

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

На правах рукописи

Бакман Артемий Сергеевич

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах
выполненной научно - квалификационной работы

Кинетические особенности белок-белковых взаимодействий ферментов эксцизионной
репарации оснований ДНК

Направление подготовки 04.06.01 Химические науки

Специальность 1.4.9. Биоорганическая химия

Новосибирск 2023

1. Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Геномная ДНК в живой клетке постоянно повреждается под действием как факторов внутриклеточного происхождения, таких как реакционноспособные метаболиты, так и под действием экзогенных факторов окружающей среды, таких как ионизирующее излучение или токсичные вещества [1–3]. К числу наиболее распространённых повреждений ДНК относятся потеря оснований вследствие гидролиза N-гликозидной связи с образованием апуриновых/апиримидиновых сайтов (АР-сайтов), а также окисление, метилирование и другие химические модификации оснований ДНК. Такие повреждения ДНК являются мутагенными и цитотоксичными, вследствие чего в клетках живых организмов существуют пути их репарации. АР-сайты и модифицированные основания ДНК репарируются системой эксцизионной репарации оснований (BER). Система BER важна для поддержания стабильности генома, и нарушения в ней вызывают у человека такие болезни, как преждевременное старение [4], нейродегенеративные [5] и онкологические заболевания [6].

Эксцизионная репарация оснований – это многостадийный процесс, инициируемый спонтанным гидролизом N-гликозидной связи или ДНК-гликозилазой, которая распознаёт и удаляет из ДНК повреждённое основания, образуя АР-сайт [1]. На данный момент у человека известно 11 ДНК-гликозилаз, которые процессируют широкий спектр повреждений [9]. Образовавшийся АР-сайт распознаётся апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазой 1 (APE1), которая гидролизует фосфодиэфирную связь с 5'-стороны от АР-сайта, образуя разрыв в цепи ДНК с дезоксирибозофосфатной группой (dRP) на 5'-конце и гидроксильной группой на 3'-конце [10,11]. Далее ДНК-полимераза β (Pol β) добавляет нуклеотид к 3'-гидроксильной группе и удаляет 5'-дезоксирибозофосфат за счёт присущей ей 5'-dRP-лиазной активности [12–14]. Завершение репарации ДНК обеспечивается лигированием разрыва комплексом XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1) с ДНК-лигазой III [15–17]. Некоторые ДНК-гликозилазы обладают β -лиазной активностью и помимо удаления повреждённого основания образуют разрыв повреждённой цепи ДНК с α,β -ненасыщенным альдегидом [18,19] или с фосфатной группой [20] на 3'-конце. Одноцепочечные разрывы ДНК с неканоническими модифицированными 3'- и 5'-концами могут также возникать в результате действия окислительных агентов [21,22], а также в результате abortированной активности ДНК-лигаз и ДНК-топоизомераз [23–25]. Для репарации таких неканонических одноцепочечных разрывов требуется их предварительный процессинг, после которого они станут доступными для последующего синтеза ДНК и лигирования. Процессинг могут осуществлять Pol β , удаляющая 5'-сахарофосфатную группу за счёт 5'-dRP-лиазной активности [12], APE1, удаляющая 3'-блокирующие группы [26], полинуклеотидкиназа/фосфатаза (PNKP), которая дефосфорилирует 3'-концы и фосфорилирует 5'-гидроксильные группы [27], апатаксин, который процессирует 5'-концы, заблокированные в результате abortированной лигазной реакции [25], и тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1), которая репарирует одноцепочечные разрывы, возникшие в результате abortированной активности ДНК-топоизомераз [24,28]. Эти ферменты по отдельности или в комбинациях друг с другом могут переводить одноцепочечные разрывы ДНК с модифицированными 3'- и 5'-концами к разрыву с 3'-гидроксильной 5'-фосфатной группами, доступному для последующей репарации Pol β с лигированием комплексом XRCC1 с ДНК-лигазой III. В случаях, если заблокированные 5'-концы не будут процессированы перечисленными выше ферментами, BER может

завершаться по длиннозаплаточному пути [29–31]. В этом случае Pol β присоединяет один нуклеотид к 3'-концу, после чего репликативная полимераза δ продолжает синтез с вытеснением цепи в присутствии ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) и репликативного фактора C. В итоге образуется 2-12 нуклеотидный свисающий одноцепочечный участок («флэп»), который удаляется флэп-эндонуклеазой 1 (FEN 1), после чего разрыв лигируется ДНК-лигазой 1 [32].

Исследование механизма эксцизионной репарации оснований представляет актуальную проблему как с точки зрения понимания фундаментальных механизмов поддержания стабильности генома, так и для поиска путей лечения наследственных заболеваний, связанных с дефектами системы BER, а также онкозаболеваний [7]. Механизмы эксцизионной репарации оснований активно изучались в последние десятилетия, и был достигнут большой прогресс в установлении участников процесса репарации и характеризации отдельных стадий процесса. Однако понимание координации между отдельными этапами процесса BER на данный момент остаётся неполным. Известно, что координация BER осуществляется за счёт взаимодействий между белками – участниками процесса. Изучение таких взаимодействий необходимо для глубокого понимания этого жизненно важного процесса и на текущий момент является одной из актуальных тем в области исследований репарации ДНК [8].

Цель настоящей работы заключалась в детальном кинетическом исследовании процесса согласованного взаимодействия апуриновой/апириимидиновой эндонуклеазы человека APE1 и ДНК-полимеразы β друг с другом и с ДНК в процессе эксцизионной репарации оснований.

В ходе исследований решались следующие **задачи**:

- 1) Определение функциональной роли аминокислотных остатков His309, Tyr171, Arg177 и Arg181 APE1 в механизме AP-эндонуклеазной реакции и уточнение механизма взаимодействия APE1 с модельными ДНК-субстратами;
- 2) Создание системы на основе флуоресцентно меченной APE1 для изучения взаимодействия фермента с ДНК и другими белками BER;
- 3) Исследование взаимного влияния между APE1 и Pol β в процессе BER;
- 4) Анализ эффекта ДНК-гликозилаз на каталитическую активность Pol β .

Научная новизна и практическая значимость работы: в работе впервые с помощью метода «остановленной струи» были исследованы мутантные формы APE1 H309A, Y171F, R177A и R181A, что позволило получить новые данные, дополняющие существующие в литературе представления о функциях соответствующих аминокислотных остатков в механизме AP-эндонуклеазной реакции.

Была создана новая система на основе флуоресцентно меченной APE1, позволяющая регистрировать специфические взаимодействия фермента с ДНК и изучать ДНК-опосредованные взаимодействия APE1 с другими белками BER. С помощью данной флуоресцентной системы было изучено взаимодействие APE1 модельными ДНК-субстратами, что позволило уточнить механизм данного взаимодействия, в частности впервые установить порядок стадий в процессе диссоциации комплекса фермента с расщеплённой ДНК. Также использование флуоресцентно меченной APE1 в данной работе позволило впервые зарегистрировать в режиме реального времени кинетику вытеснения APE1 из комплекса с расщеплённой ДНК под действием Pol β .

Впервые было изучено с помощью метода «остановленной струи» прямое влияние APE1 на отдельные стадии катализируемой Pol β реакции встраивания нуклеотида в ДНК. Впервые была показана стимулирующее действие ДНК-гликозилаз NTHL1, MBD4 и SMUG на каталитическую активность Pol β .

Система BER является необходимым элементом для поддержания жизнеспособности клеток и стабильности генома, а дефекты BER ответственны за возникновение многих наследственных заболеваний. С другой стороны, система BER повышает жизнеспособность опухолевых клеток и, таким образом, рассматривается как потенциальная мишень в противоопухолевой терапии. Понимание механизмов BER, касающихся как взаимодействий ферментов BER с повреждённой ДНК, так и белок-белковых взаимодействий, координирующих процесс репарации, может помочь в поиске мишеней как для лечения наследственных заболеваний, так и для противоопухолевой терапии.

Личное участие автора: Автором проводилось получение векторов для индукции мутантных форм APE1, выделение и очистка мутантных форм APE1, эксперименты по характеристике активности мутантных форм, флуоресцентное мечение белков и все эксперименты с участием меченых ферментов. Обработка и интерпретация всех экспериментальных результатов, за исключением установления остатка C99 как сайта мечения APE1, проводилась лично автором.

Методы исследования: для внесения мутаций в ген APE1 использовался метод сайт-направленного мутагенеза, для выделения и очистки белков использовались ионообменная и аффинная хроматографии, для анализа накопления продуктов ферментативных реакций использовался метод электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле, предстационарную кинетику взаимодействия ферментов с ДНК изучали методом «остановленной струи» с регистрацией флуоресценции остатков триптофана фермента, флуоресцеина в составе ДНК, 2-аминопурина в составе ДНК или красителя Alexa Fluor 488 в составе меченого белка. Обработка кинетических данных проводилась с помощью программ Origin 8.1 и DynaFit (BioKin, Pullman, WA). Программа DynaFit использовалась для численного решения системы дифференциальных уравнений, соответствующих кинетической схеме с нахождением значений констант скорости всех происходящих в системе процессов и коэффициентов удельной флуоресценции всех входящих в схему частиц.

2. Содержание работы

2.1. Определение функциональной роли аминокислотных остатков H309, Y171, R177 и R181 APE1 в механизме AP-эндонуклеазной реакции

С целью уточнения функциональных ролей аминокислотных остатков H309, Y171, R177 и R181 в механизме взаимодействия APE1 с ДНК были получены мутантные формы фермента, содержащие замены H309A, Y171F, R177A и R181A. Активность полученных мутантных форм APE1 по отношению к 5'-FAM-меченому дуплексу ДНК, содержащему F-сайт, была охарактеризована путём разделения продукта реакции расщепления от исходной нерасщеплённой ДНК методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле. Анализ накопления продукта при выдерживании 1,0 мкМ ДНК и 0,05 мкМ фермента в течение 10 с (Рис. 1) показал, что мутантная форма R177A обладает несколько большей активностью по сравнению с APE1 дикого типа (данный факт согласуется с предыдущим исследованием этой мутантной формы [33]), в то время как замена R181A слегка снижает активность фермента. В случае мутантных форм Y171F и H309A в данных условиях продукт AP-эндонуклеазной реакции не детектировался, что свидетельствует о сильном сокращении их каталитической активности, описанном в литературе ранее [34–38].

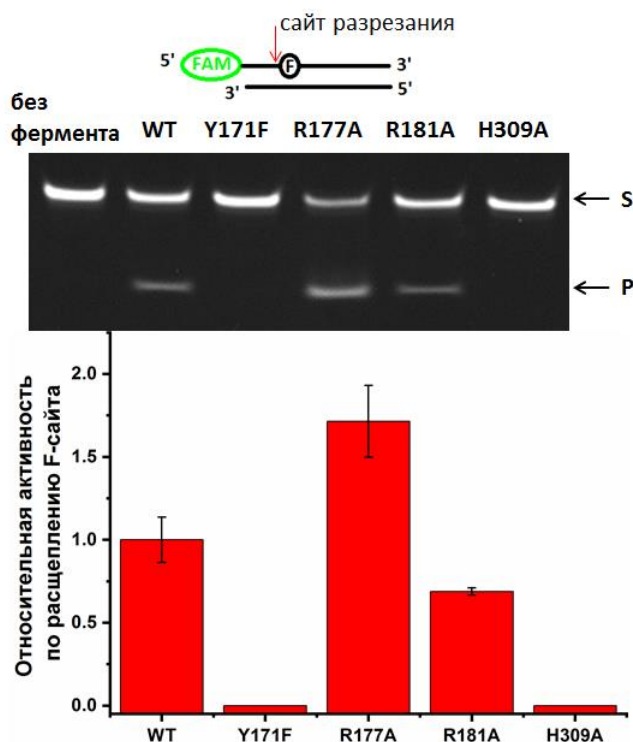


Рисунок 1. Сравнение активностей APE1 дикого типа (WT) и мутантных форм фермента по отношению к дуплексу ДНК, содержащему F-сайт методом разделения продукта и субстрата путём электрофореза в полиакриламидном геле. В реакционной смеси концентрация фермента была равна 0,05 мкМ, субстрата – 1,0 мкМ, реакция проводилась в течение 10 с.

Активность мутантных форм Y171F и H309A по отношению к дуплексу, содержащему F-сайт, была изучена в условиях кинетики одного оборота (Рис. 2). Кинетические кривые накопления продукта AP-эндонуклеазной реакции были обработаны с помощью экспоненциального уравнения:

$$[\text{продукт}] = A \times [1 - \exp(-k^{\text{ПААГ}} t)] \quad (1)$$

где A – амплитуда, k^{PAGE} – наблюдаемая константа скорости реакции и t – время реакции.

Рассчитанные наблюдаемые константы расщепления ДНК показали, что АР-эндонуклеазная активность мутантных форм Y171F и H309A в ~1000–10000 раз меньше, чем у APE1 дикого типа, при этом APE1 Y171F в ~6 раз активнее APE1 H309A. Полученные результаты хорошо согласуются с данными предшествующих исследований этих мутантных форм фермента [34,36].

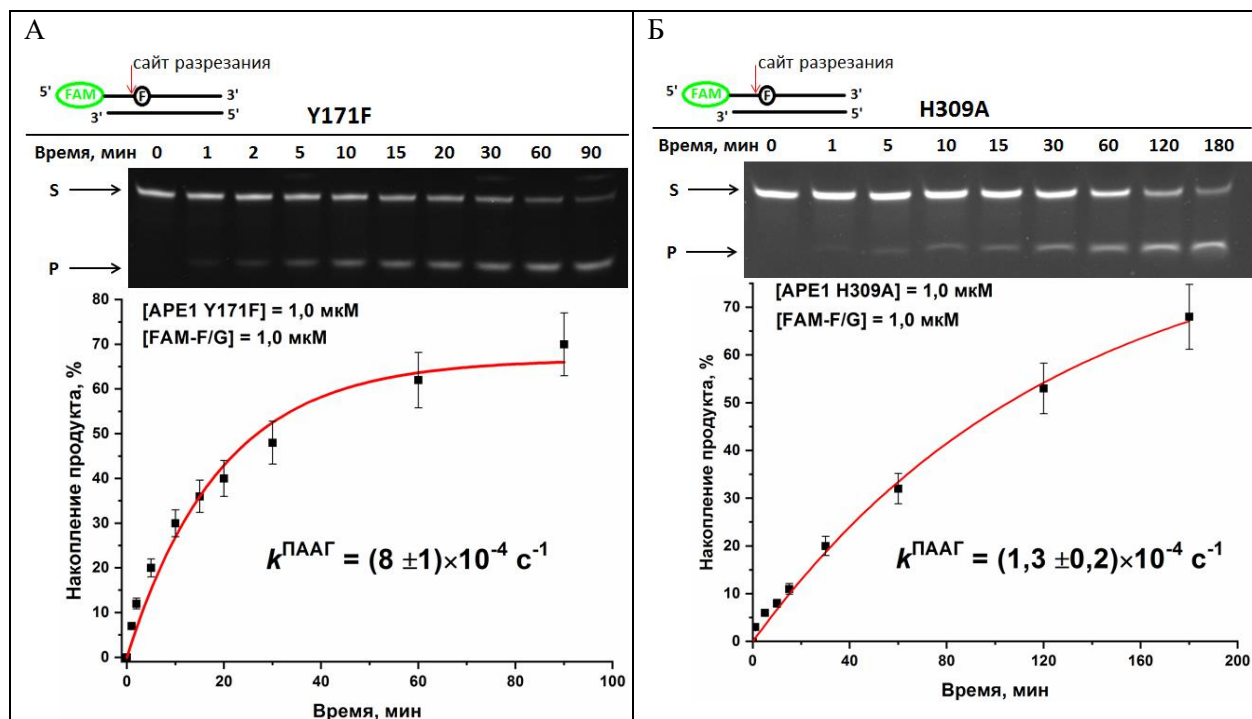


Рисунок 2. Кинетика накопления продукта АР-эндонуклеазной реакции для мутантных форм АРЕ1 Y171F (А) и H309A (Б) в условиях одного оборота. Кинетические кривые были обработаны с помощью Уравнения 1, что позволило рассчитать наблюдаемую константу $k^{ПААГ}$ для обеих мутантных форм. Начальные концентрации фермента и ДНК-субстрата в реакционной смеси были равны 1,0 мкМ.

Ранее в ряде работ [34,39–41] предполагалось, что остаток H309 или Y171 может выступать в роли основания, активирующего нуклеофильную молекулу воды в механизме гидролиза фосфоэфирной связи. В этом случае изменение степени протонирования этих аминокислотных остатков должно было бы приводить к сильному изменению скорости катализа. Чтобы проверить это предположение, было изучено влияние pH на активность мутантных форм АРЕ1 Y171F и H309A (Рис. 3).

Ранее было показано, что в диапазоне pH от 6,0 до 9,0 зависимость активности АРЕ1 от pH описывается гиперболической функцией:

$$A_{obs} = A_{EH+} + \left(\frac{A_E - A_{EH+}}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} \right) \quad (2)$$

где A_{obs} – наблюдаемая активность, A_{EH+} – активность протонированной формы фермента, A_E – активность депротонированной формы фермента, K_a – константа кислотности для равновесия протонирования фермента.

Это соответствует модели, согласно которой активность фермента при изменении pH меняется вследствие изменения степени протонирования одного или нескольких аминокислотных остатков белка с определённым результирующим значением pK_a ,

наблюдаемым в эксперименте. Если степень протонирования остатка Y171 или H309 значительно влияет на активность фермента, у мутантных форм с заменами Y171F или H309A, соответственно, профили влияния pH на каталитическую активность должны быть изменены со сдвигом наблюдаемого значения pK_a по сравнению с APE1 дикого типа.

Зависимости активности фермента от pH для мутантных форм Y171F и H309A (Рис. 3) оказались очень близкими к зависимости для фермента дикого типа, описанной ранее [39]. Таким образом, полученные результаты не подтверждают роль остатков Y171 и H309 в активации нуклеофильной молекулы воды и согласуются с моделью, в которой в качестве основания действует остаток D210 [33,42].

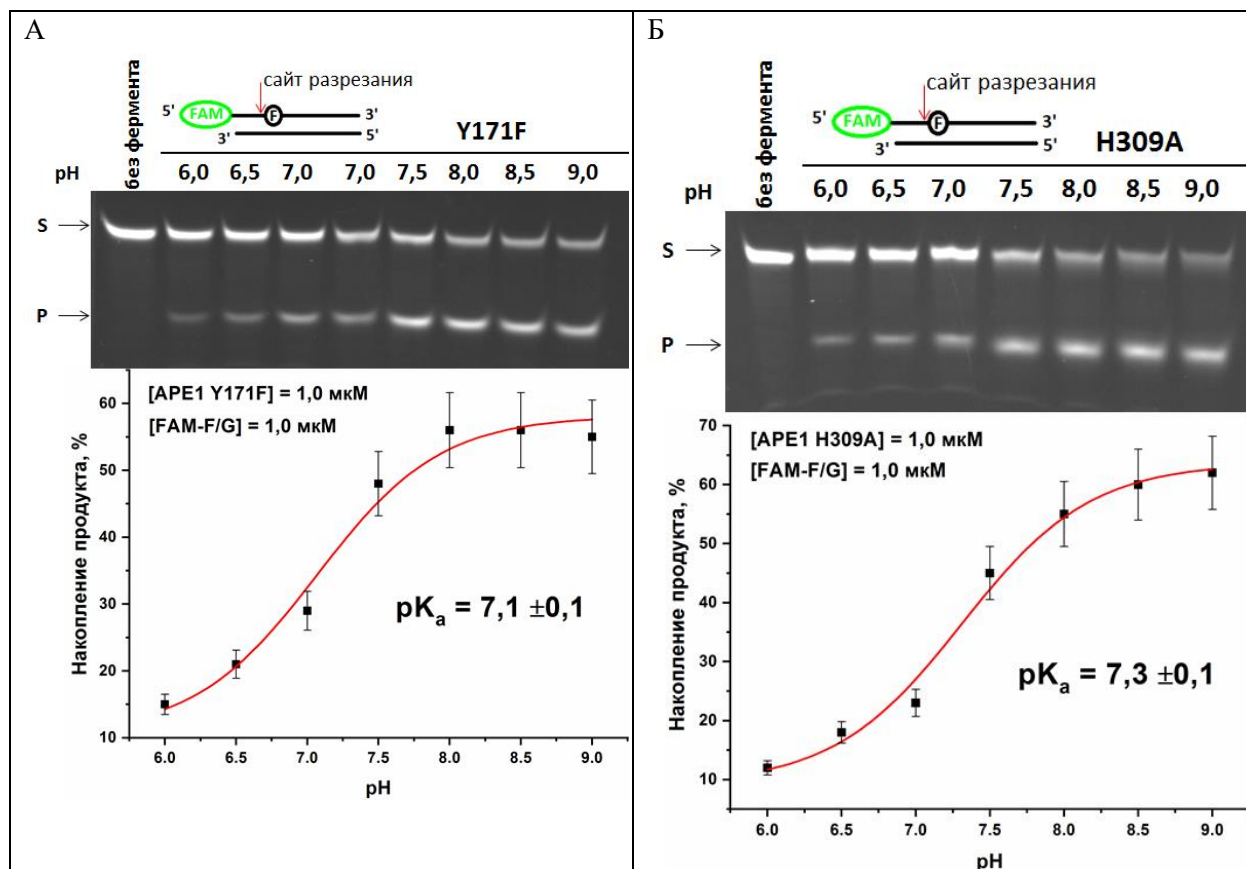


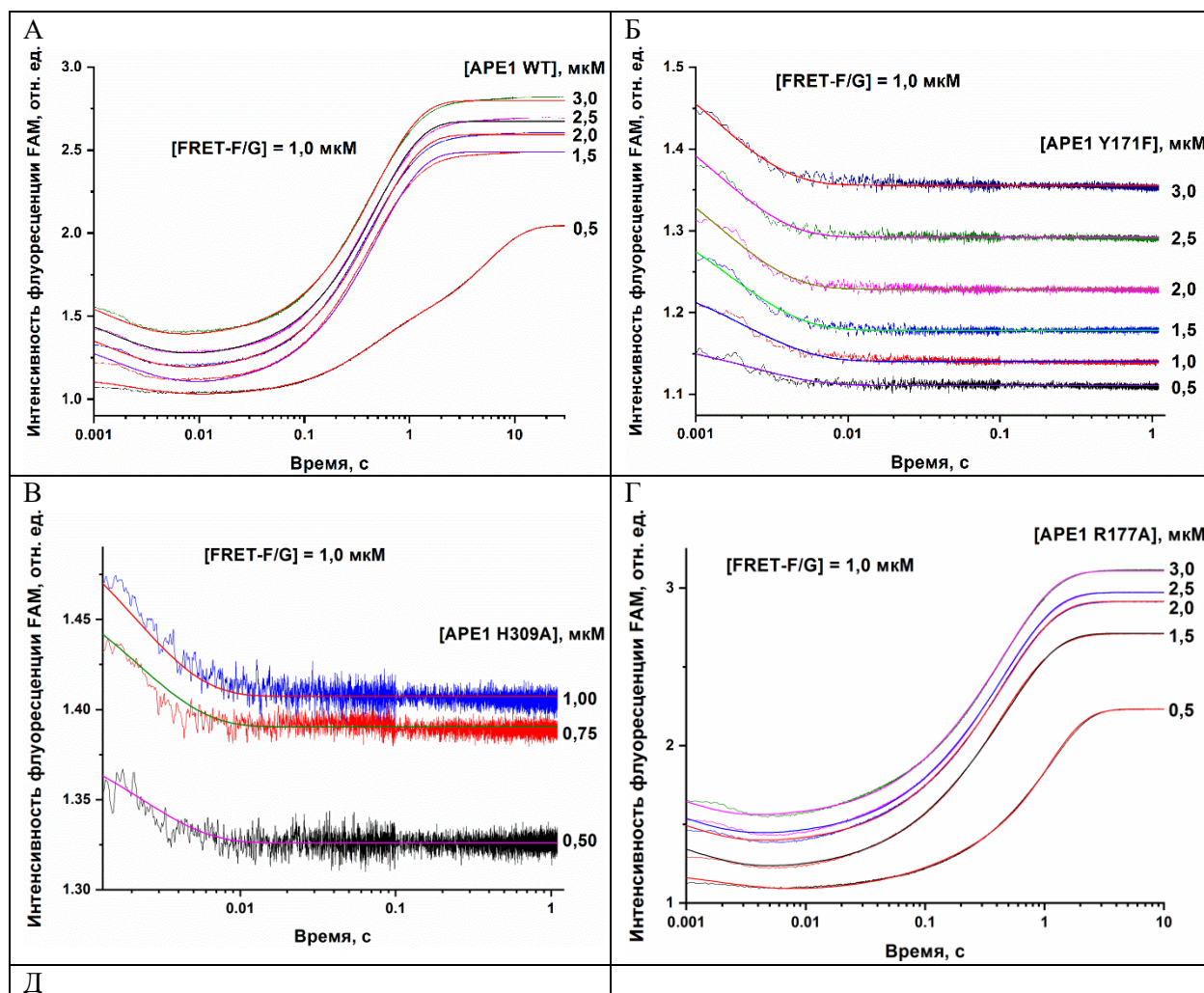
Рисунок 3. Влияние pH на активность мутантных форм Y171F (А) и H309A (Б). Экспериментальные зависимости были обработаны с помощью Уравнения 2, что позволило рассчитать значения pK_a . Концентрации APE1 и ДНК в реакционной смеси были равны 1,0 мкМ, время реакции – 10 мин в случае Y171F и 30 мин в случае H309A.

Чтобы охарактеризовать влияние аминокислотных замен на различные стадии каталитического процесса, было проведено предстационарное кинетическое исследование с регистрацией конформационных изменений ДНК и фермента в процессе их взаимодействия.

Для того чтобы отследить конформационные изменения ДНК-субстрата был использован дуплекс, содержащий флуорофор FAM и тушитель флуоресценции BHQ1 на своих концах. Эти два красителя образуют FRET-систему, в которой интенсивность флуоресценции FAM зависит от расстояния между ним и BHQ1, то есть расстояния между концами ДНК-дуплекса. Растворы ДНК-субстрата и фермента быстро смешивались друг с другом с помощью метода остановленного потока, после чего регистрировалась интенсивность флуоресценции FAM в режиме реального времени. Эксперименты были

проведены для APE1 дикого типа и четырёх мутантных форм в одинаковых условиях с варьированием концентраций белка (Рис. 4).

Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции FAM при взаимодействии FRET-субстрата с APE1 дикого типа содержат начальную фазу падения интенсивности флуоресценции, соответствующую образованию фермент-субстратного комплекса, в котором ДНК-дуплекс изогнут, и последующую фазу роста интенсивности флуоресценции, соответствующую расщеплению ДНК с последующей диссоциацией продукта. В случае мутантных форм Y171F и H309A кинетические кривые содержат только фазу снижения флуоресценции, поскольку их активность по расщеплению ДНК была слишком слабая для детекции в изучаемом диапазоне времени. Кинетические кривые для мутантных форм R177A и R181A содержат как фазу снижения, так и фазу роста флуоресценции, подтверждая, что эти мутантные формы способны не только связывать, но и эффективно расщеплять ДНК-субстрат.



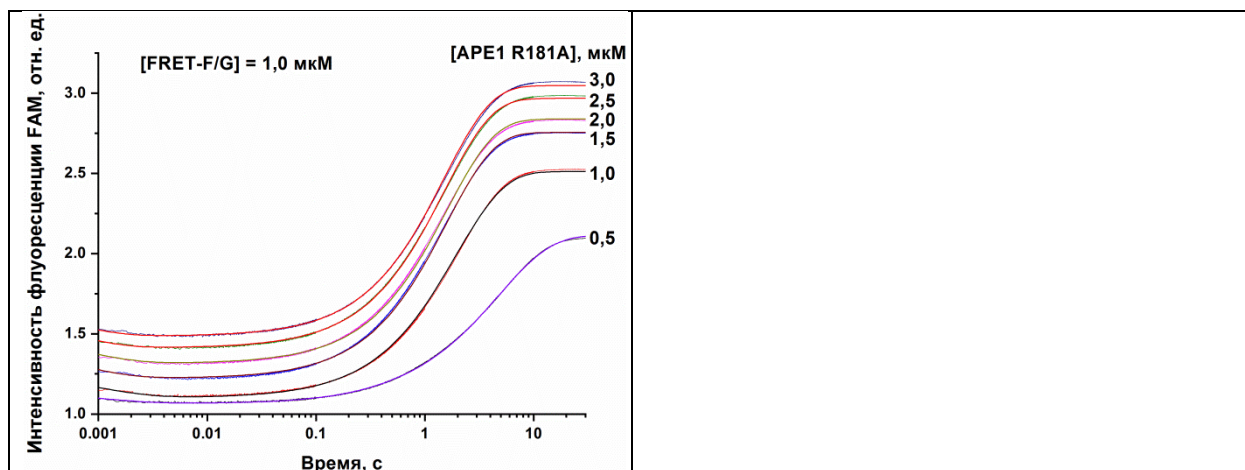


Рисунок 4. Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции FAM при взаимодействии APE1 дикого типа (А), Y171F (Б), H309A (В), R177A (Г) или R181A (Д) с ДНК-субстратом FRET-F/G. Экспериментальные данные и теоретические кривые представлены как зубчатые и гладкие линии, соответственно.

Кинетические кривые для мутантных форм Y171F и H309A были обработаны в программе DynaFit согласно **Схеме 1**, а кривые для APE1 дикого типа, R177A и R181A – согласно **Схеме 2**. Полученные кинетические константы приведены в **Таблице 1**.

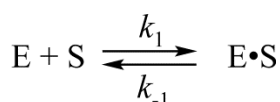


Схема 1. Кинетический механизм связывания фермента с субстратом. E – фермент, S – субстрат, E·S – фермент-субстратный комплекс.

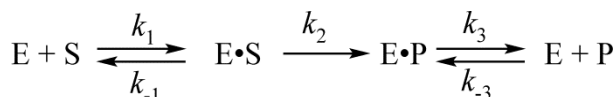


Схема 2. Кинетический механизм ферментативного катализа, содержащий стадию связывания фермента с субстратом, стадию гидролиза фосфоэфирной связи (химическая реакция) и стадию диссоциации продукта. E – фермент, S – субстрат, P – продукт, E·S – фермент-субстратный комплекс, E·P – комплекс фермента с продуктом.

Таблица 1. Кинетические параметры взаимодействия APE1 дикого типа и мутантных форм фермента с ДНК-субстратом, содержащим F-сайт, полученные путём анализа кинетических кривых изменения интенсивности флуоресценции FAM.

	$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	k_{-1}, s^{-1}	$K_S \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	k_2, s^{-1}	k_3, s^{-1}	$k_{-3} \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$K_P \times 10^6, \text{M}$
Y171F	230 ± 20	140 ± 20	1.6 ± 0.4				
H309A	160 ± 60	200 ± 40	0.8 ± 0.5				
WT	350 ± 40	20 ± 4	18 ± 6	2.22 ± 0.03	0.38 ± 0.02	26 ± 4	0.015 ± 0.003
R177A	520 ± 10	75 ± 7	7 ± 1	2.36 ± 0.02	8.0 ± 0.3	1.6 ± 0.2	5 ± 1
R181A	740 ± 90	110 ± 40	7 ± 3	0.73 ± 0.03	1.4 ± 0.2	18 ± 7	0.08 ± 0.04

$K_S = k_1/k_{-1}$, $K_P = k_3/k_{-3}$.

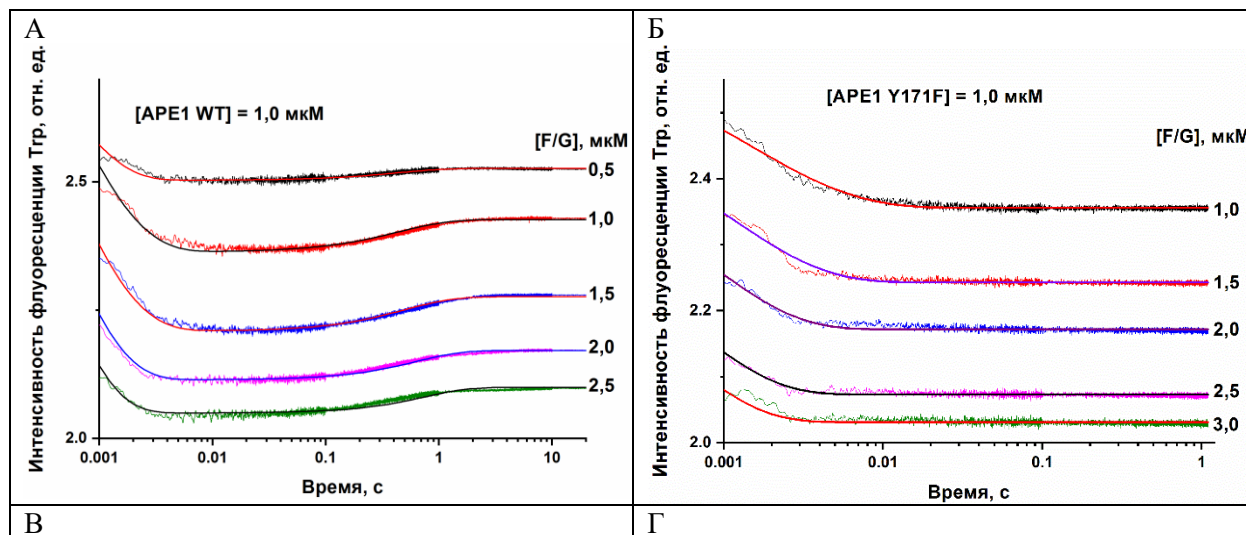
Полученные данные показывают, что замены R177A и R181A приводят к уменьшению K_S в 2-3 раза, а замены Y171F и H309A – в 10-20 раз. При этом константа гидролиза фосфоэфирной связи при замене R177A практически не изменяется, а при замене

R181A снижается в ~ 3 раза. Кроме того, в случае R181A и R177A K_R оказалась значительно больше, чем у дикого типа фермента, в ~ 5 и в ~ 300 раз, соответственно. Кинетическая константа k_3 тоже значительно повышена у этих двух мутантных форм APE1.

Рассчитанные значения констант отдельных стадий каталитического механизма фермент-субстратного взаимодействия объясняет результаты сравнения активностей мутантных форм, полученные в стационарных условиях. Повышенные значения K_R и k_3 при сохранении значения k_2 дикого типа приводят к значительному повышению активности фермента в условиях большого избытка субстрата. Замена R181A приводит к существенному снижению k_2 , которое, однако, компенсируется повышением k_3 и K_R , в результате чего активность этой мутантной формы в условиях многих оборотов слабо отличается от активности APE1 дикого типа.

Снижение K_S и повышение K_R в случае замен R177A и R181A – это связанные эффекты, свидетельствующие о том, что данные замены в целом снижают сродство фермента к ДНК, содержащей F-сайт. Такое снижение сродства ожидаемо, поскольку методом рентгеноструктурного анализа было показано, что остатки R177 и R181 образуют контакты с ДНК в комплексах APE1 с ДНК [33,42]. Однако важно заметить, что влияние этих замен на сродство к продукту AP-эндонуклеазной реакции значительно сильнее, чем на сродство к субстрату. Здесь наши данные согласуются с результатами, опубликованными ранее [42,43], и подтверждают предположение о том, что функция остатков R177 и R181 заключается преимущественно в связывании продукта, а не субстрата. Значительное снижение k_2 , вызванное заменой R181A, наталкивает на предположение о том, что найденное ранее вращение остатка R181 при образовании продукта [42] играет роль не только в формировании контакта для связывания с расщеплённой ДНК, но также способствует более эффективному протеканию стадии гидролиза фосфоэфирной связи.

Для того чтобы изучить конформационную динамику APE1 в ходе взаимодействия с ДНК-субстратом, регистрировали флуоресценцию остатков триптофана фермента (Рис. 5). В предыдущих исследованиях было показано, что суммарная флуоресценция остатков триптофана APE1 дикого типа в процессе AP-эндонуклеазной реакции претерпевает изменения [44–49]. Вначале наблюдается падение флуоресценции, соответствующее образованию фермент-субстратного комплекса, затем происходит рост флуоресценции, соответствующий расщеплению ДНК и диссоциации продукта.



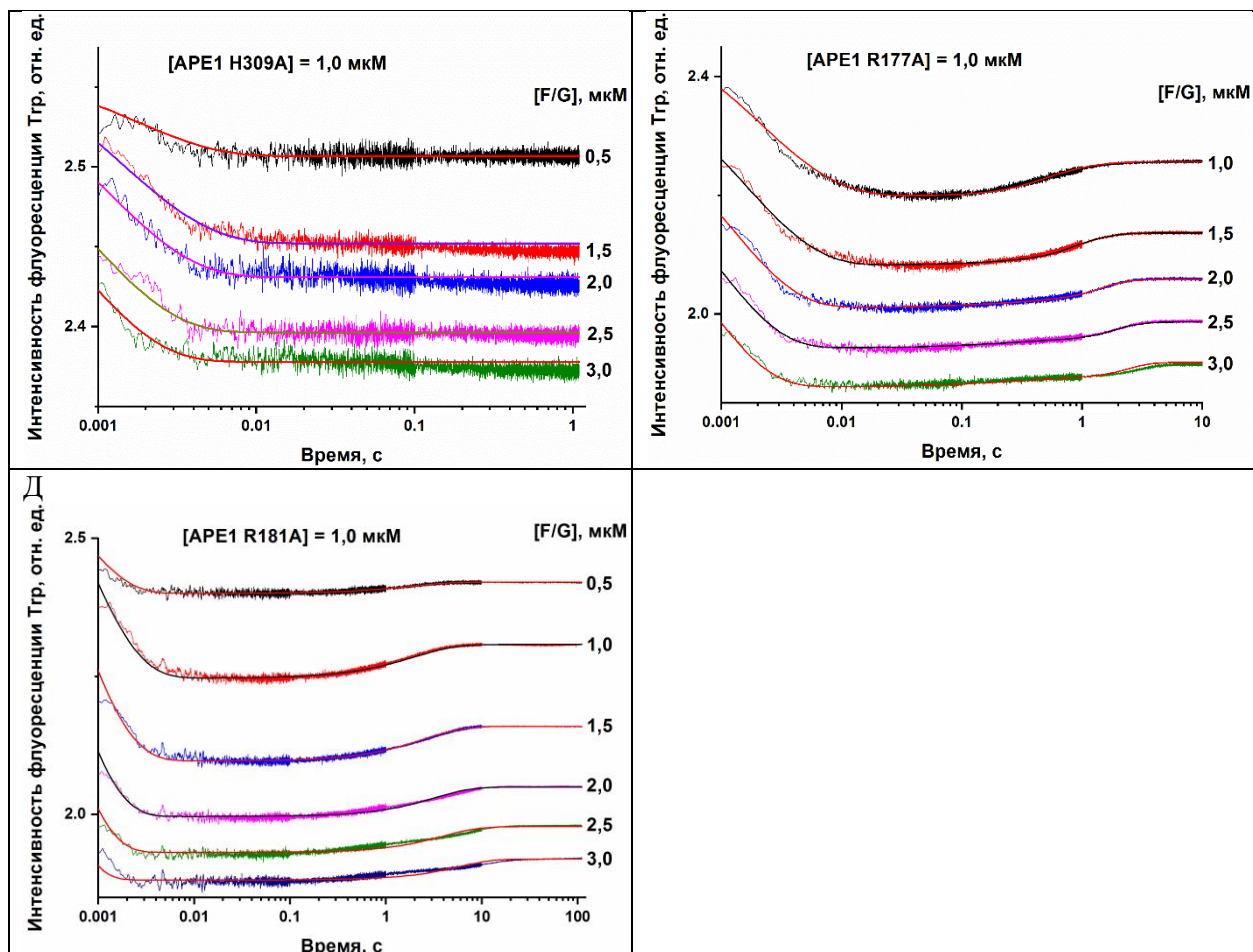


Рисунок. 5. Кинетические кривые изменения флуоресценции остатков триптофана фермента при взаимодействии APE1 дикого типа, (А), Y171F (Б), H309A (В), R177A (Г) или R181A (Д) с ДНК-дуплексом, содержащим F-сайт. Экспериментальные данные и теоретические кривые представлены как зубчатые и гладкие линии, соответственно.

В случае мутантных форм Y171F и H309A на кривых изменения флуоресценции Тгр наблюдалась только падение флуоресценции, соответствующее стадии связывания ДНК, тогда как для мутантных форм R177A и R181A кривые содержали и фазу падения, и фазу роста флуоресценции, отражающую расщепление ДНК с диссоциацией продукта. Таким образом, качественный анализ показывает согласованность данных, полученных с помощью двух разных флуорофоров.

Для получения количественных кинетических параметров кривые флуоресценции Тгр были обработаны согласно **Схеме 1** в случае мутантных форм APE1 Y171F и H309A и согласно **Схеме 2** в случае APE1 дикого типа, R177A и R181A. Рассчитанные константы представлены в **Таблице 2**.

Количественный анализ кривых изменения флуоресценции Тгр в целом показали результаты, согласующиеся с данными флуоресценции FAM. Было показано, что аминокислотные замены приводят к снижению скорости связывания фермент-субстратного комплекса, а в случае H309A и R181A также и к снижению сродства фермента к субстрату. Замена R177A не приводит к изменению константы расщепления ДНК, в то время как замена R181A снижает её в ~4 раза. При этом как R177A, так и R181A существенно снижают стабильность комплекса фермент-продукт.

Таблица 2. Кинетические параметры взаимодействия APE1 дикого типа и мутантных форм фермента с ДНК-субстратом, содержащим F-сайт, полученные путём анализа кинетических кривых изменения интенсивности флуоресценции остатков триптофана в составе APE1.

	$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	k_{-1}, s^{-1}	$K_S \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	k_2, s^{-1}	$K_P \times 10^6, \text{M}$
Y171F	620 ± 50	19 ± 4	30 ± 10		
H309A	430 ± 30	50 ± 10	9 ± 2		
WT	1600 ± 100	50 ± 20	30 ± 15	$2,4 \pm 0,2$	$0,06 \pm 0,01$
R177A	430 ± 10	15 ± 2	29 ± 5	$2,3 \pm 0,1$	$0,10 \pm 0,02$
R181A	1170 ± 60	80 ± 20	15 ± 5	$0,61 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,02$

$$K_S = k_1/k_{-1}$$

$$K_P = k_3/k_{-3}$$

2.2. Флуоресцентное мечение APE1

Для мечения APE1 был использован реагент Alexa Fluor 488 C5-малеимид, который способен взаимодействовать с остатками цистеина. В молекуле фермента есть 7 остатков цистеина, 4 из которых (C99, C138, C296, C310) находятся близко к поверхности глобулы и, согласно литературным данным, способны подвергаться химической модификации [50,51]. С целью получить APE1, меченную по определённым остаткам цистеина, были получены мутантные формы, содержащие двойные замены C138S/C296S, C138S/C310S и C296S/C310S. Данные мутантные формы, а также фермент дикого типа были помечены флуорофором. Анализ меченых белков методом масс-спектрометрии MALDI показал, что APE1 дикого типа и C296S/C310S были в основном дважды мечеными, тогда как C138S/C296S и C138S/C310S присоединяли в основном одну молекулу флуорофора на молекулу белка. Отсюда было сделано предположение, что в наших экспериментальных условиях мечение флуорофором проходило в основном по остаткам C99 и C138, причём мечение по остатку C99 было дополнительно подтверждено масс-спектрометрическим анализом продуктов трипсинолиза меченой APE1. У всех меченых форм APE1 была проанализирована AP-эндонуклеазная активность, и было показано, что она сохраняется на том же уровне, как у немеченого фермента дикого типа. На Рис. 6 изображена структура APE1 в комплексе с модельным ДНК-субстратом, где показаны все 4 возможные сайты прикрепления флуорофора к молекуле белка. Стоит отметить, что остаток C99 расположен близко к ДНК-связывающему сайту APE1, а также к остатку тушителя флуоресценции на одном из концов ДНК-дуплекса. Таким образом, вероятно, именно флуорофор, присоединённый к этому остатку цистеина, наиболее чувствителен к процессам взаимодействия фермента с ДНК.

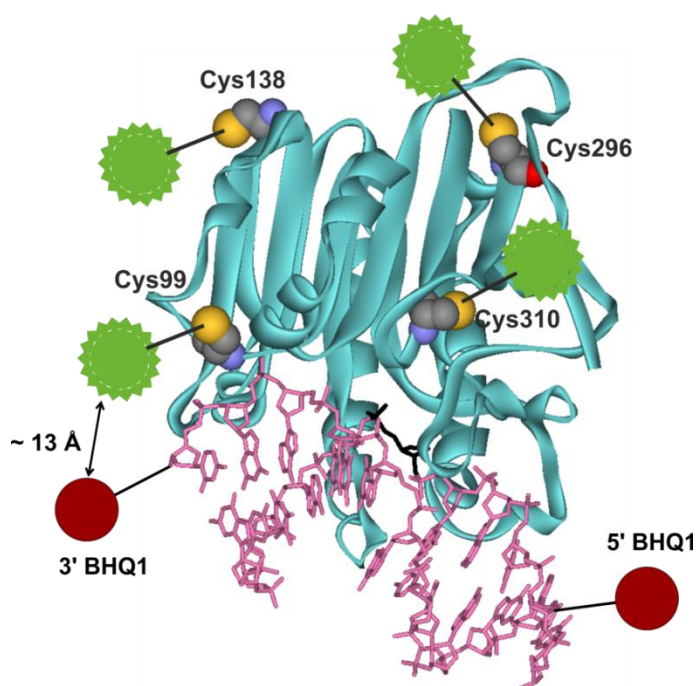


Рисунок 6. Кристаллическая структура комплекса APE1 с ДНК-дуплексом, содержащим AP-сайт (PDB ID: 1DE8). Показаны 4 остатка цистеина, доступных для химической модификации, согласно литературным данным. Флуоресцентные метки, присоединённые к этим остаткам, схематически изображены зелёным цветом, а остатки тушителя флуоресценции BHQ1, прикреплённого к концам модельных ДНК-дуплексов схематически показаны в виде красных кругов.

2.3. Взаимодействие флуоресцентно меченных APE1 с ДНК

Изменение флуоресценции Alexa Fluor 488 при взаимодействии меченой APE1 с ДНК-субстратами было изучено методом остановленной струи (Рис. 7). На Рис. 7 (А) показаны кинетические кривые изменения флуоресценции при взаимодействии с 17-звенными ДНК-дуплексами, содержащими F-сайт (F/G-17, F/G-3'BHQ-17 и F/G-3'BHQ-17). В качестве контроля регистрировалась флуоресценция меченой APE1 при взаимодействии с дуплексами C/G-3'BHQ-17 и C/G-3'BHQ-17, не содержащими модифицированных нуклеотидов. Как видно из рисунка, в случае использования ДНК, не содержащей F-сайта, не было зарегистрировано каких-либо значительных изменений флуоресценции меченой APE1. В то же время, при взаимодействии со специфическими субстратами AP-эндонуклеазной реакции были зарегистрированы двухфазные кривые изменения флуоресценции. Таким образом, полученная нами флуоресцентная система позволяет регистрировать специфичные взаимодействия APE1 с субстратами AP-эндонуклеазной реакции. Кинетические кривые были обработаны в соответствии с двухэкспоненциальным уравнением:

$$F = F_0 + F_1(1 - \exp(-k_1t)) + F_2(1 - \exp(-k_2t)), \quad (3)$$

где F – наблюдаемая интенсивность флуоресценции, F_0 – фоновый уровень флуоресценции, F_1 и F_2 – амплитуды изменения флуоресценции первой и второй стадий процесса, k_1 и k_2 – наблюдаемые кинетические константы первой и второй стадий процесса, соответственно.

Для того чтобы соотнести фазы изменения интенсивности флуоресценции Alexa Fluor 488 с этапами фермент-субстратного взаимодействия, было проведено сравнение полученных данных с результатами, полученными с помощью других флуорофоров,

используемых ранее для регистрации данного процесса (Рис. 7 (Б), Табл. 3). Сравнение кривых изменения интенсивности флуоресценции Alexa Fluor 488 с кривой изменения интенсивности флуоресценции FAM в составе FRET-пары в ДНК и с кривой изменения флуоресценции Trp в белке позволило сделать вывод, что первая фаза соответствует связыванию фермента с субстратом и формированию каталитически компетентного комплекса, тогда как вторая – гидролизу фосфодиэфирной связи с образованием продукта AP-эндонуклеазной реакции. Последующий анализ кривых изменения интенсивности флуоресценции меченой APE1 при взаимодействии с субстратами F/G-3'BHQ-17, F/G-5'BHQ-17 и F/G-17 позволил уточнить механизм взаимодействия APE1 с этими модельными субстратами (Рис. 8).

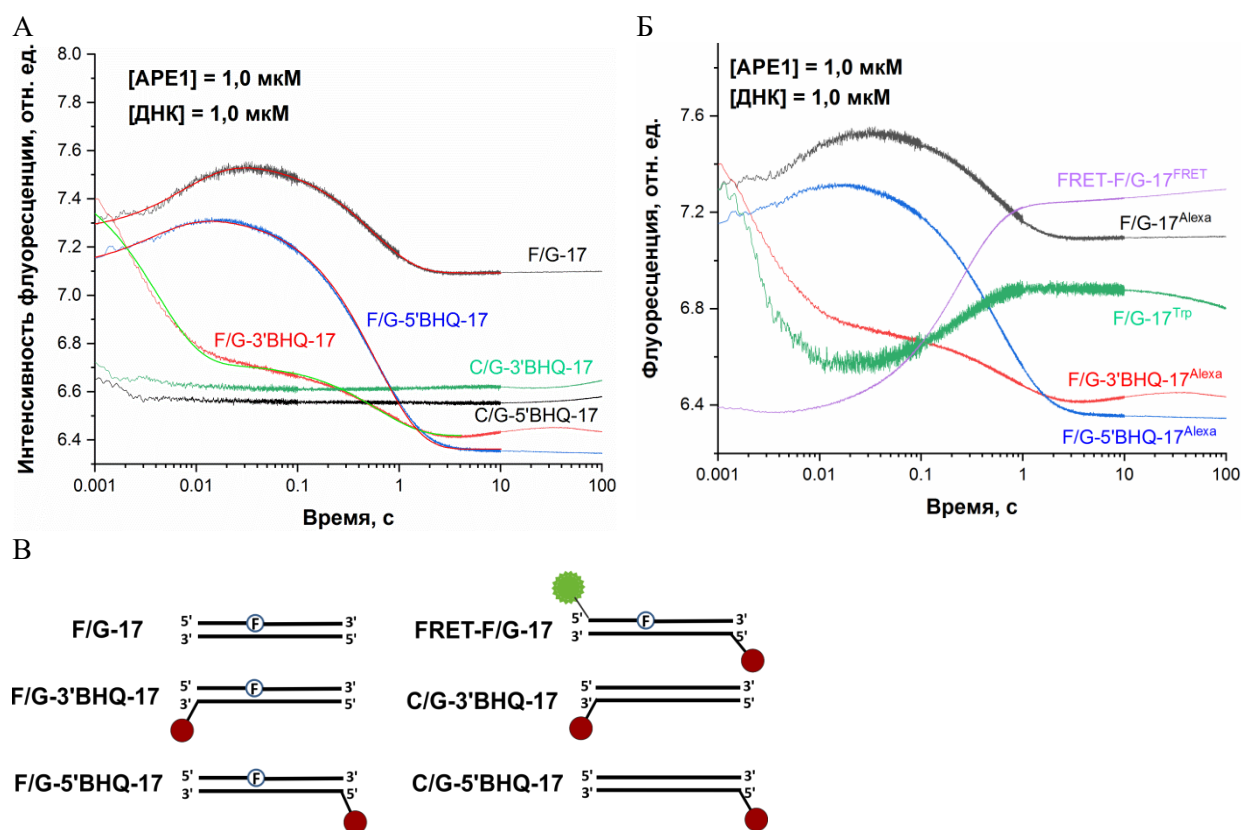


Рисунок 7. (А) Изменение интенсивности флуоресценции Alexa Fluor 488 при взаимодействии меченой мутантной формы C138S/C296S APE1 с 17-звенными ДНК-дуплексами. Экспериментальные данные и теоретические кривые представлены как зубчатые и гладкие линии, соответственно. (Б) Кинетические кривые изменения флуоресценции Alexa Fluor 488 при взаимодействии меченой мутантной формы C138S/C296S APE1 с 17-звенными ДНК-дуплексами в сравнении с кривой изменения FRET-сигнала при взаимодействии немеченой APE1 с субстратом FRET-F/G-17 и кривой изменения флуоресценции Trp при взаимодействии немеченой APE1 с субстратом F/G-17. (В) Схематичное изображение ДНК-субстратов.

Таблица 3. Наблюдаемые кинетические константы взаимодействия APE1 с 17-звенными ДНК-субстратами, рассчитанные из кривых изменения интенсивности флуоресценции разных флуорофоров с помощью Уравнения 3.

Флуорофор	Субстрат	$k_1, \text{с}^{-1}$	$k_2, \text{с}^{-1}$
Alexa Fluor 488 в белке	F/G-3'BHQ-17	246 ± 1	1.64 ± 0.04
	F/G-5'BHQ-17	262 ± 3	1.66 ± 0.01
	F/G-17	127 ± 1	1.84 ± 0.02
FRET-пара FAM/BHQ1 в ДНК	FRET-F/G-17	500 ± 80	4.08 ± 0.01

Остатки Trp в белке	F/G-17	407 ± 3	3.92 ± 0.02
---------------------	--------	-------------	-----------------

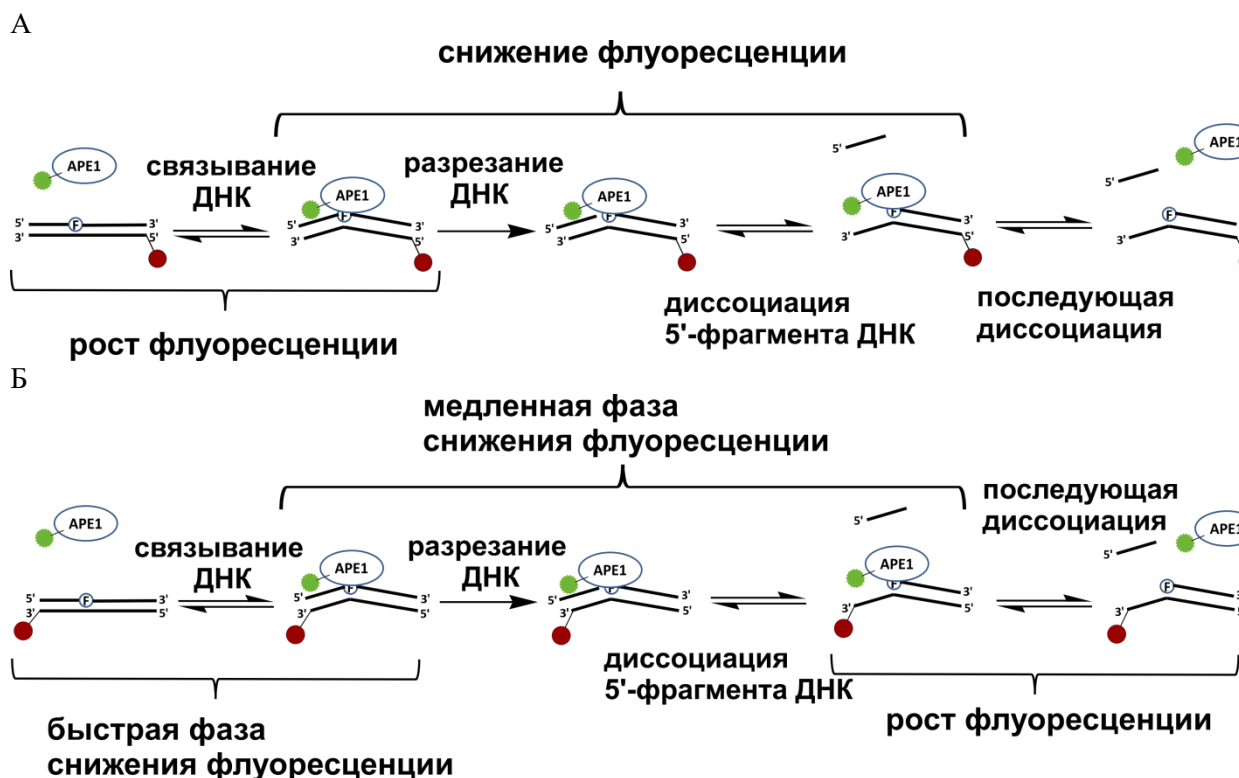


Рисунок 8. Схематическое изображение механизмов взаимодействия флуоресцентно меченной APE1 с модельными субстратами F/G-17, F/G-5'-BNQ-17 (А) и F/G-3'-BNQ-17 (Б). Схемы составлены на основе анализа как предыдущих работ, опубликованных в литературе, так и данных, полученных в текущем исследовании с использованием новой флуоресцентной системы.

Методом «остановленной струи» было изучено взаимодействие флуоресцентно меченной APE1 с 28- и 13-звенными ДНК-дуплексами (Рис. 9 (А)). Кинетические кривые в этих случаях тоже содержали начальную фазу роста и последующую фазу падения флуоресценции, как и в случае с 17-звенными субстратами. Таким образом, флуоресцентно меченная APE1 позволяет детектировать взаимодействия фермента с ДНК-субстратами различной длины. Однако в случае короткого 13-звенного дуплекса амплитуда изменений флуоресценции была очень низкой, поэтому этот субстрат является плохой моделью для данных исследований. В случае 28-звенного субстрата кинетическая кривая изменения флуоресценции была обработана с помощью Уравнения 3, что позволило рассчитать кинетические константы $k_1 = 224 \pm 1 \text{ с}^{-1}$ and $k_2 = 1,60 \pm 0,01 \text{ с}^{-1}$ для первой и второй фаз изменения флуоресценции, соответственно. Анализ кривой изменения флуоресценции для 28-звенного дуплекса позволил уточнить механизм взаимодействия ДНК с этим модельным ДНК-субстратом (Рис. 10). С целью дополнительного подтверждения правильности соотнесения фаз изменения флуоресценции на кинетических кривых со стадиями процесса фермент-субстратного взаимодействия были проведены эксперименты в условиях отсутствия ионов магния (которые были удалены из раствора с помощью ЭДТА) и с использованием флуоресцентно меченной неактивной мутантной формы APE1, содержащей замену D210N (Рис. 9 (Б)). Мутантная форма APE1 D210N и фермент дикого типа в отсутствие ионов Mg^{2+} способны связываться с ДНК, но не обладают каталитической активностью [47,52]. Как и ожидалось, в этих случаях на кинетических кривых

присутствует лишь начальная фаза роста флуоресценции, а фаза, отнесённая нами к разрезанию ДНК и диссоциации продукта, отсутствует.

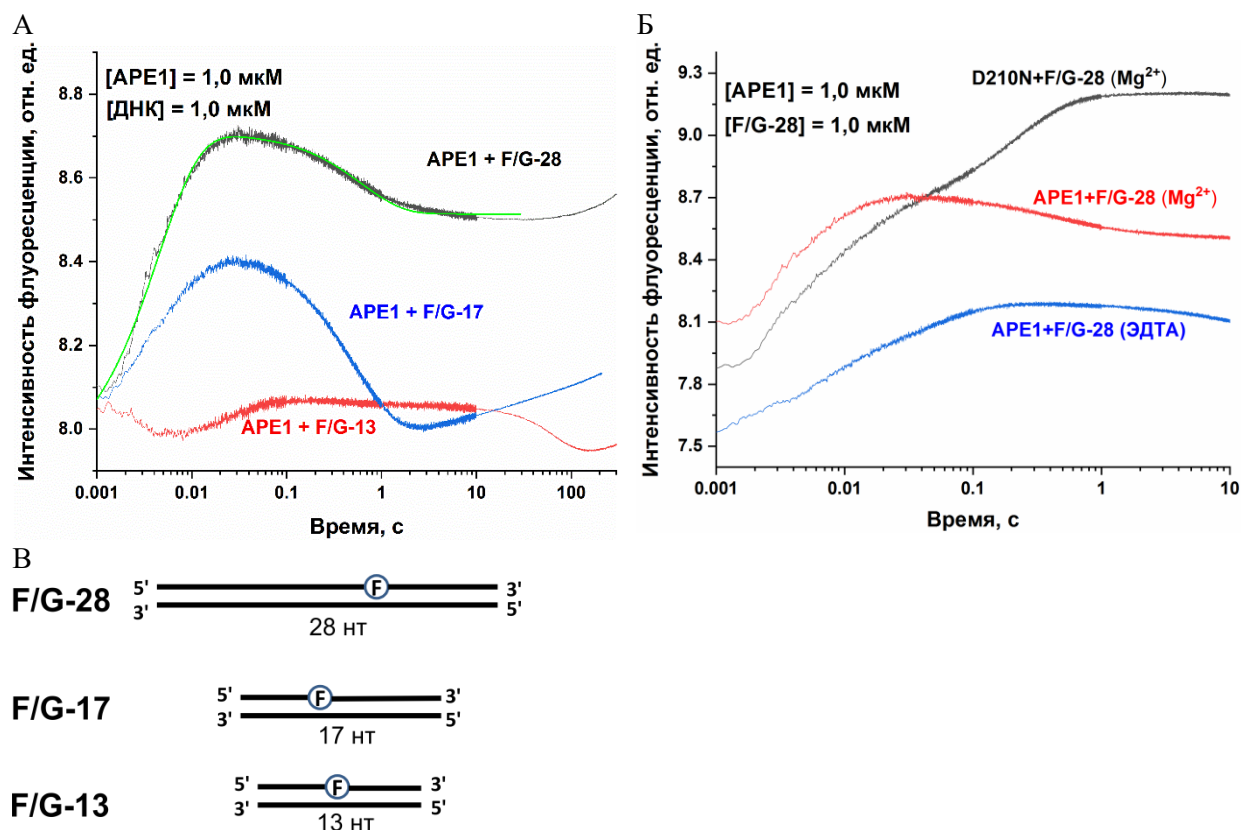


Рисунок 9. (А) Кривые изменения интенсивности флуоресценции Alexa Fluor 488 при взаимодействии меченой APE1 C138S/C296S с 13-, 17- и 28-звенными ДНК-дуплексами, содержащими F-сайт. Гладкая зелёная кривая является теоретической кривой, построенной путём обработки экспериментальных данных с помощью двухэкспоненциального **Уравнения 3**. (Б) Кривые изменения флуоресценции Alexa Fluor 488 при взаимодействии меченой каталитически неактивной мутантной формы APE1 D210N в присутствии Mg^{2+} (чёрная кривая) и меченой каталитически активной APE1 C138S/C296S в присутствии (красная кривая) или в отсутствии (синяя кривая) Mg^{2+} . Отсутствие ионов магния в растворе обеспечивалось добавлением ЭДТА натрия, связывающего ионы магния, которые могли попасть в реакционную смесь из препарата белка. (В) Схематическое изображение использованных в экспериментах ДНК-дуплексов.

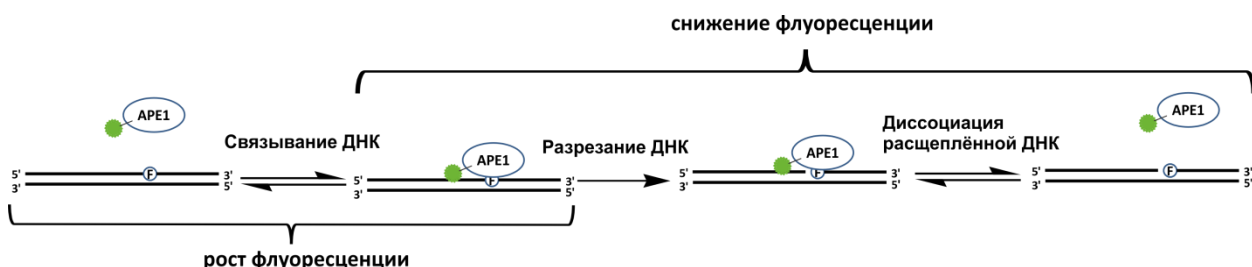


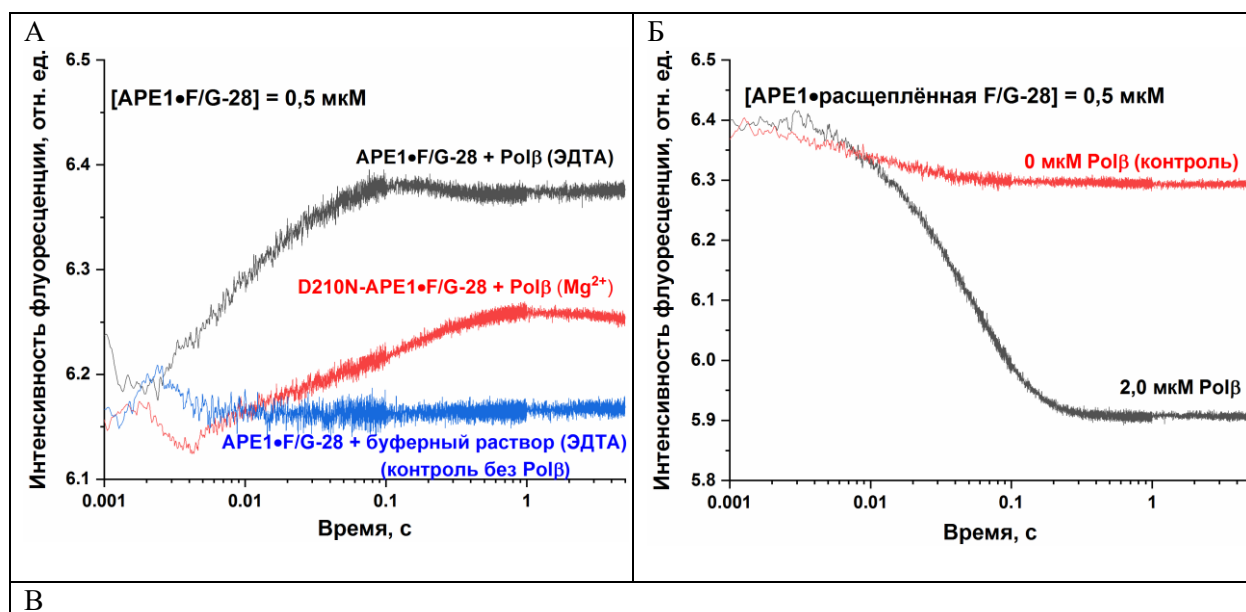
Рисунок 10. Схема взаимодействия флуоресцентно меченой APE1 с 28-звенным ДНК-дуплексом, содержащим F-сайт. Схема составлена на основе совокупного анализа экспериментов, полученных в текущем исследовании, и литературных данных.

2.4. Исследование взаимодействий между APE1 и Pol β

2.4.1. Влияние Pol β на APE1

Ранее было показано, что Pol β стимулирует AP-эндонуклеазную активность APE1 [53–56]. В нашей работе мы использовали флуоресцентно меченную APE1 для того чтобы прояснить механизм этого эффекта. Взаимодействие прединкубированного комплекса меченной APE1 с ДНК-субстратом, содержащим F-сайт, с Pol β было изучено методом «остановленной струи» с регистрацией флуоресценции Alexa Fluor 488 в составе APE1 (Рис. 11(А)). Чтобы предотвратить расщепление ДНК под действием APE1, использовали буферный раствор с добавлением ЭДТА натрия, не содержащий ионы магния и мутантную форму APE1 D210N, не обладающую каталитической активностью. В обоих случаях после смешивания раствора фермент-субстратного комплекса APE1 с раствором Pol β был зарегистрирован рост флуоресценции. Поскольку ранее рост флуоресценции данного флуорофора в составе APE1 был соотнесён со связыванием фермента с ДНК, мы объясняем данный результат тем, что добавление Pol β стабилизирует комплекс APE1 с субстратом AP-эндонуклеазной реакции.

Также было исследовано взаимодействие Pol β с APE1, находящейся в комплексе с расщеплённой ДНК. Флуоресцентно меченную каталитически активную APE1 сначала добавляли к 28-звенному дуплексу с F-сайтом и инкубировали 5 минут. После этого полученный раствор смешивали с раствором Pol β методом «остановленной струи» с регистрацией флуоресценции Alexa Fluor 488 (Рис. 11 (Б)). Взаимодействие Pol β с флуоресцентно меченной APE1, находящейся в комплексе с расщеплённой ДНК, приводит к резкому снижению флуоресценции белка. Данный результат был интерпретирован как вытеснение APE1 из комплекса с продуктом под действием Pol β , что хорошо согласуется с предложенным в литературе механизмом «передачи эстафетной палочки» для координации BER [57].



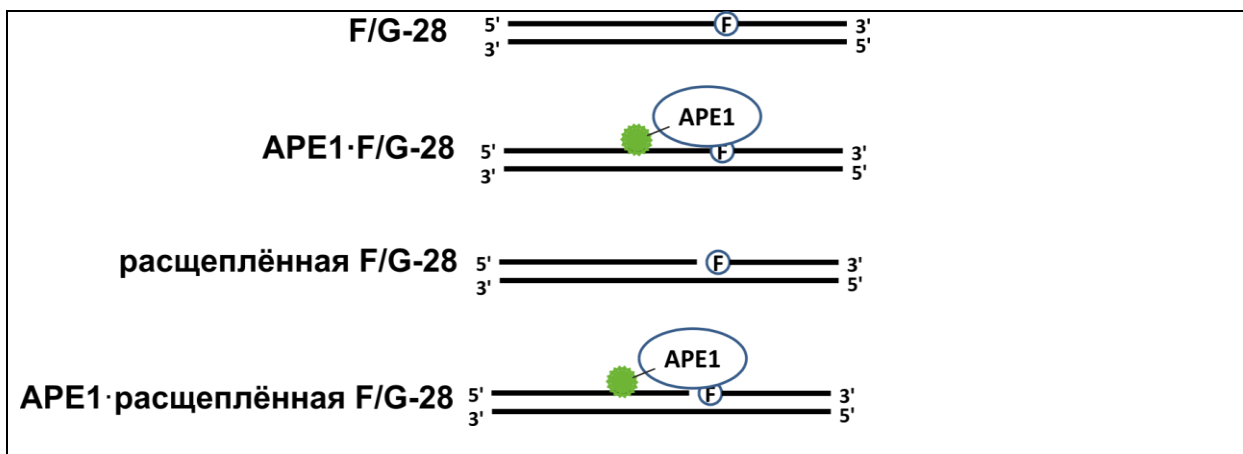


Рисунок 11. (А) Кинетические кривые изменения флуоресценции Alexa Fluor 488 в составе меченой APE1 при взаимодействии комплекса APE1·F/G-28 с Pol β . Раствор прединкубированного комплекса смешивался с раствором Pol β . Расщепление ДНК под действием APE1 предотвращалось использованием буферного раствора с добавлением ЭДТА, не содержащего ионы магния (чёрная кривая) или использованием каталитически неактивной мутантной формы фермента (красная кривая). (Б) Кинетические кривые изменения флуоресценции Alexa Fluor 488 в составе меченой APE1 при взаимодействии Pol β с комплексом APE1 с продуктом AP-эндонуклеазной реакции. (В) Схематические изображения использованных в экспериментах ДНК-дуплексов и их комплексов с флуоресцентно меченой APE1.

2.4.2. Влияние APE1 на Pol β

Кинетика нуклеотидилтрансферазной реакции, катализируемой Pol β , ранее была изучена методом «остановленной струи» с использованием ДНК-дуплексов, содержащих 2-аминопурины в качестве флуоресцентного зонда, чувствительного к индуцируемым полимеразой конформационным изменениям ДНК [58–60]. Данный метод позволяет отдельно регистрировать стадию связывания фермента с субстратом и конформационные изменения происходящие после встраивания нуклеотида в ДНК. В нашей работе этот подход был использован, чтобы изучить влияние APE1 на отдельные стадии катализируемого Pol β встраивания нуклеотида в два разных субстрата, имитирующих интермедиаты BER: однонуклеотидную брешь в ДНК и однонуклеотидную брешь с 5'-дезоксирибозофосфатной группой.

Кинетика встраивания одного нуклеотида в ДНК-субстрат с однонуклеотидной брешью Gap_2-aPu была изучена при различных концентрациях APE1 (**Рис. 12**). Кривые изменения флуоресценции 2-аминопурина в составе ДНК-субстрата были обработаны с помощью **Уравнения 3**, что позволило рассчитать константы скорости, соответствующие стадии связывания Pol β с ДНК с образованием каталитически-компетентного комплекса (k_1) и стадии катализа с последующей диссоциацией продукта (k_2) при различных концентрациях APE1 в реакционной смеси (**Рис. 13**). Анализ полученных данных показал, что повышение концентрации APE1 приводит к некоторому снижению констант скорости обеих стадий, а также амплитуды второй стадии.

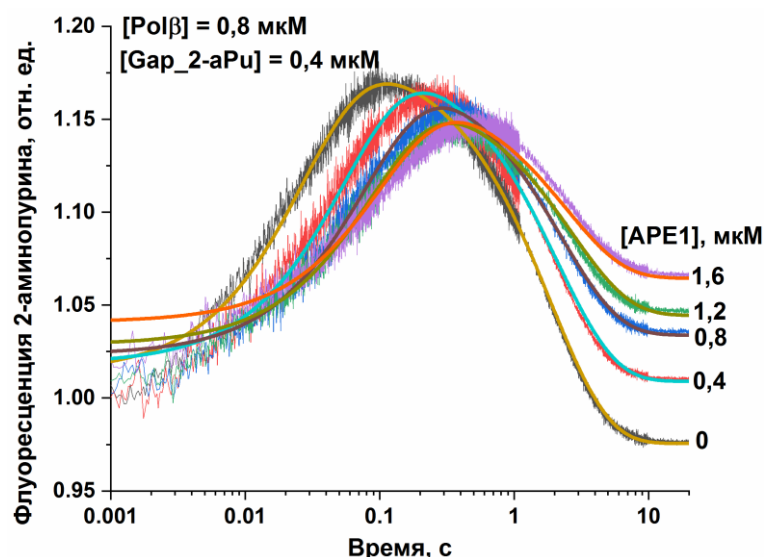


Рисунок 12. Кривые изменения флуоресценции 2-аминопурина в составе дуплекса Gap_2-aPu в процессе нуклеотидилтрансферазной реакции, катализируемой Polβ в присутствии различных концентраций APE1. Экспериментальные и теоретические кривые представлены в виде зубчатых и гладких линий, соответственно.

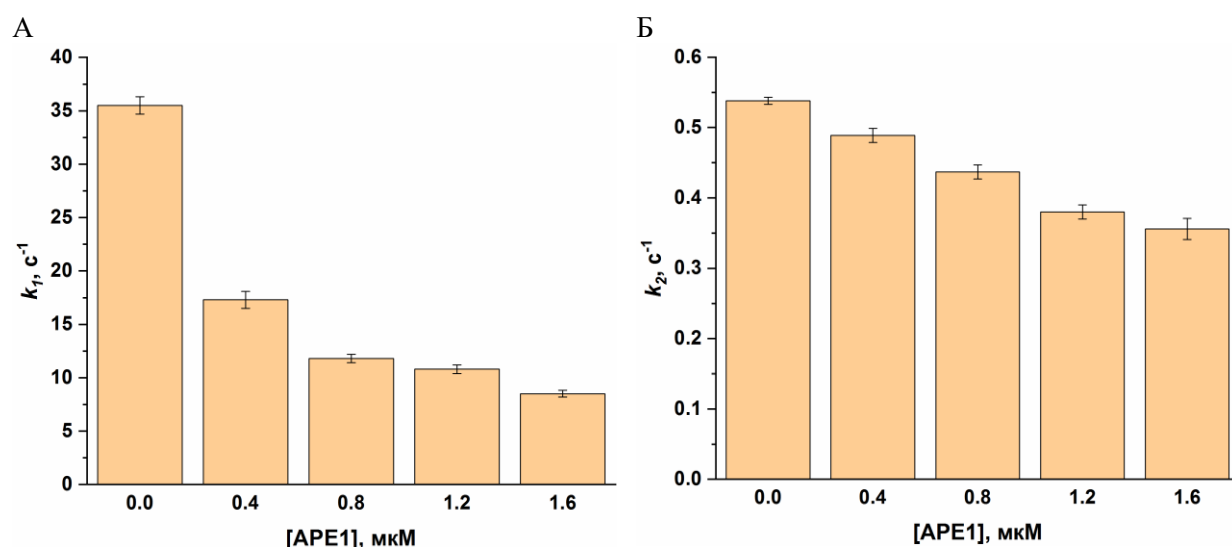


Рисунок 13. Влияние концентрации APE1 на наблюдаемые константы скорости формирования каталитически компетентного комплекса Polβ с ДНК (k_1) и каталитической стадии (k_2) в процессе встраивания нуклеотида в субстрат с однонуклеотидной брешью Gap_2-aPu.

Кинетика встраивания нуклеотида в ДНК-субстрат с однонуклеотидной брешью и F-сайтом GapF_2-aPu в присутствии различных концентраций APE1 была изучена методом «остановленной струи» с регистрацией флуоресценции 2-аминопурина (Рис. 14 (А)). В данном случае при высоких концентрациях APE1 на флуоресцентных кривых появлялась дополнительная третья фаза роста флуоресценции. Поскольку данная фаза роста флуоресценции 2-аминопурина наблюдается после фазы падения, соответствующей конформационным перестройкам после присоединения нуклеотида, мы предполагаем, что эта новая фаза соответствует связыванию APE1 с продуктом нуклеотидного присоединения. Повышение концентрации Polβ приводит к исчезновению этой дополнительной фазы (Рис. 14 (Б)), что свидетельствует о конкуренции между APE1 и Polβ за связывание ДНК-продукта.

Кинетические кривые были обработаны с помощью двухэкспоненциального **Уравнения 3** в случае наличия двух фаз изменения флуоресценции или с помощью трёхэкспоненциального **Уравнения 4** в случае наличия трёх фаз изменения флуоресценции:

$$F = F_0 + F_1(1 - \exp(-k_1t)) + F_2(1 - \exp(-k_2t)) + F_3(1 - \exp(-k_3t)), \quad (4)$$

где F – наблюдаемая интенсивность флуоресценции, F_0 – фоновый уровень флуоресценции, F_1 , F_2 и F_3 – амплитуды изменения флуоресценции первой, второй и третьей стадий процесса, k_1 , k_2 и k_3 – наблюдаемые кинетические константы первой, второй и третьей стадий процесса, соответственно.

Как видно из **Рис. 15**, в случае субстрата с однонуклеотидной брешью с F-сайтом не наблюдается зависимость от концентрации APE1 изменения констант связывания Pol β с ДНК-субстратом и каталитической стадии. Таким образом, наши результаты указывают на то, что влияние APE1 на катализируемое Pol β заполнение однонуклеотидной брешы в ДНК зависит от наличия AP-сайта на 5'-конце этой брешы.

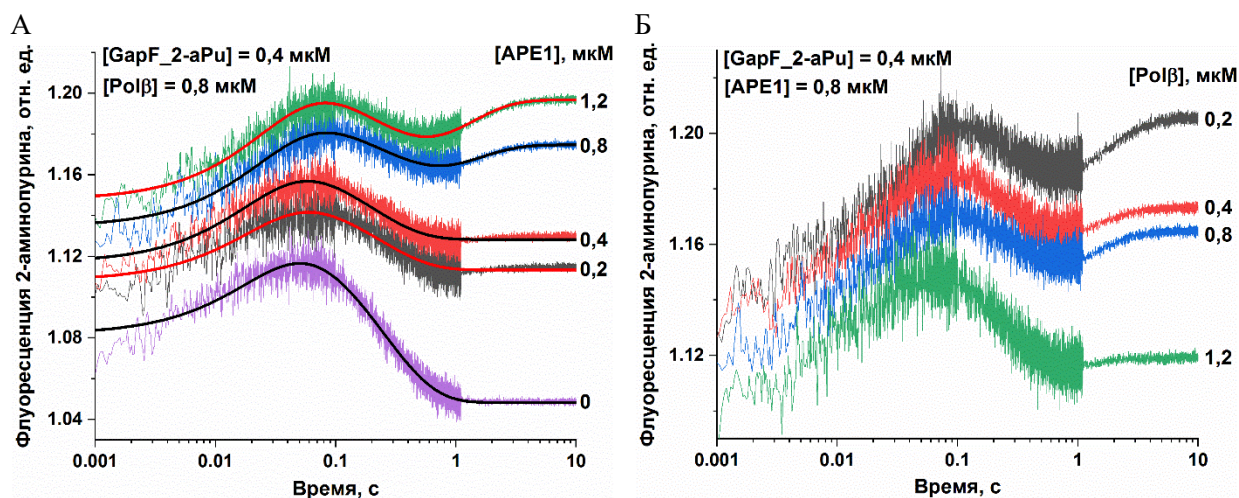


Рисунок 14. Кривые изменения флуоресценции 2-аминопурина в составе дуплекса GapF_2-aPu в процессе нуклеотидилтрансферной реакции, катализируемой Pol β в присутствии различных концентраций APE1. Экспериментальные и теоретические кривые представлены в виде зубчатых и гладких линий, соответственно. (А) Концентрация Pol β равна 0,8 мкМ, а концентрация APE1 варьируется от 0 до 1,2 мкМ. (Б) Концентрация APE1 равна 0,8 мкМ, а концентрация Pol β варьируется от 0,2 до 1,2 мкМ.

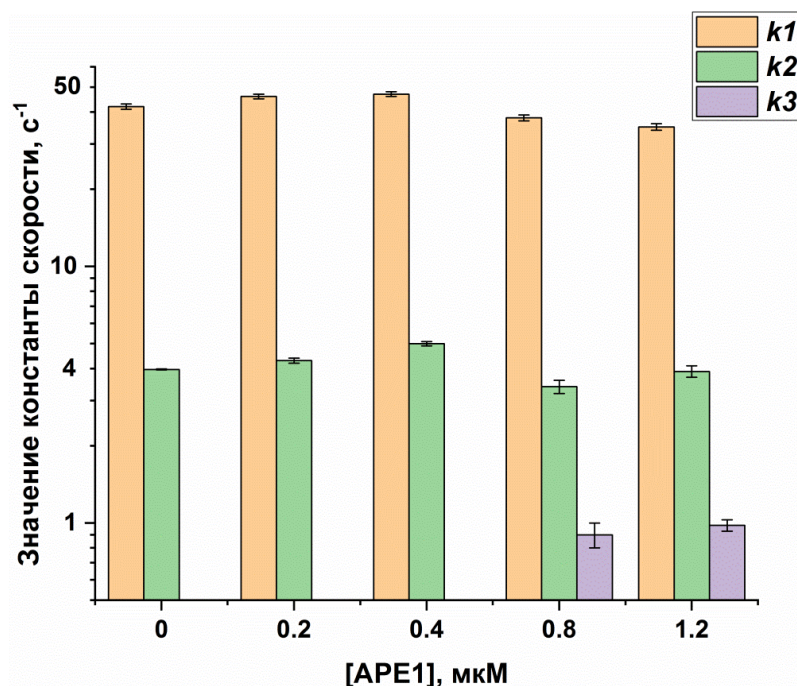


Рисунок 15. Влияние APE1 на наблюдаемые константы скорости формирования каталитически компетентного комплекса Pol β с ДНК (k_1) и каталитической стадии (k_2) в процессе встраивания нуклеотида в субстрат с однонуклеотидной брешью Gap_2-аРн, а также на константу k_3 , соответствующую третьей фазе изменения флуоресценции, появляющейся при высоких концентрациях APE1 и, вероятно, соответствующей связыванию APE1 с ДНК-продуктом нуклеотидилтрансферазной реакции.

2.5. Исследование влияния ДНК-гликозилаз на активность Pol β

Влияние различных ДНК-гликозилаз на полимеразную активность Pol β по отношению к субстратам, имитирующим такие интермедиаты BER, как однонуклеотидную брешь (Gap), однонуклеотидную брешь с AP-сайтом (GapF), двухнуклеотидную брешь (2ntGap) и одноцепочечный разрыв (Nick), было изучено с помощью анализа кинетики накопления продукта, отделяемого от исходной ДНК методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (Рис. 16). Кинетические кривые накопления продукта в случае каждого субстрата при добавлении каждой ДНК-гликозилазы были обработаны с помощью Уравнения 1, что позволило рассчитать наблюдаемые кинетические константы нуклеотидилтрансферазной активности Pol β (Рис. 17 (А)). Эти данные были использованы для нахождения коэффициентов стимуляции полимеразной активности Pol β по отношению к каждому субстрату для каждой ДНК-гликозилазы (Рис. 17 (Б)). Коэффициент стимуляции рассчитывался как отношение наблюдаемой константы скорости встраивания нуклеотида в данный субстрат в присутствии данной ДНК-гликозилазы к наблюдаемой константе скорости в отсутствие эффектора. Результаты показали, что ДНК-гликозилазы AAG, OGG1, NTHL1, MBD4, UNG и SMUG, относящиеся к различным структурным семействам и обладающие различными субстратными специфичностями, стимулируют активность Pol β по отношению к различным интермедиатам BER. Наши результаты подтверждают предыдущие исследования, показавшие, что Pol β взаимодействует с ДНК-гликозилазами UNG [61], OGG1 [62] и AAG [62]. В то же время влияние NTHL1, MBD4 и SMUG на Pol β было показано нами впервые. Поскольку в последовательности реакций BER Pol β и исследуемые ДНК-гликозилазы не выполняют соседние реакции, наши результаты свидетельствуют скорее в пользу того, что в данном

случае координация осуществляется в соответствии с механизмом «репарасом», нежели по модели «передачи эстафетной палочки», что согласуется с предыдущими исследованиями, показавшими образование мультибелковых комплексов с участием Pol β и некоторых ДНК-гликозилаз [61–64].

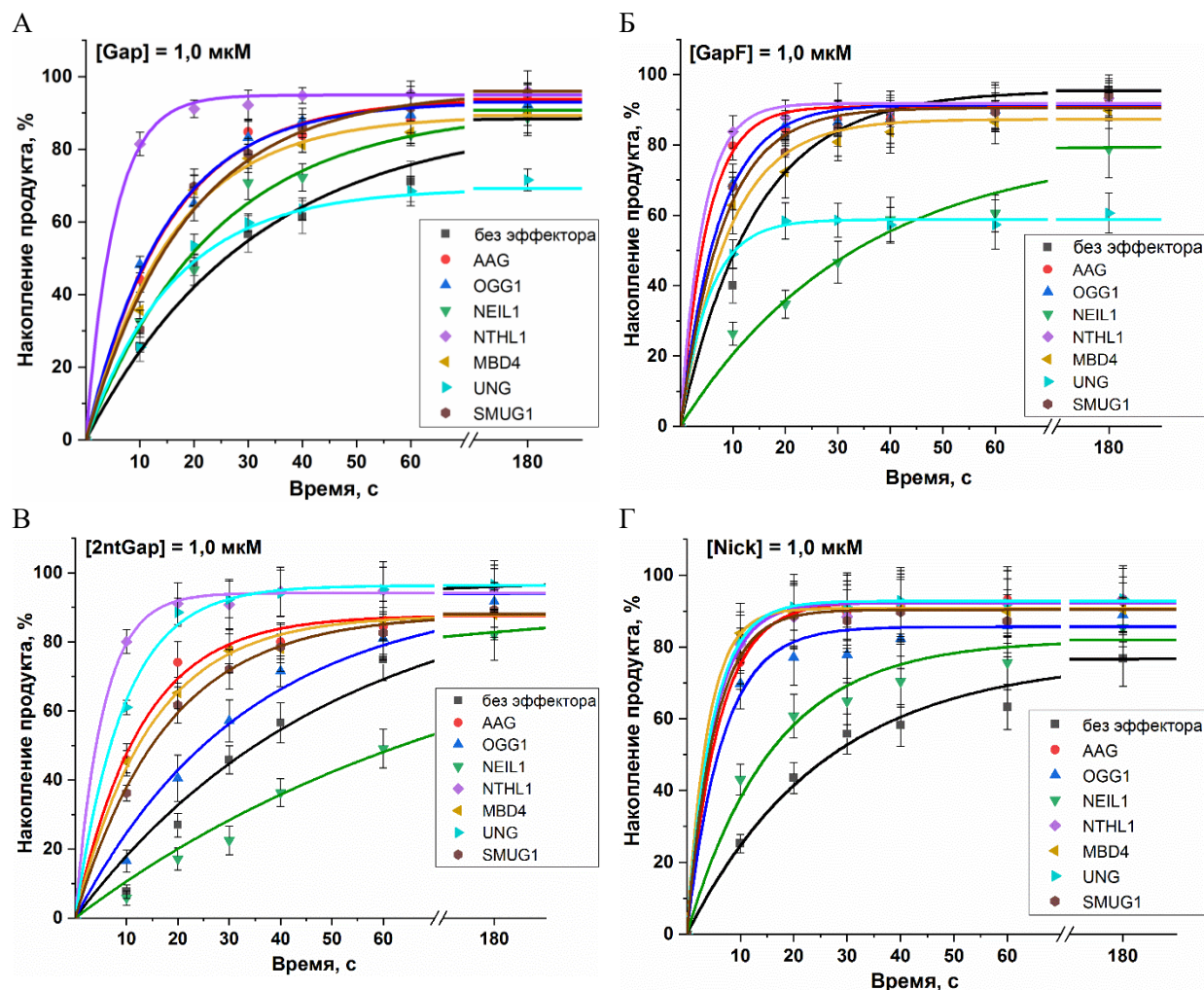
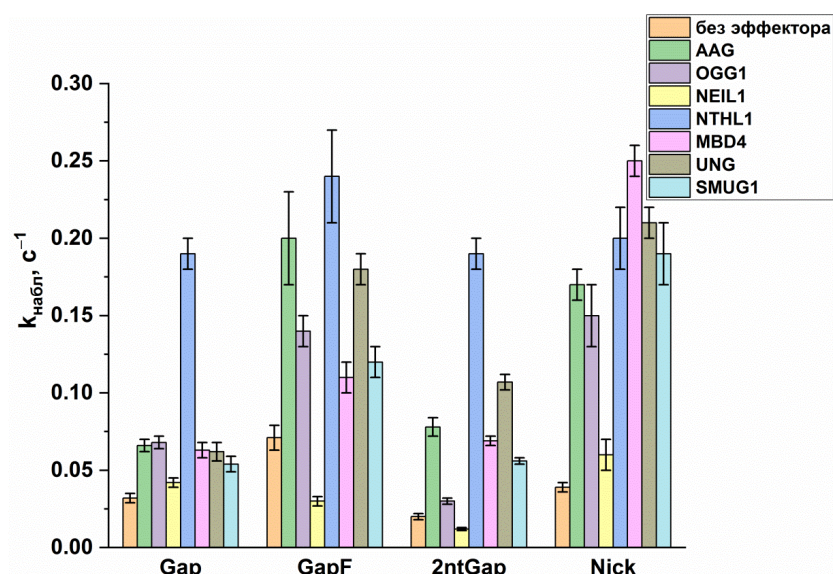


Рисунок 16. Кинетические кривые накопления катализируемого Pol β встраивания одного нуклеотида в ДНК-субстраты Gap (А), GapF (Б), 2ntGap (В) и Nick (Г) в присутствии различных ДНК-гликозилаз или в отсутствие эффиктора. Концентрации Pol β и ДНК-субстратов в реакционных смесях были равны 1,0 мкМ, каждая ДНК-гликозилаза добавлялась до финальной концентрации 2,0 мкМ. Экспериментальные данные (показаны в виде точек) обрабатывались с помощью Уравнения 1, что позволило рассчитать наблюдаемые кинетические константы нуклеотидилтрансферной реакции для каждой кинетической кривой.



Б

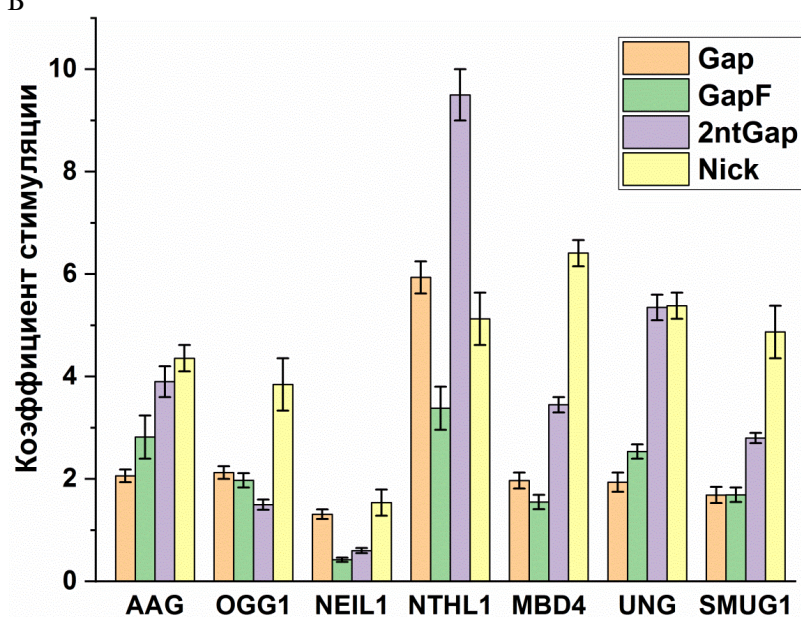


Рисунок 17. Влияние различных ДНК-гликозилаз на активность Polβ по отношению к различным ДНК-субстратам. (А) Наблюдаемые константы скорости катализируемого Polβ встраивания нуклеотида в различные субстраты в отсутствие эффиктора и в присутствии различных ДНК-гликозилаз. (Б) Коэффициенты стимуляции, рассчитанные как отношение наблюдаемой константы скорости в присутствии данной ДНК-гликозилазы к наблюдаемой константе скорости в отсутствие эффиктора.

3. Выводы

1. Анализ кинетики взаимодействия мутантных форм Y171F, H309A, R177A и R181A с ДНК-субстратами позволил уточнить роль данных аминокислотных остатков в механизме AP-эндонуклеазной реакции. Показано, что остатки Y171 и H309 не только критически важны для катализа эндонуклеазной реакции, но также участвуют в связывании APE1 с ДНК, что подтверждает их роль в стабилизации переходного состояния реакции за счёт координации гидролизуемой фосфатной группы ДНК, как было предположено ранее на основе анализа кристаллических структур комплексов фермента с ДНК. Остаток R177 не участвует в гидролизе фосфодиэфирной связи, однако важен для связывания фермента с расщеплённой ДНК, поскольку его замена на аланин приводит как к ускорению диссоциации фермента из комплекса с продуктом, так и к уменьшению термодинамической стабильности этого комплекса. Остаток R181 также важен для стабилизации комплекса APE1 с расщеплённой ДНК, но помимо этого способствует протеканию реакции гидролиза фосфодиэфирной связи, поскольку его замена на аланин существенно снижает константу скорости каталитической стадии. С учётом анализа кристаллографических данных, согласно которому, R181 участвует в связывании ДНК и меняет свою конформацию при расщеплении ДНК, можно предположить, что данный аминокислотный остаток способствует тому, чтобы расщепляемая молекула ДНК приняла благоприятную для катализа конформацию в активном центре фермента.

2. Была создана система на основе флуоресцентно меченной APE1, позволяющая регистрировать специфические процессы взаимодействия фермента с ДНК, содержащей F-сайт а также ДНК-опосредованные взаимодействия между APE1 и другими ферментами BER. С помощью созданной флуоресцентной системы было изучено взаимодействие APE1 с модельными ДНК-субстратами различной длины. Полученные данные были использованы для уточнения механизма взаимодействия фермента с широко используемыми в исследованиях модельными субстратами. В частности был выяснен последовательность стадий диссоциации комплекса фермента с расщеплённой ДНК в зависимости от длины субстрата.

3. Было изучено взаимное влияние между APE1 и Pol β в ходе их взаимодействия с ДНК-субстратами, моделирующими интермедиаты BER. Показано, что Pol β стимулирует образование каталитически компетентного комплекса APE1 с субстратом AP-эндонуклеазной реакции и диссоциацию APE1 из комплекса с расщеплённой ДНК, таким образом, двумя разными путями стимулируя активность APE1. В свою очередь было показано, что влияние APE1 на катализируемое Pol β встраивание нуклеотида в ДНК зависит от природы ДНК-субстрата. В случае встраивания нуклеотида в ДНК, содержащую однонуклеотидную брешь, было показано, что добавление APE1 несколько ингибирует как стадию формирования каталитически компетентного комплекса ДНК-субстрата с полимеразой, так и непосредственно каталитическую стадию встраивания нуклеотида. В случае же наличия 5'-F-сайта в однонуклеотидной бреши было показано отсутствие влияние концентрации APE1 на отдельные стадии процесса взаимодействия Pol β с ДНК. Данные результаты свидетельствуют о сложном механизме координации между этими двумя ферментами BER, выходящем за пределы модели «передачи эстафетной палочки».

4. Показано, что ДНК-гликозилазы AAG, OGG1, NTHL1, MBD4, UNG и SMUG, относящиеся к различным структурным семействам и обладающие различной субстратной специфичностью, стимулируют активность Pol β по отношению к субстратам, имитирующим такие интермедиаты BER, как двухнуклеотидная брешь, однонуклеотидная брешь, однонуклеотидная брешь с AP-сайтом, одноцепочечный разрыв. Полученные результаты с учётом литературных данных свидетельствуют в пользу того, что ДНК-гликозилазы формируют контакты с Pol β в ходе осуществления полимеразной реакции в BER, возможно, в составе мультипротеиновых комплексов («репарасом»).

4. Публикации по теме диссертации

- [1] A.S. Bakman, A.A. Ishchenko, M. Saparbaev, O.S. Fedorova, N.A. Kuznetsov, Pre-steady-state kinetic and mutational insights into mechanisms of endo- and exonuclease DNA processing by mutant forms of human AP endonuclease, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1866 (2022) 130198. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130198>.
- [2] A.S. Bakman, A.A. Kuznetsova, L. V. Yanshole, A.A. Ishchenko, M. Saparbaev, O.S. Fedorova, N.A. Kuznetsov, Fluorescently labeled human apurinic/aprimidinic endonuclease APE1 reveals effects of DNA polymerase β on the APE1–DNA interaction, *DNA Repair (Amst)*. 123 (2023) 103450. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2023.103450>.
- [3] A.S. Bakman, S.S. Boichenko, A.A. Kuznetsova, A.A. Ishchenko, M. Saparbaev, N.A. Kuznetsov, The Impact of Human DNA Glycosylases on the Activity of DNA Polymerase β toward Various Base Excision Repair Intermediates, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 9594. <https://doi.org/10.3390/ijms24119594>.

Тезисы конференций:

- [1] Бакман А.С., Кузнецов Н.А. Анализ влияния аминокислотных замен R177A, R181A, Y171F и H309A на взаимодействие AP-эндонуклеазы человека с ДНК-субстратами. *Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology (PlantGen School 2021) : Young Scientists School*. 2021
- [2] Bakman A., Boichenko S., Fedorova O.S., Kuznetsov N. Using fluorescently labeled proteins to study the interactions of APE1 with DNA and Pol β during the BER pathway. *BGRS/SB-2022, Novosibirsk, Russia*, 2022.

Список литературы

- [1] T. Lindahl, Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature*. 362 (1993) 709–715. <https://doi.org/10.1038/362709a0>.
- [2] E.C. Friedberg, DNA damage and repair, *Nature*. 421 (2003) 436–440. <https://doi.org/10.1038/nature01408>.
- [3] Y.-J. Kim, D. M. Wilson III, Overview of Base Excision Repair Biochemistry, *Curr. Mol. Pharmacol.* 5 (2011) 3–13. <https://doi.org/10.2174/1874467211205010003>.
- [4] D.B. Lombard, K.F. Chua, R. Mostoslavsky, S. Franco, M. Gostissa, F.W. Alt, DNA repair, genome stability, and aging, *Cell*. 120 (2005) 497–512. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.028>.
- [5] K.W. Caldecott, Single-strand break repair and genetic disease, *Nat. Rev. Genet.* 9 (2008) 619–631. <https://doi.org/10.1038/nrg2380>.
- [6] J. Bartkova, Z. Hořejší, K. Koed, A. Krämer, F. Tort, K. Zleger, P. Guldberg, M. Sehested, J.M. Nesland, C. Lukas, T. Orntoft, J. Lukas, J. Bartek, DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis, *Nature*. 434 (2005) 864–870. <https://doi.org/10.1038/nature03482>.
- [7] M. Poletto, A.J. Legrand, G.L. Dianov, DNA Base Excision Repair: The Achilles' Heel of Tumour Cells and their Microenvironment?, *Curr. Pharm. Des.* 23 (2020) 4758–4772. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170710123602>.
- [8] N.A. Moor, O.I. Lavrik, Protein–Protein Interactions in DNA Base Excision Repair, *Biochem.* 83 (2018) 411–422. <https://doi.org/10.1134/S0006297918040120>.
- [9] G.L. Dianov, U. Hübscher, Mammalian base excision repair: The forgotten archangel, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 3483–3490. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt076>.
- [10] P.W. Doetsch, R.P. Cunningham, The enzymology of apurinic/apyrimidinic endonucleases, *Mutat. Res. Repair.* 236 (1990) 173–201. [https://doi.org/10.1016/0921-8777\(90\)90004-O](https://doi.org/10.1016/0921-8777(90)90004-O).
- [11] D.W. Mosbaugh, S.E. Bennett, Uracil-Excision DNA Repair, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 48 (1994) 315–370. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60859-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60859-4).
- [12] Y. Matsumoto, K. Kim, Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase β during DNA repair, *Science* (80-.). 269 (1995) 699–702. <https://doi.org/10.1126/science.7624801>.
- [13] C.E. Piersen, R. Prasad, S.H. Wilson, R.S. Lloyd, Evidence for an imino intermediate in the DNA polymerase β deoxyribose phosphate excision reaction, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 17811–17815. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.17811>.
- [14] D.K. Srivastava, B.J. Vande Berg, R. Prasad, J.T. Molina, W.A. Beard, A.E. Tomkinson, S.H. Wilson, Mammalian abasic site base excision repair: Identification of the reaction sequence and rate-determining steps, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 21203–21209. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.33.21203>.
- [15] R.A. Nash, K.W. Caldecott, D.E. Barnes, T. Lindahl, XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III, *Biochemistry*. 36 (1997) 5207–5211. <https://doi.org/10.1021/bi962281m>.
- [16] E. Cappelli, R. Taylor, M. Cevasco, A. Abbondandolo, K. Caldecott, G. Frosina, Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 23970–23975. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.23970>.
- [17] K.W. Caldecott, J.D. Tucker, L.H. Stanker, L.H. Thompson, Characterization of the XRCC1-DNA ligase III complex in vitro and its absence from mutant hamster cells, *Nucleic Acids Res.* 23 (1995) 4836–4843. <https://doi.org/10.1093/nar/23.23.4836>.
- [18] S. Boiteux, J.P. Radicella, The human OGG1 gene: Structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis, *Arch. Biochem. Biophys.* 377 (2000) 1–8. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1773>.

- [19] R. Aspinwall, D.G. Rothwell, T. Roldan-Arjona, C. Anselmino, C.J. Ward, J.P. Cheadle, J.R. Sampson, T. Lindahl, P.C. Harris, I.D. Hickson, Cloning and characterization of a functional human homolog of Escherichia coli endonuclease III, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 109–114. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.1.109>.
- [20] L. Wiederhold, J.B. Leppard, P. Kedar, F. Karimi-Busheri, A. Rasouli-Nia, M. Weinfeld, A.E. Tomkinson, T. Izumi, R. Prasad, S.H. Wilson, S. Mitra, T.K. Hazra, AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells, *Mol. Cell.* 15 (2004) 209–220. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.003>.
- [21] P. Liu, L. Qian, J.-S. Sung, N.C. de Souza-Pinto, L. Zheng, D.F. Bogenhagen, V.A. Bohr, D.M. Wilson, B. Shen, B. Demple, Removal of Oxidative DNA Damage via FEN1-Dependent Long-Patch Base Excision Repair in Human Cell Mitochondria, *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 4975–4987. <https://doi.org/10.1128/mcb.00457-08>.
- [22] E.M. Fielden, Radiation damage to DNA: techniques, quantitation and mechanisms. Bowness-on-Windermere, Lake District, United Kingdom, April 19-24, 1997., in: *Radiat. Res.*, 1997: pp. 481–522. <https://doi.org/10.2307/3579326>.
- [23] S.F. El-Khamisy, K.W. Caldecott, TDP1-dependent DNA single-strand break repair and neurodegeneration, *Mutagenesis.* 21 (2006) 219–224. <https://doi.org/10.1093/mutage/gel024>.
- [24] F.C. Ledesma, S.F. El Khamisy, M.C. Zuma, K. Osborn, K.W. Caldecott, A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage, *Nature.* 461 (2009) 674–678. <https://doi.org/10.1038/nature08444>.
- [25] I. Ahel, U. Rass, S.F. El-Khamisy, S. Katyal, P.M. Clements, P.J. McKinnon, K.W. Caldecott, S.C. West, The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates, *Nature.* 443 (2006) 713–716. <https://doi.org/10.1038/nature05164>.
- [26] B. Demple, L. Harrison, Repair of oxidative damage to DNA: Enzymology and biology, *Annu. Rev. Biochem.* 63 (1994) 915–948. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.004411>.
- [27] M. Weinfeld, R.S. Mani, I. Abdou, R.D. Aceytuno, J.N.M. Glover, Tidying up loose ends: The role of polynucleotide kinase/phosphatase in DNA strand break repair, *Trends Biochem. Sci.* 36 (2011) 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.01.006>.
- [28] S.F. El-Khamisy, G.M. Saifi, M. Weinfeld, F. Johansson, T. Helleday, J.R. Lupski, K.W. Caldecott, Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1, *Nature.* 434 (2005) 108–113. <https://doi.org/10.1038/nature03314>.
- [29] Y. Matsumoto, K. Kim, D.F. Bogenhagen, Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair, *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 6187–6197. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.9.6187-6197.1994>.
- [30] T. Lindahl, M.S. Satoh, G. Dianov, Enzymes acting at strand interruptions in DNA., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 347 (1995) 57–62. <https://doi.org/10.1098/rstb.1995.0009>.
- [31] G. Frosina, P. Fortini, O. Rossi, F. Carrozzino, G. Raspaglio, L.S. Cox, D.P. Lane, A. Abbondandolo, E. Dogliotti, Two pathways for base excision repair in mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 9573–9578. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.16.9573>.
- [32] A. Klungland, T. Lindahl, Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: Reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1), *EMBO J.* 16 (1997) 3341–3348. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.11.3341>.
- [33] C.D. Mol, T. Izumi, S. Mitra, J.A. Tainer, DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 DNA repair and coordination, *Nature.* 403 (2000) 451–456. <https://doi.org/10.1038/35000249>.
- [34] S.T. Mundle, M.H. Fattal, L.F. Melo, J.D. Coriolan, N.E. O'Regan, P.R. Strauss, Novel role of tyrosine in catalysis by human AP endonuclease 1, *DNA Repair (Amst).* 3 (2004)

- 1447–1455. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.06.009>.
- [35] S.E. Tsutakawa, D.S. Shin, C.D. Mol, T. Izumi, A.S. Arvai, A.K. Mantha, B. Szczesny, I.N. Ivanov, D.J. Hosfield, B. Maiti, M.E. Pique, K.A. Frankel, K. Hitomi, R.P. Cunningham, S. Mitra, J.A. Tainer, Conserved structural chemistry for incision activity in structurally non-homologous apurinic/aprimidinic endonuclease APE1 and endonuclease IV DNA repair enzymes, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 8445–8455. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.422774>.
- [36] R.L. Maher, L.B. Bloom, Pre-steady-state kinetic characterization of the AP endonuclease activity of human AP endonuclease 1, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 30577–30585. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704341200>.
- [37] J.P. Erzberger, D.M. Wilson 3rd, D.M. Wilson, The role of Mg²⁺ and specific amino acid residues in the catalytic reaction of the major human abasic endonuclease: New insights from EDTA-resistant incision of acyclic abasic site analogs and site-directed mutagenesis, *J. Mol. Biol.* 290 (1999) 447–457. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2888>.
- [38] W.-C.C. Kim, B.R. Berquist, M. Chohan, C. Uy, D.M. Wilson, C.H. Lee, Characterization of the endoribonuclease active site of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1, *J. Mol. Biol.* 411 (2011) 960–971. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.06.050>.
- [39] I. V. Alekseeva, A.S. Bakman, Y.N. Vorobjev, O.S. Fedorova, N.A. Kuznetsov, Role of Ionizing Amino Acid Residues in the Process of DNA Binding by Human AP Endonuclease 1 and in Its Catalysis, *J. Phys. Chem. B.* 123 (2019) 9546–9556. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b07150>.
- [40] M.A. Gorman, S. Morera, D.G. Rothwell, E. de La Fortelle, C.D. Mol, J.A. Tainer, I.D. Hickson, P.S. Freemont, The crystal structure of the human DNA repair endonuclease HAP1 suggests the recognition of extra-helical deoxyribose at DNA abasic sites, *EMBO J.* 16 (1997) 6548–6558. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.21.6548>.
- [41] S.T. Mundle, J.C. Delaney, J.M. Essigmann, P.R. Strauss, Enzymatic mechanism of human apurinic/aprimidinic endonuclease against a THF AP site model substrate, *Biochemistry.* 48 (2009) 19–26. <https://doi.org/10.1021/bi8016137>.
- [42] B.D. Freudenthal, W.A. Beard, M.J. Cuneo, N.S. Dyrkheeva, S.H. Wilson, Capturing snapshots of APE1 processing DNA damage, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22 (2015) 924–931. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3105>.
- [43] S.R. Peddi, R. Chattopadhyay, C.V. V. Naidu, T. Izumi, The human apurinic/aprimidinic endonuclease-1 suppresses activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 induced by DNA single strand breaks, *Toxicology.* 224 (2006) 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.04.025>.
- [44] N.A. Timofeyeva, V. V. Koval, D.G. Knorre, D.O. Zharkov, M.K. Saparbaev, A.A. Ishchenko, O.S. Fedorova, Conformational dynamics of human ap endonuclease in base excision and nucleotide incision repair pathways, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 26 (2009) 637–652. <https://doi.org/10.1080/07391102.2009.10507278>.
- [45] L.Y. Kanazhevskaya, V. V. Koval, D.O. Zharkov, P.R. Strauss, O.S. Fedorova, Conformational transitions in human AP endonuclease 1 and its active site mutant during abasic site repair, *Biochemistry.* 49 (2010) 6451–6461. <https://doi.org/10.1021/bi100769k>.
- [46] O.S. Alekseeva, I.V. Davletgildeeva, A.T. Arkova, O.V. Kuznetsov, N.A. Fedorova, The impact of single-nucleotide polymorphisms of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 on specific DNA binding and catalysis, *Biochimie.* 163 (2019) 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.05.015>.
- [47] A.D. Miroshnikova, A.A. Kuznetsova, Y.N. Vorobjev, N.A. Kuznetsov, O.S. Fedorova, Effects of mono- and divalent metal ions on DNA binding and catalysis of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1, *Mol. Biosyst.* 12 (2016) 1527–1539. <https://doi.org/10.1039/c6mb00128a>.
- [48] A.D. Miroshnikova, A.A. Kuznetsova, N.A. Kuznetsov, O.S. Fedorova, Thermodynamics of damaged DNA binding and catalysis by human AP endonuclease 1, *Acta Naturae.* 8

- (2016) 103–110. <https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-1-103-110>.
- [49] N.A. Kuznetsov, M.S. Kupryushkin, T. V. Abramova, A.A. Kuznetsova, A.D. Mirosnikova, D.A. Stetsenko, D. V. Pyshnyi, O.S. Fedorova, New oligonucleotide derivatives as unreactive substrate analogues and potential inhibitors of human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1, *Mol. Biosyst.* 12 (2015) 67–75. <https://doi.org/10.1039/c5mb00692a>.
- [50] O.A. Krumkacheva, G.Y. Shevelev, A.A. Lomzov, N.S. Dyrkheeva, A.A. Kuzhelev, V. V Koval, V.M. Tormyshev, Y.F. Polienko, M. V Fedin, D. V Pyshnyi, O.I. Lavrik, E.G. Bagryanskaya, DNA complexes with human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1: Structural insights revealed by pulsed dipolar EPR with orthogonal spin labeling, *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) 7767–7780. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz620>.
- [51] A.T. Raper, B.A. Maxwell, Z. Suo, Dynamic Processing of a Common Oxidative DNA Lesion by the First Two Enzymes of the Base Excision Repair Pathway, *J. Mol. Biol.* 433 (2021) 166811. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166811>.
- [52] I. V. Alekseeva, A.A. Kuznetsova, A.S. Bakman, O.S. Fedorova, N.A. Kuznetsov, The role of active-site amino acid residues in the cleavage of DNA and RNA substrates by human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1864 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129718>.
- [53] R.A.O. Bennett, D.M. Wilson, D. Wong, B. Demple, Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase β in the base excision repair pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 7166–7169. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7166>.
- [54] D. Wong, B. Demple, Modulation of the 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase and DNA synthesis activities of mammalian DNA polymerase β by apurinic/apyrimidinic endonuclease 1, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 25268–25275. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400804200>.
- [55] Y. Liu, R. Prasad, W.A. Beard, P.S. Kedar, E.W. Hou, D.D. Shock, S.H. Wilson, Coordination of steps in single-nucleotide base excision repair mediated by apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase β , *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 13532–13541. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611295200>.
- [56] O.A. Kladova, I. V. Alekseeva, M. Saparbaev, O.S. Fedorova, N.A. Kuznetsov, Modulation of the apurinic/apyrimidinic endonuclease activity of human APE1 and of its natural polymorphic variants by base excision repair proteins, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21197147>.
- [57] R. Prasad, W.A. Beard, V.K. Batra, Y. Liu, D.D. Shock, S.H. Wilson, A review of recent experiments on step-to-step “hand-off” of the DNA intermediates in mammalian base excision repair pathways, *Mol. Biol.* 45 (2011) 536–550. <https://doi.org/10.1134/S0026893311040091>.
- [58] P.B. Balbo, E.C.W. Wang, M.D. Tsai, Kinetic mechanism of active site assembly and chemical catalysis of DNA polymerase β , *Biochemistry.* 50 (2011) 9865–9875. <https://doi.org/10.1021/bi200954r>.
- [59] M. Bakhtina, M.P. Roettger, S. Kumar, M.D. Tsai, A unified kinetic mechanism applicable to multiple DNA polymerases, *Biochemistry.* 46 (2007) 5463–5472. <https://doi.org/10.1021/bi700084w>.
- [60] C.A. Dunlap, M.D. Tsai, Use of 2-aminopurine and tryptophan fluorescence as probes in kinetic analyses of DNA polymerase β , *Biochemistry.* 41 (2002) 11226–11235. <https://doi.org/10.1021/bi025837g>.
- [61] M. Akbari, M. Otterlei, J. Diaz-Peña, P.A. Aas, B. Kavli, N.B. Liabakk, L. Hagen, K. Imai, A. Durandy, G. Slupphaug, H.E. Krokan, Repair of U/G and U/A in DNA by UNG2-associated repair complexes takes place predominantly by short-patch repair both in proliferating and growth-arrested cells, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 5486–5498. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh872>.
- [62] E.K. Braithwaite, P.S. Kedar, D.J. Stumpo, B. Bertocci, J.H. Freedman, L.D. Samson,

- S.H. Wilson, DNA polymerases β and λ mediate overlapping and independent roles in base excision repair in mouse embryonic fibroblasts, PLoS One. 5 (2010) e12229. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012229>.
- [63] M.L. Hegde, P.M. Hegde, D. Arijit, I. Boldogh, S. Mitra, Human DNA glycosylase NEIL1's interactions with downstream repair proteins is critical for efficient repair of oxidized DNA base damage and enhanced cell survival, Biomolecules. 2 (2012) 564–578. <https://doi.org/10.3390/biom2040564>.
- [64] A. Das, L. Wiederhold, J.B. Leppard, P. Kedar, R. Prasad, H. Wang, I. Boldogh, F. Karimi-Busheri, M. Weinfeld, A.E. Tomkinson, S.H. Wilson, S. Mitra, T.K. Hazra, NEIL2-initiated, APE-independent repair of oxidized bases in DNA: Evidence for a repair complex in human cells, DNA Repair (Amst). 5 (2006) 1439–1448. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.07.003>.

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Бакман Артемий Сергеевич

Проверяющий: Гапонова Светлана Константиновна

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://users.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 14
Начало загрузки: 11.09.2023 12:57:22
Длительность загрузки: 00:01:13
Имя исходного файла: ВКР-Бакман_без
ссылок.docx
Название документа: ВКР-Бакман_без
ссылок
Размер текста: 51 кБ
Символов в тексте: 52186
Слов в тексте: 6753
Число предложений: 310
Способ извлечения текста: OCR

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Начало проверки: 11.09.2023 12:58:37
Длительность проверки: 00:00:47
Комментарии: не указано
Поиск с учетом редактирования: да
Модули поиска: ИПС Адилет, Библиография, Сводная коллекция ЭБС, Интернет
Плюс*, Сводная коллекция РГБ, Цитирование, Переводные заимствования (RuEn),
Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu), Переводные заимствования
по eLIBRARY.RU (KkRu), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (KyRu),
Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика, Переводные
заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Переводные
заимствования по Интернету (EnRu), Переводные заимствования по Интернету
(KkRu), Переводные заимствования по Интернету (KyRu), Переводные
заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Переводные
заимствования (KkEn), Переводные заимствования (KyEn), Переводные
заимствования издательства Wiley, eLIBRARY.RU, СПС ГАРАНТ: аналитика, СПС
ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, IEEE, Медицина, Диссертации НББ,
Коллекция НБУ, Перефразирования по eLIBRARY.RU, Перефразирования по СПС
ГАРАНТ: аналитика, Перефразирования по Интернету, Перефразирования по
Интернету (EN), Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в
английском сегменте, Перефразированные заимствования по коллекции
Интернет в русском сегменте, Перефразирования по коллекции издательства
Wiley, Патенты СССР, РФ, СНГ, СМИ России и СНГ, Шаблонные фразы, Кольцо
вузов, Издательство Wiley, Переводные заимствования



СОВПАДЕНИЯ	САМОЦИТИРОВАНИЯ	ЦИТИРОВАНИЯ	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
10,34%	0%	0%	89,66%

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.

Самоцитирование — 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.

Цитирование — 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.

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

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.

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте	Комментарии
[01]	3,72%	3,72%	kuznetsov_autoref.pdf http://niboch.nsc.ru	25 Мая 2021	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	8	8	
[02]	1,92%	1,43%	Конформационная динамика ДНК-гл... http://niboch.nsc.ru	11 Июл 2020	Интернет Плюс*	16	22	
[03]	1,4%	1,4%	endutkin_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	31 Мая 2021	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	3	3	
[04]	0,82%	0,82%	DAG2019_AbstractBook_Vol209122019.... http://rusbiochem.org	11 Мая 2021	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	2	2	
[05]	0,8%	0,47%	https://publ.icgbio.ru/wp-content/uplo... https://publ.icgbio.ru	25 Янв 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	1	2	

[06]	0,79%	0%	kuznetsov_autoref.pdf http://niboch.nsc.ru	25 Мая 2021	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[07]	0,77%	0,33%	https://publ.icgbio.ru/wp-content/uplo... https://publ.icgbio.ru	25 Янв 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	1	2	
[08]	0,73%	0,73%	DAG2019_AbstractBook_Vol209122019.... http://rusbiochem.org	11 Мая 2021	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	1	1	
[09]	0,72%	0%	Acta Naturae. 2017. Т. 9, № 1(32) http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[10]	0,57%	0%	http://www.eimb.ru/dissovet/2016-12-2... http://eimb.ru	29 Окт 2019	Интернет Плюс*	0	7	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[11]	0,49%	0%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	0	7	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[12]	0,49%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch.... http://niboch.nsc.ru	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[13]	0,49%	0,49%	БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИ... http://elibrary.ru	19 Янв 2018	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	1	
[14]	0,48%	0,48%	Термодинамика конформационных ... https://spravochnick.ru	11 Янв 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	1	1	
[15]	0,46%	0%	Природные каталитические иммуног... https://vak.minobrnauki.gov.ru	02 Апр 2021	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[16]	0,46%	0,46%	857-24-PB.pdf http://actanaturae.ru	04 Июн 2021	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	1	1	
[17]	0,43%	0%	Молекулярные механизмы деяния си... http://ref365.ru	31 Мая 2016	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[18]	0,42%	0%	ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АПУРИНО... http://elibrary.ru	31 Авг 2007	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[19]	0,37%	0%	Технология микроволнового обезво... http://diss.natlib.uz	23 Июл 2021	Коллекция НБУ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[20]	0,34%	0%	Ермаков, Евгений Александрович Пр... http://dlib.rsl.ru	16 Июн 2021	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[21]	0,31%	0%	Поиск поврежденных участков ДНК ... https://spravochnick.ru	31 Окт 2022	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[22]	0,31%	0%	Поиск поврежденных участков ДНК ... http://elibrary.ru	03 Янв 2017	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[23]	0,31%	0%	КОНФОРМАЦИОННАЯ ДИНАМИКА И ... http://elibrary.ru	15 Янв 2011	eLIBRARY.RU	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[24]	0,31%	0%	Особенности взаимодействия аденин... http://elibrary.ru	01 Янв 2017	eLIBRARY.RU	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[25]	0,3%	0%	не указано http://ivo.garant.ru	03 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[26]	0,3%	0%	не указано http://ivo.garant.ru	03 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[27]	0,3%	0%	Экраны электромагнитного излучени... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[28]	0,3%	0%	не указано http://ivo.garant.ru	04 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[29]	0,3%	0%	Interpretation of radioimpedance soun... https://ieeexplore.ieee.org	04 Ноя 2013	IEEE	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[30]	0,3%	0%	Способ получения наноразмерной с... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[31]	0,3%	0%	Способ очистки вируса осповакцины ... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[32]	0,3%	0%	Средство для нейтрализации вируса н... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[33]	0,3%	0%	https://rscf.ru/upload/iblock/d56/d56cd... https://rscf.ru	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[34]	0,3%	0%	Экспертиза в российском законодате... http://studentlibrary.ru	27 Ноя 2017	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[35]	0,3%	0%	Поздравляем директора Российско-а... http://barnaul.bezformata.com	17 Авг 2019	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[36]	0,3%	0%	Распоряжение Правительства РФ от 2... http://ivo.garant.ru	30 Июн 2022	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	0,3%	0%	Распоряжение Правительства РФ от 2... http://ivo.garant.ru	04 Мая 2021	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[38]	0,3%	0%	Распоряжение Правительства РФ от 2... http://ivo.garant.ru	27 Фев 2021	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[39]	0,3%	0%	Распоряжение Правительства РФ от 2... http://ivo.garant.ru	02 Авг 2021	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[40]	0,3%	0%	T. 2 http://emll.ru	08 Июл 2017	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	0,3%	0%	Экспертиза в российском законодате... http://studentlibrary.ru	19 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[42]	0,3%	0%	Теоретические основы новых направ... http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	0,29%	0%	ПРИМЕНЕНИЕ ПИРРОЛОЦИТОЗИНА ... http://elibrary.ru	05 Авг 2015	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[44]	0,26%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch.... http://niboch.nsc.ru	25 Мая 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[45]	0,25%	0%	Медицинский алфавит 26 / 2017, том 3... https://docplayer.ru	12 Сен 2019	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[46]	0,25%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch.... http://niboch.nsc.ru	11 Apr 2022	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[47]	0,25%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch.... http://niboch.nsc.ru	26 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[48]	0,24%	0%	Серпокрылова, Инна Юрьевна Конъ... http://dlib.rsl.ru	07 Мар 2012	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[49]	0,21%	0%	Мазунин, Илья Олегович Анализ изм... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2010	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[50]	0,21%	0%	Противоопухолевое средство тритер... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	0,2%	0%	List of abstracts accepted for publication https://bgrssb.icgbio.ru	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	0,19%	0%	ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГИБР... http://elibrary.ru	30 Авг 2014	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	0,19%	0%	ru:education:postgraduate:students:cn... http://niboch.nsc.ru	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	0,19%	0%	ru:education:postgraduate:students:cn... http://niboch.nsc.ru	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	0,19%	0%	Горбунова, Марина Георгиевна "Эпи... http://dlib.rsl.ru	30 Июл 2012	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	0,17%	0%	Журнал СТМ - Html View - Официальн... http://stm-journal.ru	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[57]	0,15%	0%	Научно-технологическая проектная ... https://sochisiri.ru	14 Авг 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	0,15%	0%	https://diss.gpi.ru/media/diss/37/disser... https://diss.gpi.ru	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	0,12%	0%	http://www.sifibr.irk.ru/images/avtorefe... http://sifibr.irk.ru	17 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	0,1%	0%	http://rcpcm.org/wp-content/uploads/... http://rcpcm.org	28 Янв 2022	Интернет Плюс*	0	1	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

Бакман Артемий Сергеевич

«Кинетические особенности белок-белковых взаимодействий ферментов
эксцизионной репарации оснований ДНК»

Оригинальность работы составляет 89.66%, 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. Гапонова