительные нарушения кинетики расщепления 8-охоG по сравнению с hOGG1 дикого типа. Наибольшее подавление фазы отщепления поврежденного основания наблюдали для варианта R154H, для которого значения $k_I = 0,23 \pm 0,03 \text{ мин}^{-1}$ по сравнению с диким типом hOGG1 ($k_I = 1,4 \pm 0,1 \text{ мин}^{-1}$). Замена R46Q значительно дестабилизировала hOGG1 по сравнению с диким типом ($T_m = 36,6 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ по сравнению с $T_m = 41,8 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$). Напротив, варианты A85S и S232T hOGG1 (оба $T_m = 42,2 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1$) обладают сходной термостабильностью по сравнению с hOGG1 дикого типа. Наконец, вариант R154H hOGG1 стабилизирован незначительно ($T_m = 43,2 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$). Таким образом, вариант R46Q hOGG1 термолабилен. Изучение структуры комплекса R46Q hOGG1 в состоянии, когда фермент связывает ДНК, показало, что R46 функционирует как стабилизирующая основа, объединяя три существенных элемента вторичной структуры: αE , βG и петли между αA и βB [88]. Мутация R46Q с высокой вероятностью изменит образование водородных связей, благодаря которым три элемента вторичной структуры сближены, а разрушение каркаса дестабилизирует все окружение.

1.9. Механизм узнавания поврежденного основания

Структура гетероциклических оснований 8-охоG и G, по большому счёту, отличается только по двум положениям: C8 (O против H) и N7 (H против неподелённой пары электронов). По этой причине протон при атоме N7 в 8-охоG имеет возможность образовывать водородную связь с карбонилем основной цепи остатка Gly42, тогда как у неповрежденного G такой возможности нет. Для того чтобы

детальнее разобраться в структурных особенностях взаимодействия фермента hOGG1 с окисленным основанием 8-охоG и неповрежденным G, в работе [90] изучали взаимодействие с ДНК-субстратами мутантного белка N149C hOGG1, у которого полностью отсутствует каталитическая активность. Остаток Cys149 через дисульфидную связь соединяли линкером с атомом C4 в остатке цитозина, комплементарного 8-охоG. Это позволяло ограничить возможность диссоциации белка из комплекса с ДНК. Были получены кристаллические структуры комплексов N149C hOGG1 с 8-охоG-, G- и 7-deazaG-содержащими ДНК-дуплексами.

Обнаружено, что в комплексах hOGG1 с 8-охоG и G-содержащими ДНК изгиб спирали ДНК в месте выворачивания нуклеозида составляет ~70 и ~80 градусов, соответственно. Основание 8-охоG, при этом, погружено глубоко в узнающий повреждение карман фермента, а G – выталкивается из этого кармана и лежит на поверхности фермента в «экзо-сайте», расположенном на расстоянии примерно 5 Å от кармана фермента (Рис. 12 А, Б). Основание G взаимодействует с двумя остатками активного центра Phe319 и His270, но эти контакты отличаются от тех, что имеют место в случае 8-охоG. В комплексе с 8-охоG-субстратом остаток His270 не контактирует с этим основанием, а вместо этого образует водородную связь с его 5'-фосфатом. В комплексе с G этот фосфат не участвует в образовании контакта, а His270 взаимодействует с π-системой основания.

Оценка свободной энергии взаимодействия остатков 8-охоG и G с активным центром фермента hOGG1 (ΔA_1 и ΔA_2 , соответственно), проведенная в [90] с использованием компьютерного моделирования по методу квантовой механики/молекулярной механики, показала, что свободная энергия дискриминации поврежденного основания $\Delta\Delta A = \Delta A_1 - \Delta A_2$ равна -6.8 ккал/моль, что соответствует 10^5 -кратному предпочтительному связыванию в активном центре остатка 8-охоG по сравнению с G.

Водородная связь, образующаяся между карбонильным атомом кислорода Gly42 и протоном при атоме N7 8-охоG, сильно стабилизирует структуру комплекса. В случае G – вместо неё будет кулоновское отталкивание между карбонилем Gly42 и

неподеленной парой электронов атома N7, если остатки G и Gly42 будут занимать в комплексе те же положения, что и в комплексе с 8-охоG.

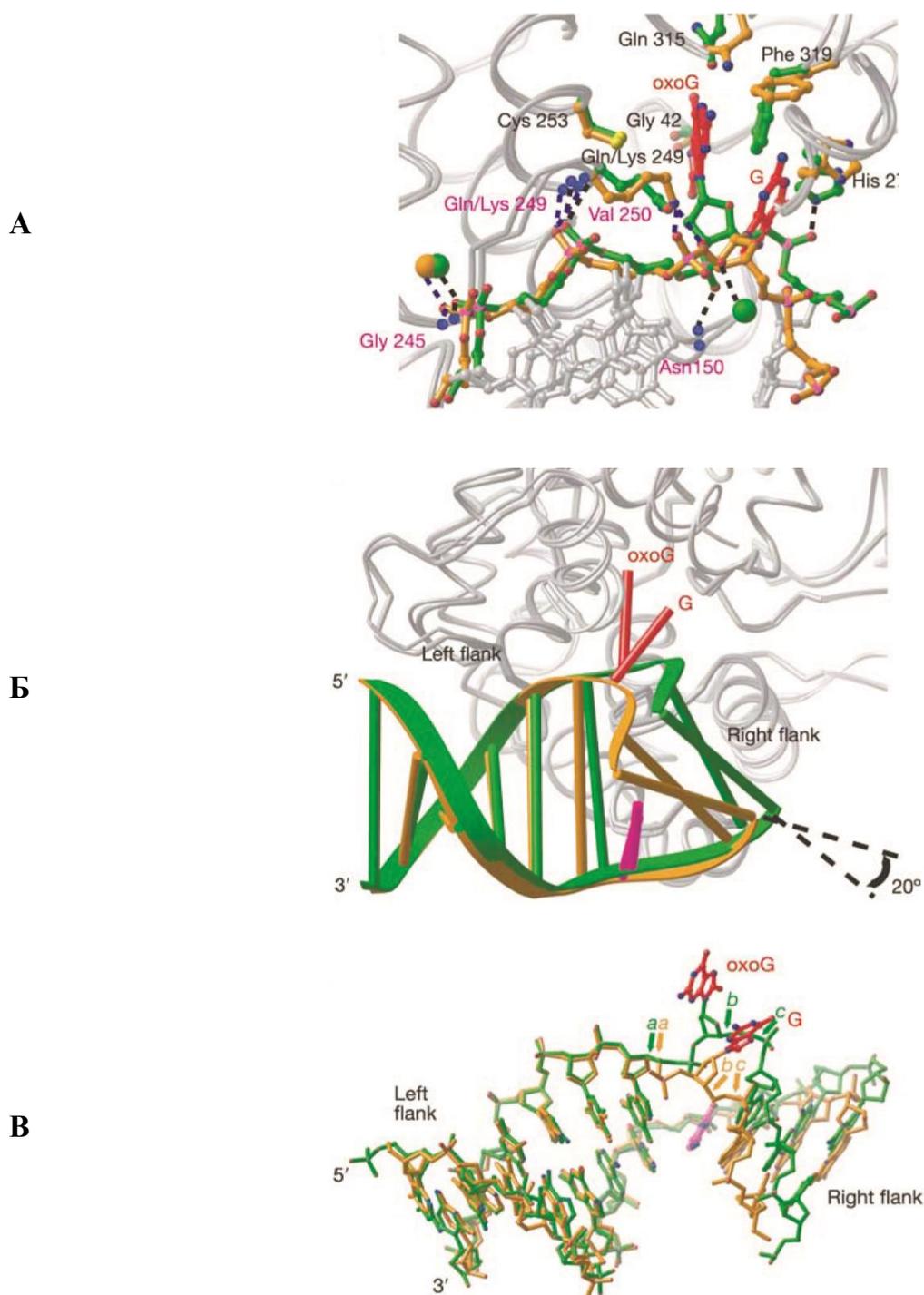


Рисунок 12. Наложение структур N149C hOGG1 с ДНК-дуплексом, содержащим либо 8-охоG, либо G. **А.** Расположение аминокислот активного центра фермента при взаимодействии с основаниями 8-охоG и G. **Б.** Изменение структуры ДНК-дуплекса в

зависимости от связывания повреждённого и неповреждённого оснований. **В.** Изменение геометрических параметров ДНК в области связывания с ферментом. Жёлтыми и зелёными стрелками обозначены валентные связи, претерпевающие существенное вращение: $+110^\circ$ (стрелка а) для связи C4'–C5' с 3'-конца от 8-охоG, $+119^\circ$ (стрелка b) для связи C4'–C5' 8-охоG, -151° (стрелка с) для связи P–O5' [90].

Работа [90] позволяет глубже понять механизм узнавания поврежденного основания. Выворачивание основания из цепи ДНК не может происходить в ходе одной стадии, как согласованный процесс. Скорее всего, он протекает через образование серии дискретных состояний. Этот вывод основывается на том, что комплекс фермента hOGG1 с G-субстратом может имитировать интермедиат, образующийся с 8-охоG-субстратом, непосредственно перед выворачиванием основания в карман активного центра.

Сравнение конформаций комплексов фермента с G- и 8-охоG-содержащей ДНК позволяет понять, что происходит на последней стадии выворачивания основания. Со стороны 3'-конца (слева) от данного нуклеотида структуры комплексов очень похожи. Сохранение контакта в этих комплексах обеспечивается водородными связями со структурным мотивом фермента «спираль — шпилька — спираль» (helix–hairpin–helix), включающим остатки Gly245, Gln 249 и Val250), а также сохраняется электростатическое взаимодействие с ионом двухвалентного металла (Рис. 12А). Единственным исключением из этого совпадения является 3'-фосфат экстраспирального нуклеозида, который образует водородную связь с Lys249 в G-комплексе; тогда как в комплексе, содержащем 8-охоG, остаток Lys249 должен быть исключен из взаимодействия с 3'-фосфатом и повернут в сторону активного центра для того, чтобы принять участие в каталитической стадии. Предполагается, что контакты с левой стороны от повреждения – возможно даже контакт 3'-фосфата ДНК с Lys249 – устанавливаются раньше, чем фактически произойдет выворачивание поврежденного основания. С правой стороны от экстра-спирального нуклеозида, конформации спирали являются разными для G и 8-охоG-структур. Следовательно, в комплексе с G-ДНК имеет более выраженный изгиб спирали ($\sim 80^\circ$ по сравнению с $\sim 70^\circ$); дуплекс с правой стороны также сильнее повернут, примерно на $\sim 20^\circ$ вокруг

оси спирали (Рис. 12Б). Эта разница возникает из-за потери водородных связей, образованных между 3'- и 5'-фосфатами и NH-группой основной цепи остатка Asn150 и NH-группой боковой цепи остатка His270. Двухвалентный катион Ca^{2+} , который координирует 3'-фосфат и стабилизирует изгиб за счет внутри- и внешнесферных контактов с внеспиральным нуклеозидом, также отсутствует в G-комплексе (Рис. 12А). Эти контакты устанавливаются в 8-охоG-комплексе только после выворачивания поврежденного нуклеотида в узнающий карман фермента.

С учётом достигнутого прогресса в понимании структурных основ проявления ферментом высокой специфичности по отношению к поврежденному основанию остается непонятным, как фермент hOGG1 узнает 8-охоG внутри ДНК-спирали. По мнению авторов работы [132], решение этого вопроса заключается в идентификации вариантов hOGG1, способных узнавать внутриспиральное повреждённое основание, но значительно снижать способность связывания внеспирального повреждения.

В работе [132] был проведен анализ структуры мутантных форм hOGG1, содержащих замены аминокислот, участвующих в формировании контактов с 8-охоG. Как и в предыдущей работе [90], авторы использовали технологию межмолекулярных дисульфидных сшивок для ковалентного связывания остатков цистеина в hOGG1 с атомом C4 цитозина, комплементарного окисленному гуанину. Показано, что мутации по остатку His270, который образует контакт с 5'-фосфатом (мутант H270A), и по остатку глутамина Gln315, взаимодействующему с Уотсон-Криковской поверхностью ДНК (мутант Q315A), не влияют на структуру фермента, но лишают его функциональности.

С другой стороны, замена Gly42, формирующего специфический, показанный ранее [88] контакт с 8-охоG, на аланин (мутант G42A) приводит к появлению препятствия для связывания 8-охоG в области контактной поверхности между ДНК и hOGG1. Важно отметить, что Gly42 – единственная аминокислота в hOGG1, которая непосредственно «считывает» структурную разницу между G и 8-охоG: атом N7 8-охоG образует водородную связь с карбонильным кислородом Gly42 [90]. Замена атома водорода при C_{α} -атоме Gly42 гораздо более объёмной метильной группой аланина (мутант G42A) вносит существенные стерические затруднения при

связывании 8-охоG в активном центре фермента (Рис. 13А); такое связывание вызывает конформационные реорганизации во вторичной структуре hOGG1 и изменяет присутствие определенных аминокислот в активном центре.

При введении мутации Q315F, которая стерически препятствовала связыванию 8-охоG в кармане активного центра, были получены две структуры: Q315F*149 и Q315F*292, в которых цитозин комплементарной цепи был ковалентно связан с остатками цистеина 149 и 292, соответственно. Мутант Q315F*149 действительно не связывал остаток 8-охоG в кармане активного центра, а только в экзо-сайте (Рис. 13Б). Однако мутант Q315F*292 позволял остатку 8-охоG почти полностью погружаться в узнающий карман, так что могли образовываться водородные связи между Gly42 и 8-охоG N7-H (Рис. 13В). Авторы данной работы полагают, что в этой структуре за счёт ковалентной сшивки с удаленным Cys292 стабилизируется слабое взаимодействие основания 8-охоG с узнающим повреждение карманом. Несмотря на то, что в этой структуре остаток 8-охоG погружен в карман активного центра, его отрыв от ДНК не происходит. Необходимо также отметить, что замена Gln на Phe в мутанте Q315F вызывала полную потерю специфичности hOGG1 при связывании 8-охоG-содержащей и неповреждённой ДНК.

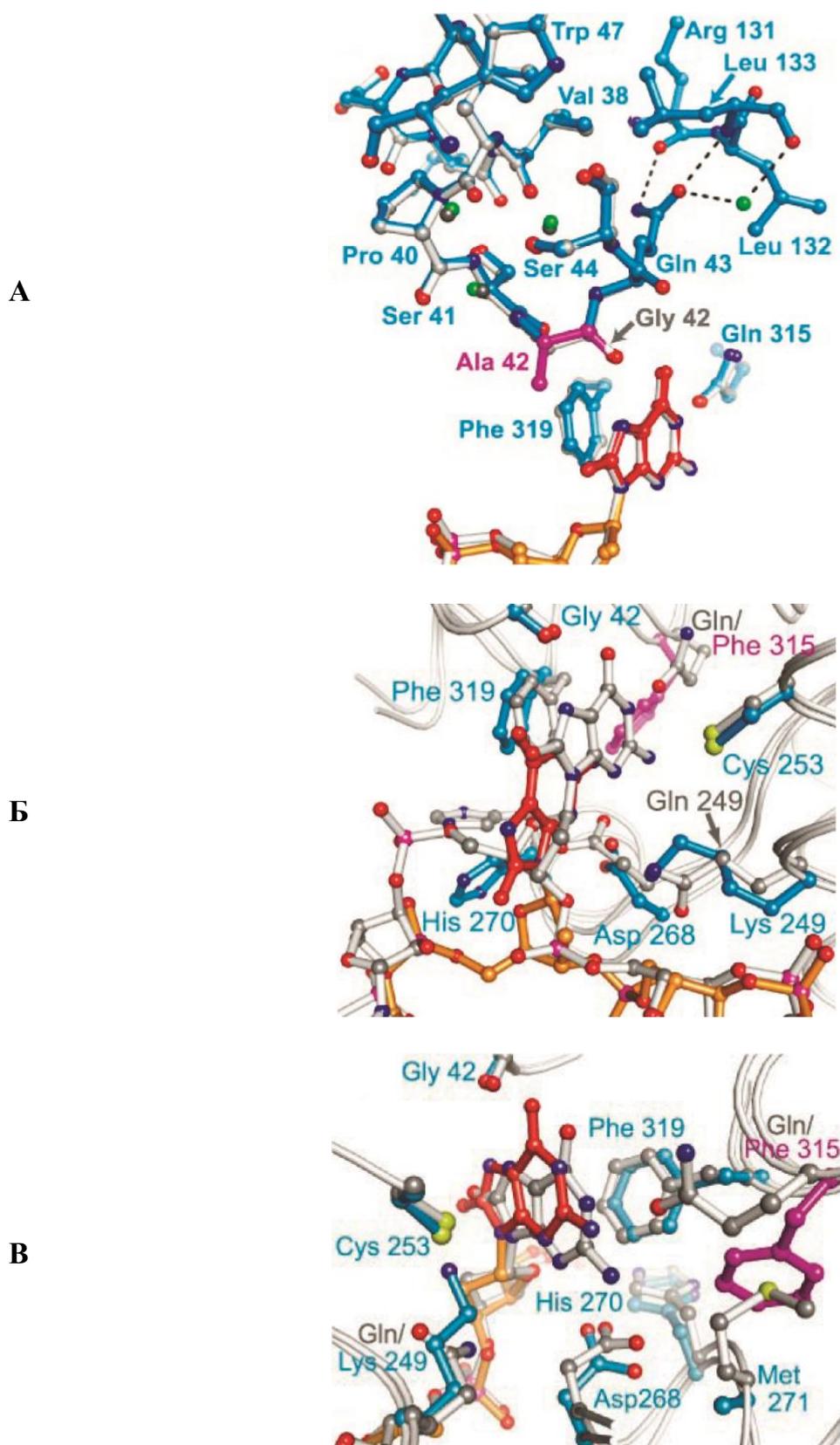


Рисунок 13. Изменения в расположении аминокислот активного центра hOGG1 в комплексе с 8-охоG-содержащей ДНК вследствие введения мутаций по аминокислотам, участвующим в формировании контактов с 8-охоG. А. Наложение

аминокислот активного центра hOGG1 для WT (серый остов) и мутантной формы G42A (синий остов). **Б.** Аминокислоты активного центра для структуры Q315F*149; остаток 8-охоG для WT hOGG1 приведён в сером цвете, для Q315F – красный. **В.** Аминокислоты активного центра для структуры Q315F*292 [132].

С целью детального выяснения роли отдельных аминокислот, участвующих в связывании 8-охоG в активном центре фермента hOGG1 в работе [85] был синтезирован фотоактивируемый аналог 8-охоG, несущий на атоме кислорода, находящемся при C6 в остатке 8-охоG, орто-нитрофенил-изопропильную группу (PC). Использование такого производного в составе ДНК-субстрата в сочетании с флеш-крио-трэппингом продуктов позволило структурно охарактеризовать один из наиболее поздних интермедиатов, образующихся в ходе процесса BER.

Комплекс фермента с PC-субстратом имел такую же структуру, что и комплекс с G-субстратом, то есть модифицированное PC-основание располагалось в экзо-сайте фермента hOGG1 [90]. Вследствие облучения кристалла этого комплекса светом с длиной волны 373 нм при 4 °C в течение 30 секунд фотоактивируемое производное отщепляло орто-нитрофенил-изопропильную группу и превращалось в 8-охоG (PC-комплекс). Дальнейшее быстрое замораживание в жидком азоте и анализ полученной структуры показали, что образовавшееся основание 8-охоG оказывалось в кармане активного центра в том же положении, что и в комплексе hOGG1 с 8-охоG-содержащей ДНК [88, 132]. При этом присутствовал контакт, являющийся определяющим в проявлении специфичности узнавания 8-охоG ферментом, образованный за счёт водородной связи между атомом N7 основания 8-охоG и карбонильным атомом кислорода основной цепи остатка Gly42; хотя длина этой связи была больше, чем в комплексе с 8-охоG-субстратом (LRC-комплекс) (3.4 Å против 2.8 Å) (Рис. 14).

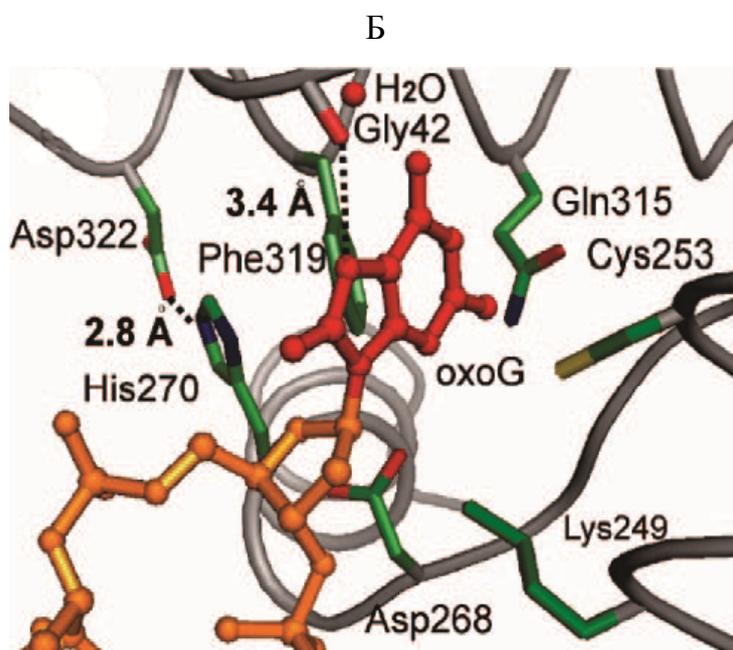
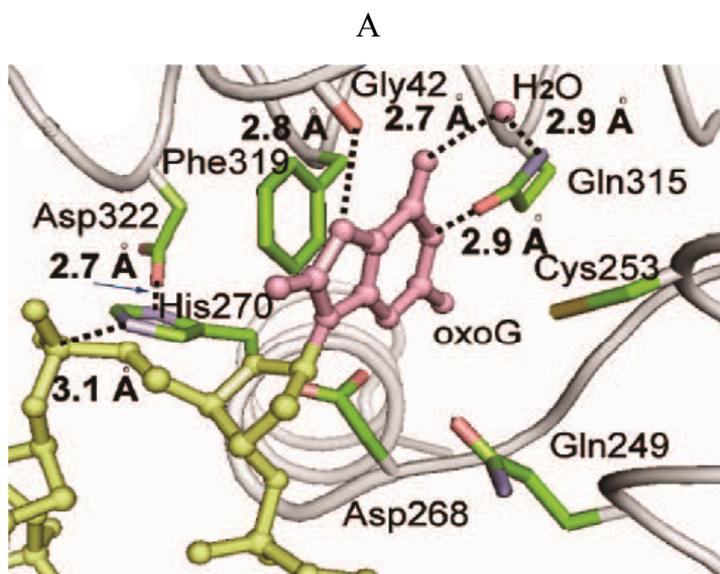


Рисунок 14. Расположение аминокислот активного центра относительно 8-охоG в LRC-комплексе (А) и PC-комплексе (Б) [85].

Кроме этого основного контакта в PC-комплексе другие взаимодействия 8-охоG с ключевыми аминокислотами отсутствовали. Из работ [88, 132] известно, что три ключевые аминокислоты в hOGG1, играют важную роль в формировании контактов с 8-охоG, а именно, Phe319, Cys253 и Gln315. В PC-комплексе они находятся в других положениях, чем в полученных ранее структурах [88] (см. Рис. 4,

Рис. 14А). Кроме того, дополнительный контакт между His270 и 5'-фосфатом 8-охоG, имеющийся в LRC-комплексе, в PC-комплексе отсутствует. Вместо этого His270 находится в стэкинге с Phe319, тогда как водородная связь между His270 и Asp322, присутствующая в FC-комплексе, отсутствует в LRC-комплексе с 8-охоG-субстратом. Каталитическая нуклеофильная боковая цепь Lys249 в FC-комплексе дезориентирована и не вовлечена в образование ключевого солевого мостика с остатком Cys253 (Lys249(NH³⁺)/Cys253(S⁻)), который был предсказан расчетным путём в [90] для стадии узнавания основания 8-охоG. Это различие между FC- и LRC-комплексами не ограничивается расположением боковых заместителей перечисленных аминокислот. Спираль α -O, в которой находятся три аминокислоты активного центра, Gln315, Phe319 и Asp322, также оказывается отодвинутой от активного центра (Рис. 14Б).

Таким образом, изученная в данной работе структура комплекса относится к наиболее позднему интермедиату, когда-либо до сих пор исследованному для ДНК-гликозилаз, в котором основание 8-охоG почти полностью вставлено в активный центр, однако последний еще не приобрёл конечную каталитически-активную конформацию [133]. Полученные в работе данные показали, что попадание поврежденного основания из экзо-сайта в активный центр фермента происходит намного быстрее, чем последующая реорганизация аминокислот активного центра, необходимая для образования каталитически-компетентного состояния.

В последующей работе Verdine G. с соавторами [134] использовали отработанную ранее [90, 132] технологию межмолекулярных дисульфидных сшивок для ковалентного связывания остатков цистеина в hOGG1 с атомом C4 цитозина, комплементарного окисленному гуанину. Такая техника позволяет добиться образования комплекса между ферментом и ДНК-дуплексом в процессе получения кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного анализа. Они закристаллизовали и получили структуру hOGG1, в которой гуанин был вывернут из двуцепочечной спирали ДНК и помещён в активный центр фермента.

Также был получен комплекс hOGG1 с G-содержащим ДНК-дуплексом, гуанин которого помещён в каталитический центр, но расщепления гликозидной связи не

происходит. Эта неспособность катализировать расщепление гликозидной связи происходит не из-за структурного влияния дисульфидной сшивки между ДНК и ферментом; замена G на 8-охоG в этом же комплексе приводит к эффективному вырезанию окисленного нуклеотида. Полученные данные указывают на существование механизма позднего предотвращения вырезания азотистого основания G, которое ошибочно попало в активный центр hOGG1. Подобный механизм включается только в тех редких случаях, когда гуанин преодолевает энергетический барьер перехода из экзо-сайта в карман активного центра. Механизм, на котором основано предотвращение вырезания G остается неясным. Ранее было показано, что *N*-гликозидная связь при G более лабильна при нейтральных значениях pH, чем она же при 8-охоG [135]. Таким образом, механизм дискриминации, который опирается на различия в лабильности гликозидной связи G по сравнению с 8-охоG, в данном случае не может служить объяснением. Гликозилаза hOGG1 решает одновременно несколько задач: во-первых, осуществляет поиск 8-охоG, который встречается гораздо реже G, во вторых, корректно отличает 8-охоG от структурно подобного G, и в третьих, осуществляет каталитическое выщепление более стабильного 8-охоG.

Авторы полагают, что переходное состояние для расщепления гликозидной связи в G может быть энергетически выше, чем для 8-охоG либо вследствие смещения основных элементов активного центра, либо вследствие отсутствия стабилизации переходного состояния фермент·G через образование водородной связи с Gly42. Кроме всего прочего, ориентация G в активном центре слегка отличается от таковой для 8-охоG, полученной ранее [88]; это может помешать достижению оптимального конформационного состояния для атаки Lys249 по C1'-положению дезоксирибозы. Эта гипотеза хорошо подтверждается предыдущими результатами, когда введение точечных мутаций в аминокислоты узнающего кармана, которые даже немного изменяли его геометрию: D268N [91] и Q315F [132], приводило к драматическому падению эффективности катализа hOGG1.

В рассматриваемой работе [134] был получен надмолекулярный ансамбль, который структурно весьма похож на комплекс, в котором hOGG1 выщепляет из ДНК основание 8-охоG. Различия этих комплексов обусловлены, возможно, лишь расхождениями на уровне тонкого взаимодействия активного центра с G и 8-охоG.

Авторы полагают, что вполне вероятно, что во время поиска повреждений в ДНК hOGG1 иногда выворачивает неповрежденный гуанин в свой активный центр. Полученные результаты позволяют предполагать, что такие случайные попадания G в активный центр hOGG1 не приводят к расщеплению N-гликозидной связи вследствие способности различать 8-охоG и G на уровне катализа.

1.9.1. Структурные особенности, влияющие на то, который из ферментов – OGG1 или Fpg осуществит репарацию 8-охоG

По сравнению с неповрежденным гуанином, образующим Уотсон-Криковскую пару с цитозином в анти-конформации, 8-охоG способен формировать Хугстеновские пары с аденином, принимая син-конформацию. Гликозилаза hOGG1 способна удалять только 8-охоG, образующий пару с цитозином, в паре охоG:A поврежденное основание удаляется в 1000-3000-раз медленнее, чем будучи напротив G [136, 137]. Для того, чтобы понять, почему hOGG1 не способна удалять охоG в контексте охоG:A, в работе [138] провели моделирование методом МД, чтобы изучить то, как анти- и син-конформеры охоG размещаются в активных сайтах hOgg1 и Fpg. Fpg, в отличие от hOGG1 способна выщеплять охоG в контексте охоG:A. В результате были получены структуры взаимодействия hOGG1 с охоG в syn- и anti-конформациях. На Рис. 15 представлены структуры, когда остаток аспарагиновой кислоты находится в анионном или нейтральном состоянии. Расположение водородных связей между аминокислотными остатками активного сайта и охоG аналогичны для анионного и нейтрального Asp268. Водородная связь N7-H охоG и Gly42 сохраняется на протяжении всей траектории, а средняя энергия взаимодействия охоG-Gly42 составляет -6,5 ккал/моль. В обеих системах N1-H и N2-H охоG образуют водородную связь с Gln315, с аналогичной занятостью водородных связей и, следовательно, средней энергией стабилизации охоG-Gln315 около -13 ккал/моль. Кроме того, N2-H охоG образует водородную связь с Oδ остатка Asp268, с общей энергией взаимодействия на остаток -13,8 или -14,9 ккал/моль для анионного или нейтрального Asp268, соответственно. Положение анионного Asp268 в кристаллической структуре относительно 2'-дезоксирибозы также сохраняется благодаря консервативной водородной связи с His270 и Met271, хотя для нейтрального Asp268 заполненность водородных связей снижается. Тем не менее, в

обоих случаях Asp268 сохраняет порочные взаимодействия для α -спирали. Остаток Phe319 находится в стэкинге с ohoG (3,779 Å) по отношению к OG, в среднем 3,613 и 3,596 Å для анионного и нейтрального Asp268, соответственно, но Phe319 вносит малый вклад в связывание субстрата (приблизительно -4 ккал/моль). Asp268 находится в непосредственной близости к O4' 2'-дезоксирибозы ohoG, вне зависимости от протонирования.

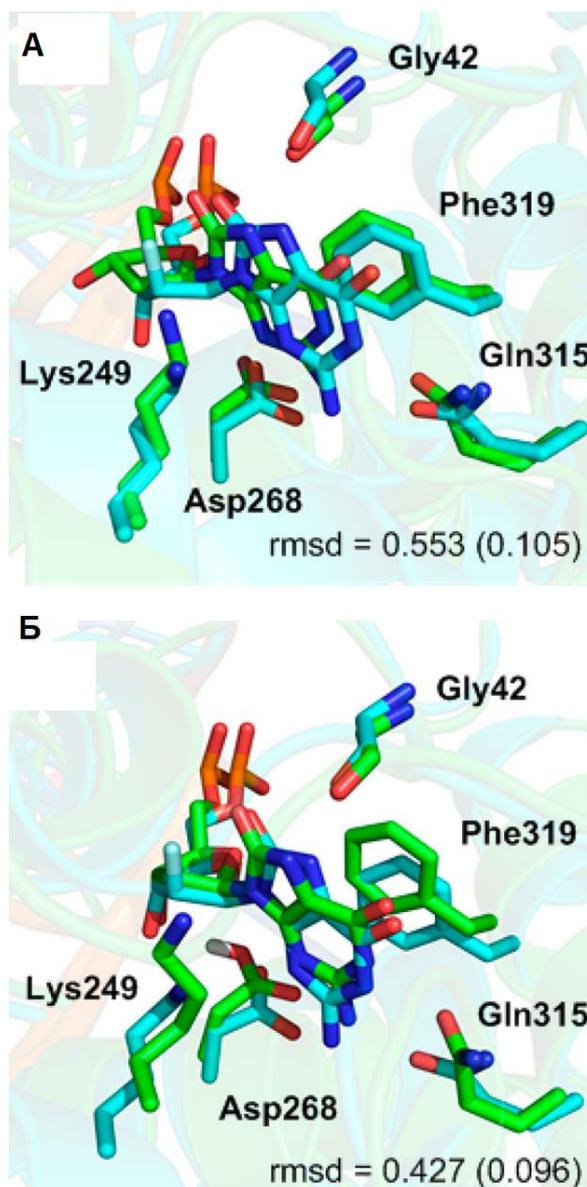


Рисунок 15. Наложение кристаллической структуры (PDB ID 3KTU, голубой) и МД структуры (зеленый) ohoG в анти-конформации, взаимодействующего с активным сайтом hOgg1, содержащем анионный (А) или нейтральный (Б) Asp268. Только один атом водорода для нейтрального Asp268 (O δ -H) показан на рисунке.

Приведено среднее RMSD (Å) остова активного сайта по отношению к кристаллической структуре.

При построении аналогичной структуры для суп-конформации oхoG, анионный Asp268 существенно смещен из-за отталкивания с атомом O8 oхoG (Рис. 16) и результирующей средней энергией взаимодействия 2 ккал/моль.

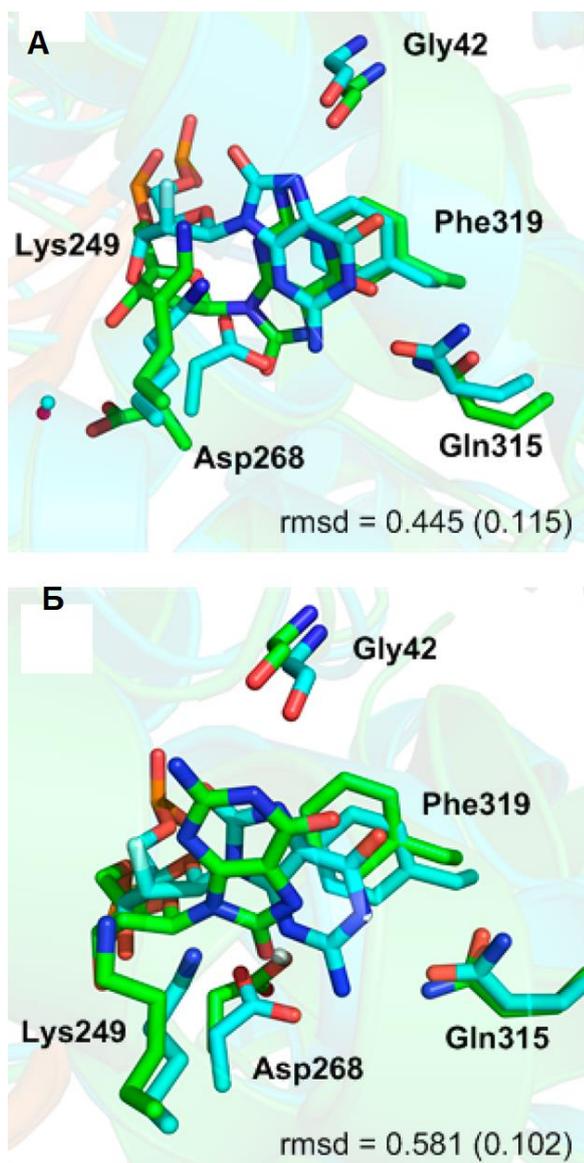


Рисунок 16. Наложение кристаллической структуры (PDB ID 3KTU, голубой) и МД структуры (зеленый) oхoG в син-конформации, взаимодействующего с активным сайтом hOgg1, содержащем анионный (А) или нейтральный (Б) Asp268. Только один атом водорода для нейтрального Asp268 (Oδ-H) показан на рисунке.

Приведено среднее RMSD (Å) остова активного сайта по отношению к кристаллической структуре.

Такое положение остатка Asp268 нарушает каркас спирали, т.к. образуются водородные связи Asp268 с Met271 и Val269 (99%), но не His270, что меняет размерность первого поворота α -спирали с 3.6₁₃ до 3₁₀. Кроме того, позиция иона Ca²⁺ в кристаллической структуре изменяется, обеспечивая кристаллизацию Asp268. Этот частично сольватированный ион используется ферментом для стабилизации отрицательного заряда фосфатных групп, расположенных вблизи сайта повреждения ДНК. Новое положение иона Ca²⁺ вызывает конформационное изменение в остове ДНК на 3'-стороне от ohoG, что изменяет положение нуклеотида относительно Lys249. Другие изменения в активном сайте включают взаимодействия между остатком Gly42 и водородами при атомах N1 и N2 в syn-ohoG, которые в совокупности стабилизируют ДНК-ферментный комплекс примерно на -7 ккал/моль. С другой стороны, Gln315 взаимодействует с ohoG через N7-H (41%) и O6 (76%) и стабилизирует систему в среднем на -4,9 ккал/моль. Среднее расстояние между остатком Phe319 и син-ohoG (~3,9 Å) немного больше, чем с анти-ohoG (~3,6 Å), и, следовательно, соответствующее стекинг взаимодействие для син-ohoG немного уменьшается на ~0,5 ккал/моль. Таким образом, и для нейтрального, и для протонированного Asp268 можно заключить, что при взаимодействии с син-ohoG, он значительно смещен относительно поврежденного основания. Как следствие, Asp268, по крайней мере, частично теряет способность формировать петлю на конце α М-спирали, что, вероятно, дестабилизирует белок, как это было показано в мутантных формах Asp268Glu и Asp268Gln, которые аналогичным образом нарушают α -спираль [91]. Более того, хотя Lys249 сохраняет положение, благоприятное для нуклеофильной атаки если Asp268 нейтрален, положение активного сайта Lys249 полностью нарушается для анионного Asp268. Поскольку было показано, что остаток Asp268 является ключевым для катализа, мутация которого в Ala, Asn, Glu или Gln отрицательно влияет на стабильность белка и/или каталитическую активность, предсказанное нарушение Asp268, по крайней мере, частично способствует

наблюдаемому в экспериментах уменьшению скорости вырезания охoG в паре с A в 3000 раз по сравнению с охoG:C [137].

1.9.2. Узнавание 8-охоА-содержащего ДНК-субстрата

8-охо-dG и 8-охо-dA представляют собой два основных окислительных повреждения, возникающих в результате окисления пуриновых оснований по 8-му положению [139, 140]. Было обнаружено, что оба повреждения предпочтительно принимают суп-конформацию относительно N-гликозидной связи из-за стерического столкновения между C8-кето группой и сахаром нуклеозида [141]. В то время как узнавание и вырезание повреждения 8-охо-dG ферментом hOGG1 широко изучено, взаимодействию hOGG1 с повреждением 8-охо-dA до недавнего времени не уделяли внимания, поскольку мутагенный потенциал 8-охо-dA как минимум в 10 раз меньше, чем 8-охо-dG [142]. У человека 8-охоdA исправляет тимин ДНК-гликозилаза TDG, которая узнает и вырезает 8-охо-dA, которое находится в комплексе 8-охо-dA:dT, 8-охо-dA:dG, или 8-охо-dA:dC base pairs [143]. В случае образования пар 8-охо-dA:dC устранением повреждений занимаются ДНК-гликозилазы человека hOGG1 и NEIL1 [144, 145]. В работе [140] для изучения комплексов 8-охоG-ДНК с hOGG1, использовали синтетические ДНК-дуплексы, которые имеют различные замены в 7- и 8-положениях, для исследования влияния N7-водорода и C8-кето на предпочтение сопряжения оснований, мутагенный потенциал и восстановление, а именно: 8-охо-dA, 8-охо-dA, 7-deaza-dA, 8-Br-dA и 8-Br-7-deaza-dA. Исследование показало, что для образования стабильной пары 8-охо-dA с dG важны полярные N7-водород и C8-кетогруппы в 8-охо-dA, а не син-конформация (Рис. 17).

N7-водород в 8-охо-dA или C7-водород в 7-deaza-dA и 8-Br-7-deaza-dA были предположительно важны для распознавания hOGG1, хотя эффективность вырезания 7-deaza-dA и 8-Br-7-deaza-dA этим ферментом была намного ниже, чем 8-охо-dA [146]. Присутствие водорода в N7-положении в повреждении 8-охо-dA или в C7-положении в 7-deaza-dA и 8-Br-7-deaza-dA, было критическим для распознавания hOGG1. Также, как и N7-водород в 8-охо-dG [147], N7-водород 8-охо-dA может формировать сильную водородную связь с Gly42 в hOGG1. Однако, слабое взаимодействие между C7-водородом в 7-deaza-dA или 8-Br-7-deaza-dA и Gly42 в

hOGG1, а также делокализованная электронная пара N9 могут в конечном итоге привести к более низкой эффективности их эксцизии, чем 8-охо-dA.

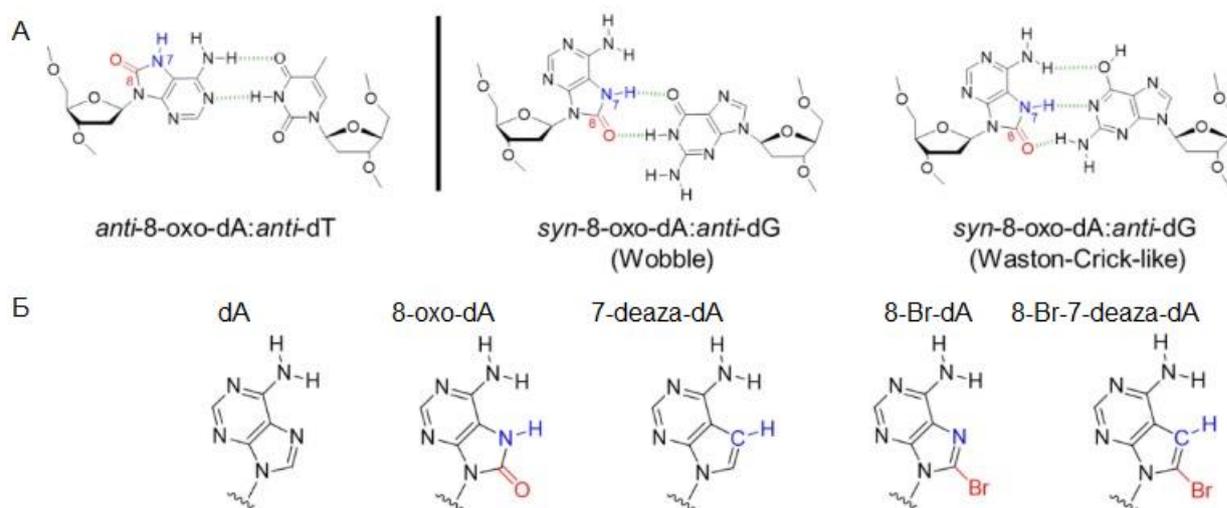


Рисунок 17. Образование пары 8-охо-dA с dT, и dG в syn и anti-конформациях (А) и химические аналоги 8-охо-dA [140].

1.9.3. Узнавание и вырезание 2,6-диамино-4-оксо-5-формаидопиридина (FaryG)

Окисление гуанина в ДНК, возникающее в результате реакций с активными формами кислорода, возникающими в результате химического воздействия, изменения условий окружающей среды, ультрафиолетового или ионизирующего облучения, а также нарушения клеточного метаболизма, ведет к образованию нескольких структурно различных продуктов окисления. Помимо 8-охоG, мутагенным потенциалом обладает модификация гуанина 2,6-диамино-4-оксо-5-формаидопиридин (FaryG) (Рис. 18). Как и 8-охоG, ошибки при репликации FaryG индуцируют трансверсию G – Т и мутацию G – А [37]. В работе [148] были идентифицированы несколько мутантных форм hOGG1, более специфичных к FaryG, а не к 8-охо-G. Так мутантная форма D322N, в которой расположенная вблизи каталитического центра аспарагиновая кислота заменена на аспарагин, была в 3.3 раза специфичнее к FaryG, чем 8-охоG.

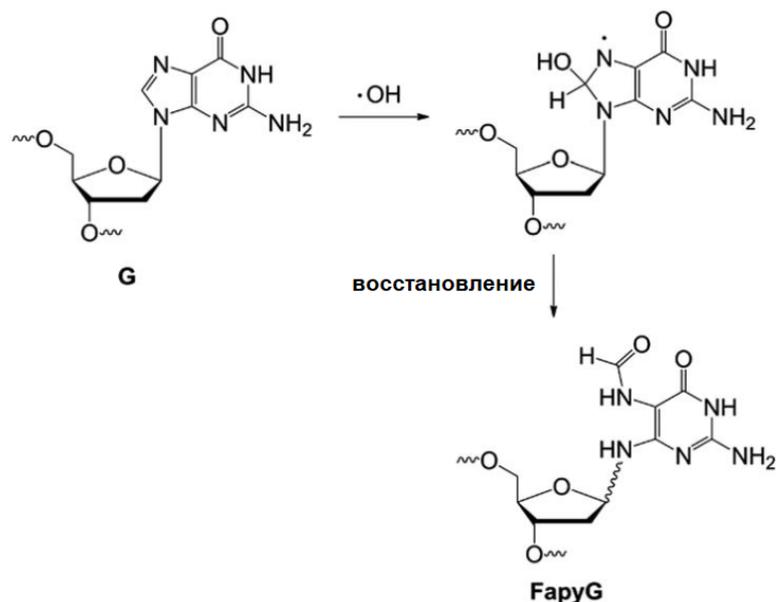


Рисунок 18. Образование модификации FapyG [148].

В кристаллической структуре hOGG1, как в апо-форме, так и в связанной с 8-охоG, карбоксильная группа остатка D322 формирует водородную связь с имидазольным кольцом гистидина H270 (Рис. 14). В частности, H270 формирует водородную связь с C8=O, процессированного 8-охоG, и выступает в роли ключевого остатка в процессе узнавания и репарации 8-охоG.

Дальнейшее исследование важности остатка D322 показало, что мутанты hOGG1 с укороченной аминокислотной последовательностью (1–321) и мутантная форма D322P с заменой аспарагиновой кислоты на пролин, были не способны репарировать обе модификации – и FapyG и 8-охоG. Поскольку пролин нарушает структуру альфа-спирали, замена D322P может вызывать глобальные изменения в структуре hOGG1, что в итоге ведет к потере активности фермента [90]. В целом, авторы [148] предполагают, что варианты hOGG1, содержащие гидрофобные аминокислоты в позиции 322, будут иметь преимущественную специфичность к FapyG, по сравнению с вариантами hOGG1, содержащими гидрофильные аминокислоты в этой позиции, за исключением аргинина и лизина (Рис. 19). Можно заключить, что свойства аминокислотного остатка в положении 322, такие как донор/акцептор водорода, гидрофобность, стереохимию, размер боковой цепи и заряженность влияют на субстратную специфичность фермента hOGG1.

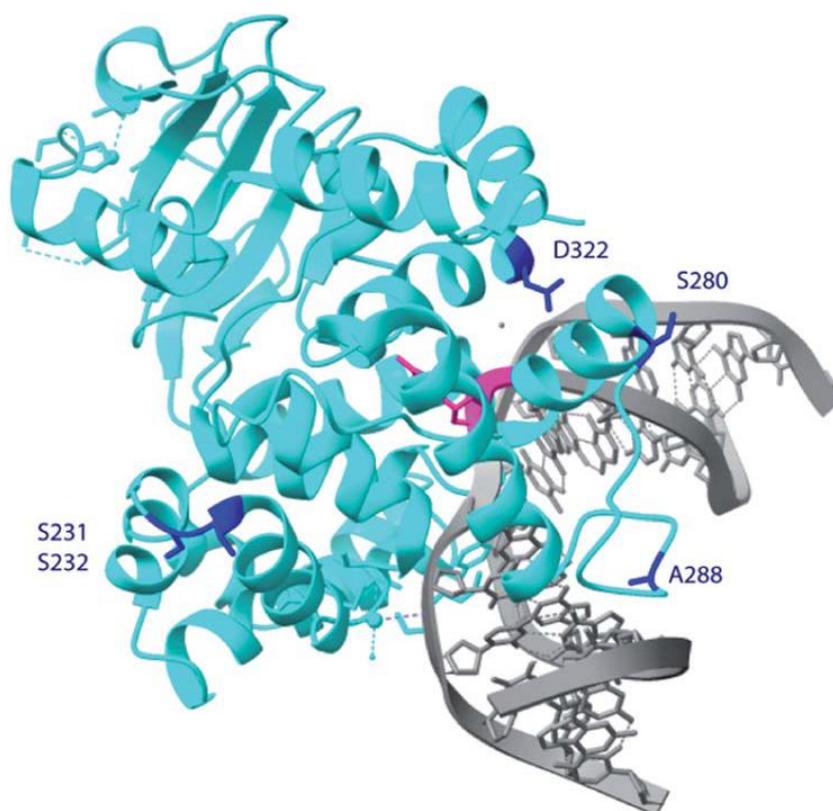


Рисунок 19. Кристаллическая структура hOGG1, взаимодействующей с ДНК (PDB ID 6W0M) [148, 149]. Розовым обозначен 8-охоG и серым остальная часть молекулы ДНК.

Как уже было описано, остаток C253 формирует диполь-дипольные взаимодействия с остатком K249 для удаления вырезанного 8-охоG [123]. Изучение свойств мутантных форм hOGG1 с заменой в позиции C253 цистеина, которая важна для выщепления 8-охо-G, на другие аминокислоты показало, большинство замен в позиции 253 вели к потере способности hOGG1 вырезать 8-охоG. Авторы показали, что присутствие алифатического аминокислотного остатка в позиции 253 блокирует выход 8-охоG, что хорошо согласуется с описанными ранее в нашей работе [124] результатами, демонстрирующими низкую активность мутантной формы hOGG1 с заменой C253L. В свою очередь, мутантные формы C253M и C253L сохраняют активность по эксцизии FapyG, и такая активность в 10 раз выше, чем для 8-охоG. Такие результаты позволяют предположить, что наличие крупной боковой группы у аминокислоты в позиции 253 существенно препятствует эксцизии 8-охоG, но

почти не влияет на эксцизию FaryG, возможно, из-за большей структурной гибкости последнего.

Проведенное исследование показывает, что несмотря на сходство 8-охоG и FaryG, существуют структурно-обусловленные особенности их взаимодействия с hOGG1.

1.9.4. Устранение кластерных повреждений

Более сложным случаем для репарации является исправление 8-охоG в составе кластерных повреждений. Действительно, присутствие второго повреждения, приходящегося на один или два витка спирали, может кардинально влиять на 8-охоG ДНК-гликозилазами. Наиболее важными и консервативными мотивами в структуре OGG1 является мотив N149-N150-N151, который является важнейшим для взаимодействия со спиралью ДНК и стабилизации структуры вырезаемого 8-охоG. Среди них “главным” можно считать N149, который непосредственно взаимодействует с расположенным внутри малой бороздки 8-охоG; он заполняет пробел, образовавшийся в результате отсутствия окисленного нуклеотида, который удаляется через большую бороздку и стабилизирует двойную спираль (Рис. 20).

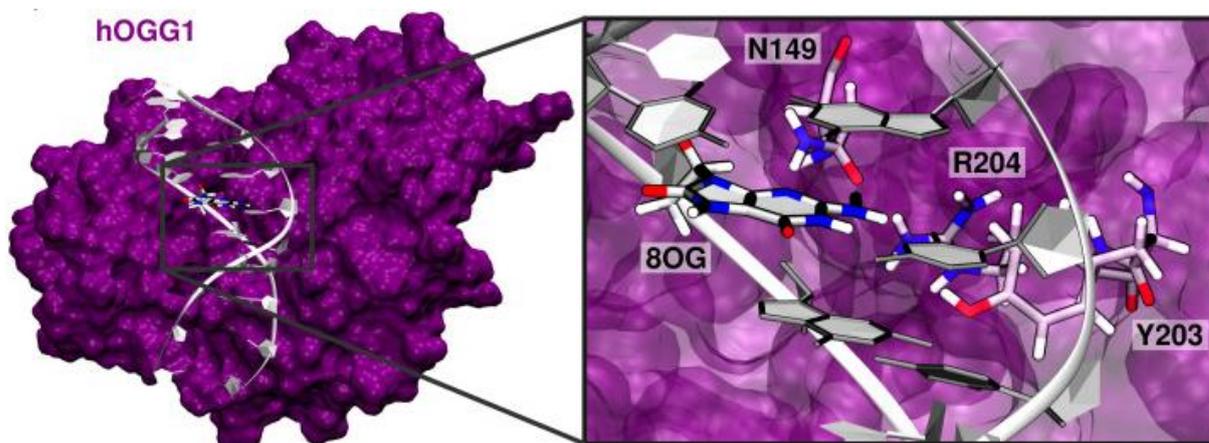


Рисунок 20. Структура hOGG1, взаимодействующего с 10-звенным ДНК-дуплексом, содержащим 8-охоG на позиции 5-го нуклеотида. Увеличен участок фермента, содержащий три аминокислотных остатка, самых важных для удаления вырезанного 8-охоG: N149, Y203, и R204. Для наглядности атомы сахарофосфатного остова не приведены. По [150].

Также важны два остатка аргинина (R154 и R204), которые взаимодействуют с N149 и одиночным цистеином, формируя сеть стабильных водородных связей. Помимо этого, тирозин Y203 частично внедряется в спираль для поддержания изгиба π -сопряжением азотистого основания в 3'-положении этого цитозина.

Используя методы МД, Jiang с коллегами [150] исследовал узнавание 8-охоG ферментом hOGG1, когда повреждение находится в контексте множественных повреждений с мисматчами на 5' или 3'-конце. Они определили жесткость ДНК-белковых взаимодействий в присутствии мисматчей в ДНК, и связали более низкий уровень репарации при наличии 5'-мисматчей с нарушением структурных особенностей 8-охоG, если присутствует повреждение соседнего азотистого основания. Исследование контактов hOGG1 с 8-охоG-содержащей ДНК показало нарушение взаимодействия, если присутствовали мисматчи с 3' или 5'-концов от 8-охоG. В обоих случаях наблюдалась меньшая гибкость фрагмента α -спирали, содержащего ключевые для экстрюзии аминокислотные остатки и область S148-R154 с мотивом NNN, консервативным для гликозилаз, отражает более тесные взаимодействия, обнаруженные при кластерных повреждениях. В присутствии мисматчей, происходит ослабление Уотсон-Криковских взаимодействий, что может давать большие возможности для формирования водородных связей между ДНК и белком. При мисматче с 5'-положения dG17 более предрасположен к взаимодействиям с ферментом, и такое новоизмененное подстраивание может нарушить интеркаляцию Y203 и другие взаимодействия с участием N149, R204, R154, тем самым инициируя активность hOGG1.

1.10. Структура комплекса hOGG1 с ДНК, без выворачивания 8-охоG из двойной спирали, имитирующая начальные стадии взаимодействия фермента с мишенью в ДНК

Анализ существующих структур hOGG1 с ДНК показывает, что большинство построены с учетом выворачивания 8-охоG из двойной спирали (Рис. 2, к примеру). В работе [149] Shigdel с соавторами успешно смоделировали структуру комплекса hOGG1 с ДНК, где модифицированное основание 8-охоG не подверглось выворачиванию, благодаря ковалентным сшивкам. Для предотвращения “выворачивания” основания из спирали ДНК проводили химическое “сшивание” с остатком цистеина C207 фермента с образованием дисульфидной связи с гуанином, к которому был изначально присоединен тиоловый линкер по положению N2.

Для того, чтобы получить структуру hOGG1, взаимодействующего с невывернутым охоG, в активный сайт фермента была введена точечная мутация C253W, стерически блокирующая вход охоG в активный сайт. Взаимодействие такой мутантной формы белка с ДНК-субстратом, осуществляющим сшивку с C207 фермента позволили получить структуру активного комплекса ЕС (Рис. 21). В структурах IC и ЕС на Рис. 18 целевые пары оснований G-C и охоG-C однозначно являются внутрицепочечными RMSD между двумя структурами составляет 0,244 Å, в которых RMSD суперпозиция была выполнена для всех атомов.

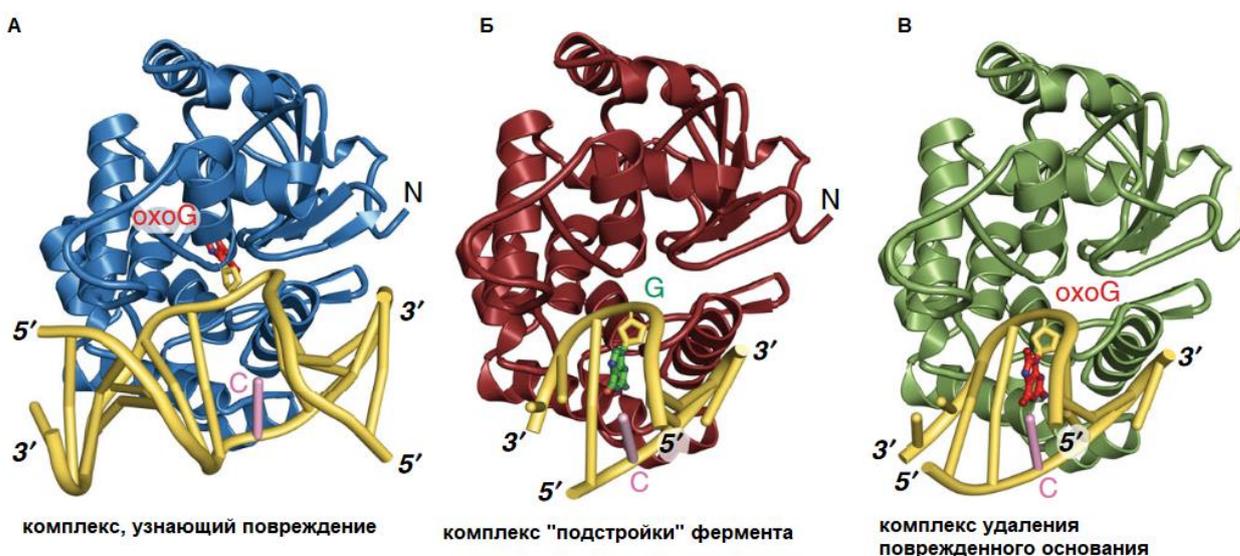


Рисунок 21. Взаимодействие hOGG1 с ДНК. А: структура комплекса, узнающего повреждение с выворачиванием 8-охоG в активном сайте фермента; Б: структура комплекса “подстройки” (IC) с локализацией неповрежденного невывернутого основания G в активном сайте; В: структура комплекса, удаляющего поврежденное основание (EC), когда оно находится внутри спирали ДНК. Розовым обозначен цитозин напротив G или 8-охоG. Желтым изображена спираль ДНК.

Полученные структуры улучшили представления о ранних событиях, происходящих при проверке повреждений в ДНК ферментом OGG1. Сравнивая ДНК в узнающем комплексе и в комплексах IC и EC (Рис. 22), можно видеть значительные изменения конформации ДНК между комплексами. Канонический мотив спираль-шпилька-спираль встречается во всех структурах hOGG1-ДНК, открытых на сегодняшний день [132, 134]. Компоненты этого мотива - G245, Q/K249 и V250 образуют водородные связи с ДНК-субстратом и закрепляют репарируемую цепь ДНК таким образом, чтобы сделать доступным 8охоG.

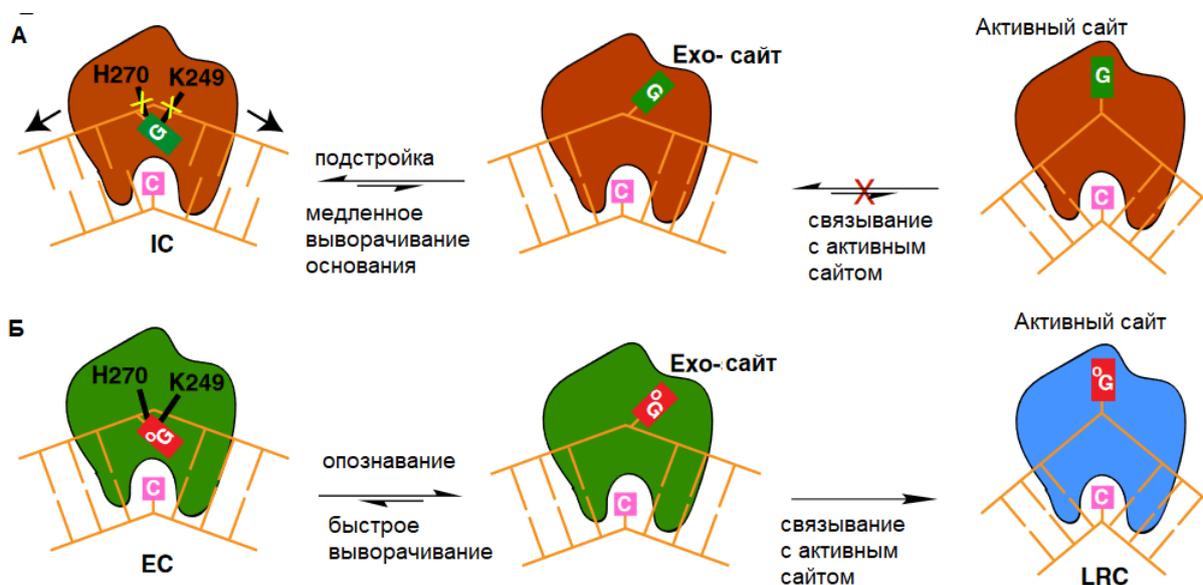


Рисунок 22. Распознавание 8охоG ферментом hOGG1. А: H270 и K249 не координируют G в комплексе IC, что ведет к медленному выворачиванию G, в процессе скольжения фермента вперед-назад вдоль целевой цепи ДНК; Б: H270 и K249 специфично распознают и координируют 8охоG, облегчая его выворачивание. После этого 8охоG перемещается в активный сайт фермента для инициации каталитического выщепления.

Рентгеноструктурный анализ комплекса ЕС также показал, что в ЕС молекула воды образует мостик между охoG и 5'-фосфатом так, чтобы ослабить отталкивание между ними. Для предотвращения отталкивания рибоза охoG вынуждена принимать альтернативную конформацию сахара и/или поворачивать фосфодиэфирные группы вокруг охoG. В ЕС-комплексе в структуре hOGG1 более длинное расстояние, поэтому мостик из молекулы воды между C8=O охoG, C5' и 5'- фосфатом, соответственно, может способствовать изгибу ДНК в целевом участке, изгибать ДНК в сайте-мишени, сближая эти отталкивающиеся функциональные группы, тем самым инициируя выворачивание охoG из спирали. Именно благодаря этому отталкиванию фермент различает охoG и G, даже на начальном этапе встречи с повреждением, находящемся внутри спирали, до выворачивания основания и конформационных изменений в узнающем комплексе (Рис. 22). В узнающем комплексе остатки F319 и C253 взаимодействуют с обеими π -системами вывернутого охoG с образованием сэндвича в активном сайте hOGG1. Вывернутый охoG дополнительно стабилизируется за счет водородной связи с боковой карбонильной группой Q315, а также с карбонильной группой G42 пептидной связи. Конформация, которая реализуется при взаимодействии охoG с G42 является стадией дискриминации охoG от G в активном центре фермента [90]. Изгибание с разворачиванием не реализуются в комплексе IC и формирование подобной конформации невозможно. Локальное скольжение фермента вдоль ДНК вперед и назад с узнаванием охoG выталкивает α -спираль, содержащую F319 и Q315, из активного центра. Таким образом, активный центр в IC и ЕС структурах становится доступным для правильного связывания охoG. Такая перестройка активного сайта наблюдалась ранее в структуре экзо-сайта hOGG1, что позволяет предположить, что перестройка α -спирали относительно узнающего повреждение комплекса происходит после или параллельно с перемещением поврежденного основания в активный сайт.

1.11. Что еще известно о механизме химического взаимодействия hOGG1 с субстратом

Опираясь на многочисленные структурные и биохимические работы, Verdine G. с соавторами [87] высказали предположение, что в кислотном/основном взаимодействии с атомами Nε (аминогруппа Lys249), C2' и O4' участвует вырезаемое основание 8-охоG. Авторы изучили структуру восстановленного боргидридом натрия интермедиата, получаемого в ходе взаимодействия фермента hOGG1 с 8-охоG-содержащим ДНК-субстратом. Оказалось, что вырезаемое из ДНК основание 8-охоG не покидает фермент, а остается в активном центре и выступает в качестве кофактора стадии β-элиминирования. В структуре фермента атом N9 остатка 8-охоG располагается близко к атомам Nε и O4', что позволяет ему участвовать в передаче протона между этими атомами.

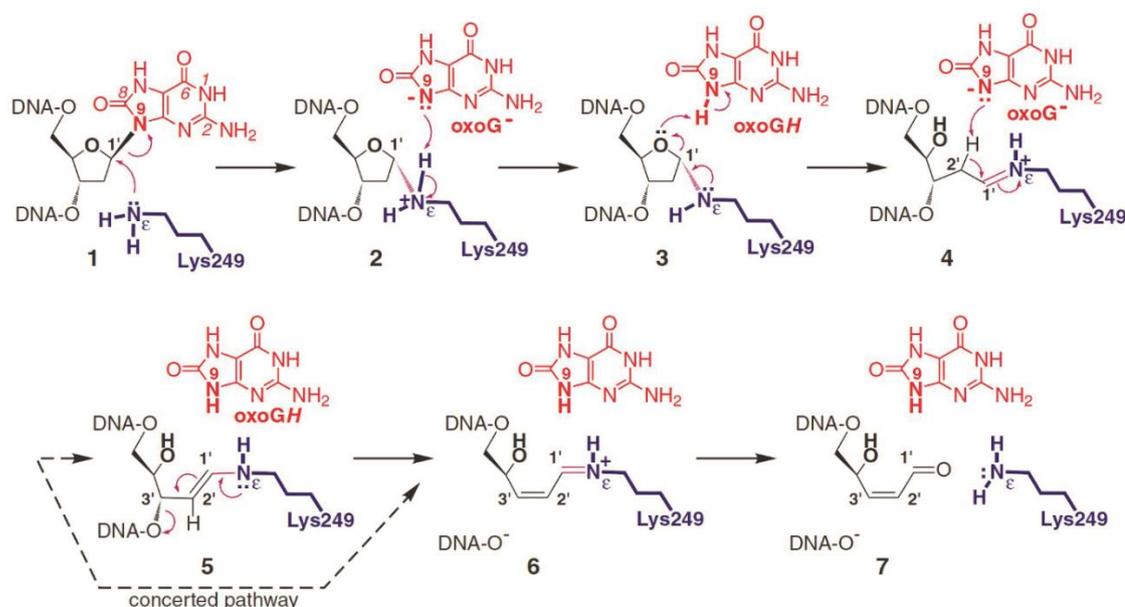


Рисунок 23. Предполагаемый пошаговый механизм каталитического действия hOGG1, в котором вырезаемое на первой стадии основание 8-охоG выступает в качестве кофактора стадии β-элиминирования [87].

На Рис. 23 представлен механизм процесса, катализируемого ферментом hOGG1, предложенный в [87]. На первой стадии за счет атаки ε-аминогруппой Lys249 по атому C1' дезоксирибозы происходит разрыв гликозидной связи и образование аниона основания 8-охоG⁻. Анион затем отрывает протон от ε-NH₂-группы Lys249,

при этом образуется аминаль **3**. Протонированный 8-охоГН отдает протон на атом О4' остатка рибозы. За счет этого аминаль **3** реорганизуется в основание Шиффа **4** с раскрытием фуранозного цикла. Основание Шиффа **4** несёт дополнительный протон на атоме Nε Lys249, который передается снова на 8-охоГ⁻. Образуется 8-охоГН и незаряженное основание Шиффа **5**, в котором протекает реакция β-элиминирования, приводящая к разрыву 3'-фосфодиэфирной связи. При этом образуются фрагменты ДНК с 5'-фосфатом и положительно заряженный интермедиат **6**, содержащий на 3'-конце α,β-ненасыщенное основание Шиффа, несущее положительный заряд. В результате гидролиза интермедиата **6** образуется свободный фермент и фрагмент ДНК, содержащий на 3'-конце 4-гидрокси-2,3-пентеналь-1.

На основании полученных результатов, авторы заключили, что это первый из известных примеров ферментативного катализа, в котором продукт первой стадии реакции служит кофактором последующих стадий.

Ревизию предложенного механизма провела группа под руководством проф. V. Sychrovsky. Сначала они показали, что изменение гибридизации гликозидного азота (переход в пирамидную форму) обеспечивает эффективное расщепление N-гликозидной связи 8-охоГ ДНК-гликозилазой hOGG1 [151]. Схема реакции предполагала прямое присоединение протона к N9 гликозидному азоту охоГ от Nε-аммония остатка Lys249 фермента, что возможно благодаря пирамидной геометрии N9. Изменение гибридизации N9 охоГ индуцируется в активном сайте hOGG1. Координация азота N9 с Nε-аммонием Lys249, выявленная в доступных кристаллических структурах, позволяет согласованно и синхронно замещать связь N9-C1' на связь N9-H. Энергия ΔG# для нового предложенного механизма реакции, рассчитанная методом B3LYP/6-31G(d,p) 17,0 ккал•моль⁻¹, значительно ниже энергий ΔG# для других реакций, использующих атаку Nε-аминогруппы на аномерный углерод C1' охоГ и атаку Nε-аммония на азот N3 основания охоГ. Более того, энергия активации для расщепления охоГ, протекающего через N9-пирамидализацию, ниже, чем энергия, рассчитанная для обычного G, поскольку электронное состояние пятичленного ароматического кольца охоГ лучше подходит для реакции. Таким образом, окисление азотистого основания ведет к модификации ароматического

кольца, и распознавание такой модификации ферментом hOGG1 может быть ключевым фактором для достижения специфического расщепления. Далее, авторы продемонстрировали возможность использования ^{15}N ЯМР спектроскопии в структурных исследованиях нуклеиновых кислот и, в частности, пользу теоретических методов для детальной интерпретации измеренных параметров ЯМР [152]. Влияние вращения 9-этильной группы на сдвиги ^{15}N ЯМР было изучено в связи с вращательной гибкостью N-гликозидной связи в нуклеозидах ДНК. С учетом полученных ранее данных, анализировали влияние пирамидной геометрии азота N9 на сдвиг ЯМР N9. Были синтезированы молекулы модифицированных ohoG и G: 9-этил-8-ohoG и 9-этил-G, получены кристаллы и сняты ЯМР спектры ^{15}N в кристалле и в жидкости. Эксперименты по рентгенографии и ^{15}N ЯМР позволили провести надежный сравнительный анализ протокола расчета для точной интерпретации сдвигов ^{15}N ЯМР окисленного гуанина. Авторы предположили, что пирамидная геометрия азота N9, которая может возникать при повреждении ДНК в каталитическом сайте hOGG1, может быть обнаружена с помощью ЯМР спектроскопии ^{15}N .

Позднее, в работе [153] была показана решающая роль согласованного взаимодействия остатков Lys249 и Asp268 с ohoG в процессе его вырезания. Исследование проводили с применением методов QM/MM (M06-2X/6-31G(d,p):OPLS2005) ЯМР, был рассчитан энергетический баланс гликозилазной реакции hOGG1, включая вырезание ohoG, образование ковалентного аддукта фермент-субстрат между остатком Lys249 и рибозой ohoG, а также образование основания Шиффа. Дополнительно указанные измерения были проведены для мутантной формы фермента D268N. На основании данных по изменению свободной энергии активации были внесены изменения в схему Fromme J.C. Вырезание ohoG, образование аддукта Lys249-рибоза и образование основания Шиффа были равнозначно важными стадиями реакции, но образование основания Шиффа было скоростью-лимитирующим этапом рассчитанной гликозилазной реакции. Стабилизация вырезанного основания ohoG рассчитывалась только после образования аддукта Lys249-рибозы. Реакция была стабилизирована раскрытием кольца ковалентного промежуточного продукта Lys249-рибоза, то есть, путем

образования основания Шиффа (Рис. 24). Такая гликозилазная реакция является возможной с точки зрения значения свободной энергии Гиббса (<17,7 ккал/моль) и структур реактанта и продукта реакции. Нарушение функции эксцизии оснований у мутантной формы D268N было продемонстрировано с помощью ^1H и ^1H - ^{15}N HSQC ЯМР-спектроскопических измерений и рационализированы с помощью QM/MM расчетов. Компенсация появляющихся зарядов на оксокарбении рибозы с карбоксилатом остатка Asp268 во время эксцизии охoG была необходима для сохранения эксцизионной функции hOGG1.

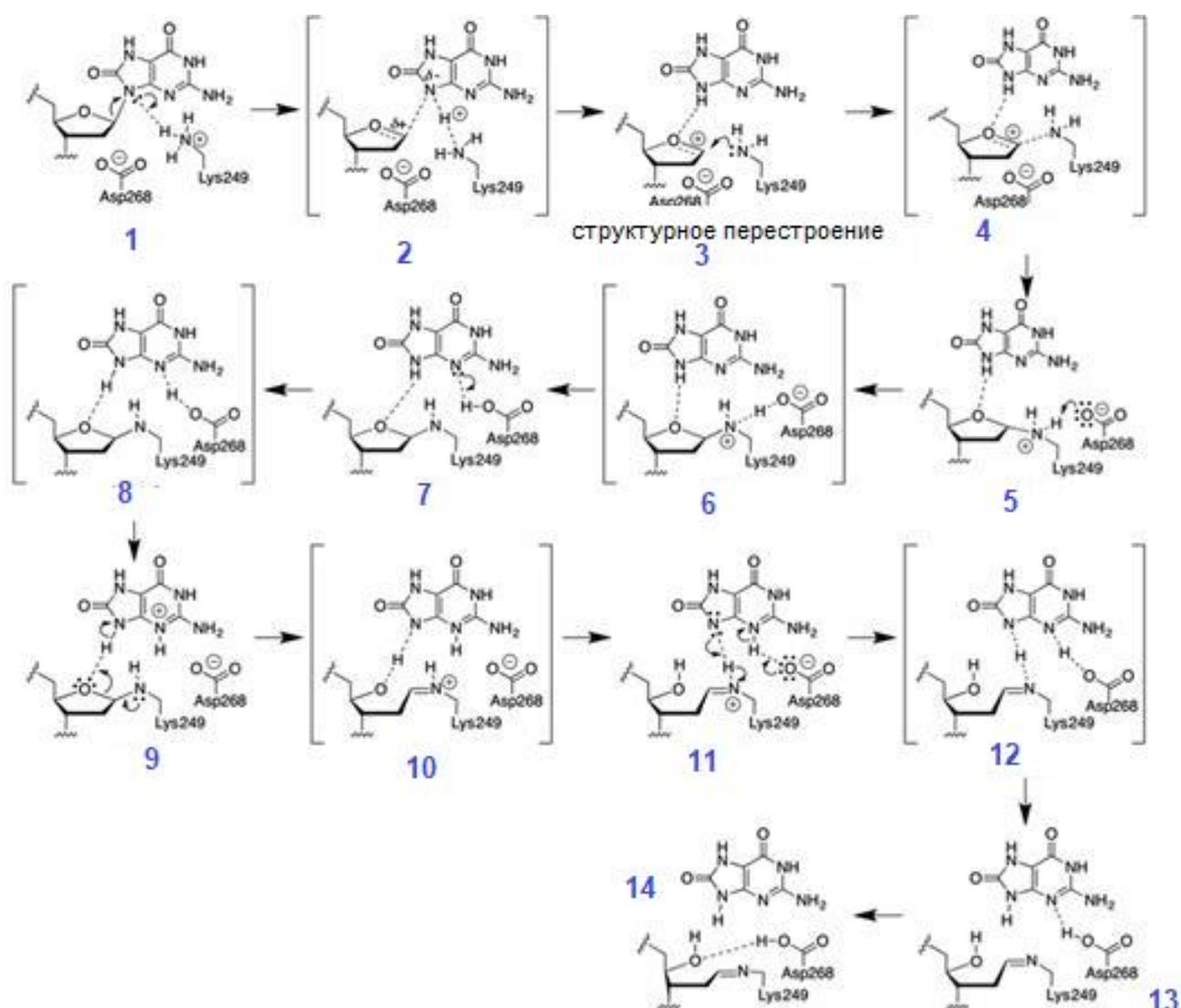


Рисунок 24. Химические превращения (1-14) в процессе гликозилазной реакции hOGG1 с охoG. Основные стадии реакции: вырезание охoG (2), перестройка каталитического кора (3), образование ковалентного аддукта Lys249–рибоза (4), депротонирование аддукта Lys249–рибоза группой CO₂ остатка Asp268 (6),

протонирование положения N3 основания ohoG (8), образование протонированного основания Шиффа через открытие рибозного кольца аддукта Lys249–рибоза (10), депротонирование основания Шиффа путем переноса двух протонов, с образованием продукта (12-13) и перестроение каталитического кора с участием CO₂H группы остатка Asp268 (14) [152].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном обзоре рассмотрены структурные особенности взаимодействия фермента репарации человека 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы с ДНК-субстратами. Исследование таких взаимодействий крайне важно, поскольку присутствие в геномной ДНК модифицированного до 8-охоG гуанина, является причиной большинства трансверсий G:C в T:A, что в итоге занимает второе место по распространенности среди спонтанных генетических изменений у человека. Значимость hOGG1 для коррекции таких повреждений была подтверждена в экспериментах *in vivo*: мутация с заменой пары G:C на T:A была обнаружена в кодоне 12 высокоонкогенного белка K-ras, что вело к образованию опухолей легких у мышей с дефицитом генов окислительной репарации ДНК, Mth и OGG1.

В обзоре проведён анализ как опубликованных к настоящему моменту работ, так и трёхмерных структур hOGG1, имеющихся в базе Research Collaboratory for Structural Bioinformatics.

Показано, что ключевыми аминокислотами, отвечающими за дискриминацию 8-охоG от G и принимающими участие в связывании окисленного основания в узнающем кармане являются Gly42, Asn149, Cys253, His270, Gln315, Phe319. 8-охоG-узнающий карман hOGG1 хорошо подогнан под структуру поврежденного основания, позиционируя нужным образом остатки Phe319, His270 и Asp268. Связывание рибозофосфатного остова ДНК определяет конформацию остатка His270, который в свою очередь вызывает конформационные изменения в Phe319 и Gln315, что позволяет окисленному основанию связаться в специфическом кармане. Боковые цепи заместителей в остатках Phe319, Gln315 и His270 действуют как единое целое, переключаясь между закрытым и открытым состояниями при связывании 8-охоG-нуклеотида. Gly42 – единственная аминокислота в hOGG1, которая непосредственно «считывает» структурную разницу между G и 8-охоG: атом N7 8-охоG образует водородную связь с карбонильным кислородом Gly42. Кроме того, существует механизм позднего предотвращения вырезания азотистого неповрежденного основания G, которое ошибочно попало в активный центр hOGG1.

Показано, что важнейшими аминокислотами активного центра фермента, принимающими участие в катализе, являются Lys249 и Asp268. В соответствии с механизмом катализа, предложенном для ферментов OGG1, остаток Lys249 осуществляет нуклеофильную атаку по атому углерода C1' дезоксирибозного кольца, замещая основание 8-охоG и образуя ковалентный интермедиат – основание Шиффа – который может быть зарегистрирован с помощью восстановления двойной связи [93]. Протонированная боковая группа Lys249 в свободном ферменте не способна осуществить такую функцию, которая требует присутствия неподелённой пары электронов, как в нейтральной ϵ -NH₂. Поэтому остаток Lys249 должен быть депротонирован для того, чтобы могла пройти эта реакция, и это может произойти лишь в том случае, если взаимодействия, стабилизирующие протонированное состояние Lys249, исчезают при связывании с субстратом. Связывание с нуклеотидом 8-охоG способствует изменению положения остатка Asp268 через перемещение остатков Phe319 и 270, что приводит к разрыву его ион-парной/водородной связи с Lys249. Водородные связи, образованные остатками Asp268 и Asn149 с протонированным атомом азота ϵ -аминогруппы Lys249, служат триггерными замками в свободном ферменте; одна водородная связь связана с узнаванием 8-охоG, другая – цитозина, и обе должны исчезнуть для того, чтобы фермент был готов к нуклеофильной атаке дезоксирибозы ДНК. Asp268, расположенный на N-конце α -спирали выполняет двойственную функцию, катализируя протекание стадий удаления основания и разрыва цепи.

Мотив N149-N150-N151 является важнейшим для взаимодействия со спиралью ДНК и стабилизации структуры вырезаемого 8-охоG.

Обсуждён структурно-динамический механизм удаления окисленных оснований из ДНК с помощью hOGG1. Показано, что выворачивание основания из цепи ДНК не может происходить в ходе одной стадии, как согласованный процесс. По-видимому, он протекает через образование серии дискретных состояний. Интересной и плодотворной кажется гипотеза о том, что контроль специфичности выщепления повреждённого основания с помощью hOGG1 выполняется на всех этапах: на стадии узнавания повреждения, на этапе выворачивания его из дуплекса, в

процессе связывания 8-охоG в узнающий карман фермента и стадии каталитического расщепления *N*-гликозидной связи.

В обзоре систематизированы современные знания о химических превращениях 8-охоG (1-14) (Рис. 24) в процессе гликозилазной реакции hOGG1. Достаточно наглядно видно, что предложенный позже механизм [151] является эволюционным продолжением и развитием механизма, предложенного ранее в работах G. Verdine [85, 87, 88]. В обоих предложенных механизмах ключевыми «химическими» участниками ферментативного процесса являются остатки Asp268 и Asn149 с протонированным атомом азота ϵ -аминогруппы Lys249.

Обзор позволяет в целом глубже понять механизмы узнавания поврежденного основания белком hOGG1 и структурно-динамические особенности его каталитической активности. Проведенный анализ литературы демонстрирует вклад автора диссертации в расширение понимания взаимодействия ДНК-субстратов с hOGG1.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы

В работе были использованы акриламид, N,N' метиленбисакриламид, диметилформамид (Fluka, Швейцария), агароза, мочевиная, дрожжевой экстракт, триптон (Amresco, США); BSA, Stains-All, коктейль ингибиторов протеаз (PIC), реагент Бредфорда, муравьиная кислота, оксид дейтерия (D₂O), имидазол (все — Sigma-Aldrich, США); 2β-меркаптоэтанол (Ferah, Германия); ТЕМЕД, борная кислота, глицерин, бромистый этидий, MgCl₂, агароза, триптон, дрожжевой экстракт, ЭДТА, Tris, канамицин, ДТТ, IPTG, (все — «Helicon», Россия), глицерин, пиперидин, перхлорат лития, хлорид магния, хлорид калия, агар (Panreac, Испания); Coomassie G-250 (Serva, Германия); ТЕМЕД, ДТА, персульфат аммония, ацетонитрил (все — «AppliChem», Германия), бромфеноловый синий, набор белковых маркеров 10-250 кДа, SDS (все — «Диа-М», Россия), кумасси голубой («VWR Life Science», США), набор для очистки плазмид NucleoBond® Xtra Midi («Macherey-Nagel», Германия). В работе использовали также отечественные реактивы и растворители квалификации «осч». Для приготовления буферных растворов использовали деионизированную или дважды дистиллированную воду.

Для высокоэффективной жидкостной хроматографии олигонуклеотидов использовали ионообменную колонку Nucleosil 100-10 N(CH₃)₂ и обращенно-фазовую колонку Nucleosil 100-10 C18 производства Macherey-Nagel, Германия. При выделении белков для хроматографии использовались колонки: гепариновая колонка HiTrap™ Heparin 1 мл («Cytiva», США) и хелатирующая колонка: HiTrap™ Chelating HP 1 мл («Cytiva», США).

В HDX-MS экспериментах использовались колонки: аналитическая - ACQUITY UPLC™ Peptide BEH C18 1,7 мкм, 1x10 мм; «Waters Corporation», США) и колонка-ловушка: VanGuard™ BEH C18 1,7 мкм, 2,1x5 мм («Waters Corporation», США).

Плазмиды pXC53, содержащие ген WT *ape1* либо гены мутантной формы APE1 Y171F-P173L-N174K, были любезно предоставлены профессором Ф. Р. Страусс (Северо-Восточный университет, США). Плазида pET24a со вставкой гена hNEIL2 была синтезирована коммерчески. Белок SpCas9 был экспрессирован, выделен и очищен коммерчески.

2.2. Стандартные буферы и смеси

Буфер для лизиса клеток: 20 мМ HEPES KOH, pH = 7,6; 150 мМ NaCl; 20 мМ Имидазол; 1 % тритон; 5 % глицерин; 2 мМ ЭДТА; 5 мМ MgCl₂.

Буфер А для хелатирующей колонки: 20 мМ HEPES KOH, pH = 7,6; 500 мМ NaCl; 30 мМ Имидазол; 0,025 % NP-40.

Буфер Б для хелатирующей колонки: 20 мМ HEPES KOH, pH = 7,6; 500 мМ NaCl; 500 мМ имидазол; 0,025 % NP-40.

Буфер А для гепариновой колонки: 20 мМ HEPES KOH, pH = 7,6; 50 мМ NaCl.

Буфер Б для гепариновой колонки: 20 мМ HEPES KOH, pH = 7,6; 1 М NaCl.

TE: 10 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 1 мМ ЭДТА.

SOC: 2 % триптон (w/v), 0,5 % дрожжевой экстракт (w/v), 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 20 мМ глюкоза.

Среда LB: 10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl.

Трис-глициновый буфер: 25 мМ Tris-глицин (pH 8,3), 0,1 % SDS.

Буфер для проведения H/D обмена: 20 мМ HEPES-KOD, pH = 7,6; 150 мМ NaCl; 1 мМ TCEP в D₂O.

Раствор Chr1: (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ DTT);

Раствор Chr2: 1 М NaCl, 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ DTT.

2.3. Методы

2.3.1. Выделение плазмидной ДНК

Для трансформации плазмидной ДНК использовали электрокомпетентные клетки *E. coli* NovaXG. 1 мкл плазмиды hNEIL2 с концентрацией 0,1 мкг/мл смешали с 40 мкл клеток в предварительно охлажденной кювете для электропорации, которую затем поместили в электропоратор. В кювету незамедлительно добавили 300 мкл SOC, аккуратно пипетировали 2-3 раза и перенесли в пробирку. Клетки в питательной среде инкубировали при 37 °С в течение 1 ч и перемешивании (250 об/мин). На чашки с агаризованной средой LB, содержащей антибиотик канамицин (50 мкг/мл) высевали клетки и инкубировали в течение ночи при 37 °С. В колбу объемом 250mL добавили 20mL LB. Одиночную колонию переносили в 20 мл среды LB с 50 мкг/мл канамицина и оставляли инкубироваться в течение ночи при 37 °С и 220 об/мин. В колбу, содержащую 180 мл среды LB добавили 200 мкл канамицина (конечная концентрация

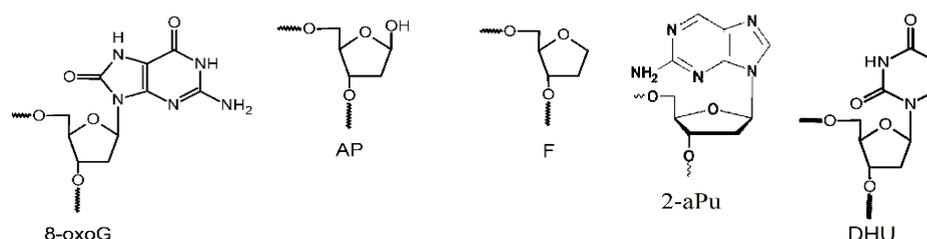
50 мкг/мл) и затем 20 мл Nova XG NEIL2 и инкубировали при 37 °С, 220 об/мин в течение ночи. Из ночной культуры выделяли плазмидную ДНК с помощью набора NucleoBond® Xtra Midi по стандартному протоколу производителя.

2.3.2. ДНК-субстраты для исследования эндонуклеазной активности ферментов

Исследование активности ДНК-связывающих ферментов проводили на синтетических модельных дцДНК. Для получения ДНК-дуплексов ДНК гибридизовали в эквимольных количествах олигонуклеотиды, содержащие повреждение, с комплементарными неповрежденными или с частично комплементарными олигонуклеотидами. Нуклеотидные последовательности использованных в работе олигонуклеотидов и типы модифицированных звеньев представлены в таблице 1.

Таблица 1. Последовательности модельных олигонуклеотидов и виды модифицированных нуклеозидов в их составе

| Обозн. модели | Нуклеотиды/модифицированные нуклеотиды | Последовательность |
|---------------|--|---|
| A | X = AP, F, G, oxoG | 5' CTCTCXCCTTCC3' |
| B | X = AP, F, G, oxoG Y = 2-aPu | 5' CTCTCYCTTCC3' |
| C | X = AP, F, G, oxoG Y = 2-aPu | 5' CTCTCYXCTTCC3' |
| D | X = AP, F, oxoG, G | 5' -Cy3-CTCTCXCCTTCC 3' GAGAGCGGAAGG-Cy5 |
| E | X = F | 5' CTCTC-OH 5' pXCCTTCC |
| F | X = F, Y = 2-aPu | 5' CTCTY-OH 5' pXCCTTCC |
| G | X = F, Y = 2-aPu | 5' CTCTC-OH 5' pYXCTTCC |
| H | X = C, F, AP, DHU | 5' TGACTGCATAXGCATGTAGACGATGTGCAT |
| I | X = C, DHU; Y = 2-aPu | 5' TGACTGCATYXGCATGTAGACGATGTGCAT |
| J | X = C, DHU; Y = 2-aPu | 5' TGACTGCATAXYCATGTAGACGATGTGCAT |
| K | X = F, DHU | 5' TGACTGCATA 5' pdXGCATGTAGACGATGTGCAT |



2.3.3. Синтез и выделение модифицированных олигонуклеотидов

Олигонуклеотиды после стандартного химического твердофазного синтеза и деблокирования выделяли последовательным проведением ионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ. Для анализа гомогенности выделенных препаратов олигонуклеотидов использовали электрофорез в 20 %-ном денатурирующем ПААГ, олигонуклеотидный материал окрашивали красителем «Stains-all». Молярные концентрации растворов олигонуклеотидов определяли из значений оптической плотности при 260 нм, используя значения коэффициентов молярной экстинкции, рассчитанные в приближении метода ближайших соседей.

2.3.3.1. Олигонуклеотиды с апуриновым/апиримидиновым сайтом

Олигонуклеотиды (AP) и (AP-aPu), содержащие AP-сайт, были получены согласно [78]. Для этого олигонуклеотиды (U) и (U-aPu) (0,1 мкмоль) в 150 мкл буфера (20 mM Tris-HCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM DTT, 0,1 мг/мл BSA, pH 8,0) обрабатывали 14 ч при 37 °С урацил-ДНК-гликозилазой (15 ед. акт.) (СибЭнзим, Россия). Продукт реакции очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ в линейном градиенте 0→20 % ацетонитрила в 0,1 М триэтиламмоний ацетате, pH 7,0. Чтобы подтвердить наличие AP-сайта и гомогенность полученного модифицированного олигонуклеотида, образец олигонуклеотида (0,1 о.е.) обрабатывали 10%-ным водным пиперидином при 95 °С, либо инкубировали с ДНК-гликозилазой Fpg в течение 1 ч при 25 °С, в присутствии или в отсутствие комплементарного олигонуклеотида. Реакционные смеси разделяли методом гель-электрофореза в 20 % денатурирующем ПААГ, продукты реакции визуализировали окрашиванием «Stains-all».

2.3.3.2. Получение 8-бромгуанина

Предварительно по методике [155] синтезировали 8-бромгуанозин: к суспензии гуанозина (0,8 г) в воде по каплям добавляли раствор брома в воде (бромную воду) при интенсивном перемешивании, до появления стабильной окраски желтоватого цвета. Осадок отделяли фильтрованием, промывали ледяной водой для удаления остатков брома, и сушили на воздухе в течение 16 ч при комнатной температуре.

Для получения 8-бромгуанина (MW = 230,0 г/моль) проводили кислотный гидролиз 8-бромгуанозина 1 М HCl в течение 1 ч при 95 °С. При масс-

спектрометрическом анализе на масс-спектрометре AutoFlex Speed Series (Bruker Daltonics, Германия) наблюдали пик с соотношением $m/z = 232,4$ г/моль, соответствующий молекулярной массе иона $[M + H]^+$, что подтверждает образование 8-бромгуанина в качестве основного продукта реакции

2.3.4. Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантного белка *hOgg1*

Экспрессия. Плазмида pET-15b несла целевой ген, кодирующий фермент *hOgg1*. К последовательности белка был добавлен N-концевой His₆ фрагмент (His-Tag) через пептидный линкер из 13 аминокислот. Компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) трансформировали плазмидой методом электропорации на приборе Neon™ Transfection System (Thermo Fisher Scientific, США) в условиях, рекомендованных производителем. После трансформации проводили наращивание клеток *E. coli* в жидкой среде в следующих условиях: среда 2*YT с 25 мкг/мл канамицина, 37°C, постоянное помешивание; такие условия обеспечивали селективный рост клеток с целевой плазмидой. После достижения мутности раствора OD₅₉₅ = 0,6-0,7 ($\lambda = 595$ нм), проводили стимуляцию IPTG (200 мМ) не более 12 ч (при понижении температуры до 30°C). Предварительно оптимизировали синтез целевого белка, анализируя уровни выхода при концентрации IPTG 100– 700 мкМ и продолжительности индукции 4 -15 ч. Культуральную массу центрифугировали (12 000 об/мин, 10 мин) для получения осадка.

Выделение. Лизис клеток осуществляли инкубацией с 40 мл лизис-буфера (100 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА), предварительно клетки в буфере тщательно суспендировали. Суспензию инкубировали 30 мин при 25 °С с фенилметилсульфонилфторидом (1 мМ) и лизоцимом (0,5 мг/мл), добавляли NaCl до концентрации 1 М, инкубировали 30 мин при перемешивании на магнитной мешалке, затем обрабатывали ультразвуком 22 кГц (10 импульсов по 30 с,) для количественного лизиса клеток, охлаждая после каждого импульса 90 с на льду. Полученную смесь пропускали под высоким давлением (30 МПа) через Френч пресс (Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Пущино, Россия). Лизат для отделения от бактериального дебриса центрифугировали 20 мин (12 000 об./мин, 4 °С), отбирали супернатант. Далее работали с жидкой фракцией, содержащей целевой белок.

Очистка. Для очистки рекомбинантного белка hOGG1 полученный супернатант разбавляли 25 мМ фосфатом калия (рН 7,4) в соотношении 1:3 и наносили на катионообменную колонку I (50 мл, Fractogel EMD SO³, Merck). Промывали 120 мл раствора 200 мМ NaCl в 25 мМ фосфате калия (рН 7,4), соединяли с хелатирующей колонкой II с катионами Ni²⁺ (5 мл, HiTrap Chelating, Pharmacia) и элюировали белок 100 мл раствора 1 М NaCl в 25 мМ фосфате калия (рН 7,4). Отсоединяли хелатирующую колонку II и промывали ее 25 мл буферного раствора, содержащего 500 мМ NaCl и 50 мМ имидазол в 25 мМ фосфате калия (рН 7,4). Целевой белок hOgg1, с His₆ фрагментом элюировали 25 мл буферного раствора Д^{hOgg1} (25 мМ фосфат калия, рН 7,4, 500 мМ NaCl, 500 мМ имидазол). Элюат разбавляли 25 мМ фосфатом калия (рН 7,4) в соотношении 1:9, наносили на катионообменную колонку III (5 мл, HiTrap Heparin, Pharmacia) и хроматографировали в линейном градиенте 200 → 800 мМ NaCl в 25 мМ фосфате калия (рН 7,4), с регистрацией оптической плотности элюата при 280 нм. Полученные фракции анализировали гель-электрофорезом по Лэммли. Фракции, содержащие ДНК-гликозилазу hOgg1, диализовали против буфера 25 мМ фосфат калия, рН 7,4, 400 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ DTT, 50 % глицерин и хранили при -20 °С.

2.3.5. Экспрессия, выделение и очистка формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы Fpg

Экспрессия. Плазмида рЕТ-13а несла целевой ген, кодирующий фермент Fpg. Для продукции этого фермента использовали линию компетентных клеток *E. coli* B834(DE3). Трансформацию проводили методом электропорации на приборе Neon™ Transfection System (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя. После трансформации проводили наращивание клеток *E. coli* в жидкой среде в следующих условиях: среда 2*YT с 25 мкг/мл канамицина, 37°C, постоянное помешивание; такие условия обеспечивали селективный рост клеток с целевой плазмидой. После достижения мутности раствора OD₅₉₅ = 0,6-0,7 (λ = 595 нм), проводили стимуляцию IPTG (50 мкМ) не более 6 ч. Предварительно оптимизировали синтез целевого белка, анализируя уровни выхода при концентрации IPTG 20– 200 мкМ и продолжительности индукции 4-15 ч. Культуральную массу центрифугировали (12 000 об/мин, 10 мин) для получения осадка.

Выделение. Клеточный осадок лизировали в стандартных условиях. Полученную смесь пропускали под высоким давлением (30 МПа) через экструзионный дезинтегратор клеток (Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Пущино, Россия). Полученный гидролизат для отделения от бактериального дебриса центрифугировали 20 мин (12 000 об./мин, 4 °С). К супернатанту добавляли полиэтиленимин до 0,01 % и оставляли на льду на 20 мин, после чего центрифугировали 20 мин (12 000 об./мин, 4 °С).

Очистка. Надосадочную жидкость, содержащую целевой белок, разбавляли в соотношении 1:3 буферным раствором Chr1 и наносили на катионообменную колонку I (50 мл, Fractogel EMD SO~3, Merck), колонку промывали 100 мл того же буферного раствора. Белок элюировали 100 мл буферного раствора Chr2. Элюат разбавляли буферным раствором Chr1 в соотношении 1:4, наносили на катионообменную колонку III (5 мл, HiTrap Heparin, Pharmacia) и хроматографировали в линейном градиенте 200 → 800 mM NaCl в 20 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 1 mM ЭДТА, 1 mM DTT с регистрацией оптической плотности на 280 нм. Аликвоты фракций анализировали на наличие целевого белка гель-электрофорезом по Лэммли с окрашиванием кумасси. Фракции, содержащие целевой белок, диализовали против буфера 20 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 1 mM ЭДТА, 1 mM DTT, 250 mM NaCl, 50 % глицерин и хранили при -20 °С.

2.3.6. Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантного белка hNEIL2

Экспрессия. Плазмида pET24a-hNEIL2 несла целевой ген, кодирующий белок hNEIL2. Для его продукции использовали линию компетентных клеток *E. coli* Rosetta2 (DE3), позволяющую эффективно транслировать белки, гены которых содержат низко встречающиеся триплеты. Методом электропорации клетки Rosetta2 (DE3) трансформировали плазмидой pET24a-hNEIL2 на приборе Neon™ Transfection System (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя. После трансформации проводили наращивание клеток *E. coli* в среде LB в присутствии канамицина в течение ночи (ночная культура). Далее, в среду LB с 50 мкг/мл канамицина (всего 190 мл) инокулировали 10 мл ночной культуры *E. coli* Rosetta2 (DE3). *E. coli* выращивали при 37 °С на качалке со скоростью 220 об./мин ожидая, когда поглощение на длине волны 595 нм достигнет значений $OD_{595} = 0,6-0,7$.

Затем 100 мл клеточной культуры добавляли к 900 мл LB-среды с 50 мкг/мл канамицина и аналогично предыдущему шагу доводили значение OD_{595} до ~0.6. Колбу оставляли при 4 °C перед началом индукции. Синтез рекомбинантного белка индуцировали добавлением IPTG до концентрации 50 мкМ (475 мкл 1 М), рост культуры продолжали в течение ночи при 15 °C.

Выделение. Клетки осаждали центрифугированием при $5000\times g$ в течение 7 мин. при 4 °C и распускали в 10 мл буфера для лизиса. Далее работали с жидкой фракцией, содержащей целевой белок. К полученной суспензии добавляли DTT (12 мкл 1 М) и коктейль ингибитора протеаз (120 мкл 1 М) и дважды пропускали через French Press. Клеточный дебрис отделяли центрифугированием при $20000\times g$ в течение 1 ч. при 4 C. В супернатант добавляли NaCl (4 М) и имидазол (3 М) в необходимом количестве, чтобы конечная концентрация была аналогичной буферу А для хелатирующей колонки.

Очистка. Первой ступенью очистки белка была металл-хелатная хроматография. Колонку (HiTrapTM Chelating HP, 1 мл) подготавливали последовательным промыванием 5 мл H₂O, 5 мл ЭДТА 0.05 М, 5 мл H₂O, 4 мл NiCl₂ 0.1 М и уравнивали 5 мл буфера А. На подготовленную колонку наносили разбавленный супернатант, содержащий целевой белок. Промывали колонку 5 мл буфера А, затем вели элюцию градиентом 30→500 мМ имидазола (объем градиента 10 мл), собирая фракции по 0,8 мл. Фракции в районе основного пика поглощения на 280 нм анализировали методом электрофореза по Лэммли (4-12 % SDS-ПААГ) и объединяли те, которые содержали целевой белок. Фракции разбавляли буфером до концентрации соли буфера А для гепариновой колонки (HiTrapTM Heparin, 1 мл), содержащего 20 мМ HEPES буфер (pH 7,6), 50 мМ NaCl и наносили на уравновешенную буфером А колонку. Колонку промывали 5 мл нижнего буфера (А) и вели элюцию градиентом 50→1000 мМ NaCl (объем градиента 10 мл), собирая фракции по 0,8 мл. Фракции в области основного пика поглощения на 280 нм анализировали электрофорезом по Лэммли с окрашиванием кумасси голубым. Фракции, содержащие только полосу, соответствующую по подвижности целевому белку hNEIL2, объединяли и добавляли DTT до 1 мМ и 10% (v/v) глицерин. Аликвоты белка хранили при температуре -80 °C

для дальнейшей работы. Общую концентрацию выделенных белков определяли методом Брэдфорда с использованием БСА для построения калибровочных кривых.

2.3.7. Определение концентраций Fpg и hOGG1 и доли активного фермента

Концентрацию растворов ДНК-гликозилаз определяли из значений оптической плотности на длине волны 280 нМ. Регистрировали спектр оптического поглощения раствора белка в буферном растворе на спектрофотометре UV 2100 («Shimadzu», Япония) относительно того же буфера. Коэффициенты молярной экстинкции белков на длине волны 280 нм по данным [156] составляли: для hOGG1 - $68420 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, для Fpg - $32100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Для определения доли активного фермента использовали метод боргидридного восстановления основания Шиффа [157], которое образуется при реакции C1'-атома углерода поврежденного нуклеотида с каталитической группой в активном центре фермента (аминогруппа лизина Lys-249 для hOGG1 либо иминогруппа пролина Pro-1 для Fpg). Фермент (2 мкМ) и ohoG/C-субстрат (0–5 мкМ) инкубировали в 10 мкл буфера (25 мМ фосфат калия, рН 6,8, 100 мМ NaCl, 100 мМ NaBH₄) в течение 1 ч при 25 °С. Реакционную смесь анализировали электрофорезом в 12 % ПААГ, продукты реакции визуализировали окрашиванием «Coomassie brilliant blue» (Merck, Германия). Рассчитанная из полученных данных доля активного белка составляла 65 % и 90% для hOGG1 и Fpg, соответственно. Во всех описанных далее экспериментах указывали концентрацию активного белка.

2.3.8. Выделение и очистка рекомбинантного белка Apr1 из *Saccharomyces cerevisiae*

Экспрессия. Экспрессию Apr1 проводили в клетках *E. coli* штамма Origami B DE3 pLysS («Novagen», США), трансформированных плазмидой pET11a, содержащей вставку гена, кодирующего Apr1. Клетки выращивали в 140 мл среды LB с пониженным содержанием NaCl (5 г/л) и 50 мкг/мл ампициллина при температуре 37° С, ожидая, когда поглощение на длине волны 595 нм составит 0,6–1,0. После этого культуру клеток разбавляли десятикратным объемом среды LB с пониженным содержанием NaCl. Когда оптическое поглощение культуры снова достигало 0,6–0,8, добавляли IPTG для индукции синтеза рекомбинантного белка Apr1, инкубировали 4 ч при 37 °С, затем 16 ч при 30 °С.

Выделение. Клетки собирали центрифугированием и ресуспендировали в 30 мл буфера, содержащего 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM ЭДТА и 1 mM фенилметилсульфонилфторида, а затем обрабатывали лизоцимом (0,5 мг/мл) 30 мин при комнатной температуре. После этого добавляли NaCl до концентрации 0,4 M. Затем проводили обработку ультразвуком (22 кГц) на приборе Sonopuls HD3100 («Vandelin», Германия) при температуре 0° в буфере TE (10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM ЭДТА). Время обработки составляло 30 с, импульсы повторяли 10 раз. После обработки ультразвуком раствор центрифугировали 15 мин с ускорением $16\ 000 \times g$.

Очистка. Полученный супернатант разбавляли водой в 10 раз до концентрации 0,04 M NaCl и наносили на колонку Hi Trap Q HP («GE Healthcare», Little Chalfont, Великобритания), уравновешенную буфером 20 mM HEPES-KOH, pH 7,6, 5%-ный глицерин, 40 mM NaCl (буфер O). С этой колонки собирали фракцию, не связавшуюся с сорбентом (содержащую целевой продукт), концентрацию NaCl в которой доводили до 0,1 M и наносили на колонку Hi Trap Heparin HP («GE Healthcare»), уравновешенную буфером O, содержащим 100 mM NaCl. Белок элюировали в линейном градиенте 0,1 M–0,6 M KCl, промывая буфером состава: 20 mM HEPES-KOH, pH 7,6, 5%-ный глицерин, 0,6 M KCl. Далее брали фракцию, содержащую целевой белок, и наносили на Hi Trap Ni²⁺-хелатирующую колонку, уравновешенную буфером O с содержанием KCl 0,5 M. Собирали фракцию, не связавшуюся с сорбентом, так как она содержала целевой белок. Концентрирование полученного Arp1 проводили посредством диализа через мембрану против диализного буфера состава: 50 mM HEPES-KOH, pH 7,6, 100 mM KCl, 50%ный глицерин при +4°. На каждом этапе выделения и очистки отбирали аликвоты для электрофоретического анализа присутствия фермента. Концентрацию фермента определяли оптически на спектрофотометре UV 2100 («Shimadzu», Япония). Для этого регистрировали спектр оптического поглощения белка в диализном буфере относительно буфера состава: 20 mM HEPES-KOH, pH 7,6, 5%-ный глицерин, 0,5 M KCl. Коэффициент молярной экстинкции белка на длине волны 280 нм по данным ExPASy server составляет $3,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [158].

2.3.9. Нарботка, выделение и очистка рекомбинантны белков - эндонуклеазы APE1 дикого типа и ее мутантных форм

Нарботка. Экспрессию рекомбинантных белков проводили в клетках *E. coli*. Был выбран штамм компетентных клеток BL21/DE3 pLysS, в которых достигается высокая экспрессия рекомбинантного белка при встраивании его гена под контроль промотора T7.

Компетентные клетки трансформировали плазмидой pXC53 с помощью электропоратора на приборе Neon™ Transfection System (Thermo Fisher Scientific, США) в условиях, рекомендованных производителем. Банк трансформированных клеток хранили при -70°C. Культуру трансформированных клеток выращивали при 37°C в 300 мл среды 2×YT с 100 мкг/мл ампицилина, ожидая, когда поглощение на длине волны 595 нм достигнет значений $OD_{595} = 0,6-0,7$. Индуцировали синтез рекомбинантного белка добавлением 0,4 mM IPTG, и продолжали культивирование не менее 2 ч. Предварительно проводили оптимизацию синтеза целевого белка, анализируя уровни выхода при концентрации IPTG 100 – 700 мкМ и продолжительности индукции 2 -10 ч. Культуральную массу центрифугировали (12 000 об/мин, 10 мин) для получения осадка.

Выделение. Клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин (12000 об/мин, 4°C). Осадок ресуспендировали в 30 мл буфера TE, добавляли 1 mM фенилметилсульфонилфторид и 0,5 мг/мл лизоцим и инкубировали 30 мин на льду при постоянном перемешивании для лизирования клеток. К полученной суспензии добавляли NaCl до концентрации 1 M, инкубировали 20 мин и обрабатывали ультразвуком 22 кГц (10 импульсов по 30 с,) при 0 °C. Полученную смесь пропускали под высоким давлением (30 МПа) через Френч пресс (Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Пущино, Россия). Для отделения от бактериального дебриса лизат центрифугировали 15 мин (15000 об/мин, 4 °C). К супернатанту добавляли полиэтиленимин до 0,01% для удаления ДНК, инкубировали 20 мин при 0 °C при постоянном перемешивании и центрифугировали 15 мин (10000 об/мин, 4°C). Отбирали супернатант, осаждали белки постепенным добавлением сульфата аммония до получения насыщенного раствора (516 г/л), инкубировали 2 ч при 0°C и центрифугировали.

Очистка. Все стадии хроматографической очистки проводили при охлаждении (0–4 °С). Полученный после центрифугирования осадок белка растворяли в 50 мл 25 мМ КН₂РО₄, (рН 7,5), раствор наносили на катионообменную колонку (5 мл, HiTrap SP HP, GE Healthcare, Великобритания). Колонку промывали 10 мл 25 мМ КН₂РО₄, (рН 7,5), затем элюировали целевой белок 10 мл раствора 1 М NaCl в 25 мМ КН₂РО₄ (рН 7,5) на скорости 2 мл/мин. Элюат разбавляли в 10 раз 25 мМ КН₂РО₄, (рН 7,5), и наносили на катионообменную колонку Heparin HP (5 мл, GE Healthcare, США). Проводили перфузионную хроматографию (PerSeptive Biosystems) в линейном градиенте 0→1 М NaCl 25 мМ КН₂РО₄, (рН 7,5), регистрируя оптическую плотность при 280 нм. Полученные фракции анализировали гель-электрофорезом по Лэммли с последующим окрашиванием раствором Coomassie G-250. Фракцию, содержащую целевой белок, диализовали через мембрану против буфера, содержащего 50 мМ Tris-HCl (рН 7.5), 100 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 1 мМ DTT, 50% глицерин и хранили при -20 °С.

Мутантные формы эндонуклеазы APE1 получали по той же методике с использованием соответствующих плазмид.

Концентрацию растворов фермента определяли оптически на спектрофотометре UV 2100 («Shimadzu», Япония), измеряя значения оптической плотности при 280 нм в 0,1×TE буфере в присутствии 6 М гуанидиний хлорида. Коэффициент молярной экстинкции эндонуклеазы APE1 при 280 нм рассчитывали по формуле $\epsilon = (N_{\text{Тур}} \times 1280 + N_{\text{Трп}} \times 5690) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, где $N_{\text{Тур}}$ – число остатков тирозина, $N_{\text{Трп}}$ – число остатков триптофана в составе белка; полученное для APE1 значение составляло $5,52 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.3.9. Сайт-направленный мутагенез остатка Asn-212 в составе эндонуклеазы APE1

Для замены аспарагина-212 в составе APE1 на аспартат в нуклеотидную последовательность гена *ape1* в составе плазмиды pET11a-APE1 вводили соответствующие замены по протоколу, разработанному Agilent Technologies (США) и рекомендованному к применению, используя олигонуклеотидные праймеры, синтезированные в Лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН:

5' primer – 5'GGTCAATTTCTTCATGTGCCACATCGAGGTCTCCACACAGC

3' primer – 5'GCTGTGTGGAGACCTCGATGTGGCACATGAAGAAATTGACC

По окончании ПЦР продукты амплификации анализировали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле с последующей визуализацией бромистым этидием. Исходную плазмиду удаляли из ПЦР-смеси обработкой рестриктазой DpnI (Fermentas, Латвия) 3 ч при 37°C. Нарботанными ДНК-продуктами трансформировали электрокомпетентные клетки Eсo10. Мутантную плазмиду очищали на спин-колонке с использованием набора «NucleoSpin Plasmid Easy Pure» (Macherey-Nagel, Германия) по протоколу производителя и секвенировали для подтверждения присутствия требуемой мутации N212D.

2.3.10. Нарботка, выделение и характеристика белка Cas9

Белок Cas9 был наработан с использованием линии супер-продуцирующих клеток *E. coli* по устоявшейся методике. Одна наработка и выделение проводились в течение нескольких дней. Методика состояла в следующем:

В первый день проводилась трансформация химически компетентных клеток методом теплового шока в соответствии с протоколом, поставляемым с клетками *E. coli*. Затем чашки инкубировали в течение ночи при 37 °С, используя агар с LB-средой с 50 мкг/мл канамицина и 33 мкг/мл хлорамфеникола.

На следующий день осуществляли инокуляцию предкультуры предварительно нагретой LB-средой с 50 мкг/мл канамицина и 33 мкг/мл хлорамфеникола. За ростом клеток следили, измеряя оптическую плотность при 595 нм, до достижения значений ~ 0,8. После этого индуцировали синтез рекомбинантного белка добавлением 1 М IPTG.

Клетки собирали путем центрифугирования в течение 15 мин при 3500 об/мин, осадок клеток ресуспендировали при 0 °С в буфере для лизиса (20 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 250 мМ NaCl, 5 мМ имидазол, рН 8,0, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид). Ресуспендированные клетки лизировали с использованием используя гомогенизатора клеток (Avestin Emulsiflex), центрифугировали лизат и отбирали супернатант.

Очистку белка проводили с помощью металло-хелатной хроматографии, собирая фракции объемом 2 мл. Полученные фракции анализировали при помощи электрофореза по Лэммли и объединяли фракции, содержащие белок Cas9.

Затем раствор белка обрабатывали протеазой TEV и проводили диализ с отсечкой молекулярной массы 12-14 кДа. Степень расщепления протеазой TEV

проверяли с помощью анализа электрофорезом по Лэммли. Дальнейшую очистку проводили на колонке HiTrap SP FF column (GE Healthcare), собирая два пика с различными отношениями поглощения на 260 и 280 нм. Все собранные фракции были проанализированы на присутствие Cas9 с помощью электрофореза по Лэммли. Объединяли фракции содержащие Cas9, с отношением A_{260}/A_{280} менее 0,6. Затем белок концентрировали на колонках Амикон 30 кДа с использованием буфера SEC (20 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 500 mM KCl, 1 mM DTT) и проводили очистку гель-фильтрацией на колонке HiLoad 16/600 Superdex 200 PG (GE Healthcare) в том же буфере. Собирали фракции по 2 мл, проводили их анализ с помощью электрофореза по Лэммли и объединяли фракции, содержащие белок Cas9.

На последнем этапе проводили концентрирование белка Cas9 колонках Амикон с отсечкой молекулярной массы 30 кДа примерно до концентрации 50 мкМ, делили на аликвоты по 50 мкл и замораживали для хранения.

2.3.11. Электрофорез в системе Лэммли

Анализ белковых фракций проводили методом электрофореза в буферной системе Лэммли. Концентрирующий гель содержал 5 % акриламида, 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 % SDS; разделяющий гель – 12 % акриламида, 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % SDS. Электрофорез проводили в 25 mM Трис-глициновом буфере, pH 8,3, с 0,1 % SDS, с градиентом напряжения 14–20 В/см. Для окрашивания белков в геле использовали раствор кумасси, с последующей отмывкой раствором, содержащим этанол и уксусную кислоту.

2.3.12. Определение температуры плавления ДНК-дуплексов

Эксперименты по термической денатурации дуплексов проводили используя спектрометр Varian Cary 300-Bio (описано подробнее в [159]). Для растворов ДНК в буфере и реакционного буфера (50 mM Tris-HCl, pH 7,5 mM KCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM DTT, 9% глицерин) записывали кривые оптического поглощения на длинах волн 260, 270, 330 нм при нагреве от 5 до 95 °C с шагом 0,5 °C/min (кварцевая кювета, ширина оптического пути 0,2 см, Peltier thermostabilized multicell holder (6×6)). Кривые оптической плотности, полученные на длинах волн 260 и 270 нм использовали для вычисления температуры плавления ДНК-дуплексов; данные, полученные на

длины волны 330 нм, использовали для оценки корректности проведения эксперимента и корректировки базовой линии [160]. В качестве оценки температуры плавления дуплексов выбирали максимумы на дифференциальных кривых плавления, после математической обработки обработки: сглаживание и дифференцирование (OriginPro 2021).

2.3.13. Компьютерное моделирование комплексов hOgg1 с ДНК-субстратами

В качестве стартовой структуры использовали кристаллическую структуру комплекса hOGG1 с олигонуклеотидным дуплексом, 1EMB [161]. В исходной структуре Gln в положении 249 был заменён на Lys в соответствии с аминокислотной последовательностью дикого типа. Олигонуклеотидные последовательности модифицировали с помощью Chimera 1.16 [162]. Параметры силового поля для остатка ohoG-Clamp были получены с помощью программного пакета [163] при параметризации с использованием базисного набора (Basis set) 6-31G* [164].

При моделировании по методу молекулярной динамики применяли программное обеспечение [165] с ускоренным кодом для GPU [166, 167] с использованием силового поля ff14SB [168] для белка и bsc1 [169] для ДНК. Симуляцию молекулярной динамики начинали с минимизации (500 000 шагов минимизации) энергии комплексов в модели неявного растворителя для устранения нежелательных контактов. К оптимизированным моделям комплексов добавляли водное окружение (модель воды TIP3P с кубическими периодическими условиями 8 Å). Количество воды в моделируемой ячейке было в диапазоне от 12199 до 12777 молекул. Для нейтрализации отрицательного заряда в периодической ячейке использовали ионы натрия. Минимизация систем в явной модели растворителя проводилась в два этапа. На первом этапе релаксации подвергались молекулы растворителя, в то время как комплекс оставался фиксированным. На втором этапе минимизировалась вся система. Нагревание проводили в системе с фиксированным комплексом в течение 125 пс от 1 до 300 К с использованием pmemd.cuda. Уравновешивание плотности системы проводили в течение 50 пс при постоянном давлении 1 бар. Затем систему уравновешивали при постоянном давлении 1 бар и температуре 300 К в течении

500 пс. МД-моделирование проводили в течение 100 нс в NPT ансамбле (1 бар, 300 К). Анализ полученных траекторий проводили с помощью Chimera 1.16 и cprtraj [170].

2.3.14. AP-эндонуклеазная активность эндонуклеазы APE1

Для оценки эндонуклеазной активности раствор 0,08 о.е. F-субстрат и 9,6 мкМ фермента APE1 в буфере (50 мМ HEPES/КОН, рН 7,5, 20 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 2 мМ DTT) инкубировали 90 мин при 25°C. В качестве контрольных образцов использовали инкубированные в тех же условиях отдельно F-субстрат и смесь олигомера d(CTCTCFCCCTCC) с эндонуклеазой APE1. Реакционные смеси анализировали денатурирующим электрофорезом в 20% ПААГ, продукты реакции визуализировали окрашиванием «Stains-all».

2.3.15. Определение доли активной эндонуклеазы APE1 при титровании лигандом

Фракцию (количество) активного фермента APE1 определяли титрованием 25 мкМ фермента в стационарном состоянии и 2,5-100 мкМ интактного лиганда с 2-аминопурином (2-aPu)C/G и наблюдением за изменением интенсивности флуоресценции 2-аминопурина. Испускание флуоресценции 2-aPu регистрировали на длине волны $\lambda_{em} = 370$ нм при возбуждении на длине волны $\lambda_{ex} = 310$ нм. Предварительно в качестве контроля была получена зависимость интенсивности флуоресценции 2-aPu от концентрации лиганда в отсутствие фермента. Измерения проводили в термостатируемой кювете (80 мкл) при 25°C на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, Австралия) в буфере NIR. Концентрация глицерина в растворе в ходе измерения составляла около 11%.

Образование комплексов между APE1 (всех тех типов) и субстратом DHU/G также было исследовано с помощью метода задержки в геле. Для этого соответствующий фермент (1 мкМ) быстро смешивали на льду с 5 мкМ ³²P-меченым субстратом в буфере NIR с 4% глицерина, и немедленно наносили на термостатированный (1°C) 8 % неденатурирующий ПААГ при напряжении 50 В/см. Для контроля использовали ³²P-меченые олигонуклеотид DHU и дуплекс DHU/G в том же буфере.

2.3.16. Электрофоретический анализ накопления продуктов разрезания [³²P]-меченых ДНК-субстратов эндонуклеазой APE1

За образованием продуктов разрезания 5'-меченых специфических ДНК-субстратов эндонуклеазой APE1 следили, анализируя реакционные смеси денатурирующим электрофорезом в 20%-ном ПААГ. В ходе эксперимента 12 мкл раствора [³²P]-меченого субстрата и 12 мкл раствора фермента в буфере BER (50 mM HEPES/КОН (pH 7.5), 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂) и 2 mM DTT) быстро смешивали при 25°C. Для фермента дикого типа WT APE1 и его мутантных форм концентрация фермента и субстрата в реакторе составляла 1,5 мкМ. В серии экспериментов с «тройным мутантом» Y171F-P173L-N174K использовали 3 мкМ фермент и субстрат; в серии экспериментов с мутантом N212A APE1 м с AP(2-aPu)- и F(2-aPu)-субстратами использовали 2 мкМ фермента и субстрата. Концентрация меченого ДНК-субстрата в реакционной смеси не превышала 0,1 мкМ. В определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирали аликвоты по 2 мкл, смешивая их для остановки реакции с 2 мкл раствора 7 M мочевины, содержащего по 0,1% красителей BF и ХС. Для анализа стабильности поврежденной ДНК 1,5 мкМ субстрата инкубировали отдельно в тех же условиях, что и реакционную смесь. Реакционные смеси анализировали методом электрофореза в 20% денатурирующем ПААГ при 50 В/см при комнатной температуре. После электрофореза гели высушивали и визуализировали путем сканирования с помощью радиоденситометра «Molecular Imager FX» (Bio-Rad, США), либо радиоавтографией на рентгеновскую пленку CP-BU New (Agfa, Бельгия). Для получения количественных данных радиоавтографы обрабатывали в программном пакете Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, США). Степень расщепления ДНК-субстрата рассчитывали как отношение интегральной интенсивности полос, соответствующих продукту, к сумме интегральных интенсивностей полос, соответствующих продукту и субстрату. При определении константы скорости реакции начальная часть экспериментальной кривой определялась линейной функцией, а начальная скорость (V_0) определялась из угла наклона. Схематически механизм накопления продукта, регистрируемого данным

способом, можно представить в виде: $E + S \xrightarrow{k_{inc}^{PAGE}} EP \xrightarrow{K_d} E + P$. В предположении, что

$k_{inc}^{PAGE} = V_0/[ES]$, $K_a = [ES]/[E][S]$, $e_0 = [E] + [ES]$, а $s_0 = [S] + [ES]$, было получено уравнение (1) для оценки значения константы скорости k_{inc}^{PAGE} :

$$k_{inc}^{PAGE} = 2V_0 \left(e_0 + s_0 + \frac{1}{K_a} + \sqrt{\left(e_0 + s_0 + \frac{1}{K_a} \right)^2 - 4e_0s_0} \right)^{-1}, \quad (1)$$

где V_0 – начальная скорость, определяемая углом наклона линейного участка зависимости; e_0 и s_0 – начальные концентрации фермента и субстрата, K_a – равновесная константа сродства фермента к соответствующему субстрату, значение которой для каждого субстрата установлено методом «остановленной струи», $[ES]$ – равновесная концентрация каталитического комплекса.

2.3.17. Исследование предстационарной кинетики взаимодействия эндонуклеазы APE1 с ДНК методом «остановленной струи»

Регистрировали спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции 1,5 мкМ раствора белка в буфере BER на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, Австралия) для определяли длин волн, соответствующих максимумам в спектрах поглощения и эмиссии флуоресценции остатков Trp в составе эндонуклеазы APE1. Для остатков триптофана были обнаружены максимумы возбуждения (λ_{ex}) = 280 нм и эмиссии (λ_{em}) = 330 нм. Для изучения кинетики прецессии фермент-субстратных взаимодействий эксперименты проводили на микрообъемном спектрометре SX.18 MV (Applied Photophysics, Великобритания). После быстрого смешивания фермента и субстрата регистрировали временную зависимость интенсивности флуоресценции триптофана в белке или 2-аминопурина в ДНК-субстрате; флуоресценцию остатков Trp возбуждали при длине волны 280 нм и наблюдали при длине волны более 320 нм с помощью оптических фильтров WG-320. (Schott, Германия). Флуоресценцию 2-аPu возбуждали при 310 нм и регистрировали на длинах волн более 370 нм, используя светофильтр LG-370 (Corion, США). Поскольку при использовании ДНК-субстрата с 2-аминопурином сигналы от разных флуорофоров могут накладываться друг на друга, в этом случае для наблюдения флуоресценции триптофана использовали светофильтр P10-340F (Corion, США), пропускающего 10 нм полосу света на длине волны 340 нм. Мертвое время прибора составляло 1,38 мс. Все эксперименты проводили при 25°C в

буфере BER в условиях, близких к условиям «одного оборота фермента». При наблюдении за флуоресценцией остатков Trp концентрация белка в реакционной смеси составляла 1,5 мкМ, концентрация ДНК-субстрата варьировала в диапазоне от 0,5–3,0 мкМ. Исключением был случай взаимодействия мутантной формы N212A APE1 с AP- и F-субстратами, где использовали 3,0 мкМ фермента и 1,0–4,0 мкМ субстрат. В ходе регистрации флуоресценции 2-аPc концентрация субстратов в реакционной ячейке составляла 1,5 мкМ, а концентрация ферментов варьировалась в пределах 0,3–3,0 мкМ. Каждая кинетическая кривая в концентрационных сериях является результатом усреднения пяти экспериментальных кривых.

При облучении белков УФ-светом боковые радикалы ароматических аминокислот окисляются, что называется «выгоранием» белка (снижение интенсивности флуоресценции). Данный эффект был характерен для кинетических кривых, построенных по флуоресценции остатков Trp, начиная с 10 с. Чтобы скорректировать его вклад, выбирали участок кинетических кривых, где интенсивность флуоресценции изменялась одинаково для всей серии концентраций субстрата. В большинстве случаев это был конечный участок кривой после завершения каталитического цикла. Выбранный участок описывали экспоненциальной функцией (2) в программном пакете OriginPro 8 (OriginLab Corp., США),

$$y = A_1 \exp(-x/t_1) + y_0 \quad (2)$$

где y – текущее значение интенсивности флуоресценции в рассматриваемой области, x – время, соответствующее значениям интенсивности флуоресценции на рассматриваемом участке кинетической кривой, t_1 – характеристическое время выгорания. Рассчитанные из первого уравнения коэффициенты A_1 , t_1 и y_0 применяли далее в уравнении (3) при обработке всей кривой:

$$F = \frac{(y - y_0) \exp(t/t_1)}{A_1} + y_0 + A_1 - 1, \quad (3)$$

где y – значение интенсивности флуоресценции Trp в каждый момент времени t .

Экспериментальные кинетические кривые последовательно обрабатывали с использованием различных кинетических схем, включающих от одной до трех обратимых стадий изомеризации фермент-субстратного комплекса. Релевантность выбранного механизма реакции и констант скорости оценивали по разности между значениями экспериментальной и теоретической кривой, полученной в результате оптимизации параметров. Ошибка определения величин кинетических параметров включала как инструментальную ошибку, так и погрешность оптимизации параметров методом нелинейной регрессии. Таким образом, обобщенная погрешность определения величин констант не превышала 20%.

2.3.18. Определение величин констант K_M и k_{cat} для WT APE1 по теории графов

Значения кинетических параметров Михаэлиса-Ментен оценивали по значениям кинетических констант, полученных методом «остановленной струи» с использованием теории графов. [172]. Согласно данным предстационарной кинетики, взаимодействие AP-эндонуклеазы WT APE1 с AP-субстратом реализуется через четыре стадии, а для минимального механизма взаимодействия с F-субстрата включает пять стадий. Для каждого механизма были определены базовые константы для всех промежуточных состояний фермент-субстратного комплекса, чтобы соотнести стационарные кинетические параметры с константами, полученными в стационарных условиях. В общем случае стационарная скорость ферментативной реакции с помощью метода графов может быть описана следующим образом:

$$v = \frac{k_{i+1} \cdot D_{ES_i} \cdot e_0}{\sum_S D_S}, \quad (4)$$

где D_S – базовые определители всех состояний фермента, D_{ES_i} – базовый определитель промежуточного состояния фермента, приводящего к образованию продукта, k_{i+1} – константа скорости стадии, приводящей к образованию продукта. Проведение преобразований для 4-стадийной схемы приводит к уравнениям:

$$K_M = \frac{k_{-1}k_3 + k_{-1}k_{-2} + k_2k_3}{k_1(k_2 + k_{-2} + k_3)} \quad (5)$$

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_{-2} + k_3} \quad (6)$$

Для пятистадийной схемы кинетические параметры определяются через уравнения:

$$K_M = \frac{k_{-1} k_{-2} (k_{-3} + k_4) + k_3 k_4 (k_{-1} + k_2)}{k_1 (k_3 (k_2 + k_4) + (k_2 + k_{-2}) (k_{-3} + k_4))} \quad (7)$$

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3 k_4}{(k_3 (k_2 + k_4) + (k_2 + k_{-2}) (k_{-3} + k_4))} \quad (8)$$

2.3.19. Изучение кинетических характеристик взаимодействия APE1 N212D и N212A с ДНК-субстратами, содержащими остаток 2-аминопурина

Стационарная кинетика взаимодействия APE1 N212D и N212A со специфическими субстратами была изучена флуориметрически с помощью спектрофотометра Cary Eclipse. (Varian, Австралия). В оптической кювете, термостатированной при 25°C, к 40 мкл 3 мкМ фермента в буфере BER добавляли 40 мкл ДНК-субстрата с концентрацией 0,5–3 мкМ, затем кювету помещали в прибор и начиная с 30 с интенсивность флуоресценции 2-аминопурина контролировалась путем возбуждения флуоресценции при 310 нм и регистрации сигнала при 370 ± 5 нм. Данные для различных концентраций субстрата, обрабатывали в программном пакете DynaFit с использованием нелинейной регрессии, как описано выше.

2.3.20. Исследование стабильности комплексов эндонуклеазы APE1 с продуктами превращения специфических ДНК-субстратов

Константы диссоциации комплексов различных форм эндонуклеазы APE1 (WT APE1, N212D APE1, N212A APE1 либо Y171F-P173L-N174K APE1) с продуктами эндонуклеазной реакции (K_d^{titr}) находили методом флуоресцентного титрования фермента в равновесных условиях смесью олигонуклеотидов, соответствующих продуктам разрезания F-содержащих ДНК-субстратов. Реакцию проводили в объеме 80 мкл. Фермент разбавляли буфером BER до концентрации 1,5 мкМ и прикапывали ДНК-дуплексы, представляющие собой продукты F-содержащих ДНК-субстратов до

финальной концентрации 120 мкМ. Реакцию проводили в течение 30 с в кювете флуориметра и детектировали изменение флуоресценции на длине волны 330 нм. Численные значения интенсивности флуоресценции использовали для определения зависимости интенсивности флуоресценции белка от концентрации продуктов F-содержащих ДНК-субстратов. Эксперимент повторяли не менее трех раз и представляли данные в виде кривых титрования, полученных по среднему значению повторов. Данные обрабатывали в программном пакете OriginPro 8, описывая интенсивность флуоресценции F уравнением

$$F = F_b + f_E[E] + f_{EP}[EP], \quad (9)$$

где F_b – фоновая флуоресценция, f_E и f_P – удельные интенсивности флуоресценции свободного белка и комплекса фермента с продуктом EP. Из уравнения для константы диссоциации $K_d^{iir} = [EP]/[E][P]$ и уравнения мат. баланса было получено выражение для связи между интенсивностью флуоресценции F и константой диссоциации:

$$F = F_0 + f_{EP} \cdot e_0 + \frac{(f_E - f_{EP})}{2} \left(\sqrt{(K_d^{iir} + p_0 - e_0)^2 + 4K_d e_0} - K_d^{iir} - p_0 + e_0 \right), \quad (10)$$

где e_0 и p_0 – общая концентрация APE1 и продукта, K_d^{iir} – равновесная константа диссоциации комплекса EP.

2.3.21. Эксперименты по водородно-дейтериевому обмену с последующей масс-спектрометрией hNEIL2

Реакция обмена. Перед началом обмена концентрацию очищенного белка hNEIL2 доводили до 5,4 мкМ в 20 мМ HEPES (pH 7,6), 150 мМ NaCl с добавлением 1 мМ трис(2-карбоксиил)фосфина (ТСЕР). После 1 ч инкубации при комнатной температуре реакцию обмена инициировали добавлением 160 мкл дейтерированного буфера (20 мМ HEPES (pD 7,6), 150 мМ NaCl, 1 мМ ТСЕР в D₂O) к 20 мкл уравновешенного раствора белка hNEIL2. Конечное содержание дейтерия составляло ~90 %, что способствовало однонаправленному обмену. H/D обмен останавливали в определенные временные точки (10 с, 30 с, 1 мин, 2 мин, 5 мин, 10 мин, 30 мин, 1 и 2 ч), смешивая аликвоту 20 мкл реакционной смеси с 40 мкл охлажденного буфера с

pH = 2,5, содержащего 2,5 % муравьиную кислоту и 4 М мочевины. Раствор быстро перемешивали и немедленно замораживали в жидком азоте, затем переносили на сухой лёд, хранили при -80 °C не более месяца. Эксперименты проводили в трёх повторах для каждой временной точки. Недейтерированные контроли обрабатывали по аналогичному протоколу.

Анализ образцов. 10 пмоль меченого hNEIL2 расщепляли в течение 2 минут при скорости потока 100 мкл/мин растворителя А (0,15% муравьиной кислоты, pH 2,5) с использованием колонки с иммобилизованным пепсином при 20 °C. Полученные после расщепления пептиды задерживались, концентрировались и обессоливали на колонке-ловушке при 0 °C и потоке 100 мкл/мин буфера А. Затем пептиды разделяли на аналитической колонке в течение 8 минут линейным градиентом 5-30 % растворителя Б (0,15 % муравьиной кислоты в ацетонитриле, pH 2,5) и 2 минуты линейным градиентом 30-40 % при 0 °C и скоростью потока 40 мкл/мин. Поток ЖХ направляли на масс-спектрометр Synapt G2-Si HDMS, оснащенный стандартным источником ионизации электрораспылением (ESI). Масс-спектры получали в режиме положительных ионов и разрешения в диапазоне m/z 50–1950. В случае образцов, не содержащих дейтерий, использовали те же хроматографические условия. Для оптимизации эффективности фрагментации использовались четыре различных линейных изменения энергии столкновения ловушек MS^E (10–30 В, 15–35 В, 20–45 В и 10–45 В).

После каждого анализа белка пепсиновую колонку промывали дважды раствором 1 % муравьиной кислоты, 5 % ацетонитрила и 1,5 М гуанидиний хлорида (pH 1,7). Между каждым анализом образца делали инъекции буфера А для исключения переноса пептидов.

Анализ данных. Спектры недейтерированных образцов обрабатывались с использованием ProteinLynx Global Server v3.0.1. Поиск пептидов проводили по базе данных, состоящей из последовательности hNEIL2, пепсина и смешанных

последовательностей двух белков. Были использованы следующие параметры рабочего процесса и обработки PLGS: фермент пищеварения: неспецифический, частота ложных открытий: 100, минимальное соответствие фрагмента иона пептиду и белку: 3 и 7, минимальное совпадение пептида/белка: 2, низкий и повышенный энергетические пороги: 200 и 40 отсчетов, окно коррекции эталонной массы: 0,25 Да при 556,2771 Да/э. Дальнейший отбор пептидов проводили в программе DynamX v3.0 (Параметры: фильтры PLGS: минимальная интенсивность = 5000; минимальный балл PLGS > 6,5; максимальная ошибка МН+ 10 ppm; минимальное количество продуктов/аминокислота равно 0,1, а порог файла равен 2). В результате обработки был отобран 81 пептид и 96,7 % покрытие последовательности белка hNEIL2.

2.3.22. Эксперименты по водородно-дейтериевому обмену с последующей масс-спектрометрией SpCas9 и комплекса SpCas9 с sgPНК

Реакция обмена. Перед началом обмена у белка Cas9 меняли буфер, поскольку он содержал 50 % глицерина, что затрудняет проведение реакции обмена. Смену буфера проводили на центрифуге с помощью фильтров Amicon® Ultra. Конечный буфер содержал 20 мМ HEPES-КОН (pH 7,6), 150 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂ и 1 мМ ТСЕР. Исходный раствор белка инкубировали 1 ч при комнатной температуре, затем добавляли дейтерированный буфер (20 мМ HEPES-KOD (pD 7,6), 150 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ ТСЕР в D₂O) к уравновешенному раствору белка Cas9, так что его конечная концентрация составила 0,6 мкМ. В случае комплекса Cas9 с sgPНК белок также инкубировался в течение часа при комнатной температуре, а PНК добавляли непосредственно перед началом реакции обмена в соотношении белок:PНК 1:10. Обмен вели определенное время (10 с, 30 с, 1 мин, 2 мин, 5 мин, 10 мин, 30 мин, 1, 2, 4, 6 и 8 ч) и останавливали смешивая аликвоту 20 мкл реакционной смеси с 40 мкл охлажденного буфера, содержащего 2,5 % муравьиную кислоту и 4 М мочевины, pH = 2,5 и немедленно замораживали в жидком азоте. Образцы хранили при -80 °С не более месяца. Эксперименты проводили в трёх повторах для каждой временной точки. Недейтерированные контроли обрабатывали по аналогичному протоколу.

Анализ образцов. 10 пмоль меченого Cas9 расщепляли в течение 2 минут при скорости потока 100 мкл/мин растворителя А (0,15% муравьиной кислоты, рН 2,5) с использованием колонки с иммобилизованным пепсином при комнатной температуре. Белок подвергался протеолитическому расщеплению на пептиды, которые задерживались, концентрировались и обессоливали на колонке-ловушке при 0 °С и потоке 100 мкл/мин буфера А. Полученные пептиды разделяли на аналитической колонке в течение 8 минут линейным градиентом 5-30 % растворителя Б (0,15 % муравьиной кислоты в ацетонитриле, рН 2,5) и 2 минуты линейным градиентом 30-40 % при 0 °С и скоростью потока 40 мкл/мин. Поток ЖХ направляли на масс-спектрометр HF QExactive, оснащенный стандартным источником ионизации электрораспылением (ESI). Масс-спектры регистрировали в режиме положительных ионов и разрешения в диапазоне m/z 200–3000, с использованием метода Full MS – ddMS2.

После каждого анализа белка пепсиновую колонку промывали как описано ранее.

Анализ данных. Идентификацию пептидов проводили путем обработки спектров не меченных образцов в Proteome Discoverer v 2.2 с использованием локальной базы данных, содержащей последовательность Cas9. Дальнейшая валидация идентифицированных пептидов проводилась с помощью программного обеспечения HDExaminer. Покрытие последовательности белка Cas9 составила 64%.

2.3.23. Компьютерное моделирование hNEIL2 и Cas9

2.3.23.1 Компьютерное моделирование hNEIL2

Компьютерное моделирование белка человека hNEIL2 начинали с моделирования по гомологии. Гомологичные модели получали с помощью сервера SWISS-MODEL [173] используя в качестве шаблонов кристаллографические структуры oNEIL2 (PDB ID 6VJI) [174] и mvNEIL2/3 (4MB7) [175]. Для проведения молекулярной динамики (МД) из моделей были удалены неструктурированные петли, сформированные аминокислотными остатками 58-125, а разрыв был сшивали и

структуру оптимизировали с помощью Modeller [176]. Ион Zn^{2+} помещали в цинковый палец в окружении Cys-291, His-295, Cys-315, Cys-318 и положение уточняли с помощью сервера CheckMyMetal [177].

Молекулярную динамику для стартовой структуры проводили с использованием программного обеспечения Amber20 с ускорением GPU в неявной модели растворителя. Для молекулы белка использовали силовое ff14SB, а для иона цинка – поле TIP3P. Для удаления нежелательных контактов энергию системы минимизировали, а затем постепенно нагревали систему от 20 К до 300 К в течение 100 пс. Далее уравнивали систему в течение 1 нс и проводили 100 нс молекулярную динамику при 300 К, сохраняя траектории каждую 1 пс. Полученные траектории анализировали с помощью UCSF Chimera, водородные связи определяли с помощью MDTRA [178].

2.3.23.2. *SpCas9*, *SpCas9*-sgPНК и *SpCas9*-sgPНК-ДНК.

Моделирование Cas9 по гомологии выполняли с помощью сервера Phyte2. Структура с идентификатором 4CMQ из базы данных PDB была выбрана в качестве шаблона с идентичностью 92 %. Недостающие участки белка достраивали с помощью Modeller. Структуру белка дополнили тремя ионами Mg^{2+} . Один ион магния окружен Asp-10, Glu-762 и Glu-766 остатками аминокислот, второй ион находится рядом с первым, в окружении Asp-10, Glu-766 и His-983, а третий – His-1297 и Asp-1328 аминокислотными остатками. Полученную конфигурацию использовали в качестве стартовой модели для молекулярной динамики апофермента Cas9. Координаты молекул sgPНК и ДНК для формирования комплекса получили из кристаллической структуры комплекса *Staphylococcus aureus* Cas9-sgPНК-ДНК (5CZZ в базе данных PDB).

Молекулярную динамику полученных систем проводили в модели неявного растворителя с использованием Amber 20 с GPU-ускорением. Силовое поле ff14SB использовали для белка, силовое поле OL3 для PНК и TIP3P для ионов магния. После шага минимизации систему постепенно нагревали, начиная от 20 К до 300 К в течение 100 пс. Этап уравнивания с последующей МД проводили в течение 50 нс при

300 К в ансамбле с постоянным давлением. Координаты атомов сохраняли каждую 1 пс. Программное обеспечение UCSF Chimera использовали для анализа траекторий и создания молекулярной визуализации.

2.3.24. Синтез и очистка химерной sgRNA для комплекса Cas9. Оценка нецелевой и целевой активности белка Cas9 на ДНК плазмидных субстратах

В работе использовали химерную sgRNA, состоящую из 103 нуклеотидов и имеющую следующую последовательность: 5'-GGUUGGACAUGCUCGACAUUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU U-3'. Синтез РНК проводили с помощью набора T7-transcription (Biolabmix, Новосибирск), предназначенного для постановки реакции транскрипции *in vitro*. Процедуру наработки РНК осуществляли согласно протоколу производителя (<http://biolabmix.ru/media/objects/4/91/Nabor%20T7%20transkriptsiya%20in%20vitro.pdf>). По окончании реакции синтеза к реакционной смеси добавляли раствор ДНКазы I (ThermoFischer Scientific) и очищали с помощью набора RU (Biolabmix, Новосибирск), который предназначен для выделения и очистки РНК из культур эукариотических и бактериальных клеток. После очистки РНК из смеси переосаждали добавлением раствора 0.3М NaAc и пяти объемов EtOH, 96%. Раствор центрифугировали 10 мин, 14000 rpm при комнатной температуре, после чего супернатант удаляли, а осадок подсушивали и растворяли в DEPC H₂O.

2.3.25. Определение скорости образования комплекса Cas9-sgRNA.

Титрование белка Cas9 целевой sgRNA и контрольной РНК проводили в буфере используемом для водородно-дейтериевого обмена (20 mM HEPES pH=7.6, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP). Анализ осуществляли с использованием калориметра Nano ITC (TA Instruments, USA) с объемом кюветы 190 мкл и объемом шприца 50 мкл. РНК в концентрации 50 мкМ добавляли по 2 мкл за один ввод в кювету с буфером или белком в концентрации 1 мкМ. Эксперимент проводили при 25 °С и скорости перемешивания 200 об/мин и интервалом инъекции 300 сек.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Взаимодействие ферментов репарации Fpg *E. coli* и Ogg1 человека с ДНК-субстратами²

Белки Fpg и hOgg1 относятся к различным структурным классам 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз, участвующим в процессах BER в прокариотах и эукариотах, соответственно. Эти ферменты выполняют схожие клеточные функции, устраняя поврежденные азотистые основания, включая остатки 8-оксогуанина, из ДНК. Fpg из *E. coli* удаляет пуриновые повреждения ДНК, включая Fapy-G, Fapy-A и 8-охоG [179], но основным физиологически значимым субстратом для Fpg является 8-охоG. Для узнавания и вырезания повреждения белком Fpg, важна не только химическая природа модифицированного основания. Хотя остаток Fapy является субстратом Fpg ДНК в В-форме, фермент не проводит его репарацию, если ДНК находится в Z-форме [180]. Напротив аденина, охоG (охоG/A) вырезается с меньшей скоростью, чем если он бы находился напротив цитозина (охоG/C) [181].

Гликозилаза Fpg обладает тремя типами активности: гидролизует N-гликозидную связь и катализирует образование AP-сайта, осуществляет β -элиминацию (AP-лиазная активность) и δ -элиминацию [182]. И Fpg, и hOgg1 ДНК-гликозилазы катализируют разрыв N-гликозидной связи с образованием свободного модифицированного основания, а затем - фосфодиэфирной связи со стороны 3'- атома углерода остатка 2'-дезоксирибозы путем β -элиминирования, образуя в ДНК одноцепочечный разрыв. Кроме того, фермент Fpg способен осуществлять вторую реакцию γ -элиминирования фосфата со стороны 5'-атома углерода, что приводит к удалению остатка 2'- дезоксирибозы. Поэтому, эффективная дискриминация элементарных стадий реакций является критически важной задачей, решению которой посвящен этот раздел.

3.1.1. Взаимодействие Fpg *E. coli* с ДНК субстратами

² В настоящей главе использованы материалы, опубликованные в работах [10], [14], [19], [22-27] из списка на стр. 215 – 218.

Ранее, в нашей работе [183] мы показали, что Fpg эффективно удаляет 8-охоG не только из олигонуклеотидов в составе двуцепочечного комплекса, но и из одноцепочечных олигонуклеотидов. Было показано, что константа Михаэлиса для одноцепочечных 23-звенных олигонуклеотидов ($K_M=0.55-1.3$ мкМ) в 12-170 раз выше, чем для соответствующих олигонуклеотидов в составе комплементарных двуцепочечных комплексов ($K_M = 6-60$ нМ) (нуклеотидные последовательности модельных комплексов приведены в Приложении 1). Двадцатитрехзвенные дуплексы были взяты в качестве ДНК-моделей, поскольку именно для этих моделей группой профессора А. Грольмана была продемонстрирована субстратная специфичность Fpg [65, 181]. В зависимости от того, в какой позиции в одноцепочечном олигонуклеотиде находится 8-охоG, относительная начальная скорость конверсии одноцепочечных субстратов были ниже, сопоставимы с или выше, чем для конверсии аналогичного повреждения в комплементарном двухцепочечном комплексе.

Взаимодействие фермента с неспецифическими и специфическими субстратами, как и сам каталитический процесс, должны сопровождаться конформационными переходами фермента. В последующих исследованиях для понимания кинетического механизма удаления 8-охоG из ДНК-субстратов с целью оценить конформационные изменения фермента мы использовали метод остановленной струи, измеряя изменения флуоресценции триптофана (Trp) в составе этого фермента. Учитывая, что Fpg взаимодействует специфически с последовательностью из десяти пар оснований, мы исследовали изменения флуоресценции Fpg при связывании с субстратом, представляющим собой 12-звенные модельные комплементарные дуплексы, содержащие 8-охоG нуклеотид напротив C, AP-сайт напротив C и неспецифический субстрат (NS) – аналогичный ДНК-дуплекс без повреждений в цепи (Рис. 25). Такой подход позволил определить число интермедиатов, промежуточных стадий и скорость появления/исчезновения этих интермедиатов (Рис. 25). При смешивании белка Fpg с NS-субстратом, снижение интенсивности флуоресценции белка происходило только в диапазоне времени <10 мс (Рис. 25). Такое изменение может отражать образование неспецифического комплекса/комплексов, возникающего в результате случайных столкновений взаимодействующих молекул в растворе. Анализ полученных экспериментальных

кривых и их наложение на расчетные показали, что неспецифический субстрат имеет слабую равновесную константу диссоциации для комплекса с белком Frg, $K_d = 12 \pm 3$ мкМ.

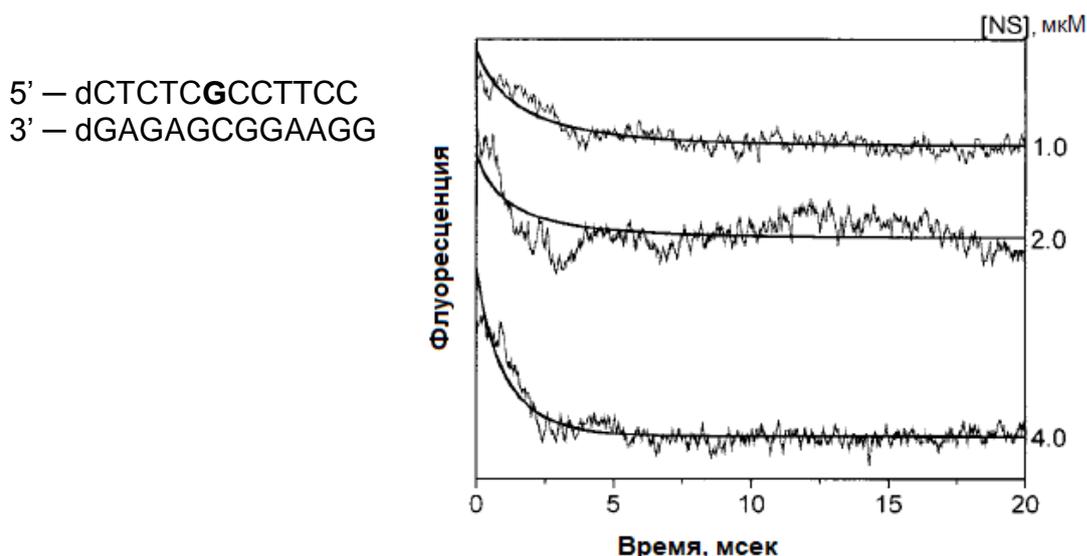


Рисунок 25. Кривые флуоресценции остатков Trp фермента Frg при взаимодействии с субстратом NS, не содержащем повреждений. Данные stopped-flow кинетики при 25°C. Представлена последовательность модельного дуплекса, жирным выделен нуклеотид, замещаемый на 8-охоG или AP-сайт.

Для анализа взаимодействия Frg со специфическим субстратом, использовали более широкий диапазон концентраций субстрата: 0.25 - 4 мкМ. Эти эксперименты позволили определить количество промежуточных стадий в связывании охоG, скорости образования и диссоциации комплекса фермент:субстрат. После смешивания Frg с субстратом охоG, флуоресценция Frg быстро снижалась, а далее медленно повышалась в интервале времени 2-100 сек. Рис. 26А демонстрирует кинетику изменения флуоресценции остатков Trp фермента в процессе взаимодействия с субстратом охоG при различных концентрациях субстрата.

Когда концентрация субстрата охоG была меньше, чем начальная концентрация белка Frg (условия однооборотной реакции), интенсивность флуоресценции достигала исходных значений (Рис. 26А, кривые для 0.25 - 1.5 мкМ). При более высоких концентрациях субстрата фермент работал в многооборотном режиме. Поэтому интенсивности не восстанавливались до исходных значений в наблюдаемые

моменты времени, что, вероятно, связано с частичным комплексообразованием между белком Frg и продуктом расщепления субстрата. Очевидно, что на первом этапе происходит бимолекулярная встреча между белком Frg и специфическим субстратом *охоG*. Специфическое связывание субстрата обнаружено на временном интервале от 0 до 20 миллисекунд; аналогичный анализ также проводился для субстрата, не являющегося специфическим (см. Рис. 26Б).

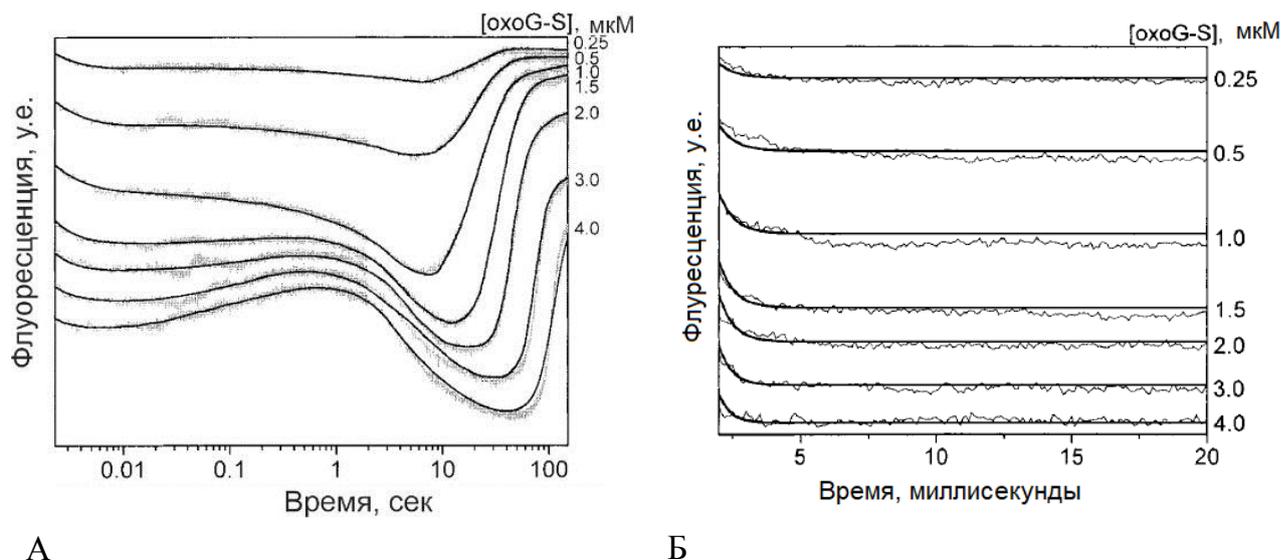


Рисунок 26. Кинетика взаимодействия Frg со специфическим ДНК-субстратом, содержащим 8-*охоG* (*охоG-S*). Данные представлены как изменение флуоресценции остатков Trp фермента. В проведенных экспериментах уровень концентрации белка составлял 1,5 микромоля. Концентрацию субстрата изменяли в пределах от 0,25 до 4,0 мкМ. А: общий вид; Б: быстрая стадия реакции.

Анализ кривых конформационного перехода фермента позволил определить константы скорости элементарных стадий. Первые две фазы представляют равновесные процессы, первый из которых описывает бимолекулярную стадию связывания, а второй образование апуринического сайта. Третьей необратимой стадией является β -элиминация. Четвертая фаза отражает δ -элиминацию и декомпактизацию комплекса фермент/продукт между Frg и выщепленным 8-*охоG*. Вторая, третья и четвертая фазы могут быть описаны экспоненциальными функциями. Эти данные

являются непосредственным доказательством конформационных переходов в Frg при реализации каталитических процессов.

Константы скорости первой фазы (k_1 , k_{-1}) ранее были вычислены для временного интервала взаимодействия от 2 до 20 миллисекунд. Константы скорости второй фазы (k_2 , k_{-2}) были определены в диапазоне взаимодействия от 100 миллисекунд до 2 секунд.

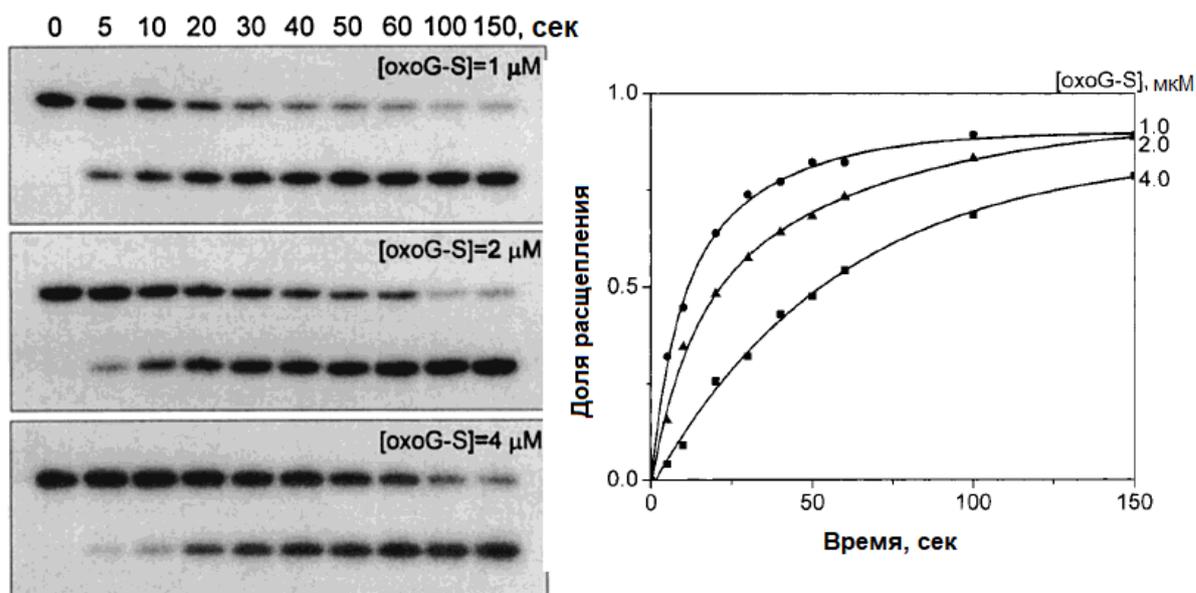


Рисунок 27. Кинетика расщепления субстрата охоG ферментом Frg при 25°C. Представлены данные анализа продуктов реакции в ПААГ с использованием 32 P-меченного субстрата и кривые его расходования.

Для расчета скорости образования продукта на стадии 4 (k_4), использовали данные кинетики разрезания субстрата охоG, полученные при разделении образующихся продуктов реакции в ПААГ (Рис. 27). Можно видеть, что зависимости образования расщепленных олигонуклеотидов от времени при концентрации олигонуклеотидных дуплексов в диапазоне 1 - 4 мкМ хорошо коррелируют со скоростью увеличения интенсивности флуоресценции на стадии 4 (Рис. 26А). Продуктом этого каталитического процесса является дуплекс, из которого удален охоG, и охоG может находиться в равновесии между свободной формой и связанной с ферментом. Стадия 4 характеризуется наименьшей константой скорости и может представлять собой финальный каталитический шаг. Продукт может находиться в равновесии свободной и связанной с ферментом форм. Для всех стадий реакции были

рассчитаны константы скорости и равновесная константа ассоциации K_{EP} (Таблица 2). Таким образом, были определены константы скорости многостадийного взаимодействия Fpg со специфическим субстратом.

Таблица 2. Константы скорости реакции взаимодействия Fpg со специфическим ДНК-субстратом oхoG при 25°C.

| Внутренняя константа скорости | Глобальный фиттинг |
|-------------------------------|-----------------------------|
| $k_1, (M^{-1}, s^{-1})$ | $(3,2 \pm 0,3) \times 10^8$ |
| $k_{-1} (s^{-1})$ | $(8,9 \pm 1,0) \times 10^2$ |
| $k_2 (s^{-1})$ | 12 ± 1 |
| $k_{-2} (s^{-1})$ | 10 ± 1 |
| $k_3 (s^{-1})$ | $0,16 \pm 0,01$ |
| $k_4 (s^{-1})$ | $0,10 \pm 0,01$ |
| $K_{EP} (M^{-1})$ | $(2,8 \pm 0,3) \times 10^5$ |

Кинетика взаимодействия белка Fpg с 8-охоG субстратом, хорошо согласуется с теоретической Схемой 2, где (Fpg*8-охоG-ДНК)_n – неспецифический распознающий комплекс, (Fpg*8-охоG-ДНК) – специфический комплекс, формирующийся в результате однонаправленного движения фермента по ДНК, (Fpg*AP-сайт-ДНК) – комплекс с AP-субстратом ДНК, образующимся на первой каталитической стадии, (Fpg*3'-nicked AP-site-DNA) – комплекс с ДНК-субстратом, где цепь содержит разрыв на второй каталитической стадии после 3'-β-элиминирования и (Fpg*nicked DNA) – комплекс, образованный на третьей каталитической стадии после 5'-δ-элиминирования с формированием ДНК-субстрата без одного нуклеотида. Таким образом показано, что существует как минимум шесть стадий в процессе репарации повреждения 8-охоG, в которых гликозилаза Fpg претерпевает конформационные превращения.

Полученные нами результаты хорошо согласуются с показанными ранее в наших работах и работах наших коллег [183–185] особенностями комплексов Fpg с неспецифическими субстратами: происходит образование множественных слабых неспецифических дополнительных контактов между Fpg и остовом ДНК. В случае

AP-сайты существенно дестабилизируют термодинамику ДНК-дуплекса и повышают гибкость ДНК. Помимо изменения конформации фермента в процессе взаимодействия с субстратом, Frg также индуцирует изгибание ДНК-субстрата и локальное плавление дуплексов, необходимое для принятия конформации, оптимальной для катализа. Можно предположить, что ДНК дуплекс (Приложение 1), содержащий тетрагидрофуран (F), который узнается, но не расщепляется Frg, будет претерпевать конформационные изменения при связывании с Frg.

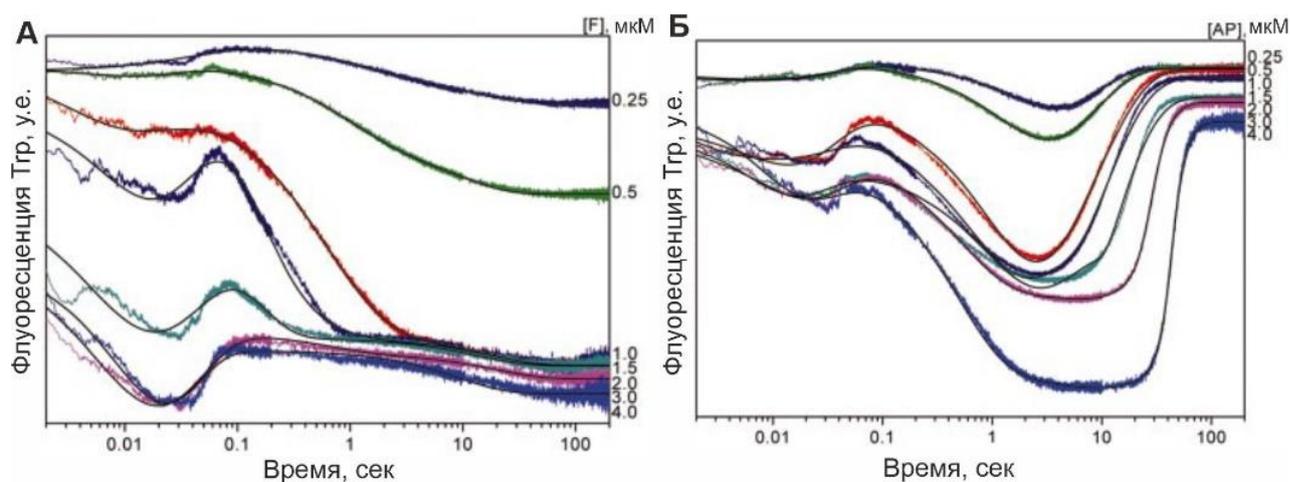
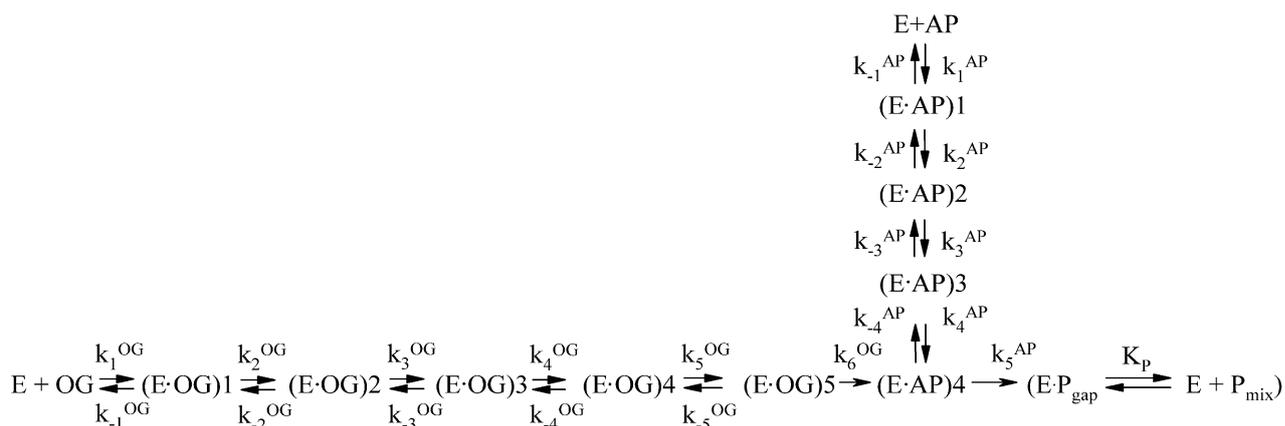


Рисунок 28. Кинетика взаимодействия Frg с нерасщепляемым субстратом дуплексом, содержащим тетрагидрофуран - A/F (А) и природным AP-сайтом –A/AP (Б). Данные представлены как изменение флуоресценции остатков Тгр фермента. Концентрацию субстрата варьировали от 0,25 до 4,0 мкМ. Теоретические кривые изображены гладкими линиями. Концентрация белка в экспериментах составляла 1,5 мкМ.

Связывание Frg с ДНК реализуется через стадию формирования неспецифического узнающего комплекса. В случае субстрата F, следующим шагом является уже специфическое связывание без реализации расщепления. Для исследования этой стадии процесса, был проведен анализ взаимодействия Frg с субстратом F и содержащим AP-сайт (A/AP). На рисунке 28 представлены кинетические кривые взаимодействия Frg с субстратами в условиях однооборотной реакции. В случае субстрата F, можно видеть зависимое от времени падение интенсивности флуоресценции остатков триптофана в Frg, которое при этом положительно коррелировало с увеличением концентрации субстрата (Рис. 28А). Характер кривых,

в соответствии с теоретической моделью, отражал наличие как минимум четырех стадий взаимодействия. При анализе связывания и расщепления субстрата A/AP, была обнаружена дополнительная стадия, по сравнению с субстратом F, относящаяся к промежутку 10-100 сек и соответствующая минимальному значению флуоресценции Frg (Рис. 28Б). Поскольку в условиях избытка субстрата (>1,5 мкМ) отрезок кривой в этой области становится линейным, это демонстрирует существование дополнительной стадии. В отношении остальных участков характер кривых для дуплексов F и AP совпадал. Представленные данные свидетельствуют о том, что стадии 1-4 отражают формирование первичного комплекса и конформационную корректировку в процессе выворачивания модифицированного нуклеотида. Заключительная, пятая стадия, характеризуется константой скорости k_5^{AP} и соответствует вырезанию модифицированного рибозного остатка и формированию двух отдельных олигонуклеотидов. Увеличение интенсивности флуоресценции в финальных сегментах кривых для AP-дуплекса отражает выход фермента из комплекса с продуктом (P_{gap}), далее представляющем собой смесь трех отдельных олигонуклеотидов (P_{mix}). На основании полученных результатов, была предложена полная кинетическая схема, описывающая взаимодействие Frg *E.coli* с различными субстратами (Схема 3).

Схема 3. Унифицированная схема связывания и разрезания любого субстрата Frg



Таким образом, кинетический анализ взаимодействия Frg с олигонуклеотидным дуплексом A/AP, содержащим AP-сайт или нерасщепляемый аналог AP-сайта (A/F) показал наличие четырех различных стадий взаимодействия фермента с субстратом в

диапазоне времени 2 мсек – 10 сек. Указанные стадии отражают связывание фермента с ДНК и узнавание повреждения с взаимной корректировкой структур ДНК и фермента для достижения каталитически компетентной конформации.

Специфичность Frg для вырезания 8-охоG не ограничивается наличием 8-охоG сайта, но требует наличия основания С в комплементарном положении, а не А. Вследствие этого возникает вопрос об особенностях взаимодействия Frg с субстратами, содержащими А, Т или G напротив 8-охоG или Т и G напротив DNU. Для этого, методом остановленной струи помимо изменения флуоресценции триптофанов в Frg, анализировали изменение флуоресценции 2-аминопуринов в ДНК. В качестве модельных ДНК использовали дуплексы А/охоG, А/DNU, С/охоG, В/охоG, В/AP, В/F, В/G, где против поврежденного основания располагались А, G или Т. На Рис. 29 представлены кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения фермента при взаимодействии с указанными ДНК-дуплексами.

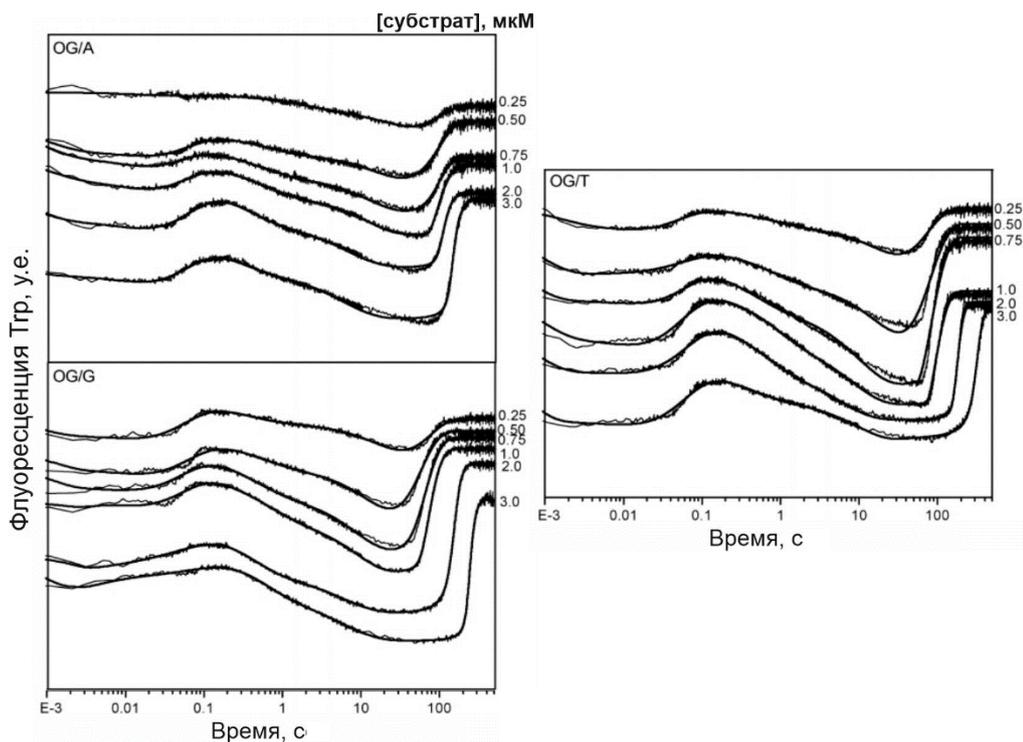


Рисунок 29. Кинетика взаимодействия Frg с ДНК-субстратами, содержащими А (OG/A), G (OG/G) и Т (OG/T) напротив 8-охоG. Экспериментальные (шероховатые) и теоретические (гладкие) кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков триптофана в составе фермента Frg при взаимодействии с субстратом.

Константы скорости индивидуальных стадий реакции были рассчитаны с учетом теоретической модели и полученных выше данных для 8-охо-G•C субстрата. Сравнение индивидуальных констант скорости для схемы с пятью стадиями показало, что для дискриминации основания напротив поврежденного основания наиболее важна вторая стадия, характеризующаяся константами k_2 и k_{-2} . Предпочтение Frg по данным остановленной струи к основанию, находящемуся напротив 8-охоG было следующим: C[dmt]T \approx A \approx G (Рис. 30).

Полученные результаты были подтверждены данными анализа продуктов расщепления соответствующих субстратов в ПААГ и показали, что эффективность расщепления была C > T > A \approx G.

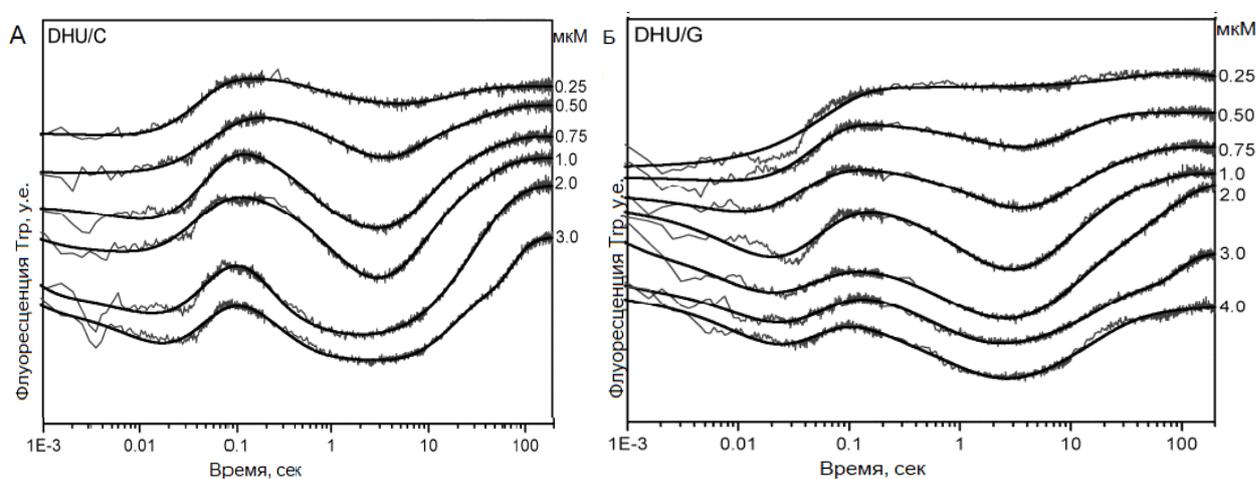


Рисунок 30. Процессинг субстратов DNU*C и DNU*G гликозилазой Frg. (А) Данные stopped flow кинетики флуоресценции остатков триптофанов в Frg для DNU*C и (Б) для DNU*G. Экспериментальные кривые изображены шероховатыми линиями, теоретические кривые – гладкими (результаты наложения пятиступенчатой кинетической модели). Концентрации субстрата показаны справа от графика; концентрация фермента составляла 2 мкМ.

3.1.2. Кинетика узнавания и разрезания субстрата ферментом hOGG1

При исследовании кинетики взаимодействия ДНК-гликозилазы человека hOGG1 с ДНК-дуплексом А, содержащим 8-охоG напротив С обнаружено, что конверсия 8-охоG включает как минимум пять различных стадий, которые детектируются по изменению флуоресценции триптофанов фермента (Рис. 31).

Сначала следуют три равновесные стадии, далее две медленные стадии и заключительная равновесная стадия. Взаимодействие hOGG1 с субстратом, содержащим AP-сайт происходило в некаталитическом режиме с очень низким уровнем β -элиминации, наблюдаемым в течение первых 1000 сек реакции (Рис. 31). Вторая необратимая стадия является лимитирующей стадией всего процесса.

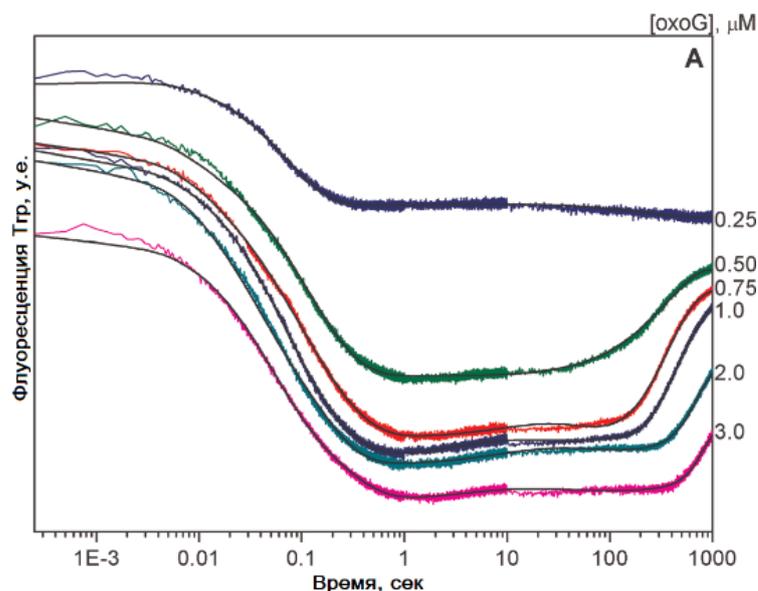


Рисунок 31. Кинетика взаимодействия hOGG1 с ДНК-субстратом, содержащим 8-охоG. Данные исследования методом остановленной струи представлены как изменение флуоресценции остатков Тгр фермента. Концентрацию субстрата варьировали от 0,25 до 3,0 мкМ. Концентрация белка в экспериментах составляла 1,5 мкМ.

Сравнивая кинетические данные изменения флуоресценции hOGG1 и анализируя накопление расщепленных продуктов в ПААГ, было показано, что необратимыми стадиями химической реакции, катализируемой hOGG1 являются расщепление N-гликозидной связи поврежденного нуклеотида и β -элиминация его 3'-фосфата. Быстрые равновесные стадии соответствовали конформационным изменениям фермента в процессе распознавания 8-охоG, а заключительная равновесная стадия - связыванию ферментом продукта реакции.

3.1.3. Влияние экзогенного свободного 8-BrG на взаимодействие hOGG1 с ДНК-дуплексами, содержащими AP и 8-охоG поврежденные основания напротив цитидина

По аналогии с другими ДНК-гликозилазами и ДНК-полимеразами можно предположить, что hOGG1 претерпевает многоступенчатые конформационные переходы между открытым и закрытым комплексом при связывании субстрата и, далее, при акте каталитического расщепления. Такое поведение иллюстрирует концепцию динамической модели ферментативного катализа, в которой конформационные перестроения в молекуле фермента запускают конверсию субстрата в продукт. Согласно структурным данным [87], отрыв протона от С2' атома является необходимой стадией для инициирования β -элиминации, которая может быть катализирована анионной формой поврежденного основания непосредственно после разрыва гликозидной связи. Для проверки данной гипотезы в реакцию hOGG1 с AP-сайт-содержащим субстратом вводили 8-бромгуанин (8-BrG), аналог гуанина, замещенный по положению С8, и следили за образованием продуктов реакции, анализируя реакционные смеси гель-электрофорезом (Рис. 32).

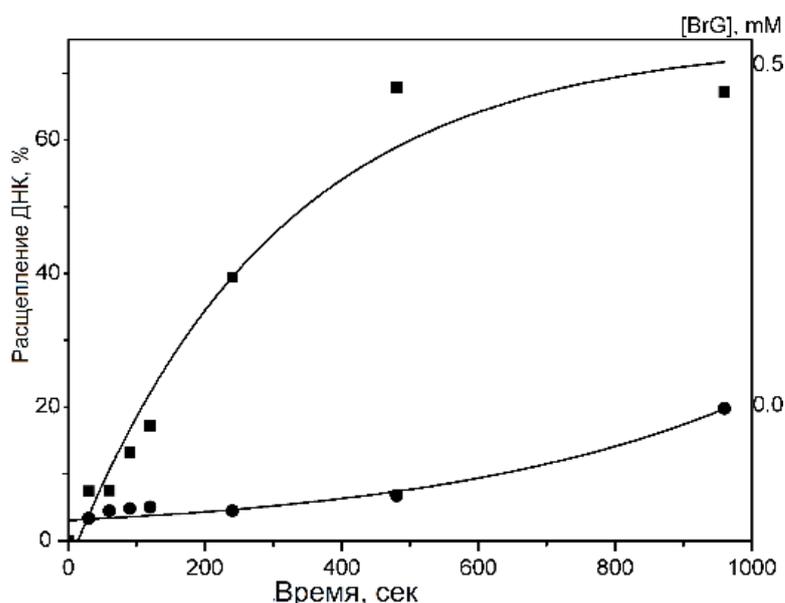


Рисунок 32. Усиление AP-лиазной активности hOGG1 в отношении субстрата 8-охоG•С в присутствии 8-BrG. Кинетические кривые накопления продукта (расщепленного дуплекса ДНК) по данным разделения продуктов реакции в ПААГ.

Можно видеть, что hOGG1 взаимодействует с субстратом, содержащим альдегидный AP-сайт очень медленно, но добавление 8-BrG существенно ускоряет реакцию – константа скорости $k_4=0,029 \text{ с}^{-1}$, что в 5 раз выше, чем для реакции в отсутствие 8-BrG, составляющей $0,006 \text{ с}^{-1}$ (Таблица 3).

Таблица 3. Константы скорости взаимодействия hOGG1 с 8-охоG в паре 8-охоG•C в присутствии 8-BrG.

| Константы | Среднее \pm SD |
|--|--------------------------------|
| $k_{1f} (\text{M}^{-1}\text{с}^{-1})$ | $(2,12 \pm 0,02) \times 10^8$ |
| $K_{-1f} (\text{с}^{-1})$ | $167 \pm 0,7$ |
| $k_{2f} (\text{с}^{-1})$ | $7,88 \pm 0,03$ |
| $K_{-2f} (\text{с}^{-1})$ | $1,19 \pm 0,01$ |
| $k_{3f} (\text{с}^{-1})$ | $0,03 \pm 0,001$ |
| $K_{-3f} (\text{с}^{-1})$ | $0,27 \pm 0,02$ |
| $k_{4f} (\text{с}^{-1})$ | $0,029 \pm 0,001$ |
| $K_{EPf} (\text{M}^{-1}\text{с}^{-1})$ | $(2,1 \pm 0,3) \times 10^{-5}$ |

Для уточнения кинетического механизма стимуляции hOGG1 аналогом гуанина 8-BrG при взаимодействии с 8-охоG•C и AP-содержащими субстратами использовали метод остановленной струи, детектируя изменение флуоресценции Trp фермента и флуоресценции 2-аPu остатков субстратов. На Рис. 33А представлены примеры зависимостей изменения флуоресценции фермента и субстратов в ходе реакции. В ходе превращений субстрата 8-охоG, основные изменения флуоресценции фермента происходят в промежутке времени, превышающем 100 с. В случае добавления в реакцию 8-BrG, две необратимые стадии – выщепление основания и β -элиминация, замещаются одной необратимой стадией, характеризующейся константой скорости k_4 . Значение k_4 , определенные из кинетических кривых изменения флуоресценции 2-аPu и Trp составили $0,0070 \text{ с}^{-1}$ и $0,0077 \text{ с}^{-1}$, соответственно.

Прямой анализ образующихся расщепленных продуктов ДНК в реакции в присутствии 8-BrG проводили методом их разделения в ПААГ (Рис. 33Б). Кривые накопления продуктов реакции позволили рассчитать константу скорости необратимой стадии $k_{elim}=0,012 \text{ с}^{-1}$, что превышало значение константы, полученной на основе данных изменения флуоресценции. Скорость β -элиминации 8-охоG из субстрата была в 2 раза выше в присутствии 8-BrG.

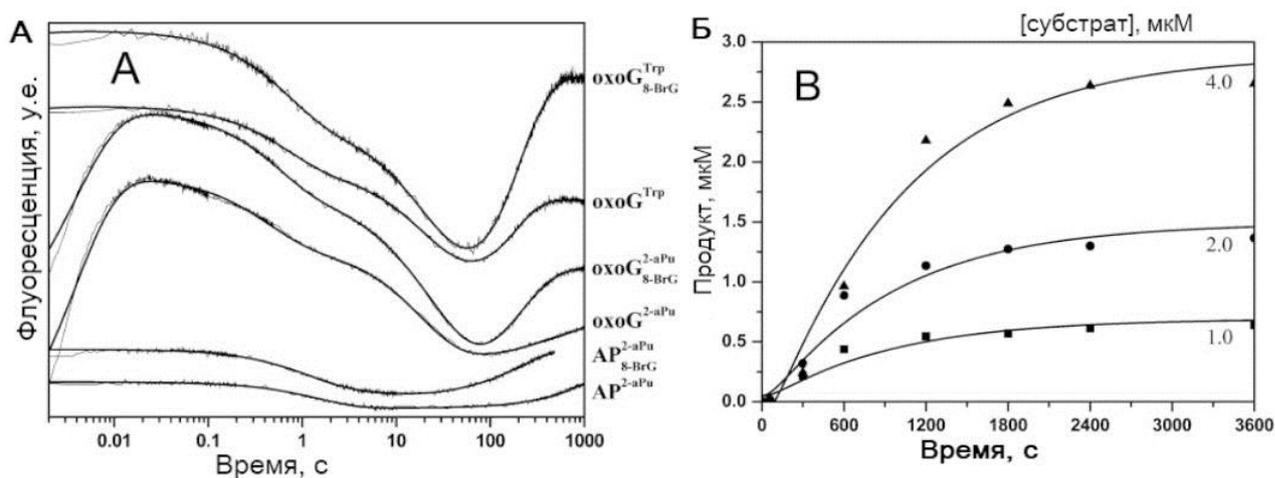


Рисунок 33. 8-BrG изменяет механизм реакции hOGG1 и его субстратами ДНК, содержащими 8-охоG и AP-сайты. (А) Кинетика изменения флуоресценции остатков Trp фермента hOGG1 или флуоресценции 2-аPu субстратов в ходе реакции. Концентрация ДНК-субстратов 1 мкМ и фермента 2 мкМ. (Б) Кинетика образования продуктов реакции в присутствии 8-BrG (0,5 мМ).

Предположительно, 8-BrG при использовании в высокой концентрации, эффективно связывается с активным сайтом hOGG1, и далее этот комплекс связывает AP-сайт, как и свободный фермент, но реакция расщепления происходит быстрее при участии 8-BrG. Когда hOGG1 взаимодействует с 8-охоG субстратом и расщепляет N-гликозидную связь, 8-охоG может как задерживаться в активном сайте, так и быстро замещаться свободным 8-BrG. Это позволяет заключить, что 8-BrG влияет на скорость β-элиминирования, осуществляемого hOGG1, а не на динамику взаимодействия фермента и ДНК субстрата до стадии расщепления.

3.1.4. Процессинг повреждений ДНК мутантными формами hOGG1

Для понимания динамических аспектов узнавания и процессинга ДНК-субстрата ферментом, были сконструированы мутанты hOGG1 с заменой Cys253 на Leu или Ile. В hOGG1 Cys253 формирует “стенку” кармана, связывающего основание, а при замене Cys253 на объемные Leu или Ile активный сайт блокируется. Структура активного центра фермента, содержащего замены Cys253 на Leu или Ile была промоделирована методами молекулярной динамики (Рис. 34), на основании чего было высказано предположение, что дополнительный стерический объем и

неспособность формировать дипольную связь Cys253-Lys249 может вести к вытеснению 8-охоG из кармана и дестабилизировать процесс его вырезания, но не исключать взаимодействие фермента с AP-сайтом.

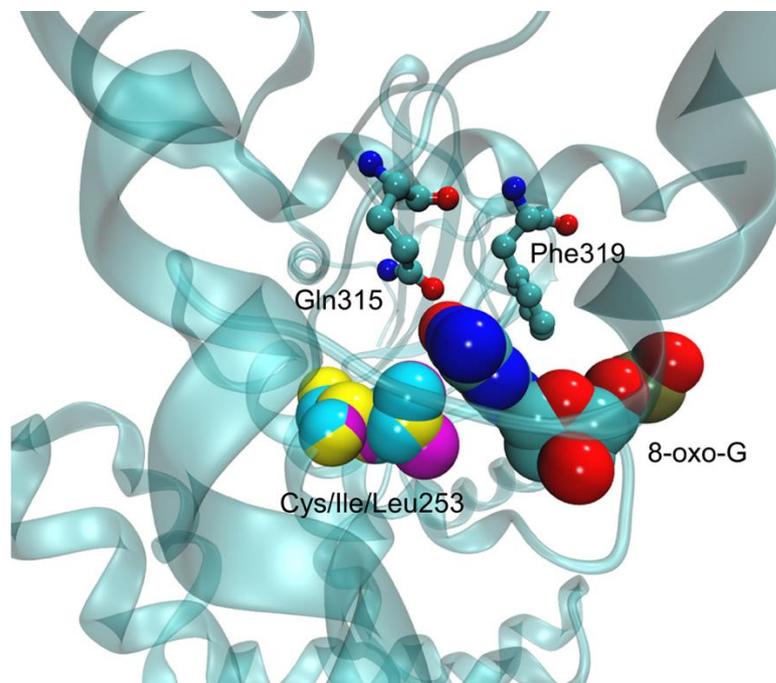


Рисунок 34. Молекулярное моделирование структуры активного центра мутантной hOGG1 с заменами Cys253 при взаимодействии с 8-охоG повреждением в ДНК-субстрате.

Взаимодействие мутантных форм hOGG1 C253L и C253I с 8-охоG субстратом изучали методом остановленной струи. На Рис. 35 представлены кинетические кривые изменения флуоресценции остатков триптофанов фермента. Можно видеть, что общий вид кривых для мутантов Leu253 и Ile253, а также для природной формы hOGG1^{wt} фермента практически совпадает (см. Рис 4).

Быстрое начальное снижение флуоресценции соответствует стадии образования комплекса с субстратом, а увеличение флуоресценции на заключительной стадии соответствует выходу продукта из фермент-субстратного комплекса. Для дикого типа фермента и мутантов были рассчитаны константы скорости (Таблица 4).

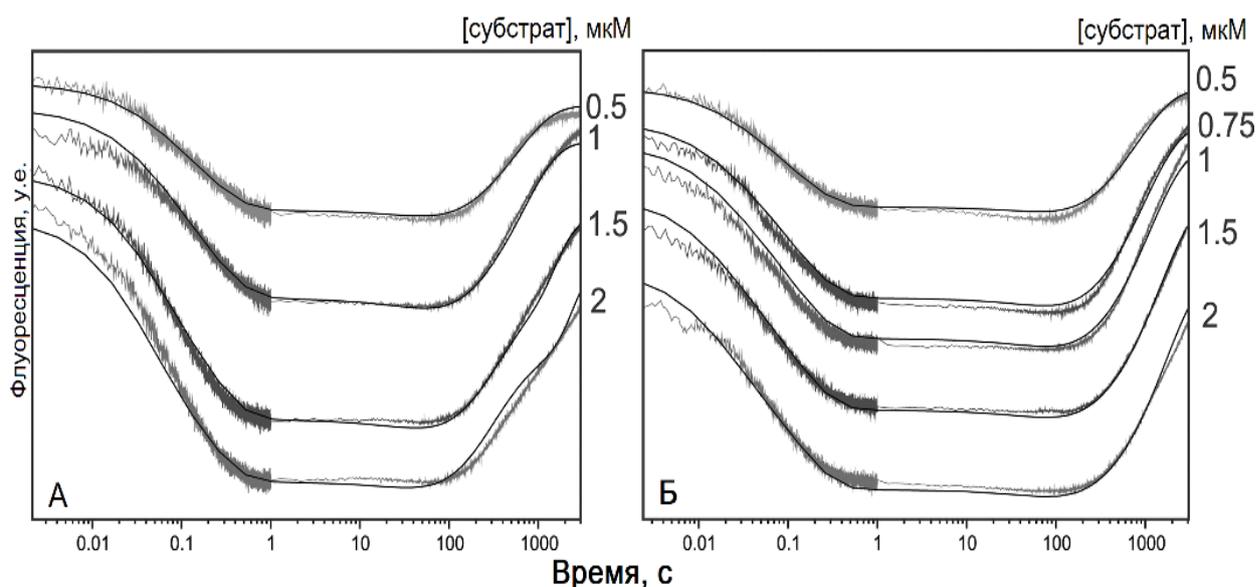


Рисунок 35. Кинетика взаимодействия C253L (А) и C253I (Б) мутантных форм hOGG1 с ДНК-субстратом, содержащим 8-охоG. Концентрацию субстрата варьировали от 0,5 до 2,0 мкМ. Концентрация белка в экспериментах составляла 1,0 мкМ.

Таблица 4. Константы скорости взаимодействия природного hOGG1 и его мутантных форм Leu253 и Ile253 с субстратом, содержащим 8-охоG.

| Константы | hOGG1 ^{wt} | Leu253 hOGG1 | Ile253 hOGG1 |
|--|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| k_1 (M ⁻¹ s ⁻¹) | (260 ± 10) × 10 ⁶ | (28,5 ± 1,3) × 10 ⁶ | (13/8 ± 0,6) × 10 ⁶ |
| k_{-1} (с ⁻¹) | 130 ± 1 | 5,7 ± 0,6 | 3,3 ± 0,3 |
| k_2 (с ⁻¹) | 13,3 ± 0,2 | 3,1 ± 0,3 | 3,5 ± 0,4 |
| k_{-2} (с ⁻¹) | 1,16 ± 0,02 | 5,2 ± 0,02 | 2,9 ± 0,2 |
| k_3 (с ⁻¹) | 0,012 ± 0,001 | 0,0116 ± 0,0005 | 0,0163 ± 0,0006 |
| k_{-3} (с ⁻¹) | 0,07 ± 0,01 | 0,0045 ± 0,0003 | 0,0082 ± 0,0004 |
| k_4 (с ⁻¹) | 0,06 ± 0,02 | 0,0042 ± 0,0003 | 0,0046 ± 0,0002 |
| K_P (M) | 8,8 × 10 ⁻⁷ | (1,1 ± 0,1) × 10 ⁻⁷ | (1,3 ± 0,1) × 10 ⁻⁷ |

Константа скорости необратимой стадии k_4 была в 15 раз меньше для мутантных форм фермента по сравнению с wild-type формой. Константа скорости k_4 наиболее вероятно соответствует стадии образования AP-сайта на месте поврежденного

основания, после чего следует стадия выхода ДНК из комплекса с ферментом. Согласно полученным данным, обе мутации преимущественно влияют на каталитическую эффективность фермента hOGG1, а не на аффинность фермента к ДНК-продукту или его способности искажать ДНК в предкаталитическом комплексе. При моделировании взаимодействия в узнающем кармане, как и ожидалось, показано, что объемные заместители в мутантных формах фермента в узнающем кармане замещают 8-охоG (Рис. 36). В случае Ile253 hOGG1 происходит перекрытие на 80% области Phe319 и планарного кольца 8-охоG, тогда как для Leu253 hOGG1 перекрытие происходит на 20%. Можно видеть, что наибольшему искажению в ДНК при взаимодействии с мутантными белками подвергается цитозин, комплементарный 8-охоG (dC⁰ на рис. 36Б) и нуклеотид dT⁻¹. Несмотря на то, что заполнение связывающего кармана поврежденным азотистым основанием для мутантов Leu253 и Ile253 дестабилизирует активный центр hOGG1 со связанным субстратом и существенно снижает способность фермента к катализу, присутствует остаточное узнавание и выщепление поврежденного основания.

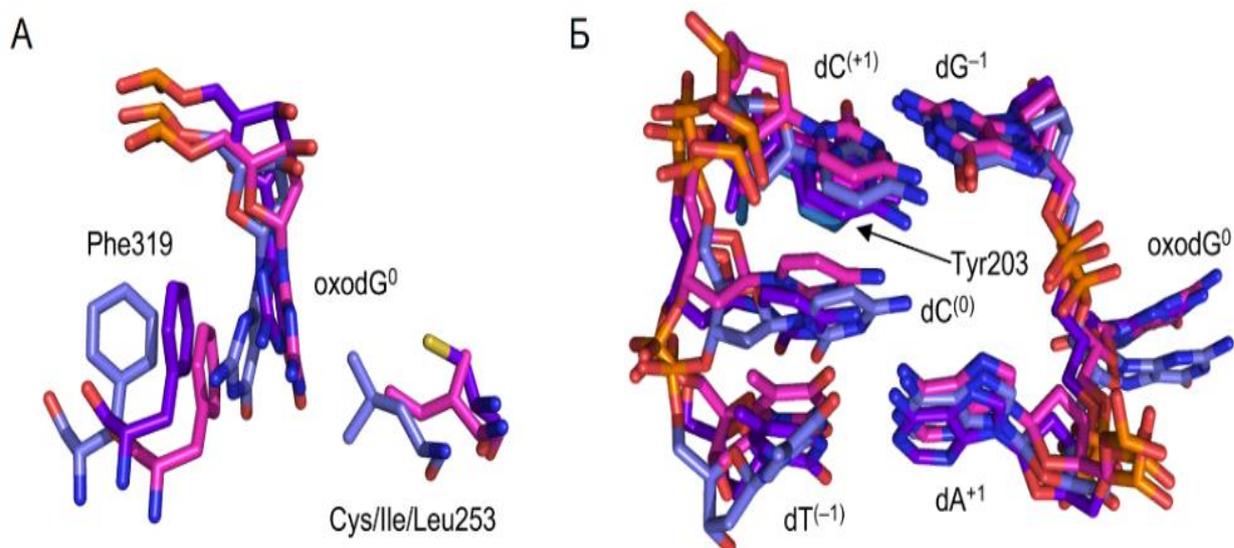


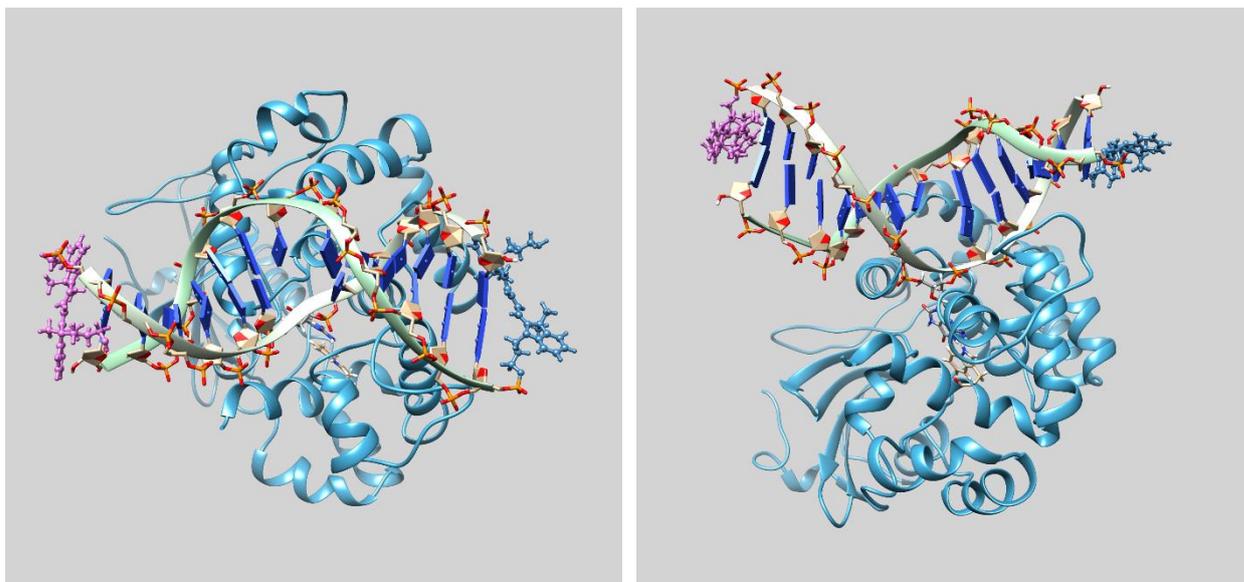
Рисунок 36. Моделирование перекрытия структур остатков нуклеотидов в активном центре hOGG1.

Наиболее вероятно, это связано с внутренней пластичностью белка и существенной энергетической выгодой выворачивания 8-охоG когда фермент уже связался с субстратом.

3.1.5. Динамика репарации 8-охоG под действием hOGG1 по данным регистрации FRET

Специально синтезированные ДНК-субстраты, содержащие остатки цианинового красителя Cy3 и Cy5 на 5'-концах комплементарных цепей ДНК, были использованы для мониторинга изменений флуоресценции при взаимодействии фермента с субстратом методом FRET. Для того чтобы выяснить, насколько изменяется геометрия ДНК-дуплекса, было осуществлено молекулярное моделирование комплекса фермента с ДНК-дуплексом, несущим остаток 8-охоG в центральной части, с применением метода молекулярной динамики. В задачи исследования также входило установить расстояние между флуоресцентными группами, их ориентацию относительно друг друга и относительно спирали ДНК.

В качестве стартовой структуры были взяты координаты аминокислот белка из файла PDB: 1EBM. Структура, полученная в результате, включала координаты аминокислот hOGG1 с 12 по 325 и была использована для моделирования методом МД. В результате из исходного 15-нуклеотидного дуплекса был получен 13-нуклеотидный дуплекс требуемой последовательности с вывернутым из спирали остатком 8-охоG и расположенными на 5'-концах каждого олигонуклеотида остатками красителей Cy3 и Cy5. Параметры силового поля для остатков Cy3 и Cy5 были получены в нашей работе с помощью программного пакета Gaussian 09 при параметризации с использованием базисного набора (Basis set) 6-31G* [164]. На Рис. 37 приведен общий вид исследуемого комплекса, в котором видны остатки цианиновых красителей на 5'-концах каждого олигонуклеотида; вид сбоку представляет характерный изгиб спирали ДНК, вызванный её связыванием с hOGG1 и выворачиванием остатка 8-охоG из спирали. Введение флуоресцентных групп стабилизировало дуплекс, содержащий 8-охоG, и увеличивало температуру плавления с 45.2°C до 47.2°C.



А

Б

Рисунок 37. Общий вид комплекса hOGG1 с дуплексом ДНК, содержащим пару красителей FRET Cy3/Cy5.

Интенсивность FRET зависит от целого ряда факторов, но в общем виде может быть описана как функция расстояния между флуорофорами. На Рис. 38А приведена зависимость от времени MD симуляции расстояния, измеренного между центральными атомами в цианиновых красителях Cy3/Cy5. На кривой можно выделить, как минимум, три стабильных значения расстояний между красителями в системе: ~ 35 , ~ 40 и ~ 48 Å. На рис. 38А представлена траектория изменения расстояния между центральным и углеродным атомами в Cy3 и Cy5 в составе ДНК-дуплекса, взаимодействующего с hOGG1. Видно, что это расстояние достаточно стабильно и находится в узком диапазоне 46-49 Å. Остатки красителей большую часть времени локализованы в стекинге на концах спирали. Отклонение атомных координат системы, в основном, лежат в диапазоне 2 – 2.5 Å. Анализ распределения вероятности достижения определенных расстояний между центральными атомами красителей Cy3 и Cy5 позволяет выделить три стабильных значения расстояний: 34, 41 и 48 Å (Рис. 38Б). Конфигурация, в которой молекулярный ансамбль проводит больше всего времени (расстояние 48 Å) – оба остатка красителя находятся в стекинге с концевой парой оснований. Конфигурация с расстоянием 41 Å – остаток Cy5 связан в малой бороздке ДНК-дуплекса, Cy3 находится в стекинге с концевой парой оснований.

Обратная ситуация – Су3 в малой бороздке, Су5 в стекинге – также реализуется, но с меньшей вероятностью. Структура с расстоянием в 34 Å между красителями реализуется, когда и Су3 и Су5 связаны в малой бороздке ДНК. Полученные значения расстояний и взаимной ориентации Су3 и Су5 позволяют говорить о расстоянии и взаимной ориентации остатков красителей близких к оптимальным для FRET как индикатора изменения геометрии дуплекса вследствие его связывания с hOGG1.

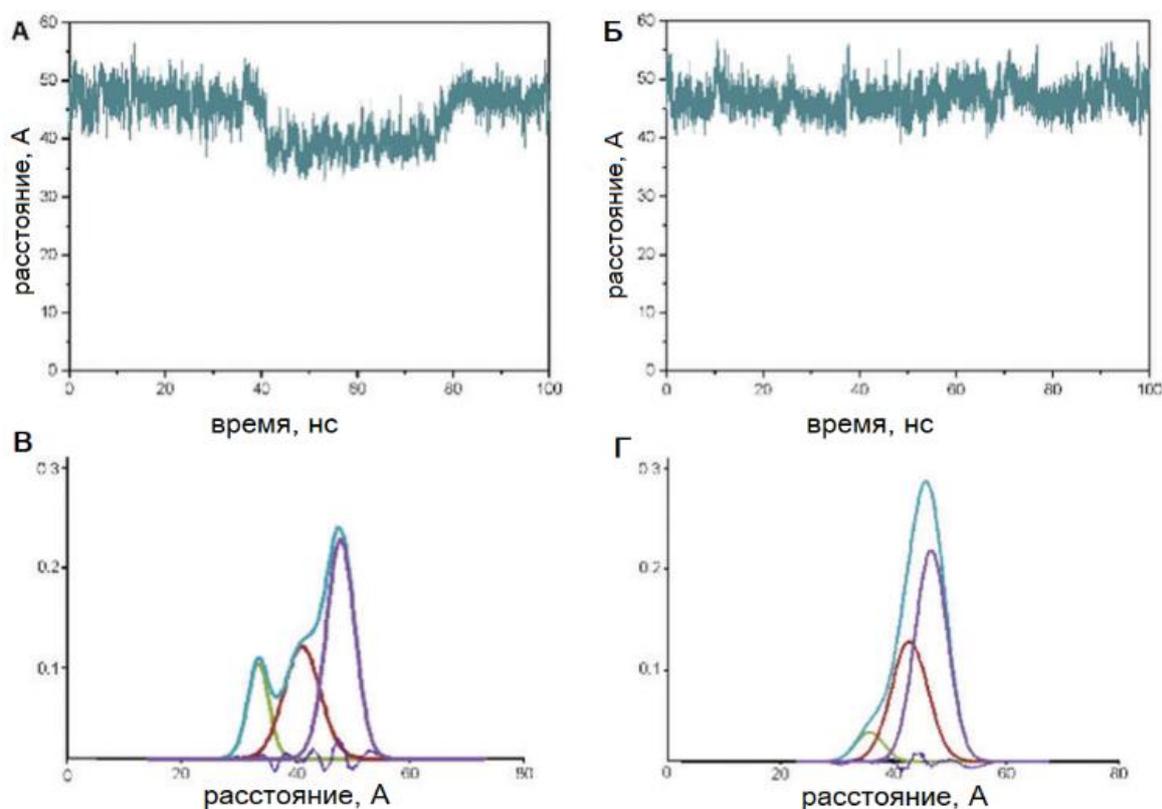


Рисунок 38. Расстояние между центральными атомами углерода в мотиве Су3/Су5 в процессе моделирования взаимодействий в комплексе hOGG1 и ДНК-дуплекса 8-охоG- Су3/Су5 (А) и ДНК в отсутствие фермента (Б). В и Г – вероятности распределения для А и Б, соответственно.

Взаиморасположение Су3/Су5 в ДНК-дуплексе без добавления фермента отличалось от такового в присутствии фермента (Рис. 38 Б). Анализ распределения вероятности достижения определенных расстояний между центральными атомами красителей Су3 и Су5 позволяет выделить одну основную конфигурацию с

расстоянием между центральными атомами красителей около 47 Å (Рис. 38Г), что доказывает наличие существенного изгиба ДНК в комплексе с hOGG1. Вклад остальных конфигураций незначителен, почти незаметен. Сравнение этого распределения с распределением для комплекса ДНК с hOGG1 (Рис. 38В) позволяет сделать вывод, что при изменении формы ДНК в результате связывания гликозилазы hOGG1 остатки красителя приобретают новую локализацию в малой бороздке и за пределами дуплекса.

Появление максимума интенсивности FRET на кривой остановленной струи для комплекса hOGG1 с 8-охоG дуплексом на 10 мс логично может быть объяснено изменением основной локализации красителей Cy3/Cy5. Предлагаемым механизмом будет следующий: шаг 1 – при связывании ДНК-дуплекса с Cy3/Cy5 ферментом hOGG1 двуцепочечная спираль изгибается – интенсивность FRET растет; шаг 2 – изменение геометрии малой бороздки в области изгиба увеличивает вероятность локализации Cy5 (в большей степени, чем Cy3) в малой бороздке – расстояние между красителями ещё уменьшается и сигнал FRET должен расти, но взаимная ориентация для диполь-дипольного взаимодействия остатков красителей неоптимальна – интенсивность FRET падает.

Для анализа взаимодействия hOGG1 дикого типа с ДНК-субстратами использовали 4 типа субстратов, содержащих: 8-охоG (Рис. 39А), неповрежденное основание (Рис. 39Б), AP-сайт (Рис. 39В) и тетрагидрофуран (F) (Рис. 39Г). Изменения флуоресценции субстрата отражали последовательные конформационные изменения в структуре ДНК в ходе каталитического цикла. На ранних временах (до 0,1 с) в случае всех исследуемых субстратов происходило увеличение сигнала FRET, что соответствовало стадии начального неспецифического связывания с ДНК. При взаимодействии с неповрежденным основанием сигнал FRET возрастал на протяжении 0,2 с, и в дальнейшем изменений уже не происходило (Рис. 39Б). В случае взаимодействия с 8-охоG дуплексом, на начальном участке кривой за увеличением интенсивности происходит быстрое снижение флуоресценции (Рис. 39А).

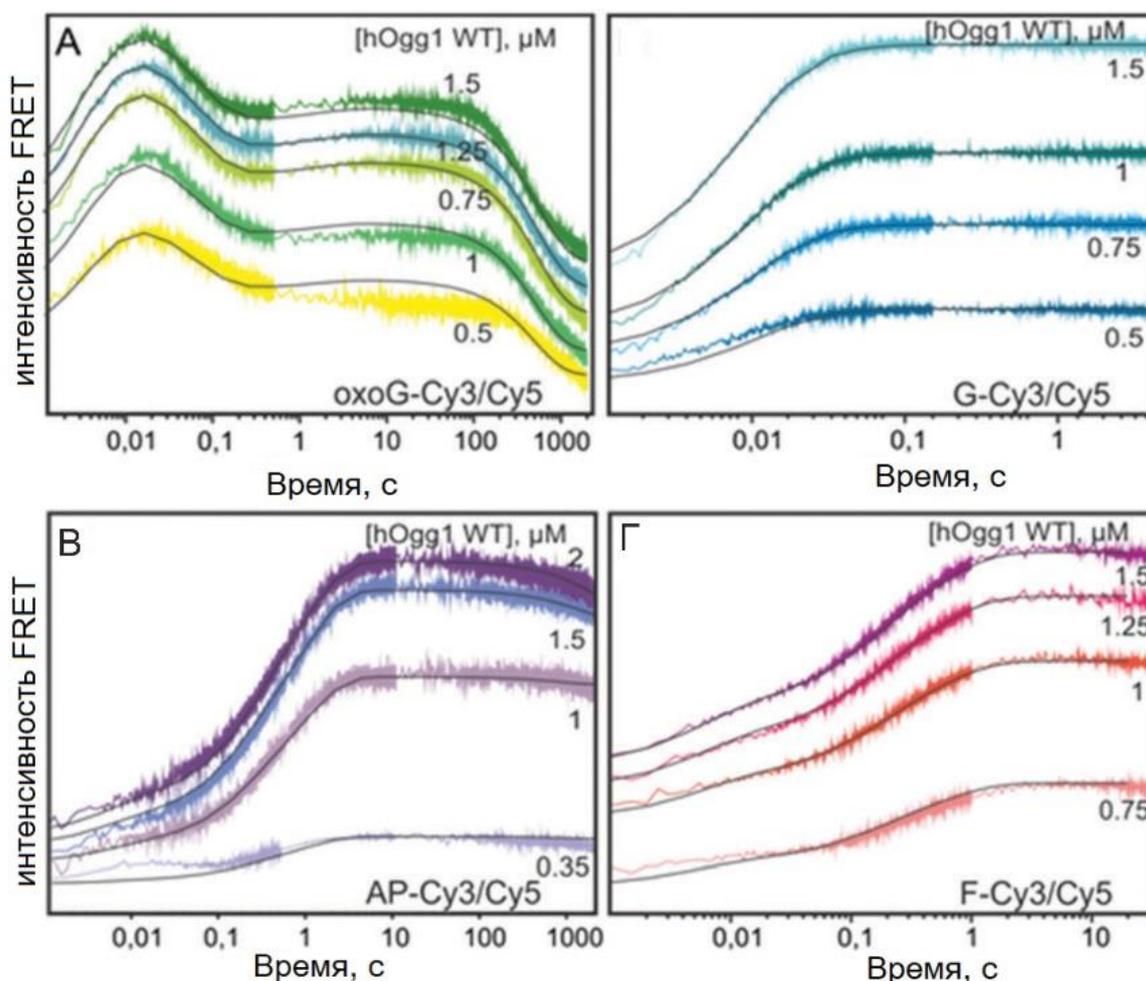


Рисунок 39. Кинетика изменения интенсивности FRET различных ДНК-субстратов (А-Г) при взаимодействии с природной формой белка hOGG1 wt.

Такое падение было обнаружено только для специфического субстрата 8-охоG, что соответствует специфическому узнаванию поврежденного основания и его выворачиванию в связывающий карман фермента. Завершающим событием является медленное падение интенсивности флуоресценции, отражающее расщепление цепи ДНК в процессе AP-лиазной реакции, локальное расхождение цепей ДНК в области образования продукта и его диссоциация из комплекса с ферментом. В случае природного AP-сайта, связывание фермента с субстратом происходило как минимум в три раза эффективнее, чем в случае нерасщепляемого сайта F. Разница в узнавании ферментом заместителя в 1'-положении дезоксирибозы подтверждает гипотезу о важности структурной пластичности в процессе подстройки активного центра к субстрату.

С целью выяснить структурные основы влияния замены Q315W на эффективность удаления из ДНК остатка 8-охоG гликозилазой hOGG1 было выполнено молекулярное моделирование комплекса hOGG1 с ДНК-дуплексом. Введение замены глутамина на триптофан в положении 315 белка проводили с использованием возможностей UCSF Chimera package [186]. Глутамин 315 отвечает за правильное позиционирование 8-охоG в активном сайте hOGG1, а замена глутамина на триптофан ведет как к изменению размера аминокислотного остатка, так и его химической природы – полярной группы на ароматическую. Важность остатка Gln315 в связывании 8-оксогуанина обусловлена наличием амидной NH₂-группы, которая через прочно связанную в активном центре молекулу воды взаимодействует с атомом O6 основания 8-охоG, а боковая карбонильная группа остатка Gln315 образует две водородные связи с атомами N1 и N2 8-оксогуанина. Вторая прочно связанная молекула воды также образует водородную связь с атомом O6. Взаимодействие остатков Gln315 и Gly42, а также связанных в активном центре молекул воды, по своим характеристикам не позволяет образовывать донорно-акцепторные водородные связи с А, С и Т [126].

Замена Q315W приводит к тому, что изменяется не только аминокислота, принимающая непосредственное участие в связывании вывернутого из ДНК остатка 8-охоG, изменяется размер аминокислоты, когда небольшая аминокислота заменяется на существенно большую, и её природа, когда полярная аминокислота заменяется на ароматическую. На Рис. 38Б представлена структура активного центра Q315W hOGG1 с локализацией 8-охоG и аминокислот активного центра. Согласно полученным данным, Trp315 частично занимает позицию 8-охоG в активном центре фермента, выталкивая поврежденное основание в направлении дезоксирибозы и гистидина His270 (Рис. 40). Возникает искажение сети взаимодействий активного центра, что существенно снижает эффективность катализа hOGG1. Эти изменения дестабилизируют активный центр фермента; как следствие, ароматическое кольцо остатка Trp315 вступает в стэкинг-взаимодействия с Phe319, уменьшая пространство, необходимое 8-охоG для взаимодействия с активным центром. Достаточно стабильного состояния структура достигает в случае, когда 8-охоG находится в стэкинге с Phe319 и Trp315, формируя тройной сэндвич.

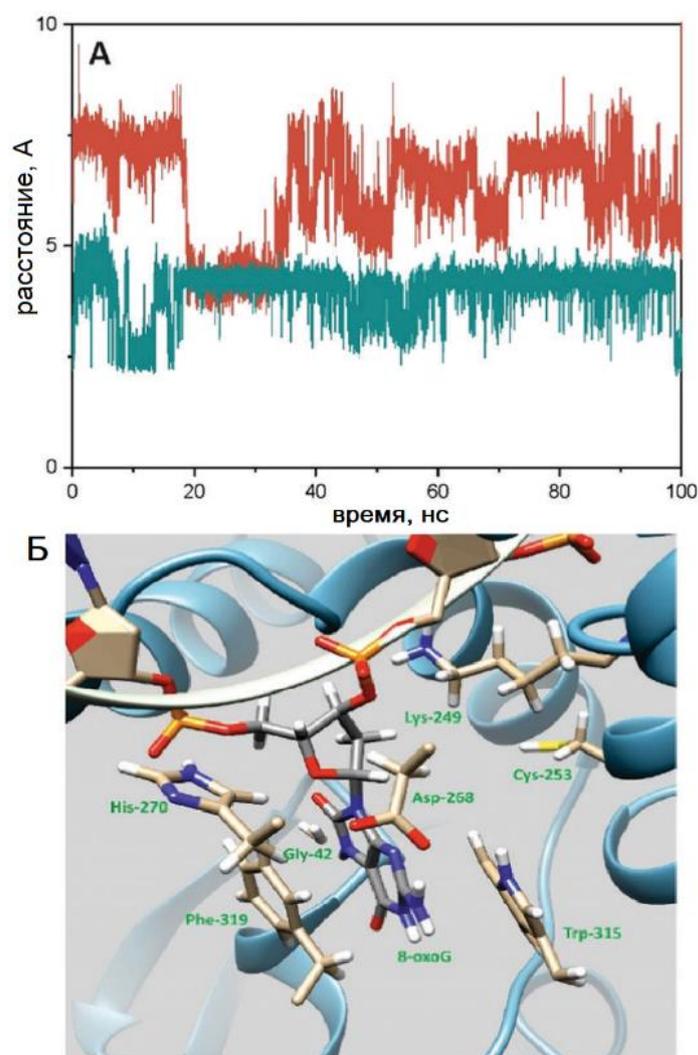


Рисунок 40. (А) Изменение расстояния между $N\epsilon$ атомом Lys249 в мутантной форме Q315W hOGG1 и атомом $C1'$ в 8-охоG в молекулярной динамике. (Б) Активный центр узнающего комплекса Q315W hOGG1 и 8-охоG субстрата.

На основании проведенного анализа можно заключить, что замена Q315W препятствует полному выворачиванию 8-охоG из дуплекса и связыванию его в активном центре hOGG1. Следствием этого является увеличение расстояние от $N\epsilon$ Lys249 до атома $C1'$ в 8-охоG, что уменьшает эффективность катализа. Таким образом, замена Gln315 на Trp препятствовала точному связыванию в активном сайте, что вело к снижению N-гликозилазной и последующей AP-лиазной активности.

3.1.6. Структурные маркеры для узнавания 8-оксогуанина в комплексе с 8-охоG-Clamp эндонуклеазой hOGG1

Использование синтетически модифицированных азотистых оснований является широко применяемой практикой при исследовании ферментов, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами [187–189]. Производное феноксазина, трициклический гетероцикл, который был предложен еще в 1995 г как аналог цитозина было названо G_Clamp (Рис. 41А) [190].

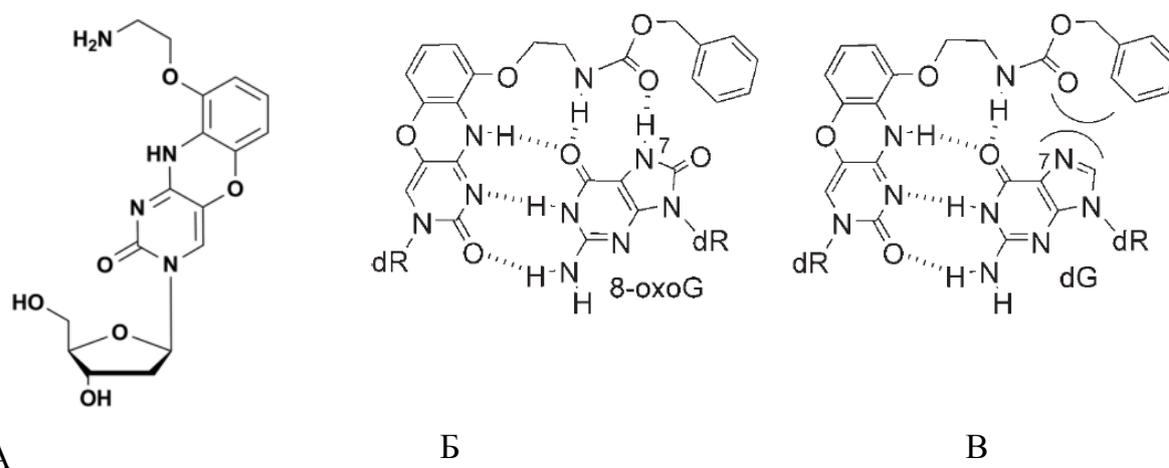


Рисунок 41. Структура G_Clamp (А) и особенности образования водородных связей между охоG_Clamp и окисленным (Б) и нормальным гуанозином (В). Представлено по [191].

Он способен образовывать 4 водородные связи с гуанином, что повышает стабильность ДНК-дуплекса и увеличивает сродство и селективность связывания олигонуклеотидов, содержащих такое модифицированное основание, с таргетной последовательностью ДНК [190, 192]. В настоящее время олигонуклеотиды, содержащие G_Clamp, достаточно широко используются для различных исследований и биомедицинских подходов [193–195]. Кроме того, были предложены модификации, названные охоG_Clamp, в структуру которых был добавлен «хвост», способный образовывать дополнительную водородную связь с водородом N-7 атома азота, который отсутствует в нормальном гуанине, но возникает в 8-оксогуанине - гидроксильном производном гуанина, которое в водных растворах существует

преимущественно в кето-форме и отличается от гуанина двумя дополнительными атомами: Н и N7 азота и О С8 (Рис. 41Б,В) [191]. ОхоG_Clamp может связываться нормальным гуанином, с образованием 4 водородных связей и с окисленным, с образованием пяти водородных связей, но особенно интересным и стал тот факт, что это производное проявляет разные флуоресцентные свойства и обладает флуоресценцией, на эффективность тушения которой по разному влияет присутствие нормального и окисленного гуанина [196, 197]. Поскольку соединение охоG_Clamp обладает флуоресценцией, которая селективно снижается при его взаимодействии с 8-оксогуанозином, это соединение было предложено в качестве сенсора для определения уровня окисленного гуанозина в клетках [198, 199]. Детекция и оценка уровня 8-охоG в ДНК, клетках и тканях имеет важное научное и диагностическое значение, так как есть множество свидетельств того, что его уровень повышается при канцерогенезе, бронхолегочных заболеваниях, старении, болезни Альцгеймера и других патологических процессах [200–206].

Для детекции 8-оксогуанина в клетках, моче, крови и тканях ранее были предложены различные методы: жидкостная хроматография высокого давления (HPLC) с электрохимической детекцией (HPLC-ECD), HPLC тандемная масс-спектрометрия (HPLC-MS), газовая хромато-масс-спектрометрия (GC-MS), капиллярный электрофорез с электрохимической детекцией (CE-ECD), иммуноферментный анализ, использование электрохимических сенсоров на основе модифицированных электродов, использование биосенсоров на основе CRISPR-Cas12a [207–213]. Тем не менее, все перечисленные методы имеют ряд ограничений и/или недостатков, в том числе удобство применения, высокая стоимость расходных материалов или приборов, ограниченная чувствительность и т.д., поэтому возможность использования специфического флуорофора, способного селективно связаться с оксогуанином и различить его среди пула неповрежденных оснований и нуклеотидов, кажется удобным и практичным инструментом для оценки присутствия 8-оксогуанина в системе в/вне ДНК.

В нашем исследовании основной задачей было изучить свойства ДНК-дуплексов с нуклеотидной парой охоG/охоG_Clamp, а также использовать уникальные

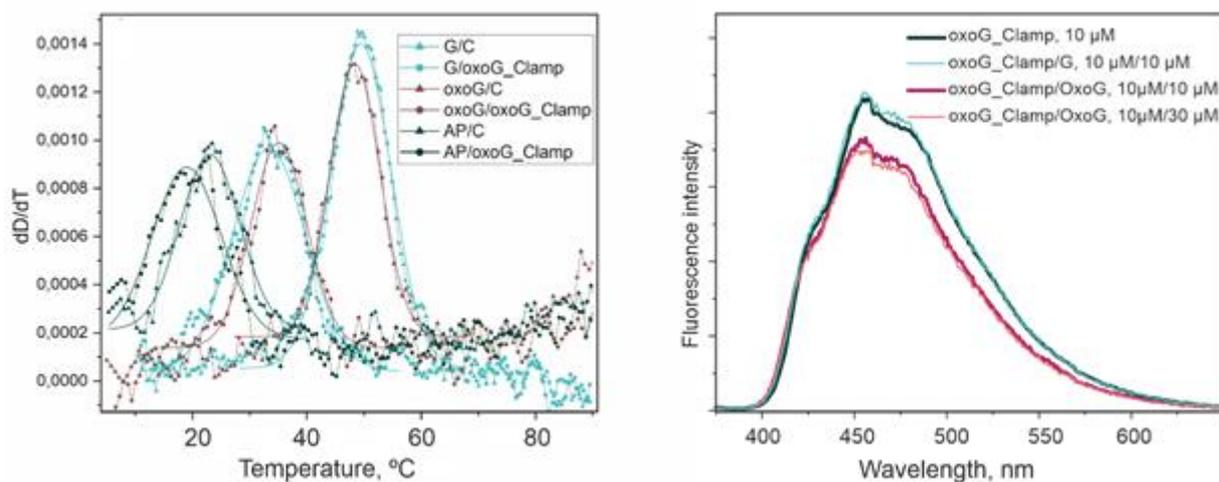
флуоресцентные свойства ohoG_Clamp для исследования работы 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека hOGG1.

Узнавание 8-охоG в активном центре OGG1 происходит путем формирования специфических контактов между поврежденным основанием и аминокислотами белка. Фермент узнает уреидный фрагмент 8-охоG, включающий C8-карбонильную группу, атомы N7 и N9. При этом атом N7 образует водородную связь с карбонилем остатка Gly42. Среди всех контактов 8-охоG имеется только одно взаимодействие с остатком Gly42, которого нет у гуанина. Разумно предположить, что ответственность за дискриминацию 8-охоG от G несет только одна водородная связь. Необходимо отметить, что критически значимая аминокислота Gly42 помещается в β -складчатом домене, располагающемся в области контакта hOGG1-ДНК. Кроме упомянутых выше, другие аминокислоты активного центра hOGG1 также участвуют в узнавании 8-охоG. Остатки Phe319 и Cys253 взаимодействуют с π -системой 8-охоG с двух противоположных сторон, образуя структуру типа «сэндвич».

В качестве модельной ДНК в исследовании использовали 13-звенные синтетические дцДНК, которые несли в 7-м положении одной цепи ohoG, G и AP, которые распознает и может процессировать 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза человека, а в комплементарной цепи - либо C, либо ohoG_Clamp. Таким образом был получен набор 7 комплексов hOgg1 с различными ДНК-дуплексами: ohoG/ohoG_Clamp, ohoG/C, где ohoG находится внутри кармана (активного центра), ohoG/C, где ohoG находится в дуплексе, G/C, G/ohoG_Clamp, AP/C, AP/ohoG_Clamp. Полученные модели использовались для проведения молекулярно-динамического моделирования. Такой подход позволил оценить влияние присутствия ohoG_Clamp на структуру дуплексов и на особенности взаимодействия с ферментом.

Для оценки влияния ohoG_Clamp на стабильность ДНК-дуплексов были записаны кривые плавления растворов дуплексов (2 мкМ) в реакционном буфере hOGG1. Все кривые плавления имели сигмоидную форму, характерную для термической денатурации дуплексов ДНК (Рис. 42). В используемых условиях замена C напротив ohoG на ohoG_Clamp снижает температуру плавления дуплекса на 13 °С

(48 °C против 35 °C), что говорит о значительной дестабилизации дуплекса за счет этой точечной замены.



А

Б

Рисунок 42. Анализ стабильности ДНК дуплексов. А. Кривые плавления ДНК-дуплексов, содержащих модификации, указанные на рисунке. Б. Изменение флуоресценции после добавления к одноцепочечному олигонуклеотиду с oxoG_Clamp (коричневая кривая) комплементарного, G (зеленая кривая) или OxoG (голубая и розовая кривые).

Несмотря на возможность образования пяти водородных связей, эта объемная группировка на месте азотистого основания не оказывает стабилизирующего воздействия на ДНК-дуплекс. По-видимому, более серьезным оказывается стерический эффект и невозможность для соседних с повреждением оснований сформировать стекинг-взаимодействия из-за пространственных возмущений. Противоположный эффект был описан в работе [197], где авторам не удалось выявить значительного различия в температурах плавления при введении oxoG_Clamp в ДНК-дуплексы. Такое расхождение в полученных нами данных и показанных ранее для G/G_Clamp – содержащих дуплексов может быть связано как с присутствием дополнительного кислорода у С8 атома гуанина, так и с появлением объемного «хвоста» бензилоксикарбонильной группы, которая мешает правильной координации соседних азотистых оснований для стекинг-взаимодействия. В случае дуплекса, содержащего AP-сайт, мы практически не наблюдали изменений в температурах

плавления, которые составили 24 °С и 21 °С для С- и охoG_Clamp – содержащих дуплексов, соответственно. Это также подтверждает гипотезу о пространственных затруднениях, которые вносит объемный аналог азотистого основания: в случае AP-дуплексов, дополнительное пространство напротив охoG_Clamp, возникающее из-за отсутствия азотистого основания, дает возможности для «упаковывания» охoG_Clamp в структуре олигонуклеотида.

При изучении флуоресцентных свойств дуплексов, было показано, что добавление эквимольного количества цепи, содержащей 8-оксогуанозин, к 10 мкМ раствору цепи, содержащей охoG_Clamp, приводит к снижению флуоресцентного сигнала от охoG_Clamp примерно на 20 % (Рис. 42Б). В то же время, добавление избытка охoG-содержащей цепи в раствор не приводит к дальнейшему уменьшению флуоресценции. Наблюдаемое тушение флуоресценции было меньше, чем описанное в работе [197], где были проведены эксперименты по титрованию свободных нуклеозидов, содержащих TBDMS защитные группы у 3'-О и 5'-О' атомов, что можно объяснить тем, что охoG_Clamp в составе олигонуклеотида приобретает дополнительные стерические ограничения для максимального сближения с охoG, необходимого для эффективного тушения флуоресценции. Также на интенсивность тушения флуоресценции, по-видимому, значительно влияет состав буфера, в частности, ионная сила раствора и присутствие ионов Mg^{2+} . Этим можно объяснить расхождение полученных данных с описанными в экспериментальной в работе [197], где для охoG_Clamp, введенном в 16-звенный монопуриновый нуклеотид было показано тушение флуоресценции до 25 % от исходной при добавлении комплементарной цепи с охoG и до 80 % от исходной при добавлении G-содержащей комплементарной цепи. Добавление к исходному раствору охoG_clamp-цепи, цепи, содержащей нормальный гуанозин, в наших условиях не приводит к снижению флуоресценции охoG-Clamp (Рис. 42Б). Избирательное тушение охoG_Clamp флуоресценции при ассоциации с охoG_Clamp делает нашу систему и условия буфера удобными для детекции

состояния, в котором 8-охоG в составе дуплекса взаимодействует с аналогом основания напротив повреждения или вывернут из ДНК-цепи.

Мы предполагали, что специфическое тушение флуоресценции oxoG_Clamp при взаимодействии с 8-охоG позволит нам зарегистрировать ключевой момент выворачивание поврежденного основания в активный центр фермента. Выведение поврежденного основания из стекинга и структуры ДНК-спирали должно «освободить» oxoG_Clamp и вызвать рост флуоресцентного сигнала. Выворачивание оксогуанина это ключевой и один из начальных этапов ферментативного процесса, происходящий в миллисекундном временном диапазоне, как было показано в нашей группе ранее.

Эксперименты проводили в условиях однооборотной реакции, изменения флуоресценции детектировали методом «остановленной струи». Удивительным образом, нами было зарегистрировано лишь небольшое снижение интенсивности флуоресценции сигнала на временах до 1 секунды (Рис. 43А).

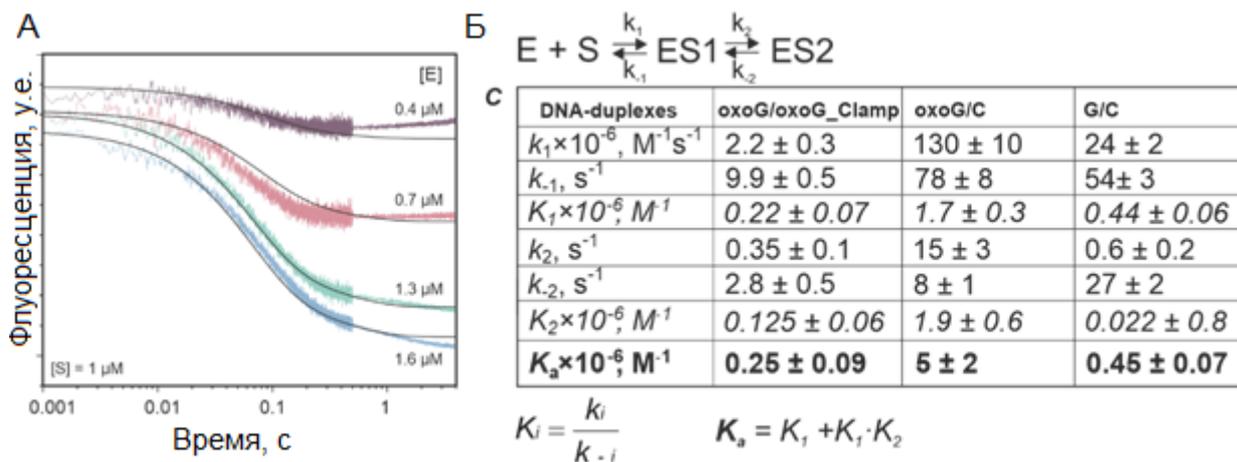


Рисунок 43. Кинетические кривые (А), предполагаемый механизм образования продукта и константы скорости (Б) для hOGG1 (1 мкМ) с дуплексом oxoG/oxoG_clamp (0.4–1.6 мкМ)

Полученные кривые хорошо подходили под двухстадийный кинетический механизм, описываемый двумя обратимыми стадиями (Рис. 43Б), были определены константы

скоростей элементарных стадий фермент-субстратного связывания. Сравнение кинетических параметров с данными, которые были получены нами ранее для фермента с дуплексами, содержащими С в комплементарной цепи (Рис. 43Б) [121] обнаруживает, что взаимодействие hOGG1 с oхoG/оxоG_Clamp дуплексом более соответствует особенностям взаимодействия hOGG1 с неспецифическим G/C дуплексом. Константы связывания K_a равны $(0,25 \pm 0,09) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ и $(0,45 \pm 0,07) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ для oхoG/оxоG_Clamp и G/C дуплекса соответственно. При том, что константа связывания hOGG1 с oхoG/C дуплексом $(5 \pm 2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ выше как минимум на порядок. Соотношение констант скоростей прямых и обратных элементарных стадий (Рис.43Б, K_1, K_2) также коррелируют для oхoG/оxоG_Clamp и G/C дуплексов, и на 1-2 порядка меньше соответствующих для специфического oхoG/C субстрата. Таким образом не было зарегистрировано признаков выворачивания 8-оксогуанина из цепи ДНК ни по характеру изменения сигнала, ни по кинетическим параметрам процесса. Небольшое снижение интенсивности флуоресцентного сигнала oхoG-Clamp можно объяснить либо сменой микроокружения флуорофора - изменением гидрофобности и полярности среды, что может влиять на квантовый выход флуоресценции, либо происходящим при связывании ДНК ферментом дополнительным сближением 8-оксогуанина и феноксазина в дуплексе, что увеличивает эффективность тушения флуоресценции.

Скорость образования продуктов реакции hOGG1 с oхoG/C и oхoG/оxоG_clamp в условиях однооборотной реакции анализировали после разделения в ПААГ. Инкубирование hOGG1 с AP/оxоG_Clamp дуплексом в течение 3 часов не привело к образованию продукта реакции, содержащего разрыв в цепи ДНК. В случае oхoG/оxоG_Clamp дуплекса не было зарегистрировано образования продуктов как N-гликозилазной, так и AP-лиазной реакции во всем наблюдаемом временном диапазоне (Рис. 44, 120 мин).

Для того, чтобы выявить структурные особенности, ведущие к потере ферментом hOGG1 и узнавать окисленное основание и разрезать сахарофосфатный остов при встрече с oхoG_Clamp, было проведено молекулярное моделирование. В качестве стартовой структуры использовали кристаллическую структуру комплекса hOGG1 с

олигонуклеотидным дуплексом [161].

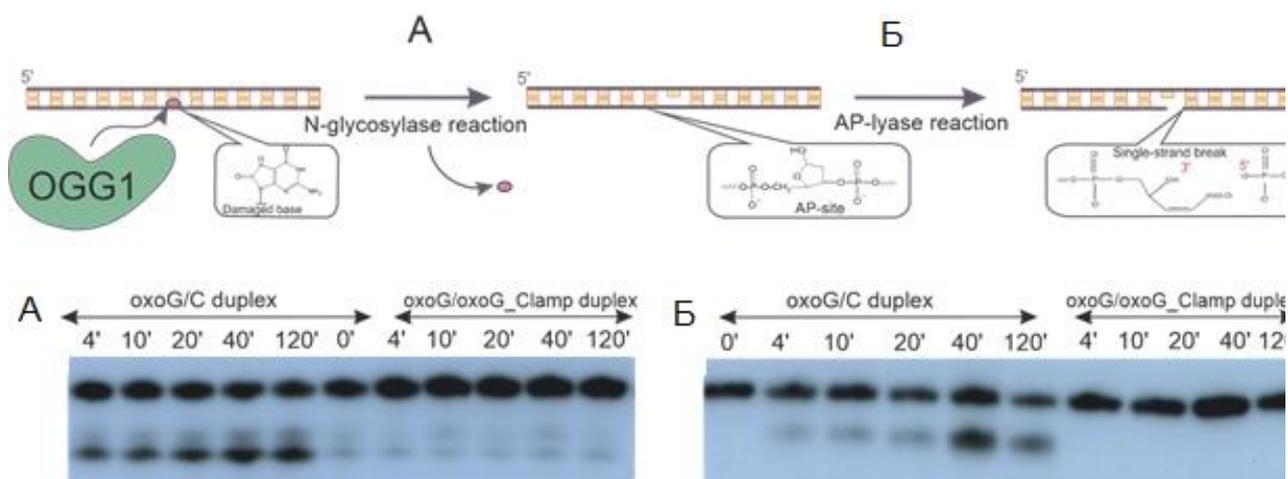


Рисунок 44. Обобщенная схема расщепления ДНК, катализируемая hOGG1 с наглядным представлением скорости накопления продуктов N-гликозилазной (А) и AP-лиазной (Б) реакций в дуплексах охoG/C или охoG/охoG_Clamp.

В исходной структуре Gln249 был заменён на Lys в соответствии с аминокислотной последовательностью дикого типа. Анализ методом МД комплекса hOGG1 с дуплексом охoG/охoG_clamp показал стабильность как белка, так и ДНК. Рис. 45 демонстрирует образовавшиеся водородные связи, которые остаются стабильными в течение 100 нс по данным RMSD.

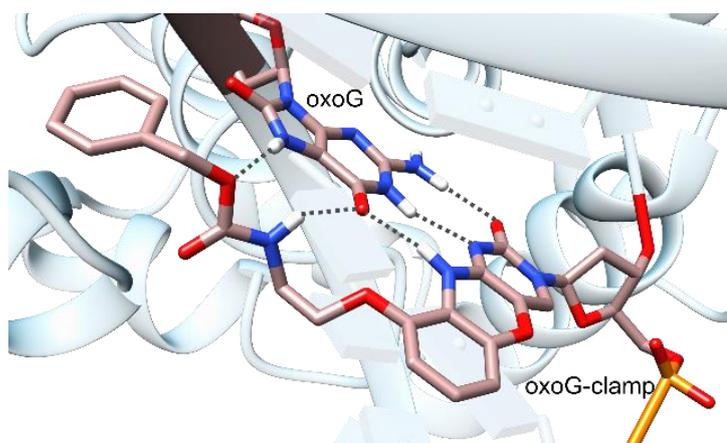


Рисунок 45. Образование водородных связей между охoG и охoG_Clamp.

В этом случае активный центр фермента остается незанятым (Рис. 46). Аминокислотные остатки Asn149, Arg154, Arg204 и Tyr203 координируют oxoG_Clamp, но со временем, дуплекс немного отдаляется и oxoG_Clamp перестает быть координированным. Поскольку известно, что взаимодействие Lys249 с oxoG очень важно, мы проанализировали расстоянием между N атомом бокового радикала Lys и C1' в oxoG. Расстояние между этими атомами $\sim 8 \text{ \AA}$ (Рис. 47).

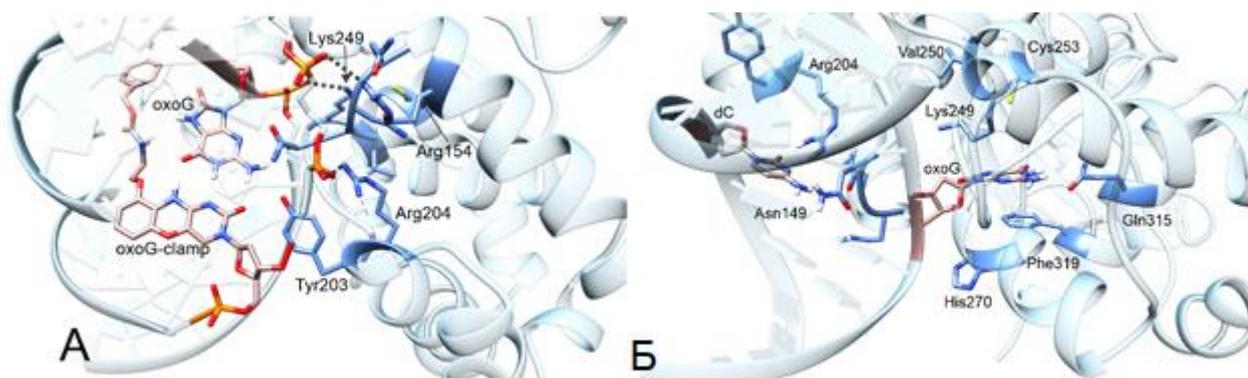


Рисунок 46. (А) Комплекс oxoG с oxoG_Clamp в окружении аминокислотных остатков, тогда как активный центр фермента остается незанятым. (Б). oxoG в окружении аминокислотных остатков в активном центре hOGG1.

Таким образом, моделирование по методу МД показало, что для рассматриваемого комплекса ферментативный процесс невозможен из-за сохранения пары oxoG/oxoG_clamp.

Помимо этого, мы также рассмотрели модели комплексов, в которых oxoG находился напротив C в противоположной цепи дуплекса, и комплексов, в которых ДНК-субстрат был готов вступить в реакцию, а oxoG располагался в активном центре OGG1.

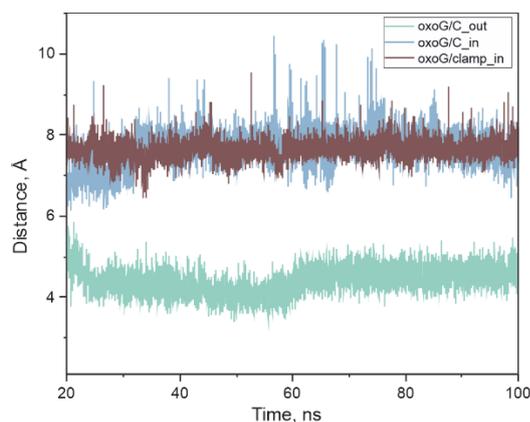


Рисунок 47. Расстояние между между N атомом бокового радикала Lys hOGG1 и C1' oxoG в составе комплексов с дуплексами ДНК, содержащими oxoG_Clamp напротив повреждения (коричневая кривая), или содержащим C напротив повреждения, в котором oxoG находится в стэкинге (голубая кривая), или вышедшее из активного сайта фермента (зеленая кривая).

Так, в модели, где 8-охоG находился во взаимодействии с цитозином, белок немного более стабилен; значения RMSD в основном колеблются в районе 2 Å. Следует отметить, что пары oxoG/C в дуплексе нестабильны, и 8-оксогуанин со временем немного выворачивается из дуплекса, но не попадает в активный центр фермента. Расстояние между атомом N Lys-249 и C1' oxoG на протяжении МД, как и в случае комплекса с oxoG/охоG-Clamp сохраняется около 8 Å (Рис. 47).

В случае комплекса, где oxoG находится в активном центре расстояние между N Lys-249 и C1' oxoG в среднем равно 4.5 Å (Рис. 47, Рис. 46Б). Аминокислота Phe-319 находится в стэкинге с 8-охоG, аминокислота Asn-151 генерирует водородную связь с кислородом фосфатной группы, расположенным между 8-охоG и цитозином в положении -1. Lys-249 образует водородную связь с атомом кислорода при фосфатной группе, локализованной между 8-охоG и цитозином в положении +1.

Аминокислоты Arg154 и Arg204 координируют находящийся против цитозина остаток 8-оксогуанина: атомы азота (амино- и иминогруппы) образуют водородные связи с атомом N3 и атомом кислорода цитозина; атом кислорода Asn149 образует водородные связи с аминогруппой; атом кислорода Asn149 образует водородные связи с аминогруппой цитозина. Asn150 в данной работе координирован с Arg154.

Структура гетероциклических оснований 8-охоG и G отличается только по двум положениям: атом C8 связан с атомами O или H и N7 содержит атом H или неподелённую пару электронов, соответственно. По этой причине атом H при атоме N7 в 8-охоG имеет возможность образовывать водородную связь с карбонилем основной цепи остатка Gly42, тогда как у G такой возможности нет. Остаток охоG-Clamp взаимодействует с карбонильным атомом кислорода в 8-ом положении 8-охоG и препятствует выворачиванию поврежденного основания 8-охоG в карман активного центра фермента hOGG1.

Таким образом, введение метки охоG_Clamp может быть удобно и целесообразно для флуоресцентной детекции оксогуанозина в ДНК. Полученные нами результаты еще раз подчеркивают критическую важность контактов аминокислотных остатков активного сайта не только с поврежденным, но и с противоположным основанием. В число аминокислотных остатков, которые обеспечивают различие охоG и G и участвуют в связывании с окисленным основанием и противоположным основанием в кармане узнавания, входят Gly42, Tyr203, Asn149, Arg154, Arg204, Phe319, Asn151. Противоположное повреждению основание оказывает большое влияние на начальные этапы сборки фермент-субстратного комплекса.

3.2. Структурная динамика узнавания субстратов апуриновой/апириимидиновой эндонуклеазой человека APE1³

Сайты, не содержащие гетероциклического основания (AP- сайты), образующиеся путем гидролиза N-гликозидных связей являются широко распространенным повреждением клеточной ДНК, составляя 50 000 – 200 000 AP-сайтов на клетку [214]. Уже показано, что распределение AP-сайтов в геноме млекопитающих имеет неслучайный характер и характеризуется динамическим обогащением в определенных местах генома, включая однонуклеотидные "горячие точки", и существенно зависит от экспрессии генов, возраста и типа ткани в частности [215, 216]. В отсутствие репарации AP-сайты чрезвычайно мутагенны и токсичны для клетки. В организме человека за исправление таких повреждений отвечает система

³ В настоящей главе использованы материалы, опубликованные в работах [13], [15], [17-18], [20-21] из списка на стр. 215 – 218.

«эксцизионной репарации оснований» BER, которая защищает клетки от одноцепочечных повреждений. Осуществление указанного механизма обеспечивается целым комплексом ферментов, среди которых важное место занимают AP-нуклеазы. Среди AP-нуклеаз в клетках млекопитающих преобладает AP-эндонуклеаза-1 (APE1, HAP1 или Ref1), принадлежащая к EhoIII семейству. На неё приходится 95% эндонуклеазной активности в экстрактах клеток человека. Молекулярно-биологические, биохимические и структурные исследования механизмов узнавания AP-сайтов в ДНК сконцентрированы, главным образом, на ферменте человека APE1 и его бактериальном гомологе EhoIII [217–219]. APE1 разрезает сахарофосфатный остов ДНК на 3'-конце AP-сайта с образованием 3'-гидроксильной и 5'-фосфатной концевых групп. После этого, благодаря работе ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы, синтезируется “заплатка”, которая полностью замещает поврежденный фрагмент. От уровня активности фермента APE1 у млекопитающих зависит способность клетки противостоять окислительному стрессу и, как следствие, злокачественному перерождению [220]. Все больше накапливается подтверждений того, что APE1 можно рассматривать как терапевтическую мишень при терапии онкологических и нейродегенеративных заболеваний [221–230]. Кроме того, гиперэкспрессия hAPE1 в клетках некоторых видов опухолей защищает их от цитотоксического воздействия лекарственных препаратов [231], снижая их терапевтическое действие и вызывая лекарственную устойчивость [232]. Поэтому, фармакологическое ингибирование APE1 может усилить чувствительность опухоли к ДНК-повреждающим агентам [233, 234]. Выяснение механизма разрезания поврежденной ДНК этим белком, необходимо для разработки методов оценки уровня ферментативной активности AP-эндонуклеазы в клетках, а также для направленного регулирования его активности.

Помимо репарации BER, для APE1 показана активность в процессе NIR - инцизионной репарации нуклеотидов. Сам процесс NIR пока продемонстрирован для ограниченного числа субстратов. Гидролиз фосфодиэфирной связи ферментом APE1 ДНК-субстрата в этом случае происходит по кислотнo-основному механизму S_N2(P) с 5'-стороны от требующего коррекции нуклеотида и с образованием гидроксила на 3'-конце бреши и фосфата на 5'-конце. Если говорить об условиях эффективности

протекания реакции расщепления, то для этого максимально подходят условия, выявленные для 3'-5'-экзонуклеазной активности [235]. Ключевое значение для расщепления ДНК в процессе NIR имеют ионы Mg^{2+} , но их концентрация будет достаточной даже при стократном уменьшении относительно необходимой для эндонуклеазной активности. В формировании активного комплекса с субстратом участвуют два иона Mg^{2+} [236]. Регистрация структурной динамики узнавания субстратов апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазой человека Ape1 входила в задачи исследования.

3.2.1. Получение предстационарных кинетических характеристик для взаимодействия APE1 с AP- и F-содержащими субстратами

Кинетику конверсии AP- и F-содержащих ДНК-субстратов под действием ARE1 и их взаимодействие с ДНК-дуплексами без повреждения оснований (NS-лиганд) изучали методом «остановленного потока» в условиях однократной реакции по изменению флуоресценции остатков Tgr по сравнению с неповрежденными, неспецифическими субстратами (NS-лиганд). Кинетические кривые интенсивности флуоресценции Tgr представлены на Рис. 48. Для субстрата AP (Рис. 48А) выделяются четыре перехода: снижение флуоресценции, участок, близкий к линейному, увеличение флуоресценции и выход на плато (линейный участок). Характер кривых имеет сходство с кривыми кинетики взаимодействия Frg с субстратом AP (Рис. 28Б), однако динамика реакций значительно отличается в соответствии со специфичностью субстратов. На ранних временах снижение флуоресценции Tgr APE1 (1–5 мс) соответствует начальному взаимодействию фермент-субстрат, с узнаванием специфического повреждения и переходом далее (5 мс - 0,04 с) в каталитически-компетентное состояние. На следующей стадии реакции (0,2–1 с), где сигнал флуоресценции возрастает, субстрат процессируется до продукта. Линейный участок соответствует финальной фазе реакции (1–5 с), когда продукт диссоциирует из комплекса с ферментом.

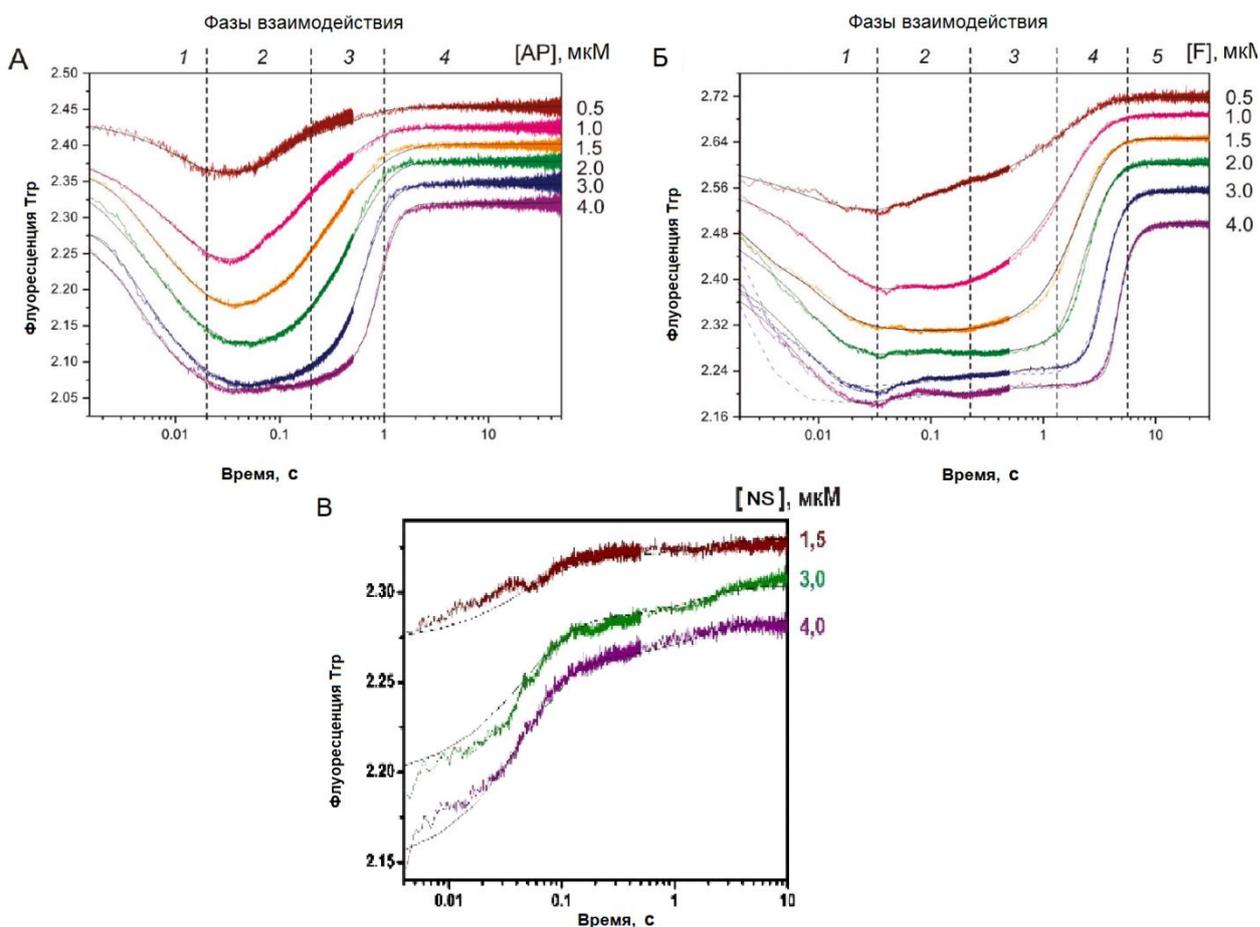
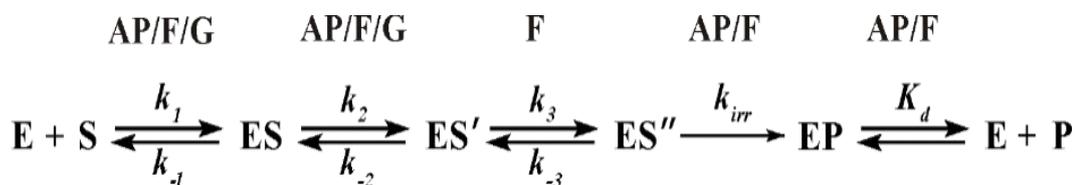


Рисунок 48. Кинетика взаимодействия природной формы APE1 с различными субстратами. (A) - AP-субстрат, (Б) - F-субстрат и (В) – ДНК дуплекс без повреждений (NS-лиганд). Данные изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp фермента (1,5 мкМ) при взаимодействии с субстратами (0,5 – 4,0 мкМ).

При анализе кривых взаимодействия с F-субстратом (Рис. 48Б) можно видеть два характерных отличия по сравнению с AP-субстратом. Во-первых, различается продолжительность стадии 3, а во-вторых, после стадии 3 можно выделить дополнительную стадию 4. Таким образом, конформационные изменения при взаимодействии с химически стабильным субстратом F происходят медленнее. Дополнительная фаза возрастания флуоресцентного сигнала в случае F-субстрата наблюдалась в интервале 0,03–0,2 с, что соответствует одной из стадий изомеризации фермент-субстратного комплекса на пути к каталитически активному состоянию. С учетом дополнительной стадии, обобщенный механизм, описывающий превращение

AP- и F- ДНК-субстратов в продукт ферментом APE1 включает как минимум пять стадий, и их можно описать следующими превращениями (Схема 4).

Схема 4. Молекулярно-кинетический механизм реакции, катализируемой природной формой белка APE1 при взаимодействии с субстратами AP, F и NS-лигандом. E – фермент, S – субстрат, ES, ES', ES'' – промежуточные фермент-субстратные комплексы, EP – комплекс фермента с продуктом, P – продукт реакции, k_i , k_{-i} – константы скорости промежуточных стадий, K_d – равновесная константа диссоциации комплекса фермента с продуктом.



Начальные взаимодействия фермента с субстратом (Стадии 1-3, константы k_1 , k_2 и k_3) и конформационные превращения в структуре и субстрата, и фермента, ведут к переходу в каталитически активную структуру ES''. Стадия 4, на которой происходит образование продукта, является необратимой (k_{irr}), поскольку соответствует гидролизу фосфодиэфирной связи в ДНК с образованием комплекса EP, после чего фермент диссоциирует из комплекса с продуктом. В программном пакете DynaFit были рассчитаны константы скорости реакций Схемы 4.

Наибольшие различия в форме кинетических кривых взаимодействия APE1 с ДНК были отмечены в реакции с неповрежденной ДНК (NS-лиганд). Эти взаимодействия соответствуют двум первым обратимым стадиям Схемы 4. На ранних временах (до 0,1 с) происходит рост интенсивности флуоресценции (Рис. 48В), тогда как в случае специфических субстратов наблюдается падение интенсивности флуоресценции (Рис. 48 А,Б). Рассчитанная величина константы равновесия K_a для AP-содержащей ДНК почти на 3 порядка выше, чем для неспецифического лиганда NS (Таблица 5). Можно заключить, что изменения структуры APE1 при взаимодействии с неповрежденной ДНК не достаточны для перехода в каталитически активное состояние. Последующая стадия реакции необратима вследствие того, что происходит расщепление субстрата с образованием комплекса EP. На завершающей стадии – комплекс диссоциирует.

Значения констант скорости образования и распада промежуточных интермедиатов представлены в Таблице 5 (на основании Схемы 2).

Таблица 5. Константы скорости и равновесия элементарных стадий процессов, соответствующих Схеме 2 и описывающих взаимодействия APE1 с ДНК-субстратами.

| Константы | ДНК-субстраты | | |
|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| | AP-субстрат | F-субстрат | NS-лиганд |
| $k_1, \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$ | $(8,9 \pm 0,5) \times 10^7$ | $(2,0 \pm 0,1) \times 10^8$ | $(7,4 \pm 0,5) \times 10^5$ |
| k_{-1}, c^{-1} | $6,0 \pm 0,7$ | $14,6 \pm 0,2$ | $17,4 \pm 0,6$ |
| k_2, c^{-1} | $3,2 \pm 0,1$ | $5,6 \pm 0,2$ | $0,17 \pm 0,01$ |
| k_{-2}, c^{-1} | $1,8 \pm 0,1$ | $28,6 \pm 0,3$ | $0,76 \pm 0,02$ |
| k_3, c^{-1} | | $6,6 \pm 0,3$ | |
| k_{-3}, c^{-1} | | $0,15 \pm 0,01$ | |
| k_{irr}, c^{-1} | $3,2 \pm 0,1$ | $2,1 \pm 0,1$ | |
| K_d, M | $(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-6}$ | $(5,5 \pm 0,2) \times 10^{-6}$ | |
| K_a, M^{-1} | $(4,1 \pm 0,2) \times 10^7$ | $(1,3 \pm 0,1) \times 10^8$ | $(5,2 \pm 0,2) \times 10^4$ |

Сравнение значений константы ассоциации K_a , отражающей сродство фермента к субстрату, которые составили $(4,1 \pm 0,2) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ и $(1,3 \pm 0,1) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ для AP- и F-субстратов, свидетельствует о том, что оба комплекса с ферментом стабильны и сродство APE1 к обоим типам повреждения достаточно высоко. Анализ величин констант скорости образования продукта в комплексе с ферментом, отражающих скорость разрыва фосфодиэфирной связи (k_{irr}) показал, что для химически стабильного F-субстрата это значение было ниже. Наиболее вероятное объяснение таких различий заключается в наличии дополнительной стадии конформационного перехода $ES' \leftrightarrow ES''$ в случае субстрата F, описываемого константами k_3 и k_{-3} . Уже было показано ранее [240], что на предкаталитических стадиях образования комплекса APE1 с AP-субстратами, положительно заряженные поверхности специфических петель фермента внедряются между основаниями, находящимися в стэкинге, изгибают и перекручивают ДНК. Такое локальное изменение структуры спирали ДНК способствует “выворачиванию” AP-сайта и позиционированию в гидрофобной полости активного центра. Неповрежденные основания, соседние с AP-сайтом, таким образом оказываются дистанцированы, а весь комплекс становится каталитически активным. Для каталитического расщепления субстрата F критически

важен дополнительный конформационный переход фермента, представляющий собой тонкую стерическую адаптацию боковых радикалов аминокислот, формирующих гидрофобную полость, к F-аналогу AP-сайта. Конформация белка APE1 в свободном состоянии отличается от его конформации при взаимодействии со специфическими субстратами или неповрежденной ДНК и определяет высокую селективность фермента к AP-сайтам.

3.2.2. Регистрация конформационной динамики AP- и F-содержащих ДНК-субстратов в комплексе с APE1

Для анализа динамики поведения AP и F-содержащих субстратов при взаимодействии с APE1 использовали дуплексы ДНК, в которых одна из цепей содержала флуоресцентный аналог аденозина 2-aPu. Поскольку положение 2-aPu относительно повреждения могло влиять на параметры взаимодействия с ферментом, были проанализированы два варианта дуплексов с 2-аминопурином, локализованным с 5'-стороны относительно AP/F - ((2-aPu)AP/F), либо с 3'-стороны (AP/F (2-aPu)) (Таблица 1). Использование таких субстратов позволяет судить об изменении конформации ДНК при взаимодействии с ферментом по изменению флуоресценции 2-aPu, на основании того, что увеличение флуоресценции отражает переход 2-aPu из гидрофобного окружения в гидрофильное. Изменения интенсивности флуоресценции 2-aPu при взаимодействии с APE1 проводили в условиях однооборотной реакции (Рис. 49 А-Г). Анализ изменения флуоресценции 2-aPu в составе субстратов показал, что положение 2-aPu относительно повреждения влияло на характер регистрируемых кривых флуоресценции и на скорость протекания процессов, причем это различие было сильнее выражено для AP субстратов. Увеличение интенсивности флуоресценции соответствует выходу продуктов реакции – расщепленных фрагментов олигонуклеотидов, из комплекса с ферментом APE1. Для субстрата AP можно выделить три стадии конформационных изменений: образование комплекса, процессинг субстрата и выход продукта из комплекса. Результаты анализа разделения продуктов реакции в ПААГ (экспериментальные точки отмечены кругами (○) на Рис. 49Г) продемонстрировали соответствие динамики накопления продуктов ходу изменения флуоресценции субстрата (2-aPu)AP.

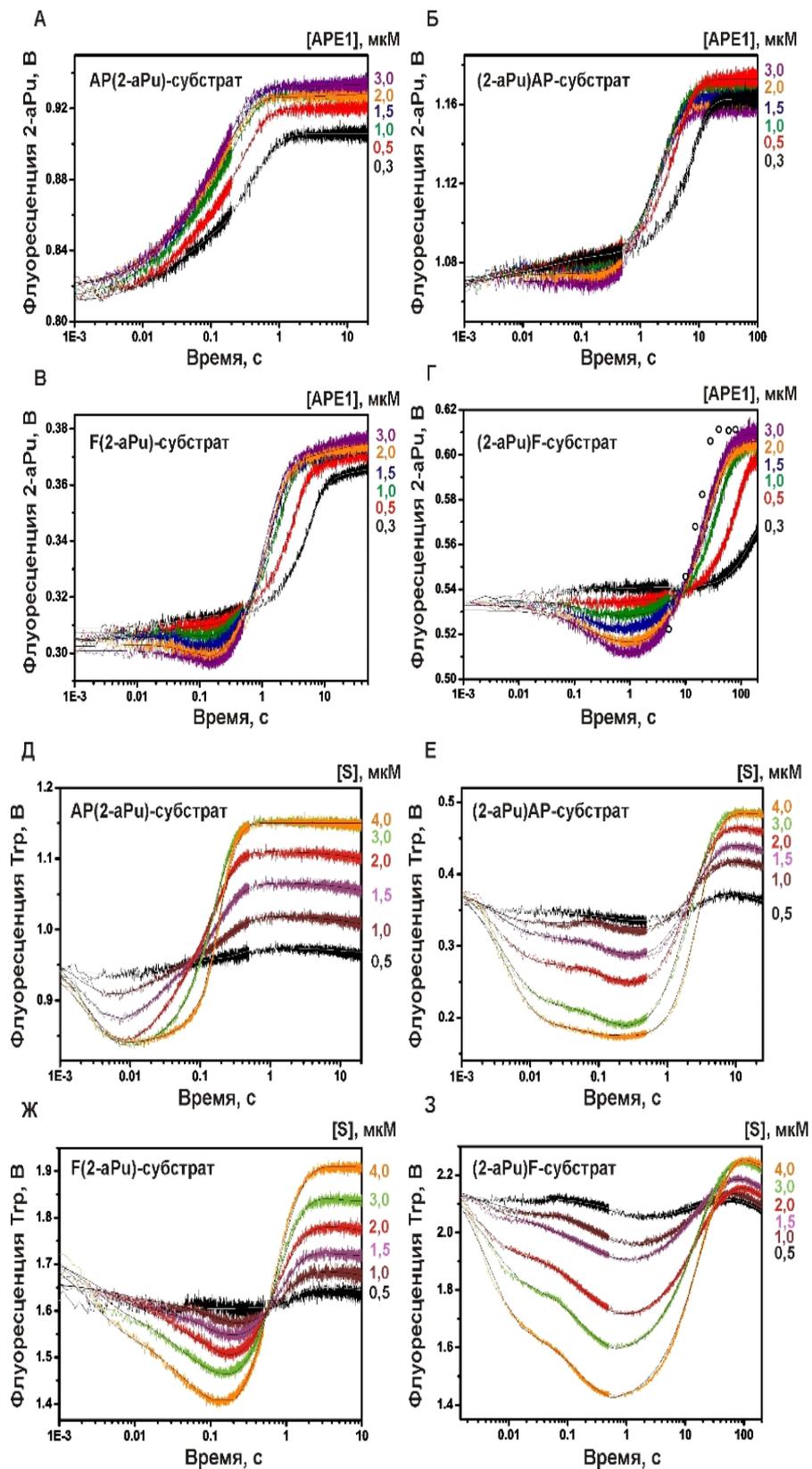


Рисунок 49. Взаимодействие APE1^{N212D} с AP- и F-субстратами. Конформационные переходы в молекулах фермента и ДНК-субстратов регистрировали по изменению интенсивности флуоресценции остатков 2-аминопурина (А-Г) и триптофана (Д-З) и.

Субстраты и их концентрации указаны на рисунках. Обозначения (○) на панели Г соответствуют степени накопления (%) продуктов в реакции с (2-APu) субстратом по данным разделения в геле.

Сравнение кривых флуоресценции для субстратов AP и F выявило фазу снижения флуоресценции субстратов F, которая отсутствовала при реакции с AP субстратами (Рис. 49 В, Г). Наиболее вероятно эта стадия (времена до 1 с) соответствует изменению конформации субстрата F, ведущей не только к попаданию поврежденного основания в активный центр APE1 с принятием комплексом каталитически компетентной структуры, но и локализации 2-aPu в более гидрофобном окружении. В то же время, аналогично взаимодействию с субстратами AP, происходит замедление выхода продукта для варианта, когда 2-aPu находится с 5'-стороны от поврежденного сайта.

Для всех используемых субстратов были рассчитаны значения прямых и обратных констант скорости (Таблица 6). Можно видеть, что 5'-расположение 2-aPu относительно повреждения вело к снижению значения константы ассоциации K_a относительно комплексов с субстратами, где 2-aPu находится с 3'-стороны от повреждения. Судя по значениям K_a для комплексов с аналогичным положением 2-aPu, стабильность комплексов с APE1 для субстратов AP была выше, чем для субстратов F. Значение константы скорости стадии гидролиза фосфодиэфирной связи k_{irr} было максимальным для AP(2-aPu)-субстрата. Скорость превращения специфических субстратов под действием APE1 увеличивается в ряду:



Для подтверждения обнаруженных эффектов, для всех образцов также регистрировали изменение флуоресценции T_{gr} фермента (Рис. 49 Д-З). С учетом данных электрофоретического разделения продуктов реакции можно говорить о том, что позиция 2-aPu существенно влияет как минимум на две первые стадии взаимодействия фермента с субстратом, а сам фермент обладает большим сродством к субстратам AP/F (2-aPu).

Таблица 6. Влияние положения остатков 2-аPu в ДНК-субстратах на скорость конформационных переходов в субстратах при взаимодействии с природной формой APE1. Представлены константы скорости отдельных стадий, полученные с учетом регистрации флуоресценции остатков 2-аPu или Trp фермента в реакции.

| Константа | Величина | | | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | определена по флуоресценции 2-аPu | | | | определена по флуоресценции Trp | | | |
| | AP(2-аPu) | (2-аPu)AP | F(2-аPu) | (2-аPu)F | AP(2-аPu) | (2-аPu)AP | F(2-аPu) | (2-аPu)F |
| $k_1, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$ | $4,8 \times 10^7$ | $2,6 \times 10^6$ | $1,9 \times 10^7$ | $3,5 \times 10^6$ | $2,1 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^7$ | $1,2 \times 10^7$ | $1,9 \times 10^7$ |
| k_{-1}, c^{-1} | 3,1 | 7,0 | 38 | 11 | 54 | 61 | 47 | 77 |
| k_2, c^{-1} | | | 7,5 | 1,3 | | 9,3 | 12 | 13 |
| k_{-2}, c^{-1} | | | 2,1 | 0,56 | | 1,1 | 0,71 | 1,9 |
| k_{irr}, c^{-1} | 7,1 | 0,50 | 1,5 | 0,08 | 5,7 | 0,37 | 2,8 | 0,08 |
| K_d, M | $2,0 \times 10^{-7}$ | $1,9 \times 10^{-6}$ | $1,1 \times 10^{-6}$ | $3,8 \times 10^{-6}$ | $1,0 \times 10^{-6}$ | $4,2 \times 10^{-6}$ | $7,5 \times 10^{-7}$ | $4,1 \times 10^{-6}$ |
| K_a, M^{-1} | $1,6 \times 10^7$ | $3,7 \times 10^6$ | $2,2 \times 10^6$ | $1,1 \times 10^6$ | $3,8 \times 10^6$ | $1,5 \times 10^6$ | $4,6 \times 10^6$ | $1,9 \times 10^6$ |

Можно заключить, что для ДНК-субстрата при взаимодействии с APE1 характерны тонкие структурные изменения с индивидуальными особенностями для различных специфических субстратов. Тот факт, что дополнительная дестабилизация структуры ДНК присутствием 2-аPu влияет, но не препятствует проявлению каталитической активности APE1, свидетельствует о пластичности ДНК-белковых комплексов и широких возможностях структурной саморегуляции тонких взаимодействий.

3.2.3. Функциональность остатка Asn212 активного центра APE1 в механизме катализа

Замены отдельных аминокислот в активном центре фермента позволяют выявлять наиболее существенные для катализа структурные особенности аминокислотных остатков. Известно, что активный центр APE1 сформирован остатками Asp70, Glu96, Tyr171, Asn174, Asp210, Asn212, и His309. В данном исследовании были получены мутантные формы APE1, в которых Asn212 был заменен на аланин (N212A) либо аспаргат (N212D). Активность ферментов тестировали по образованию продуктов расщепления субстрата, визуализированных разделением в ПААГ. Вариант N212A не обладал каталитической активностью. Поэтому для анализа отдельных стадий взаимодействия со специфическими субстратами использовали форму N212D.

На Рис. 50 А, Б представлены кинетические кривые взаимодействия мутантной формы N212D APE1 с ДНК субстратами с AP- и F сайтами, отражающие изменение флуоресценции Tgr фермента, а на Рис.50 В, С - кривые изменения флуоресценции 2-aPu субстрата в варианте AP/F(2-aPu), где 2-aPu локализуется в 3' положении относительно AP или F сайта. Сравнивая полученные кинетические кривые для N212D и для природной формы APE1 (Рис. 50 А, Б), можно заключить, что формы кривых взаимодействия с соответствующими субстратами природной и мутантной формы APE1 достаточно схожи, особенно для субстрата F. Тем не менее, динамика процессов отличается существенно: образование продукта в случае мутантной формы белка происходит позднее. Вид кривых изменения флуоресценции 2-aPu субстрата для мутантной формы белка (Рис. 50 В, Г) существенно отличался от таковых для природной формы APE1 (Рис. 49 А,В). И в случае детекции флуоресценции Tgr, и в случае 2-aPu, продолжительность одного оборота реакции составляла около 1000 с для формы N212D.

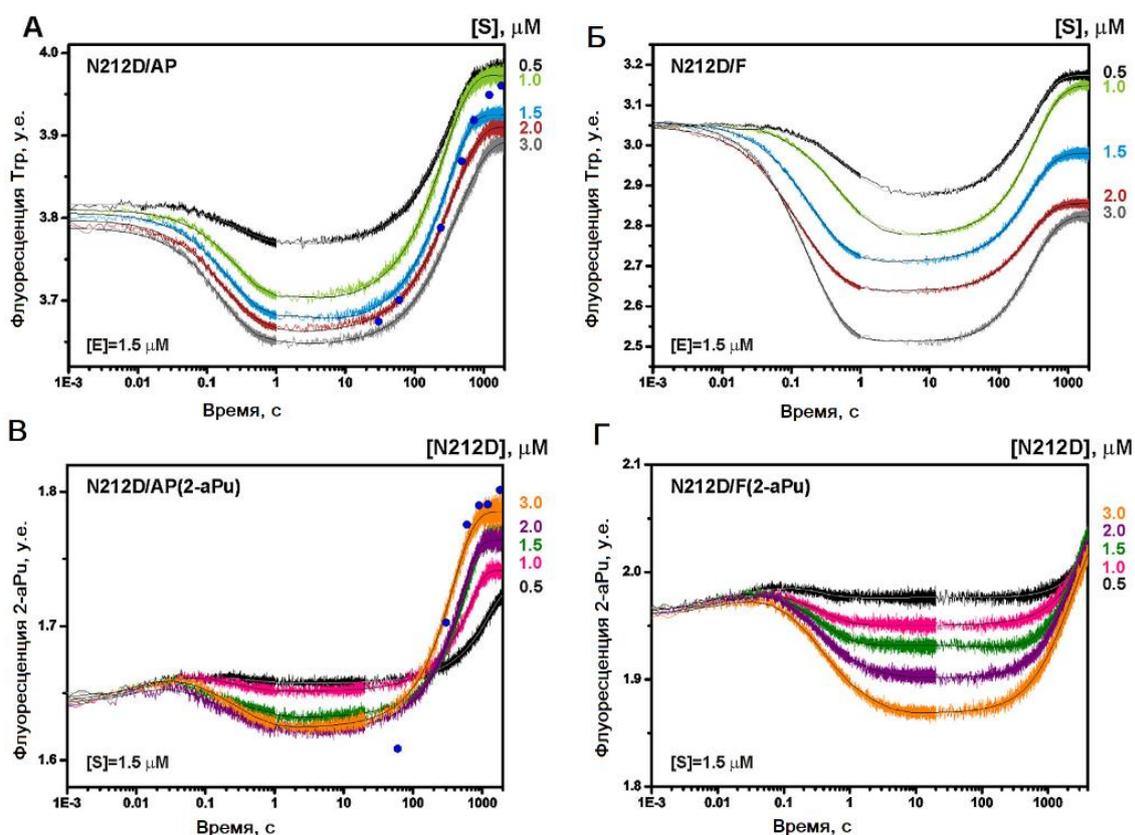
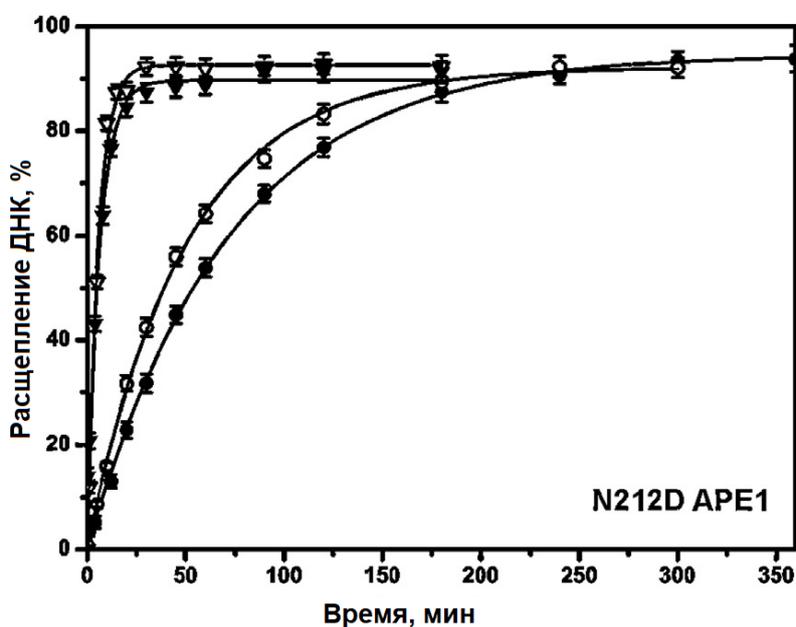


Рисунок 50. Взаимодействие APE1^{N212D} с AP- и F-субстратами. Структурные изменения в молекулах APE1^{N212D} и субстратов детектировали по изменению

интенсивности флуоресценции остатков триптофана (А, Б) и 2-аминопурина (В, Г). Субстраты и их концентрации указаны на рисунках. Обозначения (●) соответствуют степени накопления (%) продуктов реакции по данным разделения в геле.

Рассчитанные кинетические параметры взаимодействия N212D с AP- и F-субстратами и их сравнение с таковыми для фермента APE1 дикого типа (Таблица 7) позволяют заключить, что комплекс мутантной формы N212D с субстратом AP существенно более стабилен, чем для фермента дикого типа ($K_I = 3,0 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ и $1,5 \times 10^7 \text{M}^{-1}$, соответственно), и на порядок менее стабилен, чем комплекс N212D с субстратом F.



AP- (▲), F- (●), AP(2-aPu)- (△) и F(2-aPu)- (○)

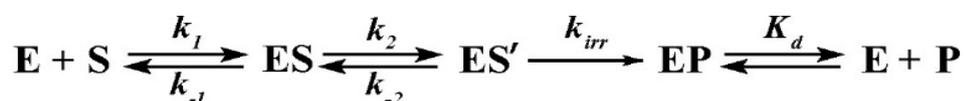
Рис. 51. Кинетика расщепления ^{32}P -меченого ДНК субстрата ферментом APE1 (форма N212D) в условиях однооборотной реакции. Кривые построены по (%) расщепленного субстрата по данным разделения в ПААГ продуктов реакции.

Для того, чтобы измерить скорость расщепления субстрата с помощью независимого подхода, был проведен эксперимент с ^{32}P -мечеными субстратами с последующим анализом продуктов реакции в ПААГ. На рис. 51 представлена кинетика накопления продуктов расщепления при взаимодействии мутантных форм

N212D APE1 с ДНК-субстратами. Сравнение данных “остановленной струи” и эффективности расщепления для субстратов AP и AP(2-aPu) показало, что накопление меченых продуктов перекрывается с фазой роста флуоресценции Tgr и 2-aPu, что соответствует необратимой стадии. В активном центре APE1^{N212D} координация иона Mg²⁺ трансформирована в сравнении с APE1^{wt}. Такие изменения в активном центре препятствуют изомеризации комплекса ES в комплекс ES'.

Количественный анализ кривых позволил предложить для описания взаимодействия субстрата с ферментом Схему 5.

Схема 5. Кинетический механизм для мутантных форм APE1 N212D и N212A, полученный на основе глобального анализа данных изменения флуоресценции методом остановленной струи. E - APE1; S - свободный ДНК-субстрат; ES - бимолекулярный опознающий комплекс; ES' - последующее состояние предкаталитического комплекса APE1-ДНК; EP - комплекс APE1 с продуктом ДНК; P - продукт расщепления субстрата. Константы скорости k_1 и k_2 характеризуют прямую реакцию, тогда как k_{-1} и k_{-2} - константы скорости обратных реакций; k_3 характеризует необратимую химическую стадию реакции; K - равновесная константа диссоциации для комплекса EP.



Константа k_{irr} , характеризующая скорость гидролиза фосфодиэфирной связи, для природной формы фермента APE1 почти на три порядка выше, чем для мутантной формы N212D. Очевидно, мутантный вариант белка все еще может изгибать фосфатную группу субстрата так, чтобы существовала возможна её нуклеофильной атака молекулой H₂O, которую активируют остатки Asp210 и Asp212. И такая возможность продемонстрирована при молекулярном моделировании комплекса APE1^{N212D} с субстратом.

Структурные изменения в мутанте N212D, приводящие к снижению каталитической активности были определены методом МД для фермента в комплексе с субстратом F(2-aPu) при температуре 300 К.

Таблица 7. Влияние аминокислотных замен в APE1 на кинетические параметры взаимодействия N212D APE1 с AP- и F-субстратами.

| | Флуоресценция Tgr | | | Флуоресценция 2-aPu | |
|---------------------|----------------------|-------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| | N212D/AP | N212D/F | wt APE1/AP | N212D/AP | N212D/F |
| $k_1, M^{-1}s^{-1}$ | $2,3 \times 10^6$ | $5,4 \times 10^6$ | $8,9 \times 10^7$ | $2,2 \times 10^7$ | $7,8 \times 10^7$ |
| k_1, s^{-1} | 7,6 | 4,9 | 6,0 | 62 | 61 |
| K_1, M^{-1} | $3,0 \times 10^5$ | $1,1 \times 10^6$ | $1,5 \times 10^7$ | $3,6 \times 10^5$ | $1,3 \times 10^6$ |
| k_2, s^{-1} | 6,7 | 5,0 | 3,2 | 4,8 | 2,3 |
| k_2, c^{-1} | 2,3 | 3,7 | 1,8 | 0,68 | 0,35 |
| K_2 | 2,9 | 1,4 | 1,8 | 7,1 | 6,6 |
| k_3, s^{-1} | 0,0058 | 0,0049 | 3,2 | 0,005 | н/д |
| Kd, M | $1,2 \times 10^{-6}$ | $3,3 \times 10^6$ | $1,0 \times 10^{-6}$ | $2,7 \times 10^{-6}$ | н/д |
| Ka, M^{-1} | $6,8 \times 10^5$ | $1,5 \times 10^6$ | $4,1 \times 10^7$ | $2,5 \times 10^6$ | $8,3 \times 10^7$ |

На Рис. 52А представлен общий вид комплекса wtAPE1-DNA и его увеличенная часть (Рис. 52Б), показывающая локализацию ключевых аминокислот и иона Mg^{2+} в активном центре. Анализ MD-траекторий для мутанта Asn212Asp APE1 показал значительное искажение геометрии активного сайта.

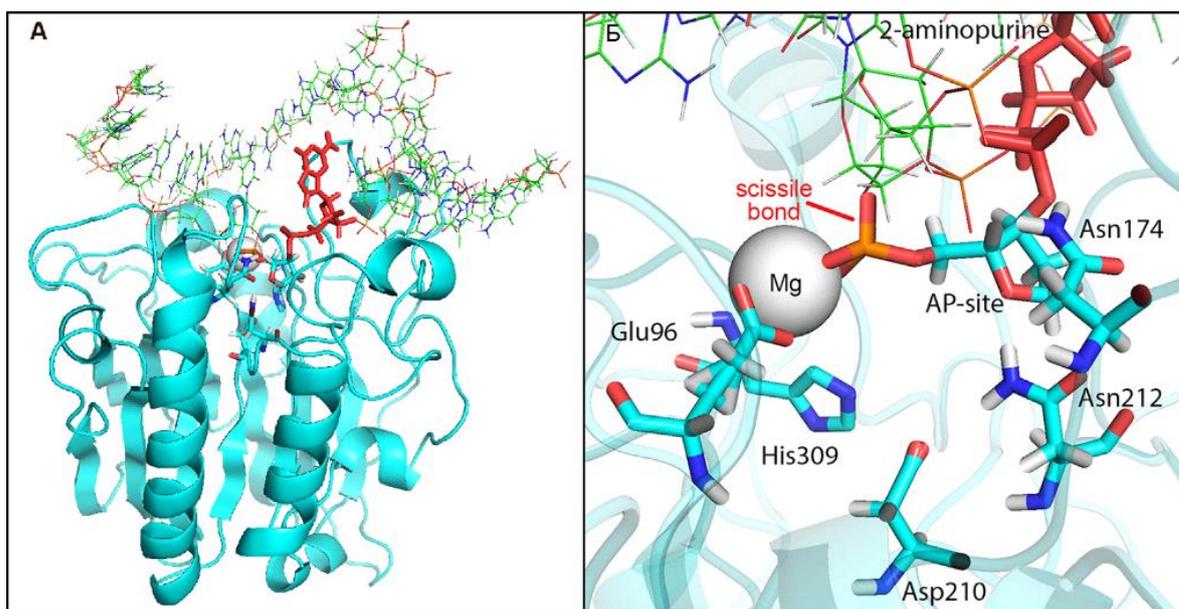


Рисунок 52. (А) Общий вид молекулярного комплекса APE1 с ДНК-дуплексом. Основание 2-aPu показано красными балками; F-сайт показан в виде модели балки, окрашенной в соответствии с типом атомов (голубой - углерод; синий - азот; красный - кислород; коричневый - атомы фосфора). (Б) Локализация остатков активного сайта. Ион Mg^{2+} показан в виде серой сферы СРК, аминокислотные остатки Glu96, Asn174, Asp210, Asn212 и His309, образующие активный сайт, показаны в виде стержней, окрашенных в соответствии с типом атома. Остальная часть белка показана в виде полупрозрачной схематической модели.

На рис. 53Б показано положение F-сайта и ключевых аминокислот в мутанте по сравнению с APE1 дикого типа (Рис. 53А). Координация иона Mg^{2+} в комплексе Asn212Asp APE1 с F-содержащим субстратом была значительно нарушена. Расстояние между координационной карбоксильной группой Glu96 и ионом металла увеличилось на 1,6 Å по сравнению с ее положением в APE1wt. Когда Asn212 заменен на Asp, имидазольное кольцо His309 поворачивается вокруг связи C α -C β , что приводит к увеличению расстояния между атомом N1 и фосфатом ДНК-мишени с 3,8 Å до 9,4 Å.

Таким образом, моделирование методом молекулярной динамики показывает, что сайт-мишень в ДНК-субстрате надежно закреплен в активном сайте APE1wt посредством нековалентных взаимодействий со специфическими аминокислотами и ионом Mg^{2+} , который действует в качестве "зажима" между ферментом и ДНК.

Ранее Yu и Hadi [237] путем биоинформатического анализа SNP мутаций в APE1 показали, что замены N212K и N212H являются крайне тяжелыми для фермента и, по-видимому, нарушают функциональную область в APE1. Исследуя в нашей работе мутантные формы N212D и N212A мы продемонстрировали, что основное различие между структурами этих мутантов заключается в отсутствии нековалентных взаимодействий между Asn-212, Asp-210, целевым 5-фосфатом и каталитической водой в случае N212A. Мы предполагаем, что это различие является причиной сниженной активности мутантных форм эндонуклеазы при разрезании ДНК-субстратов. Этот вывод хорошо согласуется с данными о кристаллических структурах свободного APE1 и его комплексов с продуктом ДНК [238, 239].

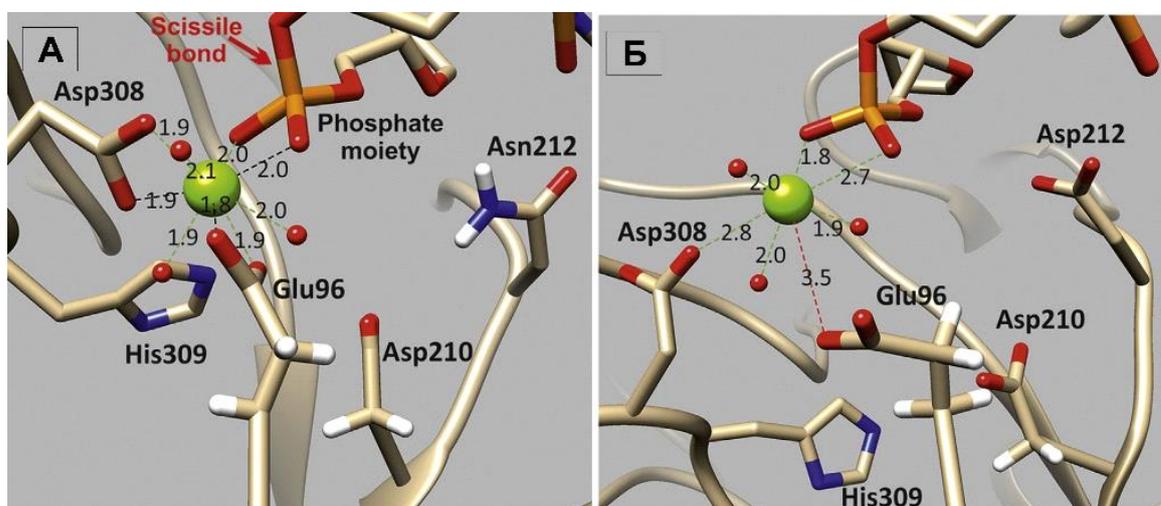


Рисунок 53. Молекулярное моделирование взаимодействия WT APE1 (А) и N212D (Б) с субстратом F(2-aPu). В обеих структурах катион магния (зеленая сфера) координирован двумя карбоксилатами остатков Glu-96 и Asp-308, 5'-фосфатами и тремя молекулами H₂O.

3.2.4. Моделирование методом МД комплекса APE1 с ДНК-дуплексом, содержащим аддукт бенз[а]пирена с гуанином и AP-сайт

Нуклеаза APE1 обладает не только AP-эндонуклеазной активностью, но и 3'→5' экзонуклеазной, 3'-фосфодиэстеразной и 3'-фосфатазной активностями, что делает ее главным координирующим ферментом BER [18]. Продукты метаболизма полициклических ароматических углеводородов, таких как бенз[а]пирен (BP), способны образовывать ковалентные аддукты с ДНК, что обуславливает их выраженные патологические эффекты на уровне клеток и организма. Высокий мутагенный уровень показан для высокоактивного метаболита – 7,8-дигидродиол-9,10-эпоксида (BPDE), который взаимодействует преимущественно с гуанинами с образованием аддукта BP-dG. Отдельные сведения были накоплены по вопросу связывания и узнавания эндонуклеазой APE1 человека ДНК-субстратов, в которых одновременно присутствуют и AP сайт и BP-dG аддукты. Данных о влиянии взаиморасположения указанных повреждений на ДНК на гидролитическую активность фермента APE1 было меньше. Поскольку расположение 2-aPu с разных сторон от AP сайта влияет на кинетику отдельных стадий реакции, интересно было изучить как расположение BPDE-N2-dG относительно AP сайта изменяет локализацию аминокислот в активном центре фермента APE1.

Для того чтобы выяснить, какое влияние на локализацию аминокислот в активном центре фермента APE1 и каталитическую эффективность оказывает присутствие крупного фрагмента BPDE-N2-dG, фланкирующего AP-сайт, моделировали взаимодействие фермента с модельными AP-содержащими дцДНК-субстратами методом молекулярной динамики.

Структуру ДНК-дуплекса получали, редактируя с помощью UCSF Chimera [162] дуплекс из работы [240] (PDB ID: 1DEW). В результате из исходного 15-звенного дуплекса был получен 12-звенный дуплекс требуемой последовательности,

содержащий вывернутый из спирали остаток аналога AP-сайта, и расположенный в комплементарной цепи остаток BPDE-N2-dG. Параметры силового поля для остатка BPDE-N2-dG были получены в работе с помощью программного пакета Gaussian 09 при параметризации с использованием базисного набора (Basis set) 6-31G* [164].

Конъюгат бенз[а]пирена с гуанином может находиться в двух стерео-формах: транс и цис. Молекулярное моделирование было проведено всего для 4-х комплексов фермента с субстратами AP₋₁-BP и AP₊₃-BP и цис- и транс- форм аддуктов с использованием пакета AMBER 14.

Так как APE11 человека связывает содержащий AP-сайт ДНК-дуплекс направленно, ориентируясь на положение AP-сайта в цепи, важно взаимное расположение AP-сайта и BP, присоединенного по экзоциклической аминогруппе гуанина. Для того, чтобы определить влияние аддуктов BPDE-N2-dG на репарацию AP-сайта, находящегося в противоположной цепи ДНК, использовали 12-звенные дуплексы, в которых AP сайт был смещен к 3'-концу (+3 позиция; дуплекс AP₊₃-BP-ДНК). На Рис. 54 приведен общий вид исследуемых комплексов AP₊₃-BP и увеличенная его часть (Рис. 45В, Г), относящаяся к локализации AP-сайта, остатка бензо[а]пирена и аминокислот активного центра, когда BP-dG аддукт находится в цис- (Рис. 54А, В) и транс-конформации (Рис. 54Б, Г). В дуплексе AP₊₃-BP остаток бензо[а]пирена располагается в области сильного изгиба ДНК-спирали, который возникает при связывании ДНК ферментом Ape1, и непосредственно контактирует с аминокислотами активного центра и каталитически важным ионом Mg²⁺. В области локализации dG-BP расположены важные для каталитической активности аминокислоты Asp308 и His-309. Остаток Asp308 атомом кислорода карбоксильной группы бокового радикала участвует в координации иона Mg²⁺; атом азота His309 координирует атом кислорода фосфатной группы при AP-сайте. Можно заключить, что в активном центре при взаимодействии с дуплексом AP₊₃-BP изменяются критически важные расстояния: от кислорода карбоксильной группы Asp308 до катиона магния и расстояние от азота остатка His309 до кислорода фосфатной группы изменяется.

Для дуплекса, не содержащего dG-BP, а содержащего только AP-сайт, эти расстояния составляют: 2.2 и 4.3 Å, соответственно. Можно сделать однозначный

вывод, что в дуплексе AP₊₃-BP остаток транс-dG-BP радикально увеличивает указанные расстояния и в существенной степени инактивирует APE1. Что касается цис-dG-BP, то его геометрия не оставляет пространства для локализации dG-BP в пределах белково-нуклеинового комплекса в области сильного изгиба ДНК-спирали.

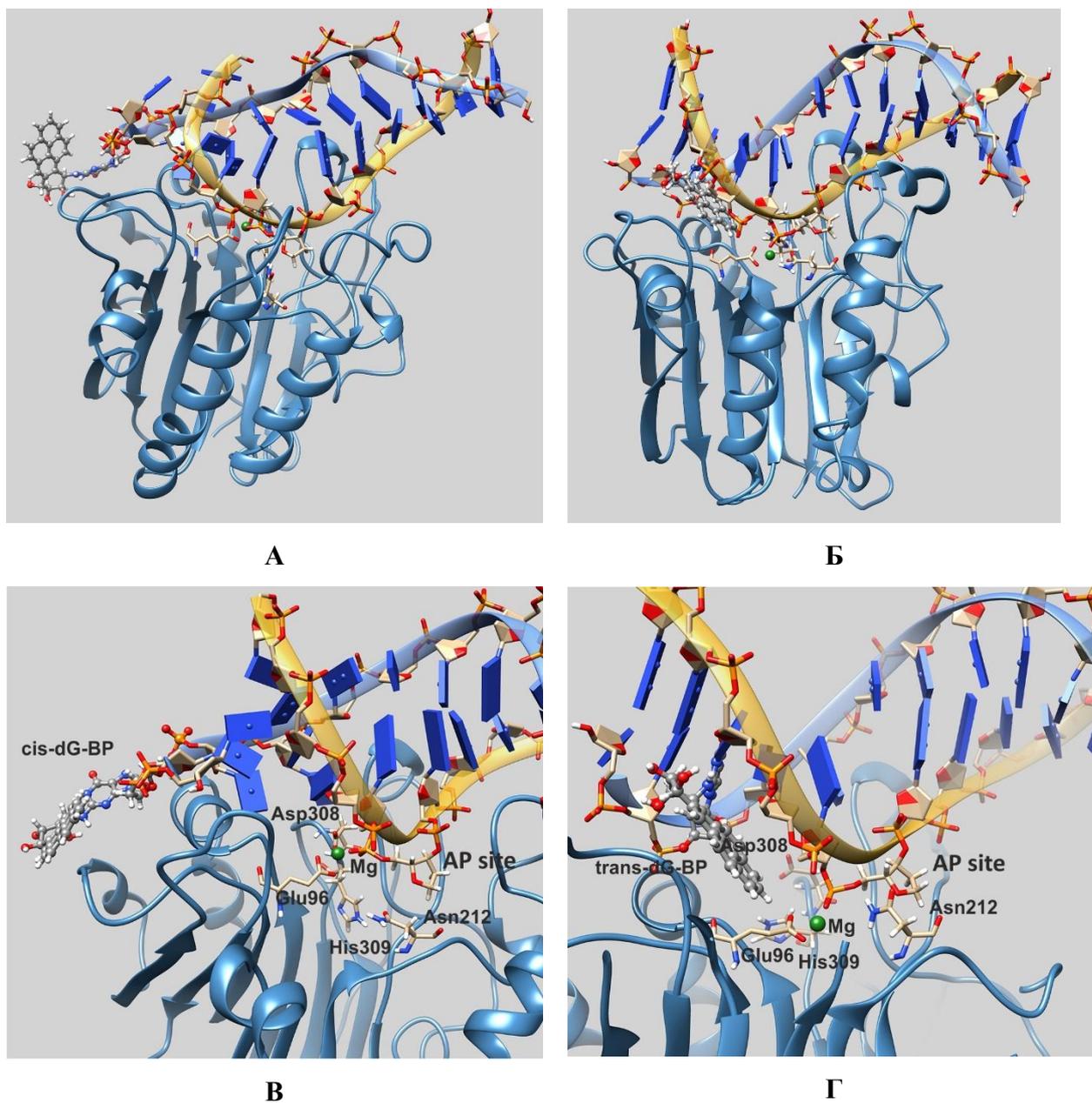


Рисунок 54. Общий вид комплекса Ape1 с ДНК-дуплексом AP₊₃-BP, содержащим цис-dG-BP (А, В) и транс-dG-BP (Б, Г). Локализация AP-сайта, иона Mg²⁺, аминокислот активного центра и остатка dG-BP.

Энергетически выгоднее оказывается выворачивание аддукта из спирали и локализация его снаружи ДНК. Основное влияние оказывается на расположение His309; увеличение расстояние между His309 и O2P от 4.3 до 7 Å снижает эффективность Ape1.

Таким образом, в комплексе с транс-ВР-dG, содержащем AP+3-ВР-DNA, расстояния между атомом кислорода карбоксильной группы Asp308 и ионом Mg²⁺, а также атомом азота His309 и атомом кислорода фосфатной группы AP-сайта значительно увеличиваются и каталитическая активность фермента снижается.

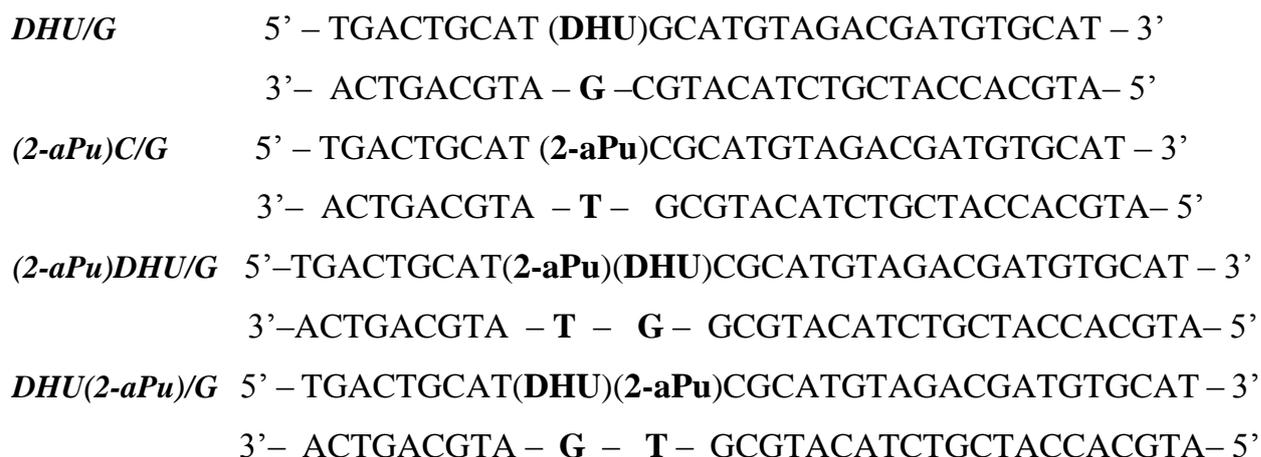
3.2.5. Кинетический механизм конформационных изменений и каталитической активности APE1 в ходе репарации NIR

Эндонуклеаза APE1 в клетках человека наряду с эксцизионной репарацией оснований может катализировать инцизионную репарацию нуклеотидов NIR. На вопрос могут ли быть обеспечены условия, при которых NIR становится основной активностью фермента, был получен положительный ответ [235]. Эксперименты были проведены на экстрактах клеток HeLa, в которых показали, что крайне существенным для переключения на NIR-активность было значения pH и концентрация ионов двухвалентных металлов. Тем не менее, стоит отметить, что существует определенная субстратная специфичность для реализации NIR: APE1 расщепляет ДНК, содержащие 5,6-дигидропиримидины, α -2'-дезоксаденозин, α -тимидин, 2 α -дезоксцитидин, 5-гидрокси-2'-дезоксидеозин и 5-гидрокси-2'-дезоксидеозин [28, 241].

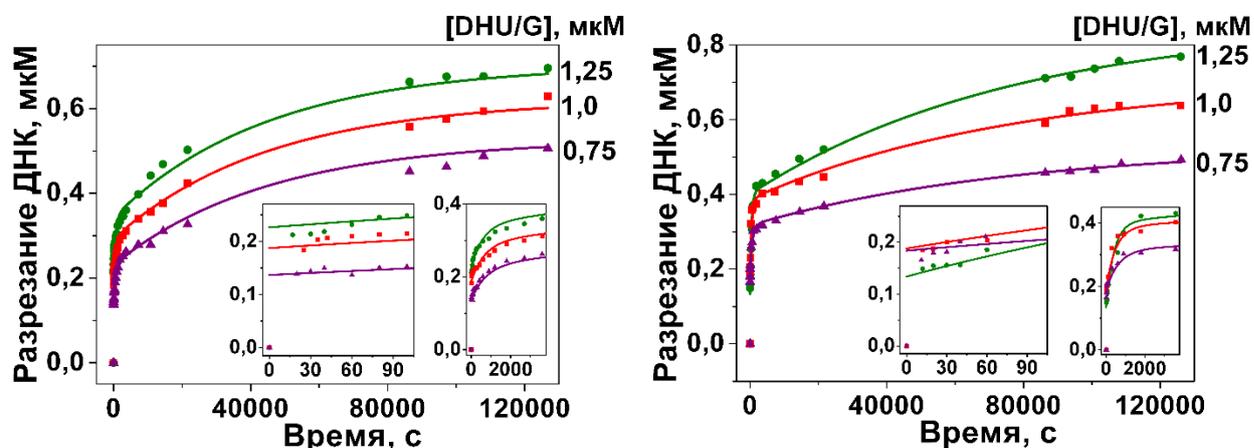
В экспериментах, направленных на изучение процесса NIR, применяли ДНК-дууплексы длиной тридцать нуклеотидов, несущие повреждение DNU напротив G в положении 11 в качестве специфического субстрата (Рис. 55А). Контролем служила аналогичная дцДНК без модификации. Реакцию расщепления ДНК проводили в буфере BER и NIR течение 35 часов и анализировали продукты реакции после разделения в ПААГ. По данным расщепления строили кинетические кривые разрезания ДНК (Рис. 55Б, В). Можно видеть, что эффективность гидролитической активности фермента высокая и для буфера BER и для буфера NIR.

В первой фазе (на врезках на Рис. 55) на временах < 20 с как в BER-, так и в NIR-буферах наблюдался скачок в накоплении продуктов, т.е. процесс был быстрым.

Промежуткам 20 с – 2000 с соответствует вторая фаза накопления продукта (Рис. 55 Б, В на врезках), медленная относительно фазы 1. Еще медленнее протекала фаза 3, которая реализовалась на временах > 2000 с. Медленное двухфазное накопление продукта может свидетельствовать о существовании стабильного комплекса фермента с продуктом, либо о том, что не весь фермент является активным. Поэтому, для точного определения доли активного фермента было проведено титрование APE1 неповреждённым лигандом (2-aPu)C/G, содержащим 2-aPu (Рис. 55А).



А



Б

В

Рисунок 55. Зависимость кинетики гидролиза субстрата DHU ферментом APE1 от используемого в реакции буфера. Реакцию проводили в буферах BER (**Б**) и NIR (**В**), концентрация фермента 1 мкМ. **А**. Нуклеотидные последовательности модельных дуплексов, используемых в экспериментах. Под основными кривыми представлены увеличенные фрагменты кинетических кривых для фазы 1 и 2.

В процессе титрования регистрировали изменение интенсивности флуоресценции 2-aPu, возникающее при связывании лиганда с ферментом. Чтобы

перевести лиганд в форму, связанную с ферментом, концентрацию фермента поднимали с 1 мкМ до 25 мкМ. Такие концентрации значительно превышали значения константы диссоциации комплекса фермента с лигандом. Переход в связанную форму при таких концентрациях был лимитирован концентрацией активных центров (Рис. 56).

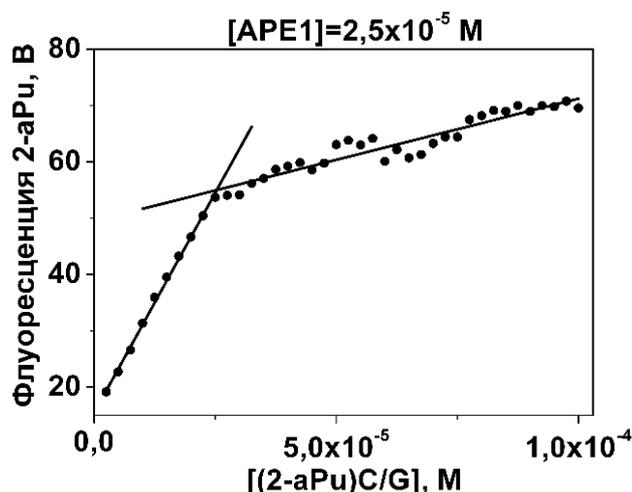
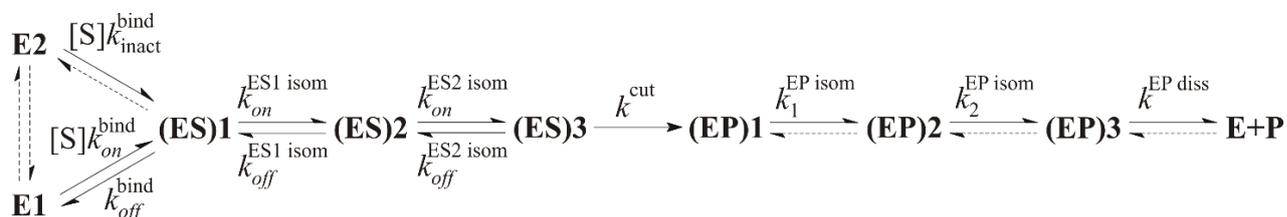


Рисунок 56. Кривые фермент-субстратного взаимодействия. Фермент APE1 (25 мкМ) титровали ДНК-субстратом (2-aPu)C/G (Рис. 55А) в буфере NIR. Экспериментальные точки приведены после коррекции базовой линии.

На кривой возрастания интенсивности флуоресценции можно выделить один чётко выраженный излом в точке, соответствующей соотношению концентрации фермента и лиганда 1:1, что соответствует ситуации, когда 100% молекул APE1 активны для связывания в используемом буфере NIR. В указанных условиях реакции фермент существует в двух конформациях, что подтверждают оба используемых метода анализа – и флуоресцентное титрование фермента, и динамика гидролиза субстрата по данным электрофореза. Эти две конформации учитывает кинетическая Схема 6. В начальный момент времени часть фермента существует в конформации (E1), энергетически менее выгодной, но более активной для разрезания DHU-субстрата; другая часть фермента существует в конформации (E2), энергетически более выгодной, но намного менее активной для разрезания данного субстрата. Менее активная форма фермента может либо непосредственно участвовать в формировании начального фермент-субстратного комплекса, либо находиться в равновесии с более

активной формой. Поэтому как процесс формирования комплекса E2 с субстратом, так и конформационный переход E2 в E1 сильно смещены в обратную сторону, а высвобождение фермента из комплекса с продуктом является лимитирующей стадией всего ферментативного процесса. Для подтверждения предполагаемого кинетического механизма APE1, были зарегистрированы кинетические кривые взаимодействия APE1 с субстратами (2-aPu)DHU/G, DHU(2-aPu)/G и DHU/G в буфере NIR (данные не приводятся, см. [242]). Фермент в более активной конформации E1 быстро образует начальный фермент-субстратный комплекс (ES)1, который подвергается двум конформационным переходам в (ES)2 и (ES)3. Затем протекает быстрый гидролиз 5'-фосфодиэфирной связи субстрата, вслед за которым происходят две стадии конформационных превращений комплекса фермента с продуктом ферментативной реакции. После этого следует лимитирующая стадия диссоциации фермента из стабильного комплекса с продуктом. Наложение превращений фермента в конформации E1 и в конформации E2 обеспечивает в результате наблюдаемый в эксперименте ход кинетических кривых.

Схема 6. Взаимодействие APE1 с остатком 5,6-DHU в процессе NIR.



По данным кинетических кривых изменения флуоресценции фермент-субстратного комплекса были рассчитаны прямые и обратные кинетические константы скорости образования начального фермент-субстратного комплекса и его изомеризации, а также константа скорости расщепления субстрата (Таблица 8). Схема 6 была использована для интерпретации кинетики взаимодействия APE1 с DHU субстратами. Каждая кинетическая кривая, соответствующая взаимодействию ферментов с DHU-содержащими субстратами, была количественно обработана в соответствии со Схемой 6. Стадии, зафиксированные на отдельных кинетических кривых, сопоставляли с кинетическими стадиями на схеме.

Таблица 8. Константы скорости взаимодействия APE1 с субстратами, содержащими DHU в буферах BER и NIR

| Буфер BER | | | |
|----------------------------------|---|---------------------------------------|-------------------------------|
| | DHU/G | [³² P]-DHU/G ¹ | (2-aPu)DHU/G ¹ |
| $k_{on}^{bind} (M^{-1}c^{-1})$ | $(38 \pm 0,1) \times 10^6$ | | |
| $k_{off}^{bind} (c^{-1})$ | $131 \pm 0,2$ | | |
| $k_{on}^{ESI isom} (c^{-1})$ | $145 \pm 0,6$ | | |
| $k_{off}^{ESI isom} (c^{-1})$ | $36 \pm 0,2$ | | |
| $k_{inact}^{bind} (c^{-1})$ | | $(32 \pm 3) \times 10^{-4}$ | |
| $k^{cut} (c^{-1})$ | $20 \pm 0,1$ | | $15 \pm 0,7$ |
| $k_2^{EP isom} (c^{-1})$ | | | $(16 \pm 0,6) \times 10^{-4}$ |
| $k^{EP diss} (c^{-1})^2$ | | $(22 \pm 2) \times 10^{-6}$ | $(18 \pm 0,2) \times 10^{-6}$ |
| Буфер NIR | | | |
| | [³² P]-DHU/G ¹ {[³² P]-(2-aPu)DHU/G} ¹ | (2-aPu)DHU/G ¹ | DHU(2-aPu)/G ¹ |
| $k_{on}^{bind} * (M^{-1}c^{-1})$ | | | |
| $k_{off}^{bind} * (c^{-1})$ | | | |
| $k_{inact}^{bind} (c^{-1})$ | $(160 \pm 20) \times 10^{-4}$ { $(250 \pm 20) \times 10^{-4}$ } | | |
| $k^{cut} (c^{-1})$ | | 49 ± 10 | 53 ± 4 |
| $k_1^{EP isom} (c^{-1})$ | | | $0,56 \pm 0,1$ |
| $k_2^{EP isom} (c^{-1})$ | | $(37 \pm 0,3) \times 10^{-4}$ | $(27 \pm 1) \times 10^{-4}$ |
| $k^{EP diss} (c^{-1})^2$ | $(13 \pm 3) \times 10^{-6}$ { $(22 \pm 3) \times 10^{-6}$ } | $(15 \pm 0,1) \times 10^{-6}$ | |

Можно видеть, что скорость гидролитического расщепления ДНК-субстрата, содержащего DHU, ферментом APE1 в процессе NIR сопоставима по величине со скоростью расщепления ДНК-субстрата, содержащего AP-сайт, в процессе BER.

Константы скорости каталитического расщепления ферментом DHU-субстрата в буфере NIR ($K^{\text{cut}} = 49\text{-}53 \text{ c}^{-1}$), оптимальном для расщепления DHU, были лишь незначительно ниже ($\sim 1.3\div 1.4$ раза) константы скорости каталитического расщепления F-содержащего субстрата ($K^{\text{cut}} = 68 \text{ c}^{-1}$) и примерно в два раза ниже соответствующей константы для AP-субстрата ($K^{\text{cut}} = 97 \text{ c}^{-1}$) в буфере BER, оптимальном для расщепления AP- и F-субстратов [243]. Полученные данные подтверждают функциональную роль NIR-репарации. По-видимому, существование очень прочного комплекса между APE1 и продуктом расщепления субстрата, содержащего DHU, обеспечивает координированное присоединение других белков, участвующих в репарации, к субстрату и передачу субстарта от одного фермента к другому. Такими белками могут быть флэп-эндонуклеаза 1 [244, 245], ДНК-полимераза δ и ДНК-лигаза [246], а также ДНК-полимераза β [247].

Таким образом, предложенная кинетическая Схема 6 ферментативного процесса описывает механизм превращения субстрата, содержащего остаток DHU, ферментом APE1 в процессе инцизионной репарации нуклеотидов.

3.2.5.1. Использование мутантных форм белка APE1 K98R и N161APE1 для определения кинетического механизма в процессе NIR

Использование мутантных форм белка является удобным инструментом для определения анализа ферментативных активностей. В работе [248] было показано, что если внести дополнительную замену лизина на аргинин в положении 98 (K98R) в мутантной форме белка APE1^{E96A} (глутамат заменен на аланин), который не обладает ферментативной активностью, то и 3'-фосфодиэстеразная, и AP-нуклеазная активности восстановятся. Такие исследования демонстрировали значимость и частичную вариативность соседних аминокислотных остатков в APE1 для каталитической активности. Более того, замена K98R влияла на структурное окружение остатков триптофана в APE1, что может быть детектировано методом «остановленной струи». Поэтому для изучения взаимодействия APE1 со специфическими субстратами при NIR был сконструирован мутантный белок, содержащий Arg вместо Lys в положении 98 – APE1^{K98R}. Как известно, Asp70 участвует в координации катионов двухвалентных металлов, а его карбоксильная

группа связана посредством водородных связей с Lys98. Кроме того, была получена еще одна мутантная форма эндонуклеазы - APE1^{NΔ61}, с удаленным 61-звенным N-концевым фрагментом, функционально соответствующим домену Ref-1 (окислительно-восстановительный эффекторный фактор 1, активируется активными формами кислорода и азота). Домен Ref-1 является АФК-зависимым регулятором транскрипции при апоптозе, воспалении и других клеточных процессах [249, 250]. Ранее полагали [251], а на сегодняшний день уже показано, что Ref-1 домен не критичен для реализации APE1-активности BER. Поскольку домен Ref-1 является частью фермента репарации, предполагали, что он важен для активности фермента в реакциях NIR [252, 253], поэтому использование подобного мутанта в условиях NIR позволит прояснить этот вопрос.

В качестве ДНК-моделей для анализа активности мутантных форм NΔ61APE1 и K98A использовали дуплекс DHU/G (Рис. 55А) и его аналоги, где в позиции DHU находились тетрагидрофуран (F) или AP-сайт для сравнения с реакцией BER. В реакциях использовали ДНК-дуплексы, несущие метку ³²P. Реакцию проводили в буфере, специфичном для NIR, анализировали продукты реакции в ПААГ и рассчитывали содержание каждой формы продукта (Рис. 57). Расщепление DHU-содержащего субстрата мутантной формой K98A была ниже, чем ферментом дикого типа (Рис. 57) и составляло около 35% за 35 ч реакции.

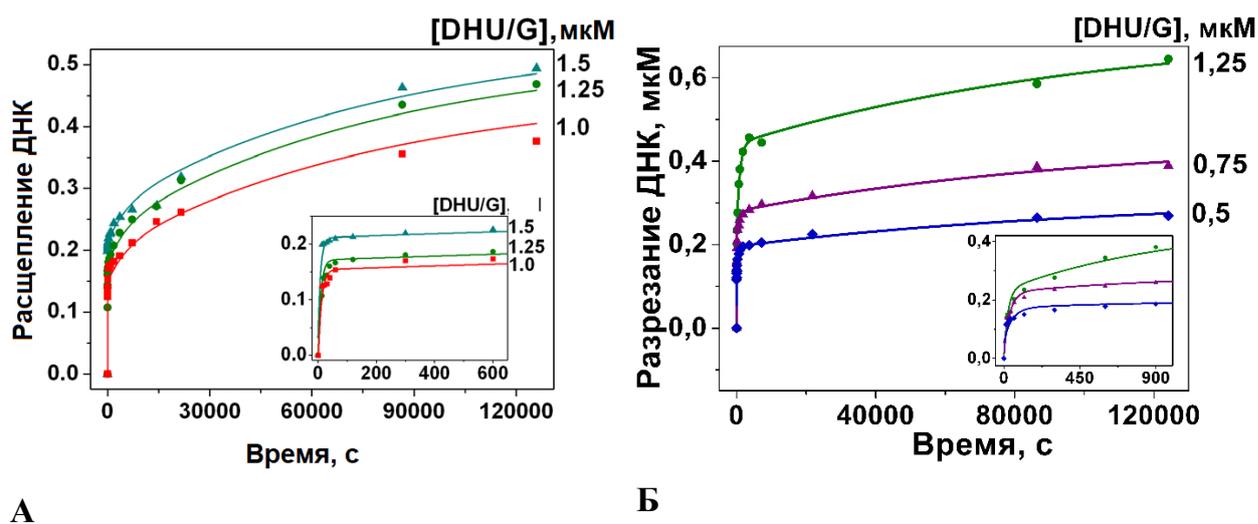
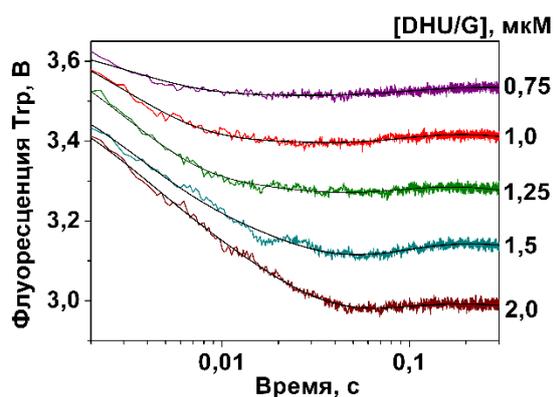


Рисунок 57. Кинетика расщепления [³²P]-DHU/G субстрата под действием мутантных форм APE1^{K98A} (А) и APE1^{NΔ61} (Б) в буфере NIR. Кривые построены по данным расщепления

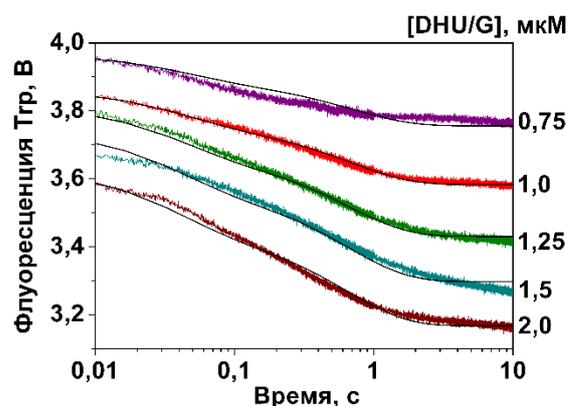
субстрата в ПААГ. Начальные области кинетических кривых до 100 с и от 100 до 2000 с увеличены на врезках.

Как и для фермента дикого типа (Рис. 57 Б) в реакции со специфическим субстратом в буфере NIR, на полученных кривых можно выделить три сегмента, отражающих стадии взаимодействия фермента с субстратом для обеих мутантных форм APE1. Накопление продукта в начальной фазе происходило быстро, на похожих временах: до 100 с для APE1^{K98A} и до 200 с для APE1^{NΔ61}. Далее накопление продуктов при гидролизе субстрата вариантами APE1^{K98A} и APE1^{NΔ61} замедлялось по сравнению с ферментом природной формы. Такая динамика накопления продукта позволяет заключить, что связывание субстрата и природной формой APE1, и формами APE1^{K98A} и APE1^{NΔ61}, реализуется схожим образом.

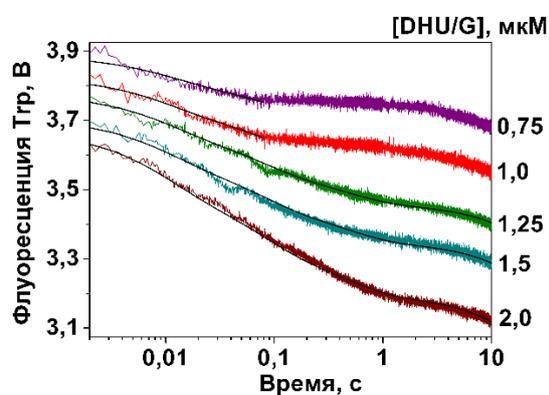
Далее были изучены предстационарные стадии взаимодействия указанных мутантных форм фермента в концентрации 1 мкМ с DHU-содержащим субстратом (0,75 – 2,0 мкМ) по изменению флуоресценции триптофана в условиях однооборотной реакции (Рис. 58).



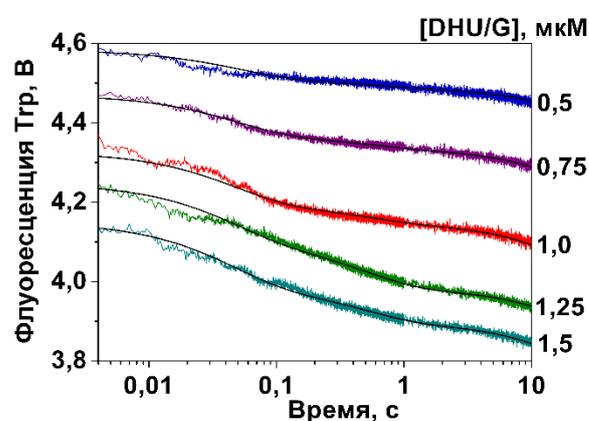
А



Б



В



Г

Рисунок 58. Взаимодействие APE1 (А, Б), APE1^{K98A} (В) и APE1^{NΔ61} (Г) с DHU/G субстратом. Реакции проводили в буфере NIR (Б, В, Г), используя реакцию APE1 в буфере BER в качестве положительного контроля. Структурные изменения регистрировали по изменению интенсивности флуоресценции остатков Trp.

Анализ участков кривых, полученных при взаимодействии в NIR-буфере, выявил снижение интенсивности флуоресценции Trp на ранних стадиях реакции (время до 1 с) для всех трех исследованных форм фермента. Такое снижение может соответствовать образованию комплексов фермента с субстратом и более активной конформацией E1 и изомеризации этих комплексов, как это было ранее проанализировано для нативной формы фермента. В случае неспецифического лиганда (без модификаций), в условиях NIR, флуоресценция Trp фермента дикого типа APE1 и мутантной формы APE1^{NΔ61} прекращает снижаться после 3 с реакции. В условиях буфера BER, стабилизация изменения флуоресценции Trp APE1 происходит гораздо раньше (до 30 мс).

Константы скорости прямой и обратной реакций стадии образования фермент-субстратного комплекса для мутантов APE1^{NΔ61} и APE1^{K98A} представлены и в Таблице 9. Константы обозначены по наименованию стадий – k^{bind} описывает первичное образование комплекса, $k^{ES\ isom}$ структурное превращение, а k^{cut} стадию гидролиза в ДНК-субстрате фосфодиэфирной связи. Эта стадия является необратимой.

Таблица 9. Влияние мутаций K98A и NΔ61 в ферменте APE1 на скорость конформационных переходов в субстратах DHU, в буфере NIR. Представлены константы скорости отдельных стадий, полученные с учетом регистрации флуоресценции остатков Trp фермента в реакции.

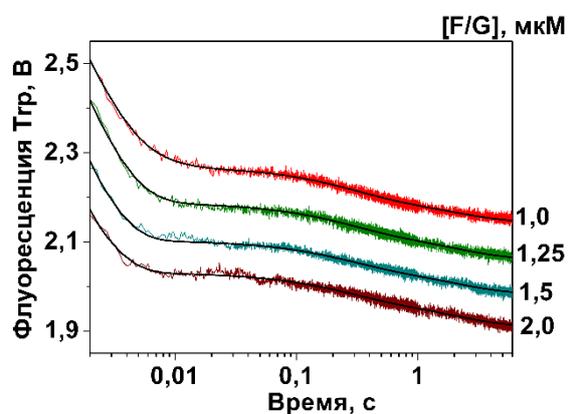
| | APE1 ^{NΔ61} | | | APE1 ^{K98A} | | |
|--|----------------------|---------------------------------------|---------------------------|----------------------|---------------------------------------|--------------|
| | DHU/G | [³² P]-DHU/G ¹ | (2-aPu)DHU/G ¹ | DHU/G | [³² P]-DHU/G ¹ | (2-aPu)DHU/G |
| | | | | | | |

| | | | | | | |
|--------------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| $k_{on}^{bind} (M^{-1}c^{-1})$ | $(4,3\pm 0,01)\times 10^6$ | | | $(9,2\pm 0,1)\times 10^6$ | | |
| $k_{off}^{bind} (c^{-1})$ | $13\pm 0,01$ | | | 81 ± 1 | | |
| $k_{on}^{ES1 isom} (c^{-1})$ | $1,6\pm 0,01$ | | | $4,1\pm 0,1$ | | |
| $k_{off}^{ES1 isom} (c^{-1})$ | $1,6\pm 0,01$ | | | $13\pm 0,4$ | | |
| $k_{on}^{ES2 isom} (c^{-1})$ | | | | $1,7\pm 0,1$ | | |
| $k_{off}^{ES2 isom} (c^{-1})$ | | | | $2,2\pm 0,1$ | | |
| $k_{inact}^{bind} (c^{-1})$ | | $(11\pm 2,1)\times 10^{-4}$ | | | $(1,9\pm 0,6)\times 10^{-4}$ | |
| $k^{cut} (c^{-1})$ | $0,11\pm 0,01$ | $0,10\pm 0,01$ | $0,10\pm 0,01$ | $0,20\pm 0,01$ | $0,22\pm 0,03$ | $0,30\pm 0,01$ |
| $k_2^{EP isom} (c^{-1})$ | | | $(7,9\pm 0,41)\times 10^{-4}$ | | | $(4,4\pm 0,7)\times 10^{-4}$ |
| $k^{EP diss} (c^{-1})^2$ | | $(9,4\pm 1,1)\times 10^{-6}$ | $(9,5\pm 1,7)\times 10^{-6}$ | | $(12\pm 5)\times 10^{-6}$ | |

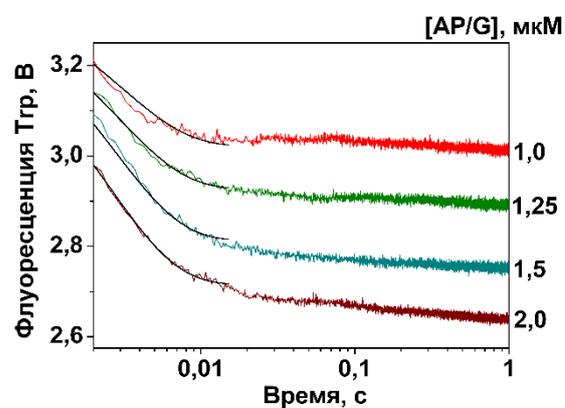
На основании полученных данных был описан механизм превращения субстрата, содержащего остаток DHU, ферментом APE1 в процессе инцизионной репарации нуклеотидов. Рассчитанные кривые взаимодействия представлены черными гладкими кривыми. Можно заключить, что кинетическая Схема 6, предложенная для случая взаимодействия APE1 с субстратом с остатком 5,6-DHU в процессе NIR хорошо описывает наблюдаемые фазы взаимодействия.

На следующем этапе исследования мы исследовали динамику конформационных переходов APE1, APE1^{K98A} и APE1^{NΔ61} при взаимодействиях со специфическими субстратами (для BER) F и AP в буфере BER в условиях однооборотной реакции (Рис. 59). Отметим, что в реакции APE1^{NΔ61} с субстратом F, используемая концентрация субстрата была почти в три раза выше, чем для других форм фермента. Кинетические кривые для субстратов F и AP наиболее существенно отличались для природной формы фермента. Анализ взаимодействия всех исследуемых форм фермента с субстратом F выявил, что в начальной фазе взаимодействия (20 – 50 мс) падение интенсивности флуоресценции было наиболее пологим в случае APE1^{NΔ61}. Это происходило вследствие того, что константа связывания APE1^{NΔ61} с субстратом была выше, и при более низких концентрациях субстрата не удалось наблюдать связывание. Взаимодействие с субстратом AP (Рис. 59Б) мутанта APE1^{NΔ61} сопровождалось более продолжительным (до 100 – 150 мс) падением интенсивности флуоресценции фермента. Взаимодействие APE1^{K98A} с

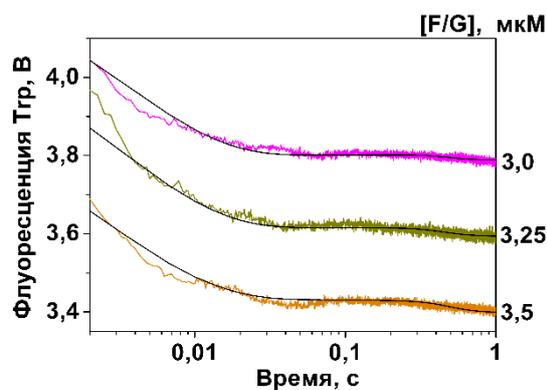
субстратом F индуцировало самое стремительное падение флуоресценции (до 20 мс). В случае субстрата AP, взаимодействующего с белком ARE1^{K98A}, формы кривых для обоих специфических субстратов были схожими (Рис. 59). Тем не менее, в промежутке 10-30 мс (Рис. 59Б) для этой формы фермента изменения интенсивности флуоресценции были более существенными в реакции с F субстратом. Можно предположить, что кинетический цикл взаимодействия протекает через одинаковое количество стадий для обоих субстратов. Поскольку в наблюдаемый промежуток времени не удалось обнаружить восстановление флуоресценции Trp белка до начального уровня (Рис. 58 и 59), реакция не достигла стадии распада комплекса.



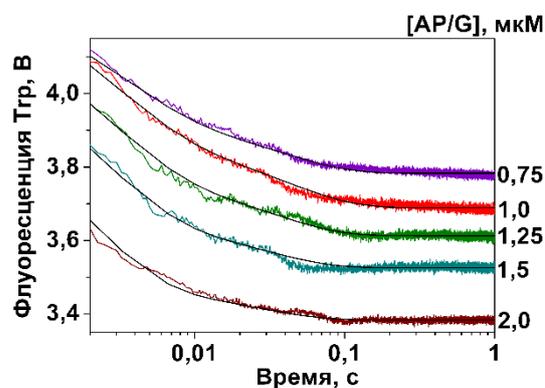
А



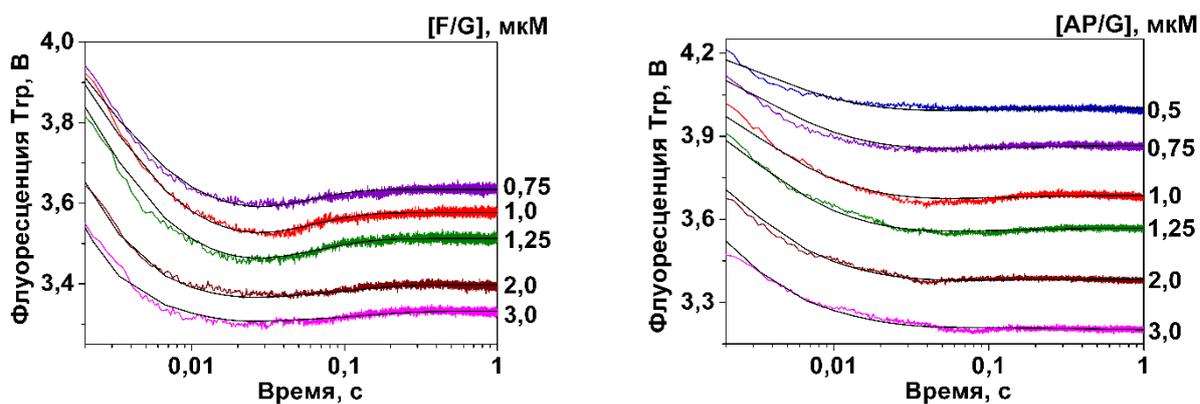
Б



В



Г



Д

Е

Рисунок 59. Взаимодействие APE1^{K98A} (А, Б), APE1^{NΔ61} (В, Г) и APE1 (Д, Е) с F (А, В, Д) и AP (Б, Г, Е) субстратами. Представлены данные реакции в буфере BER. За конформационными переходами следили по изменению интенсивности флуоресценции остатков триптофана.

Можно отметить стабильность комплексов исследуемых мутантных форм APE1 с гидролизованной продуктом специфических субстратов. С учетом данных о структуре комплексов APE1 со специфическими субстратами [254], полученные данные подтверждают гипотезу о том, что замена K98A не влияет на связывание продукта. Для формы APE1^{NΔ61} не удалось детектировать фазу конформационной трансформации фермента при образовании продукта из субстратов F- и AP. Аналогичные данные были получены для природной формы APE1.

Математическая обработка полученных кривых позволила рассчитать константы скорости прямых и обратных реакций взаимодействия ферментов с субстратами (Таблица 10, 11).

Таблица 10. Сравнение констант скорости реакций, описывающих взаимодействие APE1 в буферах NIR и BER с субстратами F и AP. На основании кинетической Схемы 6.

| | Буфер NIR | | Буфер BER | |
|--|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|----|
| | F | F | F | AP |
| k_{on}^{bind} (M ⁻¹ s ⁻¹) | (0,23±0,01)×10 ⁸ | (3,8±0,1)×10 ⁸ | (1,8±0,1)×10 ⁸ | |
| k_{off}^{bind} (с ⁻¹) | 4,9±0,1 | 79±1 | 120±10 | |

| | | | |
|------------------------------------|---------|------|------|
| $k_{on}^{ES1\ isom}$ (c^{-1}) | 24±1 | 59±1 | 18±1 |
| $k_{off}^{ES1\ isom}$ (c^{-1}) | 68±1 | 18±1 | 32±1 |
| k^{cut} (c^{-1}) | 1,0±0,1 | 68±1 | 97±1 |

Таблица 11. Сравнение констант скорости реакций, описывающих взаимодействие мутантных форм APE1^{NΔ61} и APE1^{K98A} в буфере BER с субстратами F и AP. На основании кинетической Схемы 6.

| | K98A | | NΔ61APE1 | |
|--|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | F | AP | F | AP |
| k_{on}^{bind} (M ⁻¹ c ⁻¹) | (3,7±0,1)×10 ⁸ | (2,0±0,1)×10 ⁸ | (1,6±0,1)×10 ⁸ | (2,6±0,1)×10 ⁸ |
| k_{off}^{bind} (c ⁻¹) | 38±1 | 492±2 | 7,3±0,5 | 34±1 |
| $k_{on}^{ES1 isom}$ (c ⁻¹) | 30±1 | 289±1 | 15±1 | 38±1 |
| $k_{off}^{ES1 isom}$ (c ⁻¹) | 310±1 | 355±2 | 58±1 | 4,2±0,1 |
| k^{cut} (c ⁻¹) | 5,5±0,1 | | 58±1 | |
| $k_{on}^{EP isom}$ (c ⁻¹) | 2,7±0,1 | | | |
| $k_{off}^{EP isom}$ (c ⁻¹) | 1,5±0,1 | | | |

Далее были проведены эксперименты по определению скорости накопления продуктов реакции взаимодействия APE1 и APE1^{K98A} с субстратом DHU в буферах NIR и BER методом анализа продуктов реакции электрофорезом в ПААГ. Для мутантной формы APE1^{K98A} была установлена дополнительная стадия изомеризации фермент-субстратного комплекса при протекании NIR, которую ранее не удавалось детектировать для фермента APE1 дикого типа. Согласно схеме, в начальный момент времени часть фермента находится в более активной для разрезания DHU-субстрата конформации E1, тогда как другая часть фермента существует в менее активной конформации E2. Менее активная форма фермента E2 может либо непосредственно участвовать в формировании начального фермент-субстратного комплекса (ES) (Рис. 59, фаза 1), либо находиться в медленном равновесии с более активной формой E1. Фермент в более активной конформации E1 быстро образует начальный фермент-субстратный комплекс (фаза 1), после чего происходят две перестройки структуры - фаза 2 и фаза 3. Затем протекает быстрый гидролиз 5'-фосфодиэфирной связи субстрата, вслед за которым происходят две стадии конформационных превращений

комплекса фермента с продуктом ферментативной реакции (Схема б). После этого следует лимитирующая стадия диссоциации фермента из стабильного комплекса с продуктом.

Константы скорости прямой и обратной реакций стадии образования фермент-субстратного комплекса с субстратом DHU для APE1 в буфере BER представлены в Таблице 12, а для буфера NIR - в Таблице 13. Они были получены в результате математической обработки экспериментальных кривых с учетом Схемы б.

Таблица 12. Сравнение констант скорости реакций, описывающих взаимодействие APE1 с DHU субстратами в буфере BER. На основании кинетической Схемы б.

| | DHU/G | [³² P]-DHU/G ¹ | (2-aPu)DHU/G ¹ |
|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| $k_{on}^{bind} (M^{-1}c^{-1})$ | $(38 \pm 0,1) \times 10^6$ | | |
| $k_{off}^{bind} (c^{-1})$ | $131 \pm 0,2$ | | |
| $k_{on}^{ES1 isom} (c^{-1})$ | $145 \pm 0,6$ | | |
| $k_{off}^{ES1 isom} (c^{-1})$ | $36 \pm 0,2$ | | |
| $k_{inact}^{bind} (c^{-1})$ | | $(32 \pm 3) \times 10^{-4}$ | |
| $k^{cut} (c^{-1})$ | $20 \pm 0,1$ | | $15 \pm 0,7$ |
| $k_2^{EP isom} (c^{-1})$ | | | $(16 \pm 0,6) \times 10^{-4}$ |
| $k^{EP diss} (c^{-1})^2$ | | $(22 \pm 2) \times 10^{-6}$ | $(18 \pm 0,2) \times 10^{-6}$ |

¹ При расчётах полагали, что концентрация фермента, участвовавшего в расщеплении субстрата, составляла 15% от его исходной концентрации.

² В значения константы $k^{EP diss}$ вносит дополнительную ошибку частичная инактивация фермента при длительной инкубации.

Таблица 13. Сравнение констант скорости реакций, описывающих взаимодействие APE1 с DHU субстратами в буфере NIR. На основании кинетической Схемы б.

| | DHU/G | [³² P]-DHU/G { [³² P]-(2-aPu)DHU/G } | (2-aPu)DHU/G | DHU(2-aPu)/G |
|----------------------------------|-----------------------------|--|-------------------------------|-----------------------------|
| $k_{on}^{bind} * (M^{-1}c^{-1})$ | $(2,9 \pm 0,1) \times 10^6$ | | | |
| $k_{off}^{bind} * (c^{-1})$ | 18 ± 1 | | | |
| $k_{inact}^{bind} (c^{-1})$ | | $(160 \pm 20) \times 10^{-4}$ { $(250 \pm 20) \times 10^{-4}$ } | | |
| $k^{cut} (c^{-1})$ | | | 49 ± 10 | 53 ± 4 |
| $k_1^{EP isom} (c^{-1})$ | | | | $0,56 \pm 0,1$ |
| $k_2^{EP isom} (c^{-1})$ | | | $(37 \pm 0,3) \times 10^{-4}$ | $(27 \pm 1) \times 10^{-4}$ |

| | | | | |
|--|--|--|-----------------------------|--|
| $k^{EP\text{ diss}} (\text{с}^{-1})^2$ | | $(13\pm 3)\times 10^{-6}$ $\{(22\pm 3)\times 10^{-6}\}$ | $(15\pm 0,1)\times 10^{-6}$ | |
|--|--|--|-----------------------------|--|

Полученные данные показывают, что мутация K98A с заменой лизина на аланин сложным образом влияет на образование первичного неспецифического фермент-субстратного комплекса, и препятствует подстройке фермента в комплексе с неповрежденной ДНК.

Анализ константы скорости образования (k_{on}^{bind}) и константы ассоциации ($k_{on}^{bind} / k_{off}^{bind}$) для APE1 дикого (Таблицы 10, 12 и 13), описывающих начальную стадию образования комплекса ES были выше для специфических субстратов по сравнению с субстратом без повреждения. В случае мутантной формы APE1 с делецией, в буфере NIR константа скорости прямой реакции стадии образования начального комплекса с неповрежденной ДНК выше, чем в случае специфического DNU субстрата. Аналогичные различия описывали стабильность указанных комплексов: первичный комплекс APE1^{NΔ61} с неповрежденным дуплексом был в 2 раза более стабилен, чем со специфическим DNU субстратом (буфер NIR). Следующее событие каталитического цикла, конформационная подстройка APE1^{NΔ61} и DNU-субстрата (соответствует фазе ES2) реализовывалась быстрее, по сравнению с неповрежденным дуплексом. Тем не менее, стабильность такого комплекса (Таблицы 9, 11) была существенно ниже, чем для комплекса с неспецифическим лигандом (Таблицы 12, 13). Можно сделать вывод, что отсутствие Ref-1 фрагмента в APE1^{NΔ61} влияет на узнавание специфического повреждения в условиях NIR. Дискриминация между специфическим субстратом и неспецифическим лигандом реализуется в результате замедления образования комплекса APE1 с неповрежденной ДНК в оптимальных буферных условиях. Ref-1 домен осуществляет негативную регуляцию связывания фермента с неповрежденной ДНК. Значения констант скорости (k_{on}^{bind}) и ($k_{on}^{bind} *$), описывающие начальные стадии взаимодействия фермента с субстратом для APE1^{NΔ61} и природного фермента, соответственно, отличаются незначительно.

Помимо влияния на дискриминацию специфического субстрата, Ref-1 влияет на скорость гидролиза ДНК: (k^{cut}) для полноразмерного фермента была в 500 раз выше,

чем для варианта APE1^{NA61}. Если сравнивать значения k^{cut} для формы APE1 с заменой K98A ($k^{cut} = 0,20 \pm 0,01 \text{ c}^{-1}$) и формы с потерей Ref-1 домена ($k^{cut} = 0,11 \pm 0,01 \text{ c}^{-1}$), можно заключить, что замена K98A менее существенна для каталитической активности NIR. Несмотря на то, что замена K98A затрагивает структуру активного центра, а укороченная форма фермента лишена домена, не связанного напрямую с нуклеазной активностью и расположенного в отдалении от активного центра, влияние делеции на ферментативный процесс значительно.

По сравнению с природным ферментом, потеря Ref-1 домена пятикратно снижает значение константы скорости изомеризации комплекса ($k_2^{EP\ isom}$).

Проведенное исследование добавило много нового в понимание функций домена Ref-1 фермента APE1. К наиболее существенным находкам можно отнести демонстрацию значимости домена Ref-1 для дискриминации специфических DHU субстратов и ускорение разрезания ДНК в репарации NIR. Дополнительно можно предположить, что Ref-1 оказывает влияние на эффективность протекания следующих стадии репарации, поскольку Ref-1 хоть и незначительно, но повышает сродство к продуктам гидролиза субстратов. Такое предположение основано на сравнении констант скорости высвобождения продуктов расщепления DUU- и F- субстратов природным ферментом и ферментом, лишенным Ref1 домена.

Ref-1 домен относят к более позднему приобретению APE1 в ходе эволюции, поскольку он высоконсервативен у млекопитающих, а у многих других организмов отсутствует [251]. Наличие двух остатков цистеинов в Ref1 домене, образующих дисульфидную связь, обуславливают его чувствительность к активным формам кислорода в клетке, после взаимодействия с которыми проявляется активность APE1 как транскрипционного фактора в ответ на окислительный стресс. Как транскрипционный фактор Ref-1 домен непосредственно взаимодействует с ДНК. Ref-1 домен составляет N-концевую часть APE1. При взаимодействии с поврежденной ДНК домен Ref-1 оказывается с 3' стороны от репарируемого сайта и может влиять на скорость диссоциации фермента из комплекса с продуктом.

Поскольку в настоящее время показано, что окислительные повреждения ДНК могут быть элементами сигналинга физиологических процессов, не вызывает удивления компоновка в APE1 указанных двух активностей. APE1 может участвовать во внесении одноцепочечных разрывов в промоторные области генов, которым необходима репарация окислительно поврежденных оснований в кодирующей части. Результаты, полученные в данной работе и описывающие изменение нуклеазной активности APE1 без Ref-1 домена в процессах BER и NIR, позволяют сделать заключение о том, что Ref-1 необходим для принятия каталитически активной для NIR конформации активным центром. В случае BER отсутствие Ref-1 не влияет на нуклеазную активность APE1. Сравнивая активность фермента в разрезании субстратов DHU и AP можно предположить, что конформации активного центра при взаимодействии с указанными повреждения претерпевают структурные подстройки, отличаются между собой, и Ref-1 участвует в подстройке к DHU субстрату. Можно заключить, что помимо регуляции окислительно-восстановительного сигналинга, Ref-1 добавил ферменту APE1 новую нуклеазную активность – осуществлять инцизионную репарацию нуклеотидов.

3.3. Кинетические закономерности взаимодействия Apr1 нуклеазы из *Saccharomyces cerevisiae* с ДНК-субстратами⁴

Белок Apr1 из *S. cerevisiae* является гомологом бактериальной AP-нуклеазы Nfo и осуществляет репарацию ДНК. Для Apr1 показаны как минимум пять каталитических активностей: 1) AP-эндонуклеазной активностью, благодаря которой поврежденная цепь ДНК разрезается с 5'-конца обычного или восстановленного AP-сайта; (2) 3'-фосфодиэстеразной активностью, за счет которой вырезаются 3'-концевые блокирующие группы ДНК такие, как α,β -ненасыщенные альдегиды, 4-гидрокси-2-пентеналь (3'-dRP), 3'-фосфогликолят (3'-pg) или 3'-фосфат (3'-P), (3) 3'-тирозил-ДНК-фосфодиэстеразной активностью, приводящей к удалению ковалентно связанной топоизомеразы 1 (3'-Topo1); (4) эндонуклеазной активностью, благодаря

⁴ В настоящей главе использованы материалы, опубликованные в работах [7-9], [11], [16] из списка на стр. 215 – 218.

которой фосфодиэфирная связь расщепляется с 5'-стороны от окисленных оснований ДНК, таких как 5,6-дигидроурацил и формапидопиримидины (FapyA и FapyG); (5) 3'→5'-экзонуклеазной активностью, которая удаляет 3'-концевой нуклеотид.

Для исследования конформационной динамики ДНК-субстрата при взаимодействии с *Apn1* в ходе каталитического цикла, использовали *Apn1* из *S. cerevisiae*, клонированную и наработанную в клетках-продуцентах *E. coli*. Модельными субстратами были синтетические дцДНК (12 пар нуклеотидов), содержащие остатки флуоресцентных аналогов гетероциклических оснований - 2-аминопурина или пирролоцитозина в соседнем положении с 3'- или с 5'-стороны от природного AP-сайта или его синтетического аналога. Кроме фермента дикого типа, использовали фермент с заменой His83 на Ala.

3.3.1. Роль остатка His83 эндонуклеазы Apn1 из Saccharomyces cerevisiae в каталитическом выщеплении AP-сайта

AP-нуклеаза Endo IV из *E. coli* является структурным гомологом *Apn1* из *S. cerevisiae*. Ранее считали, что His83 в *Apn1* координирует один из трех ионов Zn^{2+} (*Zn1*) в активном сайте *Apn1*, подобно His69 в Endo IV [255]. Garcin с соавторами показали [256], что Endo IV связывает вывернутую из спирали AP-дезоксирибозу ДНК-субстрата, а аминокислотные остатки белка, расположенные в малой и в большой бороздках фиксируют AP-сайт в изолированном кармане активного центра. Поверхность взаимодействия белка с ДНК располагается вокруг вывернутой AP-дезоксирибозы и фланкирующих её фосфатов. Необходимо отметить, что большинство контактов образуется с цепью, содержащей AP-сайт. Переход из свободной формы фермента в субстрат-связанную не ведет к существенным изменениям структуры Endo IV. Существенные трансформации происходят со структурой субстрата: он искажается относительно В-формы ДНК. Так, связанная с ферментом ДНК изгибается на угол около 90°. Такая изогнутая структура ДНК стабилизируется с 5'-стороны при помощи α -спирали фермента, которая увеличивает малую бороздку. Endo IV укрепляет ДНК-остов в месте AP-сайта введением двух остатков в малую бороздку ДНК (Arg37 и Tyr72). Аргинин-37 образует водородную

связь с 3'-фосфатной группой AP-сайта, стабилизируя его вывернутую конформацию. Таким образом, Endo IV специфически связывает вывернутый AP-сайт в кармане, окаймлённом остатками ароматических и гидрофобных аминокислот.

Нами было сделано предположение, что замена His83 на Ala может снизить активность *Apn1* вследствие слабой координации ионов Zn^{2+} , участвующих в ферментативном катализе. Для исследования этой гипотезы был получен мутант *Apn1* H83A, в котором His83 был заменен на Ala. Такая замена изменяла скорость образования каталитически активного комплекса фермента с поврежденным ДНК-субстратом и реакцию гидролиза. Катализ H83A *Apn1* зависит не только от расположения относительно AP-сайта в ДНК, но и от характера повреждения.

Далее, мы провели молекулярно-динамическую симуляцию фермент-субстратных комплексов для мутантной формы H83A *Apn1*, содержащей дуплекс F(2-aPu) и два, либо три иона Zn^{2+} . ДНК содержала синтетический аналог AP-сайта и остаток флуорофора 2-аминопурина, расположенный рядом с ним. Такое моделирование, проведённое для температуры 300 К, позволяет получить картину динамического поведения молекулярной системы. Методы компьютерного моделирования позволили рассчитать общий вид комплекса *Apn1* дикого типа при взаимодействии с (2-aPu)F ДНК-дуплексом (Рис. 60). При развороте F-лиганда из спирали ДНК и перемещении его в активный центр *Apn1*, его положение меняется незначительно. Достаточно хорошо видно поведение остатка 2-аминопурина: он подвижен в комплементарной паре с dC, находится рядом с полостью, образованной вследствие выворачивания AP-сайта; по-видимому, способен изменять свою флуоресценцию вследствие изменения окружения.

Что касается локализации ионов Zn^{2+} , то их поведение в структуре H83A *Apn1* для случая моделирования двух и трёх ионов имеет различия. Можно видеть положение аминокислотных остатков в активном сайте и их взаиморасположение относительно ионов Zn^{2+} .

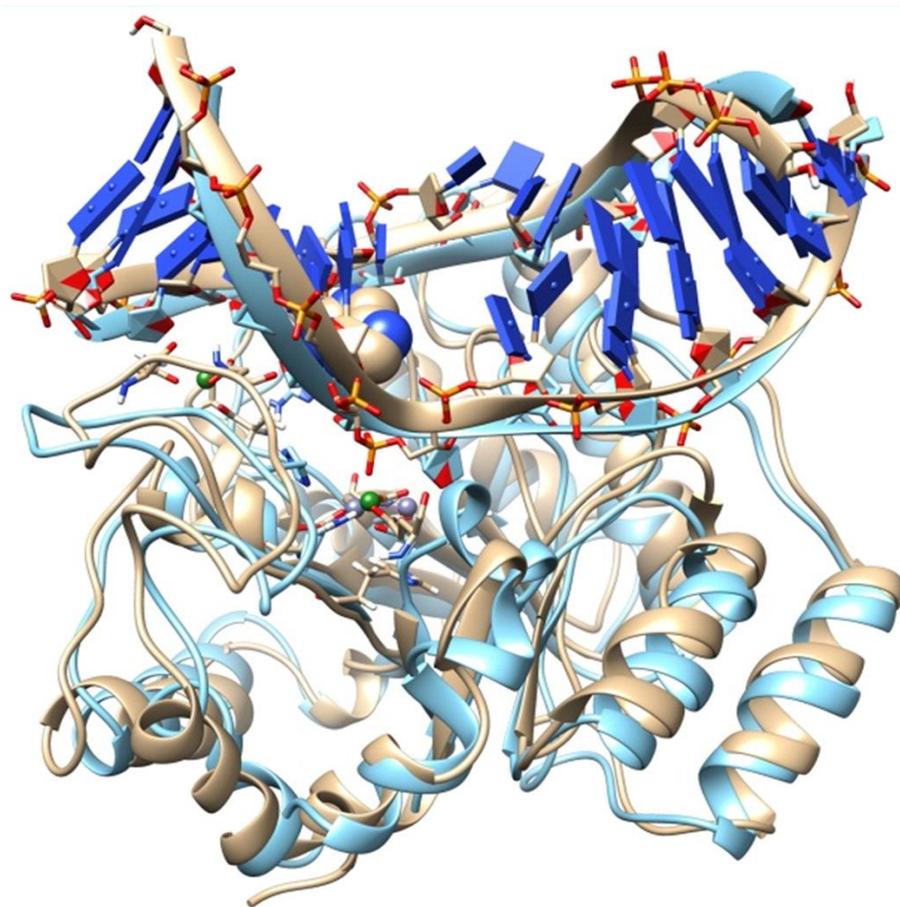


Рисунок 60. Моделирование методом МД взаимодействия формы H83A Arp1 с ДНК-субстратом. Комплекс с одним ионом Zn^{2+} (голубые ленты, Zn^{2+} - фиолетовые сферы) и двумя ионами Zn^{2+} (серо-коричневые ленты, Zn^{2+} —зеленые сферы).

На рисунке 61 ионы Zn^{2+} показаны зеленым, His83, His123, Glu158, Asp192, His195, His229, Asp242, His244 и Glu274, образующие активный сайт, показаны в виде палочек, окрашенных в соответствии с типом атомов (хаки - углерод; синий - азот; красный - кислород; коричневый, фосфор). RMSD для всех атомов в ДНК составляет 3,7 Å. Все три иона Zn^{2+} были вовлечены в катализ: Zn1 и Zn2 взаимодействовали с атомами кислорода фосфатной группы, расположенных вблизи расщепляемой связи, и притягивали электронную плотность к ним, способствуя расщеплению фосфодиэфирной связи.

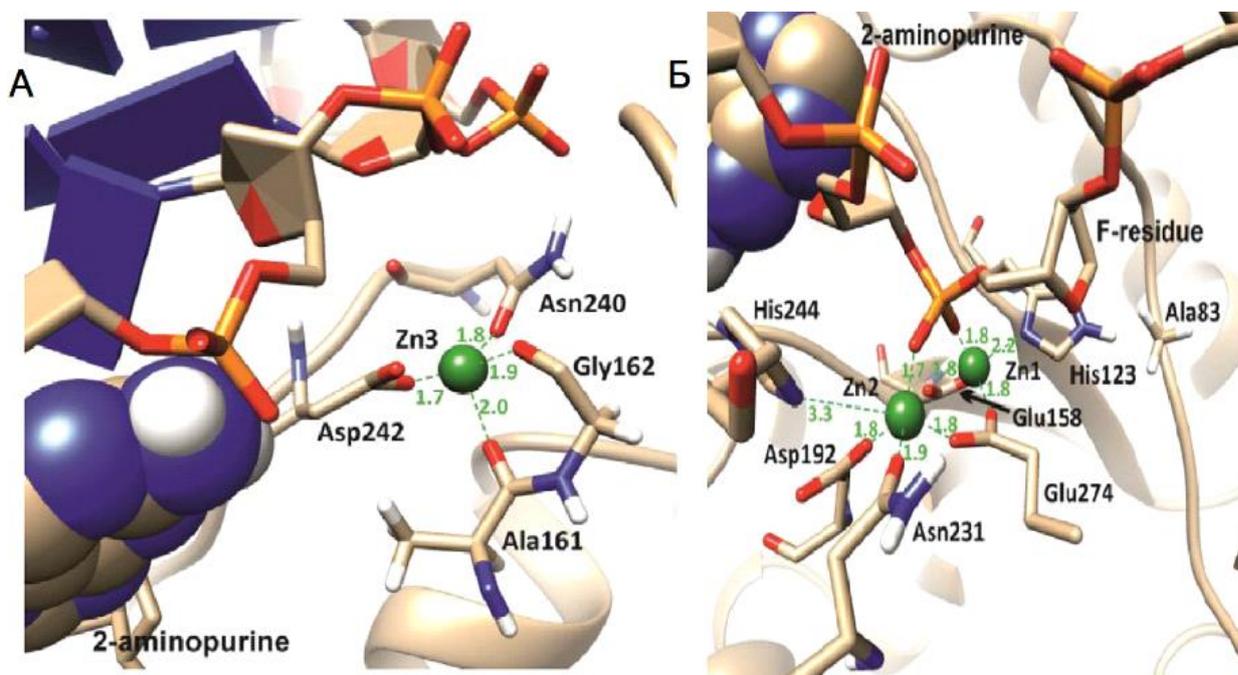


Рисунок 61. Молекулярная динамика положения остатков аминокислот в активном сайте комплекса H83A Apr1 с ДНК. Геометрия координации атомов Zn3 (А) показана для МД-моделирования с двумя ионами Zn^{2+} ; геометрия координации Zn1 и Zn2 (Б) показана для МД-моделирования с тремя ионами Zn^{2+} . Ионы цинка показаны зелеными сферами, остаток 2-aPu показан сферами СРК, F сайт, Glu158, Asp192, Glu274 аминокислотные остатки, формирующие активный сайт, показаны в виде палочек (хаки - углерод; синий - азот; красный - кислород; коричневый, атомы фосфора).

Когда образовывался продукт расщепления, ион Zn3, по-видимому, взаимодействовал с 5'-областью содержащей AP-сайт- цепью продукта ДНК, стабилизируя уходящую группу. Ион Zn3 координируется с Asp242 и смещается на 4,6 Å ближе к 5'-концу F-содержащей ДНК (Рис. 61). Моделирование структуры H83A Apr1 с тремя ионами Zn^{2+} показало, что наиболее существенные изменения произошли для иона Zn3. Замена положительно заряженного His83 на неполярный Ala привела к ослаблению координации Zn1, за которым последовало небольшое смещение иона металла относительно его первоначального местоположения.

Смещение Zn1 означает, что Glu274 теперь должен координировать оба иона Zn1 и Zn2 вместо одного Zn2, координируемого в WT Apr1 (рис. 61Б). Снижение

числа присутствующих в активном сайте фермента катионов цинка непосредственно влияет на падение нуклеазной активности Н83А-мутанта *Apr1*.

Таким образом, именно His83 правильно координирует ионы Zn^{2+} активного сайта, играя решающую роль в каталитической стадии разрезания. Полученные результаты могут быть полезны для разработки новых противогрибковых и противомаларийных агентов.

Поскольку His83 принимает участие в связывании иона Zn^{2+} логично ожидать, что замена этой аминокислоты способна изменять активность фермента, как минимум за счет изменения в расположении ионов Zn^{2+} . Поэтому, в дополнение к определению влияния ионов Zn^{2+} на AP-эндонуклеазную активность мутантной формы Н83А *Apr1*, были зарегистрированы кинетические кривые взаимодействия Н83А *Apr1* с субстратом (2-аPu)F в присутствии 0,25 мМ Zn^{2+} (Рис. 62). Присутствие ионов Zn^{2+} привело к восстановлению активности мутантной формы Н83А *Apr1* в отношении (2-аPu)F субстрата 5'-совмещенного. Однако мутантный фермент не смог достичь такого же уровня активности в отношении дуплекса (2-аPu)F, как в отношении дуплекса с 3'-совпадением (Рис. 62 Б-Г). На рис. 62Б показана конформационная динамика дуплекса (2-аPu)F, взаимодействующего с Н83А *Apr1* в присутствии и в отсутствие ионов Zn^{2+} , а также с *Apr1* дикого типа. Здесь можно увидеть закономерность ускорения каталитической стадии в следующем порядке: (Н83А *Apr1*) < (Н83А *Apr1* + Zn^{2+}) < (WT *Apr1*) \approx (WT *Apr1* + Zn^{2+}). Кинетический механизм, описывающий это взаимодействие, точно такой же, как и взаимодействие F(2-аPu) с WT *Apr1* и Н83А *Apr1*. Каталитическая скорость восстановленного процесса в 2,7 раза выше по сравнению с аналогичным взаимодействием в отсутствие ионов Zn^{2+} . Сродство Н83А *Apr1* к (2-аPu)F в присутствии ионов Zn^{2+} в два раза выше, чем без ионов металла. Более того, сродство восстановленного фермента к (2-аPu)F выше, чем у Н83А *Apr1* к F(2-аPu) без ионов Zn^{2+} . Другими словами, дефицит ионов цинка в активном сайте мутантного *Apr1* приводит к снижению сродства фермента к субстратам ДНК с повреждениями и зависит от пространственной структуры конкретных повреждений. Кинетические параметры взаимодействий подтвердили, что ключевое различие лежит в каталитической стадии. Этот факт позволяет понять роль остатка His-83 в катализе,

где этот остаток участвует не только в координации Zn^{2+} но и в превращении субстрата в продукт реакции.

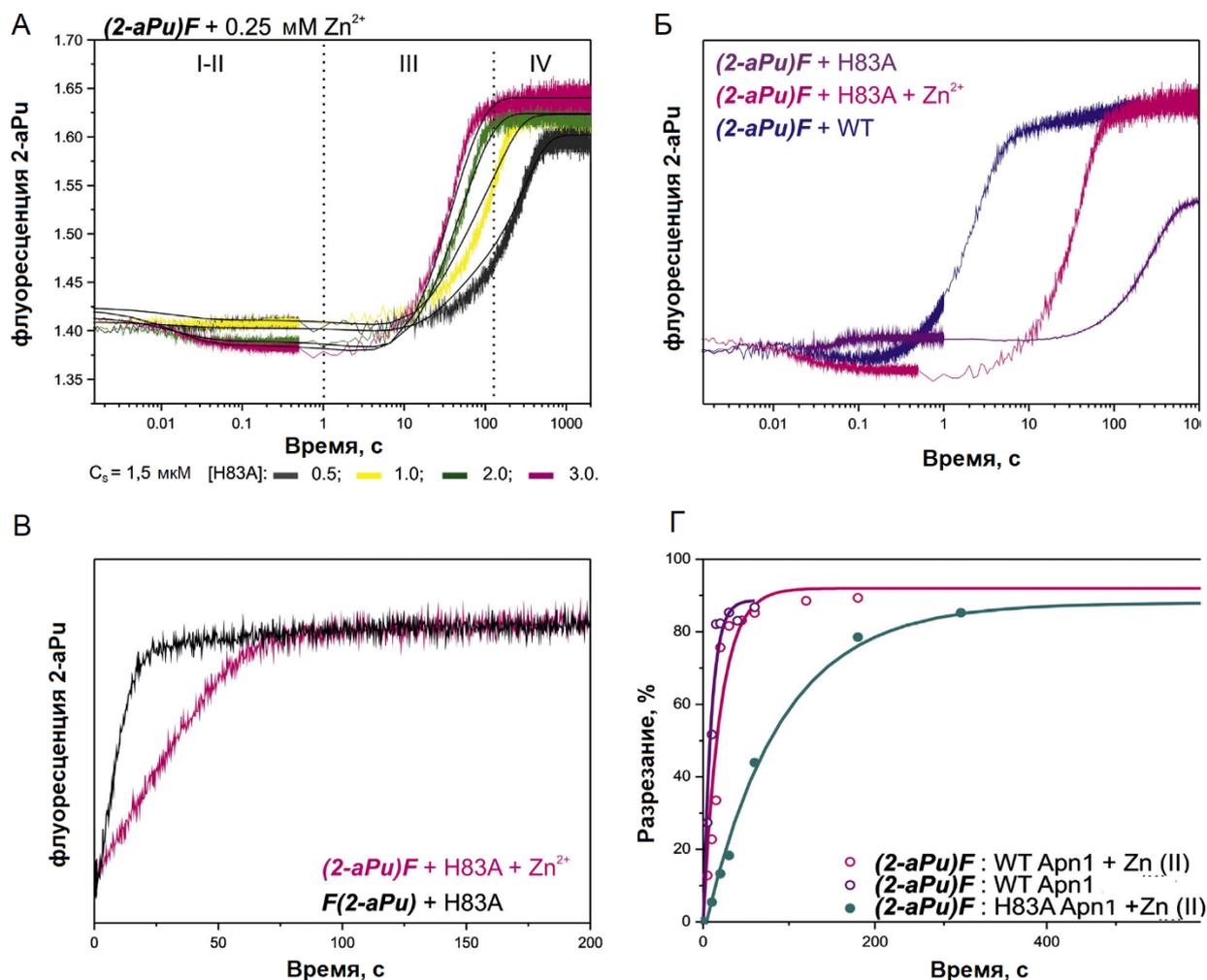


Рисунок 62. Конформационная динамика дуплексов ДНК при взаимодействии с WT Apn1 и мутантной формой H83A. (А) (2-aPu)F дуплекс в присутствии ионов Zn^{2+} , взаимодействующий с H83A Apn1. [ДНК]=1,5 мкМ, концентрацию фермента варьировали в диапазоне 0,5 - 3,0 мкМ. [Zn^{2+}]=0,25 мМ. (Б) Суперпозиция кинетических следов взаимодействия H83A Apn1 и WT Apn1 с дуплексом (2-aPu)F в присутствии и в отсутствии Zn^{2+} , концентрация фермента 3,0 мкМ, [Zn^{2+}]=0,25 мМ. (В) Суперпозиция кинетических следов взаимодействия H83A Apn1 с (2-aPu)F дуплексом в присутствии ионов Zn^{2+} и дуплекса F(2-aPu). (Г) Динамика разрезания субстрата (2-aPu)F ферментами WT и H83A Apn1 в присутствии и отсутствии Zn^{2+} (по результатам анализа продуктов в ПААГ).

На основании исследования роли остатка His83 эндонуклеазы *Apn1* из *S. cerevisiae* в каталитическом выщеплении AP-сайта можно заключить, что, возможно критичным для формирования правильного каталитического комплекса является наличие и расположение ионов Zn^{2+} . Результаты моделирования показывают, что все три иона Zn^{2+} принимают непосредственное участие в координации в активном центре фермента WT *Apn1* вывернутого из двойной спирали ДНК AP-сайта. Кроме того, они участвуют в формировании переходного состояния вследствие перераспределения электронной плотности на фосфате рядом с расщепляемой связью. Остаток гистидина в положении 83 является критически важным для каталитической активности *Apn1*. Введение мутации H83A приводит к существенному уменьшению наблюдаемой константы скорости расщепления ДНК-субстрата. Такое влияние вызвано нарушением координации AP-сайта в переходном состоянии, и, по-видимому, главное – изменением расположения иона Zn1 относительно межнуклеотидного фосфата с 5'-стороны от AP-сайта. Такое нарушение сети водородных связей влечет за собой небольшие флуктуации в положении иона Zn2 и очень существенные нарушения в расположении иона Zn3 – как раз он является ключевым звеном в образовании продукта расщепления ДНК и стабилизирует продукт реакции.

3.3.2. Кинетические и структурные особенности вовлечения эндонуклеазы *Apn1* из *S. cerevisiae* в NIR репарацию

Эндонуклеаза APE1 человека принадлежит к семейству эндонуклеаз Eho III, которые эффективно расщепляют модифицированные нуклеотиды в двуцепочечных ДНК по пути NIR [243, 257]. Также в процессе NIR может принимать участие нуклеаза *Apn1*. Недавнее исследование сайтов связывания *Apn1* *S. cerevisiae* с ДНК-субстратами в условиях окислительного стресса показало, что репарация по пути BER происходит не во всех GC-богатых областях ДНК, и не все GC-богатые регионы содержат *Apn1*-связывающие сайты [258]. Кроме того, в пути репарации NIR *Apn1* участвует в стадии разрезания фосфодиэфирной связи с 5'-конца модифицированного нуклеотида в двуцепочечной ДНК. Экзонуклеазная активность *Apn1* с 3'- и 5'-конца обеспечивает альтернативный путь репарации модифицированных нуклеотидов в

ДНК [259]. Кроме того, Arn1 обладает 3'-фосфодиэстеразной, 3'-фосфатазной и 3'-тирозил-ДНК-фосфодиэстеразной активностями [260].

Для AP-нуклеаз ионы двухвалентных металлов выступают кофакторами. Поскольку ранее мы показали высокую мобильность ионов Zn^{2+} в активном центре мутантной формы H83A Arn1, мы предположили, что ионы Mg^{2+} в буфере NIR будут способны к замещению ионов Zn^{2+} в активном центре с существенными изменениями структуры фермента.

В исследовании анализировали влияния ионов Mg^{2+} на катализ Arn1 в процессе репарации NIR. Для этого, проводили реакцию в буфере, содержащем ионы Mg^{2+} .

В качестве субстратов в исследовании использовали ДНК-дуплексы, содержащие остаток 2aPu в качестве флуоресцентной репортерной группы и 5,6-дигидродезоксисуридин (DHU) как мишень репарации, отличающиеся взаиморасположением 2-aPu и DHU: (2-aPu)DHU и DHU(2-aPu). Реакцию с этими субстратами проводили в буферах, специфичных для BER и NIR с использованием Arn1 дикого типа или мутантной формой H83A Arn1. Буфер для NIR содержал ионы Mg^{2+} , а в буфере для BER ионы магния отсутствовали. Анализ продуктов реакции в ПААГ показал, что NIR-активность WT Arn1 не зависит от типа буфера (BER или NIR), тогда как для мутантной формы H83A Arn1 реакция NIR сильно зависела от ионов Mg^{2+} : присутствие в буфере 5мМ Mg^{2+} снижало скорость расщепления DHU-содержащего субстрата (Рис. 63). Такой эффект может быть вызван вытеснением ионов Zn^{2+} в активном сайте ионами Mg^{2+} .

Взаимодействие дикого типа Arn1 с субстратами DHU и DHU(2-aPu) в буфере NIR ведет к накоплению 90% и 80% продукта реакции, соответственно (Рис. 63 А, В). В случае проведения реакции с мутантной формой H83A, расщепление субстрата DHU было на уровне 40%, а субстрата DHU(2-aPu) на уровне 10% за 3600 с.

Такой характер разрезания можно объяснить конформационными изменениями фермента в комплексе с ДНК, имеющей сложные повреждения, поскольку модифицированные нуклеотиды DHU и 2-aPu расположены рядом друг с другом, и такое расположение препятствует доступу аминокислотных остатков активного сайта фермента и ионов Zn^{2+} к 5'-фосфодиэфирной связи с остатком DHU. Сравнивая эндонуклеазную активность мутантной формы H83A Arn1 в реакциях BER и NIR,

можно заключить, что присутствие аланина вместо гистидина негативно влияет на активность NIR за счет изменения координирования ионов Zn^{2+} . В присутствии 5 мМ Mg^{2+} , снижение NIR-активности H83A Apr1 может быть обусловлена замещением ионов Zn^{2+} в активном сайте ионами Mg^{2+} .

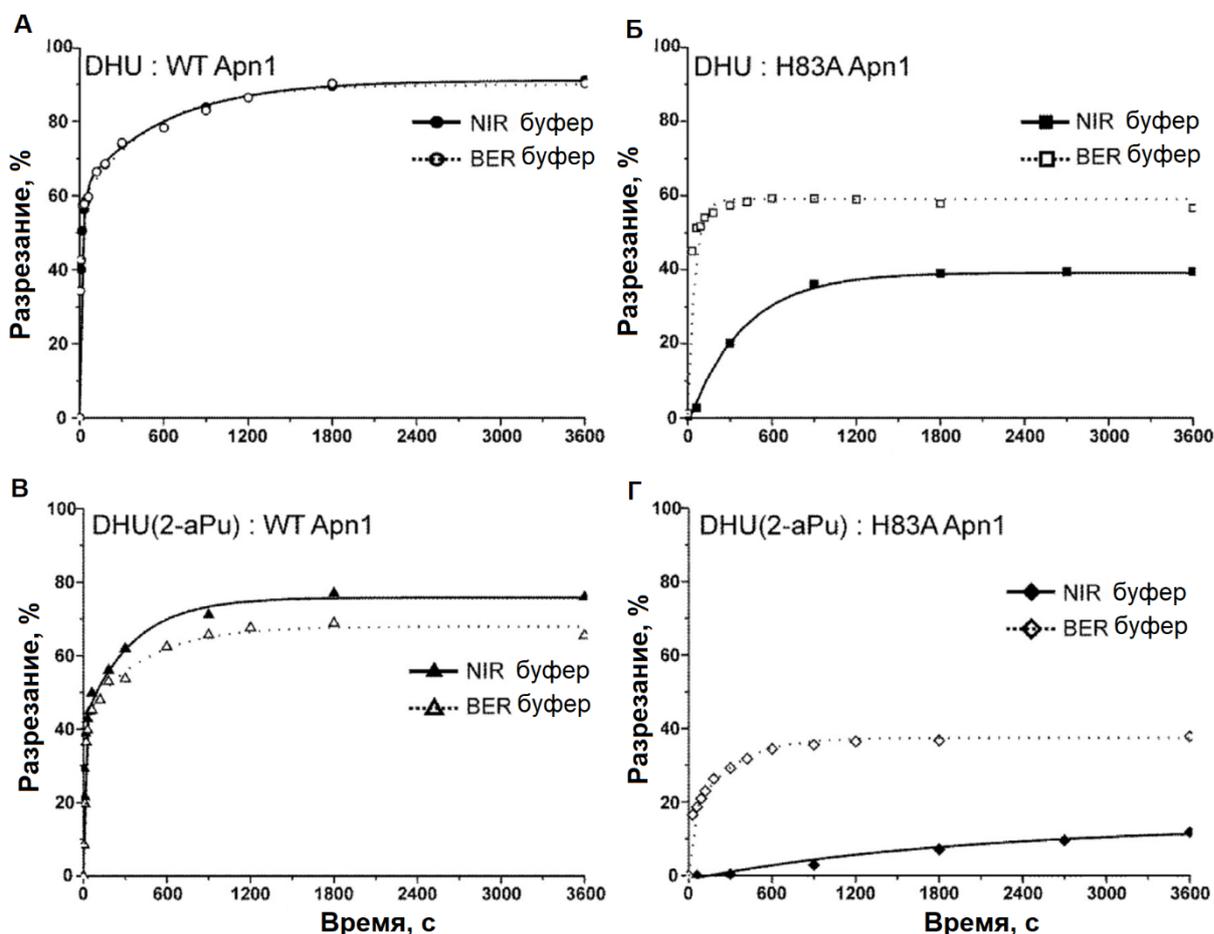


Рисунок 63. Расщепление субстрата DHU (А, Б) и DHU(2-аPu) (В, Г) Apr1 дикого типа (А, В) или мутантной формой H83A Apr1 (Б, Г) в буфере NIR или BER. На рисунке представлено сравнение разрезания ДНК-субстрата в BER или NIR буферах. Во всех реакциях концентрации фермента и субстрата были эквимольными: $[DHU(2-aPu)] = [Apr1] = 1,5$ мМ.

В случае использования ДНК-дуплекса с (2-аPu)DHU, оба фермента – и дикого типа, и форма H83A не появляли NIR активности независимо от присутствия/отсутствия ионов Mg^{2+} (Рис. 64). Мы предполагаем, что Apr1 не может разрезать ДНК-субстрат в дуплексе с (2-аPu)DHU из-за пространственной структуры

комплекса (2-aPu)DHU-Apn1, который, вероятно, был значительно искажен вблизи активного сайта, поскольку две неканонические пары оснований были размещены в непосредственной близости друг от друга. Таким образом, доступ каталитически активным аминокислотным остаткам и ионам Zn^{2+} к 5'-фосфодиэфирной связи, подлежащей разрезанию между остатками 2-aPu и DHU может быть заблокирован.

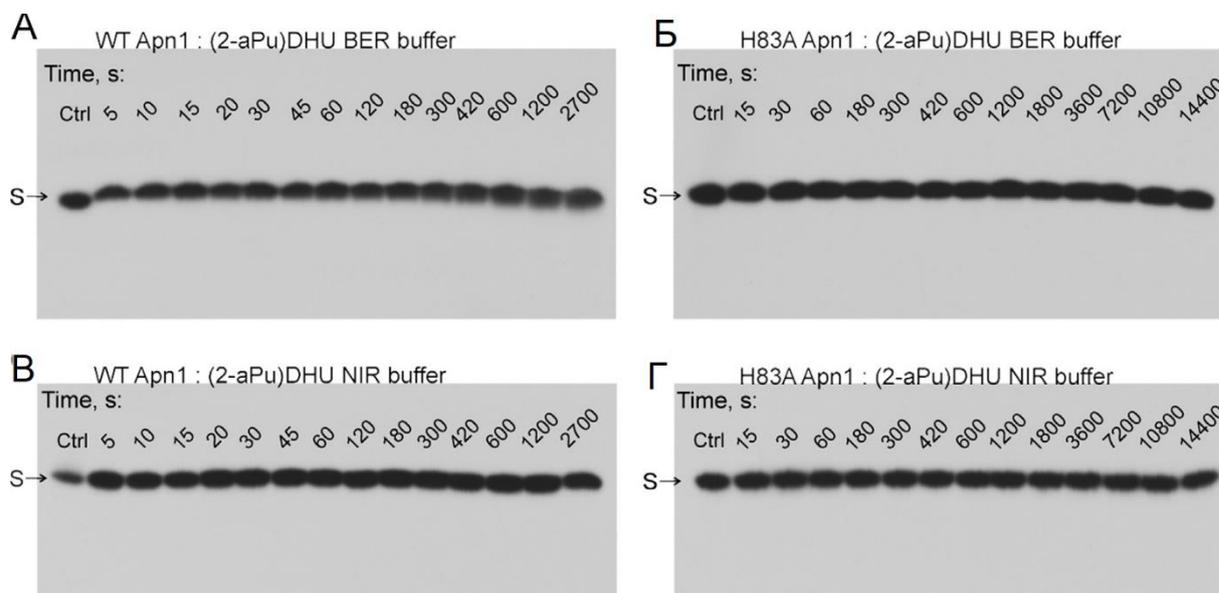


Рисунок 64. Кинетика расщепления ^{32}P -меченного субстрата (2-aPu)DHU с WT Apn1 (А, В) или H83A Apn1 (Б, Г) в буфере BER (А, Б) или NIR (В, Г). Авторадиоавтограф разделения продуктов реакции в ПААГ. S – полоса, соответствующая нерасщепленному субстрату. Ctrl – субстрат в соответствующем буфере без добавления фермента.

Мы применили методы моделирования молекулярной динамики комплекса Apn1 с ДНК чтобы выявить ключевые для стадии узнавания и разрезания в процессе NIR аминокислоты в активном центре фермента. Модельные ДНК-субстраты содержали специфическое повреждение – DHU. Фермент дикого типа координировал три иона Zn^{2+} в комплексе с DHU-субстратами. Анализ пространственного положения остатка 5,6-DHU после разворачивания в активный центр показал, что он претерпевает незначительные изменения положения (Рис. 65). Основным структурным стабилизатором в этом случае выступает аминокислотный остаток Asn279, который участвует в образовании водородной связи с 5,6-DHU (Рис. 65).

Далее стояла задача определить которые из аминокислотных остатков в активном сайте *Apr1* отвечают сначала за распознавание, а далее за удаление 5,6-дигидроурацила (5,6-DHU). Условия взаимодействия фермента с субстратом, несущим повреждение DHU в центральной части дуплекса в процессе NIR были смоделированы методами МД.

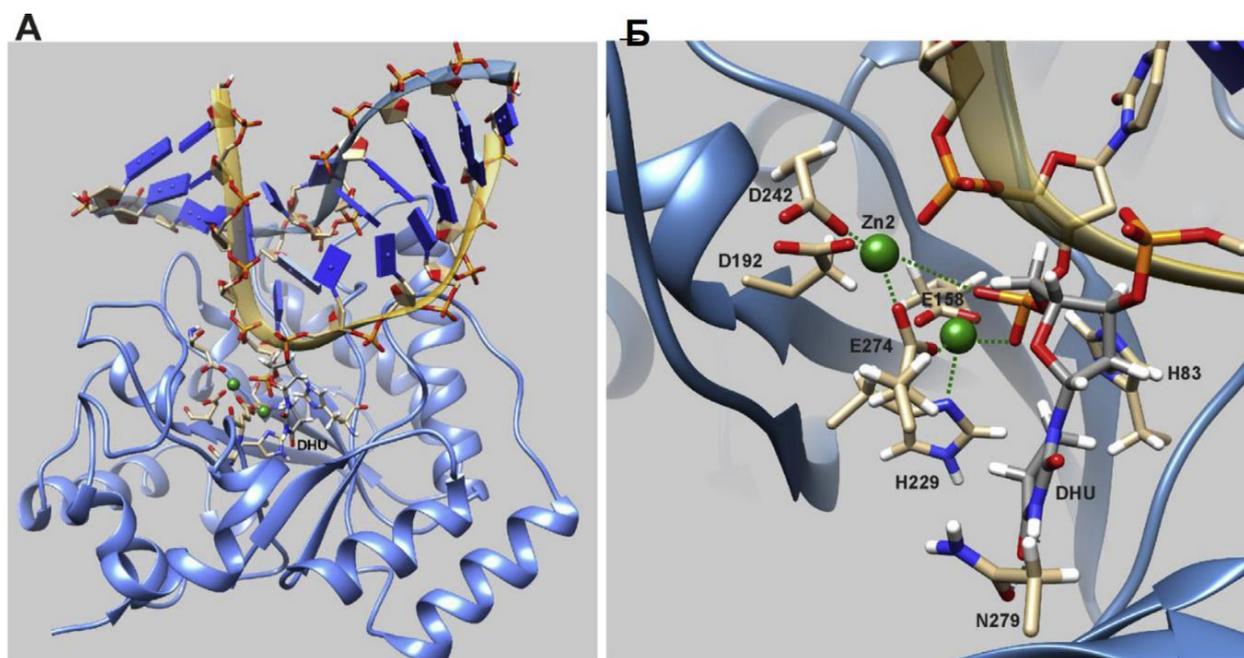


Рисунок 65. Молекулярный комплекс *Apr1* с ДНК-дуплексом. (А) Общий вид комплекса. Ионы Zn^{2+} показаны зеленым цветом. (Б) Расположение остатков активного сайта фермента. Ионы Zn^{2+} изображены зелеными сферами. Аминокислотные остатки His83, Glu158, Asp192, His229, Asp242, Glu274 и Asn279, образующие активный сайт, показаны в виде палочек, окрашенных в соответствии с типом атомов (хаки - углерод; синий - азот; красный - кислород; коричневый - фосфор).

В модельных комплексах молекула *Apr1* дикого типа содержала три иона Zn^{2+} и образовывала комплексы с дуплексами DHU, DHU(2-aPu) или (2-aPu)DHU. Водородная связь, образовавшаяся между остатком DHU и Asn279 стабилизирует “вывернутую” из ДНК конформацию DHU (Рис. 66).

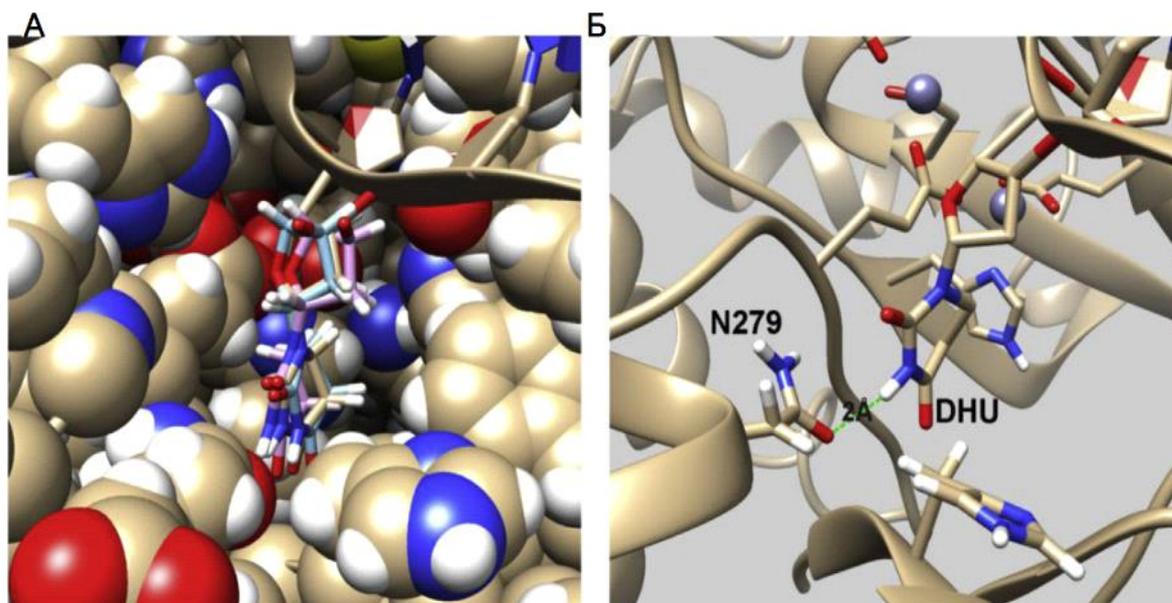


Рисунок 66. Поворот остатка DHU в карман активного сайта WT Apr1. (А) Наложение остатка DHU, расположенного в глубоком и узком кармане Apr1 в ходе МД-моделирования. (Б) Водородная связь, образованная остатками DHU и Asn279. Два иона Zn^{2+} расположены внутри.

Таким образом, NIR-активность Apr1 специфична к широкому спектру модифицированных оснований. Для восстановления поврежденной геномной ДНК альтернативный путь NIR может привлекать Apr1 в случае функционального отказа ДНК-гликозилазы, что демонстрирует значимость Apr1 для различного типа повреждений, за исключением разрывов ДНК.

3.4. Структура NEIL2 человека по данным HDX-MS⁵

Для детекции взаимодействий белок-лиганд и белок-белок необходимы аналитические инструменты, способные обнаруживать структурные изменения таких взаимодействий. В настоящее время во многих биохимических, фармакологических и клинических исследованиях используются методы оптического, кругового дихроизма (CD), ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) [261] и масс-спектрометрического детектирования [262]. Однако не все белки можно изучать

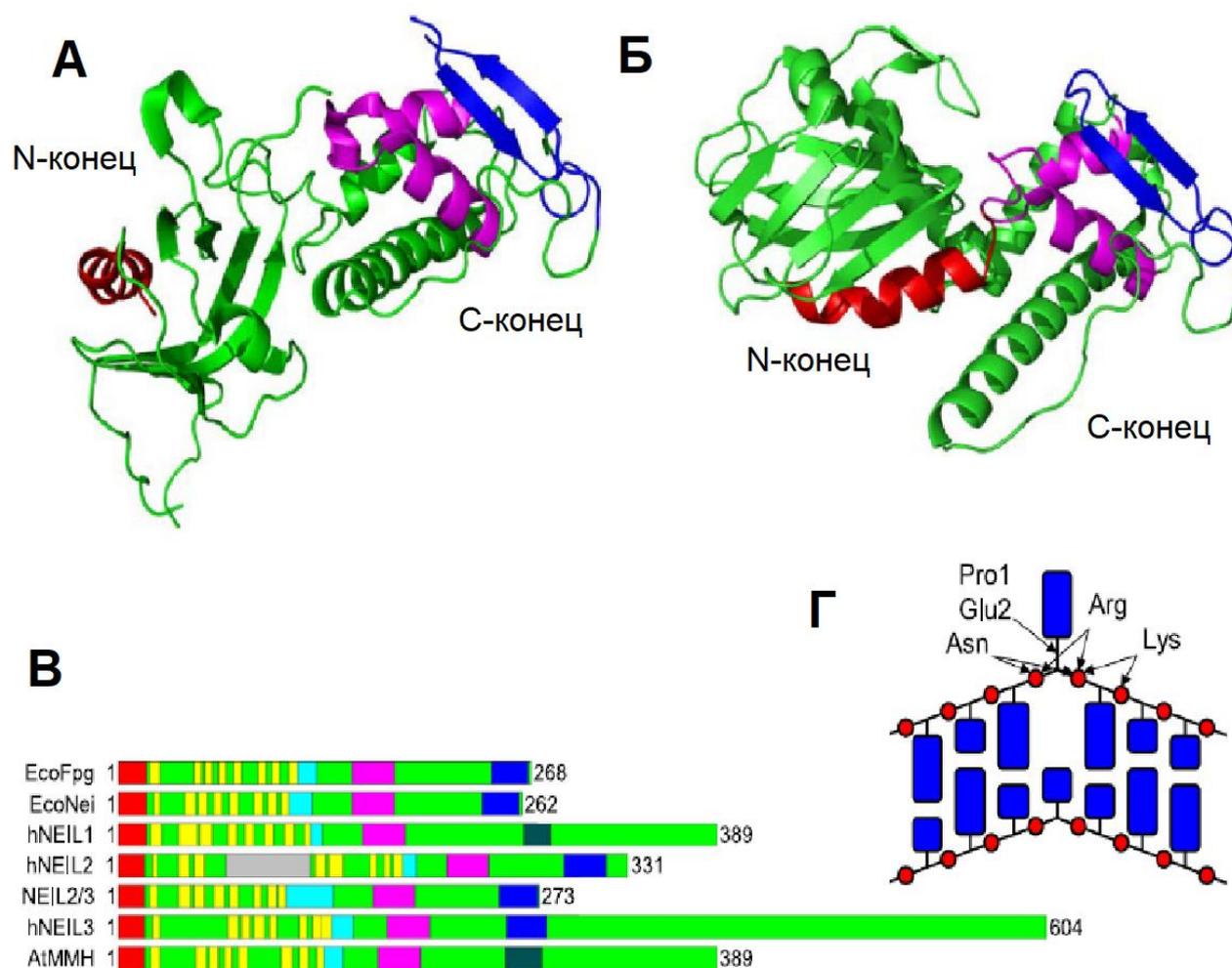
⁵ В настоящей главе использованы материалы, опубликованные в работах [1] и [6] из списка на стр. 215 – 218.

этими методами из-за ограничений растворимости и/или размера. Например, круговой дихроизм (CD), один из наиболее распространенных спектроскопических методов, используемых для изучения третичной структуры белков требует высокой очистки белка и отсутствия мешающих белков и примесей или оптически активных буферов [263]. Методы ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии (MS) также часто используются для изучения очищенных образцов белков. Для изучения основ узнавания в белково-нуклеиновых комплексах необходима методология, которую можно применять для изучения белковой структуры высших порядков при белково-лигандных взаимодействиях в растворе. Таким инструментом может стать масс-спектрометрия с использованием водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS), который широко используется для исследования белково-лигандных взаимодействий. Обмен лабильных протонов на дейтерий в амидах, спиртах, карбоновых кислотах, или аминах регистрируется с помощью MS и ЯМР [264]. Поскольку NH-протон способный к обмену с дейтерием существует практически в каждой пептидной связи белка (кроме пролина), HDX - очень полезный метод для понимания структуры высшего порядка и фолдинга белка. Гидрофобные внутренние области структурированных белков обладают сильными водородными связями, что ограничивает обмен водорода/дейтерия в этих регионах и позволяет оценить их конформационную структуру [265]. Таким образом, HDX-MS является исключительно полезным инструментом для изучения конформации и динамики белков, которые трудно изучать с помощью обычных биофизических методов [266].

Метод HDX-MS был применен нами для определения расположения высоко- и низкомолекулярных сайтов в структуре гликозилазы hNEIL2 в растворе. Эндонуклеаза VIII-подобный белок 2 человека (hNEIL2) принадлежит к структурному суперсемейству “спираль-два поворота-спираль” (H2TH) ДНК гликозилаз (Рис. 67). Этот фермент проявляет уникальную специфичность к окисленным пиримидинам в ДНК-субстратах, отличных от канонической В-формы: одноцепочечным ДНК, G-квадруплексам, петлям, шпилькам и межцепочечным сшивкам. Структура белка hNEIL2 не была изучена в связи с трудностями регистрации его конформационных изменений в растворе. Наиболее близким гомологом hNEIL2 с изученной структурой является NEIL2 опоссума (oNEIL2) (Рис. 67А). Показано, что структуры ДНК-

связанных H2TH ДНК-гликозилаз представляют закрытый комплекс с каталитическими остатками, принадлежащими к различным доменам, точно расположенным для удержания вывернутого вырезаемого нуклеотида и осуществления нуклеофильной атаки на его С1' атом.

Рисунок 67. Структурные особенности ДНК-гликозилаз семейства H2TH. Структура открытой (А) конформации на примере oNEIL2 и закрытой (Б) на примере



mvNEIL2/3. Красным изображена N-концевая петля, сиреневым – H2TH мотив, глубоким – домен цинковых пальцев. (В) – Ключевой структурный мотив в различных H2TH ДНК-гликозилазах. Желтым изображен β -сэндвич. (Г) – схематическое изображение контактов H2TH ДНК-гликозилаз с сахаро-фосфатным остовом вокруг поврежденного основания.

Тем не менее, структуры свободных Nei из *E. coli*, Fpg из *Neisseria meningitides*, и oNEIL2 опоссума демонстрируют вращение домена, что ведет к открытой

конформации, в которой каталитический сайт разобщен из-за больших расстояний между его остатками, принадлежащими к разным доменам, и вопрос о структуре свободного hNEIL2 оставался открытым.

Для проведения расщепления белка в режиме онлайн с последующим ВЭЖХ-МС анализом была сконструирована и изготовлена экспериментальная установка. Анализ скорости водородно-дейтериевого обмена отдельных пептидов проводили в программном обеспечении DynamX (версия 3.0, Waters) и HDExaminer (версия 3.1, Sierra Analytics). Для этого первоначально была построена пептидная карта на основе недейтерированных пептидов с параметрами точности массы 10 ppm (миллионных долей) и минимальным отношением продукт/аминокислота 0,1. Уровень покрытия последовательности белка пептидами составлял до 96.7%, кроме области с 176 по 181 аминокислоту. Белок инкубировали в буфере с дейтериевой водой ($pD=7,6$), после чего проводили HDX-MS пептидов после расщепления пепсином.

Уровень водородо-дейтериевого обмена для разных пептидов оказался разным на начальных этапах инкубации белка в дейтериевом буфере (Рис. 68). Полный временной ход событий обмена H/D для каждого пептида иллюстрируется графиком на Рис. 68А. Видно, что амидные водороды остатков 56-129 обмениваются быстро и достигают максимума насыщения в течение первых десяти секунд, что соответствует поведению неструктурированных областей. Поскольку эта неструктурированная петля имеет повышенное содержание пролина (10 из 74 остатков, или 13,5%, являются пролинами, по сравнению с 6,2% в остальной части полипептида), она расщепляется пепсином не эффективно. В результате, полученные пептиды, покрывающие петлю $\beta 3/\beta 4$, были нетипично длинными, что затрудняло их анализ с помощью программы DynamX. Соответствующие пептиды были вручную добавлены в список пептидов во время обработки данных. И наоборот, амидные водороды остатков 1-55, 195-230, 237-266 и 270-322 показали более медленную скорость поглощения дейтерия, что характерно для областей со стабильной вторичной структурой.

Таким образом, можно заключить, что, наиболее быстрый и интенсивный обмен происходил в уникальном для hNEIL2 фрагменте – неструктурированной петле $\beta 3/\beta 4$ в области 56-129 а.о. Другим фрагментом с быстрым замещением дейтерием водородов амидных групп была область с 181 по 196 а.о., и это соответствует области

степени неструктурированной во всех депонированных последовательностях. Интересно, что наименее неструктурированным из всех проанализированных последовательностей был этот фрагмент у oNEIL2 из опоссума. Возможно, именно этот факт может частично объяснить, почему попытки кристаллизации hNEIL2 не увенчались успехом, в то время как oNEIL2 образовывал дифракционные кристаллы [174].

Вопрос о конформации hNEIL2 в комплексе с ДНК долгое время оставался открытым. Для интерпретации данных HDX-MS большую помощь может оказывать моделирование методами МД. Как правило, ДНК гликозилазы семейства H2TH при связывании с ДНК переходят из открытого состояния в закрытое с движением в N- и C-концевых доменах (Рис. 67А, Б). Закрытая конформация в комплексе с ДНК подтверждалась рентгеноструктурным анализом для большинства гликозилаз типа H2TH, тогда как открытая конформация свободного фермента в растворе была недоступна для регистрации. Поскольку рассчитанной структуры hNEIL2 не существовало, мы построили две гомологичные модели, одна из которых была основана на "открытой" структуре oNEIL2 [174], а другая – на "закрытой" структуре mvNEIL2/3 [175]. Неупорядоченная петля между $\beta 3$ и $\beta 4$ не была включена в модели; в структуре oNEIL2 ее пограничные остатки направлены в сторону от N-концевого домена что позволяет предположить, что петля не взаимодействует с остальной частью белка.

Ион Zn^{2+} был помещен в мотив цинкового пальца до проведения МД. Для обеих конформаций белка 100 нс МД-симуляция проводилась дважды, чтобы оценить воспроизводимость результатов. Анализ МД-траекторий показан на рис. 69. RMSD для hNEIL2 был представлен, чтобы показать стабильность белка на протяжении всей 100 нс МД-траектории. На рис. 69 также показана диаграмма "открытой-закрытой" конформаций после достижения системой равновесия (последние 20 нс МД). По оси x показана разница в расстояниях между $C\alpha$ -атомами Lys49 и Asn230 для открытого (розовый) и закрытого (красный) состояния. Сопоставление относительного поглощения дейтерия для каждого пептида из модельной структуры выявило взаимосвязь между эффективностью поглощения и стабильностью белковой области в МД. Первая складчатая область начинается от N-конца и продолжается до пептида

46-59. Эта часть белка содержит N-концевую α A-спираль с каталитическими остатками Pro1 и Glu2 и часть β -сэндвича до неструктурированной петли β 3/ β 4.

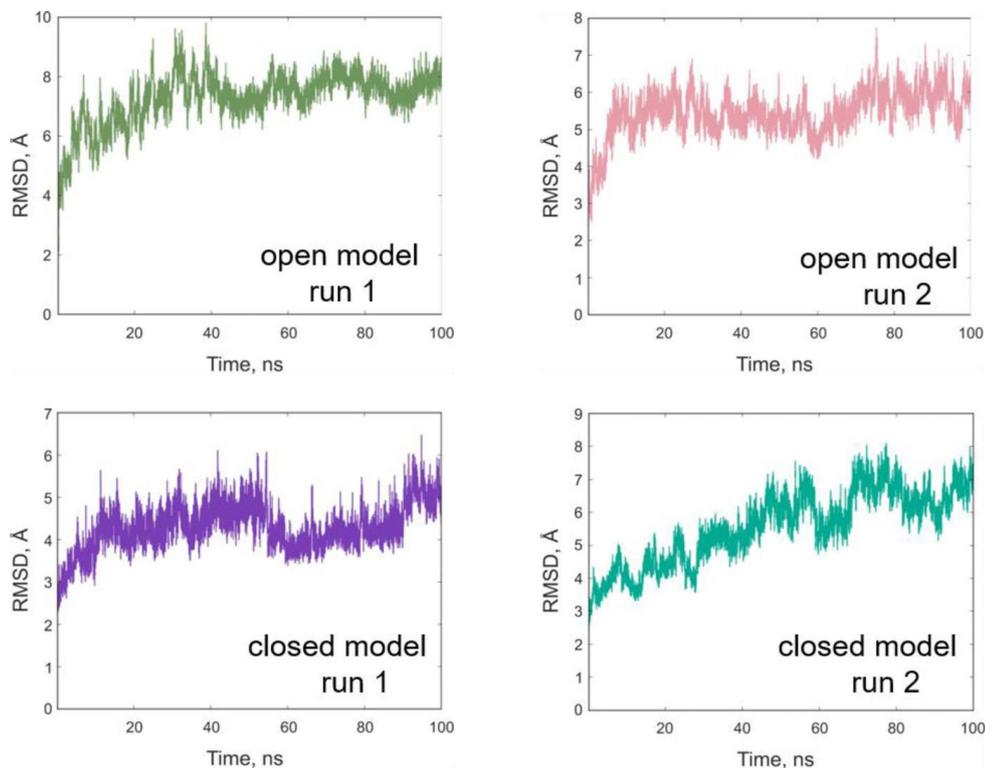


Рисунок 69. RMSD флуктуации hNEIL2 на всей траектории МД.

Неструктурированная петля покрыта пептидами, включающими остатки 56-129 и демонстрирует быстрое поглощение дейтерия. Поведение быстрого обмена продолжается приблизительно до позиции 196, вовлекая конец N-концевого домена, междоменный линкер и начало С-концевого домена. Остальная часть С-концевого домена имеет медленную кинетику обмена дейтерия и представляется хорошо структурированной.

Чтобы рассмотреть области, подвергающиеся локальным перестройкам между открытым и закрытым состоянием, мы усреднили заполненность каждой отдельной водородной связи в обоих повторах каждой модели и выбрали те, которые показывают наибольшую разницу между двумя конформациями (Рис. 69). Остатки с наиболее заметными изменениями в схеме водородных связей сгруппированы в петлях β 1/ β 2 и β 5/ β 6 в концевом домене, междоменном линкере и домене цинковых пальцев.

На основании данных HDX-MS/MD показано, что в свободном состоянии в растворе белок hNEIL2 предпочтительно находится в открытой конформации. Характерная для NEIL2 позвоночная область, содержащая протяженную инсерцию в N-концевом домене и отсутствующая в других ДНК гликозилазах, в растворе находится в неструктурированном состоянии (Рис. 70).

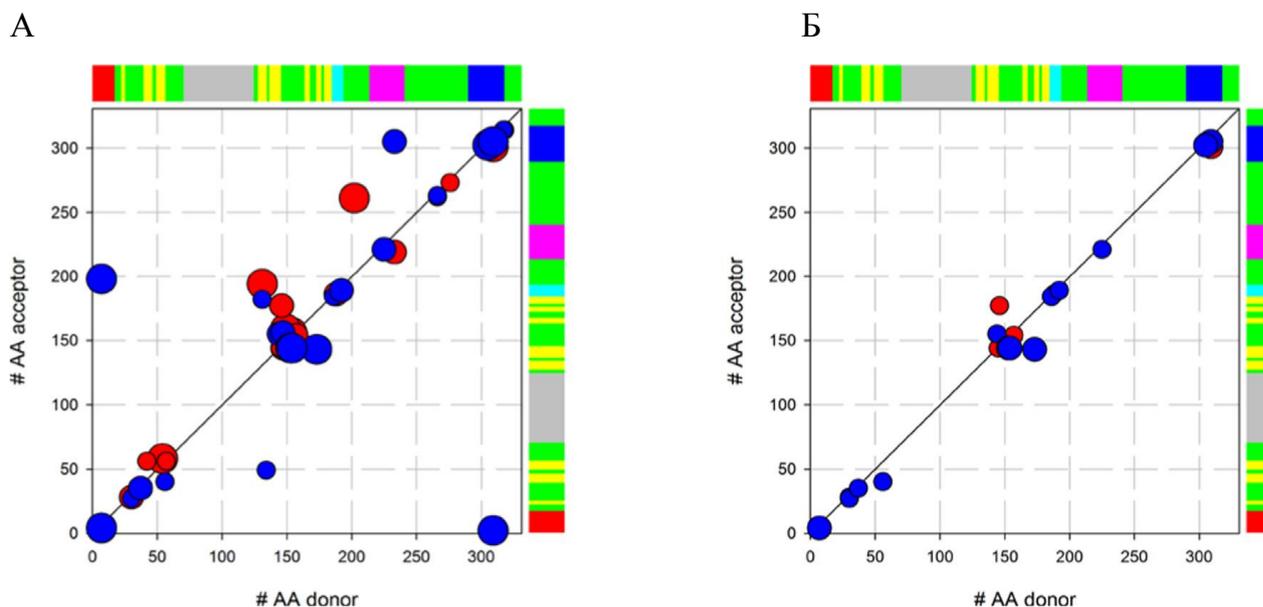


Рисунок 70. Локально перестроенные водородные связи hNEIL2 в МД. Наибольшие различия в заселенности всех внутримолекулярных водородных связей (А) или амидных водородных связей (Б) между открытой и закрытой конформациями. Показаны только связи с $SD > 3$ от среднего значения. Цветные полосы схематически изображают ключевые структурные элементы hNEIL2, как на рисунке 54(В).

Полученные в работе данные позволили четко подтвердить, что открытая конформация является предпочтительной в растворе для свободного hNEIL2. Можно заключить, что hNEIL2 является конформационно подвижным белком, что может быть связано с его участием в репарации неканонических структур ДНК и/или вовлечением в функциональные и регуляторные белок-белковые взаимодействия.

3.5. Конформационные изменения эндонуклеазы Cas9, выявленные методом HDX-MS ⁶

В настоящее время в научной литературе наблюдается интенсивный интерес к детальным механизмам и динамическим аспектам функционирования ферментов, взаимодействующих с ДНК [268–270]. Среди ДНК-узнающих белков интерес исследователей прикован к системе CRISPR/Cas9, которую начали использовать для редактирования генома [271, 272]. Простота системы CRISPR-Cas9 обеспечила ей широкую востребованность в мировой научной практике: эта система включает в себя белок Cas9 и направляющую одноцепочечную РНК (sgRNA) [32, 273], сконструированную на основе crRNA и tracrRNA. Такая система, тем не менее, страдает от систематического недостатка – разрезания не полностью комплементарной ДНК [125,126,127]. Недавно было показано, что мутагенез остатков, стабилизирующих мисматч, снижает расщепление ДНК вне мишени, но сохраняет быстрое расщепление ДНК в мишени [277]. Обычно при редактировании генома для решения генно-инженерных задач с использованием sgRNA/Cas9 допускается до 6 несовпадений в комплементарной области sgRNA•tDNA [278], а Cas9 также расщепляет dsDNA на участках в отсутствие экстракта 5'-NGG-3' последовательности PAM в dsDNA [279]. Вставки и делеции в tDNA в комплементарной области tDNA/sgRNA также являются распространенными ошибками [280]. Поэтому, для эффективного редактирования ДНК-субстратов их точное узнавание ферментом Cas9 имеет критическое значение и определяет возможности практического применения этой системы.

Известно, что Cas9 содержит два эндонуклеазных домена, HNH и RuvC, которые расщепляют комплементарную цепочку ДНК (целевую ДНК-цепь) и некомплеметарную (нецелевую ДНК-цепь) [32, 281, 282], и что расщепление ДНК, катализируемое Cas9, требует наличия короткой последовательности, известной как ориентированный на прото-спасер примыкающий мотив (PAM), расположенный сразу же после последовательности ДНК-мишени [281, 282]. Насколько селективным будет действие системы CRISPR-Cas9, в большей степени определяет направляющая

⁶ В настоящей главе использованы материалы, опубликованные в работах [2-4] из списка на стр. 215 – 218.

РНК. Именно комплементарность между ней и редактируемой областью ДНК важна для селективного позиционирования активного центра Cas9. Специфический гидролиз в целевом сайте зависит от структуры Cas9, которая формируется взаимодействием определенных аминокислотных остатков.

В настоящее время недостаточно информации о том, как изменяется структура Cas9 при взаимодействии с неполной комплементарной ДНК мишенью для регуляции эндонуклеазной активности Cas9. Поэтому, интересно было зарегистрировать структурные изменения фермента методом HDX-MS при взаимодействии с ДНК-субстратами, изучить селективность узнавания биохимическими методами анализа, и установить детальный молекулярно-кинетический механизм действия эндонуклеазы Cas9 в процессе узнавания и расщепления ДНК.

Для решения поставленных задач изучали конформационные изменения, выявленные методом HDX-MS, при взаимодействии фермента с ДНК-субстратами, имеющими по одной замене в цепи ДНК для создания модели неполной комплементарности, и при введении мутаций в эндонуклеазные домены, ответственные за расщепление каждой из цепей двуцепочечной ДНК для изучения регуляции эндонуклеазной активности. Селективность действия определяли по способности системы CRISPR-Cas9 расщеплять данные субстраты.

Среди недостатков существующих кристаллических структур нуклеазы Cas9 и ее комплексов можно отметить, что большинство представляют собой усеченный вариант или содержат неразрешенные неупорядоченные области (Рис. 71).

Для компьютерного моделирования были выбраны полноразмерная нуклеаза apoCas9 *Streptococcus pyogenes*, и комплексы Cas9–sgRNA и Cas9–sgRNA–DNA. Чтобы получить начальные координаты всех атомов, проводили моделирование Cas9 по гомологии с помощью сервера Phyre2. Для получения релевантной модели, были добавлены данные о недостающих остатках с помощью программных пакетов Chimera 1.15 и Modeller. В рассчитываемую модель были вручную добавлены координаты катионов магния и комплекса Cas9 с направляющей РНК. Координаты для комплекса Cas9 с направляющей РНК были получены на основе данных кристаллической структуры комплекса Cas9–sgRNA–DNA из *Staphylococcus aureus*

(PDB ID: 5CZZ), для чего с помощью программных пакетов LEaP (Amber20) и UCSF Chimera 1.15 были внесены необходимые изменения, связанные с особенностями конкретно здесь используемых молекул. Первоначальная теоретическая модель включала 10-звенную ДНК, 1360 аминокислот, три катиона магния и sgRNA (85 нуклеотидов).

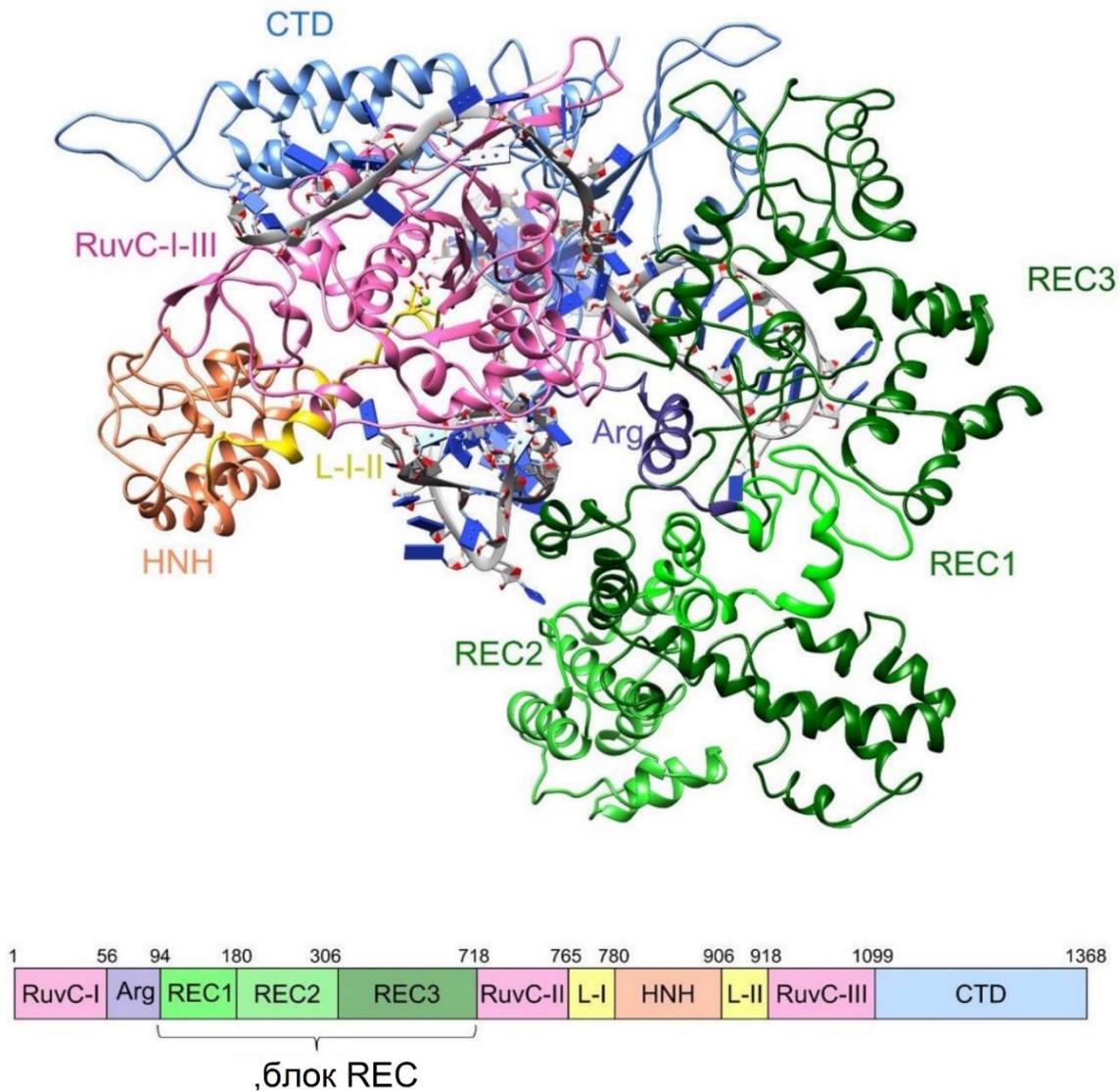


Рисунок 71. Общая структура Cas9 из *Streptococcus pyogenes* в комплексе с sgRNA и целевой ДНК. Окраска функциональных фрагментов на пространственной модели и схеме последовательности белка совпадает.

При моделировании нуклеотидные последовательности направляющей РНК и ДНК-мишени не полностью воспроизводили последовательности таковых,

использованных в экспериментах по водородно-дейтериевому обмену. Тем не менее, мы сохранили фрагменты, которые являлись ключевыми в моделируемом взаимодействии. Моделирование методом молекулярной динамики позволило получить информацию о стабильности свободной Cas9, ее комплексов и их динамике.

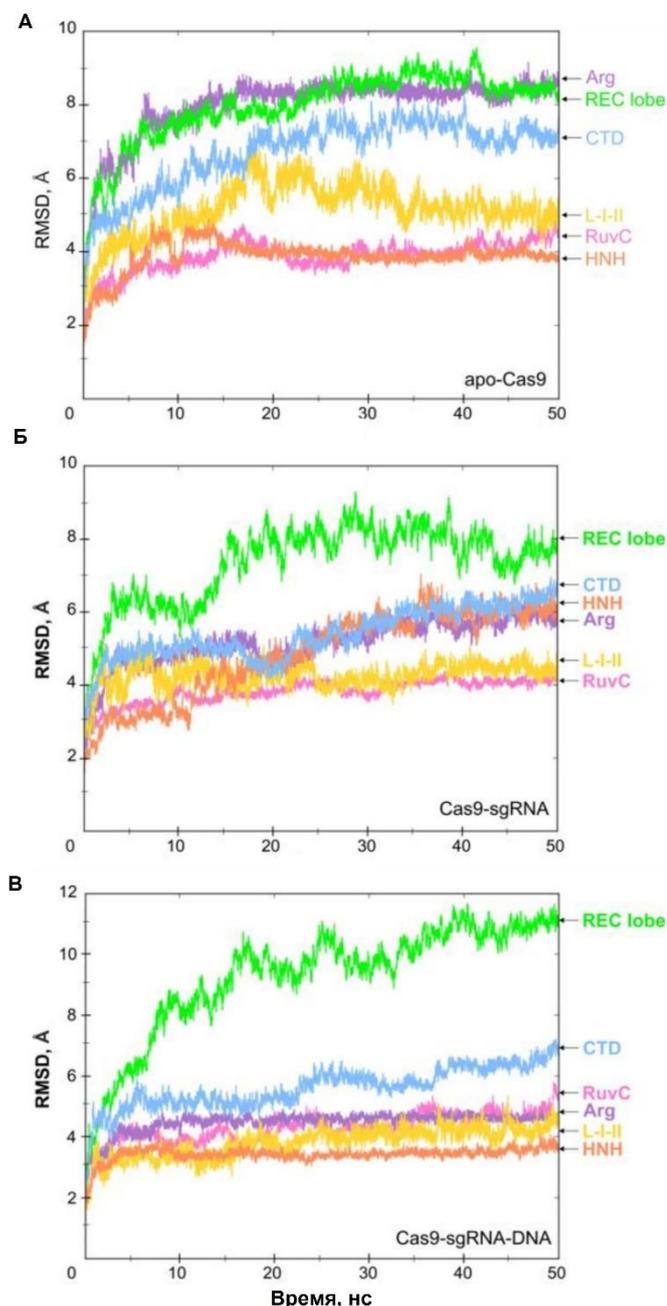


Рисунок 72. Изменение параметра RMSD (в ангстремах) от времени симуляции на траектории 50 нс для апофермента apoCas9 (А), двойного комплекса Cas9–sgRNA (Б), и тройного комплекса с ДНК-субстратом Cas9–sgRNA–DNA (В). На кривых представлены средние значения отклонения для доменов нуклеазы Cas9: REC lobe (зеленый), CTD (синий), RuvC (розовый), и HNH (оранжевый), и линкерных

олигопептидов L-I-II (желтый) и Arg (фиолетовый). Амплитуда отклонения коррелирует с динамикой флуктуаций белка.

Для апофермента apoCas9 характерна относительная стабильность в ходе всей MD-траектории (50 нс). Данные Рис. 72А показывают, что все домены белка быстро достигают равновесия на временах около 5 нс и далее флуктуируют в пределах 1 Å на протяжении остального времени моделирования. Динамика среднеквадратичного отклонения (RMSD) свидетельствует о достаточно высокой стабильности всех доменов в комплексе Cas9–sgRNA, кроме фрагмента REC, флуктуации в котором при взаимодействии с РНК значительно изменились (Рис. 72). Профиль RMSD, полученный для тройного комплекса с субстратом Cas9-sgRNA-DNA соответствовал в основном аналогичному профилю для двойного комплекса Cas9-sgRNA. Тем не менее, введение в систему ДНК-субстрата изменило характер поведения конкретных доменов (Рис. 72В). Полученные данные позволили установить, что наиболее мобильным был фрагмент REC3 в домене REC.

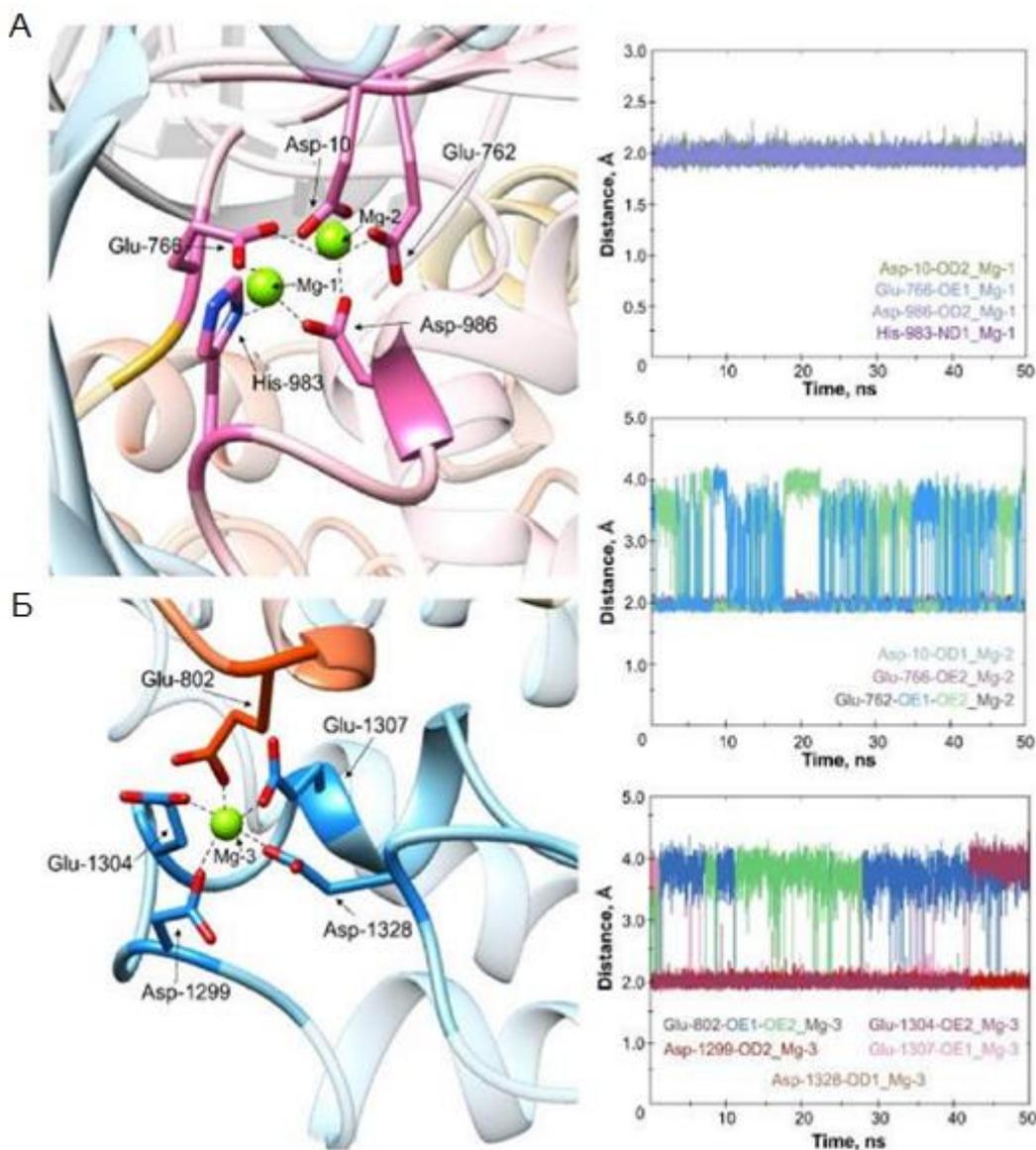


Рисунок 73. Моделирование методом МД координационных центров ионов металлов в комплексе Cas9–sgRNA–DNA. (А) Координация катионов магния Mg-1, Mg-2, (зеленые сферы) аминокислотами домена RuvC (выделен розовым) белка Cas9. (Б) Расположение катиона магния (Mg-3, зеленая сфера) в составе домена CTD (синий). Координирующий остаток Glu802 находится в составе домена HNH (оранжевый). На панели (Б) приведены флуктуации расстояния (RMSD) между функциональной группой аминокислоты и координированного с ней катиона металла.

Полученные в результате моделирования структуры апофермента нуклеазы apoCas9 и ее комплексов с sgRNA и с ДНК содержали три катиона магния,

локализованные в доменах RuvC и CTD. Расстояния между катионами магния и координирующими аминокислотами белка в тройном комплексе Cas9- sgRNA-DNA показаны на Рис. 73В.

Установлено, что ионы Mg^{2+} координируются карбоксилатными остатками Asp10, Glu762, Glu766, Asp986 и остатком His983 (Рис. 73) на одинаковых расстояниях ($\sim 2 \text{ \AA}$), что согласуется с данными кристаллографии [283]. Только один атом кислорода в боковом радикале Glu762 взаимодействует с катионом Mg^{2+} в конкретный момент времени. Можно заключить, что расстояние между координирующим атомом кислорода и ионом металла сохранялось на уровне около 2 \AA , в то время как другой атом кислорода отдалялся приблизительно на 4 \AA . Третий катион магния (Mg-3) был локализован между CTD и HNH-доменами белка. Остатки Asp1299, Glu1304, Glu1307 и Asp1328 из спирального РАМ-взаимодействующего домена и Glu802 из HNH домена обеспечивают координацию иона Mg-3 (Рис. 73). Таким образом, стабильность положения ионов металла во время моделирования свидетельствует о состоятельности представленной модели всего комплекса.

Для анализа распределения поглощения дейтерия по структуре белка, измеренное относительное поглощение дейтерия после 1 и 480 мин инкубации в D_2O было спроецировано на наши смоделированные структуры для комплекса Cas9- sgRNA (Рис. 74). Полученные данные свидетельствуют о высокой степени корреляции между уровнем поглощения дейтерия и доступностью соответствующих фрагментов белка для взаимодействия с молекулами воды. Так, например, данные по пептидному фрагменту 92-97, локализованному на краю междоменного линкера Arg, убедительно подтверждают изменение уровня обмена для свободного и связанного состояния.

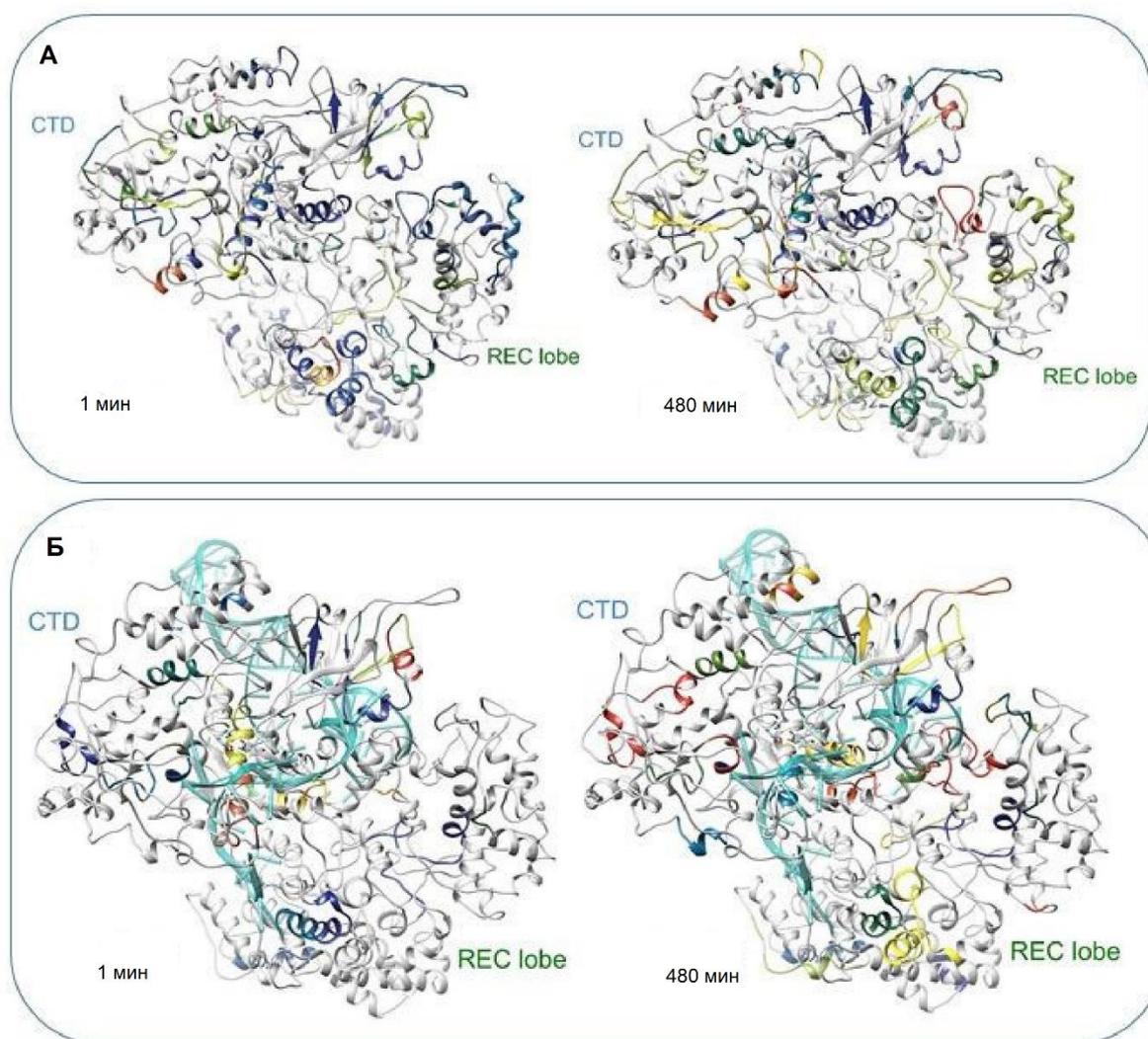


Рисунок 74. Относительный захват дейтерия белком Cas9 (А) и двойным комплексом Cas9-sgRNA (Б) на временах 1 мин и 480 мин, совмещенный со структурой, построенной методом молекулярной динамики. РНК показана как светло-голубая лента. Цвет пептидов совпадает с цветом пептидов на Рис. 58.

Этот спиральный линкер лежит на внутренней поверхности расщелины спиральной доли [283] и имеет обширные контакты с сгРНК. Согласно данным HDX, поглощение дейтерия пептидом 92-97 в связанном состоянии изменилось с равномерного на низкое, что указывает на защиту его амидных водородов в комплексе с сгРНК от обмена. Это предположение подтверждается уменьшением значений RMSD, наблюдаемое при переключении между модельными структурами apoCas9 и Cas9-sgRNA (Рис. 74А, Б). Аналогичная тенденция наблюдалась для линкерной области L-

II, представляющей собой петлю со спиральными элементами (пептид 905-911). В апоферменте apoCas9 данный пептидный фрагмент локализован на поверхности белка, а в составе комплекса с ним соседствуют петлевые области доменов RuvC III и HNH, в результате уровень водородно-дейтериевого обмена падает с высокого до низкого. Этот результат хорошо коррелирует с данными криоэлектронной микроскопии, полученными для каталитически компетентного тройного комплекса Cas9-РНК-ДНК, в котором происходит конформационный переход пептидного линкера L-II из спирали в петлю, повышающий подвижность домена HNH [284].

Для определения влияния структуры ДНК-дуплексов, сформированных частично с образованием неканонических Уотсон-Криковских пар, на эффективность расщепления ДНК в таких дуплексах системой CRISPR-Cas9 в растворе, проводили термодинамический анализ таких взаимодействий. Белок Cas9 был наработан и выделен из линии супер-продуцирующих клеток *E. coli* по стандартной методике. Оценка активности белка Cas9 была проведена на ДНК плаزمиды *in vitro*: целевая плаزمиды, содержала ген ANXA6, а другая являлась контрольной (нецелевой) - без данного гена. В качестве модельных субстратов использовали олигонуклеотиды (32 п.н.) с нуклеотидными заменами в цепи, противоположной одноцепочечной ДНК, комплементарной РНК, в различных положениях относительно РАМ (Таблица 14). Для определения термодинамических параметров взаимодействия в системе Cas9, направляющей РНК и ДНК-субстрата использовали изотермическую калориметрию и методы молекулярной динамики.

Таблица 14. Термодинамические параметры образования дуплексов и их расщепления

| субстрат | последовательность, 5'-3' | замена | спаривание | ΔE , kcal/mol, 37 °C | T_m , °C | расщепление, % | $t_{1/2}$, мин |
|----------|--|----------|------------|------------------------------|------------|----------------|-----------------|
| S01 | GTGAGTTGGACATGCTCGAC AT TCGGGAGATC | - | | -293.69 ± 0.08 | 75.2 ± 0.3 | 72.5 ± 1.5 | 18.2 ± 2.4 |
| S02 | GTGAGTTGGACATGCTCGAC AT TCGGGACATC | G→C | C:C | -281.82 ± 0.08 | 74.0 ± 0.3 | 65.8 ± 1.7 | 23.3 ± 4.3 |
| S07 | GTGAGTTGGACATGCTCGAC AT TGGGGAGATC | C→G | G:G | -287.03 ± 0.01 | 73.6 ± 0.2 | 67.8 ± 0.4 | 38.9 ± 2.2 |
| S06 | GTGAGTTGGACATGCTCGAC AC TCGGGAGATC | T→C | C:A | -290.22 ± 0.09 | 72.0 ± 0.2 | 61.9 ± 1.4 | 38.6 ± 7.1 |
| S03 | GTGAGTTGGACATGCTCGAC AT GCGGGAGATC | T→G | G:A | -286.33 ± 0.09 | 72.0 ± 0.4 | 56.5 ± 1.1 | 69.5 ± 4 |
| S04 | GTGAGTTGGACATGCTCGAA AT GCGGGAGATC | T→G, C→A | G:A, A:G | -286.58 ± 0.11 | 69.7 ± 0.3 | 44.7 ± 2.0 | 43.2 ± 7.7 |
| S05 | GTGAGTTGGACATGCTCGAA AT TCGGGAGATC | C→A | A:G | -281.59 ± 0.10 | 70.7 ± 0.1 | 41.8 ± 2.9 | 36.9 ± 12.5 |
| S09 | GTGAGTTGGACATGCTCGAC GT TCGGGAGATC | A→G | G:T | -298.39 ± 0.08 | 73.4 ± 0.2 | 34.5 ± 1.7 | 19.6 ± 5.9 |
| S08 | GTGAGTTGGACATGCTCGAC TA TCGGGAGATC | A→T, T→A | TA:TA | -288.15 ± 0.09 | 70.9 ± 0.6 | 30.8 ± 5.6 | 99.3 ± 50.3 |

Замены в последовательностях выделены красным. Квадратом ограничены позиции расщепления. ΔE – энергия образования комплекса. T_m – температура плавления дуплексов, $t_{1/2}$ – время полурасщепления. Детекцию расщепления проводили при соотношении Cas9-sgRNA:dsDNA 210:1.

Для субстрата S01, не содержащего замены, энергия взаимодействия двух цепей была 293.7 ± 0.1 ккал/моль. В случае субстрата S03, где пара G:A находилась в позиции +2 от последовательности PAM, $\Delta E = 286.3 \pm 0.1$ ккал/моль. Замена C на A в позиции +5 к PAM (S05) вела к межцепочечному связыванию олигонуклеотидов с $\Delta E = 281.6 \pm 0.1$ ккал/моль. Энергия образования пары G:G в позиции +1 к PAM в субстрате S07 ($\Delta E = 287.0 \pm 0.1$ ккал/моль) близка к таковой для субстрата S03. Энергия связывания двух цепей $\Delta E = 290.2 \pm 0.1$ ккал/моль была определена для дуплекса S06, содержащего C вместо T в позиции +3. Для двухцепочечной ДНК S09, содержащей G:T пару в позиции +4 к PAM, $\Delta E = 298.4 \pm 0.1$ ккал/моль, указывая на высокую термодинамическую стабильность дуплекса в сравнении со всеми другими дуплексами с ошибками спаривания. Полученные данные хорошо согласуются с данными из работы [285], где авторы показали, что вклад единственного ошибочного спаривания GT в стабильность двойной спирали также зависит от соседних с ошибкой оснований. Пара GT стабилизируется водородными связями и стабильность дуплекса также зависит от соседних нуклеотидов.

Комплекс Cas9-sgRNA распознает ДНК посредством специфических взаимодействий с двумя участками ДНК: протоспейсером и последовательностью, прилегающей к PAM. Связывание между ДНК-мишенью и комплементарной последовательностью из 20 нуклеотидов на 5'-конце спейсера sgRNA происходит за счет спаривания оснований. В отличие от этого, связыванию PAM способствуют прямые взаимодействия между аминокислотными остатками фермента и ДНК-мишенью [286, 287]. Далее, мы использовали химерную sgRNA, состоящую из 103 нуклеотидов. Химерная sgRNA, состоящая из 103 нуклеотидов, была использована для того, чтобы белок Cas9 мог осуществлять сайт-специфическое расщепление ДНК.

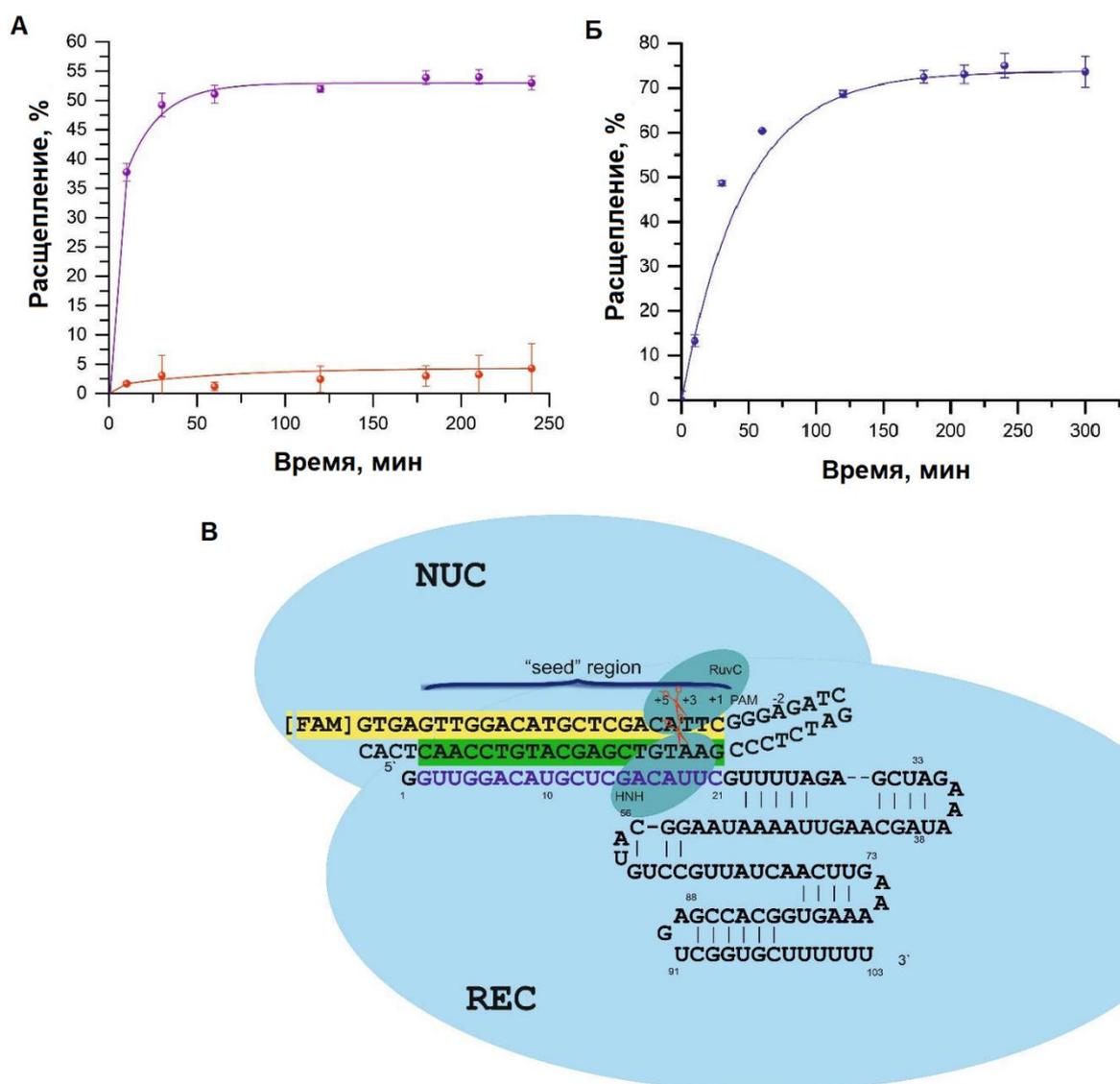


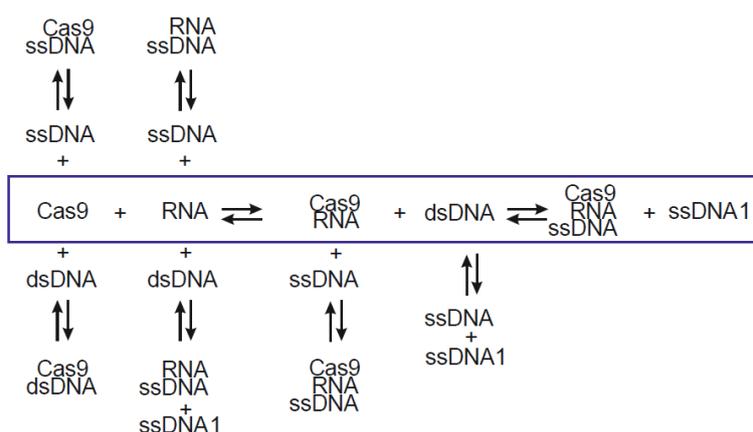
Рисунок 75. Взаимодействие Cas9 с ДНК-субстратами. (А, Б) – кинетические кривые расщепления субстратов. (А) – Расщепление субстратов S01 (розовая кривая) и S03 (красная кривая) при соотношении Cas9-sgRNA:dsDNA 8:1. (Б) Расщепление субстрата S01 при соотношении Cas9-sgRNA:dsDNA 210:1. (В) – иллюстрация комплекса Cas9-sgRNA и ДНК-субстрата. Сайт расщепления выделен жирным шрифтом, а последовательности, образующие комплементарный дуплекс, выделены зеленым и желтым цветом.

При восьмикратном избытке Cas9-sgRNA по отношению к ДНК-субстрату не удалось детектировать расщепление ДНК, содержащих замены в различных позициях в области комплементарности ДНК и sgRNA, а для субстрата без замены S01 доля расщепления составила 52% (Рис. 75А). При соотношении Cas9-sgRNA:dsDNA как

210:1 происходило расщепление всех используемых субстратов с различной эффективностью (Таблица 14), и для субстрата S01 оно было максимальным – 73% (Рис. 75Б). Уровень расщепления субстратов, содержащих одну или две некомплементарные пары снижался по мере приближения мисматчей к PAM и сайту расщепления (Таблица 14, Рис. 75В). Замена гуанина на цитозин в дистальной области (S02) была к незначительному снижению как степени, так и скорости расщепления. Замена первого нуклеотида из PAM (C→G в субстрате S07) не уменьшала степень расщепления, но практически в два раза замедляла скорость реакции.

Полученные результаты хорошо согласуются с исследованием, где показано, что мисматчи, расположенные дистально от PAM существенны для селективности расщепления, локального расплетения ДНК и конформационной динамики фермента, что ведет к увеличению времени протекания реакции [288]. Таким образом, мисматчи, расположенные проксимально от PAM в ДНК-субстратах снижают эффективность работы фермента, поскольку “затравочная” область вовлечена в связывание и расщепление, тогда как мисматчи дистальные к PAM не имеют существенного значения для эффективности расщепления.

Схема 7. Схематическое представление возможных взаимодействий при образовании комплекса между Cas9–RNA и одноцепочечной ДНК



Такой подход позволяет не только оценить эффект взаимодействия нуклеиновых кислот, но и понять вклад фермента в процессы узнавания, образования каталитически активного комплекса и расщепления. Было исследовано влияние расположения неканонических пар относительно последовательности PAM на

эффективность расщепления мишени. Для описания взаимодействия фермента с субстратом, использовали схематическую диаграмму (Схема 7) возможных процессов, сопровождающих образование комплекса Cas9-РНК/дцДНК.

Были проанализированы обратимые процессы при термодинамическом равновесии. Основным процессом является взаимодействие Cas9 с комплексом РНК и, далее после взаимодействия с дцДНК, образование комплекса Cas9-RNA/оцDNA (на Схеме 7 в рамке). Альтернативно, целевой комплекс может образовываться при взаимодействии Cas9-РНК с дцДНК. В дополнение к основному процессу образования целевого комплекса, могут происходить побочные реакции с образованием дополнительных комплексов. Свободная оцDNA может образовывать комплементарные комплексы с РНК и оцDNA1, или оцDNA1 может быть вытеснена из дцДНК свободной РНК. Кроме того, неспецифическое взаимодействие может происходить путем взаимодействия Cas9 с одно- или двухцепочечной ДНК. Анализ формирования внутримолекулярных комплексов при смешивании оцДНК/ДНК1 (дцДНК) или оцДНК/РНК показал термодинамические изменения. В Таблице 15 представлены термодинамические параметры, полученные методом изотермической калориметрии.

Таблица 15. Термодинамические параметры на основании данных изотермической калориметрии

| Ячейка | Шприц | K_d , М | n | ΔH° , кКал/моль | ΔS° , кКал/моль · К | $\Delta G^\circ(25^\circ\text{C})$, кКал/моль |
|----------------|--------------------------|---|-----------------|---------------------------------|-------------------------------------|---|
| Substance, мкМ | Нуклеиновая кислота, мкМ | | | | | |
| буфер | РНК, 50 | $1,62 \cdot 10^{-6}$ | - | -95,25 | -346,0 | 7,90 |
| буфер | РНК, 10 | - | - | - | - | - |
| буфер | дцДНК, 25 | - | - | - | - | - |
| буфер | оцДНК, 20 | - | - | - | - | - |
| RNA, 10 | дцДНК, 25 | - | - | - | - | - |
| РНК, 2 | оцДНК, 20 | $6,36 \cdot 10^{-7} \pm 2,43 \cdot 10^{-7}$ | $0,11 \pm 0,14$ | $-429,2 \pm 542,4$ | -1411 | -8,454 |
| оцДНК, 2 | оцДНК1, 20 | $2,09 \cdot 10^{-7} \pm 0,67 \cdot 10^{-7}$ | $0,83 \pm 0,05$ | $-212,2 \pm 17,7$ | -681,1 | -9,112 |
| Cas9, 10 | оцДНК, 20 | - | - | - | - | - |
| Cas9, 5 | дцДНК, 25 | - | - | - | - | - |
| Cas9*, 5 | РНК, 62,5 | $2,21 \cdot 10^{-6} \pm 0,67 \cdot 10^{-6}$ | $2,10 \pm 0,12$ | $-399,10 \pm 39,12$ | -13130 | -7,72 |

| | | | | | | |
|------------------------|-----------|--|----------------------|--------------------|-----------|----------|
| Cas9, 5 РНК, 1 | оцДНК, 10 | $9,80 \cdot 10^{-9} \pm$ $1,87 \cdot 10^{-8}$ | $0,67 \pm$ $0,07$ | $-49,27 \pm 8,73$ | $-128,60$ | $-10,93$ |
| Cas9**, 6 РНК, 1 | дцДНК, 25 | $1,02 \cdot 10^{-7} \pm$ $5,90 \cdot 10^{-7}$ | $0,76 \pm$ $0,68$ | $-45,08 \pm 302,4$ | $-119,02$ | $-9,54$ |

Для подтверждения полученных экспериментальных данных было проведено молекулярное моделирование комплексов Cas9-РНК/ДНК и Cas9-РНК, нативной формы Cas9, дуплексов РНК/ДНК и дцДНК, и отдельно РНК и оцДНК. Используя методы ММ-PBSA (PB) и ММ-GBSA (GB) свободные энергии связывания были рассчитаны для образования комплексов Cas9-РНК/ДНК, Cas9-РНК, РНК/ДНК и комплексов дцДНК (Таблица 16). Сравнение данных калориметрии и данных моделирования показало хорошую корреляцию для значений энергии активации, полученных обоими методами ($R^2=0.969$).

Таблица 16. Значения энергии образования комплексов по данным ММ-PBSA (PB) и ММ-GBSA (GB)

| Комплекс | Рецептор | лиганд | ММ-GBSA | ММ-PBSA |
|------------------|----------|--------|------------------------|---------------------------|
| | | | ΔE , кКал/моль | ΔE , кКал/моль |
| Cas9- РНК/ДНК | Cas9-РНК | оцДНК | -363.9 ± 0.2 | -149.0 ± 0.2 |
| Cas9-РНК | Cas9 | РНК | -820.0 ± 0.3 | -948.2 ± 0.4 |
| РНК/ДНК | РНК | оцДНК | -208.7 ± 0.1 | 6.1 ± 0.1 |
| дцДНК, 32 н | оцДНК | оцДНК | -296.3 ± 0.1 | -163.7 ± 0.1 |
| дцДНК, 24 н | оцДНК | оцДНК | -221.3 ± 0.1 | -140.7 ± 0.1 |

Полученные результаты позволяют сделать обоснованный вывод, что существует небольшое энергетическое преимущество при формировании комплексов Cas9—RNA/DNA из комплекса Cas9—RNA и дуплексов ДНК/ДНК. Небольшие различия в ΔG связывания для полностью комплементарного комплекса и дуплекса, содержащего однонуклеотидную замену, являются факторами, определяющими

дискриминацию правильного/неправильного комплекса нуклеазой Cas9. Небольшая разница в энергии связывания имеет значение для биологических взаимодействий и может быть частью сиквенс-специфического узнавания двуцепочечной ДНК системой CRISPR—Cas9. Полученные данные показали, что в случае коротких дуплексов с неканоническими парами стадия узнавания и связывания ферментом дцДНК субстратов определяет скорость реакции, а не термодинамические параметры, влияющие на «расплетение» ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных о конформационных переходах в ферментах, ДНК-субстратах (лигандах) установлены кинетические механизмы обнаружения и превращения поврежденных сайтов ДНК для эукариотических ферментов репарации: AP-эндонуклеаз APE1 человека и Ape1 из *Saccharomyces cerevisiae* (как природных форм, так и функциональных мутантов), принадлежащих к двум разным семействам ExoIII и Endo IV; для ДНК-гликозилаз Fpg и OGG1 (природных форм и функциональных мутантов); для эндонуклеаз NEIL2 и Cas9. Для решения задач работы методологически применяли подход с регистрацией изменений в спектрах оптического поглощения в реальном режиме времени методом «остановленного потока»; идентифицировали короткоживущие фермент-субстратные комплексы и интермедиаты масс-спектрометрическим методом.

В работе применен комплексный подход, включающий изучение кинетических характеристик взаимодействия между ферментом и субстратом, моделирование комплексов по методу молекулярной динамики и использования масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена для получения динамических структур. Используемый подход позволил достаточно подробно на структурном уровне описать динамическую подвижность изучаемых комплексов. Структурные основы узнавания в белково-нуклеиновых комплексах были изучены с применением масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена.

Белково-нуклеиновые комплексы участвуют во множестве различных ферментативных путей, где жесткая регуляция их каталитической активности имеет

решающее значение для развития и поддержания биохимии клетки. Ранее в работах коллег были выявлены удивительные примеры пластичности таких комплексов, позволяющие им принимать различные конформации в ответ на взаимодействие со специфическими регуляторными доменами или белками. В нашей работе для ограниченного числа белковых комплексов показано похожее поведение.

Полученные нами данные позволяют заключить, что структурно-динамические механизмы работы ферментов репарации, принадлежащих к различным структурным семействам: ExoIII (APE1), Endo IV (Apl1), Endo III (OGG1), Endo VIII (NEIL2, Fpg), возможно описать сравнимым количеством стадий (регистрируемых как по изменению флуоресценции фермента, так и по флуоресценции субстрата) пластичного изменения структуры всего белково-нуклеинового комплекса.

Результаты, полученные в представленной работе позволяют по-новому оценить природу механизмов взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами и глубже понять фундаментальные основы процессов, обеспечивающих узнавание в белково-нуклеиновых комплексах.

ВЫВОДЫ

Данная работа представляет собой завершённое систематическое исследование, по результатам которого выявлены общие закономерности и различия в работе ряда ферментов репарации и геномного редактирования, механизмы узнавания и процессинга различных субстратов. В работе был применён комплексный методологический подход, включающий изучение кинетических характеристик взаимодействия между ферментом и субстратом, моделирование комплексов по методу молекулярной динамики (МД) и использование масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS) для получения динамических структур. Полученные результаты позволяют описать процессы узнавания в белково-нуклеиновых комплексах с позиции динамической пластичности компонентов таких комплексов

1. Получены кинетические и структурные параметры взаимодействия формамидопиримидин-ДНК гликозилазы Frg из *E. coli* с субстратами различной степени специфичности.
 - Кинетический анализ взаимодействия Frg с олигонуклеотидным дуплексом, содержащим AP-сайт или его нерасщепляемый аналог, выявил наличие четырех стадий взаимодействия фермента с субстратом в интервале 2 мс – 10 с. Указанные стадии отражают связывание фермента с ДНК и узнавание повреждения с взаимной корректировкой структур биополимеров для достижения каталитически компетентной конформации комплекса.
 - Показано, что основание, находящееся напротив 8-охоG влияет на эффективность вырезания этого модифицированного основания. Предпочтение белка Frg к основанию, напротив 8-охоG убывает в ряду $C > T > A \approx G$.
2. Проведено структурно-функциональное исследование процесса узнавания ДНК-субстратов с помощью 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека hOGG1.
 - Выявлено, что взаимодействие hOGG1 с субстратом, содержащим AP-сайт, происходит в некаталитическом режиме с очень низким уровнем реакции β -элиминирования, наблюдаемым в течение первых 1000 с реакции.
 - Показано, что отрыв протона от атома C2' AP-сайта гликозилазой hOGG1 является необходимой стадией для инициирования β -элиминирования, которая

- катализируется анионной формой поврежденного основания непосредственно после разрыва гликозидной связи. Скорость β -элиминирования 8-охоG в 2 раза выше в присутствии 8-BrG. 8-BrG влияет на скорость β -элиминирования, а не на динамику взаимодействия фермента и ДНК-субстрата до стадии расщепления.
- Обнаружено, что замены Cys253Leu и Cys253Ile преимущественно влияют на каталитическую эффективность hOGG1, а не на его аффинность к ДНК-продукту или способность изгибать ДНК в предкаталитическом комплексе. Способность мутантного hOGG1 распознавать и отщеплять поврежденные основания может быть обусловлена внутренней пластичностью глобулы белка и энергетической выгодой выворачивания 8-охоG из спирали для комплекса ДНК с ферментом.
 - Показано, что аминокислотная замена Gln315Trp в hOGG1 препятствует полному выворачиванию 8-охоG из двойной спирали и его эффективному связыванию в активном сайте фермента, что приводит к уменьшению как N-гликозилазной так и AP-лиазной активности hOGG1.
 - Показано, что синтетический остаток охоG-Clamp, расположенный в ДНК-дуплексе рядом с окисленным основанием 8-охоG, препятствует процессу выщепления остатка 8-охоG.
3. Впервые предложен и детально охарактеризован кинетический механизм реакции, катализируемой APE1 человека в процессе NIR.
- Показано, что APE1 обладает высоким сродством к ДНК-субстратам, содержащим флуоресцирующий остаток 2-aPu, расположенный в цепи ДНК с 3'-стороны от повреждения (AP-сайта). Расположение остатка 2-aPu в ДНК с 3'-стороны от повреждения не оказывает влияния на скорость расщепления ДНК, а иногда даже увеличивает скорость катализа. Показано, что скорость оборота фермента APE1 зависит от природы повреждения ДНК-субстрата. Настоящий факт подтверждает ключевую роль структурной пластичности ДНК-субстрата в осуществлении катализа.
 - Моделирование по методу МД показывает, что сайт-мишень в ДНК-субстрате надежно закреплен в активном сайте APE1 посредством взаимодействий со

- специфическими аминокислотами и ионом Mg^{2+} , который действует в качестве «захвата» между ферментом и ДНК.
- Геометрия активного сайта APE1 нарушается при взаимодействии с ДНК-субстратом, содержащим аддукт бенз[а]пирена с гуанином, причем более значительно в случае, когда BPDE-dG находится в транс-конформации и BPDE-dG интеркалирует в комплекс APE1-ДНК вблизи расщепленной фосфодиэфирной связи, чем в случае цис-изомера.
4. На основании данных моделирования по гомологии впервые предложена 3D-структура фермента Arn1 из *Saccharomyces cerevisiae*.
- Установлено, что остаток His83, координирующий ионы Zn^{2+} в активном центре, играет решающую роль в каталитической стадии разрезания ДНК-субстрата.
 - Показано, что Arn1 специфичен к широкому спектру модифицированных оснований. Для восстановления поврежденной геномной ДНК альтернативный путь NIR может привлекать Arn1 в случае функционального отказа ДНК-гликозилазы.
5. Впервые предложена 3D-структура эндонуклеазы NEIL2 человека в растворе.
- На основании данных HDX-MS/MD показано, что в свободном состоянии в растворе белок hNEIL2 предпочтительно находится в открытой конформации, а характерная для hNEIL2 позвоночная область, содержащая протяженную петлю в N-концевом домене и отсутствующая в других ДНК-гликозилазах, находится в неструктурированном состоянии.
6. Определены ключевые стадии и термодинамические характеристики взаимодействия эндонуклеазы Cas9 из *Streptococcus pyogenes* с дцДНК-субстратом, определяющие скорость реакции расщепления ДНК.
- Предложена динамическая 3D-структура комплекса эндонуклеазы Cas9 *S. pyogenes* на основе HDX-MS и данных МД.
 - Показано, что в случае коротких дуплексов с неканоническими парами стадия узнавания и связывания ферментом Cas9 дцДНК субстратов определяет скорость реакции, а не термодинамические параметры, влияющие на «расплетание» ДНК.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ:**

1. Zhdanova P.V., Ishchenko A.A., Chernonosov A.A., Zharkov D.O., **Koval V.V.** Dynamics and conformational changes in human NEIL2 DNA glycosylase analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry/ J. Mol. Biol. - 2022. - V. 434. - N.2. - P. 167334. doi: 10.1016/j.jmb.2021.167334.
2. Zhdanova P.V., Chernonosov A.A., Prokhorova D.V., Stepanov G.A., Kanazhevskaya L.Y., **Koval V.V.** Probing the dynamics of streptococcus pyogenes Cas9 endonuclease bound to the sgRNA complex using hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry. Int. J. Mol. Sci. - 2022. - V. 23. - P.1129. doi: 10.3390/ijms23031129.
3. Baranova S.V., Zhdanova P.V., Lomzov A.A., **Koval V.V.**, Chernonosov A.A. Structure- and content-dependent efficiency of Cas9-assisted DNA cleavage in genome-editing systems. Int. J. Mol. Sci. - 2022. V. - 23. - P. 13889. doi: 10.3390/ijms232213889.
4. Zhdanova P.V., Lomzov A.A., Prokhorova D.V., Stepanov G.A., Chernonosov A.A., **Koval V.V.** Thermodynamic swings: how ideal complex of Cas9-RNA/DNA forms. Int. J. Mol. Sci. - 2022. -V. 23. - P. 8891. doi: 10.3390/ijms23168891.
5. Rechkunova N.I., Zhdanova P.V., Lebedeva N.A., Maltseva E.A., **Koval V.V.**, Lavrik O.I. Structural features of DNA polymerases β and λ in complex with benzo[a]pyrene-adducted DNA cause a difference in lesion tolerance. DNA Repair (Amst). - 2022. - V. 116. - P. 103353. doi: 10.1016/j.dnarep.2022.103353.
6. Zhdanova P.V., Ishchenko A.A., Chernonosov A.A., Zharkov D.O., **Koval V.V.** Dataset for dynamics and conformational changes in human NEIL2 protein analyzed by integrative structural biology approach. Data Brief. - 2021. - V. 40. - P. 107760. doi: 10.1016/j.dib.2021.107760.
7. Dyakonova E.S., **Koval V.V.**, Lomzov A.A., Ishchenko A.A., Fedorova O.S. Apurinic/aprimidinic endonuclease Apn1 from *Saccharomyces cerevisiae* is recruited to the nucleotide incision repair pathway: Kinetic and structural features. Biochimie. - 2018. - V. 152. - P. 53-62.
8. Dyakonova E.S., **Koval V.V.**, Lomzov A.A., Ishchenko A.A., Fedorova O.S. Data on PAGE analysis and MD simulation for the interaction of endonuclease Apn1 from

- Saccharomyces cerevisiae* with DNA substrates containing modified bases 5,6-dihydrouracil and 2-aminopurine. Data Brief. - 2018. - V. 20. - P. 1515-1524.
9. Starostenko L.V., Rechkunova N. I., Lebedeva N. A., Lomzov A.A., **Koval V.V.**, Lavrik O.I. Processing of the abasic sites clustered with the benzo[a]pyrene adducts by the base excision repair enzymes. DNA Repair. - 2017. - V. 50. - P. 43-53.
 10. Lukina M. V., **Koval V. V.**, Lomzov A. A., Zharkov D. O., Fedorova O. S. Global DNA dynamics of 8-oxoguanine repair by human OGG1 revealed by stopped-flow kinetics and molecular dynamic simulation. Molecular BioSystems. - 2017. - V. 13. - P. 1954–1966.
 11. Dyakonova, E.S., **Koval, V.V.**, Lomzov, A.A., Ishchenko, A.A., Fedorova, O.S. The role of His-83 of yeast apurinic/apyrimidinic endonuclease Apn1 in catalytic incision of abasic sites in DNA. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects. - 2015. - V. 1850. - P. 1297-1309.
 12. **Коваль В.В.**, Кнорре Д.Г., Федорова О.С. Структурные особенности взаимодействия 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека (hOGG1) с ДНК. Acta Naturae. - 2014. - Т. 6. № 3. - С. 50-65.
 13. Kanazhevskaya L.Y., **Koval V.V.**, Lomzov A.A., Fedorova O.S. The role of Asn-212 in the catalytic mechanism of human endonuclease APE1: Stopped-flow kinetic study of incision activity on a natural AP site and a tetrahydrofuran analogue. DNA Repair. - 2014. - V. 21. - P. 43-54.
 14. Lukina M.V., Popov A.V., **Koval V.V.**, Vorobjev Y.N., Fedorova O.S., Zharkov D.O. DNA damage processing by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase mutants with the occluded active site. J. Biol. Chem. - 2013. - V. 288. - N. 40. - P. 28936–28947.
 15. Kanazhevskaya L.Yu., **Koval V.V.**, Vorobjev Yu.N., Fedorova O.S. Conformational dynamics of abasic DNA upon interactions with AP endonuclease 1 revealed by stopped-flow fluorescence analysis. Biochemistry. - 2012. - V. 51. - P. 1306-1321.
 16. Дьяконова Е.С., **Коваль В.В.**, Ищенко А.А., Сапарбаев М.К., Каптейн Р., Фёдорова О.С. Кинетические закономерности взаимодействия АР-эндонуклеазы 1 из *Saccharomyces cerevisiae* с ДНК-субстратами. Биохимия. - 2012. - Т. 77. - С.1401-1412.
 17. Тимофеева Н.А., **Коваль В.В.**, Ищенко А.А., Сапарбаев М.К., Фёдорова О.С. Кинетический механизм действия апуриновой-апиридиновой эндонуклеазы

- человека в процессе инцизионной репарации нуклеотидов. Биохимия. - 2011. - Т. 76. - С. 333-344.
18. Timofeyeva N.A., **Koval V.V.**, Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S. Lys98 Substitution in human AP endonuclease 1 affects the kinetic mechanism of enzyme action in base excision and nucleotide incision repair pathways. PLoS ONE. - 2011. - V. 6. - P. e24063.
 19. Лукзен Н.Н., Иванов К.Л., **Коваль В.В.** Кинетический анализ поиска ферментом репарации поврежденных оснований ДНК: теоретическое исследование диффузионно контролируемых стадий. Известия Академии наук. Серия химическая. - 2011. - Т. 60. - С. 2569-2572.
 20. Kanazhevskaya L.Y., **Koval V.V.**, Zharkov D.O., Strauss P.R., Fedorova O.S. Conformational transitions in human AP endonuclease 1 and its active site mutant during abasic site repair. Biochemistry. - 2010. - V. 49. - P.6451-6461.
 21. Timofeyeva N.A., **Koval V.V.**, Knorre D.G., Zharkov D.O., Saparbaev M K., Ishchenko A.A., Fedorova O.S. Conformational dynamics of human AP endonuclease in base excision and nucleotide incision repair pathways. J. Biomol Struct Dyn. - 2009. - V. 26. - P. 637-652.
 22. Kuznetsov N.A., **Koval V.V.**, Zharkov D.O., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Fedorova O.S. Kinetic conformational analysis of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase. J. Biol. Chem. - 2007. - V. 282. - P. 1029–1038.
 23. Kuznetsov N.A., **Koval V.V.**, Zharkov D.O., Vorobjev Yu.N., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Fedorova O.S. Kinetic basis of lesion specificity and opposite-base specificity of *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase. Biochemistry. - 2007. - V. 46. - P. 424-435.
 24. Kuznetsov N.A., **Koval V.V.**, Zharkov D.O., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Fedorova O.S. Kinetics of substrate recognition and cleavage by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase. Nucleic Acids Res. - 2005. - V. 33. - P. 3919-3931.
 25. **Koval V.V.**, Kuznetsov N.A., Zharkov D.O., Ishchenko A.A., Douglas K.T., Nevinsky G.A., Fedorova O.S. Pre-steady-state kinetics shows differences in processing of various DNA lesions by *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase. Nucleic Acids Res. - 2004. -V. 32. - P. 926-935.

26. Fedorova O.S., Nevinsky G.A., **Koval V.V.**, Ishchenko A.A., Vasilenko N.L., Douglas K.T. Stopped-flow kinetic studies of the interaction between Escherichia coli Fpg protein and DNA substrates. Biochemistry. - 2002. - V. 41. -P. 1520-1528.
27. Федорова О.С., **Коваль В.В.**, Кузнецов Н.А. Способ определения активности 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека. Патент РФ № 2321637. Приоритет от 07.06.2006.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Albesa-Jové D., M.E. Guerin. The conformational plasticity of glycosyltransferases // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2016. – Vol. 40. – P. 23-32.
2. Campbell E., M. Kaltenbach, G.J. Correy, P.D. Carr, B.T. Porebski, E.K. Livingstone, L. Afriat-Jurnou, A.M. Buckle, M. Weik, F. Hollfelder, N. Tokuriki, C.J. Jackson. The role of protein dynamics in the evolution of new enzyme function // *Nature Chemical Biology*. – 2016. – Vol. 12. – № 11. – P. 944-950.
3. Lee A.-R., N.-H. Kim, Y.-J. Seo, S.-R. Choi, J.-H. Lee. Thermodynamic model for B-Z transition of DNA induced by Z-DNA binding proteins // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23. – № 11. – P. 2748.
4. Stevenson C.E.M., D.M. Lawson. Analysis of protein-DNA interactions using surface plasmon resonance and a ReDCaT Chip // *Methods in Molecular Biology*. – 2021. – Vol. 2263. – P. 369-379.
5. Yan Y., S.-Y. Huang. Modeling protein-protein or protein-DNA/RNA complexes using the HDock webserver // *Methods in Molecular Biology*. – 2020. – Vol. 2165. – P. 217-229.
6. Mahadevan J., S. Bowerman, K. Luger. Quantitating repair protein accumulation at DNA lesions: Past, present, and future: Cutting-edge Perspectives in Genomic Maintenance VI // *DNA Repair*. – 2019. – Vol. 81. – P. 102650.
7. Roosendaal J., T. Heidebrecht, H. Rosing, A. Perrakis, J.H. Beijnen. Quantitative LC-MS/MS analysis of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine to monitor the biological activity of J-binding protein // *Analytical Biochemistry*. – 2020. – Vol. 610. – P. 113930.
8. Krumkacheva O.A., G.Y. Shevelev, A.A. Lomzov, N.S. Dyrkheeva, A.A. Kuzhelev, V.V. Koval, V.M. Tormyshev, Y.F. Polienko, M.V. Fedin, D.V. Pyshnyi, O.I. Lavrik, E.G. Bagryanskaya. DNA complexes with human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1: structural insights revealed by pulsed dipolar EPR with orthogonal spin labeling // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Vol. 47. – № 15. – P. 7767-7780.
9. Coey C.T., A.C. Drohat. Kinetic methods for studying DNA glycosylases functioning

- in base excision repair // *Methods in Enzymology*. – 2017. – Vol. 592. – P. 357-376.
10. Thompson P.S., D. Cortez. New insights into abasic site repair and tolerance // *DNA Repair*. – 2020. – Vol. 90. – P. 102866.
 11. DNA repair and mutagenesis / Fridberg E. C. et. al. ASM Press, 2005. – 1118 p.
 12. Moor N.A., O.I. Lavrik. Protein-protein interactions in DNA base excision repair // *Biochemistry*. – 2018. – Vol. 83. – № 4. – P. 411-422.
 13. Lavrik O.I. PARPs' impact on base excision DNA repair: Tribute to Samuel H. Wilson: Shining Light on Base Excision DNA Repair // *DNA Repair*. – 2020. – Vol. 93. – P. 102911.
 14. Krokan H.E., M. Bjørås. Base excision repair // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2013. – Vol. 5. – № 4. – P. a012583.
 15. Dutta S., G. Chowdhury, K.S. Gates. Interstrand cross-links generated by abasic sites in duplex DNA // *Journal of the American Chemical Society*. – 2007. – Vol. 129. – № 7. – P. 1852-1853.
 16. Kosova A.A., S.N. Khodyreva, O.I. Lavrik. Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in DNA repair // *Biochemistry*. – 2017. – Vol. 82. – № 6. – P. 643-654.
 17. The pathways of double-strand break repair // *DNA Repair - On the Pathways to Fixing DNA Damage and Errors*. / Mladenov E., G. Iliakis. – 2011. – 394 p.
 18. Zharkov D.O. Base excision DNA repair // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2008. – Vol. 65. – № 10. – P. 1544-1565.
 19. Robertson A.B., A. Klungland, T. Rognes, I. Leiros. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it // *Cellular and molecular life sciences*. – 2009. – Vol. 66. – DNA repair in mammalian cells. – № 6. – P. 981-993.
 20. Stivers J.T., Y.L. Jiang. A mechanistic perspective on the chemistry of DNA repair glycosylases // *Chemical Reviews*. – 2003. – Vol. 103. – № 7. – P. 2729-2759.
 21. Lirussi L., H.L. Nilsen. DNA glycosylases define the outcome of endogenous base

modifications // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – № 12. – P. 10307.

22. Mullins E.A., A.A. Rodriguez, N.P. Bradley, B.F. Eichman. Emerging roles of DNA glycosylases and the base excision repair pathway // Trends in Biochemical Sciences. – 2019. – Vol. 44. – № 9. – P. 765-781.

23. Endutkin A.V., A.V. Yudkina, V.S. Sidorenko, D.O. Zharkov. Transient protein-protein complexes in base excision repair // Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. – 2019. – Vol. 37. – № 17. – P. 4407-4418.

24. Spivak G. Nucleotide excision repair in humans // DNA repair. – 2015. – Vol. 36. – P. 13-18.

25. Mao P., M.J. Smerdon, S.A. Roberts, J.J. Wyrick. Asymmetric repair of UV damage in nucleosomes imposes a DNA strand polarity on somatic mutations in skin cancer // Genome Research. – 2020. – Vol. 30. – № 1. – P. 12-21.

26. Nakamura J., M. Nakamura. DNA-protein crosslink formation by endogenous aldehydes and AP sites // DNA repair. – 2020. – Vol. 88. – P. 102806.

27. Caston R.A., B. Demple. Risky repair: DNA-protein crosslinks formed by mitochondrial base excision DNA repair enzymes acting on free radical lesions // Free Radical Biology & Medicine. – 2017. – Vol. 107. – Risky repair. – P. 146-150.

28. Ishchenko A.A., E. Deprez, A. Maksimenko, J.-C. Brochon, P. Tauc, M.K. Saparbaev. Uncoupling of the base excision and nucleotide incision repair pathways reveals their respective biological roles // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – Vol. 103. – № 8. – P. 2564-2569.

29. Bazlekowa-Karaban M., P. Prorok, S. Baconnais, S. Taipakova, Z. Akishev, D. Zembruska, A.V. Popov, A.V. Endutkin, R. Groisman, A.A. Ishchenko, B.T. Matkarimov, A. Bissenbaev, E. Le Cam, D.O. Zharkov, B. Tudek, M. Saparbaev. Mechanism of stimulation of DNA binding of the transcription factors by human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1, APE1 // DNA repair. – 2019. – Vol. 82. – P. 102698.

30. Olmon E.D., S. Delaney. Differential ability of five DNA glycosylases to recognize

and repair damage on nucleosomal DNA // ACS Chemical Biology. – 2017. – Vol. 12. – № 3. – P. 692-701.

31. Korczowska-Łącka I., M. Hurła, N. Banaszek, D. Kobylarek, O. Szymanowicz, W. Kozubski, J. Dorszewska. Selected biomarkers of oxidative stress and energy metabolism disorders in neurological diseases // Molecular Neurobiology. – 2023. – Vol. 60. – № 7. – P. 4132-4149.

32. Jinek M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna, E. Charpentier. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // Science. – 2012. – Vol. 337. – № 6096. – P. 816-821.

33. Grav L.M., K.J. la Cour Karottki, J.S. Lee, H.F. Kildegaard. Application of CRISPR/Cas9 genome editing to improve recombinant protein production in CHO cells // Methods in Molecular Biology. – 2017. – Vol. 1603. – P. 101-118.

34. Khoshnejad M., J.S. Brenner, W. Motley, H. Parhiz, C.F. Greineder, C.H. Villa, O.A. Marcos-Contreras, A. Tsourkas, V.R. Muzykantov. Molecular engineering of antibodies for site-specific covalent conjugation using CRISPR/Cas9 // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 1760.

35. Wallace S.S. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases // Free Radical Biology & Medicine. – 2002. – Vol. 33. – № 1. – P. 1-14.

36. Marnett L.J. Oxyradicals and DNA damage // Carcinogenesis. – 2000. – Vol. 21. – № 3. – P. 361-370.

37. Dizdaroglu M., P. Jaruga, M. Birincioglu, H. Rodriguez. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement // Free Radical Biology and Medicine. – 2002. – Vol. 32. – Free radical-induced damage to DNA. – № 11. – P. 1102-1115.

38. Boiteux S., M. Guillet. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae* // DNA repair. – 2004. – Vol. 3. – № 1. – P. 1-12.

39. Cooke M.S., M.D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease // The FASEB Journal. – 2003. – Vol. 17. – № 10. – P. 1195-1214.

40. Evans M.D., M. Dizdaroglu, M.S. Cooke. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance // *Mutation Research*. – 2004. – Vol. 567. – № 1. – P. 1-61.
41. Xie Y., H. Yang, C. Cunanan, K. Okamoto, D. Shibata. Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors // *Cancer Research*. – 2004. – Vol. 64. – № 9. – P. 3096-3102.
42. Gu Y., T. Desai, P.L. Gutierrez, A.L. Lu. Alteration of DNA base excision repair enzymes hMYH and hOGG1 in hydrogen peroxide resistant transformed human breast cells // *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. – 2001. – Vol. 7. – № 5. – P. 861-868.
43. Raha S., B.H. Robinson. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2000. – Vol. 25. – № 10. – P. 502-508.
44. Beckman K.B., B.N. Ames. The free radical theory of aging matures // *Physiological Reviews*. – 1998. – Vol. 78. – № 2. – P. 547-581.
45. Free radicals in biology and medicine. Fifth Edition. / Halliwell B. et. al. – Oxford, New York: Oxford University Press, 2015. – 944 p.
46. Jezek P., L. Hlavatá. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2005. – Vol. 37. – № 12. – P. 2478-2503.
47. Mullenders L.H.F. Solar UV damage to cellular DNA: from mechanisms to biological effects // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2018. – Vol. 17. – № 12. – P. 1842-1852.
48. Bernards A.S., J.K. Miller, K.K. Bao, I. Wong. Flipping duplex DNA inside out: a double base-flipping reaction mechanism by *Escherichia coli* MutY adenine glycosylase // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – № 23. – P. 20960-20964.
49. Kasai H., S. Nishimura. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents // *Nucleic Acids Research*. – 1984. – Vol. 12. – № 4. – P. 2137-2145.

50. Maiuri T., C.E. Suart, C.L.K. Hung, K.J. Graham, C.A. Barba Bazan, R. Truant. DNA damage repair in Huntington's disease and other neurodegenerative diseases // *Neurotherapeutics*. – 2019. – Vol. 16. – № 4. – P. 948-956.
51. Li C., Y. Xue, X. Ba, R. Wang. The role of 8-oxoG repair systems in tumorigenesis and cancer therapy // *Cells*. – 2022. – Vol. 11. – № 23. – P. 3798.
52. Shibutani S., M. Takeshita, A.P. Grollman. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG // *Nature*. – 1991. – Vol. 349. – № 6308. – P. 431-434.
53. Grollman A.P., M. Moriya. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within // *Trends in genetics*. – 1993. – Vol. 9. – № 7. – P. 246-249.
54. Michaels M.L., J.H. Miller. The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) // *Journal of Bacteriology*. – 1992. – Vol. 174. – № 20. – P. 6321-6325.
55. Fowler R.G., S.J. White, C. Koyama, S.C. Moore, R.L. Dunn, R.M. Schaaper. Interactions among the *Escherichia coli* mutT, mutM, and mutY damage prevention pathways // *DNA Repair*. – 2003. – Vol. 2. – № 2. – P. 159-173.
56. Sakumi K., M. Furuichi, T. Tsuzuki, T. Kakuma, S. Kawabata, H. Maki, M. Sekiguchi. Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1993. – Vol. 268. – № 31. – P. 23524-23530.
57. Wilson D.M., L.H. Thompson. Life without DNA repair // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1997. – Vol. 94. – № 24. – P. 12754-12757.
58. Lu R., H.M. Nash, G.L. Verdine. A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer // *Current biology: CB*. – 1997. – Vol. 7. – № 6. – P. 397-407.
59. Cappelli E., T. Hazra, J.W. Hill, G. Slupphaug, M. Bogliolo, G. Frosina. Rates of base excision repair are not solely dependent on levels of initiating enzymes // *Carcinogenesis*. –

2001. – Vol. 22. – № 3. – P. 387-393.

60. Maher R.L., S.S. Wallace, D.S. Pederson. The lyase activity of bifunctional DNA glycosylases and the 3'-diesterase activity of APE1 contribute to the repair of oxidized bases in nucleosomes // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Vol. 47. – № 6. – P. 2922-2931.

61. Wu M., L. Zhang, K. Dong, Y. Gong, X. Liu. A novel Family V uracil DNA glycosylase from *Sulfolobus islandicus* REY15A // *DNA Repair*. – 2022. – Vol. 120. – P. 103420.

62. Radicella J.P., C. Dherin, C. Desmaze, M.S. Fox, S. Boiteux. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1997. – Vol. 94. – № 15. – P. 8010-8015.

63. Roldán-Arjona T., Y.F. Wei, K.C. Carter, A. Klungland, C. Anselmino, R.P. Wang, M. Augustus, T. Lindahl. Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1997. – Vol. 94. – № 15. – P. 8016-8020.

64. Aburatani H., Y. Hippo, T. Ishida, R. Takashima, C. Matsuba, T. Kodama, M. Takao, A. Yasui, K. Yamamoto, M. Asano. Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue // *Cancer Research*. – 1997. – Vol. 57. – № 11. – P. 2151-2156.

65. Rosenquist T.A., D.O. Zharkov, A.P. Grollman. Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1997. – Vol. 94. – № 14. – P. 7429-7434.

66. Nishioka K., T. Ohtsubo, H. Oda, T. Fujiwara, D. Kang, K. Sugimachi, Y. Nakabeppu. Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs // *Molecular Biology of the Cell*. – 1999. – Vol. 10. – № 5. – P. 1637-1652.

67. Boiteux S., J.P. Radicella. The human OGG1 gene: structure, functions, and its

implication in the process of carcinogenesis // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2000. – Vol. 377. – № 1. – P. 1-8.

68. Cadet J., T. Douki, J.-L. Ravanat. Oxidatively generated base damage to cellular DNA // Free Radical Biology & Medicine. – 2010. – Vol. 49. – № 1. – P. 9-21.

69. Saxonov S., P. Berg, D.L. Brutlag. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2006. – Vol. 103. – № 5. – P. 1412-1417.

70. Fleming A.M., C.J. Burrows. Oxidative stress-mediated epigenetic regulation by G-quadruplexes // NAR Cancer. – 2021. – Vol. 3. – № 3. – P. zcab038.

71. Fleming A.M., J. Zhu, Y. Ding, C.J. Burrows. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine in the Context of a Gene Promoter G-Quadruplex Is an On-Off Switch for Transcription // ACS Chemical Biology. – 2017. – Vol. 12. – № 9. – P. 2417-2426.

72. Pan L., B. Zhu, W. Hao, X. Zeng, S.A. Vlahopoulos, T.K. Hazra, M.L. Hegde, Z. Radak, A. Bacsı, A.R. Brasier, X. Ba, I. Boldogh. Oxidized guanine base lesions function in 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1-mediated epigenetic regulation of nuclear factor κ B-driven gene expression // The Journal of Biological Chemistry. – 2016. – Vol. 291. – № 49. – P. 25553-25566.

73. Pan L., W. Hao, X. Zheng, X. Zeng, A. Ahmed Abbasi, I. Boldogh, X. Ba. OGG1-DNA interactions facilitate NF- κ B binding to DNA targets // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – P. 43297.

74. Visnes T., A. Cázares-Körner, W. Hao, O. Wallner, G. Masuyer, O. Loseva, O. Mortusewicz, E. Wiita, A. Sarno, A. Manoilov, J. Astorga-Wells, A.-S. Jemth, L. Pan, K. Sanjiv, S. Karsten, C. Gokturk, M. Grube, E.J. Homan, B.M.F. Hanna, C.B.J. Paulin, T. Pham, A. Rasti, U.W. Berglund, C. von Nicolai, C. Benitez-Buelga, T. Koolmeister, D. Ivanic, P. Iliev, M. Scobie, H.E. Krokan, P. Baranczewski, P. Artursson, M. Altun, A.J. Jensen, C. Kalderén, X. Ba, R.A. Zubarev, P. Stenmark, I. Boldogh, T. Helleday. Small-molecule inhibitor of OGG1 suppresses proinflammatory gene expression and inflammation // Science. – 2018. – Vol. 362. – № 6416. – P. 834-839.

75. Ba X., I. Boldogh. 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: Beyond repair of the oxidatively modified base lesions // *Redox Biology*. – 2018. – Vol. 14. – 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1. – P. 669-678.
76. Allgayer J., N. Kitsera, S. Bartelt, B. Epe, A. Khobta. Widespread transcriptional gene inactivation initiated by a repair intermediate of 8-oxoguanine // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Vol. 44. – № 15. – P. 7267-7280.
77. Fleming A.M., Y. Ding, C.J. Burrows. Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2017. – Vol. 114. – № 10. – P. 2604-2609.
78. Wang R., W. Hao, L. Pan, I. Boldogh, X. Ba. The roles of base excision repair enzyme OGG1 in gene expression // *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. – 2018. – Vol. 75. – № 20. – P. 3741-3750.
79. Perillo B., M.N. Ombra, A. Bertoni, C. Cuzzo, S. Sacchetti, A. Sasso, L. Chiariotti, A. Malorni, C. Abbondanza, E.V. Avvedimento. DNA oxidation as triggered by H3K9me2 demethylation drives estrogen-induced gene expression // *Science*. – 2008. – Vol. 319. – № 5860. – P. 202-206.
80. Ba X., A. Bacsi, J. Luo, L. Aguilera-Aguirre, X. Zeng, Z. Radak, A.R. Brasier, I. Boldogh. 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 augments proinflammatory gene expression by facilitating the recruitment of site-specific transcription factors // *Journal of Immunology*. – 2014. – Vol. 192. – № 5. – P. 2384-2394.
81. Tornaletti S., L.S. Maeda, R.D. Kolodner, P.C. Hanawalt. Effect of 8-oxoguanine on transcription elongation by T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II // *DNA Repair*. – 2004. – Vol. 3. – № 5. – P. 483-494.
82. Amente S., A. Bertoni, A. Morano, L. Lania, E.V. Avvedimento, B. Majello. LSD1-mediated demethylation of histone H3 lysine 4 triggers Myc-induced transcription // *Oncogene*. – 2010. – Vol. 29. – № 25. – P. 3691-3702.
83. Hao W., J. Wang, Y. Zhang, C. Wang, L. Xia, W. Zhang, M. Zafar, J.-Y. Kang, R.

Wang, A. Ali Bohio, L. Pan, X. Zeng, M. Wei, I. Boldogh, X. Ba. Enzymatically inactive OGG1 binds to DNA and steers base excision repair toward gene transcription // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. – 2020. – Vol. 34. – № 6. – P. 7427-7441.

84. Labahn J., O.D. Schärer, A. Long, K. Ezaz-Nikpay, G.L. Verdine, T.E. Ellenberger. Structural basis for the excision repair of alkylation-damaged DNA // *Cell*. – 1996. – Vol. 86. – № 2. – P. 321-329.

85. Lee S., C.T. Radom, G.L. Verdine. Trapping and structural elucidation of a very advanced intermediate in the lesion-extrusion pathway of hOGG1 // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – Vol. 130. – № 25. – P. 7784-7785.

86. Norman D.P., S.D. Bruner, G.L. Verdine. Coupling of substrate recognition and catalysis by a human base-excision DNA repair protein // *Journal of the American Chemical Society*. – 2001. – Vol. 123. – № 2. – P. 359-360.

87. Fromme J.C., S.D. Bruner, W. Yang, M. Karplus, G.L. Verdine. Product-assisted catalysis in base-excision DNA repair // *Nature Structural Biology*. – 2003. – Vol. 10. – № 3. – P. 204-211.

88. Bruner S.D., D.P. Norman, G.L. Verdine. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA // *Nature*. – 2000. – Vol. 403. – № 6772. – P. 859-866.

89. Bjørås M., E. Seeberg, L. Luna, L.H. Pearl, T.E. Barrett. Reciprocal “flipping” underlies substrate recognition and catalytic activation by the human 8-oxo-guanine DNA glycosylase // *Journal of Molecular Biology*. – 2002. – Vol. 317. – № 2. – P. 171-177.

90. Banerjee A., W. Yang, M. Karplus, G.L. Verdine. Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damaged DNA // *Nature*. – 2005. – Vol. 434. – № 7033. – P. 612-618.

91. Norman D.P.G., S.J. Chung, G.L. Verdine. Structural and biochemical exploration of a critical amino acid in human 8-oxoguanine glycosylase // *Biochemistry*. – 2003. – Vol. 42. – № 6. – P. 1564-1572.

92. Fang Y., P. Zou. Genome-wide mapping of oxidative DNA damage via engineering of 8-oxoguanine DNA glycosylase // *Biochemistry*. – 2020. – Vol. 59. – № 1. – P. 85-89.
93. Nash H.M., S.D. Bruner, O.D. Schärer, T. Kawate, T.A. Addona, E. Spooner, W.S. Lane, G.L. Verdine. Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily // *Current biology*. – 1996. – Vol. 6. – № 8. – P. 968-980.
94. Thayer M.M., H. Ahern, D. Xing, R.P. Cunningham, J.A. Tainer. Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure // *The EMBO journal*. – 1995. – Vol. 14. – № 16. – P. 4108-4120.
95. Guan Y., R.C. Manuel, A.S. Arvai, S.S. Parikh, C.D. Mol, J.H. Miller, S. Lloyd, J.A. Tainer. MutY catalytic core, mutant and bound adenine structures define specificity for DNA repair enzyme superfamily // *Nature Structural Biology*. – 1998. – Vol. 5. – № 12. – P. 1058-1064.
96. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.6.0.0 Schrödinger, LLC.
97. Kemp P.A. van der, J.-B. Charbonnier, M. Audebert, S. Boiteux. Catalytic and DNA-binding properties of the human Ogg1 DNA N-glycosylase/AP lyase: biochemical exploration of H270, Q315 and F319, three amino acids of the 8-oxoguanine-binding pocket // *Nucleic Acids Research*. – 2004. – Vol. 32. – № 2. – P. 570-578.
98. Schaich M.A., B.L. Schnable, N. Kumar, V. Roginskaya, R.C. Jakielski, R. Urban, Z. Zhong, N.M. Kad, B. Van Houten. Single-molecule analysis of DNA-binding proteins from nuclear extracts (SMADNE) // *Nucleic Acids Research*. – 2023. – Vol. 51. – № 7. – P. gkad095.
99. Haraszti R.A., J.E. Braun. Comparative colocalization single-molecule spectroscopy (CoSMoS) with multiple RNA species // *Methods in Molecular Biology*. – 2020. – Vol. 2113. – P. 23-29.
100. Hoskins A.A., L.J. Friedman, S.S. Gallagher, D.J. Crawford, E.G. Anderson, R. Wombacher, N. Ramirez, V.W. Cornish, J. Gelles, M.J. Moore. Ordered and dynamic assembly of single spliceosomes // *Science*. – 2011. – Vol. 331. – № 6022. – P. 1289-1295.

101. Sparks J.L., G. Chistol, A.O. Gao, M. Räschle, N.B. Larsen, M. Mann, J.P. Duxin, J.C. Walter. The CMG helicase bypasses DNA-protein cross-links to facilitate their repair // *Cell*. – 2019. – Vol. 176. – № 1-2. – P. 167-181.e21.
102. Kanke M., E. Tahara, P.J. Huis In't Veld, T. Nishiyama. Cohesin acetylation and Wapl-Pds5 oppositely regulate translocation of cohesin along DNA // *The EMBO journal*. – 2016. – Vol. 35. – № 24. – P. 2686-2698.
103. Graham T.G.W., J.C. Walter, J.J. Loparo. Two-stage synapsis of DNA ends during non-homologous end joining // *Molecular Cell*. – 2016. – Vol. 61. – № 6. – P. 850-858.
104. Aggarwal V., T. Ha. Single-molecule pull-down (SiMPull) for new-age biochemistry // *BioEssays*. – 2014. – Vol. 36. – № 11. – P. 1109-1119.
105. Jain A., R. Liu, Y.K. Xiang, T. Ha. Single-molecule pull-down for studying protein interactions // *Nature Protocols*. – 2012. – Vol. 7. – № 3. – P. 445-452.
106. Jain A., R. Liu, B. Ramani, E. Arauz, Y. Ishitsuka, K. Rangunathan, J. Park, J. Chen, Y.K. Xiang, T. Ha. Probing cellular protein complexes using single-molecule pull-down // *Nature*. – 2011. – Vol. 473. – № 7348. – P. 484-488.
107. Jang S., N. Kumar, E.C. Beckwitt, M. Kong, E. Fouquerel, V. Rapić-Otrin, R. Prasad, S.C. Watkins, C. Khuu, C. Majumdar, S.S. David, S.H. Wilson, M.P. Bruchez, P.L. Opresko, B. Van Houten. Damage sensor role of UV-DDB during base excision repair // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2019. – Vol. 26. – № 8. – P. 695-703.
108. Nelson S.R., A.R. Dunn, S.D. Kathe, D.M. Warshaw, S.S. Wallace. Two glycosylase families diffusively scan DNA using a wedge residue to probe for and identify oxidatively damaged bases // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – Vol. 111. – № 20. – P. E2091-E2099.
109. Blainey P.C., A.M. van Oijen, A. Banerjee, G.L. Verdine, X.S. Xie. A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Vol. 103. – № 15. – P. 5752-5757.
110. Dalhus B., M. Forsbring, I.H. Helle, E.S. Vik, R.J. Forstrøm, P.H. Backe, I. Alseth,

- M. Bjørås. Separation-of-function mutants unravel the dual-reaction mode of human 8-oxoguanine DNA glycosylase // *Structure*. – 2011. – Vol. 19. – № 1. – P. 117-127.
111. Bravard A., M. Vacher, B. Gouget, A. Coutant, F.H. de Boisferon, S. Marsin, S. Chevillard, J.P. Radicella. Redox regulation of human OGG1 activity in response to cellular oxidative stress // *Molecular and Cellular Biology*. – 2006. – Vol. 26. – № 20. – P. 7430-7436.
112. Bravard A., A. Campalans, M. Vacher, B. Gouget, C. Levalois, S. Chevillard, J.P. Radicella. Inactivation by oxidation and recruitment into stress granules of hOGG1 but not APE1 in human cells exposed to sub-lethal concentrations of cadmium // *Mutation Research*. – 2010. – Vol. 685. – № 1-2. – P. 61-69.
113. Morreall J., K. Limpose, C. Sheppard, Y.W. Kow, E. Werner, P.W. Doetsch. Inactivation of a common OGG1 variant by TNF-alpha in mammalian cells // *DNA repair*. – 2015. – Vol. 26. – P. 15-22.
114. Yin Y., S. Sasaki, Y. Taniguchi. Recognition and excision properties of 8-halogenated-7-deaza-2'-deoxyguanosine as 8-oxo-2'-deoxyguanosine analogues and Fpg and hOGG1 inhibitors // *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*. – 2015. – Vol. 16. – № 8. – P. 1190-1198.
115. Schmaltz L.F., J.E. Cenicerros, S. Lee. Structure of the major oxidative damage 7,8-dihydro-8-oxoguanine presented into a catalytically competent DNA glycosylase // *Biochemical Journal*. – 2022. – Vol. 479. – № 21. – P. 2297-2309.
116. Bjørås M., L. Luna, B. Johnsen, E. Hoff, T. Haug, T. Rognes, E. Seeberg. Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites // *The EMBO journal*. – 1997. – Vol. 16. – № 20. – P. 6314-6322.
117. Krokan H.E., R. Standal, G. Slupphaug. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA // *The Biochemical Journal*. – 1997. – Vol. 325. – P. 1-16.
118. Popov A.V., A.V. Yudkina, Y.N. Vorobjev, D.O. Zharkov. Catalytically competent conformation of the active site of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase // *Biochemistry*. –

2020. – Vol. 85. – № 2. – P. 192-204.

119. D'Augustin O., V. Gaudon, C. Siberchicot, R. Smith, C. Chapuis, J. Depagne, X. Veaute, D. Busso, A.-M. Di Guilmi, B. Castaing, J.P. Radicella, A. Campalans, S. Huet. Identification of key residues of the DNA glycosylase OGG1 controlling efficient DNA sampling and recruitment to oxidized bases in living cells // *Nucleic Acids Research*. – 2023. – Vol. 51. – № 10. – P. 4942-4958.

120. Zentout S., R. Smith, M. Jacquier, S. Huet. New methodologies to study DNA repair processes in space and time within living cells // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – Vol. 9. – P. 730998.

121. Lukina M.V., V.V. Koval, A.A. Lomzov, D.O. Zharkov, O.S. Fedorova. Global DNA dynamics of 8-oxoguanine repair by human OGG1 revealed by stopped-flow kinetics and molecular dynamics simulation // *Molecular BioSystems*. – 2017. – Vol. 13. – № 10. – P. 1954-1966.

122. Kuznetsova A.A., N.A. Kuznetsov, A.A. Ishchenko, M.K. Saparbaev, O.S. Fedorova. Step-by-step mechanism of DNA damage recognition by human 8-oxoguanine DNA glycosylase // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 2014. – Vol. 1840. – № 1. – P. 387-395.

123. Wang K., M. Maayah, J.B. Sweasy, K.S. Alnajjar. The role of cysteines in the structure and function of OGG1 // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2021. – Vol. 296. – P. 100093.

124. Lukina M.V., A.V. Popov, V.V. Koval, Y.N. Vorobjev, O.S. Fedorova, D.O. Zharkov. DNA damage processing by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase mutants with the occluded active site // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288. – № 40. – P. 28936-28947.

125. Hao W., T. Qi, L. Pan, R. Wang, B. Zhu, L. Aguilera-Aguirre, Z. Radak, T.K. Hazra, S.A. Vlahopoulos, A. Bacsi, A.R. Brasier, X. Ba, I. Boldogh. Effects of the stimuli-dependent enrichment of 8-oxoguanine DNA glycosylase1 on chromatinized DNA // *Redox Biology*. – 2018. – Vol. 18. – P. 43-53.

126. Koval V.V., D.G. Knorre, O.S. Fedorova. Structural features of the interaction

between human 8-oxoguanine DNA glycosylase hOGG1 and DNA // *Acta Naturae*. – 2014. – Vol. 6. – № 3. – P. 52-65.

127. Mouzakis K.D., T. Wu, K.A. Haushalter. Thermostability and excision activity of polymorphic forms of hOGG1 // *BMC research notes*. – 2019. – Vol. 12. – № 1. – P. 92.

128. Kohno T., K. Shinmura, M. Tosaka, M. Tani, S.R. Kim, H. Sugimura, T. Nohmi, H. Kasai, J. Yokota. Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA // *Oncogene*. – 1998. – Vol. 16. – № 25. – P. 3219-3225.

129. Audebert M., J.P. Radicella, M. Dizdaroglu. Effect of single mutations in the OGG1 gene found in human tumors on the substrate specificity of the Ogg1 protein // *Nucleic Acids Research*. – 2000. – Vol. 28. – № 14. – P. 2672-2678.

130. Audebert M., S. Chevillard, C. Levalois, G. Gyapay, A. Vieillefond, J. Klijanienko, P. Vielh, A.K. El Naggar, S. Oudard, S. Boiteux, J.P. Radicella. Alterations of the DNA repair gene OGG1 in human clear cell carcinomas of the kidney // *Cancer Research*. – 2000. – Vol. 60. – № 17. – P. 4740-4744.

131. Shinmura K., T. Kohno, H. Kasai, K. Koda, H. Sugimura, J. Yokota. Infrequent mutations of the hOGG1 gene, that is involved in the excision of 8-hydroxyguanine in damaged DNA, in human gastric cancer // *Japanese Journal of Cancer Research*. – 1998. – Vol. 89. – № 8. – P. 825-828.

132. Radom C.T., A. Banerjee, G.L. Verdine. Structural characterization of human 8-oxoguanine DNA glycosylase variants bearing active site mutations // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282. – № 12. – P. 9182-9194.

133. Kuznetsov N.A., V.V. Koval, G.A. Nevinsky, K.T. Douglas, D.O. Zharkov, O.S. Fedorova. Kinetic conformational analysis of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282. – № 2. – P. 1029-1038.

134. Crenshaw C.M., K. Nam, K. Oo, P.S. Kutchukian, B.R. Bowman, M. Karplus, G.L. Verdine. Enforced presentation of an extrahelical guanine to the lesion recognition pocket of human 8-oxoguanine glycosylase, hOGG1 // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2012.

– Vol. 287. – № 30. – P. 24916-24928.

135. Bialkowski K., P. Cysewsk, R. Olinski. Effect of 2'-deoxyguanosine oxidation at C 8 position on N-glycosidic bond stability // *Zeitschrift für Naturforschung C.* – 1996. – Vol. 51. – № 1-2. – P. 119-122.

136. Leipold M.D., H. Workman, J.G. Muller, C.J. Burrows, S.S. David. Recognition and removal of oxidized guanines in duplex DNA by the base excision repair enzymes hOGG1, yOGG1, and yOGG2 // *Biochemistry.* – 2003. – Vol. 42. – № 38. – P. 11373-11381.

137. Krishnamurthy N., K. Haraguchi, M.M. Greenberg, S.S. David. Efficient removal of formamidopyrimidines by 8-oxoguanine glycosylases // *Biochemistry.* – 2008. – Vol. 47. – № 3. – P. 1043-1050.

138. Sowlati-Hashjin S., S.D. Wetmore. Structural insight into the discrimination between 8-Oxoguanine glycosidic conformers by DNA repair enzymes: a molecular dynamics study of human oxoguanine glycosylase 1 and formamidopyrimidine-DNA glycosylase // *Biochemistry.* – 2018. – Vol. 57. – № 7. – P. 1144-1154.

139. Guschlbauer W., A.M. Duplaa, A. Guy, R. Téoule, G.V. Fazakerley. Structure and in vitro replication of DNA templates containing 7,8-dihydro-8-oxoadenine // *Nucleic Acids Research.* – 1991. – Vol. 19. – № 8. – P. 1753-1758.

140. Wu J., M. Zhang, L. Song, Y. Tan, Y. Taniguchi, C.J. Hipolito, Y. Zhang, Y. Yin. Implications of N7-hydrogen and C8-keto on the base pairing, mutagenic potential and repair of 8-oxo-2'-deoxy-adenosine: Investigation by nucleotide analogues // *Bioorganic Chemistry.* – 2022. – Vol. 127. – P. 106029.

141. Stone M.P., H. Huang, K.L. Brown, G. Shanmugam. Chemistry and structural biology of DNA damage and biological consequences // *Chemistry & Biodiversity.* – 2011. – Vol. 8. – № 9. – P. 1571-1615.

142. Koag M.-C., H. Jung, S. Lee. Mutagenic replication of the major oxidative adenine lesion 7,8-dihydro-8-oxoadenine by human DNA polymerases // *Journal of the American Chemical Society.* – 2019. – Vol. 141. – № 11. – P. 4584-4596.

143. Talhaoui I., S. Couvé, A.A. Ishchenko, C. Kunz, P. Schär, M. Sapparbaev. 7,8-

dihydro-8-oxoadenine, a highly mutagenic adduct, is repaired by *Escherichia coli* and human mismatch-specific uracil/thymine-DNA glycosylases // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – Vol. 41. – № 2. – P. 912-923.

144. Jensen A., G. Calvayrac, B. Karahalil, V.A. Bohr, T. Stevnsner. Mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 Incises 8-oxoadenine opposite cytosine in nuclei and mitochondria, while a different glycosylase incises 8-oxoadenine opposite guanine in nuclei // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 21. – P. 19541-19548.

145. Grin I.R., G.L. Dianov, D.O. Zharkov. The role of mammalian NEIL1 protein in the repair of 8-oxo-7,8-dihydroadenine in DNA // *FEBS Letters*. – 2010. – Vol. 584. – № 8. – P. 1553-1557.

146. Leonard G.A., A. Guy, T. Brown, R. Téoule, W.N. Hunter. Conformation of guanine-8-oxoadenine base pairs in the crystal structure of d(CGCGAATT(O8A)GCG) // *Biochemistry*. – 1992. – Vol. 31. – № 36. – P. 8415-8420.

147. Kuznetsov N.A., V.V. Koval, O.S. Fedorova. Mechanism of recognition and repair of damaged DNA by human 8-oxoguanine DNA glycosylase hOGG1 // *Biochemistry*. – 2011. – Vol. 76. – № 1. – P. 118-130.

148. Sun J., N.M. Antczak, H.L. Gahlon, S.J. Sturla. Molecular beacons with oxidized bases report on substrate specificity of DNA oxoguanine glycosylases // *Chemical Science*. – 2022. – Vol. 13. – № 15. – P. 4295-4302.

149. Shigdel U.K., V. Ovchinnikov, S.-J. Lee, J.A. Shih, M. Karplus, K. Nam, G.L. Verdine. The trajectory of intrahelical lesion recognition and extrusion by the human 8-oxoguanine DNA glycosylase // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 4437.

150. Jiang T., A. Monari, E. Dumont, E. Bignon. Molecular mechanisms associated with clustered lesion-Induced impairment of 8-oxoG recognition by the human glycosylase OGG1 // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – № 21. – P. 6465.

151. Šebera J., L. Trantírek, Y. Tanaka, V. Sychrovský. Pyramidalization of the glycosidic nitrogen provides the way for efficient cleavage of the N-glycosidic bond of 8-OxoG with

the hOGG1 DNA repair protein // *The Journal of Physical Chemistry B.* – 2012. – Vol. 116. – № 41. – P. 12535-12544.

152. Dračínský M., M. Šála, B. Klepetářová, J. Šebera, J. Fukal, V. Holečková, Y. Tanaka, R. Nencka, V. Sychrovský. Benchmark theoretical and experimental study on ¹⁵N NMR shifts of oxidatively damaged guanine // *The Journal of Physical Chemistry B.* – 2016. – Vol. 120. – № 5. – P. 915-925.

153. Šebera J., Y. Hattori, D. Sato, D. Reha, R. Nencka, T. Kohno, C. Kojima, Y. Tanaka, V. Sychrovský. The mechanism of the glycosylase reaction with hOGG1 base-excision repair enzyme: concerted effect of Lys249 and Asp268 during excision of 8-oxoguanine // *Nucleic Acids Research.* – 2017. – Vol. 45. – № 9. – P. 5231-5242.

154. Bhagwat M., J.A. Gerlt. 3'- and 5'-strand cleavage reactions catalyzed by the Fpg protein from *Escherichia coli* occur via successive β - and δ -elimination mechanisms, respectively // *Biochemistry.* – 1996. – Vol. 35. – № 2. – P. 659-665.

155. Long R.A., R.K. Robins, L.B. Townsend. Purine nucleosides. XV. The synthesis of 8-aminoand 8-substituted aminopurine nucleosides // *The Journal of Organic Chemistry.* – 1967. – Vol. 32. – № 9. – P. 2751-2756.

156. Gill S.C., P.H. von Hippel. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data // *Analytical Biochemistry.* – 1989. – Vol. 182. – № 2. – P. 319-326.

157. Verdine G.L., D.P.G. Norman. Covalent trapping of protein-DNA complexes // *Annual Review of Biochemistry.* – 2003. – Vol. 72. – P. 337-366.

158. Gasteiger E., A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R.D. Appel, A. Bairoch. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis // *Nucleic Acids Research.* – 2003. – Vol. 31. – ExPASy. – № 13. – P. 3784-3788.

159. Golyshev V.M., T.V. Abramova, D.V. Pyshnyi, A.A. Lomzov. A new approach to precise thermodynamic characterization of hybridization properties of modified oligonucleotides: Comparative studies of deoxyribo- and glycine morpholine pentaadenines // *Biophysical Chemistry.* – 2018. – Vol. 234. – P. 24-33.

160. Lokhov S. G., D. V. Pyshnyi. Thermodynamic and spectral properties of DNA

miniduplexes with the terminal G·A mispairs and 3' or 5' dangling bases // FEBS Letters. – 1997. – Vol. 420. – № 2-3. – P. 134-138.

161. Bruner S.D., D.P. Norman, J.C. Fromme, G.L. Verdine. Structural and mechanistic studies on repair of 8-oxoguanine in mammalian cells // Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. – 2000. – Vol. 65. – P. 103-111.

162. Pettersen E.F., T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis // Journal of Computational Chemistry. – 2004. – Vol. 25. – № 13. – P. 1605-1612.

163. Frisch M.J., G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman. Gaussian 16 / Wallingford CT: Gaussian, Inc, 2016.

164. Rassolov V.A., M.A. Ratner, J.A. Pople, P.C. Redfern, L.A. Curtiss. 6-31G* basis set for third-row atoms // Journal of Computational Chemistry. – 2001. – Vol. 22. – № 9. – P. 976-984.

165. Case D.A., H.M. Aktulga, K. Belfon, I.Y. Ben-Shalom, J.T. Berryman, S.R. Brozell. Amber20 / University of California, San Francisco, 2020.

166. Götz A.W., M.J. Williamson, D. Xu, D. Poole, S. Le Grand, R.C. Walker. Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 1. Generalized born // Journal of Chemical Theory and Computation. – 2012. – Vol. 8. – № 5. – P. 1542-1555.

167. Salomon-Ferrer R., A.W. Götz, D. Poole, S. Le Grand, R.C. Walker. Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit solvent particle mesh ewald // Journal of Chemical Theory and Computation. – 2013. – Vol. 9. – № 9. – P. 3878-3888.

168. Maier J.A., C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K.E. Hauser, C. Simmerling. ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB // Journal of Chemical Theory and Computation. – 2015. – Vol. 11. – ff14SB. – № 8. – P. 3696-3713.

169. Cheatham T.E., D.A. Case. Twenty-five years of nucleic acid simulations // Biopolymers. – 2013. – Vol. 99. – № 12. – P. 969-977.

170. Roe D.R., T.E. Cheatham. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data // *Journal of Chemical Theory and Computation*. – 2013. – Vol. 9. – PTRAJ and CPPTRAJ. – № 7. – P. 3084-3095.
171. Основы ферментативной кинетики / Э. Корниш-Боуден. – Москва: МИР, 1979. – 280 с.
172. Volkenstein M.V., B.N. Goldstein. Allosteric enzyme models and their analysis by the theory of graphs // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 1966. – Vol. 115. – № 2. – P. 478-485.
173. Waterhouse A., M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F.T. Heer, T.A.P. de Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore, T. Schwede. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – Vol. 46. – № W1. – P. W296-W303.
174. Eckenroth B.E., V.B. Cao, A.M. Averill, J.A. Dragon, S. Doublé. Unique structural features of mammalian NEIL2 DNA glycosylase prime its activity for diverse DNA substrates and environments // *Structure*. – 2021. – Vol. 29. – № 1. – P. 29-42.e4.
175. Prakash A., B.E. Eckenroth, A.M. Averill, K. Imamura, S.S. Wallace, S. Doublé. Structural investigation of a viral ortholog of human NEIL2/3 DNA glycosylases // *DNA repair*. – 2013. – Vol. 12. – № 12. – P. 1062-1071.
176. Šali A., T.L. Blundell. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints // *Journal of Molecular Biology*. – 1993. – Vol. 234. – № 3. – P. 779-815.
177. Zheng H., D.R. Cooper, P.J. Porebski, I.G. Shabalina, K.B. Handing, W. Minor. CheckMyMetal: a macromolecular metal-binding validation tool // *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*. – 2017. – Vol. 73. – № 3. – P. 223-233.
178. Popov A.V., Y.N. Vorobjev, D.O. Zharkov. MDTRA: a molecular dynamics trajectory analyzer with a graphical user interface // *Journal of Computational Chemistry*. – 2013. – Vol. 34. – № 4. – P. 319-325.
179. Boiteux S., E. Gajewski, J. Laval, M. Dizdaroglu. Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein formamidopyrimidine-DNA glycosylase: excision of purine

lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization // *Biochemistry*. – 1992. – Vol. 31. – № 1. – P. 106-110.

180. Lagravère C., B. Malfoy, M. Leng, J. Laval. Ring-opened alkylated guanine is not repaired in Z-DNA // *Nature*. – 1984. – Vol. 310. – № 5980. – P. 798-800.

181. Tchou J., V. Bodepudi, S. Shibutani, I. Antoshechkin, J. Miller, A.P. Grollman, F. Johnson. Substrate specificity of Fpg protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1994. – Vol. 269. – № 21. – P. 15318-15324.

182. Boiteux S., F. Coste, B. Castaing. Repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: Properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N-glycosylases // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2017. – Vol. 107. – P. 179-201.

183. Ishchenko A.A., V.V. Koval, O.S. Fedorova, K.T. Douglas, G.A. Nevinsky. Structural requirements of double and single stranded DNA substrates and inhibitors, including a photoaffinity label, of Fpg protein from *Escherichia coli* // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. – 1999. – Vol. 17. – № 2. – P. 301-310.

184. Ishchenko A.A., N.V. Bulychev, G.A. Maksakova, F. Johnson, G.A. Nevinskiĭ. Interaction of *Escherichia coli* 8-oxoguanine DNA glycosylase with single-stranded oligodeoxyribonucleotides and their complexes // *Molecular biology*. – 1998. – Vol. 32. – № 3. – P. 549-558.

185. Ishchenko A.A., N.V. Bulychev, G.A. Maksakova, F. Johnson, G.A. Nevinsky. Single-stranded oligodeoxyribonucleotides are substrates of Fpg protein from *Escherichia coli* // *IUBMB life*. – 1999. – Vol. 48. – № 6. – P. 613-618.

186. Tsui V., D.A. Case. Theory and applications of the generalized born solvation model in macromolecular simulations // *Biopolymers*. – 2000. – Vol. 56. – № 4. – P. 275-291.

187. Bege M., A. Borbás. The medicinal chemistry of artificial nucleic acids and therapeutic oligonucleotides // *Pharmaceuticals*. – 2022. – Vol. 15. – № 8. – P. 909.

188. Gheibi-Hayat S.M., K. Jamialahmadi. Antisense oligonucleotide (AS-ODN) technology: principle, mechanism and challenges // *Biotechnology and Applied*

Biochemistry. – 2021. – Vol. 68. – № 5. – P. 1086-1094.

189. Potaczek D.P., H. Garn, S.D. Unger, H. Renz. Antisense molecules: A new class of drugs // *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2016. – Vol. 137. – № 5. – P. 1334-1346.

190. Lin K.-Y., R.J. Jones, M. Matteucci. Tricyclic 2'-deoxycytidine analogs: Syntheses and incorporation into oligodeoxynucleotides which have enhanced binding to complementary RNA // *Journal of the American Chemical Society*. – 1995. – Vol. 117. – № 13. – P. 3873-3874.

191. Nakagawa O., S. Ono, Z. Li, A. Tsujimoto, S. Sasaki. Specific fluorescent probe for 8-oxoguanosine // *Angewandte Chemie*. – 2007. – Vol. 46. – № 24. – P. 4500-4503.

192. Flanagan W.M., J.J. Wolf, P. Olson, D. Grant, K.Y. Lin, R.W. Wagner, M.D. Matteucci. A cytosine analog that confers enhanced potency to antisense oligonucleotides // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1999. – Vol. 96. – № 7. – P. 3513-3518.

193. Varizhuk A.M., T.S. Zatsepin, A.V. Golovin, E.S. Belyaev, Y.I. Kostyukevich, V.G. Dedkov, G.A. Shipulin, G.V. Shpakovski, A.V. Aralov. Synthesis of oligonucleotides containing novel G-clamp analogue with C8-tethered group in phenoxazine ring: Implication to qPCR detection of the low-copy Kemerovo virus dsRNA // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2017. – Vol. 25. – № 14. – P. 3597-3605.

194. Mitteaux J., P. Lejault, F. Wojciechowski, A. Joubert, J. Boudon, N. Desbois, C.P. Gros, R.H.E. Hudson, J.-B. Boulé, A. Granzhan, D. Monchaud. Identifying G-quadruplex-DNA-disrupting small molecules // *Journal of the American Chemical Society*. – 2021. – Vol. 143. – № 32. – P. 12567-12577.

195. Murase H., F. Nagatsugi. Development of the binding molecules for the RNA higher-order structures based on the guanine-recognition by the G-clamp // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2019. – Vol. 29. – № 11. – P. 1320-1324.

196. Nakagawa O., S. Ono, A. Tsujimoto, Z. Li, S. Sasaki. Selective fluorescence detection of 8-oxoguanosine with 8-oxoG-clamp // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic*

Acids. – 2007. – Vol. 26. – № 6-7. – P. 645-649.

197. Nasr T., Z. Li, O. Nakagawa, Y. Taniguchi, S. Ono, S. Sasaki. Selective fluorescence quenching of the 8-oxoG-clamp by 8-oxodeoxyguanosine in ODN // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2009. – Vol. 19. – № 3. – P. 727-730.

198. Nakagawa O., S. Ono, A. Tsujimoto, Z. Li, S. Sasaki. Fluorescence detection of 8-oxoguanosine by G-clamp derivatives // *Nucleic Acids Symposium Series*. – 2006. – № 50. – P. 21-22.

199. Li Z., O. Nakagawa, Y. Koga, Y. Taniguchi, S. Sasaki. Synthesis of new derivatives of 8-oxoG-clamp for better understanding the recognition mode and improvement of selective affinity // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2010. – Vol. 18. – № 11. – P. 3992-3998.

200. Nakabeppu Y. Cellular levels of 8-oxoguanine in either DNA or the nucleotide pool play pivotal roles in carcinogenesis and survival of cancer cells // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2014. – T. 15. – № 7. – C. 12543-12557.

201. Olinski R., D. Gackowski, R. Rozalski, M. Foksinski, K. Bialkowski. Oxidative DNA damage in cancer patients: a cause or a consequence of the disease development? // *Mutation Research*. – 2003. – Vol. 531. – № 1-2. – P. 177-190.

202. Tanner L., A.B. Single, R.K.V. Bhongir, M. Heusel, T. Mohanty, C. a. Q. Karlsson, L. Pan, C.-M. Clausson, J. Bergwik, K. Wang, C.K. Andersson, R.M. Oommen, J.S. Erjefält, J. Malmström, O. Wallner, I. Boldogh, T. Helleday, C. Kalderén, A. Egesten. Small-molecule-mediated OGG1 inhibition attenuates pulmonary inflammation and lung fibrosis in a murine lung fibrosis model // *Nature Communications*. – 2023. – Vol. 14. – № 1. – P. 643.

203. Xia J., S. Wu, G. Wu, J. Yang. Inhibition of 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) expression suppresses polycystic ovarian syndrome via the NF- κ B signaling pathway // *Reproductive Biology*. – 2022. – Vol. 22. – № 3. – P. 100679.

204. Sliwinska A., D. Kwiatkowski, P. Czarny, M. Toma, P. Wigner, J. Drzewoski, K. Fabianowska-Majewska, J. Szemraj, M. Maes, P. Galecki, T. Sliwinski. The levels of 7,8-

dihydrodeoxyguanosine (8-oxoG) and 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) - A potential diagnostic biomarkers of Alzheimer's disease // *Journal of the Neurological Sciences*. – 2016. – Vol. 368. – P. 155-159.

205. Nie B., W. Gan, F. Shi, G.-X. Hu, L.-G. Chen, H. Hayakawa, M. Sekiguchi, J.-P. Cai. Age-dependent accumulation of 8-oxoguanine in the DNA and RNA in various rat tissues // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 303181.

206. Cividini F., B.T. Scott, A. Dai, W. Han, J. Suarez, J. Diaz-Juarez, T. Diemer, D.E. Casteel, W.H. Dillmann. O-GlcNAcylation of 8-oxoguanine DNA glycosylase (Ogg1) impairs oxidative mitochondrial DNA lesion repair in diabetic hearts // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2016. – Vol. 291. – № 51. – P. 26515-26528.

207. Valavanidis A., T. Vlachogianni, C. Fiotakis. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis // *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*. – 2009. – Vol. 27. – № 2. – P. 120-139.

208. Floyd R.A., J.J. Watson, P.K. Wong, D.H. Altmiller, R.C. Rickard. Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation // *Free Radical Research Communications*. – 1986. – Vol. 1. – № 3. – P. 163-172.

209. Wang C.-C., W.-L. Chen, C.-M. Lin, C.-H. Lai, C.-H. Loh, H.-I. Chen, S.-H. Liou. The relationship between plasma and urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine biomarkers measured by liquid chromatography tandem mass spectrometry // *Environmental Science and Pollution Research International*. – 2016. – Vol. 23. – № 17. – P. 17496-17502.

210. Lin H.-S., A.M. Jenner, C.N. Ong, S.H. Huang, M. Whiteman, B. Halliwell. A high-throughput and sensitive methodology for the quantification of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: measurement with gas chromatography-mass spectrometry after single solid-phase extraction // *The Biochemical Journal*. – 2004. – Vol. 380. – № Pt 2. – P. 541-548.

211. Chiorcea-Paquim A.-M. 8-oxoguanine and 8-oxodeoxyguanosine biomarkers of oxidative DNA damage: A review on HPLC–ECD determination // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – № 5. – P. 1620.

212. Chiorcea-Paquim A.-M., A.M. Oliveira-Brett. Nanostructured material-based electrochemical sensing of oxidative DNA damage biomarkers 8-oxoguanine and 8-oxodeoxyguanosine: a comprehensive review // *Microchimica Acta*. – 2021. – Vol. 188. – № 2. – P. 58.
213. Hu H., K. Dong, B. Yan, Y. Mu, Y. Liao, L. Zhang, S. Guo, X. Xiao, X. Wang. Highly-sensitive and homogenous detection of 8-oxoguanine based DNA oxidative damage by a CRISPR-enhanced structure-switching aptamer assay // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2023. – Vol. 239. – P. 115588.
214. Nakamura J., J.A. Swenberg. Endogenous apurinic/apyrimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues // *Cancer Research*. – 1999. – Vol. 59. – № 11. – P. 2522-2526.
215. Cai Y., H. Cao, F. Wang, Y. Zhang, P. Kapranov. Complex genomic patterns of abasic sites in mammalian DNA revealed by a high-resolution SSiNGLe-AP method // *Nature Communications*. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 5868.
216. Liu Z.J., S. Martínez Cuesta, P. van Delft, S. Balasubramanian. Sequencing abasic sites in DNA at single-nucleotide resolution // *Nature Chemistry*. – 2019. – Vol. 11. – № 7. – P. 629-637.
217. Gorman M.A., S. Morera, D.G. Rothwell, E. de La Fortelle, C.D. Mol, J.A. Tainer, I.D. Hickson, P.S. Freemont. The crystal structure of the human DNA repair endonuclease HAP1 suggests the recognition of extra-helical deoxyribose at DNA abasic sites // *The EMBO journal*. – 1997. – Vol. 16. – № 21. – P. 6548-6558.
218. Carpenter E.P., A. Corbett, H. Thomson, J. Adacha, K. Jensen, J. Bergeron, I. Kasampalidis, R. Exley, M. Winterbotham, C. Tang, G.S. Baldwin, P. Freemont. AP endonuclease paralogues with distinct activities in DNA repair and bacterial pathogenesis // *The EMBO journal*. – 2007. – Vol. 26. – № 5. – P. 1363-1372.
219. Khaliullin I.G., D.K. Nilov, I.V. Shapovalova, V.K. Švedas. Construction of a full-atomic mechanistic model of human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 for virtual screening of novel inhibitors // *Acta Naturae*. – 2012. – Vol. 4. – № 2. – P. 80-86.
220. Sevilya Z., Y. Leitner-Dagan, M. Pinchev, R. Kremer, D. Elinger, F. Lejbkowicz,

H.S. Rennert, L.S. Freedman, G. Rennert, T. Paz-Elizur, Z. Livneh. Development of APE1 enzymatic DNA repair assays: low APE1 activity is associated with increase lung cancer risk // *Carcinogenesis*. – 2015. – Vol. 36. – № 9. – P. 982-991.

221. Thakur S., B. Sarkar, R.P. Cholia, N. Gautam, M. Dhiman, A.K. Mantha. APE1/Ref-1 as an emerging therapeutic target for various human diseases: phytochemical modulation of its functions // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2014. – Vol. 46. – № 7. – P. e106.

222. Shah F., D. Logsdon, R.A. Messmann, J.C. Fehrenbacher, M.L. Fishel, M.R. Kelley. Exploiting the Ref-1-APE1 node in cancer signaling and other diseases: from bench to clinic // *NPJ precision oncology*. – 2017. – Vol. 1. – P. 19.

223. Laev S.S., N.F. Salakhutdinov, O.I. Lavrik. Inhibitors of nuclease and redox activity of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/redox effector factor 1 (APE1/Ref-1) // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2017. – Vol. 25. – № 9. – P. 2531-2544.

224. Simeonov A., A. Kulkarni, D. Dorjsuren, A. Jadhav, M. Shen, D.R. McNeill, C.P. Austin, D.M. Wilson. Identification and characterization of inhibitors of human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 // *PloS One*. – 2009. – Vol. 4. – № 6. – P. e5740.

225. Dorjsuren D., D. Kim, V.N. Vyjayanti, D.J. Maloney, A. Jadhav, D.M. Wilson, A. Simeonov. Diverse small molecule inhibitors of human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 identified from a screen of a large public collection // *PloS One*. – 2012. – Vol. 7. – № 10. – P. e47974.

226. Luo M., M.R. Kelley. Inhibition of the human apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) repair activity and sensitization of breast cancer cells to DNA alkylating agents with lucanthone // *Anticancer Research*. – 2004. – Vol. 24. – № 4. – P. 2127-2134.

227. Ströbel T., S. Madlener, S. Tuna, S. Vose, T. Lagerweij, T. Wurdinger, K. Vierlinger, A. Wöhrer, B.D. Price, B. Demple, O. Saydam, N. Saydam. Ape1 guides DNA repair pathway choice that is associated with drug tolerance in glioblastoma // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 9674.

228. Fishel M.L., M.R. Kelley. The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a therapeutic and chemopreventive target // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2007. – Vol. 28.

– № 3-4. – P. 375-395.

229. Whitaker A.M., W.J. Stark, T.S. Flynn, B.D. Freudenthal. Molecular and structural characterization of disease-associated APE1 polymorphisms // DNA repair. – 2020. – Vol. 91-92. – P. 102867.

230. Malfatti M.C., A. Bellina, G. Antoniali, G. Tell. Revisiting two decades of research focused on targeting APE1 for cancer therapy: The pros and cons // Cells. – 2023. – Vol. 12. – № 14. – P. 1895.

231. Tudek B., M. Swoboda, P. Kowalczyk, R. Oliński. Modulation of oxidative DNA damage repair by the diet, inflammation and neoplastic transformation // Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society. – 2006. – Vol. 57. – P. 33-49.

232. McNeill D.R., A.M. Whitaker, W.J. Stark, J.L. Illuzzi, P.J. McKinnon, B.D. Freudenthal, D.M. Wilson. Functions of the major abasic endonuclease (APE1) in cell viability and genotoxin resistance // Mutagenesis. – 2020. – Vol. 35. – № 1. – P. 27-38.

233. Abbotts R., S. Madhusudan. Human AP endonuclease 1 (APE1): from mechanistic insights to druggable target in cancer // Cancer Treatment Reviews. – 2010. – Vol. 36. – № 5. – P. 425-435.

234. Wilson D.M., A. Simeonov. Small molecule inhibitors of DNA repair nuclease activities of APE1 // Cellular and molecular life sciences: CMLS. – 2010. – Vol. 67. – № 21. – P. 3621-3631.

235. Gros L., A.A. Ishchenko, H. Ide, R.H. Elder, M.K. Sapparbaev. The major human AP endonuclease (Ape1) is involved in the nucleotide incision repair pathway // Nucleic Acids Research. – 2004. – Vol. 32. – № 1. – P. 73-81.

236. Whitaker A.M., B.D. Freudenthal. APE1: A skilled nucleic acid surgeon // DNA repair. – 2018. – Vol. 71. – P. 93-100.

237. Yu E.T., M.Z. Hadi. Bioinformatic processing to identify single nucleotide polymorphism that potentially affect Ape1 function // Mutation Research. – 2011. – Vol. 722. – № 2. – P. 140-146.

238. Manvilla B.A., E. Pozharski, E.A. Toth, A.C. Drohat. Structure of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 with the essential Mg²⁺ cofactor // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. – 2013. – Vol. 69. – № 12. – P. 2555-2562.
239. Tsutakawa S.E., D.S. Shin, C.D. Mol, T. Izumi, A.S. Arvai, A.K. Mantha, B. Szczesny, I.N. Ivanov, D.J. Hosfield, B. Maiti, M.E. Pique, K.A. Frankel, K. Hitomi, R.P. Cunningham, S. Mitra, J.A. Tainer. Conserved structural chemistry for incision activity in structurally non-homologous apurinic/aprimidinic endonuclease APE1 and endonuclease IV DNA repair enzymes // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288. – № 12. – P. 8445-8455.
240. Mol C.D., T. Izumi, S. Mitra, J.A. Tainer. DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 and DNA repair coordination // *Nature*. – 2000. – Vol. 403. – № 6768. – P. 451-456.
241. Daviet S., S. Couvé-Privat, L. Gros, K. Shinozuka, H. Ide, M. Saparbaev, A.A. Ishchenko. Major oxidative products of cytosine are substrates for the nucleotide incision repair pathway // *DNA repair*. – 2007. – Vol. 6. – № 1. – P. 8-18.
242. Timofeyeva N.A., V.V. Koval, A.A. Ishchenko, M.K. Saparbaev, O.S. Fedorova. Kinetic mechanism of human apurinic/aprimidinic endonuclease action in nucleotide incision repair // *Biochemistry*. – 2011. – Vol. 76. – № 2. – P. 273-281.
243. Timofeyeva N.A., V.V. Koval, D.G. Knorre, D.O. Zharkov, M.K. Saparbaev, A.A. Ishchenko, O.S. Fedorova. Conformational dynamics of human AP endonuclease in base excision and nucleotide Incision repair pathways // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 2009. – Vol. 26. – № 5. – P. 637-652.
244. Dianova I.I., V.A. Bohr, G.L. Dianov. Interaction of human AP endonuclease 1 with flap endonuclease 1 and proliferating cell nuclear antigen involved in long-patch base excision repair // *Biochemistry*. – 2001. – Vol. 40. – № 42. – P. 12639-12644.
245. Ranalli T.A., S. Tom, R.A. Bambara. AP endonuclease 1 coordinates flap endonuclease 1 and DNA ligase I activity in long patch base excision repair // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – № 44. – P. 41715-41724.

246. Tom S., T.A. Ranalli, V.N. Podust, R.A. Bambara. Regulatory roles of p21 and apurinic/aprimidinic endonuclease 1 in base excision repair // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276. – № 52. – P. 48781-48789.
247. Sukhanova M.V., S.N. Khodyreva, N.A. Lebedeva, R. Prasad, S.H. Wilson, O.I. Lavrik. Human base excision repair enzymes apurinic/aprimidinic endonuclease1 (APE1), DNA polymerase beta and poly(ADP-ribose) polymerase 1: interplay between strand-displacement DNA synthesis and proofreading exonuclease activity // *Nucleic Acids Research*. – 2005. – Vol. 33. – № 4. – P. 1222-1229.
248. Izumi T., J. Malecki, M.A. Chaudhry, M. Weinfeld, J.H. Hill, J.C. Lee, S. Mitra. Intragenic suppression of an active site mutation in the human apurinic/aprimidinic endonuclease // *Journal of Molecular Biology*. – 1999. – Vol. 287. – № 1. – P. 47-57.
249. Li M., D.M. Wilson. Human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2014. – Vol. 20. – № 4. – P. 678-707.
250. Evans A.R., M. Limp-Foster, M.R. Kelley. Going APE over ref-1 // *Mutation Research*. – 2000. – Vol. 461. – № 2. – P. 83-108.
251. Thakur S., M. Dhiman, G. Tell, A.K. Mantha. A review on protein–protein interaction network of APE1/Ref-1 and its associated biological functions // *Cell Biochemistry and Function*. – 2015. – Vol. 33. – № 3. – P. 101-112.
252. Walker L.J., C.N. Robson, E. Black, D. Gillespie, I.D. Hickson. Identification of residues in the human DNA repair enzyme HAP1 (Ref-1) that are essential for redox regulation of Jun DNA binding // *Molecular and Cellular Biology*. – 1993. – Vol. 13. – № 9. – P. 5370-5376.
253. Xanthoudakis S., G.G. Miao, T. Curran. The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1994. – Vol. 91. – № 1. – P. 23-27.
254. Beernink P.T., B.W. Segelke, M.Z. Hadi, J.P. Erzberger, D.M. Wilson, B. Rupp. Two divalent metal ions in the active site of a new crystal form of human apurinic/aprimidinic endonuclease, Ape1: implications for the catalytic mechanism // *Journal of Molecular*

Biology. – 2001. – Vol. 307. – № 4. – P. 1023-1034.

255. Hosfield D.J., Y. Guan, B.J. Haas, R.P. Cunningham, J.A. Tainer. Structure of the DNA repair enzyme endonuclease IV and its DNA complex: double-nucleotide flipping at abasic sites and three-metal-ion catalysis // *Cell*. – 1999. – Vol. 98. – № 3. – P. 397-408.

256. Garcin E.D., D.J. Hosfield, S.A. Desai, B.J. Haas, M. Björas, R.P. Cunningham, J.A. Tainer. DNA apurinic-apyrimidinic site binding and excision by endonuclease IV // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2008. – Vol. 15. – № 5. – P. 515-522.

257. Tsutakawa S.E., J. Lafrance-Vanasse, J.A. Tainer. The cutting edges in DNA repair, licensing, and fidelity: DNA and RNA repair nucleases sculpt DNA to measure twice, cut once // *DNA repair*. – 2014. – Vol. 19. – P. 95-107.

258. Morris L.P., A.B. Conley, N. Degtyareva, I.K. Jordan, P.W. Doetsch. Genome-wide map of Apn1 binding sites under oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast*. – 2017. – Vol. 34. – № 11. – P. 447-458.

259. Ishchenko A.A., X. Yang, D. Ramotar, M. Sapparbaev. The 3'->5' exonuclease of Apn1 provides an alternative pathway to repair 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine in *Saccharomyces cerevisiae* // *Molecular and Cellular Biology*. – 2005. – Vol. 25. – № 15. – P. 6380-6390.

260. Vance J.R., T.E. Wilson. Repair of DNA strand breaks by the overlapping functions of lesion-specific and non-lesion-specific DNA 3' phosphatases // *Molecular and Cellular Biology*. – 2001. – Vol. 21. – № 21. – P. 7191-7198.

261. Duncan K.E., B.R. Dempsey, L.E. Killip, J. Adams, M.L. Bailey, G.A. Lajoie, D.W. Litchfield, C.J. Brandl, G.S. Shaw, B.H. Shilton. Discovery and characterization of a nonphosphorylated cyclic peptide inhibitor of the peptidylprolyl isomerase, Pin1 // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2011. – Vol. 54. – № 11. – P. 3854-3865.

262. Daniel J.M., G. McCombie, S. Wendt, R. Zenobi. Mass spectrometric determination of association constants of adenylate kinase with two noncovalent inhibitors // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2003. – Vol. 14. – № 5. – P. 442-448.

263. Greenfield N.J. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides

- from circular dichroism data // *Analytical Biochemistry*. – 1996. – Vol. 235. – № 1. – P. 1-10.
264. Englander S.W., L. Mayne. Protein folding studied using hydrogen-exchange labeling and two-dimensional NMR // *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. – 1992. – Vol. 21. – P. 243-265.
265. Engen J.R. Analysis of protein conformation and dynamics by hydrogen/deuterium exchange MS // *Analytical Chemistry*. – 2009. – Vol. 81. – № 19. – P. 7870-7875.
266. Moroco J.A., J.R. Engen. Replication in bioanalytical studies with HDX MS: aim as high as possible // *Bioanalysis*. – 2015. – Vol. 7. – № 9. – P. 1065-1067.
267. Walsh I., A.J.M. Martin, T. Di Domenico, S.C.E. Tosatto. ESpritz: accurate and fast prediction of protein disorder // *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28. – № 4. – P. 503-509.
268. Krüger A., F.M. Zimbres, T. Kronenberger, C. Wrenger. Molecular modeling applied to nucleic acid-based molecule development // *Biomolecules*. – 2018. – Vol. 8. – № 3. – P. 83.
269. Nieto P.M. The use of NMR to study transient carbohydrate-protein interactions // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2018. – Vol. 5. – P. 33.
270. Banerjee A., W.L. Santos, G.L. Verdine. Structure of a DNA glycosylase searching for lesions // *Science*. – 2006. – Vol. 311. – № 5764. – P. 1153-1157.
271. Cong L., F.A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P.D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L.A. Marraffini, F. Zhang. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // *Science*. – 2013. – Vol. 339. – № 6121. – P. 819-823.
272. Jiang W., D. Bikard, D. Cox, F. Zhang, L.A. Marraffini. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems // *Nature Biotechnology*. – 2013. – Vol. 31. – № 3. – P. 233-239.
273. Hsu P.D., D.A. Scott, J.A. Weinstein, F.A. Ran, S. Konermann, V. Agarwala, Y. Li, E.J. Fine, X. Wu, O. Shalem, T.J. Cradick, L.A. Marraffini, G. Bao, F. Zhang. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases // *Nature Biotechnology*. – 2013. – Vol. 31. –

№ 9. – P. 827-832.

274. Hruscha A., P. Krawitz, A. Rechenberg, V. Heinrich, J. Hecht, C. Haass, B. Schmid. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish // *Development*. – 2013. – Vol. 140. – № 24. – P. 4982-4987.

275. Kim D., S. Bae, J. Park, E. Kim, S. Kim, H.R. Yu, J. Hwang, J.-I. Kim, J.-S. Kim. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells // *Nature Methods*. – 2015. – Vol. 12. – № 3. – P. 237-243, 1 p following 243.

276. Fu Y., J.A. Foden, C. Khayter, M.L. Maeder, D. Reyon, J.K. Joung, J.D. Sander. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells // *Nature Biotechnology*. – 2013. – Vol. 31. – № 9. – P. 822-826.

277. Bravo J.P.K., M.-S. Liu, G.N. Hibshman, T.L. Dangerfield, K. Jung, R.S. McCool, K.A. Johnson, D.W. Taylor. Structural basis for mismatch surveillance by CRISPR-Cas9 // *Nature*. – 2022. – Vol. 603. – № 7900. – P. 343-347.

278. Mali P., J. Aach, P.B. Stranges, K.M. Esvelt, M. Moosburner, S. Kosuri, L. Yang, G.M. Church. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering // *Nature Biotechnology*. – 2013. – Vol. 31. – № 9. – P. 833-838.

279. Kleinstiver B.P., V. Pattanayak, M.S. Prew, S.Q. Tsai, N.T. Nguyen, Z. Zheng, J.K. Joung. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects // *Nature*. – 2016. – Vol. 529. – № 7587. – P. 490-495.

280. Lin Y., T.J. Cradick, M.T. Brown, H. Deshmukh, P. Ranjan, N. Sarode, B.M. Wile, P.M. Vertino, F.J. Stewart, G. Bao. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Vol. 42. – № 11. – P. 7473-7485.

281. Sapranaukas R., G. Gasiunas, C. Fremaux, R. Barrangou, P. Horvath, V. Siksnys. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Research*. – 2011. – Vol. 39. – № 21. – P. 9275-9282.

282. Gasiunas G., R. Barrangou, P. Horvath, V. Siksnys. Cas9-crRNA ribonucleoprotein

complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Vol. 109. – № 39. – P. E2579-2586.

283. Jinek M., F. Jiang, D.W. Taylor, S.H. Sternberg, E. Kaya, E. Ma, C. Anders, M. Hauer, K. Zhou, S. Lin, M. Kaplan, A.T. Iavarone, E. Charpentier, E. Nogales, J.A. Doudna. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation // *Science*. – 2014. – Vol. 343. – № 6176. – P. 1247997.

284. Huai C., G. Li, R. Yao, Y. Zhang, M. Cao, L. Kong, C. Jia, H. Yuan, H. Chen, D. Lu, Q. Huang. Structural insights into DNA cleavage activation of CRISPR-Cas9 system // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – № 1. – P. 1375.

285. Allawi H.T., J. SantaLucia. Thermodynamics and NMR of internal G.T mismatches in DNA // *Biochemistry*. – 1997. – Vol. 36. – № 34. – P. 10581-10594.

286. Cameron P., C.K. Fuller, P.D. Donohoue, B.N. Jones, M.S. Thompson, M.M. Carter, S. Gradia, B. Vidal, E. Garner, E.M. Slorach, E. Lau, L.M. Banh, A.M. Lied, L.S. Edwards, A.H. Settle, D. Capurso, V. Llaca, S. Deschamps, M. Cigan, J.K. Young, A.P. May. Mapping the genomic landscape of CRISPR–Cas9 cleavage // *Nature Methods*. – 2017. – Vol. 14. – № 6. – P. 600-606.

287. Stephenson A.A., A.T. Raper, Z. Suo. Bidirectional degradation of DNA cleavage products catalyzed by CRISPR/Cas9 // *Journal of the American Chemical Society*. – 2018. – Vol. 140. – № 10. – P. 3743-3750.

288. Liu M.-S., S. Gong, H.-H. Yu, K. Jung, K.A. Johnson, D.W. Taylor. Engineered CRISPR/Cas9 enzymes improve discrimination by slowing DNA cleavage to allow release of off-target DNA // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 3576.

289. Schmidt C., Robinson C.V. Dynamic protein ligand interactions--insights from MS. *FEBS Journal*. – 2014. – Vol. 281. – P. 1950-1964.

290. Bessonov S., Anokhina M., Krasauskas A., Golas M.M., Sander B., Will C.L., Urlaub H., Stark H., Luhrmann R. Characterization of purified human Bact spliceosomal complexes reveals compositional and morphological changes during spliceosome activation and first

step catalysis. *RNA*. – 2010. – Vol. 16. – P. 2384–2403.

291. Schmidt C., Lenz C., Grote M., Luhrmann R., Urlaub H. Determination of protein stoichiometry within protein complexes using absolute quantification and multiple reaction monitoring. *Analytical Chemistry*. – 2010. – Vol. 82. – P. 2784–2796.

292. Spreitzer E., Usluer S., Madl T. Probing surfaces in dynamic protein interactions. *Journal of Molecular Biology*. – 2020. – Vol. 432. – P. 2949-2972.

293. Pereira P.J.B., Manso J.A., Macedo-Ribeiro S. The structural plasticity of polyglutamine repeats. *Current Opinion in Structural Biology*. – 2023. – Vol. 80. – P. 102607.

294. Ozgur S., Buchwald G., Falk S., Chakrabarti S., Prabu J.R., Conti E. The conformational plasticity of eukaryotic RNA-dependent ATPases. *FEBS Journal*. – 2015. – Vol. 282. – P. 850-863.

295. Crean R.M., Gardner J.M., Kamerlin S.C.L. Harnessing conformational plasticity to generate designer enzymes. *Journal of the American Chemical Society*. – 2020. – Vol. 142. – P. 11324-11342.

296. Huse M., Kuriyan J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*. – 2002. – Vol. 109. – P. 275-282.

297. Niefind K., Issinger O.G. Conformational plasticity of the catalytic subunit of protein kinase CK2 and its consequences for regulation and drug design. *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2010. – Vol. 1804. – P. 484-492.

Приложение 1.

Олигонуклеотидные модели, использованные в работе

| Последовательности, 5'→3' | Применение |
|---|---|
| OG1, охoGCTCTCCCTTCCTCCTTTTCCTCT; OG2, C-охoGTCTCCCTTCCTCCTTTTCCTCT; OG3, CT-охoGCTCCCTTCCTCCTTTTCCTCT; OG4, CTC-охoGTCCCTTCCTCCTTTTCCTCT; OG5, CTCT-охoGCCCTTCCTCCTTTTCCTCT; OG6, CTCTC-охoGCCTTCCTCCTTTTCCTCT; OG11, CTCTCCCTTC-охoGCTCCTTTTCCTCT; OG(11,12), CCTCTCCCTT-охoG- охoGTCCTTTTCCTCT; OG20, CTCCTCCCTTCCTCCTTTTC-охoGTCT; OG21, CTCCTCCCTTCCTCCTTTTC-охoGCT; OG22, CTCCTCCCTTCCTCCTTTTCCT-охoGT G11, CTCTCCCTTCGCTCCTTTTCCTCT; | Исследование специфичности Fpg |
| d(CTCTCохoGCCTTCC) d(CTCTC(AP)CCTTCC) | Исследование механизма действия Fpg |
| d(GGAAGGCGAGAG), d(CT CTCp), d(pCCTTCC) и d(CTCTCXССТTCC) где X это 8-охoG, DHU или тетрагидрофуран (F) | Исследование кинетики взаимодействия Fpg с модифицированными субстратами |
| d(CTCTCXССТTCC) | Исследование кинетики расщепления hOGG1 |
| d(CTCTCXССТTCC), d(CTCTYXCCTTCC) d(CTCTCXУСТTCC) d(CTCTCGYCTTCC) где X это 8-охoG, DHU, AP, F, а Y это 2-aPu | Исследование предстационарной кинетики и специфичности Fpg; Анализ конформации hOGG1 при взаимодействии с различными субстратами |
| dTGACTGCATAХGCATGTAGACGATGTGCAT, где X это DHU, AP, F | Исследование конформационной динамики APE1 при взаимодействии с субстратом |