

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Булгаков Никита Алексеевич

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах научно-
квалификационной работы

Физико-химические основы субстратной специфичности ДНК-гликозилаз суперсемейства
«спираль–2 поворота–спираль»

Направление подготовки

1.5 Биологические науки

Специальность

1.5.4. Биохимия

Работа выполнена в Лаборатории геномной и белковой инженерии, ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия.

Научный руководитель:

к.б.н. Юдкина Анна Владимировна
н.с. ЛГБИ ИХБФМ СО РАН

Общая характеристика работы

1. Актуальность исследования

ДНК как носитель генетической информации постоянно находится под воздействием экзогенных и эндогенных факторов, что влияет на её целостность [1, 2]. Повреждения различной химической природы, которые возникают как следствие таких факторов, могут приводить к мутациям и клеточной смерти. При том один из самых частых типов повреждений ДНК — окислительные повреждения, которые возникают прежде всего из-за активных форм кислорода (АФК) [1, 3]. В клетке АФК появляются из нескольких источников: утечка электронов из электрон-транспортной цепи в митохондриях (ксантин оксидаза, цитохромы P450, пероксидазы и др.) или окисление низкомолекулярными метаболитами, необратимо приводящим к появлению окислительных повреждений в ДНК, а также под действием внешних источников: ксенобиотики, УФ-излучение [3].

Чаще всего с АФК реагируют основания пуринового ряда, давая в качестве окислительных продуктов: 8-оксогуанин (8-oG), 2,6-диамино-4-гидрокси-5-формамидопиримидин (Fapy-G), 8-оксоаденин (8-oA), 4,6-диамино-5-формамидопиримидин (FapyAde) и др. Одно из наиболее распространенных окислительных повреждений это 8-oG, которое часто используется как маркер окислительного стресса [4–6]. Присутствие 8-oG в ДНК оказывает весьма мутагенное влияние вследствие того, что в *син*-конформации 8-oG образует Хугстиновскую пару с аденином [7, 8]. Как итог, при наличии в ДНК 8-oG после 1-го раунда репликации появляется трансверсия G:C→T:A, которая представляет собой одну из основных причин возникновения рака у человека с сигнатурами SBS18 и SBS36 [9–14]. Для борьбы с этими последствиями практически все живые организмы имеют специализированную ферментативную систему — «GO-систему», которая состоит из 3-х ферментов:

- 1) 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза (Fpg у бактерий и OGG1 у эукариот), которая удаляет 8-oG из пары 8-oG:C,
- 2) 8-oG:A-специфичная аденин-ДНК-гликозилаза, удаляющая аденин из пары 8-oG:A (MutY у бактерий и MUTYH у эукариот),
- 3) 8-оксоГТФаза (MutT у бактерий и MTH1 у эукариот), которая предотвращает включение 8-oG в ДНК из пула окисленных нуклеозидтрифосфатов, гидролизуя d(8-oG)TP [7, 8].

Тем не менее, основания пиримидинового ряда тоже реагируют с АФК, хоть и с меньшей частотой. Пиримидины образуют отличный ряд повреждений, подвергаясь

действию АФК. Это обусловлено не только отличием пиримидинового кольца от пуринового, но, в частности, и наличием метильной группы в 5-м положении для Т и 5-mC [3]: тимингликоль (Tg) и урацилгликоль (Ug), дигидротимин (h₂T) и дигидроурацил (h₂U), 5-гидроксиурацил (ohU) и 5-гидроксицитозин (hoC) и др [15, 16]. Для удаления этого ряда повреждений у прокариот есть 2 фермента с перекрывающейся субстратной специфичностью: эндонуклеаза VIII (Nei) и эндонуклеаза III (Nth), у эукариот это NTHL [17].

Сегодня ДНК-гликозилазы разделены на суперсемейства, внутри которых у разных ферментов может быть различная субстратная специфичность, но основным критерием для классификации остается именно структурное сходство (структурные мотивы, домены) [17]. Удивительно, что такие ферменты как Fpg и Nei находятся в одном суперсемействе — «спираль–2 поворота–спираль» и помимо структурного сходства, эти ферменты имеют высокую гомологию в аминокислотной последовательности, а также одинаковые механизмы удаления поврежденного основания из ДНК [17, 18]. При этом субстратная специфичность для ферментов отличается: для Fpg основной субстрат окисленные пурины, но меньшая активность проявляется и на окисленных пиримидинах, для Nei же наоборот, основные субстраты — окисленные пиримидины, при том, что Nei также способен удалять окисленные пурины, но с меньшей эффективностью.

Анализ нокаутов по генам Fpg или Nei бактерии *E. coli* показал, что рост колоний ухудшается при наличии в питательной среде антибиотиков, блокирующих синтез белка (макролиды: клиритромицин, эритромицин; тетрациклины: доксициклин, миноциклин) или синтез клеточной стенки (пептидные и гликопептидные: бацитрацин, ванкомицин; β-лактамы: амоксицилин, цефокситин) относительно клеток дикого типа [19]. Таким образом, более детальное изучение механизмов распознавания и удаления окислительных повреждений из ДНК имеет помимо большого фундаментального еще и практический интерес, поскольку исследования механизмов работы таких ферментов откроет путь к разработке ингибиторов этих ферментов для преодоления проблемы антибиотикорезистентности.

Цель настоящей работы заключалась в детальном изучении механизмов узнавания и удаления окислительных повреждений из ДНК бактериальными ферментами структурного суперсемейства «спираль–2 поворота–спираль» физико-химическими методами.

Были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить электростатический потенциал активного центра фермента формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы (Fpg) *E. coli* дикого типа и каталитически неактивного мутантного варианта Fpg *E. coli* E2Q с помощью

конъюгированной к двуцепочечному олигонуклеотиду нитроксильной спин-метки (методом непрерывного ЭПР и методом модуляции огибающей сигналов электронного спинового эха).

2. Определить функциональную роль тетрапептидной петли 219–222 Fpg *L. lactis* в узнавании окислительного повреждения ферментом дикого типа и его мутантными вариантами с рандомизированными заменами аминокислотных остатков тетрапептидной петли.
3. Определить ключевые взаимодействия эндонуклеазы VIII (Nei) *E. coli* с основанием напротив повреждения в ДНК путем кристаллизации ДНК-белковых конъюгатов и получения кристаллических структур этих комплексов.

Научная новизна и практическая значимость работы: в работе впервые был изучен электростатический потенциал активного центра ДНК-гликозилазы Fpg *E. coli* с помощью нитроксильной спиновой метки, а также влияние инактивирующей мутации Fpg *E. coli* E2Q на электростатический потенциал, что позволило помимо разработки нового метода также получить новые данные в пользу каталитического механизма фермента.

Впервые были получены рандомизированные мутантные варианты ДНК-гликозилазы Fpg *L. lactis* по тетрапептидной петле 219–222, предложен механизм участия петли в распознавании окислительных повреждений в ДНК, с учетом природы основания напротив повреждения.

Впервые получены и проанализированы кристаллические структуры ковалентного конъюгата ДНК-гликозилазы Nei *E. coli* с модельными ДНК-субстратами, содержащими напротив повреждения тимин, цитозин или гуанин, для определения ключевых субстрат-специфичных взаимодействий, влияющих на кинетику реакции удаления поврежденных оснований. Впервые обнаружено изменение конформации пиримидиновых оснований напротив повреждения.

Ферменты суперсемейства «спираль–2 поворота–спираль» вовлечены в процессы распознавания и удаления широкого ряда наиболее распространенных повреждений ДНК — окислительных повреждений как продуктов взаимодействия АФК с азотистыми основаниями ДНК. Понимание детальных молекулярных механизмов узнавания и удаления повреждений потенциально открывает 2 области практического применения: со стороны белковой инженерии, результаты работы будут полезны для создания ферментов с заданной субстратной специфичностью, а также со стороны здравоохранения для разработки ингибиторов таких ферментов с целью уменьшения антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов.

Личное участие автора: автором лично и в полном объеме проводились следующие работы: сайт-направленный мутагенез для получения мутантного варианта Fpg *E. coli* E2Q, дальнейшие наработка и хроматографическое выделение Fpg *E. coli* дикого типа и мутантного варианта E2Q, сборка дцДНК-комплексов с одно- или двунуклеотидной брешью со свободным гексаметиленовым линкером или конъюгированной нитроксильной спин-меткой, определение капиллярным термофорезом равновесных констант диссоциации (K_d) комплексов Fpg *E. coli* дикого типа и мутантного варианта E2Q с двуцепочечной ДНК с гексаметиленовым линкером, эксперименты по характеристике Fpg *L. lactis* дикого типа и мутантных вариантов по петле 219–222, хроматографическое выделение Nei *E. coli*, образование ковалентных конъюгатов Nei *E. coli* с дцДНК-субстратами с их дальнейшим хроматографическим выделением, кристаллизация ковалентных конъюгатов Nei *E. coli* с дцДНК с последующим установлением их кристаллической структуры.

Методы исследования: для внесения мутаций в гены ферментов проводился сайт-направленный мутагенез; для выделения и очистки белков использовались ионообменная и аффинная хроматографии; для функциональной характеристики ферментов использовались классические биохимические методы: ферментативная кинетика с последующим электрофоретическим разделением субстрата и продуктов в денатурирующем полиакриламидном геле, анализ связывания белков с ДНК-субстратами проводился с помощью капиллярного термофореза на приборе Monolith (NanoTemper Technologies, Германия) или электрофоретического разделения ДНК-субстрата и комплекса с ферментом в неденатурирующем полиакриламидном геле; для образования ДНК-белкового аддукта использовался метод восстановления промежуточного интермедиата основания Шиффа с помощью боргидрида натрия с последующей ионообменной хроматографией, для количественной обработки экспериментальных данных использовали программу «Quantity One» v 4.6.3 («Bio-Rad», США) и SigmaPlot 11.0 (SPSS, США); анализ термической денатурации белков проводился с помощью высокоскоростной дифференциальной сканирующей флуорометрии на приборе Taiko (NanoTemper Technologies, Германия); получение белковых и ДНК-белковых кристаллов проводили с использованием стандартных методов кристаллизации: методом сидячей капли. Дифракционные данные для ковалентных конъюгатов Nei-ДНК получены сотрудником Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний МФТИ И. А. Капрановым на Шанхайском источнике синхротного излучения на станции BL02U1. Обработка дифракционных данных проводилась с помощью программных пакетов XDS (Wolfgang Kabsch, Max Planck Institute, Германия), CCP4 (Collaborative

Computational Project №4, Великобритания), Phenix (Lawrence Berkeley National Laboratory, США) и Coot (LMB, Великобритания), визуализация кристаллических структур проводилась с помощью PyMOL (Schrödinger, LLC, США).

Результаты

2. Изучение электростатического потенциала Fpg *E. coli* с помощью нитроксильной спин-метки, конъюгированной с ДНК, содержащей одно- или двунуклеотидную брешь

После того, как в процессе репарации Fpg удаляет 8-оG из ДНК, реакция не останавливается, и фермент удаляет остаток сахара по механизму β/δ -элиминирования, оставляя брешь, фланкированную фосфатами [20, 21, 22] (Рисунок 1).

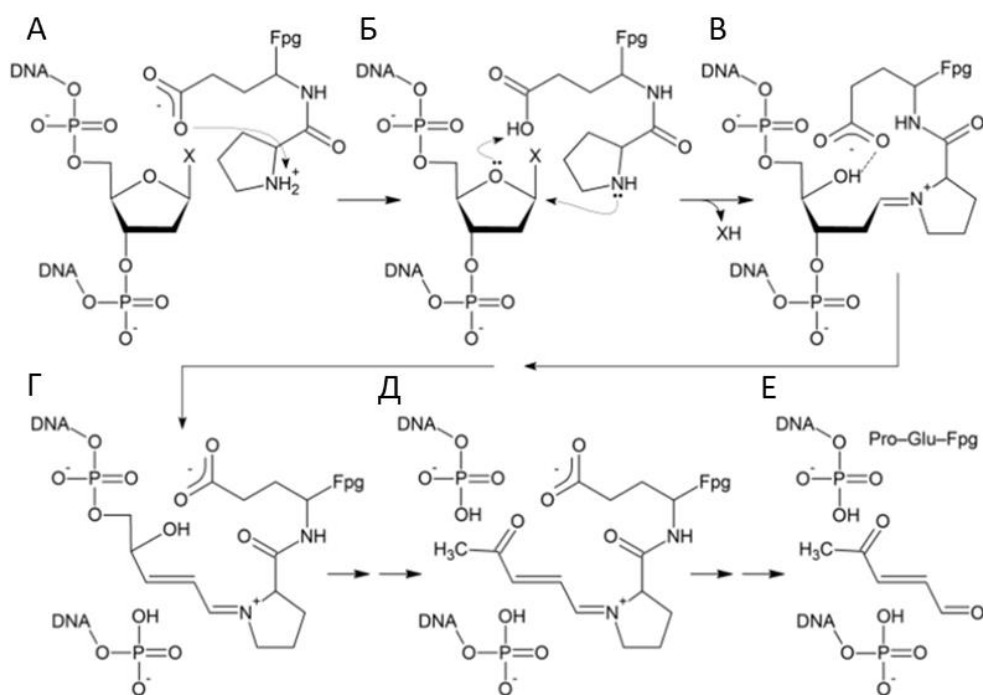


Рисунок 1. Основной механизм реакции, катализируемой Fpg. X — окисленное основание 8-оG. На рисунке цифрами обозначены отдельные стадии механизма удаления 8-оG каталитической парой Pro1-Glu2 в Fpg: А — миграция протона с Pro1 на Glu2, Б — атака неподеленной электронной парой атома азота Pro1 по C1' фуранозного кольца дезоксирибозы, с последующим раскрытием цикла и образованием основания Шиффа, В–Е — последовательные реакции β - и β/δ -элиминирования.

Известно, что по меньшей мере, Fpg из *G. stearothermophilus*, образует достаточно стабильный комплекс с такой двуцепочечной (дц-) ДНК с брешью, который затем возможно закристаллизовать [20]. Поэтому, для реализации задачи по изучению электростатического потенциала активного центра формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы были разработаны 4 дцДНК с одно- или двунуклеотидной брешью в качестве лиганда для Fpg для дальнейшего размещения в этой брешли нитроксильной спин-метки, конъюгированной с ДНК, основываясь на последовательностях, для которых подробно описаны кинетики удаления поврежденных оснований из ДНК [23, 24].

2.1. Анализ связывания EsoFrg с олиго-дцДНК, содержащей одно- или двунуклеотидную брешь с помощью капиллярного термофореза

Как было описано выше, ДНК дуплексы содержали одно или двунуклеотидную брешь, а также спиновую метку, прикрепленную к 5'- или 3'-концу внутри бреши через гексаметиленовый линкер (Рисунок 2, Таблица 1,

Таблица 2).

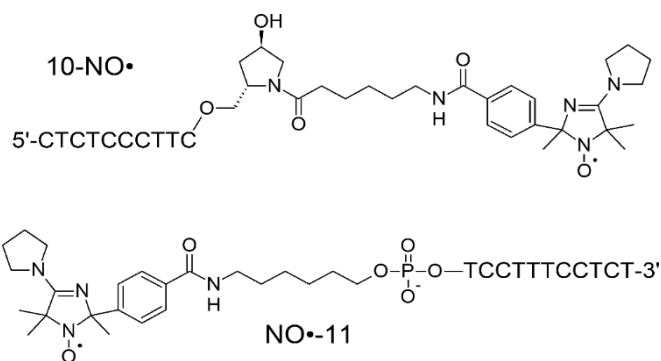


Рисунок 2. Структура спин-метки, конъюгированной с ДНК с помощью гексаметиленового линкера.

Таблица 1. Олигонуклеотиды (ОДН), используемые для сборки диДНК дуплексов для ЭПР-экспериментов.

Название	Последовательность ОДН, 5'→3'
10-OH	CTCTCCCTTC
10-NH ₂	CTCTCCCTTC-[linker]-NH ₂
10-NO•	CTCTCCCTTC-[linker]-NO•
OH-11	TCCTTTCCTCT
NH ₂ -11	NH ₂ -[linker]-TCCTTTCCTCT
NO•-11	NO•-[linker]-TCCTTTCCTCT
comp22	AGAGGAAAGGACGAAGGGAGAG
comp23-1	AGAGGAAAGGACCGAAGGGAGAG
comp23-2	AGAGGAAAGGAGCGAAGGGAGAG
TAMRA-comp22	[TAMRA]-AGAGGAAAGGACGAAGGGAGAG
TAMRA-comp23	[TAMRA]-AGAGGAAAGGACCGAAGGGAGAG

Таблица 2. Названия и состав дцДНК, используемых для ЭПР-экспериментов. В скобках указано молярное соотношение олигонуклеотидов относительно олигонуклеотида с линкером или спин-меткой в составе дцДНК.

Название дцДНК	Олигонуклеотиды	Структура дцДНК ^a
gap1-NH ₂	10-OH NH ₂ -11 TAMRA-comp22	linker (1) 5'-CTCTCCCTTC TCCTTTCCTCT-3' (1) 3'-GAGAGGGAAGCAGGAAAGGAGA-TAMRA (1)
gap2-NH ₂	10-OH NH ₂ -11 TAMRA-comp23	linker (1) 5'-CTCTCCCTTC TCCTTTCCTCT-3' (1) 3'-GAGAGGGAAGCCAGGAAAGGAGA-TAMRA (1)
NH ₂ -gap1	10-NH ₂ OH-11 TAMRA-comp22	linker (1) 5'-CTCTCCCTTC TCCTTTCCTCT-3' (1) 3'-GAGAGGGAAGCAGGAAAGGAGA-TAMRA (1)
NH ₂ -gap2	10-NH ₂ OH-11 TAMRA-comp23	linker (1) 5'-CTCTCCCTTC TCCTTTCCTCT-3' (1) 3'-GAGAGGGAAGCCAGGAAAGGAGA-TAMRA (1)
gap1-NO•	10-OH NO•-11 comp22	label (1.0625) 5'-CTCTCCCTTC TCCTTTCCTCT-3' (1) (1.0625) 3'-GAGAGGGAAGCAGGAAAGGAGA-5'
gap2-NO•	10-OH NO•-11 comp23-1	label (1.0625) 5'-CTCTCCCTTC TCCTTTCCTCT-3' (1) (1.0625) 3'-GAGAGGGAAGCCAGGAAAGGAGA-5'
NO•-gap1	10-NO• OH-11 comp22	label (1) 5'-CTCTCCCTTC TCCTTTCCTCT-3' (1.0625) 3'-GAGAGGGAAGCAGGAAAGGAGA-5' (1.0625)
NO•-gap2	10-NO• OH-11 comp23-1	label (1) 5'-CTCTCCCTTC TCCTTTCCTCT-3' (1.0625) 3'-GAGAGGGAAGCCAGGAAAGGAGA-5' (1.0625)

Структурные данные указывают на то, что карман для связывания и узнавания повреждения достаточно широкий и гибкий [25], так что справедливо было предположить, что по меньшей мере одна из разработанных структур позволит разместить спин-метку достаточно близко к каталитической паре Pro1-Glu2.

Для оценки способности EcoFpg связываться со смоделированными нами структурами ДНК с брешью, мы использовали капиллярный термофорез для измерения сродства фермента дикого типа к таким дуплексам, содержащим только линкер на одном из концов брешы (далее эти линкеры будут использованы для присоединения нитроксильной спин-метки к ДНК) и флуоресцентный краситель TAMRA на 5'-конце комплементарной цепи (gap1-NH₂, gap2-NH₂, NH₂-gap1, NH₂-gap2,

Таблица 2).

ЕсоFpg образовывал комплекс с разной эффективностью с каждым из дуплексов с линкером, что было четко детектируемо (Рисунок 3А). Сродство ЕсоFpg к дуплексам, содержащим однонуклеотидную брешь с линкером на любом из концов брешы, было одного порядка (Рисунок 3Б, Таблица 3).

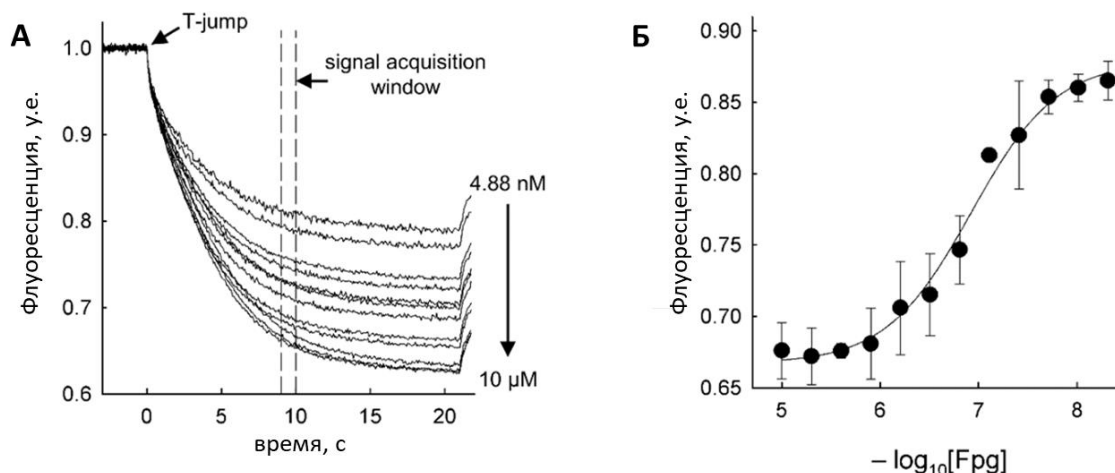


Рисунок 3. Связывание Fpg с ДНК-дуплексами, анализируемое методом микротермофореза. А — Пример флуоресцентных спектров дуплекса NH₂-gap1. Б — Кривая связывания NH₂-gap1. Показано среднее значение $\pm$ стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Данные аппроксимированы по уравнению сигмоиды. У.е., условные единицы.

Таблица 3. Значение K_d для комплексов ЕсоFpg с дцДНК, содержащей одно- или двунуклеотидную брешь с линкером.

Название дцДНК	K_d , μM^a
gap1-NH ₂	$0,35 \pm 0,17$
gap2-NH ₂	$8,7 \pm 4,2$
NH ₂ -gap1	$0,13 \pm 0,06$
NH ₂ -gap2	$2,6 \pm 1,5$

Для дуплексов, содержащих линкер на любом из концов двунуклеотидной брешы, связывание с ферментом было менее эффективно, как минимум на порядок при сравнении с субстратами с однонуклеотидной брешью (Таблица 3). Значения K_d были сравнимы со значениями из литературных данных как для неповрежденной дцДНК ($0,25 - 12 \mu\text{M}$), так и для дцДНК с однонуклеотидной брешью ($1,8 - 2,0 \mu\text{M}$), однако эти значения были определены для субстратов различной длины другими методами (анализ электрофоретической подвижности образуемых комплексов фермент-лиганд, метод остановленной струи) [23, 26, 27]. Из этого следует, что при концентрациях ЕсоFpg и дцДНК с брешью более, чем $10 \mu\text{M}$ в растворе они будут находиться преимущественно в фермент-субстратном комплексе, что позволит проводить ЭПР-измерения для комплекса.

2.2. Синтез 2-(2-((2,5-диоксопирролидиноокси)карбонил)фенил)-2,5,5-триметил-4-(пирролидино)-2,5-дигидро-1Н-имидазол-1-оксил и 2-(4-(2-гидроксиэтилкарбомоил)фенил)-2,5,5-триметил-4-(пирролидино)-2,5-дигидро-1Н-имидазол-1-оксила

Синтез нитроксильной спин-метки (Рисунок 4) выполнялся в НИОХ СО РАН им. Ворожцова в лаборатории азотистых соединений к.х.н. И. А. Кирилюком.

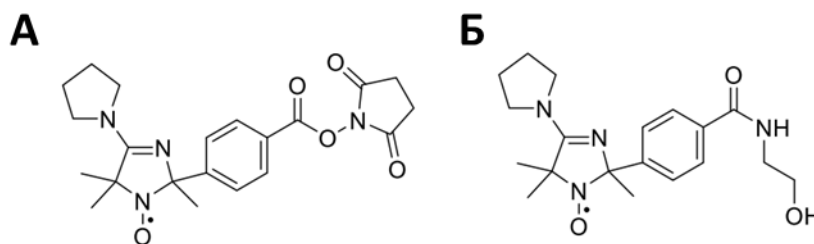


Рисунок 4. Спин-метка для ЭПР-экспериментов. А — спин-метка для конъюгирования с ДНК, Б — водорастворимая спин-метка для ЭПР-экспериментов со свободной меткой.

2.3. Синтез олигонуклеотидов и конъюгирование нитрокисльной спин-метки с олигонуклеотидами

Синтез всех олигонуклеотидов и конъюгирование нитрокисльной спин-метки с олигонуклеотидами (Рисунок 2) выполнялся в ИХБФМ СО РАН в лаборатории химии нуклеиновых кислот Т. Д. Жарковым.

2.4. Исследование доступности растворителя к радикальному центру спин-метки в комплексе EsoFpg-ДНК методом модуляции огибающей сигналов электронного спинового эха (ESEEM)

Для того, чтобы убедиться, что спин-метка при образовании комплекса Fpg-ДНК действительно находится вблизи активного центра фермента, а не вблизи внешней поверхности белковой глобулы, была исследована доступность растворителя к радикальному центру с помощью метода модуляции огибающей сигналов электронного спинового эха (electron spin echo envelope modulation — ESEEM). Этот метод позволяет измерить концентрацию дейтерированных молекул растворителя в радиусе около 5 Å от радикального центра спин-метки; ранее этот метод применялся для измерения доступности растворителя в модельных мембранах [28]. После калибровки полученных данных ESEEM для свободной метки, дальнейшие эксперименты были проведены в водно-глицериновой смеси с объемным соотношением 1:1, в которую добавляли дейтерированную воду (D₂O) и

глицерин (глицерин-d8) для олигонуклеотида NO•-11 и дцДНК gap1-NO• и gap2-NO• с/без EcoFpg дикого типа (WT) или мутантного варианта E2Q (далее E2Q). По тому, как свободная спин-метка показывала линейный ответ при различных концентрациях дейтерированных компонентов, был определён наблюдаемый фактор доступности растворителя для конъюгированной с ДНК спин-метки α_{obs} из ESEEM-амплитуд A , по уравнению $A = \alpha_{\text{obs}} \times (0.942 \times d(\text{D}_2\text{O}) + 1.271 \times d(\text{глицерин-d8}))$, где $d(\text{D}_2\text{O})$ и $d(\text{глицерин-d8})$ объёмное содержание D_2O и глицерина-d8 соответственно (коэффициенты 0,942 и 1,271 получены при линеаризации полученных данных на графике). Итоговые значения доступности растворителя к радикальному центру спин-метки приведены в Таблица 4.

Таблица 4. Доступность растворителя к радикальному центру спин-метки в комплексе EcoFpg-ДНК методом модуляции огибающей сигнала электронного спинового эха (ESEEM)

Образец	Растворитель (% D ₂ O, % глицерин-d8)	Амплитуда ESEEM ¹	α_{obs}	Доля метки, связанной с ферментом (p) ²	$\alpha_{\text{Fpg-ДНК}}$ ³
NO•-11	50% 50%	82,7 ± 5,0	0,75 ± 0,04	-	-
gap1-NO•	50% 50%	89,3 ± 5,4	0,81 ± 0,05	-	-
gap2-NO•	50% 50%	89,3 ± 5,4	0,81 ± 0,05	-	-
WT EcoFpg–gap1-NO•	13,6% 50%	52,6 ± 3,2	0,69 ± 0,04	0,42	0,52 ± 0,06
WT EcoFpg–gap2-NO•	13,6% 50%	49,0 ± 2,9	0,64 ± 0,04	0,45	0,43 ± 0,06
E2Q EcoFpg–gap1-NO•	9,3% 50%	48,2 ± 2,9	0,67 ± 0,04	0,35	0,41 ± 0,06
E2Q EcoFpg–gap2-NO•	9,3% 50%	46,0 ± 2,8	0,64 ± 0,04	0,47	0,45 ± 0,06

1 Ошибка оценивалась как 6% от значения амплитуды ESEEM

2 Оценка из X-компоненты спектра непрерывного ЭПР

3 Вычислена как $\alpha_{\text{Fpg-ДНК}} = \frac{\alpha_{\text{obs}} - \alpha_{\text{obs,ДНК}} \times (1-p)}{p}$, где $\alpha_{\text{obs,ДНК}}$ это α_{obs} для соответствующего ДНК-лиганда без фермента, а p это доля метки, связанной с ферментом

ESEEM-амплитуды для свободных NO•-11, gap1-NO• и gap2-NO• соответствовали примерно $\alpha_{\text{obs}} = 0,8$, что указывает на то, что радикальный центр спин-метки в этих случаях преимущественно взаимодействует только с растворителем. Чтобы скорректировать сигнал для фракции комплекса EcoFpg-ДНК, дополнительно были получены спектры X-диапазона непрерывного ЭПР при комнатной температуре для образцов ДНК, смешанных с EcoFpg (WT или E2Q) в смесях H₂O/D₂O, перед добавлением глицерина-d8 и шоковой заморозкой образца в рабочем процессе ESEEM. В целом, скорректированные α_{obs} значения,

вычисленные для комплексов EcoFpg-ДНК с gap1-NO• или gap2-NO•, были в диапазоне от 0,4 до 0,5 (Таблица 4), что означает уменьшение доступности молекул растворителя к радикальному центру нитроксильной спин-метки. Таким образом, можно заключить, что наиболее вероятно спин-метка в комплексах EcoFpg-ДНК изолирована от растворителя а. к. о. (аминокислотные остатки) активного центра фермента, что реализуется при взаимодействиях белка и ДНК.

2.5. Молекулярная динамика положения спин-метки в комплексе EcoFpg-ДНК

Молекулярная динамика (МД) была выполнена в НИОХ СО РАН им. Ворожцова в лаборатории магнитной радиоспектроскопии к.х.н. А. В. Шернюковым. МД проводилось для оценки расстояния между чувствительной к электростатическому окружению радикальной спин-метки и а. к. о. Pro1 и Glu2. Как результат, в симуляциях были получено расположение метки практически идентичное исходному в комплексе EcoFpg-ДНК (gap1-NO•) (за исходный комплекс мы взяли структуру ковалентного комплекса EcoFpg-ДНК [25]). Также были получены теоретические расстояния от радикального центра спин-метки до Pro1 ($8,9 \pm 0,5$ Å) и Glu2 ($14,0 \pm 0,7$ Å) (Рисунок 5).

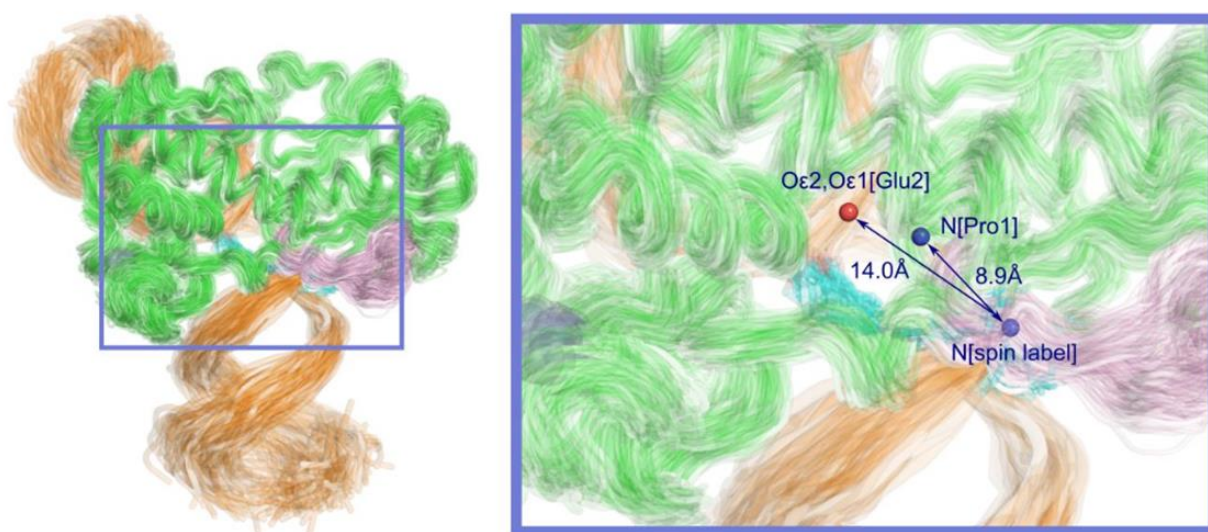


Рисунок 5. Ансамбль МД для комплекса Fpg-gap1-NO•. Белок Fpg окрашен зеленым цветом, петля связывания поврежденных нуклеотидов — розовым; ДНК — оранжевым; для наглядности показаны только основные цепи. Спировая метка окрашена в зависимости от типа атома (С — голубой; N — синий; О — красный). В синей рамке: наложенные друг на друга 500 снимков последних 50 нс траектории МД. Указаны средние положения интересующих атомов и расстояния между ними.

2.6. Анализ влияния замены E2Q в белке EсоFpg на поверхностный заряд ДНК-связывающего кармана методом непрерывного ЭПР

Для измерения эффекта мутации одной из ключевых каталитических аминокислот Glu2 на Gln2 в EсоFpg на локальный электростатический заряд в/около активного сайта, был получен набор спектров непрерывного ЭПР для конструкций дцДНК gap1-NO• и gap2-NO• в комплексе с EсоFpg WT/E2Q в диапазоне pH 6,60 – 8,14. Спектры после процедуры вычитания приведены на Рисунок 6.

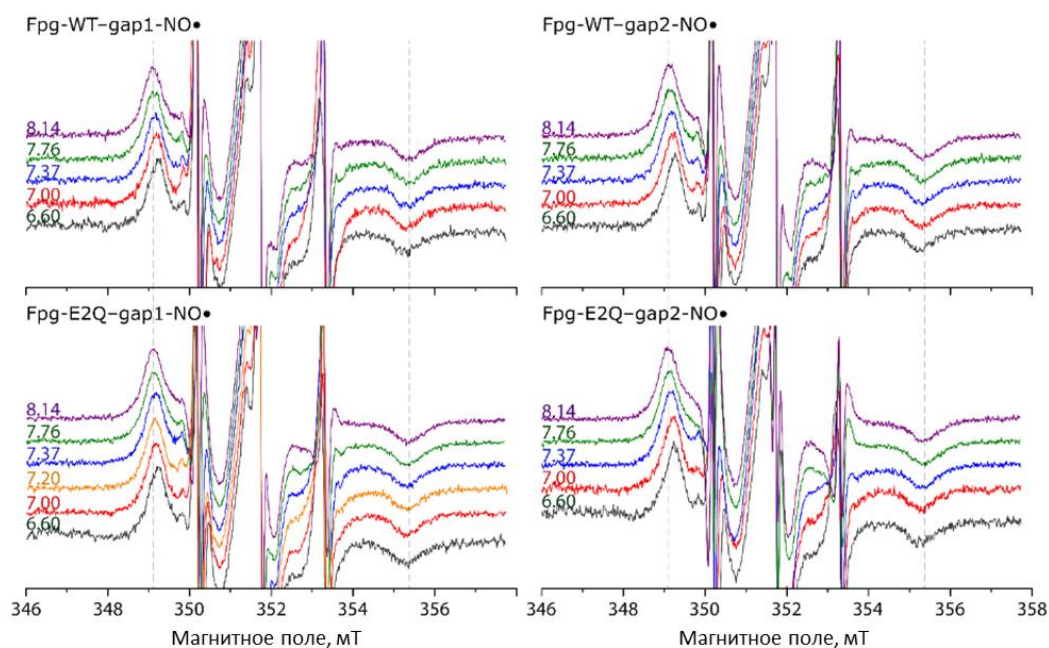


Рисунок 6. Сравнение спектров непрерывного ЭПР комплексов EсоFpg WT с gap1-NO•, EсоFpg WT с gap2-NO•, EсоFpg E2Q с gap1-NO• и EсоFpg E2Q с gap2-NO• после процедуры вычитания. Линии спектров обозначены разными цветами: при pH 6,60 — черным, 7,00 — красным, 7,20 — желтым, 7,37 — синим, 7,76 — зеленым и 8,14 — фиолетовым). Для наглядности спектры смещены в одно и то же центральное положение. Значения pH, при которых были получены спектры, указаны над линиями графика.

Поскольку спектры для gap1-NO• и gap2-NO• без фермента в зависимости от pH были одинаковы (Рисунок 7), спектр gap2-NO• был использован как общая базовая линия для всех образцов, чтобы минимизировать ошибку вычитания

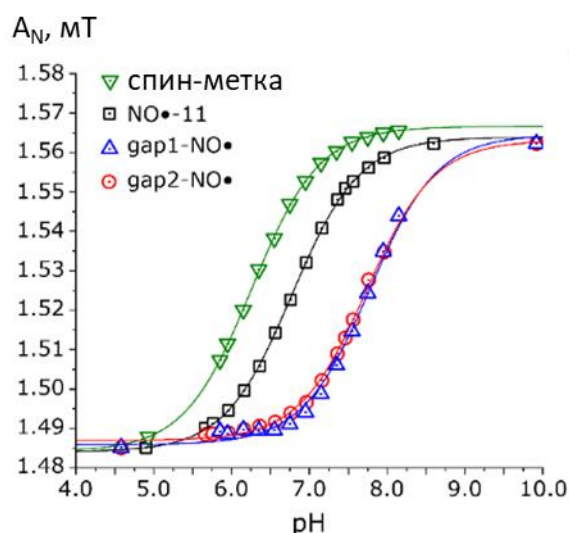


Рисунок 7. Зависимость A_N (Усреднённая константа сверхтонкого взаимодействия с азотом) от pH для спектров непрерывного ЭПР свободной спин-метки и конъюгированной с ДНК. Спин-метка в составе различных соединений обозначена фигурами различных цветов: свободная спин-метка — перевёрнутые зеленые треугольники, $\text{NO}\bullet$ -11 — черные квадраты, $\text{gap1-NO}\bullet$ — синие треугольники и $\text{gap2-NO}\bullet$ — красные кружки. Данные аппроксимированы уравнением Хендерсона–Хассельбаха: $A_N = \frac{A_N(R) + A_N(\text{RH}^+) \times 10^{pK_a - pH}}{1 + 10^{pK_a - pH}}$.

Зависимость $A_{N_{zz}}$ от pH для комплекса EcoFpg WT с $\text{gap1-NO}\bullet$ хорошо описывалась уравнением Гендерсона-Хассельбаха с фиксированными параметрами $A_{N_{zz}}(R) = 3,592 \text{ mT}$ и $A_{N_{zz}}(\text{RH}^+) = 3,401 \text{ mT}$, в результате чего было получено значение $pK_a 6,80 \pm 0,03$ (Рисунок 8).

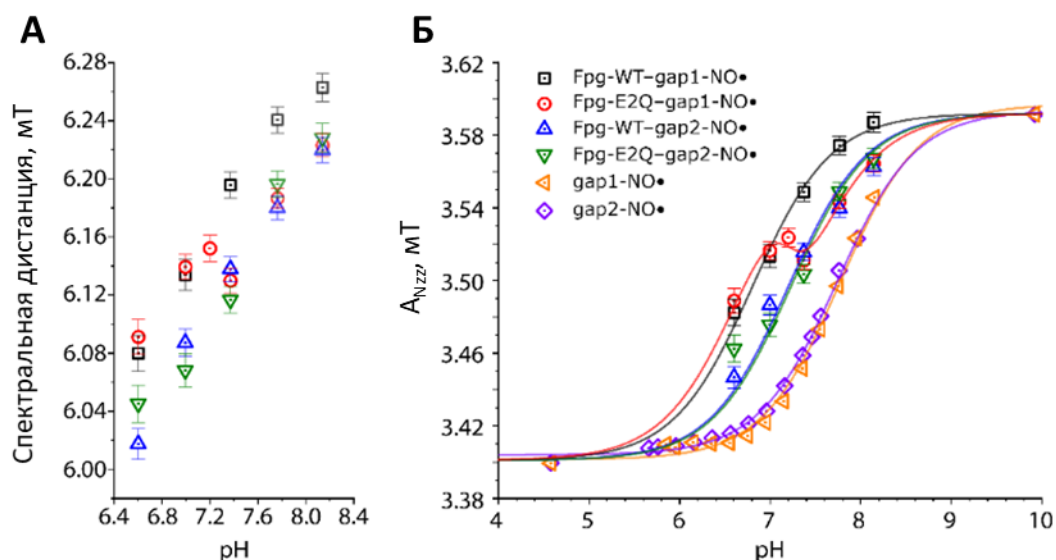


Рисунок 8. А — Расстояние между пиком сильного поля и пиком слабого поля в спектрах непрерывного ЭПР. Комплексы Fpg с дцДНК со спин-меткой обозначены фигурами различных цветов: EcoFpg-WT с $\text{gap1-NO}\bullet$ — черные квадраты, EcoFpg E2Q с $\text{gap1-NO}\bullet$ — красные кружки, EcoFpg WT с $\text{gap2-NO}\bullet$ — синие треугольники и EcoFpg E2Q $\text{gap2-NO}\bullet$ — перевёрнутые зеленые треугольники при pH 6,60–8,14. Б — Значения $A_{N_{zz}}$ (Z-компонента тензора сверхтонкого взаимодействия с азотом), рассчитанные для комплексов из значений расстояний, представленных на панели А, и для дцДНК с брешами ($\text{gap1-NO}\bullet$ — оранжевые треугольники, направленные влево, $\text{gap2-NO}\bullet$ — фиолетовые ромбы,) из изотропных значений A_N , представленных на рисунке 7. Данные аппроксимированы уравнением Хендерсона–Хассельбаха: $A_N = \frac{A_{N_{zz}}(R) + A_{N_{zz}}(\text{RH}^+) \times 10^{pK_a - pH}}{1 + 10^{pK_a - pH}}$.

где $A_{Nzz}(R)$, $A_{Nzz}(RH^+)$ и pK_a представляют собой варьируемые параметры свободных дуплексов, $A_{Nzz}(R) = 3,592$ мТ, $A_{Nzz}(RH^+) = 3,401$ мТ, а pK_a является переменной для комплексов белок–ДНК. Для комплекса Frg-E2Q-gap1-NO• единственный переменный параметр pK_a был заменен сигмоидальной функцией $pK_a = pK_{a1} + \frac{pK_{a2} - pK_{a1}}{1 + e^{-a(pH-b)}}$, где pK_{a1} , pK_{a2} и b являются переменными параметрами, $a = 8,0$.

Для схожего комплекса с EcoFpg WT с gap2-NO• в результате обработки данных были получены значения pK_a $7,20 \pm 0,06$ для EcoFpg WT и $7,23 \pm 0,06$ EcoFpg E2Q. Вполне возможно, что радикальный центр нитроксильной спин-метки (в составе дцДНК с двунуклеотидной брешью) в комплексе с EcoFpg находился достаточно далеко от дипептида Pro1–Glu2/Gln2 для измерения электростатического заряда. Однако, при образовании комплекса EcoFpg E2Q с gap1-NO• было зарегистрировано значительное отличие в результатах, относительно белка дикого типа. При pH ниже 7,00 значения A_{Nzz} для образуемых комплексов были схожими вне зависимости от варианта фермента. При значениях pH между 7,00 и 7,37, значения A_{Nzz} для вариантов EcoFpg с gap1-NO• были схожими, но при pH 7,20 было зарегистрирован перегиб, после которого поведение комплекса EcoFpg E2Q с gap1-NO• было схоже с комплексом EcoFpg E2Q с gap2-NO•. Такое поведение сигнала спин-метки напоминает то, что наблюдается на гидратированных поверхностях сшитых полимеров и мезопористых материалов, что обусловлено локальной буферной емкостью ионизирующихся групп на поверхности, расположенных вблизи радикального центра [29, 30].

Основываясь на полученных данных, можно предположить физический смысл наблюдаемых результатов: смещение значений pK_a спиновой метки связано с изменениями полярности и электростатики по уравнению $\Delta pK_a = \Delta pK_a^{pol} + \Delta pK_a^{el}$, где $\Delta pK_a^{el} = \frac{e\psi}{\ln(10)kT}$ [31, 32]. Соответственно, смещение значений ΔpK_a спиновой метки в комплексе Frg-ДНК к более основным значениям должно отражать изменение в поверхностном электростатическом потенциале ψ в отрицательную сторону, что может быть следствием или утери положительного заряда (депротонирования), или увеличения отрицательного заряда около радикального центра спин-метки. В целом, результаты исследования указывают на то, что при pH ниже 7,00 поверхностный потенциал, создаваемый а. к. о. активного центра фермента вокруг спин-метки в комплексе с дцДНК gap1-NO• с любым из вариантов EcoFpg весьма схож, но при pH > 7,37 окружение спин-метки меняется из-за измененного pK_a в активном центре EcoFpg E2Q, регистрируемое в комплексе EcoFpg E2Q-gap1-NO• из-за смещения значения в основную сторону примерно на $0,5 \pm 0,1$ по шкале pH.

3. Анализ мутантных вариантов Fpg *L. lactis* с рандомизированными заменами в тетрапептидной петле 219-222 на распознавание окислительного повреждения ДНК

Основываясь на литературных данных структуры комплекса Fpg с ДНК [25], связывание субстрата с ДНК-гликозилазой происходит на границе между доменами в положительно заряженной бороздке фермента, на дне которой располагается глубокий карман, который обеспечивает комплементарность фермента при связывании с субстратом.

Интересно, что структурные данные не показывают прямого взаимодействия Fpg с O⁸ 8-oG, который непосредственно отличает повреждение от канонического основания. Однако, при рассмотрении известных структур ДНК-гликозилазы Fpg разных видов в комплексе с субстратом можно заметить, что петля (находящаяся между αD и αE спиралями в EsoFpg) находится в непосредственной близости от O⁶ поврежденного основания. При этом после удаления повреждения, петля более не видна (т.е. не разрешена в структурах) [25]. На сегодняшний день лишь 3 структуры указывает на прямое взаимодействие этой петли и окислительного повреждения — структура комплекса Fpg *L. lactis* с дцДНК содержащей карбоциклический FapyG (в качестве нерасщепляемого аналога), где тетрапептидная петля 219–222 LlaFpg координирует именно O⁶ FapyG [33] и каталитически инактивированный мутантный вариант Fpg *G. stearothermophilus* E2Q в комплексе с ДНК, содержащей 8-oG или ohU, в обоих случаях тетрапептидная петля 222–225 координирует либо O⁶ 8-oG, либо O⁴ ohU [34]. На основании разрешения для кристаллических структур комплекса Fpg с FapyG (разрешение 1,95 Å) и с 8-oG (разрешение 2,34 Å) был сделан выбор в пользу структуры с разрешением 1,95 Å как исходного фермента для внесения мутаций в последовательность тетрапептидной петли и анализа вклада таких мутаций, поскольку при таком разрешении ориентация боковых радикалов а. к. о и нуклеотидов более четко детектируемы. На основании этих структур было сформулировано предположение, что несмотря на появление кислорода в 8-м положении гуанина, координация поврежденного основания происходит именно за счет взаимодействия амидов пептидного остова и O⁶ 8-oG (Рисунок 9).

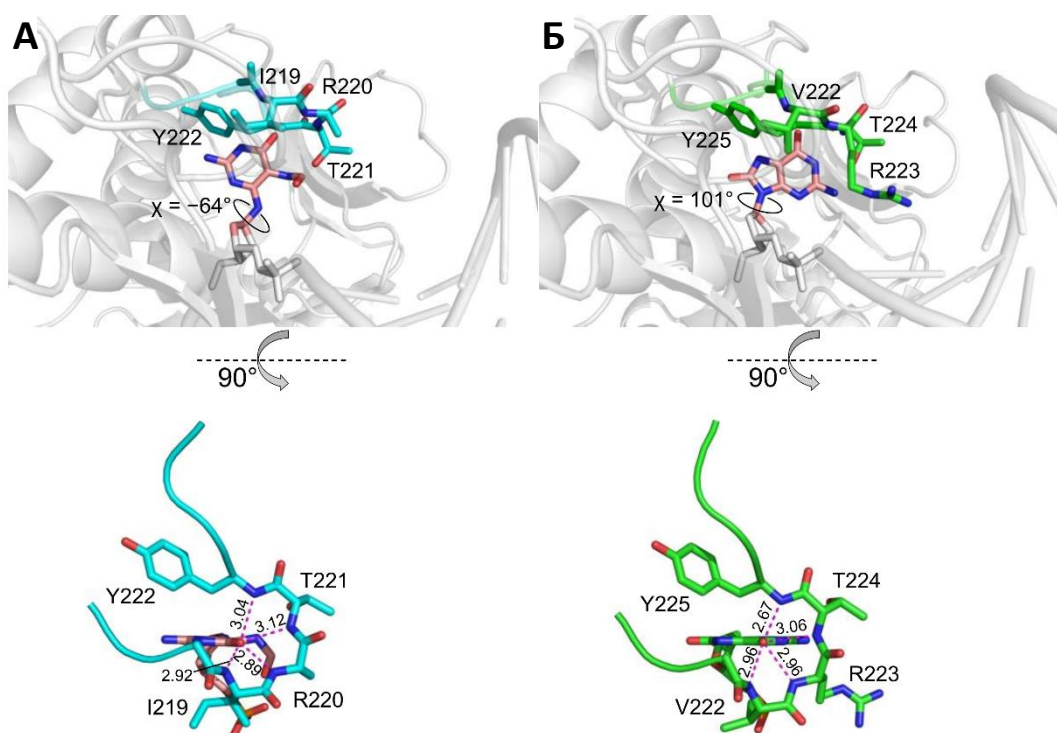


Рисунок 9. Ориентация повреждённого основания в структурах LlaFpg, связанного с ДНК, содержащей карбациклический аналог FapyG (A; 1XC8 [33]) и GstFpg, связанного с ДНК, содержащей 8-охоG (B; PDB ID 1R2Y [34]). На нижних изображениях показаны только повреждение и петля, связывающая повреждение; расстояния между атомом O⁶ и атомами азота амидных групп основной цепи указаны в Å.

3.1. Анализ консервативности петли в белке Fpg, отвечающей за распознавание повреждения

Была проанализирована консервативность аминокислот в петле Fpg, которая взаимодействует с 8-охоG или другими окисленными азотистыми основаниями. Для того чтобы исключить влияние других гликозилаз из суперсемейства «спираль–2 поворота–спираль» (такие как бактериальный Nei, животный NEIL и растительный/грибной MMH), было выбрано 428 последовательностей с высокой гомологией к консенсусной последовательности Fpg не более чем из одного семейства для белков этого суперсемейства. Для такого чрезвычайно важного структурного мотива оказалось, что размер и последовательность переменны (Рисунок 10). Хотя петля была представлена в 345 последовательностях из 428 (81%), длина петли составляла от 2 до 9 остатков (Рисунок 10А). Консервативность петли была умеренной, поскольку внутри последовательности петли находятся заряженные/полярные а. к. о., а на краях гидрофобные/ароматические а. к. о. (Рисунок 10Б). Анализ физико-химических свойств показал, что а. к. о. петли гораздо менее консервативны, чем другие необходимые для связывания или катализа структурные элементы: N-концевая каталитическая петля, ДНК-связывающий «спираль–2 поворота–спираль» мотив и мотив цинкового пальца (Рисунок 10В).

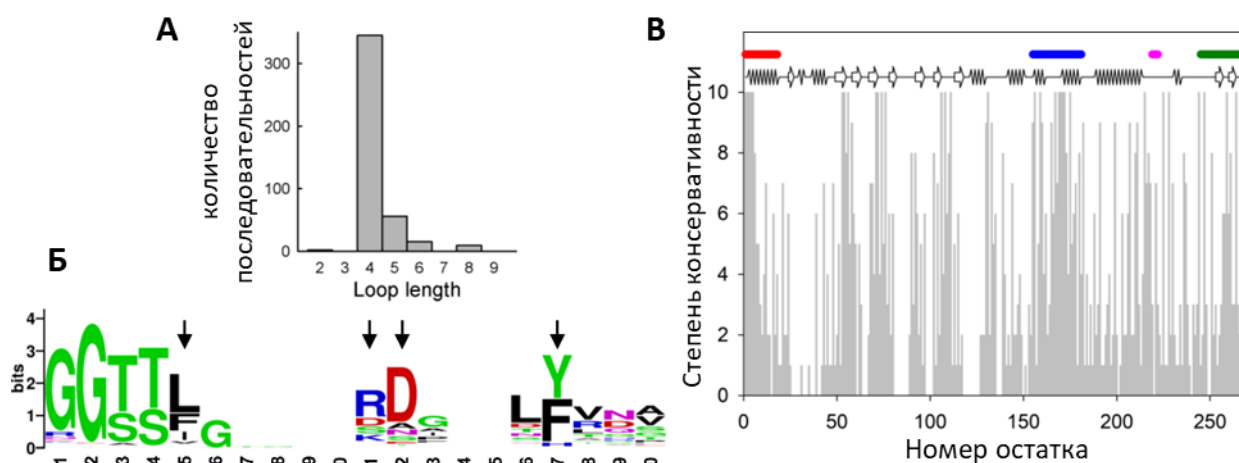


Рисунок 10. А — Распределение длин петли, ответственной за связывание повреждения, в 428 последовательностях Frg. Б — Консенсусный состав петли, основанный на сравнении последовательностей тех же белков. Диаграмма последовательности создана с помощью WebLogo [35]. Стрелки указывают положение остатков петли Lfpg (219IRTY222) в выравнивании. В — Сохранение физико-химических свойств аминокислот в тех же 428 белках Frg, картированных на последовательности Lfpg. Показана степень консервативности (СК) как $0 < СК < 10$, где 0 означает отсутствие консервативности, а 10 абсолютную консервативность [36]). Элементы вторичной структуры (α -спирали в виде зигзагов и β -тяжи в виде стрелок) схематически показаны в верхней части графика. Красные, синие, пурпурные и зеленые горизонтальные полосы обозначают соответственно N-концевую каталитическую спираль, мотив «спираль-два поворота-спираль», тетрапептидную петлю и мотив «цинкового пальца».

3.2. Влияние замен а. к. о. в тетрапептидной петле на общую укладку мутантных вариантов белка LlaFpg

Исходя из вышесказанного следует вывод, что взаимодействуют с 8-оG атомы азота амидов пептидного остова петли. Поэтому были сгенерированы и выделены 5 мутантных вариантов LlaFpg, в которых тетрапептидная петля $^{219}\text{IRTY}^{222}$ была заменена на рандомизированные варианты $^{219}\text{EDMM}^{222}$, $^{219}\text{NPGR}^{222}$, $^{219}\text{RQHG}^{222}$, $^{219}\text{RSAD}^{222}$, и $^{219}\text{WPHG}^{222}$ (далее мутантные варианты по петле) (Рисунок 11А).

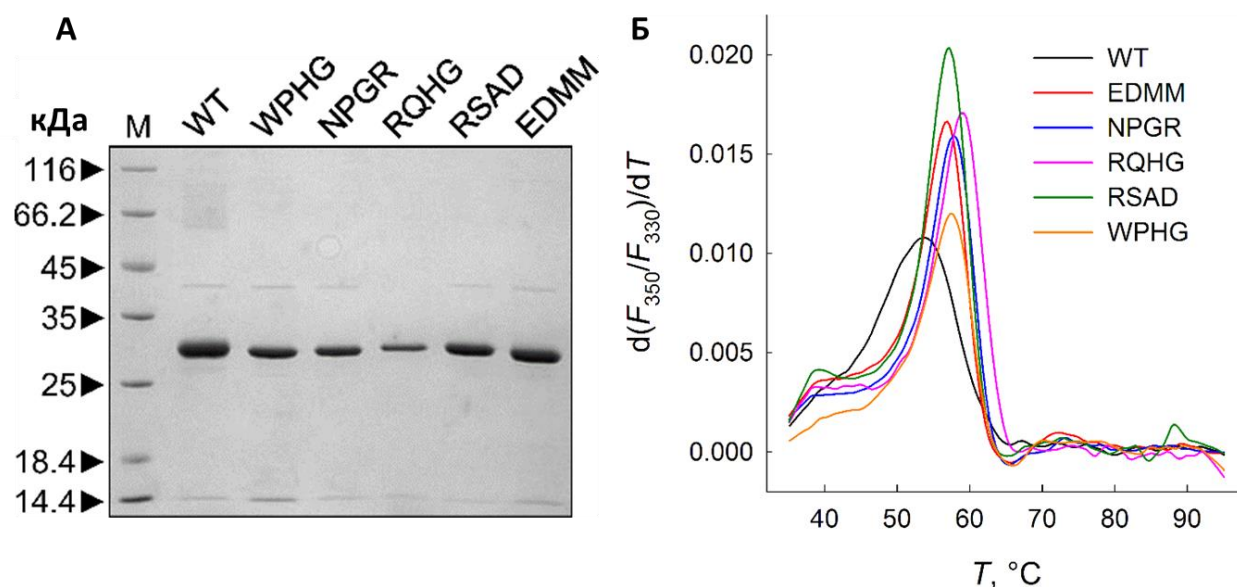


Рисунок 11. Очистка и характеристика термостабильности мутантных вариантов LlaFpg по петле 219-222. А — Гель, окрашенный кумасси после электрофореза в 12% SDS-ПААГ препаратов LlaFpg дикого типа и мутантных вариантов, М — маркеры подвижности белков; стрелки указывают молекулярную массу в кДа. Б — График точек перегиба при термической денатурации мутантных вариантов белка с помощью высокоскоростной дифференциальной сканирующей флуорометрии, данные представлены в виде графика первой производной отношения флуоресценции белков при 350 нм и 330 нм в зависимости от температуры. Варианты LlaFpg обозначены линиями разных цветов: EDMM — красная линия, RSAD — зеленая линия, RQHG — розовая линия, NPGR — синяя линия, WPHG — желтая линия, дикий тип — черная

Стоит отметить, что 2 мутантных варианта NPGR и WPHG содержали Pro во втором положении, который не способен образовывать водородные связи с участием атомов азота амидных групп пептидного остова. Все мутантные варианты имели температуру плавления чуть выше (на 3–5°C), чем дикий тип LlaFpg, что указывает на то, что внесенные мутации несущественно влияют на общую укладку белка (Таблица 5).

Таблица 5. Температуры плавления LlaFpg дикого типа и петлевых мутантов, рассчитанные на основе данных высокоскоростной дифференциальной сканирующей флуорометрии.

Фермент	$T_m, ^\circ\text{C}$
WT	53,8
EDMM	56,8
NPGR	57,8
RQHG	59,0
RSAD	57,1
WPHG	57,5

3.3. Влияние замен а. к. о. в тетрапептидной петле белка LlaFpg на эффективность удаления 8-оG из двуцепочечного олигонуклеотидного субстрата

При проверке способности удаления 8-оG из дцДНК субстрата, содержащего 8-оG:C, мутантные варианты проявляли небольшую активность в условиях стационарной кинетики (Рисунок 12).

Таблица 6. Названия и последовательности олигонуклеотидов, используемых для анализа ферментативной активности LlaFpg дикого типа и мутантных вариантов.

Название олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида	Модификация
23oG	CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT,	X = 8-oxoG
23U	CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT,	X = U
23ohU	CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT,	X = ohU
23F	CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT,	X = F
23compC	AGAGGAAAGGAGCGAAGGGAGAG	–
23compA	AGAGGAAAGGAGAGAAGGGAGAG	–

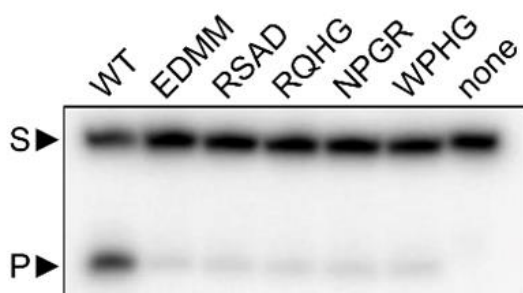


Рисунок 12. Радиоавтограф геля после разделения продуктов ферментативной реакции, катализируемой LlaFpg дикого типа и мутантных вариантов, на субстрате, содержащем 8-оG:C, после 60 мин инкубации, концентрация субстрата 50 нМ, концентрация фермента 5 нМ.

Нам удалось зарегистрировать продукты реакции только в условиях кинетики одного оборота (Рисунок 13А), однако, для мутантных вариантов реакция протекала со значительно меньшей скоростью. Константы скорости, которые были определены в условиях кинетики одного оборота, были меньше на 2-3 порядка для мутантных вариантов относительно дикого типа LlaFpg (Таблица 7).

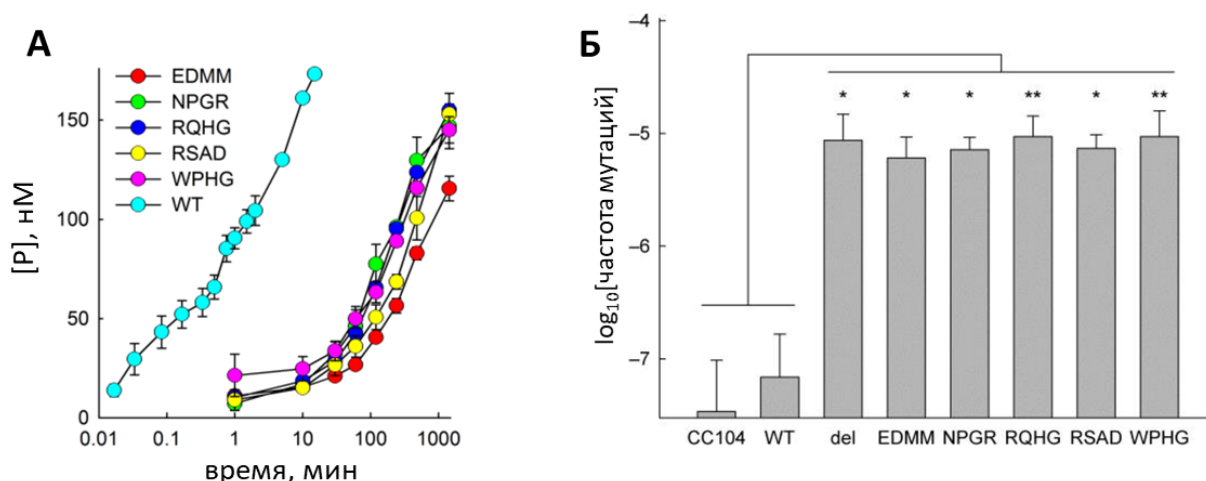


Рисунок 13. А — График накопления продукта от времени в условиях кинетики одного оборота под действием LlaFpg дикого типа и мутантных вариантов (концентрация субстрата 200 нМ, концентрация фермента 2 мкМ). Данные для вариантов LlaFpg обозначены кружками разных цветов: WT — голубым, EDMM — красным, NPGR — зеленым, RQHG — синим, RSAD — желтым и WPHG. — розовым. На графике приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего 3-х независимых повторов. Б — Частота мутаций, направленных на устойчивость к рифампицину, в штамме CC104 *fpg mutY*, трансформированном плазмидой, содержащей ген дикого типа LlaFpg (WT), неактивного мутантного варианта с делецией по петле LIFpg Δ H2TH (del) или указанного мутантного варианта, CC104 — дикий тип CC104, трансформированном плазмидой, содержащей ген неактивного мутантного варианта с делецией по петле LIFpg Δ H2TH.

Таблица 7. Значения k_2 для мутантных вариантов и белка дикого типа Fpg *L. lactis* на субстрате 8-оG:C¹.

Фермент	$k_2, \text{с}^{-1}$	относительно WT
WT	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^{-2}$	1,00
EDMM	$(5,5 \pm 0,6) \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-3}$
NPGR	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$9,1 \times 10^{-3}$
RQHG	$(7,8 \pm 0,5) \times 10^{-5}$	$7,1 \times 10^{-3}$
RSAD	$(4,6 \pm 0,7) \times 10^{-5}$	$4,2 \times 10^{-3}$
WPHG	$(7,4 \pm 0,8) \times 10^{-5}$	$6,7 \times 10^{-3}$

¹ Значение $\pm$ стандартная ошибка среднего 3–4 независимых экспериментов.

Более того, мутантные варианты LlaFpg повысили выживаемость мутагенного штамма *E. coli* CC104 *fpg mutY* в условиях устойчивости к рифампицину, в то время как дикий тип уменьшил частоту мутаций на 2 порядка (Рисунок 13Б). Таким образом, несмотря на низкую консервативность петли, детерминирующей повреждение, не любая последовательность данной петли позволяет сохранить эффективное удаление 8-оG из ДНК, представляющей собой основной субстрат для белков Fpg.

3.4. Влияние замен а. к. о. в тетрапептидной петле белка LlaFpg на сродство и эффективность расщепления АП-сайтов из двуцепочечного олигонуклеотидного субстрата

Помимо того, что Fpg эффективно удаляет 8-оG из ДНК, этот белок быстро расщепляет АП-сайты, образующиеся после удаления поврежденного основания, по

механизму β - и β/δ -элиминирования при атаке вторичной аминогруппой Pro1 по C1' остатка сахара [21, 37 – 39]. Примечательно, что в кристаллических структурах Frg в комплексе с ДНК, содержащей нерасщепляемый аналог АП-сайта, петля не разрешена, несмотря на то что поврежденный нуклеотид все равно вывернут из дцДНК, что говорит о том, что петля не образует контактов с таким видом повреждений [20, 40–44].

Мы измерили активность мутантных вариантов LlaFrg на дцДНК субстрате, содержащем АП-сайт напротив цитозина (АП:С) (Рисунок 14). В условиях стационарной кинетики (Рисунок 15) все мутантные варианты, кроме одного, расщепляли такой субстрат, хоть и медленнее фермента дикого типа. Исключением был мутантный вариант RQHG, который показал самое слабое (но детектируемое) расщепление.

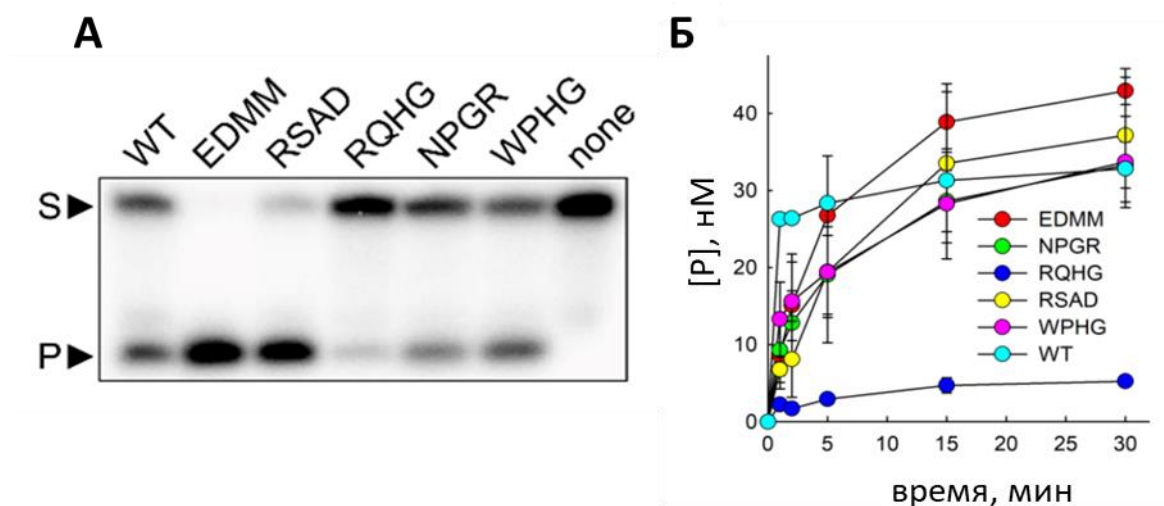


Рисунок 14. А — Радиоавтограф геля после разделения продуктов ферментативной реакции дикого типа и мутантных вариантов LlaFrg на субстрате, содержащем АП:С после 60 мин инкубации, концентрация субстрата 50 нМ, концентрация фермента 5 нМ. Б — График накопления продукта β/δ -элиминирования АП-сайта под воздействием мутантных форм и дикого типа LlaFrg. Данные для вариантов LlaFrg обозначены кружками разных цветов: WT — голубым, EDMM — красным, NPGR — зеленым, RQHG — синим, RSAD — желтым и WPHG — розовым. На графике приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего 3-х независимых экспериментов, концентрация субстрата 50 нМ, концентрация фермента 5 нМ.

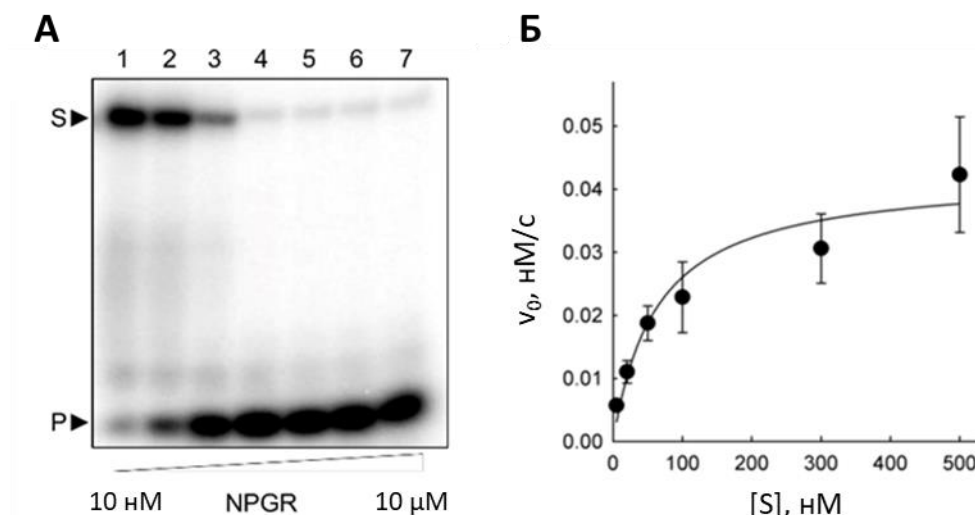


Рисунок 15. А — Радиоавтограф геля после разделения продуктов ферментативных реакций с вариантом NPGR LlaFpg для определения оптимальных условий кинетики Михаэлис-Ментен. Б — график зависимости скорости накопления продукта от концентрации субстрата АП:С для мутантного варианта NPGR LlaFpg (в концентрации 1 нМ). Данные аппроксимированы по уравнению нелинейной регрессии гиперболической функции. На графике приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего 3-х независимых экспериментов.

Кинетические параметры для всех вариантов LlaFpg в условиях стационарной кинетики (Таблица 8) указывают на то, что EDMM, NPGR, и WPHG сохраняли около половины от активности дикого типа (судя по константе специфичности k_{cat}/K_M), уменьшение значения константы специфичности было связано как с увеличением значения K_M (EDMM и WPHG), так и с падением значения k_{cat} (NPGR). В соответствии с данными, полученными при накоплении продукта от времени (Рисунок 15), RQHG проявлял наихудшую активность на исследуемом субстрате — значение k_{cat}/K_M было в 15 раз меньше относительно дикого типа, притом, что замены больше влияли на скорость реакции накопления продукта (k_{cat}). Для мутантного варианта RSAD было показано наиболее быстрое накопление продукта, но в условиях стационарной кинетики насыщение субстратом не происходило; соотношение k_{cat}/K_M было определено из линейной части уравнения на графике зависимости v_0 от $[S]_0$, значение этого параметра примерно в 7 раз было меньше, чем для фермента дикого типа. Напрямую сравнивать значения k_{cat} и K_M между вариантом RSAD и остальными вариантами LlaFpg не представлялось возможным.

Таблица 8. Кинетические константы, полученные в условиях стационарной кинетики для расщепления субстрата АП:С вариантами LlaFpg¹.

Фермент	K_M , нМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , $\mu\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$	относительно WT ²
WT	71 $\pm$ 22	0,10 $\pm$ 0,01	1,4 $\pm$ 0,5	1,00
EDMM	230 $\pm$ 120	0,16 $\pm$ 0,04	0,70 $\pm$ 0,40	0,49
NPGR	62 $\pm$ 23	0,042 $\pm$ 0,005	0,68 $\pm$ 0,26	0,48
RQHG	170 $\pm$ 130	0,016 $\pm$ 0,005	0,094 $\pm$ 0,078	0,07
RSAD	n/s ³	n/s	0,20 $\pm$ 0,04	0,14
WPHG	140 $\pm$ 70	0,13 $\pm$ 0,02	0,93 $\pm$ 0,49	0,66

¹ Значение ± стандартная ошибка среднего 3–4 независимых экспериментов.

² Соотношение k_{cat}/K_M для мутантных вариантов относительно WT LlaFpg для того же субстрата.

³ n/s, насыщение субстратом не было достигнуто, k_{cat}/K_M было определено из расчета тангенса угла наклона прямой на графике $v_0/[S]_0$.

Для проверки гипотезы, что внесенные в тетрапептидную петлю LlaFpg мутации не влияют на механизм реакции расщепления АП-сайта, была проведена реакция образования ДНК-белковой сшивки для всех вариантов LlaFpg и дцДНК, содержащей АП:С, путем восстановления промежуточного интермедиата — основания Шиффа — с помощью боргидрида натрия. Образующаяся лабильная альдиминовая связь Pro1-C1' необратимо превращается в стабильную ДНК-белковую сшивку под действием водорода, выделяющегося при гидролизе NaBH₄. Как видно на Рисунок 16 все мутантные варианты образуют медленно мигрирующую полосу, как и дикие варианты LlaFpg and EcoFpg, что подтверждает одинаковый каталитический механизм.

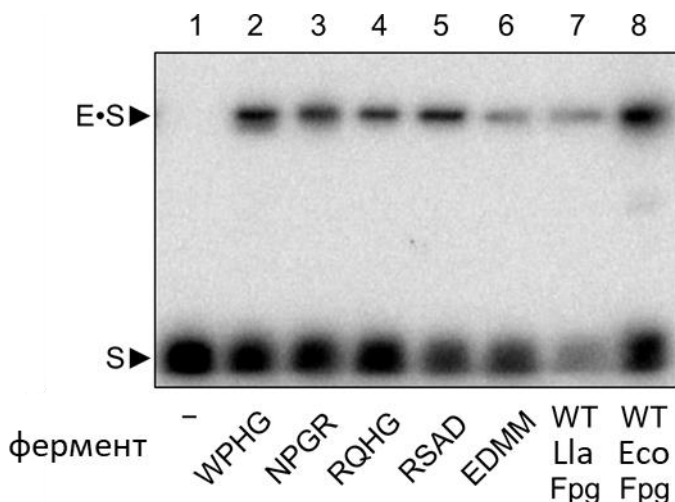


Рисунок 16. Радиоавтограф геля после разделения продуктов образования ДНК-белковой сшивки (E·S) с помощью боргидрида натрия между вариантами LlaFpg и EcoFpg дикого типа с субстратом АП:С.

Для сравнения аффинности мутантных вариантов LlaFpg к ДНК, содержащей АП-сайт, нами был использована дцДНК, содержащая (3-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)метил фосфат (F) напротив С (Рисунок 17). В присутствии всех вариантов LlaFpg возникала полоса, мигрирующая выше свободного ДНК-дуплекса в неденатурирующем полиакриламидном геле, которая соответствовала образованному комплексу между Fpg и дцДНК; при повышении концентрации белка появлялась еще более медленно мигрирующая полоса, которая указывала на неспецифичное связывание второй молекулы фермента к неповрежденной части дцДНК, которая не покрывалась первой молекулой фермента. Значение констант диссоциации комплекса дцДНК (содержащей F:С или F:А) и вариантов LlaFpg приведено в Таблица 9.

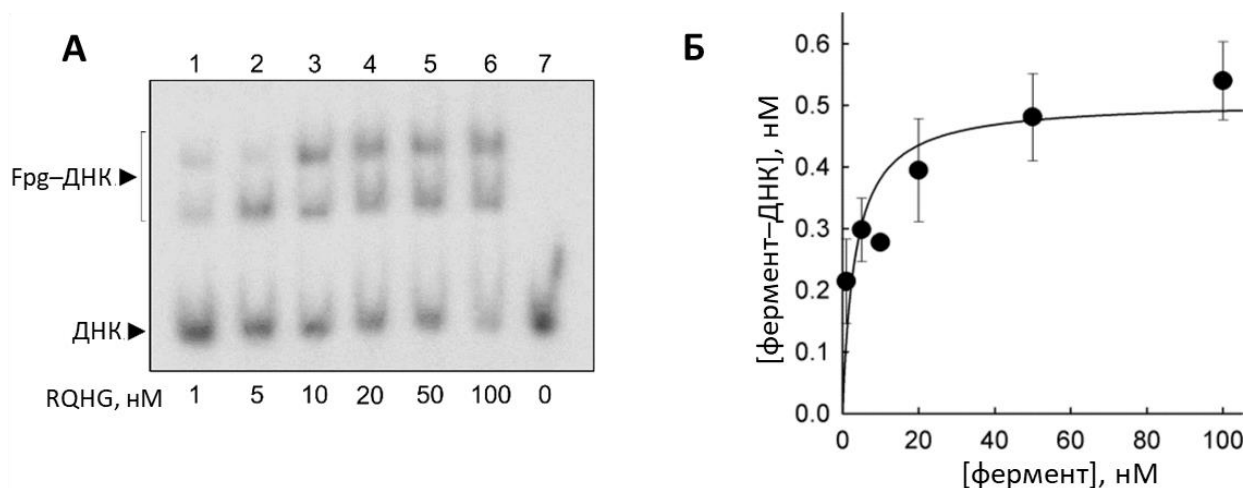


Рисунок 17. Связывание мутантных вариантов LlaFpg с ДНК-субстратом, содержащим F:C. А — Радиоавтограф геля, демонстрирующий связывание дцДНК с нерасщепляемым аналогом АП-сайта (F): концентрация фермента указана под изображением геля. Б — Кривая связывания мутанта RQHG с ДНК-дуплексом, содержащим F:C. Показано среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (3 независимых эксперимента); данные аппроксимировались уравнением гиперболической функции связывания.

Таблица 9. Значения констант связывания вариантов LlaFpg с дуплексами F:C и F:A¹.

Фермент	$K_d(F:C)$, нМ	$K_d(F:A)$, нМ
WT	$2,2 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,4$
EDMM	$0,5 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,4$
NPGR	$3,0 \pm 1,1$	$3,9 \pm 0,6$
RQHG	$3,3 \pm 1,3$	$3,8 \pm 1,0$
RSAD	$1,5 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,3$
WPHG	$0,4 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,2$

¹ Значение $\pm$ стандартная ошибка среднего 3–4 независимых экспериментов.

Можно отметить, что все мутантные варианты достаточно сильно похожи на дикий тип LlaFpg по способности связывать ДНК: аффинность была в диапазоне $0,7\text{--}5,5\times$ от аффинности дикого типа LlaFpg. В целом, полученные значения вполне ожидаемы, поскольку основная часть взаимодействий для образования комплекса Fpg-ДНК — электростатические взаимодействия с отрицательно заряженным фосфодиэфирным остовом ДНК [45], и петля не вносит вклада в эти взаимодействия. Все же значения констант диссоциации отличаются для всех вариантов, но в пределах порядка, что может быть обусловлено различной долей активной формы у каждого варианта фермента.

3.5. Влияние изменения последовательности тетрапептидной петли LlaFpg на специфичность к основанию напротив повреждения

Fpg специфичен к основанию напротив повреждения, поскольку при действии на субстрат, содержащий 8-oG, Fpg проявляет значительно большую активность на субстратах 8-oG:C, чем на 8-oG:A, так как удаление 8-oG из последней пары приведет к мутации G:C $\rightarrow$ T:A. Основную роль в распознавании основания напротив повреждения выполняет

остаток Arg (Arg109 в LlaFpg), который проникает внутрь дцДНК после выворачивания 8-оG из дуплекса и образует водородные связи с С, оставшимся внутри дуплекса [20, 25, 40]. Вдобавок результаты исследований с использованием метода остановленной струи с флуоресцентной меткой и вычисления методом молекулярной динамики показывают, что в случае А не образуются стабильные водородные связи с Arg [46, 47]. Однако, в случае повреждений, отличных от 8-оG, Fpg проявляет меньшую избирательность к основанию напротив повреждения [48]. Таким образом, предпочтение к С относительно А отражает (по крайней мере частично) способность фермента стабилизировать внеспиральное положение повреждения в каталитически компетентном состоянии, а также предотвращать возвращение повреждения внутрь спирали.

Для того, чтобы определить влияние замен а. к. о. в тетрапептидной петле LlaFpg на специфичность к основанию напротив повреждения, мы измерили кинетические параметры в условиях стационарной кинетики на дцДНК субстрате, содержащем АП:А (Таблица 10).

Таблица 10. Кинетические константы, полученные в условиях стационарной кинетики для расщепления субстрата АР:А вариантами LlaFpg¹.

Фермент	K_M , нМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , $\mu M^{-1} \times c^{-1}$	относительно WT ²	относительно АП:С ³
WT	150±80	$(2,5 \pm 0,5) \times 10^{-1}$	1,7±0,9	1,00	1,19
EDMM	33±14	$(5,7 \pm 1,0) \times 10^{-2}$	1,7±0,8	1,04	2,47
NPGR	60±42	$(7,9 \pm 1,6) \times 10^{-3}$	0,13±0,10	0,08	0,19
RQHG	33±16	$(4,2 \pm 0,6) \times 10^{-3}$	0,13±0,06	0,08	1,35
RSAD	110±40	$(4,6 \pm 0,6) \times 10^{-2}$	0,42±0,16	0,25	2,09
WPHG	n/s ⁴	n/s	0,10±0,02	0,06	0,11

¹ Значение±стандартная ошибка среднего 3–4 независимых экспериментов.

² Соотношение k_{cat}/K_M для мутантных вариантов относительно WT LlaFpg для того же субстрата.

³ Соотношение k_{cat}/K_M для субстрата АП:А относительно субстрата АП:С для того же фермента.

⁴ n/s, насыщение субстратом не было достигнуто, k_{cat}/K_M было определено из расчета тангенса угла наклона прямой на графике $v_0/[S]_0$.

LlaFpg дикого типа не проявляет предпочтения к С над А в субстратах, содержащих АП-сайт (соотношение k_{cat}/K_M для субстратов, содержащих АП:С или АП:А, не демонстрировало достоверных отличий), в отличие от субстратов, содержащих 8-оG. Мутантный вариант EDMM показал активность на уровне с диким типом на субстрате с АП:А, при этом, демонстрируя более низкую активность на субстрате с АП:С, и в целом наихудшее соотношение предпочтения С над А напротив АП-сайта, предпочитая все же А напротив. Активность мутантного варианта RSAD была в 4 раза меньше (соотношение k_{cat}/K_M), чем для дикого типа и EDMM, а предпочтение было для основания А напротив повреждения. Тем не менее, для мутантных вариантов NPGR, RQHG и WPHG активность была более чем в 10 раз меньше относительно дикого типа LlaFpg на субстрате, содержащем АП:А. Интересно, что варианты NPGR и WPHG проявляли большую

активность на субстратах с АП:С в сравнении с АП:А, тогда как RQHG показал сравнимое падение активности как для АП:С, так и для АП:А. В целом, мутанты по петле сохраняли способность расщеплять субстраты, содержащие АП-сайты напротив и С, и А, и не демонстрировали очевидной закономерности в эффективности катализа субстратов с разными основаниями напротив АП-сайта (Рисунок 18, Коэффициент корреляции Пирсона $r = 0,561$, $p = 0,247$).

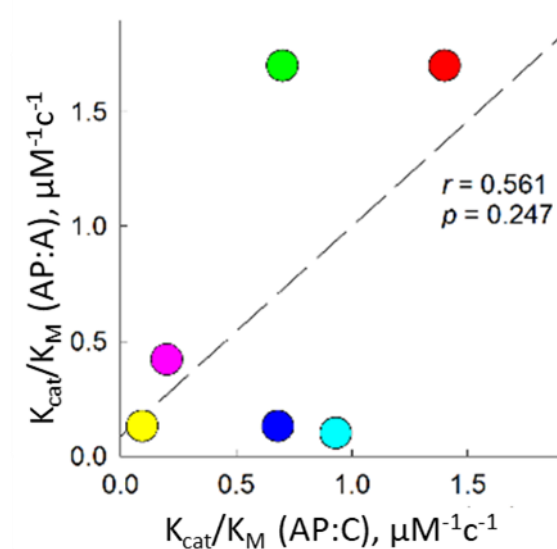


Рисунок 18. Корреляция между активностью вариантов LlaFrg на субстрате АП:А относительно АП:С. Данные для вариантов LlaFrg обозначены кружками разных цветов: WT — голубым, EDMM — красным, NPGR — зеленым, RQHG — синим, RSAD — желтым и WPHG. — розовым.

3.6. Влияние замен тетрапептидной петли белка LlaFrg на эффективность удаления ohU напротив С или А из двуцепочечного олигонуклеотидного субстрата

Хотя 8-оG, Fapy-G и Fapy-A представляют собой основные субстраты для Frg, основываясь на многочисленных биохимических и генетических исследованиях [49–55], фермент способен удалять целый ряд окислительных пиримидинов из олигонуклеотидных дц-субстратов [18, 55, 56]. Однако, эти повреждения не удаляются из высокомолекулярной ДНК, повреждения которой вызваны γ -излучением или H_2O_2 несмотря на то, что окисленные пиримидины присутствуют в заметных количествах [56]. Пиримидины образуют такие распространенные окислительные повреждения как h₂U и ohU, такие повреждения представляют собой неспецифичные субстраты Frg, которые удаляются из модельных ДНК так же эффективно, как и 8-оG, но не удаляются из геномной ДНК [24, 47, 53, 57, 58]. Для того, чтобы понять, влияют ли замены а. к. о. в тетрапептидной петле LlaFrg на узнавание окисленных пиримидинов, мы измерили кинетические

параметры на дц- олигонуклеотидном субстрате с ohU:C. Поразительно, все мутантные варианты проявляли активность на таком субстрате, сравнимую с активностью фермента дикого типа LlaFpg (Рисунок 19). Что говорит о том, что петля необходима для узнавания именно поврежденных пуринов.

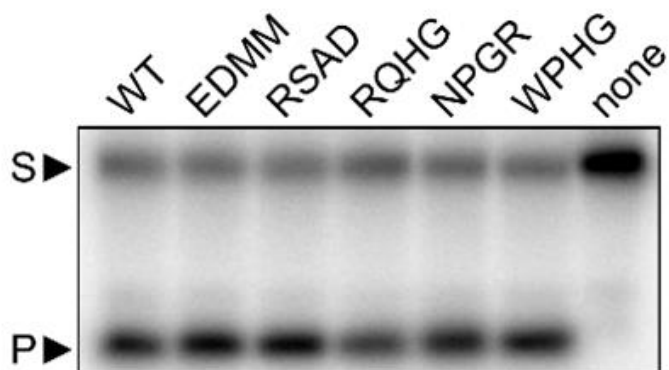


Рисунок 19. Радиоавтограф геля после разделения продуктов ферментативной реакции дикого типа и мутантных вариантов LlaFpg на субстрате, содержащем ohU:C после 60 мин инкубации, концентрация субстрата 50 нМ, концентрация фермента 5 нМ.

Таблица 11. Кинетические константы, полученные в условиях стационарной кинетики для расщепления субстрата ohU:C диким типом и мутантными вариантами LlaFpg¹.

Фермент	K_M , нМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , $\mu M^{-1} \times c^{-1}$	Относительно WT ²	относительно АП:С ³
WT	130±40	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-1}$	1,4±0,5	1,00	1,03
EDMM	38±15	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^{-2}$	0,37±0,16	0,26	0,53
NPGR	22±7	$(9,1 \pm 0,6) \times 10^{-3}$	0,41±0,13	0,29	0,61
RQHG	51±22	$(4,6 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	0,090±0,040	0,06	0,96
RSAD	31±17	$(5,8 \pm 0,7) \times 10^{-3}$	0,19±0,10	0,13	0,94
WPHG	43±15	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^{-2}$	0,33±0,12	0,23	0,35

¹ Значение±стандартная ошибка среднего 3–4 независимых экспериментов.

² Соотношение k_{cat}/K_M для мутантных вариантов относительно WT LlaFpg для того же субстрата.

³ Соотношение k_{cat}/K_M для субстрата ohU:C относительно субстрата АП:С для того же фермента.

Мутантные варианты EDMM, NPGR и WPHG проявляли активность в 3,4–4,3 раз меньше, чем дикий тип при сравнении значений k_{cat}/K_M . Тогда как влияние мутаций для RSAD и RQHG был более значительным, падение активности было в 7,7 и 17 раз, соответственно. Примечательно, что на субстратах с ohU:C и АП:С была корреляция по проявляемой активности (Рисунок 20, коэффициент корреляции Пирсона $r = 0,870$, $p = 0,0243$).

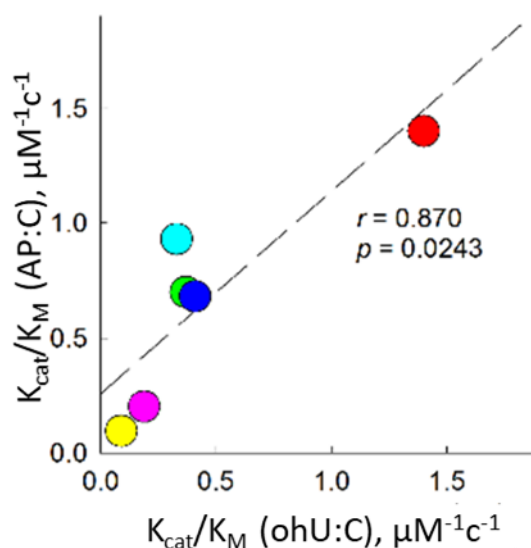


Рисунок 20. Корреляция между активностью вариантов LlaFpg на субстрате АП:С относительно ohU:С. Данные для вариантов LlaFpg обозначены кружками разных цветов: WT — голубым, EDMM — красным, NPGR — зеленым, RQHG — синим, RSAD — желтым и WPHG. — розовым.

Также мы проанализировали активность всех вариантов на субстратах, содержащих ohU:A (Таблица 12).

Таблица 12. Кинетические константы, полученные в условиях стационарной кинетики для расщепления субстрата ohU:A диким типом и мутантными вариантами LlaFpg¹.

Фермент	K_M , нМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , $\mu M^{-1} \times c^{-1}$	относительно WT ²	относительно АП:А ³	относительно ohU:С ⁴
WT	330±80	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^{-1}$	0,58±0,15	1,00	0,34	0,41
EDMM	97±39	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^{-2}$	0,16±0,07	0,28	0,10	0,44
NPGR	n/s ⁵	n/s	0,082±0,009	0,14	0,63	0,20
RQHG	270±110	$(4,1 \pm 0,7) \times 10^{-2}$	0,15±0,07	0,26	1,17	1,68
RSAD	n/s	n/s	0,15±0,02	0,26	0,35	0,78
WPHG	73±15	$(2,6 \pm 0,2) \times 10^{-2}$	0,35±0,07	0,61	3,50	1,06

¹ Значение±стандартная ошибка среднего 3–5 независимых экспериментов.

² Соотношение k_{cat}/K_M для мутантных вариантов относительно WT LlaFpg для того же субстрата.

³ Соотношение k_{cat}/K_M для субстрата ohU:A относительно субстрата АП:А для того же фермента.

⁴ Соотношение k_{cat}/K_M для субстрата ohU:A относительно субстрата ohU:С для того же фермента.

⁵ n/s, насыщение субстратом не было достигнуто, k_{cat}/K_M было определено из расчета тангенса угла наклона прямой на графике $v_0/[S]_0$.

В отличие от АП:С, АП:А и ohU:С, пара ohU:A стабилизируется за счет образования водородных связей [59], что, как ожидается, осложнит выворачивание поврежденного нуклеотида из спирали дцДНК. Дикий тип LlaFpg проявлял активность в 2,5 раза меньшую на субстрате с ohU:A, чем на субстратах с ohU:С или АП:А, в основном из-за более высокого значения K_M (Таблица 10–12). Как и в случае субстрата с ohU:С, мутантные варианты проявляли меньшую активность: в 1,6 для WPHG и в 7,1 для NPGR. Проявляемая активность на субстратах с ohU:С или ohU:A хорошо коррелировала (Рисунок 21А,

коэффициент корреляции Пирсона $r = 0,853$, $p = 0,0308$), однако не было корреляции при обработке результатов для субстратов, содержащих ohU:A и АП:А (Рисунок 21Б, коэффициент корреляции Пирсона $r = 0,490$, $p = 0,323$). Таким образом, активность всех вариантов LlaFpg проявлялась в значительной степени похожим образом на дцДНК, содержащей как неканоническое поврежденное основание (ohU), так и АП-сайт, притом, вне зависимости от основания напротив повреждения.

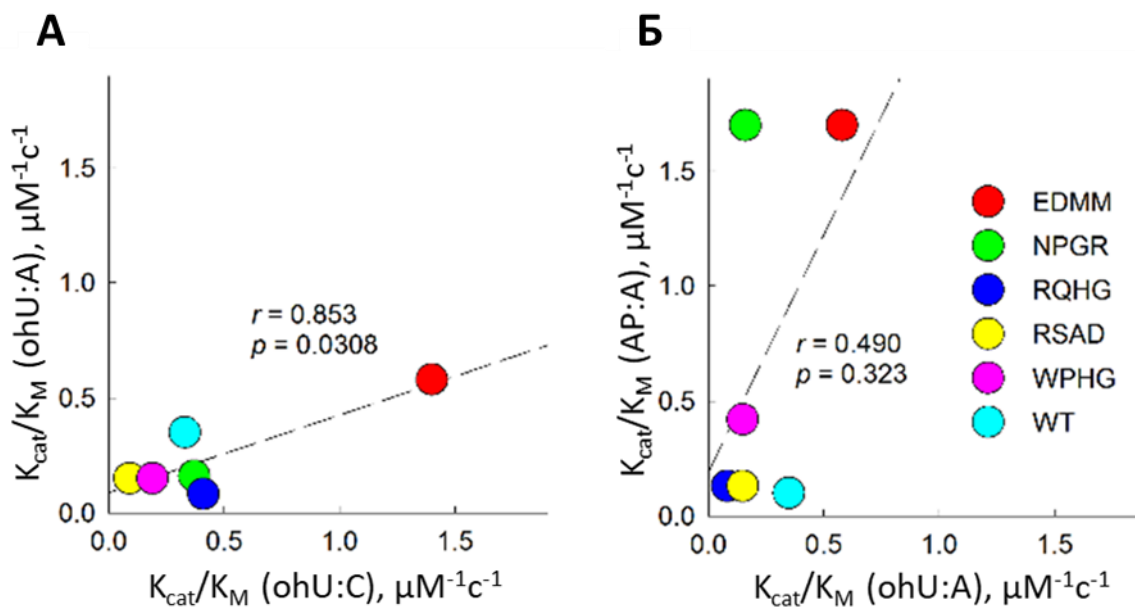


Рисунок 21. А — Корреляция между активностью вариантов LlaFpg на субстрате ohU:A относительно ohU:C. Б — Корреляция между активностью вариантов LlaFpg на субстрате АП:А относительно ohU:A. Данные для вариантов LlaFpg обозначены кружками разных цветов: WT — голубым, EDMM — красным, NPGR — зеленым, RQHG — синим, RSAD — желтым и WPHG. — розовым.

В целом, можно заключить, что замены а. к. о. в тетрапетидной петле LlaFpg отразились на активности ферментов, проявляемой на субстратах с различными окислительными повреждениями (8-oG, ohU, АП-сайт). Рандомизированные замены а. к. о. петли LlaFpg повлияли и на эффективность катализа расщепления ферментом как субстрата, содержащего АП-сайт, или же содержащего ohU, хоть и активность мутантных вариантов фермента относительно белка дикого типа отличалась в наихудшем случае примерно на порядок, в то время как для субстрата, содержащего целевое повреждение для Fpg — 8-oG, активность снизилась на 2–3 порядка. Таким образом можно сделать вывод, что несмотря на малую консервативность а. к. о. петли Fpg, необходимой для узнавания повреждения, которое осуществляется путем координации O^6 поврежденных пуринов атомами азота амидов пептидного остова петли, все же необходимо наличие консенсусной последовательности а. к. о. петли для правильного формирования конформации этой петли вокруг координируемого атома кислорода.

4. Анализ взаимодействия аминокислотных остатков активного центра Nei *E. coli* с основанием напротив повреждения

4.1. Общая структура ковалентных конъюгатов Nei–ДНК

Опубликованная структура комплекса Nei–ДНК (Nei-X:A) представлена восстановленным ковалентным интермедиатом Nei *E. coli* с 13-ти нуклеотидным ДНК дуплексом с тупыми концами, содержащим А напротив восстановленного АП-сайта (2-дезоксирибит, dRbl), конъюгированным с Nei посредством связи между C1'[dRbl]–N[Pro1] [60] (представлены 2-мя структурами с PDB ID: 1K3W и 1K3X, отличие лишь в том, что структура 1K3X содержит 5-бром урацил вместо тимина в ДНК. Структура 1K3X была разрешена методом многоволнового аномального рассеяния атомов брома, далее использовалась для решения фазовой проблемы с помощью молекулярного замещения для получения кристаллической структуры 1K3W). Примечательно, что в базах данных отсутствовали структуры с другими основаниями напротив повреждения, и выводы о возможном взаимодействии Nei с основанием напротив повреждения были сделаны исключительно на основании кинетических данных. Поэтому, для понимания механизма дискриминации субстрата ДНК-гликозилазой Nei относительно разных оснований напротив повреждения были получены и закристаллизованы ковалентные конъюгаты Nei *E. coli* с ДНК такой же последовательности, что и в структуре 1K3W, но содержащей С (Nei-X:C), G (Nei-X: G) или Т (Nei-X: T) напротив ковалентной сшивки Nei–ДНК (Таблица 13). Структуры имеют конечное разрешение: 1,75 Å (Nei-X:C), 1,85 Å (Nei-X:G), и 1,80 Å (Nei-X:T), что позволяло сравнивать их со структурой Nei-X:A (Рисунок 22).

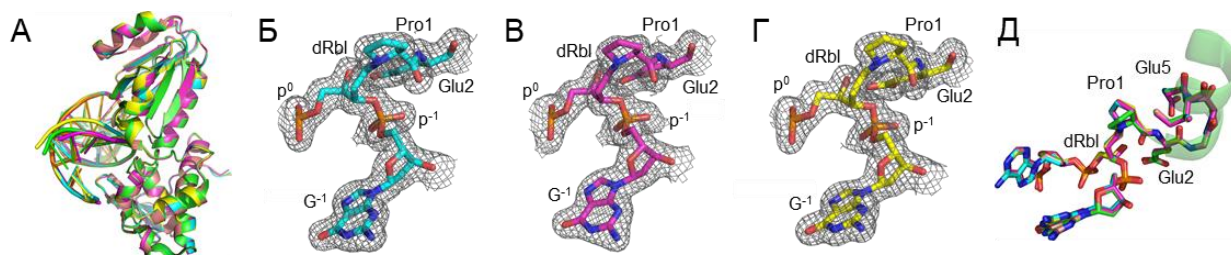


Рисунок 22. Структура комплексов Nei–ДНК и вид активного центра. А — Наложение структур Nei, ковалентно связанных с ДНК, содержащей А (структуры 1K3W — зеленый, и 1K3X — оранжевый [60]), С — голубой, G — пурпурный и Т — желтый напротив повреждения. Б–Г — Крупный план сшивки dRbl–Pro1 для комплексов Nei-X:C (Б), Nei-X:G (В) и Nei-X:T (Г) с визуализацией электронной плотности на уровне 1σ. Е — Наложение, показывающее конформацию Pro1 и N-концевой части каталитической спирали αА.

Таблица 13. Названия и последовательности олигонуклеотидов, используемых для получения кристаллических структур ковалентных конъюгатов EсоNei–ДНК и для определения физико-химических параметров активности EсоNei на субстратах, содержащих различные 5-замещенные пиримидиновые основаниями напротив повреждения.

Название	Последовательность, 5'→3'	Модификация
<i>Кристаллизация</i>		
xtal-mod	CCAGGATGAAGCC	Селективное окисление Т в Тg с помощью OsO ₄
xtal-comp-C	GGCTTCCTCCTGG	
xtal-comp-G	GGCTTCGTCCTGG	
xtal-comp-T	GGCTTCTTCCTGG	
<i>Ферментативные кинетики</i>		
kin-ohU	AGAGGAAAGGAGXGAAGGGAGAG	X = ohU
kin-comp-T	CTCTCCCTTCTCTCCTTTTCCTCT	
kin-comp-EtU	CTCTCCCTTCTCTCCTTTTCCTCT	X = 5-этилиурацил
kin-comp-AlkU	CTCTCCCTTCTCTCCTTTTCCTCT	X = 5-(окта-1,7-диин-1-ил)-урацил

Общие структуры белковой части комплексов были практически идентичны, со среднеквадратичным отклонением (RMSD) C α между Nei-X:A и новыми структурами: 0,234 Å для Nei-X:C, 0,223 Å для Nei-X:G и 0,247 Å для Nei-X:T. Nei состоит из 2х доменов, N-концевой (остатки 1–111) и C-концевой (остатки 135–262), соединенных линкером, который меняет свою конформацию при связывании с ДНК, из-за чего происходит относительное смещение доменов на ~50° в свободном ферменте и в ферменте в комплексе с ДНК [60, 61]. При сравнении новых комплексов с Nei-X:A домены изменили свое положение лишь на $\pm 1^\circ$, явно указывая на то, что изменение основания напротив повреждения не вызывает больших конформационных перестроек боковых радикалов а. к. о. и пептидного остова белка.

В структуре Nei-X:A, петля, формирующая связывающий повреждение карман (остатки 215–222) отсутствует [60], что в целом характерно для структур ДНК-гликозилаз суперсемейства «спираль–2 поворота–спираль» в комплексе с ДНК с отсутствующим поврежденным основанием, которое уже удалено в стабилизированном интермедиате [20, 25, 40–44, 62–64]. В новых структурах петля также не разрешена из-за отсутствующей электронной плотности, хотя удалось достроить остаток Gly222 во всех случаях. Помимо петли, не было обнаружено и Тg в кармане, который ранее ожидалось увидеть после хроматографического выделения и концентрирования ковалентных конъюгатов для дальнейшей кристаллизации. Кроме этого, петля, соединяющая β -цепи $\beta 5$ и $\beta 6$ в N-концевом домене достаточно лабильна, из-за чего значения В-фактора во всех 4х структурах самые высокие. Однако, она достаточно далека от каталитического центра и

ДНК-связывающих аминокислот, из чего можно сделать вывод, что её вклад в катализ и узнавание повреждения отсутствует.

4.2. Взаимодействия EcoNei и ДНК

Из 13 оснований в ДНК комплекса Nei-X:A отсутствуют терминальные пары оснований ($C^{+6}:G^{(-6)}$ и $C^{-6}:G^{(+6)}$, Рисунок 23).

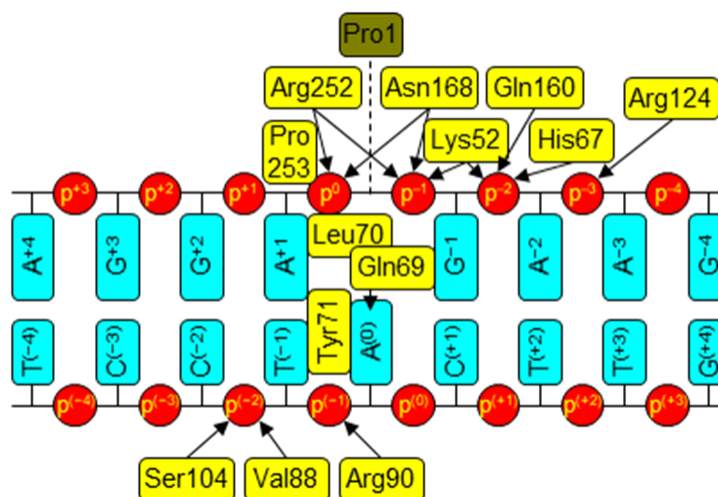


Рисунок 23. Организация ДНК-белковых взаимодействий в EcoNei. Схема контактов основана на кристаллической структуре EcoNei с ДНК [60].

В добавок, в структуре 1K3X отсутствует вторая пара оснований ($C^{-5}:G^{(+5)}$), а также в структуре 1K3X отсутствуют остатки $T^{(+3)}-G^{(+5)}$ в комплементарной цепи. В новых же структурах концы ДНК лучше разрешены: в Nei-X:C лишь 5'- и 3'-концевые нуклеотиды цепи с повреждением не разрешены, в Nei-X:T не разрешены 5'- и 3'-концевые нуклеотиды обеих цепей, а в Nei-X:G также отсутствует второй нуклеотид поврежденной цепи с 5'-конца. EcoNei полностью или частично покрывает остатки $A^{+1}-A^{-3}$ поврежденной цепи, и $C^{(-3)}-N^{(0)}$, $T^{(+3)}-G^{(+6)}$ комплементарной цепи, покрывая $703-736 \text{ \AA}^2$ и $336-406 \text{ \AA}^2$ соответственно (Рисунок 24).

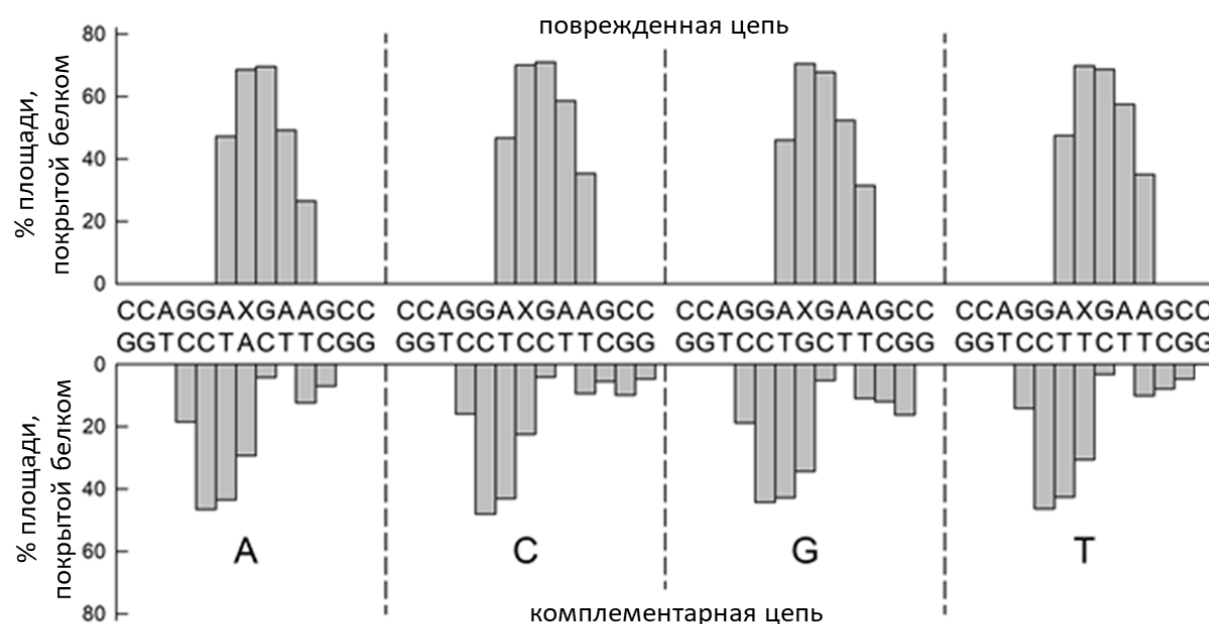


Рисунок 24. Покрывание EcoNei нуклеотидов ДНК в комплексах Nei–ДНК. Для анализа ДНК-белковых взаимодействий в структуре Nei-X:A использовалась структура 1K3X [60], поскольку она содержала больше разрешенных нуклеотидов в сравнении с 1K3W.

Практически все ДНК-гликозилазы, включая EcoNei, изгибают ДНК в месте, где находится повреждённое основание для облегчения выворачивания этого основания из спирали ДНК в активный сайт фермента. В структуре Nei-X:A угол изгиба между основаниями по краям повреждения примерно 45° [60]. Интересно, что в структурах Nei-X:C и Nei-X:T этот угол немного меньше — около 39° , тогда как в структуре Nei-X:G он наоборот больше — около 52° .

Взаимодействия белка и ДНК в основном остаются стабильными, несмотря на природу неспаренного основания напротив сшивки. Во взаимодействиях с межнуклеозидными фосфатами $G^{+2}A^{+1}/T^{(-1)}C^{(-2)}$ с 5'-стороны от повреждения наблюдалась некоторая нерегулярность: $N\zeta(\text{Lys}246)$ мотива цинкового пальца образовывал слабую водородную связь с p^{+1} в поврежденной цепи в структурах Nei-X:A (только в 1K3W), Nei-X:C и Nei-X:G, но не в остальных структурах, хотя оставался достаточно близко к этому фосфату во всех случаях, сохраняя возможность электростатических взаимодействий. Боковой радикал Val188 «прижимался» фосфату $p^{(-2)}$ в комплементарной цепи, принимая различные конформации, в то время как водородная связь $N(\text{V188})-\text{O1P}(C^{(-2)})$ сохранялась. Наиболее гибкая часть во взаимодействиях белка и ДНК была сформирована Arg124 междоменного линкера, которая взаимодействовала с фосфатной группой p^{-3} цепи с повреждением. Боковой радикал Arg124 принимал различные конформации в структурах Nei-X:A и Nei-X:G, образуя водородные связи с фосфатной группой p^{-3} , которые

присутствуют во всех структурах, хотя и сформированы через различные атомы гуанидиновой группы.

Используя модуль построения водородных связей (Hydrogen Bond Networks module) сервиса «ProteinTools server» [65], были определены несколько сетей водородных связей, формирующих взаимодействия между боковыми радикалами, по всей видимости необходимых для функционирования белка. Наиболее значимые сети водородных связей сформированы а. к. о. Arg7, Asp11, Thr49, Tyr209 и Glu5, Tyr169, Ser208, Arg212. Эти взаимодействия связывают N-концевую каталитическую α -спираль и β -сэндвич кора фермента или N-концевой домен, ДНК-связывающий мотив «спираль–2 поворота–спираль» и «отсутствующую петлю», формирующую карман для связывания повреждения (Рисунок 25А). Более того, другая сеть, состоящая из Asn168, Arg171 и Ser250, возникает сразу за Tyr168 и связывающая ДНК, мотив «спираль–2 поворота–спираль» и цинковый палец (Рисунок 25А). По итогу, эти 3 сети формируют протяжённую сеть, состоящую из всех функционально значимых элементов Nei за исключением интеркалирующей в полость ДНК петли (⁶⁹QLY⁷¹). Еще одна интересная сеть включает а. к. о. Arg124, Arg151 и Asp159. Так, Asp159 входит в состав шпильки мотива «спираль–2 поворота–спираль», в то время как Arg124 находится в междоменном линкере. Их прямой контакт формирует подобие замка, который удерживает закрытую конформацию белка при связывании с ДНК, при этом домены белка поворачиваются друг относительно друга, сгибаясь в паре Gln123–Arg124 [61]. Однако, замок кажется недостаточно крепким: в структурах Nei-X:C и Nei-X:T а. к. о. Arg124 обнаружен лишь в одной конформации («in» конформация), сближенной с фосфатной группой p^{-3} (Рисунок 25Б), и не взаимодействуя с Asp159. В структурах Nei-X:A и Nei-X:G а. к. о. Arg124 имеет несколько конформаций, одна из которых имеет 1 или 2 сильные водородные связи с фосфатной группой p^{-3} , притом либо образуя, либо не образуя контакты с Asp159 («out» конформация), в то время как остальные конформации взаимодействуют с ДНК менее сильно, но все же образуя контакты с Asp159.

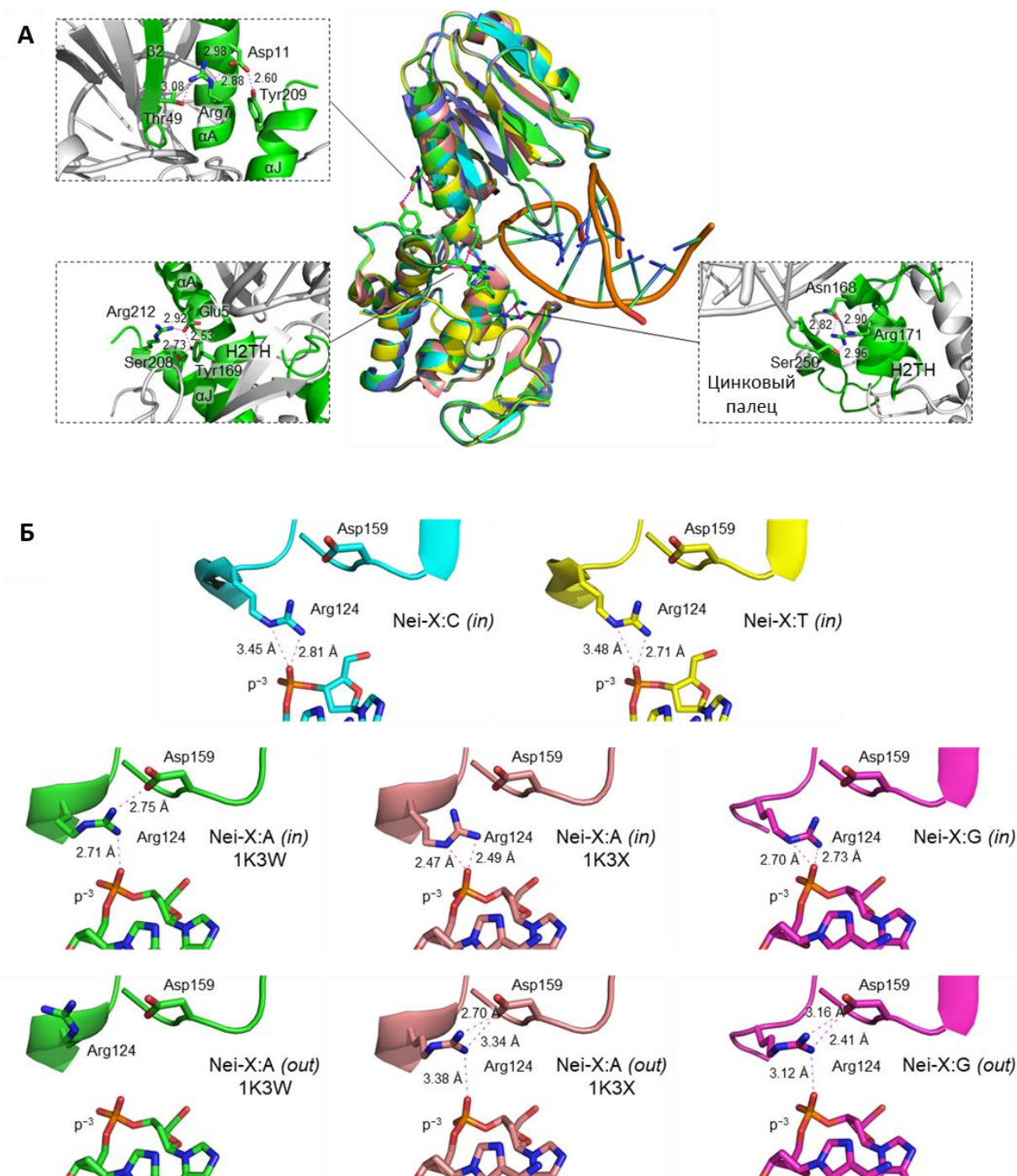


Рисунок 25. Сети водородных связей, идентифицированные в структурах Nei-X:N. А — Сети, охватывающие каталитическую спираль, β -сэндвич-ядро N-концевого домена, мотив «спираль–2 поворота–спираль» (H2TH), «пропавшую петлю» и цинковый палец. На центральном структурном наложении цветовая схема та же, что и на рисунке 22А. Для ясности боковые цепи ДНК и аминокислот показаны только для структуры Nei-X:A. На вставках показаны увеличенные изображения локальных сетей водородных связей, отображенных на структуре Nei-X:A и переориентированных для лучшей видимости. Цифры указывают межатомные расстояния между донорами и акцепторами водородных связей в Å. Б — Различные взаимодействия Arg124 междоменного линкера с ДНК и Asp159 мотива H2TH.

Что интересно и атипично для важнейших каталитических а. к. о., остаток Pro1 имеет 2 альтернативные конформации: в Nei-X:A (только в структуре 1K3W) кольцо Pro1 расположено под углом в 53° – 58° к кольцу Pro1 всех остальных структур, наибольшие изменения в торсионных углах χ_1 (N–C α –C β –C γ) и χ_2 (C α –C β –C γ –C δ) (Рисунок 22Д).

Несмотря на это, конформации dRbl и остальных каталитических остатков (Glu2, Glu5) идентичны во всех структурах.

4.3. Уотсон-Криковская грань пиримидиновых нуклеотидов

Возможно одна из наиболее необычных особенностей комплексов ковалентных конъюгатов Nei-X:N была обнаружена при более детальном анализе взаимодействий фермента с основанием напротив повреждения/ковалентной сшивки белок-ДНК. В комплексе Nei-X:A, Nε2 остатка Gln69 образовывал одну водородную связь с N3 аденина напротив повреждения. N3 аденина в качестве акцептора нетипично (из-за наличия неподеленной пары электронов на этом атоме азота), как и для N3 гуанина, а также O² пиримидинов, который занимает изостерическое положение. Таким образом можно предположить, что должны возникать водородные связи между этими атомами в новых комплексах: Nε2[Gln69]–N3[G⁽⁰⁾], Nε2[Gln69]–O²[C⁽⁰⁾], и Nε2[Gln69]–O²[T⁽⁰⁾], которые стабилизировали бы различные основания напротив повреждения вне зависимости от их природы. Но в полученных структурах лишь в комплексе Nei-X:G возникали предполагаемые взаимодействия. В этом комплексе Nei-X:G Gln69 образовывал две водородные связи с основанием напротив повреждения, Oε1[Gln69]–N²[G⁽⁰⁾] и Nε2[Gln69]–N3[G⁽⁰⁾], при этом петля и основание напротив повреждения практически не изменяли свое положение при сравнении со структурой Nei-X:A. Однако, когда пиримидиновое основание было расположено напротив повреждения, то оно было повернуто на 180° вокруг N-гликозидной связи, находясь в *син*-конформации, в результате чего O² находился со стороны большой бороздки ДНК, не взаимодействуя с ферментом. Основание Т было более наклонено к экваториальной плоскости дезоксирибозного кольца, с сопутствующим изменением структуры кольца сахара на O4'-эндо (Рисунок 26). Тогда как конформация dC, dG и dA оставалась O4'-экзо. В обеих структурах Nei-X:С и Nei-X:Т боковой радикал а. к. о. Gln69 из-за того, что не образовывал водородные связи, был смещен из полости и образовывал водородные связи с помощью Oε1 с экзоциклической аминогруппой G⁻¹. Такое взаимодействие стало причиной небольшого разворота (~15°) G⁻¹ вокруг N-гликозидной связи в освободившееся пространство от остатка Gln69. Nε2 остатка Gln69 вместо взаимодействий с ДНК (что наблюдается в структурах Nei-X:A и Nei-X:G) теперь образовывал водородные связи с Oη1 Tyr71 или Oγ1 Ser104, находясь на расстоянии около 3,5 Å от молекул воды. Объемные боковые радикалы Leu70 и Tyr71 так же оставались в брешу между A⁺¹ и G⁻¹, образуемой при изломе ДНК и выворачивании остатка сахара. Никаких взаимодействий между ферментом и потенциальными донорами или акцепторами водородных связей в С или Т в полученных структурах не было обнаружено.

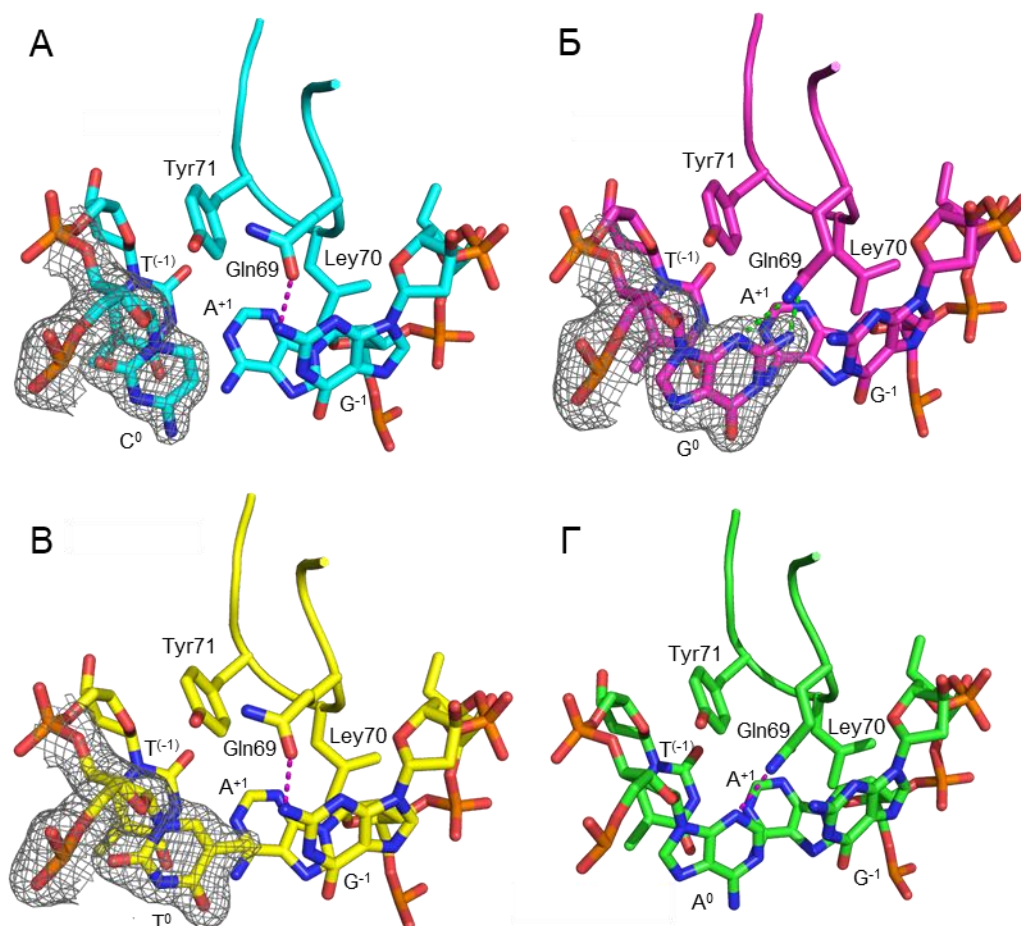


Рисунок 26. Взаимодействие EcoNei с удаленным нуклеотидом. А–Г — крупный план брешы, возникающей после удаления поврежденного нуклеотида и интеркалирующей в эту брешь петли ⁶⁹QLY⁷¹ в комплексах: А — Nei-X:C, голубым, Б — Nei-X:G, пурпурным, В — Nei-X:T, желтым и Г — Nei-X:A, зеленым[60]. Для А – В показана электронная плотность на уровне 1σ.

4.4. Влияние объемных заместителей С5 атома пиримидинов напротив повреждения на расщепление поврежденной ДНК

На основании того, что у пиримидинов напротив повреждения грань С5=С6 ориентирована внутрь спирали, было выдвинуто предположение о снижении активности Nei при наличии более объемного заместителя, чем метильная группа Т. Для проверки этой гипотезы, была измерена активность Nei на субстратах, содержащих напротив повреждения Т или 2 аналога урацила с объемными заместителями у С5 атома: 5-этилиуроацил (EtU) и 5-(окта-1,7-диин-1-ил)-урацил (C8-AlkU) (Таблица 13) [66, 67]. 5-гидроксиурацил был выбран для ферментативных кинетик, поскольку тимингликоль имеет стереоизомеры, которые EcoNei расщепляет с различной эффективностью [41], а также, для 5-гидроксиурацила представлены кинетические уже представлены данные для 23-звенных дцДНК [61, 68]. Ранее было показано, что ни EcoNei, ни его человеческие гомологи NEIL1

и NEIL2 не расщепляют дцДНК, содержащую EtU или C8-AlkU [69]. Когда EtU или C8-AlkU располагались напротив повреждения, то количество продукта после 5 мин инкубации было примерно в 3 раза ниже относительно T напротив повреждения. В условиях стационарной кинетики для EtU или C8-AlkU напротив повреждения k_{cat} была меньше в 1,7–2,1 раз при сравнении с T, тогда как значение K_M для EtU была больше в 2 раза, а для C8-AlkU больше в 4 раза. При сравнении значений константы специфичности (k_{cat}/K_M), для EtU значение оказалось меньше в 4,1 раз и для C8-AlkU меньше в 7,2 раз относительно значения константы специфичности для T (Рисунок 27, Таблица 14).

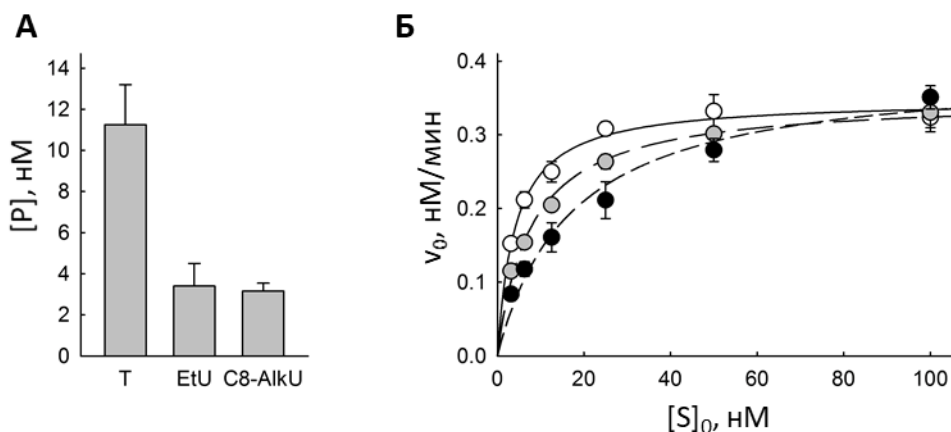


Рисунок 27. Расщепление субстратов с 5-замещенными пиримидиновыми основаниями напротив повреждения (ohU) EcoNei. А — эксперимент по оценке накопления продукта реакции расщепления с одной временной точкой (Инкубация 5 мин, концентрация субстрата 50 нМ, концентрация фермента 5 нМ). Б — график зависимости скорости накопления продукта от концентрации субстрата для EcoNei (инкубация 5 мин, концентрация фермента 2 нМ для реакции с субстратом ohU:T, 4 нМ для реакции с субстратом ohU:EtU или ohU:C8-AlkU), кружками разных цветов представлены данные для разных субстратов: белые кружки — субстрат ohU:T, серые кружки — субстрат ohU:EtU, черные кружки — субстрат ohU:C8-AlkU. Данные аппроксимированы по уравнению нелинейной регрессии гиперболической функции. На графике приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего 3х независимых экспериментов.

Таблица 14. Кинетические параметры, полученные в условиях стационарной кинетики для EcoNei и субстратов, содержащих различные 5-замещенными пиримидиновые основания напротив повреждения (ohU)¹.

Субстрат	K_M , нМ	k_{cat} , мин ⁻¹	k_{cat}/K_M , нМ ⁻¹ ×мин ⁻¹
ohU:T	$4,1 \pm 0,6$	$0,17 \pm 0,01$	$(4,2 \pm 0,5) \times 10^{-2}$
ohU:EtU	$7,8 \pm 0,9$	$0,087 \pm 0,01$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-2}$
ohU:C8-AlkU	17 ± 3	$0,098 \pm 0,01$	$(5,7 \pm 1,2) \times 10^{-3}$

¹ Значение $\pm$ стандартная ошибка среднего 3 независимых экспериментов

5. Выводы

1. На базе 2-(2-((2,5-диоксопирролидиноокси)карбонил)фенил)-2,5,5-триметил-4-(пирролидино)-2,5-дигидро-1Н-имидазол-1-оксила была разработана новая методология для регистрации электростатического потенциала внутри активного центра фермента. На основании разработанной методики для формамидопиримин-ДНК-гликозилазы Fpg *E. coli* дикого типа и мутантного варианта E2Q был измерен электростатический потенциал активного центра, в результате чего была зарегистрирована буферная емкость инаktivированного варианта E2Q в пределах pH 7,00–7,37, а также показано смещение значения pK_a спин-метки в основную сторону примерно на $0,5 \pm 0,1$ по шкале pH для каталитически некомпетентного мутантного варианта E2Q в комплексе с ДНК, что отражает изменение электростатического потенциала активного центра мутантного варианта относительно дикого типа фермента, а также принципиальную важность переноса протона именно с Glu2 для эффективного удаления как окисленного пурина, так и образуемого АП-сайта впоследствии из ДНК.

2. Рандомизация тетрапептидной петли 219–222 Fpg *L. lactis* не влияет на общий скаффолд белка и общий механизм катализа удаления поврежденного основания, а также на сродство к ДНК без основания (ДНК-содержащая нерасщепляемый аналог АП-сайта). Замены в этой петле практически не влияют на эффективность расщепления нецелевых субстратов (ДНК, содержащая АП-сайт или гидроксиурацил), в то время как эффективность катализа удаления 8-оксогуанина из ДНК мутантными вариантами LlaFpg падает драматически, что указывает на ключевой вклад петли в узнавание окисленных пуринов в ДНК.

3. На основании впервые полученных кристаллических структур ковалентного конъюгата эндонуклеазы VIII *E. coli* с ДНК, содержащей С, G или Т напротив повреждения были показаны различия в механизмах катализа в случае пуриновых и пиримидиновых оснований напротив повреждения. Было показано, что с азотистыми основаниями пуринового ряда образуются водородные связи с Gln69 интеркалирующей в ДНК петли, в то время как азотистые основания пиримидинового ряда не образовывали подобных взаимодействий, из-за поворота вокруг N-гликозидной связи, меняя свою конформацию с нативной *анти*- на *син*-конформацию. Кинетические данные, полученные на субстратах с модифицированными пиримидинами по С5'-положению напротив повреждения, свидетельствовали об ухудшении катализа удаления поврежденного основания прямо пропорционально увеличению алифатического радикала со стороны С5=С6 связи такого пиримидина.

Список литературы:

1. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature*. – 1993. – V. 362. – № 6422. – P. 709-715.
2. Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W., Wood R.D., Schultz R.A., Ellenberger T. *DNA Repair and Mutagenesis*. – Washington, D.C.: ASM Press, 2006. – 1118 pp.
3. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th ed. – Oxford: Oxford University Press, 2015. – 905 pp.
4. ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage), Gedik C.M., Collins A. Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: Results of an interlaboratory validation study // *The FASEB Journal*. – 2005. – V. 19. – № 1. – P. 82-84.
5. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer // *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. – 2015. – V. 763. – P. 212-245.
6. Cadet J., Davies K.J.A., Medeiros M.H.G., Di Mascio P., Wagner J.R. Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2017. – V. 107. – P. 13-34.
7. Grollman A.P., Moriya M. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within // *Trends in genetics*. – 1993. – V. 9. – № 7. – P. 246-249.
8. Yudkina A.V., Shilkin E.S., Endutkin A.V., Makarova A.V., Zharkov D.O. Reading and misreading 8-oxoguanine, a paradigmatic ambiguous nucleobase // *Crystals*. – 2019. – V. 9. – № 5. – P. 269.
9. Moriya M., Ou C., Bodepudi V., Johnson F., Takeshita M., Grollman A.P. Site-specific mutagenesis using a gapped duplex vector: a study of translesion synthesis past 8-oxodeoxyguanosine in *E. coli* // *Mutation Research, DNA Repair*. – 1991. – V. 254. – № 3. – P. 281-288.
10. Moriya M. Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted GC → TA transversions in simian kidney cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1993. – V. 90. – № 3. – P. 1122-1126.
11. Alexandrov L.B., Nik-Zainal S., Wedge D.C., Aparicio S.A.J.R., Behjati S., Biankin A.V., Bignell G.R., Bolli N., Borg A., Børresen-Dale A.-L., Boyault S., Burkhardt B., Butler A.P., Caldas C., Davies H.R., Desmedt C., Eils R., Eyfjörd J.E., Foekens J.A., Greaves M., Hosoda F., Hutter B., Ilcic T., Imbeaud S., Imielinski M., Jäger N., Jones D.T.W., Jones D., Knappskog S., Kool M., Lakhani S.R., López-Otín C., Martin S., Munshi N.C., Nakamura H., Northcott P.A., Pajic M., Papaemmanuil E., Paradiso A.,

- Pearson J.V., Puente X.S., Raine K., Ramakrishna M., Richardson A.L., Richter J., Rosenstiel P., Schlesner M., Schumacher T.N., Span P.N., Teague J.W., Totoki Y., Tutt A.N.J., Valdés-Mas R., van Buuren M.M., van 't Veer L., Vincent-Salomon A., Waddell N., Yates L.R., Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, ICGC Breast Cancer Consortium, ICGC MMML-Seq Consortium, ICGC PedBrain, Zucman-Rossi J., Futreal P.A., McDermott U., Lichter P., Meyerson M., Grimmond S.M., Siebert R., Campo E., Shibata T., Pfister S.M., Campbell P.J., Stratton M.R. Signatures of mutational processes in human cancer // *Nature*. – 2013. – V. 500. – № 7463. – P. 415-421.
12. Viel A., Bruselles A., Meccia E., Fornasarig M., Quaia M., Canzonieri V., Policicchio E., Urso E.D., Agostini M., Genuardi M., Lucci-Cordisco E., Venesio T., Martayan A., Diodoro M.G., Sanchez-Mete L., Stigliano V., Mazzei F., Grasso F., Giuliani A., Baiocchi M., Maestro R., Giannini G., Tartaglia M., Alexandrov L.B., Bignami M. A specific mutational signature associated with DNA 8-oxoguanine persistence in MUTYH-defective colorectal cancer // *EBioMedicine*. – 2017. – V. 20. – P. 39-49.
 13. Pilati C., Shinde J., Alexandrov L.B., Assié G., André T., Hélias-Rodzewicz Z., Ducoudray R., Le Corre D., Zucman-Rossi J., Emile J.-F., Bertherat J., Letouzé E., Laurent-Puig P. Mutational signature analysis identifies MUTYH deficiency in colorectal cancers and adrenocortical carcinomas // *The Journal of pathology*. – 2017. – V. 242. – №. 1. – P. 10-15.
 14. Kucab J.E., Zou X., Morganella S., Joel M., Nanda A.S., Nagy E., Gomez C., Degasperi A., Harris R., Jackson S.P., Arlt V.M., Phillips D.H., Nik-Zainal S. A compendium of mutational signatures of environmental agents // *Cell*. – 2019. – V. 177. – № 4. – P. 821-836. e16.
 15. Melamede, R. J., Hatahet, Z., Kow, Y. W., Ide, H., Wallace, S. S. Isolation and characterization of endonuclease VIII from *Escherichia coli* // *Biochemistry*. – 1994. – V. 33. – № 5. – P. 1255-1264.
 16. Jiang, D., Hatahet, Z., Melamede, R. J., Kow, Y. W., Wallace, S. S. Characterization of *Escherichia coli* endonuclease VIII // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – № 51. – P. 32230-32239.
 17. Zharkov D.O. Base excision DNA repair // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2008. – V. 65. – № 10. – P. 1544-1565.
 18. Zharkov D.O., Shoham G., Grollman A.P. Structural characterization of the Fpg family of DNA glycosylases // *DNA repair*. – 2003. – V. 2. – № 8. – P. 839-862.
 19. Butland G. et al. eSGA: *E. coli* synthetic genetic array analysis // *Nature Methods*. – 2008. – V. 5. – № 9. – P. 789-795.

20. Fromme J.C., Verdine G.L. Structural insights into lesion recognition and repair by the bacterial 8-oxoguanine DNA glycosylase MutM // *Nature structural biology*. – 2002. – V. 9. – № 7. – P. 544-552.
21. Bailly V, Verly W.G, O'Connor T, Laval J. Mechanism of DNA strand nicking at apurinic/apyrimidinic sites by Escherichia coli [formamidopyrimidine] DNA glycosylase // *Biochem. J.* – 1989. – V. 262. – № 2. – P. 581-589.
22. Bhagwat M., Gerlt J.A. 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. – V. 35. – № 2. – P. 659-665.
23. Tchou J., Bodepudi V., Shibutani S., Antoshechkin I., Miller J., Grollman, A.P., Johnson F. Substrate specificity of Fpg protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – № 21. – P. 15318-15324.
24. Zaika E. I., Perlow R.A., Matz E., Broyde S., Gilboa R., Grollman A.P., Zharkov D.O. Substrate discrimination by formamidopyrimidine-DNA glycosylase: a mutational analysis // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – № 6. – P. 4849-4861.
25. Gilboa R, Zharkov D.O, Golan G., Fenandes A.S., Gerchman S.E., Matz E., Kycia J.H., Grollman A.P., Sholman G. Structure of formamidopyrimidine-DNA glycosylase covalently complexed to DNA // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – № 22. – P. 19811-19816.
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. – № 5. – P. 1520-1528.
27. 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 Research*. – 2004. – V. 32. – № 3. – P. 926-935.
28. Milov, A.D., Samoilova R.I., Shubin A.A., Grishin Y.A., Dzuba S.A. ESEEM measurements of local water concentration in D₂O-containing spin-labeled systems // *Appl. Magn. Reson.* – 2008. – V. 35. – № 1. – P. 73-94.
29. Molochnikov L.S., Kovalyova E.G., Grigor'ev I.A., Zagorodni A.A. Direct measurement of H⁺ activity inside cross-linked functional polymers using nitroxide spin probes // *J. Phys. Chem.* – 2004. – V. 108. – № 4. – P. 1302-1313.
30. Kovaleva E.G., Molochnikov L.S., Golovkina E.L., Hartmann M., Kirilyuk I.A., Grigoriev I.A. Electrical potential near hydrated surface of ordered mesoporous molecular

- sieves assessed by EPR of molecular pH-probes // *Microporous and Mesoporous Materials*. – 2015. – V. 203. – P. 1-7.
31. Voinov M.A., Smirnov A.I. Spin labels and spin probes for measurements of local pH and electrostatics by EPR // *Electron. Paramag. Reson.* – 2011. – V. 22: – P. 71-106.
 32. Fernández M.S., Fromherz P. Lipoid pH indicators as probes of electrical potential and polarity in micelles // *J. Phys. Chem.* – 1977. – V. 81. – № 18. – P. 1755-1761.
 33. Coste F., Ober M., Carell T., Boiteux S., Zelwer C., Castaing B. Structural basis for the recognition of the FapydG lesion (2, 6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) by formamidopyrimidine-DNA glycosylase // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – № 42. – P. 44074-44083.
 34. Fromme J.C., Verdine G.L. DNA lesion recognition by the bacterial repair enzyme MutM // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – № 51. – P. 51543-51548.
 35. Crooks G.E., Hon G., Chandonia J.-M., Brenner S.E. WebLogo: a sequence logo generator // *Genome Research*. – 2004. – V. 14. – № 6. – P. 1188-1190.
 36. Livingstone C.D., Barton G.J. Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation // *Bioinformatics*. – 1993. – V. 9. – № 6. – P. 745-756.
 37. O'Connor T.R., Laval J. Physical association of the 2, 6-diamino-4-hydroxy-5N-formamidopyrimidine-DNA glycosylase of Escherichia coli and an activity nicking DNA at apurinic/apyrimidinic sites // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1989. – V. 86. – № 14. – P. 5222-5226.
 38. Duwat P., de Oliveira R., Ehrlich S.D., Boiteux S. Repair of oxidative DNA damage in grampositive bacteria: the Lactococcus lactis Fpg protein // *Microbiology*. – 1995. – V. 141. – № 2. – P. 411-417.
 39. Castaing B., Fourrey J.-L., Hervouet N., Thomas M., Boiteux S., Zelwer C. AP site structural determinants for Fpg specific recognition // *Nucleic Acids Research*. – 1999. – V. 27. – № 2. – P. 608-615.
 40. Serre L., Pereira de Jésus K., Boiteux S., Zelwer C., Castaing B. Crystal structure of the Lactococcus lactis formamidopyrimidine-DNA glycosylase bound to an abasic site analogue-containing DNA. – *EMBO Journal*. – 2002 – V. 21. – № 12 – P. 2854-2865.
 41. Landová B., Šilhán J. Conformational changes of DNA repair glycosylase MutM triggered by DNA binding // *FEBS Letters*. – 2020. – V. 594. – № 18. – P. 3032-3044.
 42. Pereira de Jésus K., Serre L., Zelwer C., Castaing B. Structural insights into abasic site for Fpg specific binding and catalysis: comparative high-resolution crystallographic studies of Fpg bound to various models of abasic site analogues-containing DNA // *Nucleic Acids Research*. – 2005. – V. 33. – № 18. – P. 5936-5944.

43. Biela A., Coste F., Culard F., Guerin M., Goffinont S., Gasteiger K., Cieřła J., Winczura A., Kazimierczuk Z., Gasparutto D., Carell T., Tudek B., Castaing B. Zinc finger oxidation of Fpg/Nei DNA glycosylases by 2-thioxanthine: biochemical and X-ray structural characterization // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – V. 42. – № 16. – P. 10748-10761.
44. Rieux C., Goffinont S., Coste F., Tber Z., Cros J., Roy V., Guérin M., Gaudon V., Bourg S., Biela A., Aucagne V., Agrofoglio L., Garnier N., Castaing B. Thiopurine Derivative-Induced Fpg/Nei DNA Glycosylase Inhibition: Structural, Dynamic and Functional Insights // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – № 6. – P. 2058.
45. Ishchenko A.A., Vasilenko N.L., Sinitsina O.I., Yamkovoy V.I., Fedorova O.S., Douglas K.T., Nevinsky G.A. Thermodynamic, kinetic, and structural basis for recognition and repair of 8-oxoguanine in DNA by Fpg protein from Escherichia coli // *Biochemistry*. – 2002. – V. 41. – № 24. – P. 7540-7548.
46. Popov A.V., Endutkin A.V., Vorobjev Y.N., Zharkov D.O. Molecular dynamics simulation of the opposite-base preference and interactions in the active site of formamidopyrimidine-DNA glycosylase // *BMC Structural Biology*. – 2017. – V. 17. – № 1. – P. 5.
47. Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., Vorobjev Y.N., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Fedorova O.S. Pre-steady-state kinetic study of substrate specificity of Escherichia coli formamidopyrimidine– DNA glycosylase // *Biochemistry*. – 2007. – V. 46. – № 2. – P. 424-435.
48. Boiteux S., Coste F., Castaing B. 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 and Medicine*. – 2017. – V. 107. – P. 179-201.
49. TcohU J., Kasai H., Shibutani S., Chung M.-H., Laval J., Grollman A.P., Nishimura S. 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 1991. – V. 88. – № 11. – P. 4690-4694.
50. Boiteux S., Gajewski E., Laval J., Dizdaroglu M. 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. – V. 31. – № 1. – P. 106-110.
51. Michaels M.L., Cruz C., Grollman A.P., Miller J.H. Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 1992. – V. 89. – № 15. – P. 7022-7025.
52. Michaels M.L., TcohU J., Grollman A.P., Miller J.H. A repair system for 8-oxo-7, 8-dihydrodeoxyguanine // *Biochemistry*. – 1992. – V. 31. – № 45. – P. 10964-10968.

53. Karakaya A., Jaruga P., Bohr V.A., Grollman A.P., Dizdaroglu M. Kinetics of excision of purine lesions from DNA by Escherichia coli Fpg protein // *Nucleic Acids Research*. – 1997. – V. 25. – № 3. – P. 474-479.
54. Asagoshi K., Yamada T., Terato H., Ohyama Y., Monden Y., Arai T., Nishimura S., Aburatani H., Lindahl T., Ide H. Distinct repair activities of human 7, 8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase and formamidopyrimidine DNA glycosylase for formamidopyrimidine and 7, 8-dihydro-8-oxoguanine // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – № 7. – P. 4956-4964.
55. Krishnamurthy N., Haraguchi K., Greenberg M.M., David S.S. Efficient removal of formamidopyrimidines by 8-oxoguanine glycosylases // *Biochemistry*. – 2008. – V. 47. – № 3. – P. 1043-1050.
56. Endutkin A.V., Zharkov D.O. Substrate specificities of DNA glycosylases in vitro and in vivo. – *DNA Damage, DNA Repair*. – 2021. – V. 1. – P. 175-203.
57. Dizdaroglu M., Coskun E., Jaruga P. Repair of oxidatively induced DNA damage by DNA glycosylases: Mechanisms of action, substrate specificities and excision kinetics // *Mutation Research*. – 2017. – V. 771. – P. 99-127.
58. Hatahet Z., Kow Y.W., Purmal A.A., Cunningham R.P., Wallace S.S. New substrates for old enzymes. 5-Hydroxy-2'-deoxycytidine and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine are substrates for Escherichia coli endonuclease III and formamidopyrimidine DNA N-glycosylase, while 5-hydroxy-2'-deoxyuridine is a substrate for uracil DNA N-glycosylase // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – № 29. – P. 18814-18820.
59. Thivyanathan V., Somasunderam A., Volk D.E., Hazra T.K., Mitra S., Gorenstein D.G. Base-pairing properties of the oxidized cytosine derivative, 5-hydroxy uracil // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2008. – V. 366. – № 3. – P. 752-757.
60. Zharkov D.O., Golan G., Gilboa R., Fernandes A.S., Gerchman S.E., Kycia J.H., Rieger R.A., Grollman A.P., Shoham G. Structural analysis of an Escherichia coli endonuclease VIII covalent reaction intermediate // *EMBO Journal*. – 2002. – V. 21. – № 4. – P. 789-800.
61. Gali Golan, Dmitry O. Zharkov, Hadar Feinberg, Andrea S. Fernandes, Elena I. Zaika, Jadwiga H. Kycia, Arthur P. Grollman and Gil Shoham, Structure of the uncomplexed DNA repair enzyme endonuclease VIII indicates significant interdomain flexibility // *Nucleic Acids Research* – 2005. – V. 33. – № 15. – P. 5006–5016.

62. Zhu C., Lu L., Zhang J., Yue Z., Song J., Zong S., Liu M., Stovicek O., Gao Y.Q., Yi C. Tautomerization-dependent recognition and excision of oxidation damage in base-excision DNA repair // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2016. – V. 113. – № 28. – P. 7792-7797.
63. Eckenroth B.E., Bumgarner J.D., Matsumoto-Elliott O., David S.S., Doublié S. Structural and biochemical insights into NEIL2's preference for abasic sites // *Nucleic Acids Research.* – 2023. – V. 51. – № 22. – P. 12508-12521.
64. Huskova A., Dinesh D.C., Srb P., Boura E., Veverka V., Silhan J. Model of abasic site DNA cross-link repair; from the architecture of NEIL3 DNA binding domains to the X-structure model // *Nucleic Acids Research.* – 2022. – V. 50. – № 18. – P. 10436-10448.
65. Ferruz N., Schmidt S., Höcker B. (2021) ProteinTools: ProteinTools: a toolkit to analyze protein structures // *Nucleic Acids Research.* – 2021. – V. 49. – №. W1. – P. W559-W566.
66. Gierlich J., Burley G.A., Gramlich P.M.E., Hammond D.M., Carell T. Click chemistry as a reliable method for the high-density postsynthetic functionalization of alkyne-modified DNA // *Org. Lett.* – 2006. – V. 8. – № 17. – P. 3639-3642.
67. Zuin Fantoni N., El-Sagheer A.H., Brown T. A hitchhiker's guide to click-chemistry with nucleic acids // *Chem. Rev.* – 2021. – V. 121. – № 12. – P. 7122-7154.
68. Kropachev K.Y., Zharkov D.O., Grollman A.P. Catalytic mechanism of Escherichia coli endonuclease VIII: roles of the intercalation loop and the zinc finger // *Biochemistry.* – 2006. – V. 45. – № 39. – P. 12039-12049.
69. Endutkin A.V., Yudkina A.V., Zharkov T.D., Barmatov A.E., Petrova D.V., Kim D.V., Zharkov D.O. Repair and DNA Polymerase Bypass of Clickable Pyrimidine Nucleotides // *Biomolecules.* – 2024. – V. 14. – № 6. – P. 681.



Отчет о проверке

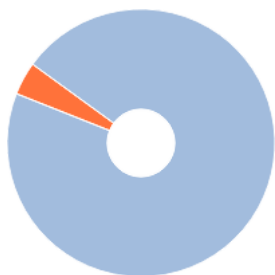
Автор: Булгаков Никита Алексеевич

Проверяющий: Мирошниченко Светлана Константиновна

Название документа: Bulgakov_VKR_aspa_wr

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ

Тариф: FULL



Совпадения:
3,6%



Оригинальность:
96,4%



ИИ-контент:
0%



Цитирования:
0%



Самоцитирования:
0%



i «Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует проверенному тексту документа.

i Проверено: 93,58% текста документа, исключено из проверки: 6,42% текста документа. Разделы, отключенные пользователем: Методы, Библиография

- **Совпадения** — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.
- **Самоцитирования** — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.
- **Цитирования** — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.
- **Текстовое пересечение** — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
- **Источник** — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
- **Оригинальный текст** — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

Номер документа: 28

Тип документа: Не указано

Дата проверки: 09.09.2025 08:48:56

Дата корректировки: 09.09.2025 08:53:03

Количество страниц: 43

Символов в тексте: 73746

Слов в тексте: 9806

Число предложений: 555

Комментарий: не указано

ПАРАМЕТРЫ ПРОВЕРКИ

Выполнена проверка с учетом редактирования: Да

Исключение элементов документа из проверки: Да

Выполнено распознавание текста (OCR): Нет

Выполнена проверка с учетом структуры: Да

Модули поиска: Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика, СПС ГАРАНТ: аналитика, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Цитирование, Коллекция НБУ, ИПС Адилет, Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Переводные заимствования IEEE, Интернет Плюс, IEEE, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Шаблонные фразы, Диссертации НББ, Патенты СССР, РФ, СНГ, Публикации РГБ, Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования), Перефразирования по коллекции IEEE, СМИ России и СНГ, Медицина, Кольцо вузов, Рувики, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика, Публикации eLIBRARY, Публикации РГБ (переводы и перефразирования), Сводная коллекция ЭБС, Кольцо вузов (переводы и перефразирования), Переводные заимствования

❗ Модули, недоступные в рамках тарифа: Интернет Free

ИСТОЧНИКИ

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарий
[01]	6,81%	0%	Булгаков_Н_А диплом 2021_финал	21 Мая 2021	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[02]	4,06%	0%	Булгаков_Н_А диплом 2021_финал	21 Мая 2021	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Техническое совпадение.
[03]	1,91%	1,91%	СТРУКТУРА И КОНФОРМАЦИОНН... http://elibrary.ru	29 Авг 2007	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[04]	0,97%	0%	Кинетические особенности взаи...	14 Дек 2024	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[05]	0,86%	0,6%	Каххарова диплом маг	06 Июн 2021	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[06]	0,84%	0%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[07]	0,81%	0%	%D0%BD%D0%B0%D1%83%D1%8... http://niboch.nsc.ru	17 Июн 2025	Интернет Плюс	
[08]	0,51%	0%	Применение мезенхимальных п... https://rusneb.ru	31 Дек 2021	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[09]	0,4%	0%	rs101010363390.txt http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2020	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[10]	0,4%	0,4%	Репарация 8-оксогуанина в ДНК. ...	20 Мар 2025	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[11]	0,4%	0%	ermakov_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	23 Окт 2024	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[12]	0,4%	0%	Ермаков, Евгений Александрови... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2020	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[13]	0,4%	0%	https://congress.surgeons.ru/tezis/... https://congress.surgeons.ru	03 Сен 2025	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[14]	0,4%	0%	Вариабельность эпигенетическо... https://rusneb.ru	13 Ноя 2020	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[15]	0,4%	0%	Создание модельной системы дл... https://rusneb.ru	13 Ноя 2020	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[16]	0,4%	0%	Подтуркина, Александра Владим... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2025	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[17]	0,4%	0%	Михайлова, Ольга Владимировн... http://dlib.rsl.ru	08 Мар 2025	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[18]	0,4%	0%	Определение Арбитражного суда... http://arbitr.garant.ru	02 Окт 2016	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[19]	0,38%	0%	Решение Советского районного с... http://arbitr.garant.ru	24 Сен 2016	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[20]	0,38%	0%	Диплом_mag_fin	03 Июн 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[21]	0,37%	0%	Способ очистки вируса осповакц... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[22]	0,37%	0%	Алкилирующие фторированные ... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[23]	0,37%	0%	Средство для нейтрализации вир... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[24]	0,37%	0%	Способ получения наноразмерн... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[25]	0,37%	0%	Синявская, Анна Максимовна Ст... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2023	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[26]	0,37%	0%	Три бердских предприятия назва... http://berdsk.bezformata.ru	07 Апр 2014	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[27]	0,37%	0%	БЭМЗ, Нотис и Продсиб из Бердс... http://berdsk.bezformata.ru	07 Апр 2014	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[28]	0,37%	0%	Учёные степени — без Высшей а... http://cheboksari.yodda.ru	21 Дек 2017	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[29]	0,37%	0%	Искитимцемент стал надежным р... http://vesiskitim.ru	05 Апр 2014	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[30]	0,37%	0%	antyuhova_e_a_evolyuciya-otechest...	20 Фев 2020	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[31]	0,37%	0%	Отчет_2024_Нуштаева_итог	31 Янв 2025	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[32]	0,37%	0%	ИХБФМ_ПушкаревскаяА.А.	30 Мая 2025	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[33]	0,37%	0%	Список кавалеров ордена Алекса... https://ru.ruwiki.ru	раньше 2011	Рувики	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[34]	0,37%	0%	Распоряжение Правительства РФ... http://ivo.garant.ru	23 Окт 2019	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[35]	0,37%	0%	Постановление Президиума Росс... http://ivo.garant.ru	18 Ноя 2021	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[36]	0,37%	0%	Патентованные инновации в мо... http://elibrary.ru	01 Янв 2025	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	0,37%	0%	Формирование подходов к оценк... https://book.ru	01 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[38]	0,36%	0,36%	Лилия_Аксенова_диплом	11 Июн 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[39]	0,33%	0,33%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	26 Янв 2021	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[40]	0,33%	0%	Тикунов с соавт текст	13 Мая 2020	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	0,33%	0%	Сведения об авторах. http://elibrary.ru	01 Янв 2024	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[42]	0,32%	0%	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДО... http://elibrary.ru	01 Янв 2012	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	0,32%	0%	endutkin_autoref.pdf http://niboch.nsc.ru	24 Фев 2025	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[44]	0,32%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	28 Апр 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[45]	0,32%	0%	Всероссийская научно-практичес... http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[46]	0,32%	0%	Артериальная гипертония у лиц ... http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[47]	0,32%	0%	СТРУКТУРА И КОНФОРМАЦИОНН... http://elibrary.ru	29 Авг 2007	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[48]	0,32%	0%	Вестник гематологии. Том IX. № 2... http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[49]	0,32%	0%	Молекулярная биология. 2017. Т. ... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[50]	0,31%	0%	%D0%BF%D0%BE%D0%BF%D0%B... http://niboch.nsc.ru	08 Мая 2021	Перефразированные заимствования по	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

					коллекции Интернет в русском сегменте	
[51]	0,31%	0%	BOUDRIES.Nadia.pdf https://repository.enp.edu.dz	01 Ноя 2024	Переводные заимствования	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	0,29%	0%	Веньямина, Алия Гусейн кызы https://ru.ruwiki.ru	раньше 2011	Рувики	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	0,27%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	16 Янв 2025	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	0,27%	0%	Юдкина, Анна Владимировна Вза... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2020	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	0,24%	0%	Кинетические особенности взаи...	14 Дек 2024	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	0,23%	0%	не указано http://ivo.garant.ru	02 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[57]	0,23%	0%	не указано http://ivo.garant.ru	03 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	0,23%	0%	не указано http://ivo.garant.ru	02 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	0,23%	0%	не указано http://ivo.garant.ru	03 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	0,23%	0%	Interpretation of radioimpedance s... https://ieeexplore.ieee.org	04 Ноя 2013	IEEE	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	0,23%	0%	Укороченная мутантная люцифе... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	0,23%	0%	Лауреаты Премии Правительств... https://ru.ruwiki.ru	раньше 2011	Рувики	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	0,23%	0%	Лауреаты Премии Правительств... https://ru.ruwiki.ru	раньше 2011	Рувики	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	0,23%	0%	Антимикробная и цитотоксическ... http://elibrary.ru	01 Янв 2024	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[65]	0,16%	0%	Т. 50, № 3, март http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	0,16%	0%	Высокопроизводительное секве... http://elibrary.ru	01 Янв 2022	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[67]	0,15%	0%	ВКР_Апрелева_Александра_Серге...	19 Июн 2020	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	0,15%	0%	ВЛИЯНИЕ СКРЫТЫХ ЧАСТОТНЫХ ... http://elibrary.ru	01 Янв 2023	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[69]	0,14%	0%	92718 http://e.lanbook.com	10 Мар 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчёт о проверке текста научно-квалификационной работы на
объём заимствования

Булгаков Никита Алексеевич

«Физико-химические основы субстратной специфичности ДНК-гликозилаз
суперсемейства «спираль-два поворота-спираль»»

Оригинальность работы составляет 96.4%, что соответствует требованиям
порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на
заседании Итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь АК – к.б.н. С.К. Мирошниченко