

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН**

На правах рукописи

Алексеева Ирина Владимировна

**Полиморфизмы белков-участников эксцизионной репарации оснований:
влияние на активность отдельных ферментов и их взаимную регуляцию**

1.5.4 – биохимия

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Научный руководитель:
д.х.н. Н.А. Кузнецов

НОВОСИБИРСК – 2024

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
1. Влияние природных полиморфизмов ферментов эксцизионной репарации оснований (BER) на их каталитическую эффективность и процессы белок-белковых взаимодействий (Обзор литературы)	11
<i>1.1. Эксцизионная репарация оснований</i>	<i>11</i>
<i>1.2. Полиморфизмы ДНК-гликозилаз</i>	<i>13</i>
<i>1.2.1.8 Оксогуанин-ДНК-гликозилаза (OGG1)</i>	<i>13</i>
<i>1.2.2. Аденин-ДНК-гликозилаза MUTYH.....</i>	<i>17</i>
<i>1.2.3. Урацил/тимин-ДНК-гликозилазы (UNG, SMUG1, TDG и MBD4)</i>	<i>19</i>
<i>1.2.4. Алкиладенин-ДНК-гликозилаза (AAG)</i>	<i>26</i>
<i>1.2.5. NEI-подобные ДНК-гликозилазы (NEIL1, NEIL2 и NEIL 3) и эндонуклеаза III hNTH1</i>	<i>28</i>
<i>1.3. Полиморфизмы АП-эндонуклеазы 1 (APE1)</i>	<i>32</i>
<i>1.4. Полиморфизмы ДНК-полимеразы β (POL β)</i>	<i>41</i>
<i>1.5. Полиморфизмы ДНК-лигазы (LigIIIα) и XRCC1</i>	<i>46</i>
<i>1.6. Заключение</i>	<i>48</i>
2. Материалы и методы	50
<i>2.1. Растворы и реагенты</i>	<i>50</i>
<i>2.2. Введение ³²P-метки в олигодезоксирибонуклеотиды</i>	<i>52</i>
<i>2.3. Зависимость степени расщепления специфического F/G-субстрата мутантными формами APE1 и его диким типом</i>	<i>53</i>
<i>2.4. Регистрация накопления продукта гидролиза фосфодиэфирной связи FRET-F(1)-субстрата мутантными формами APE1, содержащими замены в активном центре, методом гель-электрофореза</i>	<i>53</i>
<i>2.5. Регистрация накопления продуктов гидролиза фосфодиэфирной связи ДНК-субстратов ферментами SMUG1 и MBD4^{cat} методом гель-электрофореза</i>	<i>54</i>
<i>2.6. Эффективность расщепления ³²P-меченного U/G-субстрата мутантными формами SMUG1 и MBD4^{cat} и их дикими типами в присутствии каталитически неактивной формы APE1 D210N</i>	<i>54</i>
<i>2.7. Сайт направленный мутагенез APE1, SMUG1 и MBD4^{cat}</i>	<i>55</i>
<i>2.8. Выделение и очистка ДНК-гликозилазы AAG и мутантных форм белка APE1.....</i>	<i>56</i>

2.9. Выделение и очистка полиморфных вариантов каталитического домена ДНК-гликозилазы человека <i>MBD4^{cat}</i> , полноразмерной ДНК-гликозилазы <i>SMUG1</i> и ядерного антигена пролиферирующих клеток <i>PCNA</i>	58
2.10. Спектры кругового дихроизма (КД).....	58
2.11. Анализ предстационарной кинетики ферментативных реакций методом «остановленного потока»	59
2.12. Статистическая обработка данных	60
2.13. Приготовление клеточного экстракта	62
2.14. Определение чувствительности ДНК-зондов на очищенных препаратах ферментов	63
2.15. Определение оптимального для анализа количества белка в клеточном экстракте	63
2.16. Определение активности ферментов <i>BER</i> в клеточном экстракте	64
3. Результаты и их обсуждение	65
3.1. Анализ влияния замен аминокислотных остатков активного центра <i>APE1</i> в составе мутантных форм <i>D210N</i> , <i>N212A</i> , <i>T268D</i> , <i>M270A</i> и <i>D308A</i> на скорость и эффективность узнавания, связывания и превращения специфических субстратов	65
3.1.1. Определение относительной активности мутантных форм <i>APE1</i>	66
3.1.2. Конформационные изменения <i>APE1</i> при взаимодействии с ДНК	68
3.1.3. Конформационные изменения ДНК при взаимодействии с <i>APE1</i>	72
3.2. Анализ роли заряженных аминокислотных остатков в функционировании <i>APE1</i>	78
3.2.1. Влияние pH на конформацию белка <i>APE1</i>	80
3.2.2. Влияние pH на связывание ДНК и катализ	81
3.3. Анализ влияния полиморфизмов <i>APE1</i> на процессы связывания, узнавания и катализа	85
3.3.1. Анализ структуры SNP вариантов <i>APE1</i> с помощью метода КД-спектроскопии ..	86
3.3.2. Определение относительной активности SNP вариантов <i>APE1</i>	87
3.3.3. Конформационная динамика взаимодействия <i>APE1</i> дикого типа и его SNP вариантов с ДНК-субстратом	88
3.3.4. Конформационные изменения поврежденной ДНК, индуцированные <i>APE1</i> дикого типа и SNP вариантами	92
3.4. Анализ влияния SNP-ассоциированных замен <i>APE1</i> на регуляцию активности фермента другими участниками <i>BER</i>	95

3.5. Анализ влияния полиморфизмов ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4^{cat} на процессы взаимодействия с ДНК-субстратом	100
3.5.1. Анализ активности SNP вариантов SMUG1 и MBD4 ^{cat} методом разделения продуктов в ПААГ	102
3.5.2. Анализ кинетики образования фермент-субстратных комплексов методом «остановленного потока»	104
3.5.3. Влияние APE1 на активность SNP вариантов SMUG1 и MBD4 ^{cat}	107
3.6. Апробация тест-системы определения активности ключевых ферментов-участников пути BER в клеточных экстрактах	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	118
ВЫВОДЫ	121
Список используемых сокращений	123
Список литературы	125

Введение

Клеточная ДНК постоянно подвергается воздействию различных эндогенных и экзогенных факторов, которые неизбежно приводят к повреждению ДНК: структурным и химическим модификациям первичной последовательности ДНК (рис. 1). Генерация активных форм кислорода (АФК), поддерживаемая аэробным дыханием, приводит к образованию гидроксильных радикалов, супероксид анионов, перекиси водорода и других форм, которые являются основными источниками эндогенного повреждения ДНК. Идентифицировано около 80 различных типов повреждений азотистых оснований и сахаров, индуцированных АФК [1]. Свободные радикалы могут прямо или косвенно повредить азотистые основания и остатки сахаров в ДНК. Помимо эндогенного окислительного стресса, клетки также подвергаются воздействию других химически активных веществ, в том числе канцерогенов, которые индуцируют более объемные аддукты ДНК. Эти повреждения ДНК, как правило, эффективно удаляются системами репарации ДНК, но, тем не менее, могут обладать мутагенными или генотоксическими свойствами. Накопление повреждений в ДНК в конечном итоге может приводить к возникновению мутаций. В связи с этим согласованное действие ферментов репарации ДНК, способных распознавать и удалять повреждения из ДНК и, таким образом, нивелировать пагубное воздействие всех этих факторов, является важнейшим клеточным процессом.

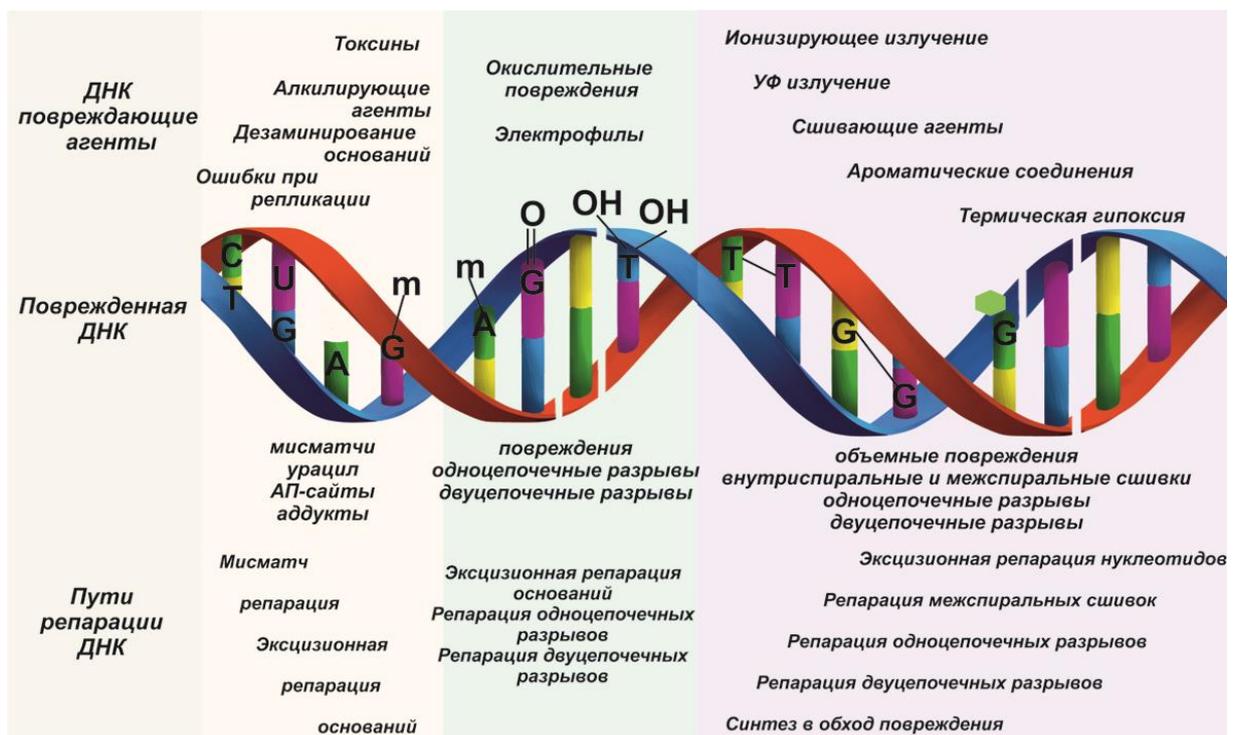


Рис. 1. Схема возможных путей репарации ДНК, вызванных различными повреждающими агентами, по данным обзора [2] с дополнениями.

Существует по меньшей мере пять основных путей репарации ДНК: (1) эксцизионная репарация оснований (BER), ответственная за поиск, распознавание и удаление необъемных повреждений, таких как окисленные и алкилированные азотистые основания, урацил в ДНК, апуриновые/апиримидиновые (АП) сайты; (2) эксцизионная репарация нуклеотидов (NER), отвечающая за репарацию объемных повреждений ДНК, таких как пиримидиновые димеры, аддукты азотистых оснований с ароматическими соединениями; (3) мисматч репарация (MMR) распознает и удаляет неправильно спаренные азотистые основания, (4) гомологичная рекомбинация (HR) и (5) негомологичная рекомбинация концов (NHEJ) отвечают за удаление двойных разрывов в ДНК [2]. Все эти пути репарации активируются на разных стадиях клеточного цикла, позволяя клеткам восстанавливать поврежденную ДНК. Эти процессы восстановления являются ключевыми для поддержания генетической стабильности в клетках.

По пути BER удаляется большинство необъемных повреждений азотистых оснований и АП-сайты [3,4]. Для репарации одного повреждения требуются согласованные действия как минимум 4 ферментов: специфической ДНК-гликозилазы, АП-эндонуклеазы, ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы [5]. Поэтому правильное функционирование ферментов BER является залогом сохранения генетической информации и защищает клетку от негативных последствий повреждения ДНК. На сегодняшний день не остается сомнений, что повреждения ДНК играют важную роль в возникновении различных заболеваний, среди которых можно отметить онкологические, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные и другие. Однако, у человека уменьшение общего уровня репарационной активности в процессе BER может быть вызвано природными однонуклеотидными полиморфизмами в генах ферментов репарации ДНК. Действительно, на сегодняшний день известно о существовании в человеческой популяции большого количества полиморфных вариантов (SNP) ферментов репарации, которые могут влиять на эффективность всего процесса BER [6]. Литературные данные [7] свидетельствуют о том, что аминокислотные замены, связанные с SNP, могут приводить не только к ухудшению функциональной активности конкретного фермента, но и быть причиной нарушения белок-белковых взаимодействий с другими участниками BER. В настоящее время взаимосвязь между SNP и этиологией некоторых заболеваний человека остается открытой областью исследований. При этом один из актуальных вопросов заключается в выяснении роли SNPs в предрасположенности к развитию различных заболеваний.

Следует отметить, что к моменту начала данной работы имелись данные как о структурах ключевых ферментов BER, так и о наборе SNP в генах данных ферментов. Однако в литературе практически отсутствовали данные о каталитических свойствах отдельных ферментов, содержащих SNP-ассоциированные замены аминокислотных остатков. Кроме того, сложность

определения взаимосвязи между отдельными полиморфизмами в генах ферментов репарации и их эффектом на репарационную способность заключается в том, что SNP-ассоциированные замены аминокислотных остатков могут приводить как к потере функциональных свойств самих ферментов, так и нарушению их координации с другими участниками процесса репарации. Поэтому детальное изучение этих аспектов представляет собой важную фундаментальную задачу.

В связи с этим **цель данной работы** заключалась в установлении влияния на постадийный механизм функционирования ряда природных и искусственных замен аминокислотных остатков ферментов эксцизионной репарации оснований ДНК человека на примере ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4 и АП-эндонуклеазы APE1.

В ходе исследования решались следующие **задачи**:

- определить влияние замен аминокислотных остатков активного центра APE1 в составе мутантных форм D210N, N212A, T268D, M270A и D308A на скорость и эффективность узнавания, связывания и превращения модельных ДНК-субстратов;
- установить роль ионизованных аминокислотных остатков активного центра APE1 в процессах образования каталитического комплекса и протекания реакции гидролиза фосфодиэфирной связи;
- провести анализ влияния замен аминокислотных остатков APE1 человека (R221C, N222H, R237A, G241R, M270T, R274Q, P311S), ассоциированных с природными однонуклеотидными полиморфизмами (SNPs), на взаимодействие с ДНК;
- определить эффект замен, ассоциированных с природными SNPs, на регуляцию активности APE1 другими участниками процесса эксцизионной репарации оснований, а именно ДНК-гликозилазами OGG1, UNG2 и AAG, ДНК-полимеразой POL β и белковыми факторами XRCC1 и PCNA;
- выявить влияние ряда природных SNP урацил-ДНК-гликозилаз человека SMUG1 (G90C, P240H, N244S и N248Y) и MBD4^{cat} (S470L, G507S, R512W и H557D) на процессы формирования фермент-субстратного комплекса, катализ и регуляцию их активности АП-эндонуклеазой APE1;
- провести апробацию методики определения активности ключевых ДНК-гликозилаз и АП-эндонуклеазы 1 человека в клеточных экстрактах раковых линий клеток человека.

Положения, выносимые на защиту

1) Аминокислотные остатки активного центра APE1 выполняют определенные функции в процессе связывания АП-сайт-содержащего ДНК-субстрата и каталитического гидролиза фосфодиэфирной связи: Thr268 критически важен на этапе связывания ДНК и формирования каталитически-компетентного комплекса; Asn212 имеет решающее значение для стадии изгибания ДНК и катализа; Asp210, помимо катализа, играет важную роль на этапе связывания ДНК-субстрата; Asp308, ответственный за координацию иона Mg^{2+} , также принимает участие на этапе связывания ДНК-субстрата; Met270, участвующий в стабилизации вывернутого состояния поврежденного нуклеотида в активном центре фермента, важен на этапе формирования каталитического фермент-субстратного комплекса.

2) Скорость протекания стадий узнавания повреждения, формирования фермент-субстратного комплекса и катализа зависит от pH среды и увеличивается с увеличением значения pH. Ключевыми аминокислотными остатками АП-эндонуклеазы 1 человека, выполняющими каталитическую стадию гидролиза фосфодиэфирной связи в ДНК-субстрате, являются Tyr171 и His309. Функциональные роли His309 и Tyr171 находятся под контролем ионизированных состояний этих остатков, что может быть молекулярным переключателем между альтернативными каталитическими механизмами, включающими эти остатки в протонированной или депротонированной формах.

3) Ферментативная активность проверенных природных полиморфных вариантов APE1 может быть, как выше, так и ниже активности фермента дикого типа, но не может быть ниже порогового значения, необходимого для поддержания уровня репарации, достаточного для выживания организма. В то же время, природные полиморфизмы ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4 могут приводить к практически полной потере ферментативной активности, что не приводит к негативным последствиям из-за того, что активность данных ДНК-гликозилаз может быть компенсирована за счет других ферментов.

4) Аминокислотные замены ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4 и АП-эндонуклеазы APE1, ассоциированные с природными полиморфизмами, влияют как на их собственную ферментативную активность, так и на взаимную регуляцию их активности другими участниками процесса репарации.

5) Разработанный чувствительный флуоресцентный способ тестирования активности ДНК-гликозилаз и АП-эндонуклеазы 1, как ключевых ферментов BER, может быть использован для определения уровня репарационной активности в белковых экстрактах раковых линий клеток человека.

Научная новизна и практическая значимость работы.

В данной работе проведен систематический анализ природных полиморфных вариантов ряда ферментов эксцизионной репарации оснований ДНК, а именно ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4 и АП-эндонуклеазы APE1 человека. Для этого на примере APE1 выполнен детальный анализ активности фермента дикого типа и ряда мутантных форм, содержащих замены потенциально важных аминокислотных остатков в активном центре, позволивший картировать их функциональную роль. Проанализированы данные об известных SNP-ассоциированных вариантах ферментов SMUG1, MBD4 и APE1. Информация об известных однонуклеотидных полиморфизмах была получена из базы данных NCBI dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Особое внимание было уделено полиморфизмам, которые (1) приводили к смене класса аминокислотного остатка, (2) располагались в функционально-важных участках белковой глобулы и (3) встречались в опухолях. Используя эти критерии, в рамках данной работы впервые был отобран ряд SNP-ассоциированных замен аминокислотных остатков для дальнейшего экспериментального анализа каталитических свойств полиморфных вариантов ферментов. В ходе работы были получены рекомбинантные препараты 15 SNP-вариантов ферментов SMUG1, MBD4 и APE1, изучены их ферментативные свойства и проанализировано влияние других участников процесса BER на их активность, что позволило сделать заключение о роли SNP-ассоциированных замен во взаимной регуляции ферментов в процессе репарации ДНК. Разработан способ определения активности ключевых ферментов эксцизионной репарации оснований в белковых экстрактах клеток человека, который был апробирован с использованием шести линий клеток опухоли яичника человека TOV112, 79, OVCAR3, MESOV, SCOV3 и TOV21 и запатентован.

Личный вклад автора. Все представленные в работе результаты получены лично автором или при непосредственном его участии. Автор принимал активное участие в анализе полученных результатов и написании статей.

Публикации и апробации работы. По материалам диссертации опубликовано 6 научных статей, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Получен 1 патент.

Результаты, изложенные в диссертации, были представлены на конференциях: 44^{ом} конгрессе FEBS (Прага, Чехия, 2018), IX Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Дагомыс, 2019), конференции BGRS-SB (Новосибирск, 2020), 45^{ом} конгрессе FEBS (онлайн-конференция, 2021), всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, 2022), всероссийской конференции «От микробиологии к генетическим

технологиям» (Новосибирск, 2023), V Всероссийской конференции «Физико-химическая биология» (Новосибирск, 2024).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 150 страницах, содержит 45 рисунков, 5 схем и 23 таблицы. Библиография включает в себя 278 литературных источников.

1. Влияние природных полиморфизмов ферментов эксцизионной репарации оснований (BER) на их каталитическую эффективность и процессы белок-белкового взаимодействия

(Обзор литературы)

1.1 Эксцизионная репарация оснований

По пути эксцизионной репарации оснований устраняются повреждения, вызванные окислением, дезаминированием, алкилированием и прочие необъемные повреждения, которые не воспринимаются клеткой как значительные искажения спирали ДНК. Схематически представленный на рис. 2 процесс BER может протекать по двум путям – длинно-заплаточный (минорный) путь и коротко-заплаточный (основной) путь и вовлекает множество участников.

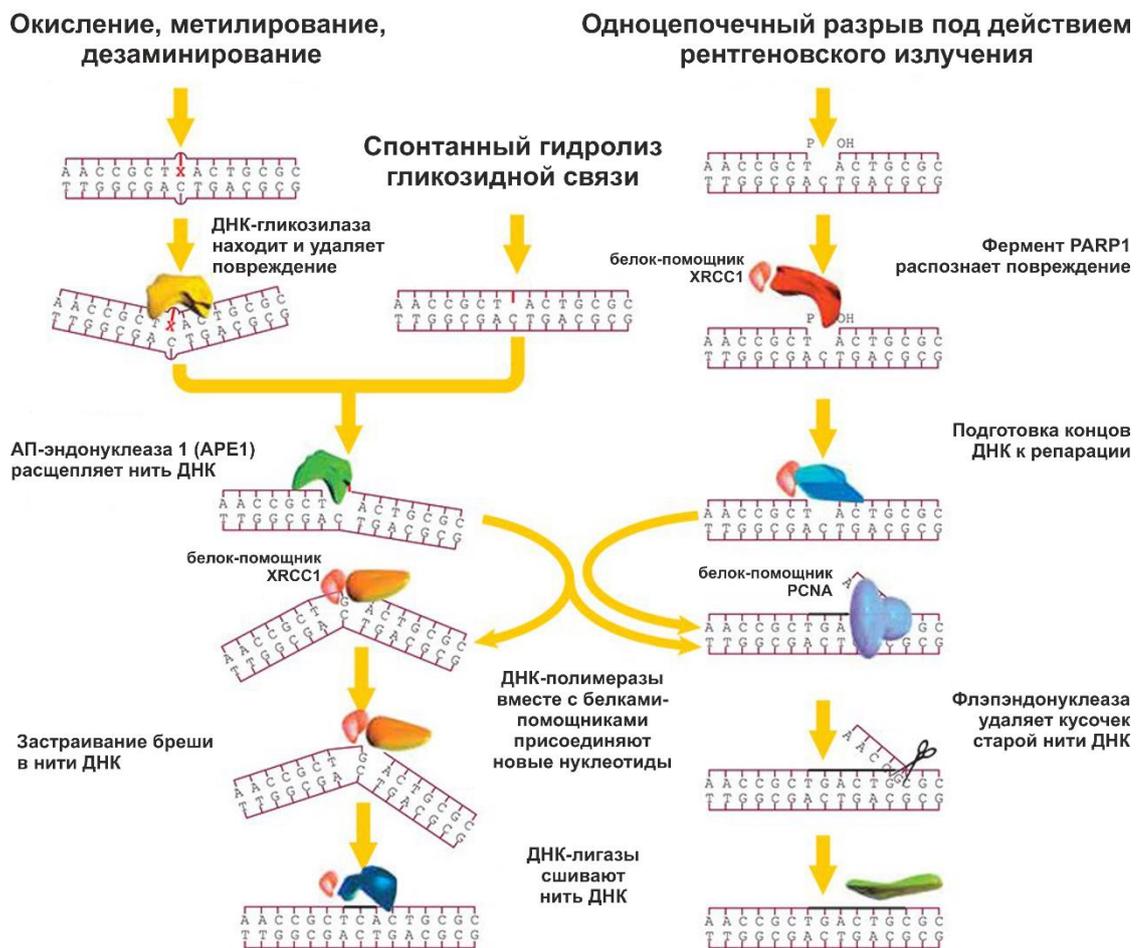


Рис. 2. Схематическое изображение реализации процесса BER в клетках млекопитающих [8].

В процессе эксцизионной репарации оснований «ремонт» поврежденного участка ДНК начинается с распознавания повреждения ДНК-гликозилазой [9]. Для этих целей у млекопитающих существует, как минимум 11 различных ДНК-гликозилаз, задействованных в процессе в зависимости от типа повреждения [10,11] (Таблица 1).

Таблица 1. ДНК гликозилазы млекопитающих

Последующие шаги: гидролиз фосфодиэфирной связи, «обработка» концов, заполнение бреши и лигирование обычно называют «общими шагами», но на самом деле реализуются они по различным механизмам, зависящим от типа гликозилазы и физиологического состояния клетки. Что именно служит сигналом для запуска того или иного пути до сих пор остается предметом дискуссий.

Из литературных данных известно, что мыши нокаутные по ДНК-гликозилазам обычно жизнеспособны и фертильны [12,13]. Исключение составляют нокауты гена тимин-ДНК-гликозилазы (TDG), которые являются смертельными для эмбрионов, вероятно, потому, что TDG также выполняет эпигенетическую функцию в регуляции метилирования ДНК [14,15]. Нефатальный эффект нокаута по одной ДНК-гликозилазе, вероятно, объясняется тем, что одно и то же повреждение может распознаваться различными ДНК-гликозилазами, а также тем, что BER может дублироваться и другими путями репарации. Подтверждением этой гипотезы служит то, что при двойном или тройном нокауте резко снижаются защитные функции особи. Таким образом, у мышей с двойным нокаутом по ДНК-гликозилазам, OGG1 (8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза) и MUTYH (аденин-ДНК-гликозилаза), резко возрастает предрасположенность к раку и наблюдается сокращение продолжительности жизни [16]. Это открытие закономерно, поскольку MUTYH удаляет аденины, которые могут быть неправильно встроены напротив 8-охоG – повреждения, удаляемого 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой. NTHL1 (эндонуклеаза III) и NEIL1/2

Фермент	Локализация в клетке	Моно- / бифункциональность
UNG2	ядро	моно
UNG1	митохондрия	моно
SMUG1	ядро	моно
TDG	ядро	моно
MBD4 (MED1)	ядро	моно
MPG (AAG)	ядро	моно
OGG1	ядро	би
MUTYH	ядро	моно
NTHL1	ядро	би
NEIL1	ядро	би
NEIL2	ядро	би
NEIL3	ядро	би

(эндонуклеаза VIII), которые в основном удаляют окисленные пиримидины и пурины с раскрытым кольцом, имеют перекрывающуюся субстратную специфичность и могут служить в качестве резервных копий друг для друга. При двойном нокауте этих гликозилаз у мышей развиваются опухоли легких и печени [17]. Удивительно, но двойные нокауты по UNG (урацил-ДНК-гликозилазе) и SMUG1 (однонитевой селективной монофункциональной урацил-ДНК-гликозилазе) жизнеспособны без явных особенностей фенотипа. Однако у мышей с тройным нокаутом, дефицитных по урацилгликозилазам UNG, SMUG1 и белку мисматч репарации MSH2, существенно сокращается продолжительность жизни и умирают они в основном от лимфом [18]. Скорее всего, MMR служит одним из возможных вариантов репарации геномного урацила. Все эти результаты свидетельствуют об обширном резерве внутри и между путями эксцизионной репарации оснований.

Необходимо отметить, что на сегодняшний день известно множество различных полиморфизмов, которые, приводят к аминокислотным заменам в различных белках BER, включая ДНК-гликозилазы, APE1, XRCC1 и POL β . Известно также, что полиморфные варианты некоторых белков BER встречаются в опухолях [19,20].

Поскольку BER является хорошо скоординированным путем репарации ДНК, который включает в себя достаточно большое количество белок-белковых взаимодействий, можно предположить, что даже незначительные изменения в этих белках, могут привести к мутагенезу и / или нестабильности генома.

1.2 Полиморфизмы ДНК-гликозилаз

1.2.1 8-Оксогуанин-ДНК-гликозилаза OGG1

В клетках млекопитающих существует по меньшей мере 11 различных ДНК-гликозилаз (Таблица 1), которые распознают специфические для каждой из них субстраты ДНК, выворачивают поврежденное основание в свой активный центр и расщепляют *N*-гликозидную связь. Одним из наиболее распространенных мутагенных аддуктов, возникающих в результате окислительного повреждения ДНК, является 7,8-дигидро-8-оксогуанин (8-охоG) [16]. Пары аденина с 8-охоG в процессе транскрипции приводят к трансверсиям [21]. 8-Оксогуанин-ДНК-гликозилаза (OGG1) удаляет как 8-охоG, так и 2,6-диамино-4-гидрокси-5-формапидопиримидин (FapyG) из пар оснований G_{повр.}:C [22,23]. Механизм возникновения этих повреждений изображен на рисунке 3. OGG1 является членом HhH семейства ДНК-гликозилаз, содержит в своей структуре мотив спираль-шпилька-спираль (HhH), за которым следует Gly-Pro-богатая петля и консервативная аспарагиновая кислота, которая инициирует нуклеофильную атаку на ϵ -аминогруппу консервативного остатка лизина. Затем этот остаток атакует атом углерода в *N*-

гликозидной связи, что приводит к высвобождению поврежденного основания. Образующееся затем промежуточное основание Шиффа приводит к расщеплению рибозофосфатного остова цепи ДНК.

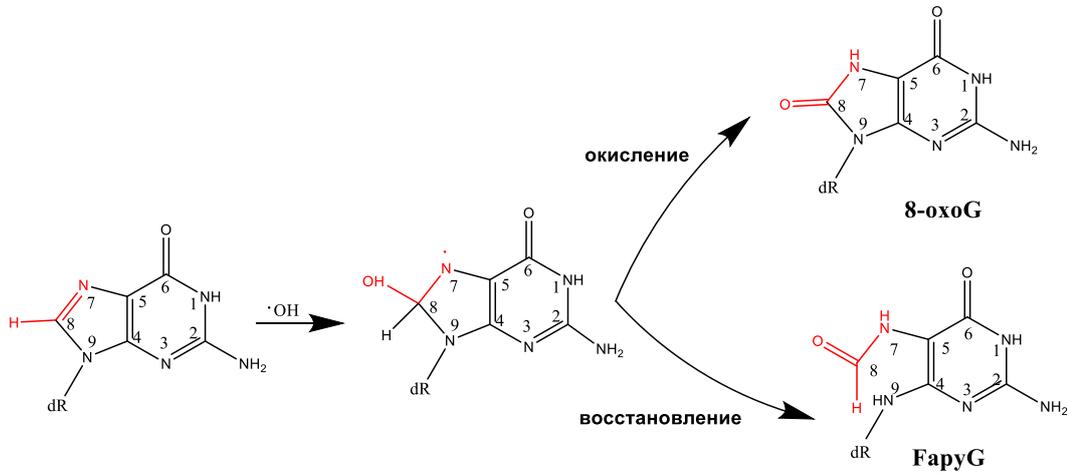


Рис. 3. Предполагаемые механизмы образования 8-охоG и FapyG из природного G.

Наиболее распространенный полиморфный вариант OGG1, Ser326Cys, наблюдается со средней частотой в популяции приблизительно 32% и является наиболее хорошо изученным вариантом OGG1 [24]. По этому варианту было опубликовано не менее 100 исследований которые показали, что существуют некоторые доказательства возникновения рака пищевода, легких, носоглотки и предстательной железы, связанного с полиморфизмом Ser326Cys, при этом риск развития рака груди обнаружен не был [24,25]. Также оказалось, что этот вариант не связан с развитием рака толстой кишки [26]. Был проведен ряд функциональных исследований варианта Ser326Cys. Серьезных отличий каталитической функции этого мутанта не обнаружено, его k_{cat} составляет около 78% от k_{cat} для фермента дикого типа [27] (Таблица 2). В лимфоцитах эффективность удаления 8-охоG этим вариантом сходна с эффективностью фермента дикого типа [28]. Было показано, что вариант Ser326Cys демонстрирует aberrantное связывание с ДНК, вероятно, включающее димеризацию [29], кроме того, окисление Cys в этом полиморфном варианте, изменяет его способность к репарации. Также было высказано предположение, что замена Ser на Cys влияет на ядерную локализацию OGG1, возможно, вследствие изменения его посттрансляционного статуса (фосфорилирования).

Таблица 2. Кинетические константы удаления 8-охоG и FapyG из поврежденной ДНК белком дикого типа GST- α -hOgg1-Ser326 и полиморфным вариантом GST- α -hOgg1-Cys326 [27]

Protein	$k_{\text{cat}} \times 10^3 (\text{min}^{-1})$		$K_{\text{m}} (\text{nM})$		$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} \times 10^5 (\text{min}^{-1} \text{nM}^{-1})$	
	8-охоG	FapyG	8-охоG	FapyG	8-охоG	FapyG
GST-α-hOgg1-Ser326	83,4 \pm 1,6	211,4 \pm 4,0	1863 \pm 144	2356 \pm 184	4,47 \pm 0,09	8,97 \pm 0,17
GST-α-hOgg1-Cys326	65,5 \pm 2,2	111,3 \pm 1,3	2319 \pm 305	2513 \pm 112	2,82 \pm 0,09	4,43 \pm 0,05

Другие варианты OGG1, такие как Arg154His, Arg46Gln и Asp322Asn, имеют значительно более низкую активность по сравнению с активностью OGG1 дикого типа [30,31]. Два SNP варианта OGG1 (Ala53Thr и Ala288Val), идентифицированные в тканях мозга больных болезнью Альцгеймера [32], обладают более низкой каталитической активностью по сравнению с диким типом фермента. SNP-вариант Ala53Thr имеет более низкое сродство к субстрату, а вариант Ala288Val демонстрирует пониженную АП-лиазную активность. При этом обе эти SNP-ассоциированные замены приводят к снижению степени связывания OGG1 с белками BER, такими как PARP1 и XRCC1 [32]. Более того, фибробласты эмбрионов мышей, экспрессирующие SNP-варианты Ala53Thr или Ala288Val, более чувствительны к окислительно-индуцированному повреждению ДНК [33]. Связь между SNP в OGG1 и различными заболеваниями изучалась в большом количестве исследований, которые в совокупности подтверждают предположение о том, что полиморфные варианты этой ДНК-гликозилазы являются факторами предрасположенности к большому спектру заболеваний, связанных с окислительным стрессом, включая онкологические, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные. Проведенные исследования убедительно показывают, что активность OGG1 является биомаркером восприимчивости к таким онкологическим заболеваниям как немелкоклеточный рак легкого [34] и рак головы и шеи [35].

Полиморфный вариант OGG1 Ile321Thr был обнаружен в зародышевой линии одного пациента с колоректальными аденомами, но не в контрольной группе [36]. Два полиморфных варианта OGG1, Thr398Ser и Ser31Pro, наблюдались у пациентов с первичным склерозирующим холангитом [37]. Было обнаружено, что вариант Ser31Pro обладает гликозилазной и ДНК-связывающей активностью, аналогичной активности дикого типа. Мутантная форма OGG1 Arg154His была обнаружена в клеточных линиях рака желудка, а Arg46Gln - в опухолях легких и почек. У обоих вариантов снижена *N*-гликозилазная активность [38].

Вариант OGG1 Ser326Cys в сочетании с SNP-вариантом APE1 Asp148Glu связаны с повышенной предрасположенностью населения Кореи к раку молочной железы [39]. Кроме того, показано, что OGG1 Ser326Cys также связан с повышенным риском возникновения колоректального рака [40,41] и риском рака мочевого пузыря у китайского и европейского населения [42,43]. Анализ межгенного взаимодействия выявил значительное увеличение риска колоректального рака, особенно для комбинаций генотипов Ser326Cys OGG1 и Gln324His MUTYH [40]. Некоторые исследования указывают на патогенную роль окислительного стресса в развитии глазных заболеваний, таких, например, как глаукома. Наиболее частым типом глаукомы является первичная открытоугольная глаукома, на которую приходится более 50% диагностированных случаев глаукомы в развитых странах [44]. Одно из исследований

демонстрирует связь между полиморфизмом OGG1 Ser326Cys и прогрессированием этого заболевания [45]. Катаракта является основной причиной слепоты во всем мире. Помутнение хрусталика является прямым результатом окислительного стресса [46]. В работе [47] показана ассоциация между полиморфизмом OGG1 Ser326Cys и возрастной катарактой.

Мозг особенно уязвим к окислительному стрессу из-за высокого потребления кислорода, слабой антиоксидантной системы и характерной для нейронов терминальной дифференцировки. Таким образом, окислительный стресс может быть причиной различных нейродегенеративных заболеваний. Носители по крайней мере одной копии аллеля Cys326 OGG1 показали значительно более раннее начало болезни Хантингтона, чем носители Ser326. Это открытие указывает на возможную роль полиморфизма OGG1 Ser326Cys в развитии фенотипа болезни Хантингтона [48,49]. Однако эта ассоциация не была подтверждена у 419 немецких пациентов с данным заболеванием [50]. Также никакой связи между вариантом OGG1 Ser326Cys и спорадической болезнью Альцгеймера не обнаружилось в двух независимых исследованиях [51,52]. Однако есть данные об ассоциации между когнитивными характеристиками и полиморфизмом OGG1 Ser326Cys [53].

Инфаркт миокарда вследствие атеросклероза коронарных артерий является ведущей причиной заболеваемости и смертности во всем мире [54]. Патология, лежащая в основе атеросклероза, представляет собой многофакторный процесс, в котором главную роль играет окислительный стресс [55,56]. Было обнаружено, что полиморфный вариант hOGG1 Ser326Cys связан с ишемической болезнью сердца у турецкого населения [57] и с развитием коронарной эктазии у китайского населения [58].

Результаты, суммирующие описанные данные о SNP-вариантах, приведены в Таблице 3.

Таблица 3. SNP-варианты ДНК-гликозилазы OGG1

<i>SNP-вариант OGG1</i>	<i>активность</i>	<i>сродство к субстрату</i>	<i>предположительные ассоциации с онкозаболеваниями</i>
Ser31Pro	WT	WT	первичный склерозирующий холангит
Arg46Glu	снижена		рак легких, рак почек
Ala53Thr	значительно снижена	снижено	болезнь Альцгеймера
Arg154His	снижена		рак желудка
Ala288Val	значительно снижена АП-лиазная и гликозилазная активность		болезнь Альцгеймера
Ile321Thr			колоректальная аденома
Asp322Asn	снижена		
Ser326Cys	снижена на 25% / WT	абберрантное (димеризация)	рак молочной железы, колоректальный рак, ишемическая болезнь сердца, рак пищевода, легких, носоглотки, предстательной железы
Thr398Ser			первичный склерозирующий холангит

1.2.2. Аденин-ДНК-гликозилаза MUTYH

ДНК-гликозилаза MUTYH пострепликативно удаляет ошибочно включенный аденин напротив 8-охоG, тем самым повышая эффективность удаления 8-охоG. У человека описаны две различные изоформы MUTYH, отличающиеся своей локализацией (митохондриальная и ядерная) [59]. MUTYH состоит из каталитического и С-концевого доменов, разделенных линкерной областью [60]. N-концевой домен содержит мотив NhhN, за ним следует Gly/Pro богатая петля и остаток аспартата (Asp222), необходимый для каталитической активности. Именно N-концевой домен взаимодействует с цепью ДНК, содержащей остаток аденина, который затем полностью вытесняется из спирали ДНК и связывается ферментом. С-концевой домен взаимодействует с цепью, содержащей 8-охоG, что позволяет распознавать 8-охоG [60]. MUTYH взаимодействует с белками, другими участниками репарации ДНК, такими как APE1, который стимулирует его гликозилазную активность и способствует повышению процессивности [61], и PCNA, который обеспечивают его связь с репликацией ДНК [62]. У мышей с нокаутом гена *muh*, как сообщалось первоначально, не наблюдается развития рака [63], но позже было показано [64], что у них повышена частота кишечных опухолей, что свидетельствует о том, что потеря активности MUTYH сама по себе приводит к спонтанному онкогенезу. У мышей с двойным нокаутом и по *muh*, и по *ogg1* наблюдается значительное увеличение частоты опухолей, преимущественно опухолей легких и яичников, а также лимфом [63]. Также было отмечено, что у мышей с двойным нокаутом по *muh* и *ogg1* наблюдается повышенная активность на фоне сниженной тревожности и нарушение способности к обучению, что указывает на роль этих гликозилаз влиять на поведение и познание [65]. У людей биаллельные мутации зародышевой линии *muh* связаны с рецессивным наследованием множественного колоректального рака (MУH-ассоциированный полипоз) [66], а моноаллельные мутации зародышевой линии увеличивают риск злокачественных опухолей головного мозга [67].

В работах [68,69] описан случай одной британской семьи, которой был поставлен диагноз множественные колоректальные аденомы и карциномы, но у членов семьи отсутствовал наследственный дефект гена аденоматозного полипоза кишечной палочки (APC). Детальное исследование опухолей, показало высокую долю трансверсий GC в ТА в гене APC, что является признаком дефекта в MUTYH (и OGG1), который удаляет неправильно встроенный аденин напротив 8-оксогуанина или FaryG. На сегодняшний день известно более 50 миссенс-мутаций в гене *muh*, более 30 из которых наблюдались у людей с MUTYH-ассоциированным полипозом [70]. Наиболее распространенными миссенс-вариантами, обнаруживаемыми у пациентов с MUTYH-ассоциированным полипозом (около 70%), являются Tyr165Cys и Gly382Asp. В этом варианте Tyr заменяется на меньший по размеру аминокислотный остаток Cys, что вызывает

резкие структурные изменения, нарушает стэкинг-взаимодействия и возможность образования водородных связей между аминокислотными остатками фермента [60]. Интересно, что в *Bacillus stearothermophilus* Tyr88, соответствующий Tyr165 в MUTYH, представляет собой остаток, выступающий в роли клина, который интеркалирует с 5'-стороны от 8-охоG в молекуле ДНК и участвует в выворачивании аденина в карман активного центра [60]. Этот остаток выполняет те же функции, что и фенилаланин в бактериальных формамидопиримидин-ДНК гликозилазах (Fpg), который, согласно кристаллографическим исследованиям, интеркалирует рядом с цитозином напротив 8-охоG и определяет различия между 8-охоG и G [71]. Этот же остаток фенилаланина в Fpg выступает в качестве зонда для обнаружения повреждения ДНК [72]. Физико-химический анализ вариантов Tyr165Cys и Gly382Asp показал, что вариант MUTYH Tyr165Cys имеет низкое сродство к субстрату, и у него практически полностью отсутствует гликозилазная активность [73]. В экспериментах, проведенных в условиях одного оборота фермента, вариант MUTYH Gly382Asp показал около 30-40% от активности фермента дикого типа [74].

Несколько SNP-вариантов MUTYH, вызванных миссенс-мутациями или инсерциями/делециями, были функционально охарактеризованы в работах [73,75]. Обычно варианты MUTYH демонстрируют значительное снижение ДНК-гликозилазной активности, что вероятно вызвано заменой аминокислотных остатков в каталитическом домене или в области узнавания субстрата. Вариант Gln324His MUTYH достаточно распространенный и обнаруживается более чем у 40% людей. Для этого мутанта была показана, активность практически идентичная активности фермента дикого типа, но при этом ассоциирован с повышенным риском рака легких [76] и колоректальным раком [77]. Два редких варианта MUTYH (Arg260Gln и His434Asp) были обнаружены у пациентов с первичным склерозирующим холангитом [37], который часто осложняется развитием холангиокарциномы.

Ряд других вариантов MUTYH был охарактеризован в работе [78] (Таблица 4), и было показано, что многие из них демонстрируют снижение эффективности связывания 8-охоG:A и гликозилазной активности.

Таким образом, был достигнут значительный прогресс в понимании того, какие варианты MUTYH случайно обнаруживаются у пациентов с MUTYH-ассоциированным полипозом, и какие полиморфизмы могут выступать маркерами этого заболевания.

Таблица 4. Варианты гликозилазы *MUTYH*, обнаруженные у пациентов с *MUTYH*-ассоциированным полипозом [78]

<i>Варианты гликозилазы</i>	<i>Активность</i>	<i>Сродство к субстрату</i>
V22M	WT	WT
V61E	WT	
R83X	Не активен	
Y90X	Не активен	Не связывается
I103delC	Не активен	Не связывается
Y165C	Не активен	Сильно снижено
R168H	Не активен	
R171W	Не активен	Сильно снижено
I209V	66.9%	
D222N	Не активен	
R227W	Серьезный дефект	Сильно снижено
R231H	Серьезный дефект	Сильно снижено
R231L	Серьезный дефект	Сильно снижено
V232F	Серьезный дефект	Частично связывает
R260Q	Серьезный дефект	Снижено
M269V	10.7%	
P281L	Серьезный дефект	Сильно снижено
R295C	WT	
Q324H	Снижена	
Q324R	Не активен, 30-40%	WT
A359V	WT	
L374P	Не активен	
Q377X	Не активен	Не связывается
G382D	30-40%, снижена	Сильно снижено
P391L	Не активен, 30-40%	
H434D	WT	
A459D	Серьезный дефект	
E466del	Не активен	Сильно снижено, не связывается
S501F	WT	

1.2.3. Урацил/тимин-ДНК-гликозилазы *UNG*, *SMUG1*, *TDG* и *MBD4*

Урацил возникает в ДНК в результате неправильного включения dUTP из пулов нуклеозидтрифосфатов, а также при дезаминировании цитозина (рис. 4а). Урацил обладает сильным мутагенным эффектом, так как может приводить к трансверсии G в A (рис. 4б).

Идентификация урацил-ДНК-гликозилазы *Escherichia coli* (UNG) в 1974 году Томасом Линдалом, можно сказать, знаменует собой открытие первого участника пути BER. Линдал искал ферментную активность, которая воздействовала бы на геномный урацил, образующийся в результате дезаминирования цитозина. Такая активность была обнаружена, но довольно неожиданно оказалась не нуклеазной. Вместо этого Линдал идентифицировал фермент, расщепляющий связь между урацилом и дезоксирибозой. Полученный АП-сайт, как было предположено, далее процессируется АП-эндонуклеазой, ДНК-полимеразой и лигазой. Таким образом, основные этапы пути BER были намечены уже в самой первой статье [79]. В клетках эукариот присутствуют две разные изоформы UNG: UNG1 и UNG2, которые локализуются в митохондриях и ядре, соответственно [80]. Эти изоформы образуются в результате транскрипции с двух различных стартовых сайтов, а также в результате альтернативного сплайсинга мРНК, транскрибируемых с гена *ung* [80]. Роль UNG1 в процессинге урацила в митохондриях точно не определена и нуждается в дополнительных исследованиях [81,82]. UNG2 является ядерной ДНК-гликозилазой, которая связывается с репликационными комплексами [83–85], взаимодействуя, среди прочего, с PCNA и репликативным белком А [86], которые стимулируют основную функцию UNG2, а именно удаление урацила. В В-клетках UNG2 также играет важную роль в соматической гипермутации (SHM) и переключении классов антител (CSR), предположительно за счет удаления урацила, генерируемого цитозиндеаминазой (AID). Существуют литературные данные о том, что UNG2 вовлекается в деметилирование ДНК в зиготах мышей, в которых тимин-ДНК-гликозилаза TDG, предназначенная для деметилирования ДНК в CpG-островках, плохо экспрессируется, но при этом незаменима при деметилировании ДНК [87]. У мышей с дефицитом UNG2 накапливается нерепарированный урацил в пролиферирующих клетках, но не наблюдается какого-либо значимого повышения частоты спонтанных мутаций [88], тогда как у взрослых мышей (> 18 месяцев) развивается В-клеточная лимфома [89]. Мыши нокаутные по гену *ung* демонстрируют высокую вероятность развития лимфом, что свидетельствует о ключевой роли этой ДНК-гликозилазы в создании разнообразия иммуноглобулинов [90]. Гомозиготные пациенты с рецессивными мутациями UNG2 дефектны как в процессах CSR, так и в процессах SHM и проявляют синдром гипер-IgM с рецидивирующими инфекциями [91].

На сегодняшний день известно немного данных о природных мутациях гена *ung*, однако, среди них обнаружено две, которые были ассоциированы с раком [92,93]. Одна из них, UNG Arg88Cys, представляет собой полиморфизм, обнаруженный в зародышевой линии семьи с колоректальным раком [92], а вторая, вызывающая замену UNG Gly143Arg, была обнаружена в клетках спорадической глиобластомы [93]. Ряд полиморфизмов *ung* был изучен на различных линиях клеток, но ни один из них не показал значительного снижения активности урацил-ДНК-гликозилазы [94].

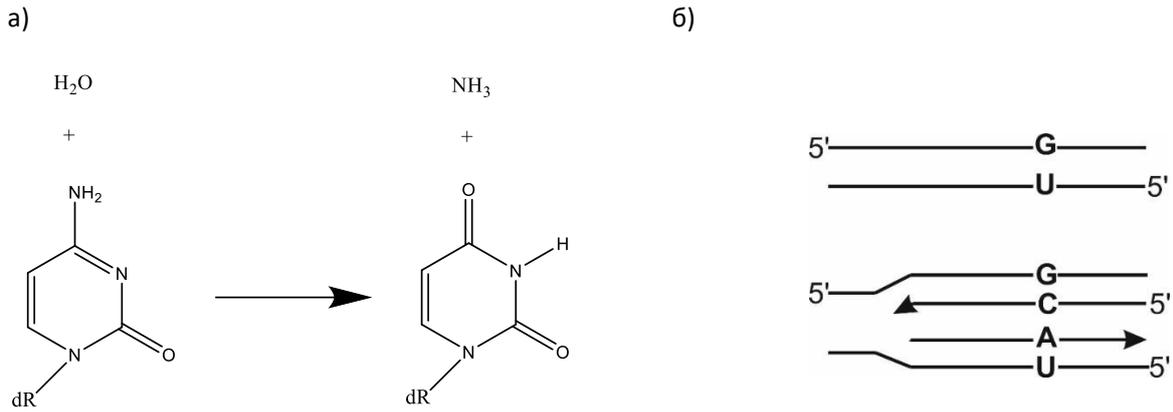


Рис. 4 (а) Гидролитическое дезаминирование цитозина приводит к образованию урацила. (б) Нерепарированные мисматчи приводят к G:A трансверсии в половине дочерних дуплексов при репликации.

Кроме UNG удаление урацила, возникающего в результате дезаминирования цитозина, осуществляет еще одна урацил-ДНК-гликозилаза SMUG1 (single strand selective mono-functional uracil-DNA-glycosylase). SMUG1 имеет ядерную локализацию и предпочитает одноцепочечные ДНК-субстраты [95]. Однако, фермент способен удалять урацил и в неканонической паре U:G. Поскольку SMUG1 имеет более низкую K_M к такого рода субстрату, в сравнении с UNG [96], то это приводит к более высокой эффективности репарации редких повреждений в нереплицирующихся участках ДНК [97]. Кроме того, SMUG1 участвует в удалении 5-гидроксиметилурацила (5-hmU) из РНК в ядрышке [98]. Мыши с нокаутом гена *smug1* нормально размножаются, и их здоровье и выживаемость до 1 года не ухудшаются, несмотря на полную остановку удаления 5-hmU из различных типов тканей [18]. Однако, когда нокаут гена *smug1* сочетается с нокаутами по генам *ung* и *msh2*, у мышей с тройным нокаутом наблюдается повышенная предрасположенность к раку, преимущественно к лимфоидным опухолям [99]. Это может свидетельствовать о том, что SMUG1 также вносит свой вклад в разнообразие антител, тем самым участвуя в адаптивном и врожденном иммунном ответе. И UNG, и SMUG1 являются членами суперсемейства UDГ, которые имеют сходные структурные мотивы. Хотя в настоящее время кристаллическая структура SMUG1 человека не определена, однако она была детально предсказана путем гомологического моделирования методом структурного выравнивания с GmeSMUG1 из *Geobacter metallireducens* (PDB IDs 5H98 и 5H9I) [100] и xSMUG1 из *Xenopus laevis* (PDB IDs 1OE4 и 1OE5) [11] (рис. 5). Из данных о функциональных особенностях SMUG1 человека [83] известно, что аминокислотные остатки Asn85 и His239 катализируют расщепление N-гликозидной связи. Остатки Asn163 и Phe98 распознают пиримидиновые основания, образуя специфическую водородную связь и π - π -стэкинг соответственно. Область Gly87–Met91 распознает заместитель в положении C5 через формирование водных мостиковых (урацил) или прямых (гидрокси-U, гидроксиметил-U и формил-U) водородных связей [83]. В SMUG1 последовательность аминокислотных остатков с 239 по 249, называемая интеркалирующей

петлей, служит в роли «клина», встраиваемого в двойную спираль ДНК в районе поврежденного нуклеотида [11,83]. Аминокислотные остатки в интеркалирующей петле отвечают за распознавание поврежденного основания, выворачивание и стабилизацию его внеспирального состояния путем заполнения образовавшийся пустоты боковой цепью Arg243 [82].

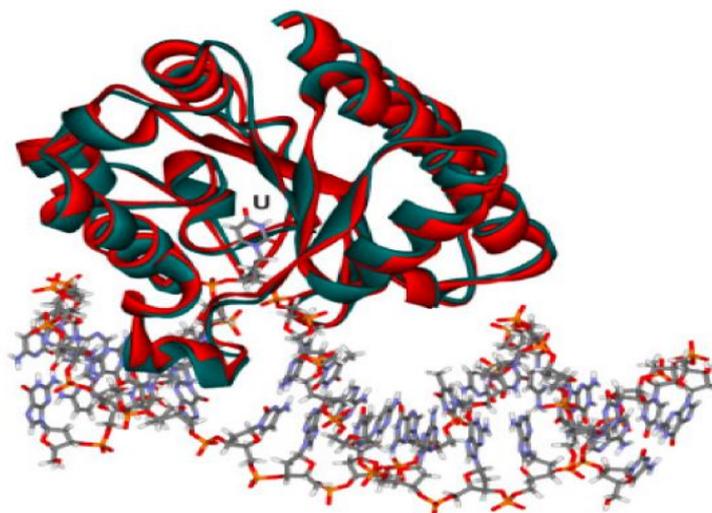


Рис. 5 Суперпозиция структур свободного фермента SMUG1 (красный) и SMUG1 в комплексе с ДНК (зеленый). Поврежденное основание (U) расположено в кармане активного сайта [101].

На сегодняшний день по данным портала www.cbioportal.org известно около 40 миссенс мутаций в гене SMUG1. Но было показано, что только два полиморфных варианта SMUG1 (G90C и G90V) умеренно влияют на риск возникновения рака легких [102]. Мутации в *smug1* также могут способствовать развитию рака толстой кишки [103,104]. В исследовании [104] авторы проанализировали полную последовательность генома 37 пациентов с диагнозом рак толстой кишки. В дополнение к мутациям в гене *smug1* генетический скрининг обнаружил мутации в генах, характерных при раке толстой кишки, таких как *apc*, *kras*, *pik3ca* и *p53*. Более того, у пациентов с инактивирующими заменами в SMUG1, такими как Q93K, R66H, R66C и R220W и диагнозом рак толстой кишки наблюдалась более высокая летальность (порядка 33%) по сравнению с группой пациентов без данных мутаций, но с таким же диагнозом. Важно отметить, что проведенные исследования на людях, ассоциирующие уровни активности SMUG1 с раком, были только корреляционными. Таким образом, все ещё остается не ясно, как сниженная активность SMUG1 и/или сниженная экспрессия при различных формах рака влияет на течение болезни и прогнозы в терапии.

Следующие два представителя семейства урацил-ДНК-гликозилаз это TDG (тимин-ДНК-гликозилаза) и MBD4 (метилцитозин связывающий домен 4), которые удаляют тимин и урацил из мисматчей с гуанином, возникающие в результате дезаминирования 5-метилцитозина и

цитозина [105]. TDG имеет большой гидрофобный каталитический карман, вмещающий широкий спектр повреждений, возникающих в результате окисления, алкилирования и дезаминирования С, 5-mС и А, что приводит к урацилу, тимину и 6-гидроксипурину (также известному как гипоксантин) соответственно [15]. После гидролиза *N*-гликозидной связи с азотистым основанием TDG прочно связывается с образовавшимся АП-сайтом, и скорость диссоциации комплекса фермента с продуктом является лимитирующей стадией ферментативного процесса. Взаимодействие каталитического домена TDG с APE1 значительно увеличивает скорость диссоциации с ДНК, содержащей АП-сайт, что позволяет проводить дальнейший процессинг повреждения [105]. Нужно отметить, что основной биологической функцией TDG, помимо удаления урацила из мисматчей и защиты от возникновения мутаций, является регуляция экспрессии генов, за счет активного деметилирования ДНК. Известно, что 5-mС, образующийся при специфическом метилировании ДНК высших эукариот, является важным маркером экспрессии генов, инактивации X-хромосом и ряда других процессов развития организма [106]. TDG также играет роль в активном деметилировании участков CpG-островков [15], с высокой частотой встречающихся в промоторах генов или рядом с ними [107]. Недавно был выяснен и воссоздан *in vitro* механизм деметилирования ДНК-субстрата, который под действием TDG-опосредованного BER, превращается из 5-mС в цитозин [108]. Эта хорошо скоординированная система способна последовательно воздействовать на обе нити симметрично модифицированных CpG, тем самым предотвращая образование двухцепочечных разрывов ДНК, но приводя к увеличению переходов С → Т [108,109]. В клетках млекопитающих деметилирование 5-mС может происходить путем специфического окисления метильной группы 5-mС ферментами TET с образованием 5-hmС, 5-fС и 5-caС [87]. Было показано, что TDG с одинаковой эффективностью удаляет основания Т, 5-fС и 5-caС, расположенные напротив G [110]. На рисунке 6 представлена структура комплекса TDG с продуктом после удаления 5-гидроксиметилурацила, а также структуры продуктов окисления 5-метилцитозина ферментами TET.

Нокаут гена *tdg* у мышей вызывает эмбриональную летальность [111]. Это контрастирует со всеми другими ДНК-гликозилазами, целевая делеция гена которых в моделях трансгенных мышей не особо сказывается на жизнеспособности и фертильности особей. Этот эффект хорошо согласуется с основной функцией TDG в управлении правильной эпигенетической программой во время развития эмбриона, как было сказано выше.

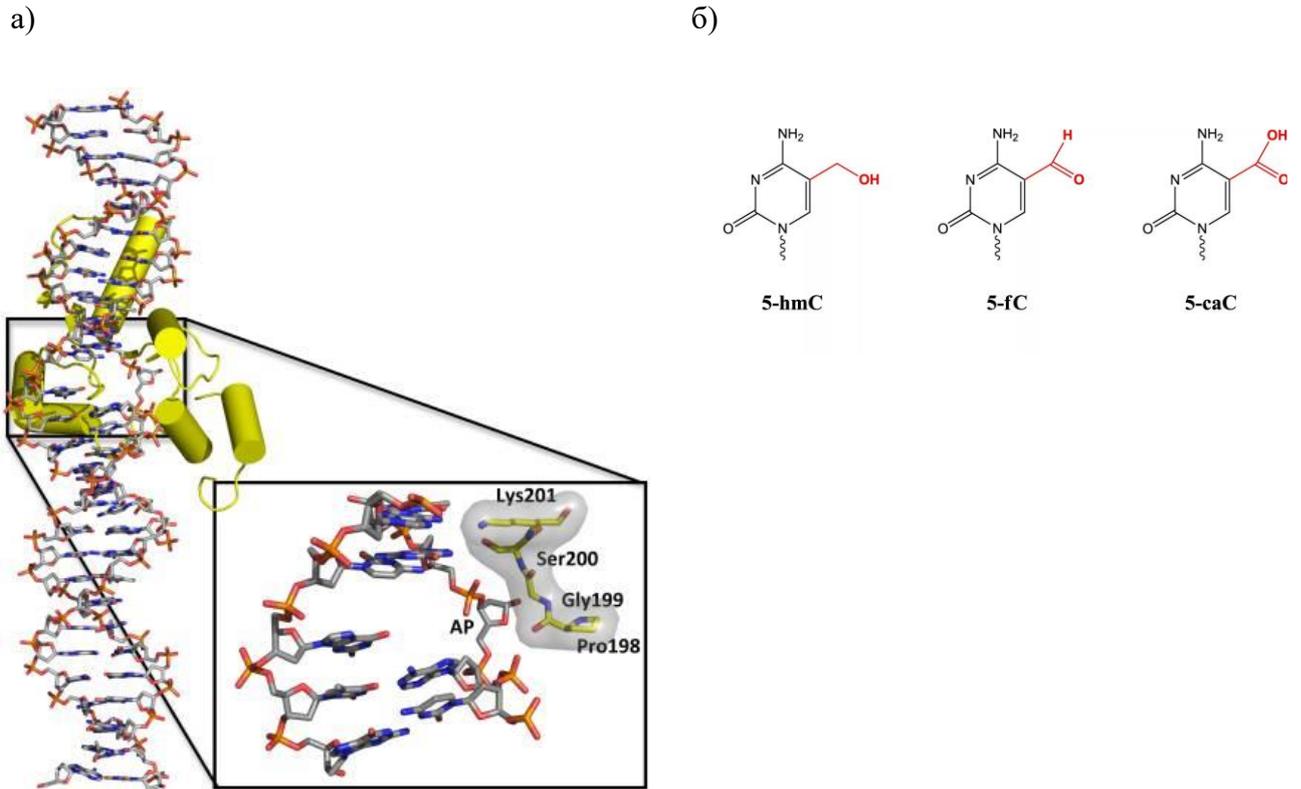


Рис. 6 (а) Структура комплекса TDG с продуктом (АП-сайт напротив G), после удаления 5-hmU из ДНК (PDBID 4FNC). В увеличенной части показана петля активного центра, которая взаимодействует с вывернутой областью ДНК. (б) Структуры продуктов окисления 5-метилцитозина (5-мС) ферментами TET.

Для тиминовой ДНК-гликозилазы (TDG) человека на сегодняшний день известно порядка 70 миссенс мутаций (по данным портала www.cbiorportal.org). Однако среди проанализированных образцов опухолей никаких статистически значимых ассоциаций полиморфных вариантов с риском возникновения того или иного вида рака обнаружено не было. Вариант TDG Gly199Ser наблюдается у 10% мирового населения. Gly199 способствует стабилизации вывернутого поврежденного нуклеотида в карман ДНК-гликозилазы и блокирует его выворачивание обратно в спираль [112]. Замена Gly199 на более крупный и нуклеофильный остаток Ser усиливает взаимодействие TDG как с АП-сайтом, так и с субстратом. Накопление АП-сайтов в клетках, экспрессирующих этот вариант, индуцирует образование двучепочных разрывов, нестабильности генома и клеточной трансформации [113]. Недавнее исследование в китайской популяции показало, что наиболее значимым SNP для риска развития немеланомного рака кожи является TDG Gly199Ser [114]. SNP вариант TDG Val367Met также способствует риску развития немеланомного рака кожи [115]. Вариант TDG Arg66Gly был идентифицирован у пациентов с семейным колоректальным раком, но не встречался у здоровых людей [116].

Следующий представитель семейства урацил-ДНК-гликозилаз - MBD4, также называемый MED1, содержит два домена, один из которых распознает метилированные и

полуметилированные CpG последовательности, а другой, проявляя гликозилазную активность, удаляет мисматч напротив G. Гликозилазный домен MBD4 гомологичен суперсемейству ДНК-гликозилаз спираль-шпилька-спираль (HhH) [117], а метил-CpG связывающий домен состоит из компактной α/β складки с петлей между двумя антипараллельными β -цепями, которая вклинивается в большую бороздку ДНК, содержащую последовательность метил-CpG [118].

MBD4 распознает не только метилированные динуклеотиды CpG, но и мисматчи T:G, образованные при спонтанном дезаминировании 5-mC. Помимо удаления T и U в паре с G, MBD4 проявляет широкую субстратную специфичность, перекрывающуюся с TDG, и включающую такие азотистые основания как 5-фторурацил, 5,6-дигидрокси-5,6-дигидротимин, тимингликоль (Tg) и 5-бром урацил, расположенные напротив G, а также уникальные субстраты, образующиеся при ошибочной репликации [105,119].

Мыши с нокаутом гена *mbd4* развиваются нормально и не обнаруживают какого-либо абберрантного фенотипа, хотя сообщалось [120] о 3-кратно более высокой частоте мутаций в сайтах CpG в эпителии селезенки и кишечника. Более того, снижение уровня экспрессии MBD4 у предрасположенных к раку моделей мышей *apc* $-/+$ приводило к увеличению опухолей желудочно-кишечного тракта. На молекулярном уровне опухоли желудочно-кишечного тракта показали увеличение переходов C \rightarrow T в сайтах CpG аллеля *apc* дикого типа. Это исследование поддерживает идею о том, что снижение уровня активности фермента MBD4 не является онкогенным само по себе, но может влиять на прогрессирование рака на фоне генетических предрасположенностей [120,121].

Варианты MBD4 Asp568His и Cys61Arg демонстрируют снижение как каталитической активности, так и способности узнавать T и U напротив G, в контексте CpG [105]. Эти варианты были идентифицированы в опухолях желудка с микросателлитной нестабильностью [122]. В исследовании [123] было обнаружено, что SNP Glu346Lys был связан со значительным снижением риска рака шейки матки в китайской популяции. Результаты работ [124,125] свидетельствуют о том, что вариант MBD4 Glu346Lys был связан со снижением риска рака легких, что свидетельствует о защитной роли этого SNP.

Исследование полиморфизма MBD4 Glu346Lys показало, что он в значительной степени связан с риском колоректального рака и раком желудка [126]. Также этот полиморфный вариант MBD4 Glu346Lys является одним из 6 маркеров в исследовании [127]. Авторы этого исследования проанализировали 568 пациентов в китайской популяции и показали, что на чувствительность к химиотерапии на основе платины и общую выживаемость при немелкоклеточной карциноме легкого может влиять наличие полиморфизмов в списке из 6

ферментов различных путей репарации (ATM, MRE11A, ERCC1, MBD4 Glu346Lys, XRCC1 Arg399Gln и PMC1).

Результаты, суммирующие данные о SNP-вариантах, описанных в главе, приведены в Таблице 5.

Таблица 5. SNP-варианты урацил-ДНК-гликозилаз

SNP-вариант UDG		активность	предположительные ассоциации с онкозаболеваниями
UNG	Arg88Cys	WT	колоректальный рак
	Gly143Arg		спорадическая глиобластома
SMUG1	Arg 66 His	не активен	рак толстой кишки
	Arg66Cys		
	Gln93Lys		
	Ag220Trp		
	Gly90Cys		
	Gly90Val		рак легких
TDG	Arg66Gly		колоректальный рак
	Gly199Ser		немелкоклеточный рак кожи
	Val367Met		
MBD4	Cys61Arg	снижена	опухоль желудка с микросателлитной нестабильностью
	Asp568His		
	Gly346Lys		

1.2.4 Алкиладенин-ДНК-гликозилаза AAG

Алкиладенин-ДНК-гликозилаза (AAG) распознает и удаляет широкий спектр алкилированных оснований, включая не только 3-метиладенин, но и гуанин, метилированный в положении N3 или N7, 1N6-этенаденин, гипоксантин и 8-оксогуанин, а также другие алкилированные и окисленные ДНК-субстраты [128] (рис. 7). AAG представляет собой монофункциональную гликозилазу. Её экспрессия зависит от клеточного цикла [129], и фермент локализуется как в ядре, так и в митохондриях [130]. Активность AAG усиливается белком XRCC1 и фактором HR23В эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) [131,132].

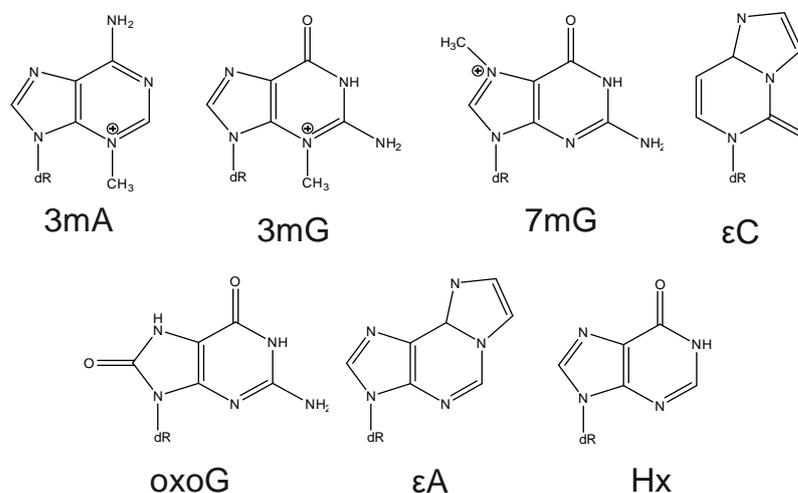
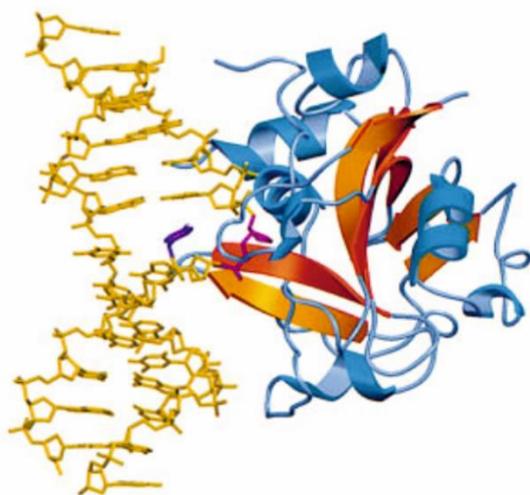


Рис. 7. Примеры повреждений ДНК, которые могут репарироваться с участием AAG.

а)



б)

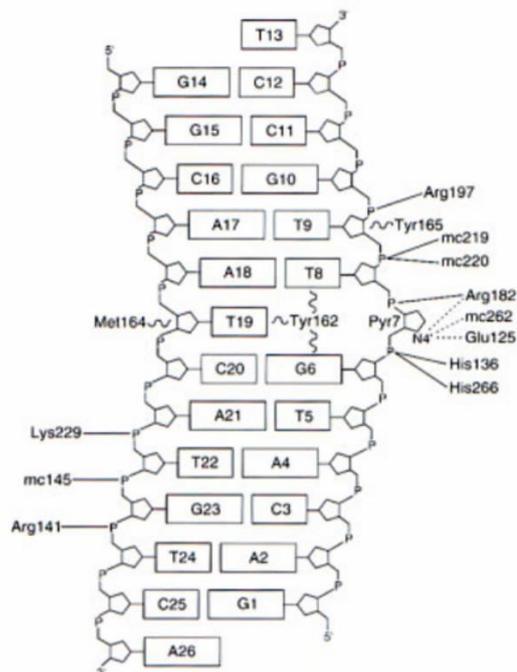


Рис. 8. Структура комплекса ААГ человека с ДНК. (а) Кристаллическая структура 3-метиладенин-ДНК-гликозилазы (ААГ) в комплексе с ДНК, содержащей ингибитор фермента-пирролидин (красный). ААГ связывается в малой бороздке ДНК и вытесняет пирролидин в активный центр фермента. Тир-162 (фиолетовый) встраивается в пространство, образовавшееся после выворачивания нуклеотида. (б) Схематическая диаграмма контактов белок-ДНК. Пирролидин (Pyr7) находится во внеспиральной конформации и участвует в ряде взаимодействий, опосредованных водой (пунктирные линии) с остатками активного центра Тир-162, Мет-164 и Тир-165. Водородные связи и солевые мостики (сплошные линии) с рибозофосфатным остовом ДНК обеспечивают связывание белок-ДНК.

Более того, ААГ связывает PCNA и стимулируется APE1 путем ускорения диссоциации продукта с АП-сайта [132,133]. Хотя ААГ человека имеет сходную субстратную специфичность с бактериальным и дрожжевым ферментом AlkA, эти ферменты принадлежат к разным структурным семействам. ААГ является членом суперсемейства спираль-шпилька-спираль (HhH). ДНК-гликозилаза ААГ состоит из одного смешанного α/β -домена, который отличается от других гликозилаз, но, как и в случае AlkA, ее активный центр образован ароматическими аминокислотными остатками, необходимыми для связывания электрон-дефицитных алкилированных азотистых оснований [134] (рис. 8).

Мыши с дефектом гена *aag* были жизнеспособными и нормально развивались, при этом они были умеренно чувствительны к алкилирующим агентам и демонстрировали значительное снижение эффективности удаления 3-mA, но не 7-mG [128]. Кроме того, у *aag*-нулевых мышей при обработке азоксиметаном для индукции алкилирующих повреждений или

декстрансульфатом для индукции воспаления наблюдалась более высокая частота рака толстой кишки, чем у мышей дикого типа, получавших аналогичную терапию [135]. Мыши с нокаутом *aag* также демонстрируют более тяжелые поражения желудка, чем мыши дикого типа, после заражения *Helicobacter pylori* [136]. Хотя существует довольно широкий спектр полиморфизмов фермента ААG большинство исследований не показывают связи между полиморфизмами гена *aag* и развитием онкологических заболеваний.

1.2.4. NEI-подобные ДНК-гликозилазы и (*NEIL1*, *NEIL2* и *NEIL3*) и эндонуклеаза III (*NTH1*)

В клетках человека обнаружены четыре бифункциональные ДНК-гликозилазы, которые распознают окисленные пиримидины и формамидопиримидины (рис. 9). Эндонуклеаза III (*NTH1*), как и все ортологи *EcoNth*, обладает ДНК-гликозилазной/лиазной активностью в отношении окисленных пиримидинов, формамидопиримидинов, 5-формилурацила, а также гидролизует АП-сайты. *NTH1*, подобно *OGG1* и *MUTYH*, также является членом суперсемейства спираль-шпилька-спираль (HhH) [137,138]

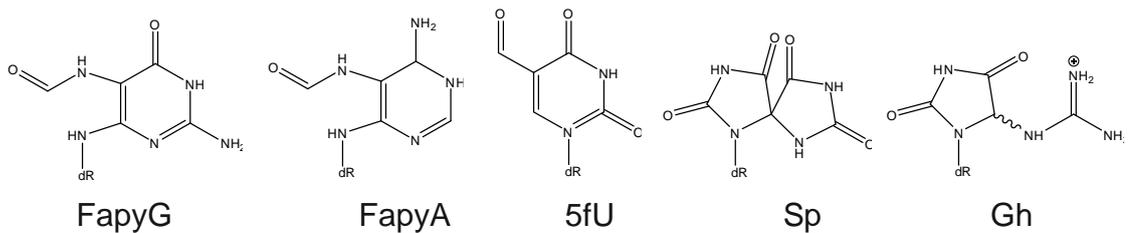


Рис. 9. Примеры повреждений ДНК в субстратах для *NTH1*, *NEIL1*, *NEIL2*, *NEIL3*.

В *E. coli* была идентифицирована и охарактеризована резервная активность *EcoNth* в удалении окисленных пиримидинов, *EcoNei*. Его первые эукариотические гомологи были обнаружены у людей и обозначены как *NEIL1*, *NEIL2* и *NEIL3* (*NEI*-подобные) [139]. *NEIL1* восстанавливает фрагментированные пурины, насыщенные пиримидины и некоторые окислительные повреждения, включая Tg, FapyG, FapyA, 8-охоG, 5-hU и 5-hC [140]. Структура *NEIL1* человека была разрешена с помощью рентгеноструктурной кристаллографии [141]. *NEIL1* содержит структурный мотив, состоящий из двух антипараллельных β-цепей, которые имитируют антипараллельные β-шпильки цинкового пальца, обнаруженные у других членов семейства *Nei*. Этот мотив необходим для ДНК-гликозилазной активности *NEIL1*, поскольку

замена одной аминокислоты (Arg277Ala) в этом безцинковом пальцеобразном мотиве снижает степень расщепления субстрата (рис. 10) [141].

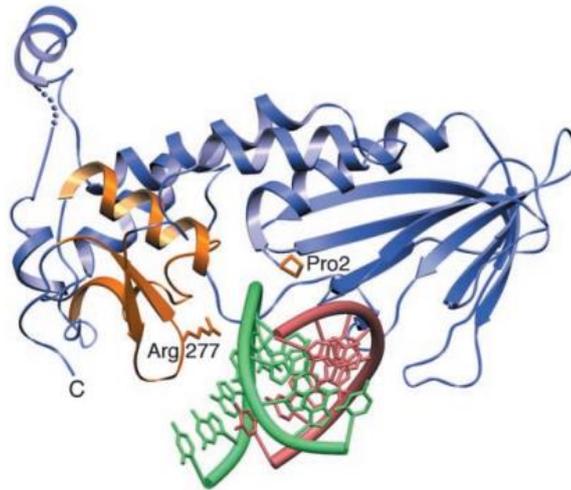


Рис. 10. Модель комплекса NEIL1–ДНК. ДНК цепь, содержащая повреждение, выделена зеленым цветом, комплементарная цепь розового цвета, NEIL1 синего цвета. Безцинковый палец, H2TH, каталитические остатки пролина и консервативного аргинина выделены золотым цветом.

NEIL1 может расщеплять повреждения, присутствующие в одноцепочечных, двухцепочечных и пузырьковых структурах ДНК [142]. После удаления поврежденного основания NEIL1 расщепляет АП-сайт по механизму β - δ -элиминирования, для которого необходима полинуклеотидкиназа (PNK) для образования 3'-ОН-конца и, таким образом, NEIL1 запускает APE1-независимый путь BER [143]. NEIL1 взаимодействует и стимулируется репликационными белками POL δ , RF-C, Lig1 и FEN1 и преимущественно участвует в BER, связанной с репликацией [144]. Кроме того, NEIL1 взаимодействует с несколькими белками BER, такими как POL β , ДНК-лигаза III (LigIII), PCNA и XRCC1, посредством своего С-концевого домена [140]. Мыши нокаутные по *neil1* жизнеспособны и не обнаруживают каких-либо явных постнатальных дефектов [145]. Сообщалось лишь о незначительном увеличении частоты аденом легких и гепатокарцином у стареющих животных. Однако явный склонный к раку фенотип наблюдался у мышей с двойным нокаутом *neil1/nth1*, которые характеризуются легочными и гепатоцеллюлярными карциномами и С \rightarrow Т трансверсиями в гене *k-ras* [17]. Эти наблюдения не только подтверждают перекрывающуюся субстратную специфичность между NEIL1 и NTHL1, но и указывают на то, что в инициации опухоли участвуют другие повреждения кроме хорошо известного проканцерогенного 8-охоG. Следует отметить, что у мышей с нокаутом *neil1* спонтанно развивается ожирение с поздним началом, связанное с гиперлептинемией, гиперинсулинемией, стеатозом печени и повышенным повреждением митохондриальной ДНК [145]. У людей инактивирующие мутации *neil1* были обнаружены в подмножестве первичных раков желудка, что позволяет предположить, что низкая активность NEIL1 может быть вовлечена

в патогенез рака желудка [146]. Описанные в литературе полиморфизмы NEIL1 в основном демонстрируют частичную или полную потерю гликозилазной активности. Полиморфный вариант Gly83Asp NEIL1 был обнаружен у двух пациентов с холагиокарциномой. Gly83 расположен в N-концевом домене, в петле внутри желобка NEIL1, который, как полагают, участвует в связывании с ДНК. Этот вариант Gly83Asp демонстрирует снижение АП-лиазной активности на двухцепочечной ДНК и дефектен в удалении 8-охоG, Tg, FapyA, FapyG и дигидротимина в дуплексной ДНК, но при этом он имеет нормальную активность в удалении 5-гидроксцитозина (5-hC) и 5-гидроксиурацила (5-hU) из одноцепочечной ДНК [37]. У варианта Cys136Arg совсем отсутствует гликозилазная активность [147]. Эта аминокислотная замена изменяет фолдинг белка, что, вероятно, ставит под угрозу даже саму способность фермента связывать поврежденный нуклеотид. В исследовании [147] сообщалось, что гликозилазная активность двух других вариантов, Ser82Cys и Asp252Asn очень схожа с активностью фермента дикого типа. В другом исследовании [142] была проанализирована субстратная специфичность вариантов NEIL1 Ser82Cys, Pro208Ser и Δ E28. Вариант Pro208Ser продемонстрировал активность, подобную дикому типу, на всех протестированных субстратах, в то время как варианты Ser82Cys и Δ E28 были дефектны при удалении Tg. Вариант NEIL1 Glu181Lys был найден у пациента с первичным склерозирующим холангитом, но белок оказался нерастворим при попытке экспрессии его в бактериальных клетках [37]. Два редких варианта NEIL1, Pro208Ser и Arg339Gln, были обнаружены у пациентов с колоректальными аденомами, но вариант Arg339Gln также был обнаружен в контроле [68]. Три варианта NEIL1, Lys242Arg, Gly245Arg и Arg334Gly были идентифицированы в опухолях желудка. Все эти варианты мало отличались по активности от NEIL1 дикого типа [147].

NEIL2 имеет такую же субстратную специфичность, что и ферменты NTHL1 и NEIL1. Структура белка NEIL2 еще не разрешена с помощью кристаллографии, однако установлено, что фермент состоит из двух доменов: N-концевого и C-концевого, которые содержат типичный мотив H2TH и необычный мотив цинковых пальцев, необходимые для связывания ДНК и катализа соответственно [148,149]. АП-сайт, образующийся после удаления поврежденного основания, расщепляется по механизму β - δ -элиминирования, сходному с механизмом действия NEIL1 [150]. NEIL2, как и NEIL1, обладает эффективной dRP-лиазной активностью [151]. NEIL2, по-видимому, играет решающую роль в репарации окисленных оснований в активных генах (транскрипционно-связанный BER, TC-BER), о чем свидетельствует его взаимодействие с РНК-полимеразой II, TFIIH, CSB и LIGIII как *in vitro*, так и *in vivo* [152,153]. Также было показано, что и NEIL1, и NEIL2 взаимодействуют с TDG во время удаления повреждений, стимулируя этот процесс [154]. Более того, NEIL функционируют как АП-лиазы во время окислительного деметилирования ДНК [154].

У мышей с нокаутом гена *neil2* нет явного фенотипа или спонтанного онкогенеза, хотя снижение уровня транскрипции *neil2* приводит к потере теломер и нестабильности генома и вызывает врожденное воспаление [153]. У животных среднего и пожилого возраста накапливаются окислительные повреждения ДНК в основном в транскрибируемых областях генома [153], что еще раз подтверждает роль NEIL2 в TC-BER.

Три полиморфных варианта NEIL2: Arg103Gln, Pro123Thr и Arg257Leu, были идентифицированы у пациентов с семейным анамнезом колоректального рака и не наблюдались в контроле [92]. Варианты NEIL2 Arg103Gln и Arg257Leu также были обнаружены у пациентов с множественными колоректальными карциномами и у больных раком легкого [68]. Гликозилазная активность варианта Arg257Leu была лишь немного ниже по сравнению с белком дикого типа. Однако при измерении гликозилазной активности в эксперименте, содержащем NEIL2 дикого типа или варианты Arg257Leu и Arg103Gln вместе с другими ДНК-белками BER (PNKP, POL β , LigIII α и XRCC1), наблюдалось примерно 5-кратное снижение активности для варианта Arg257Leu по сравнению с WT или Arg103Gln NEIL2, что видимо является следствием низкой аффинности к другим белкам репарации, особенно к POL β [155]. Вариант Arg257Leu может быть фактором риска для некоторых гистологически различных типов рака легкого в китайской популяции, где встречаемость этого SNP очень высока [155].

NEIL3 в основном действует как монофункциональная ДНК-гликозилаза [156] и удаляет гидантоиновые повреждения из одно- и двухцепочечной ДНК и 5-гидроксицитозин (5-hC) и 5-гидроксиурацил (5-hU) из одноцепочечной ДНК. N-концевая часть NEIL3 содержит мотив H2TH, а C-конец содержит мотив цинкового пальца для связывания ДНК. В консервативном N-конце остаток Val заменяет каталитический Pro, обнаруженный у большинства представителей семейства Nei [157]. Исследования на *neil3*-дефицитных мышах [158,159] показывают, что эти животные жизнеспособны, плодовиты и здоровы во взрослом возрасте и не проявляют нестабильности генома. Тем не менее, у старых мышей с нокаутом гена *neil3* обнаруживаются нарушения, связанные со сниженным обучением и памятью, демонстрируя, что NEIL3 играет определенную роль в поддержании нейрогенеза [158,159].

Недавно была выдвинута гипотеза о роли NEIL3 в атерогенезе и регуляции метаболизма липидов на основании стимуляции атеросклероза у мышей на диете с высоким содержанием жиров [160]. Это открытие подтверждает участие ДНК-гликозилаз в регуляции энергетического метаболизма. У пациентов с множественными колоректальными аденомами были обнаружены шесть полиморфных вариантов NEIL3 (Pro117Arg, Arg38Cys, Gln172His, Arg315Gln, Arg520Gly и Glu132Val), но только Glu132Val, обнаруживался у пациента, и не был найден в контрольной группе [68].

Интересно отметить, что несмотря на то, что обнаружен ряд полиморфных вариантов фермента NTH1, идентифицированных в базах, пока ни один из них не был связан с каким-либо заболеванием [161].

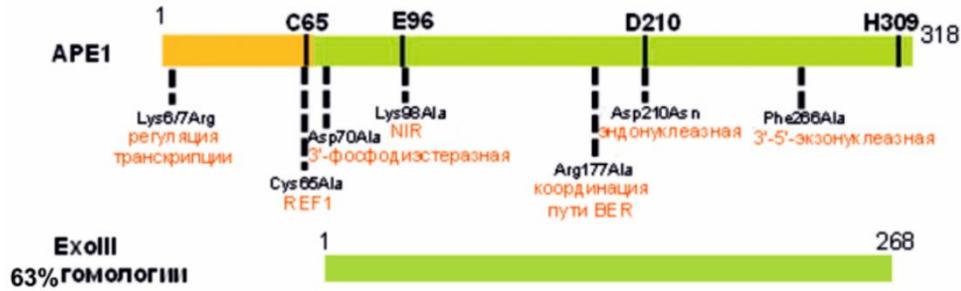
1.3 Полиморфизмы АП-эндонуклеазы 1 (APE1)

АП-эндонуклеаза 1 человека (APE1) – ключевой фермент эксцизионной репарации оснований, отвечающий за гидролиз ДНК, содержащей АП-сайты и ряд других необъемных повреждений ДНК [162]. APE1 – это многофункциональный белок, состоящий из 318 аминокислот, который участвует в репарации ДНК и регуляции транскрипции. Считается, что его главная физиологическая функция – гидролиз фосфодиэфирной связи в ДНК с 5'-стороны от АП-сайта, приводящий к разрыву рибозофосфатного остова и образованию фрагментов цепи, содержащих 3'-гидроксильную группу и 2'-дезоксирибозо-5'-фосфат. Ген *apex1* кодирует основной фермент APE1, который обладает как АП-эндонуклеазной активностью, так и 3'-фосфодиэстеразной, 3'-фосфатазной, 3'-5'-эксонуклеазной и РНКазной активностями [163].

APE1 имеет заметную гомологию с экзонуклеазой III (Xth) *E. coli*, ферментом обладающим АП-эндонуклеазной, 3'-фосфодиэстеразной и 3'-5'-эксонуклеазной активностью [164]. Гомология составляет примерно 63%, ~ 260 аминокислотных остатков с С-конца APE1 являются консервативными. Именно этот участок составляет нуклеазное ядро этого белка у млекопитающих (рис. 11а). Предположительно приобретенная N-концевая область APE1, отвечает за внутриядерную локализацию этого фермента, его взаимодействия с нуклеиновыми кислотами и белками и способствует проявлению окислительно-восстановительной (RedOx) функции (REF1) [165]. Рентгеноструктурные исследования показали, что APE1 (аминокислотные остатки с 43 по 318) принадлежит к суперсемейству ферментов фосфоэстераз, имея в своей структуре четырехслойное ядро в виде α/β -сэндвича (рис. 11б), демонстрируя явное сходство с другими нуклеазами (Xth, ДНКазой I, РНКазой H) [166].

Ключевые элементы структуры APE1 включают в себя функционально важные отдельные области и уникальный активный сайт, который позволяет APE1 специфически распознавать, связываться и скользить по цепи ДНК в поисках АП-сайта, посредством взаимодействий с рибозофосфатным остовом ДНК [167].

а)



б)

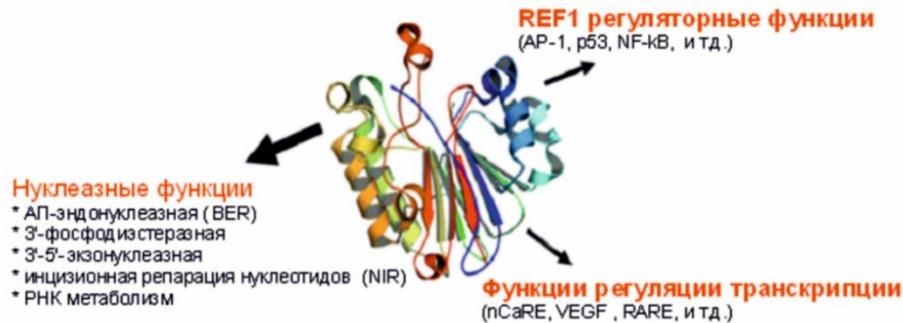


Рис. 11. Ключевые особенности APE 1. (а) Линейное сравнение белков APE1 человека Xth E. coli (Exo III). Редокс-домен APE1 изображен оранжевым, а нуклеазные домены APE1 и Exo III - зеленым. Указаны ключевые каталитические и функциональные остатки в APE1. (б) Пространственная структура APE1 и её биохимические функции. Рентгеноструктурные данные APE1 с четырехслойной α/β -складкой типа «сэндвич» (в центре). Все описанные биохимические функции белка указаны красным цветом, конкретные активности или целевые белки/гены указаны ниже или в скобках, соответственно.

Структурные данные [168–172] показали, что формирование комплекса APE1-ДНК вызывает конформационные перестройки в обеих взаимодействующих молекулах. Происходит изгиб ДНК, поврежденный нуклеотид выворачивается из двойной спирали в активный центр фермента, и эта вывернутая конформация стабилизируется путем встраивания некоторых боковых аминокислотных групп в двойную спираль ДНК (рис. 12а).

В сайте связывания ДНК у APE1 находятся остатки Arg73, Ala74, Lys78, Trp280, Asn222, Asn226 и Asn229, которые вступают в контакт с фосфатными группами ДНК дуплекса с 5'- и 3'-стороны от AP-сайта (рис. 12а). Стабилизация вывернутого из двойной спирали поврежденного нуклеотида осуществляется аминокислотными остатками Met270 и Arg177. Активный центр фермента содержит аминокислотные остатки Glu96, Tyr171, Asn174, Asp210, Asn212, Asp308 и His309 (рис. 12б). В каталитически компетентном состоянии гидролизуемая фосфодиэфирная связь, расположенная с 5'-стороны от AP-сайта, напрямую координируется остатками Asn174, Asn212 и His309.

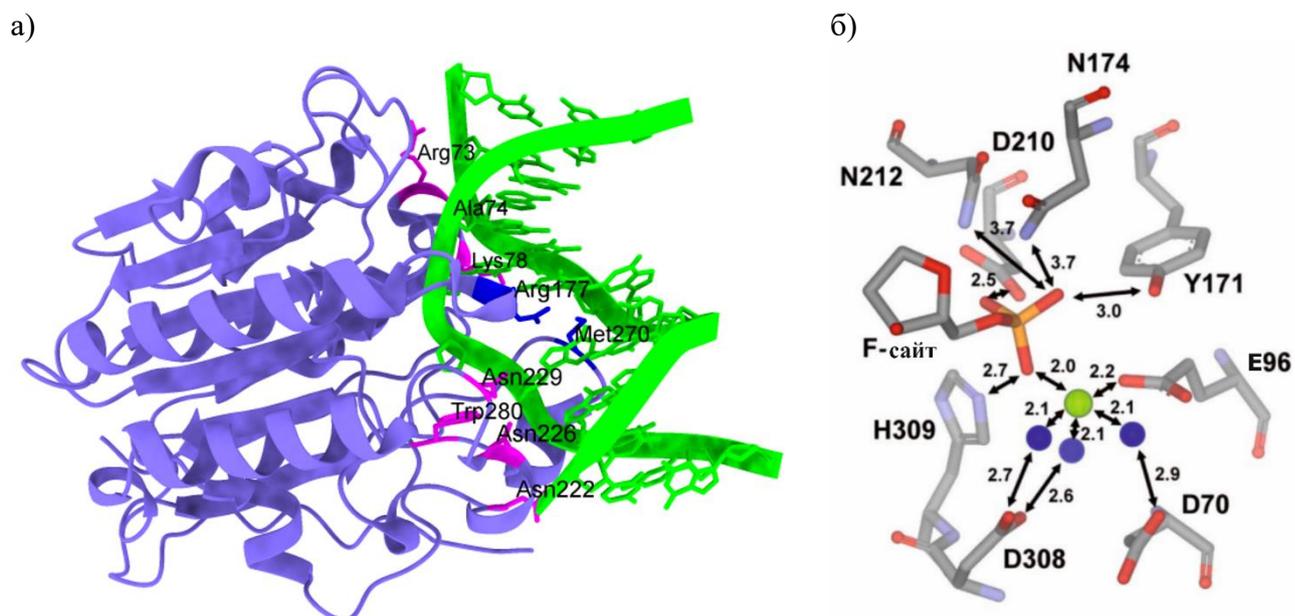


Рис. 12. Рентгеновская структура комплекса APE1 – ДНК. (а) Структура APE1 в комплексе с ДНК, содержащей F-сайт [PDB ID 1DE8]. Встраивающиеся в дуплекс ДНК остатки Met270 и Arg177 показаны синим цветом. Важные аминокислотные остатки ДНК-связывающего центра выделены розовым. (б) Контакты между ключевыми остатками активного центра, которые участвуют в координации подвижной фосфатной группы, иона Mg^{2+} (зеленый) и молекул воды (синий); расстояния выражены в Å (PDB ID 5DFF).

На сегодняшний день существует несколько альтернативных механизмов катализируемого APE1 гидролиза фосфодиэфирной связи в ДНК (рис. 13). Для проверки этих каталитических механизмов авторами многочисленных работ был использован широкий спектр мутантных форм фермента (Таблица 6).

По первоначально предложенной схеме (рис. 13а) [173] остаток His309 действует как основание. Asp283 стабилизирует протонированное состояние His309, образуя каталитическую триаду (вода-гистидин-аспартат). Координированный аминокислотным остатком Glu96 ион Mg^{2+} взаимодействует с фосфатной группой, тем самым нейтрализуя её отрицательный заряд и облегчая нуклеофильную атаку, что, в свою очередь, стабилизирует переходное состояние. Asp210 действует как донор протона для уходящей группы.

Позже на основе рентгеноструктурных данных [172], полученных для комплексов фермента с субстратом и продуктом, механизм действия APE1 был пересмотрен (рис. 13б). В новой схеме остаток Asp210 действует как обычное основание, активируя молекулу воды для нуклеофильной атаки фосфатной группы в ДНК, а остаток His309 стабилизирует отрицательно заряженное переходное состояние. Остатки Asn174 и Asn212, образующие водородные связи с гидролизуемой фосфатной группой, влияют на её ориентацию и стабилизацию переходного состояния.

Таблица 6. Функции некоторых аминокислотных остатков ДНК-связывающего и активного центров, выявленные с помощью сайт-направленного мутагенеза

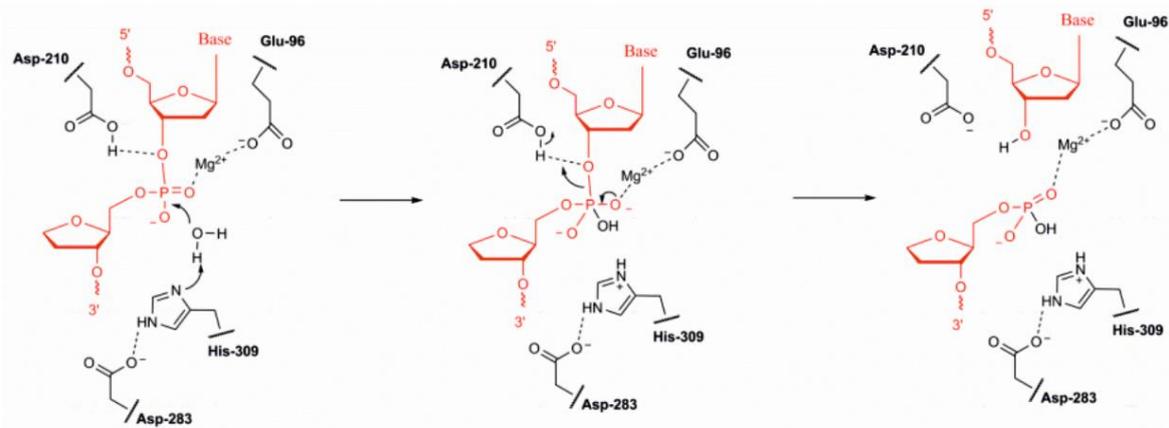
Аминокислотная замена	Влияние на активность	Предполагаемая роль аминокислотного остатка	Ссылки
Asp210Asn, Asp210Ala, Asp210His	полная инактивация	донор H ⁺ , * активация воды	[173–177]
His309Asn	активность снижена в ~10 ⁴ раз, сродство к ДНК снижено в 5 раз	активация воды, * стабилизация переходного состояния за счет взаимодействия с фосфатной группой	[172,175,176,178]
Tyr171His, Tyr171Phe, Tyr171Ala	активность снижена в ~10 ⁴ раз	возможный каталитический остаток в фенолятной форме, стабилизация переходного состояния за счет взаимодействия с фосфатной группой	[173,175,178–180]
Glu96Ala, Glu96Gln	активность снижена в 400–600 раз	координация ионов Mg ²⁺	[173–175]
Asp308Ala	активность снижена в 25 раз	координация ионов Mg ²⁺	[173,178,181]
Asp283Ala	активность снижена в 2000 раз	взаимодействие с His309	[172,178]
Asp70Ala, Asp70Arg	активность снижена в 25 раз	координация ионов Mg ²⁺	[173,174,178]
Arg177Ala	небольшое увеличение активности	специфическое взаимодействие с АП-сайтом в ДНК	[172]
Met270Ala	полностью активен	специфическое взаимодействие с АП-сайтом в ДНК	[172]
Asn212Ala	полная инактивация	взаимодействие с гидролизованной фосфатной группой, координация воды и стабилизация переходного состояния	[172,175,178,182]
Thr268Asp	активность снижена в 15 раз	контакт с 5'-фосфатом соседнего 3'-нуклеотида АП-сайта	[183]

*Эта роль не была подтверждена в последующих исследованиях.

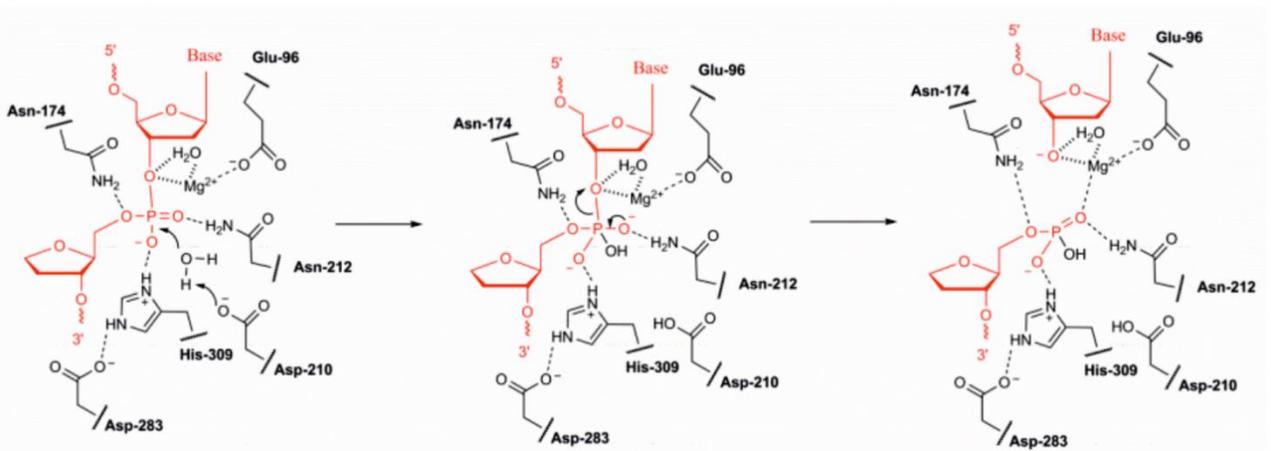
В более позднем исследовании [178] были получены рентгеновские структуры высокого разрешения комплекса АРЕ1 с субстратом и продуктом, а схема механизма эндонуклеазной реакции уточнена. Было высказано предположение, что в комплексе фермента с субстратом ион Mg²⁺ связан с Asp70, Glu96 и молекулой воды, которая контактирует с атомом кислорода гидролизуемой фосфодиэфирной связи. Молекула воды, действующая как нуклеофил, образует водородные связи с Asn212 и Asp210. Переходное состояние стабилизируется ионом Mg²⁺ и остатками Tyr171, His309, Asp210 и Asn212. В этом случае Mg²⁺ меняет свое положение и контактирует с атомом кислорода гидролизуемой фосфодиэфирной связи и атомом кислорода уходящей группы. В комплексе фермент-продукт, остаток Asn212 ориентирован в пространстве, образуя водородную связь с продуктом (рис. 13в). Альтернативные механизмы предполагают, что Tyr171 в форме фенолята атакует расщепляемую фосфатную группу [179] или His309, выступая как основание, генерирует атакующий нуклеофил [180]. Авторы этих работ

предполагают, что Tyr171 в фенолятной форме не только вовлечен во взаимодействие с ДНК, содержащей АП-сайт, но также может напрямую атаковать расщепляемую фосфатную группу.

а)



б)



в)

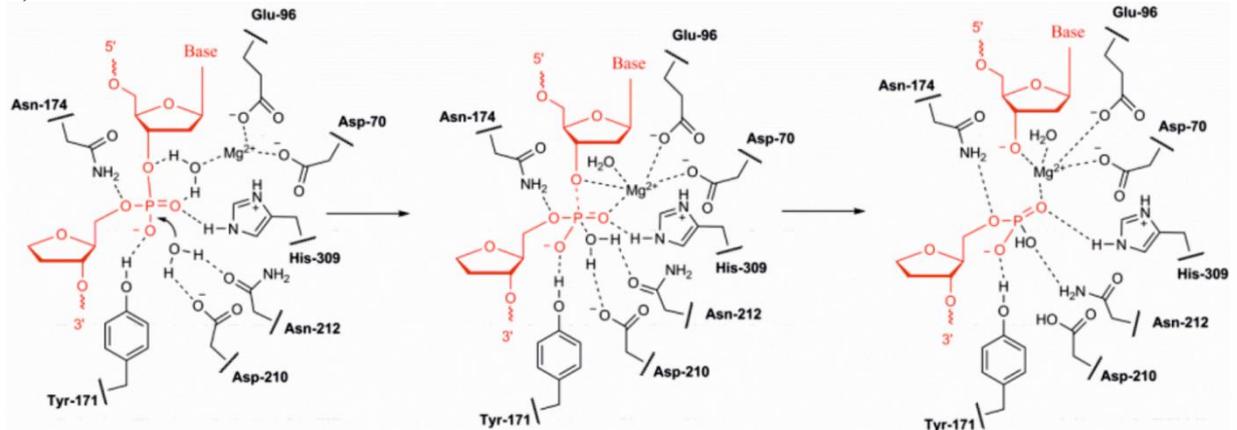


Рис. 13. Предполагаемые каталитические механизмы расщепления АП-сайта с помощью АРЕ1: (а) первоначальное предположение [173], (б) схема, предложенная в [172], (в) схема, предложенная в [178].

Действительно, фенолятный кислород Tyr171 располагается на расстоянии всего $\sim 1,5$ Å от гидролизуемой связи, что делает высоковероятной возможность прямого воздействия. Arg156, располагающийся на расстоянии 4,51 Å от тирозильного кислорода, может служить акцептором

протонов для генерации фенолят-иона. Находящаяся на противоположной стороне гидролизуемой фосфодиэфирной связи, пара His309/Asp210 может служить стабилизатором переходного состояния за счет взаимодействия с немостиковым кислородом.

Чтобы разрешить существующую в литературе неоднозначность о роли иона металла и нескольких каталитических механизмах процесс гидролиза АП-сайта был тщательно изучен с помощью теоретических подходов квантовой и молекулярной механики [184]. Было установлено, что двухступенчатый механизм расщепления инициируется нуклеофильной атакой остатком Asp210 молекулы воды. Было обнаружено, что критичный для процесса ион Mg^{2+} способствует переносу протона от активированной молекулы воды тем самым облегчая диссоциацию уходящей группы. His309, а также Tyr171 и Asn212, стабилизируют заряд на субстрате по мере протекания реакции. Asn212 и Tyr171 также играют ключевую роль на начальных этапах процесса, путем ориентирования в пространстве остатка Asp210 и нуклеофильной атаки молекулы воды в активном центре, соответственно. Несмотря на то, что ранее было предположено [180], что His309 должен быть нейтральным и инициировать реакцию, генерируя нуклеофил из молекулы воды, расчеты [184] показывают, что His309 должен быть протонирован, чтобы нейтрализовать заряд на промежуточно возникающем фосфоране, что хорошо согласуется с данными, полученными с помощью ЯМР и кристаллографии [171,178,185].

Как упоминалось выше, APE1 участвует в качестве центрального компонента BER. В частности, после удаления поврежденного основания субстрат-специфичной ДНК-гликозилазой, APE1 расщепляет образовавшийся АП-сайт, генерируя 3'-гидроксильную группу на одном конце разрыва цепи и остаток 2'-дезоксирибозофосфата (dRP) на 5'-конце. Основываясь на результатах биохимических и структурных исследований, можно сделать вывод, что эволюция APE1, по-видимому, была необходима не для повышения каталитической эффективности, а для регуляции и оптимизации всего процесса BER. Вероятно, что, оставаясь связанным с продуктом реакции, APE1 пытается облегчить «передачу» ДНК следующему ферменту в пути BER, а именно POL β . В пользу модели свидетельствует увеличение числа оборотов фермента при замене остатка Arg177 в APE1 [172,186]. Однако четких доказательств этого механизма нет.

Помимо АП-эндонуклеазной активности, APE1 обладает способностью удалять ошибочно спаренные или поврежденные нуклеотиды на 3'-конце цепи посредством своей 3'-5'-экзонуклеазной функции; удалять блокирующие группы, находящиеся на 3'-конце, такие как α,β -ненасыщенные альдегиды, фосфогликолаты и фосфаты; инициировать репарацию объемных повреждений оснований посредством процесса, называемого инцизионной репарацией нуклеотидов (NIR), и деградировать поврежденные молекулы РНК [187,188]. Следует отметить, что как биохимические, так и структурные данные указывают на то, что уникальные контакты

активного центра с участием Phe266 играют ключевую роль в деблокировании 3'-концов APE1 [189]. В дополнение к своей различной нуклеазной и RedOx-регуляторной активности, APE1, может действовать как неотъемлемый компонент транскрипционных комплексов, демонстрируя способность контролировать экспрессию даже собственного гена [190]. Как упоминалось выше, APE1 (REF1) часто является неотъемлемым компонентом транскрипционных комплексов, из-за его способности стимулировать ДНК-связывающую активность нескольких транскрипционных факторов посредством модуляции их окислительно-восстановительного статуса [191]. Этими транскрипционными факторами, в которых APE1 активируется посредством этого механизма, являются AP-1, NF κ B, HIF1 α и p53 [192]. RedOx-активность APE1 может быть отключена заменой остатка Cys65 на Ala. Однако, поскольку APE1 лишен мотива C-X-X-C, общего для большинства белков, участвующих в окислительно-восстановительных регуляциях, изомеризации и восстановлении дисульфидных связей, точный механизм, который APE1 использует для активации факторов транскрипции, остается загадкой [193,194]. Есть некоторые свидетельства того, что Cys93 играет роль в RedOx-активности APE1, но и Cys65, и Cys93 скрыты в структуре белка и расположены слишком далеко друг от друга, чтобы образовывать дисульфидную связь. Несмотря на это, была предложена модель, в которой Cys65 действует как нуклеофил для восстановления дисульфидной связи в целевом факторе транскрипции, а Cys93 служит в качестве вспомогательного остатка [195]. В этой модели APE1 должен претерпевать большие конформационные изменения или частично разворачиваться, чтобы сделать доступным третий остаток Cys, для того чтобы облегчить реакцию. Очевидно, что необходимы дальнейшие исследования для определения точного механизма функционирования APE1 в роли фактора REF1 [196].

В гене *apex1* был идентифицирован ряд полиморфизмов, но наиболее распространенным полиморфным вариантом является Asp148Glu, присутствующий примерно у 46% населения. Вариант белка Asp148Glu, а также другие варианты, такие как Gly241Arg и Gly306Ala, были биохимически охарактеризованы и показали схожую с диким типом АП-эндонуклеазную и ДНК-связывающую активности [197,198]. Полиморфные варианты APE1 Leu104Arg, Glu126Asp и Arg237Ala демонстрируют снижение АП-эндонуклеазной активности на 40-60%, в то время как вариант Asp283Gly проявляет только 10% репарационной активности по сравнению с APE1 дикого типа [199]. В таблице 7 и на рисунке 14 представлено расположение данных аминокислотных остатков в структуре белка и возможные изменения вследствие их замены.

В работе [200] авторы, используя метод молекулярного моделирования, показали влияние двух SNP вариантов APE1 I64T и P311S на физико-химические свойства белковой глобулы (рис. 15). Было показано, что эти изменения вызывают потерю термодинамической стабильности, а

также aberrantную укладку белка. Эти изменения могут модифицировать структуру APE1, что в свою очередь может влиять на способность белка APE1 связываться с ДНК. Кроме того, было обнаружено, что наличие этих мутаций приводит к изменению гидрофильной области в APE1.

Таблица 7. SNP-варианты APE1 и предполагаемое влияние аминокислотной замены на эндонуклеазную функцию на основании молекулярного моделирования [197]

Полиморфные варианты APE1	Прогнозируемое влияние аминокислотной замены
L104R	Расположен между β -листом № 2 и α -спирали № 3; замена Leu на Arg может привести к локальным структурным изменениям в белке за счет нарушения гидрофобного взаимодействия с L72, L108 и W119 и возникновения новых взаимодействий с E106 и E107
E126D	Поверхностный остаток, участвующий в отталкивающем электростатическом взаимодействии с остовом ДНК; замена Glu на аналогичный Asp не должна влиять на связывание
D148E	Расположен перед началом α -спирали № 4 — на поверхности белка; консервативная замена вряд ли повлияет на ферментативную активность
R237A	Расположен внутри α -спирали № 9; R237 стабилизирует два отрицательно заряженных остатка E216 и E217; замена Arg на Ala, вероятно, будет способствовать локальной структурной нестабильности
G241R	Расположен в середине α -спирали № 9; неконсервативная замена, которая может немного стабилизировать спираль из-за более сильной склонности Arg к образованию спирали
D283G	Функциональный остаток активного сайта (ориентирует H309 и стабилизирует его положительный заряд); Замены D283A или D283N приводят к 10-кратному снижению эндонуклеазной активности
G306A	Расположен перед β -листом № 14; замена на Ala может снизить каталитическую эффективность за счет изменения углов phi, psi G306, тем самым способствуя конформационным изменениям в этой области, которые приводят к перемещению и выравниванию ДНК относительно аминокислотного остатка активного центра H309

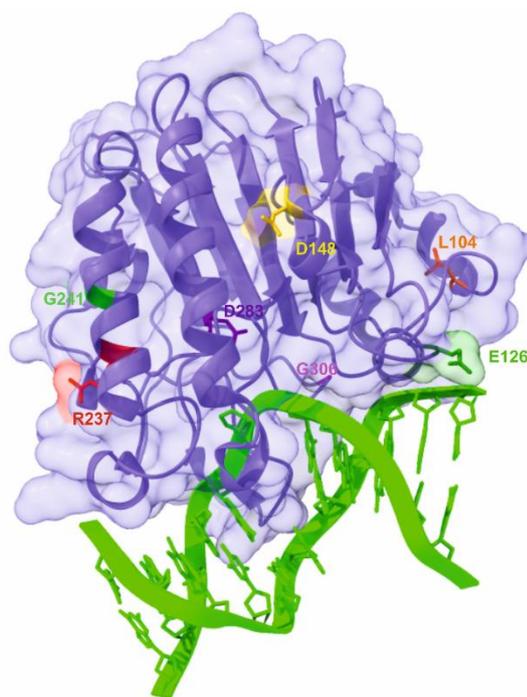


Рис. 14. Полиморфные варианты [197] показаны в контексте трехмерной молекулярной структуры APE1 в комплексе с ДНК (PDB ID 1DE8). L104 (оранжевый), E126 (зеленый), D148 (желтый), R237 (красный), G241 (зеленый), D283 (фиолетовый) и G306 (розовый). ДНК обозначена зеленым цветом.

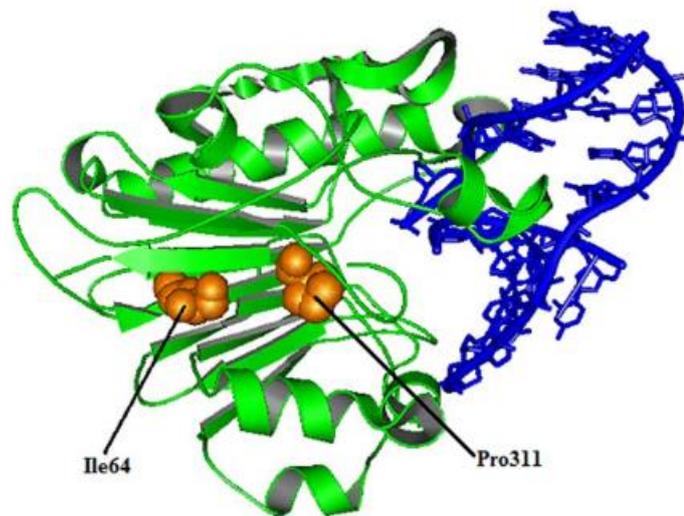


Рис. 15. Модельный комплекс APE1-ДНК с нативными аминокислотными остатками изолейцином и пролином в положениях 64 и 311 соответственно [200].

Полиморфные варианты APE1 Gln51His, Ile64Val, Pro12Leu и Arg237Cys были обнаружены в опухолях эндометрия [201]. Arg237Cys ведет себя аналогично Arg237Ala, обладая существенно сниженной по сравнению с APE1 дикого типа АП-эндонуклеазной активностью [197].

Важным выводом из многочисленных исследований, проведенных с целью выявления функциональных особенностей полиморфных вариантов APE1 и их возможной ассоциации с заболеваниями, является то, что методы молекулярно-динамического моделирования, используемые для прогнозирования влияния SNP на структуру/функцию белка и не совпадали с экспериментальными результатами. Так, например, в работе [202] по изучению вариантов популяции, которые не были конкретно связаны с заболеванием человека (Q51H, I64V, D148E, G241R, P311S и A317V (рис. 16)), авторы не выявили значимых изменений функции белка. Такой результат может указывать на то, что любое кардинальное нарушение активности APE1 будет несовместимо с выживанием и, следовательно, не сохранится в здоровой популяции. Тот факт, что полиморфные замены Q51H, I64V или D148E (как видно из других исследований [198,203]), не имели функциональных или структурных последствий, позволяет предположить, что эти белки не играют прямой роли в риске заболевания. Кроме того, ассоциированный с раком мутант P112L вел себя подобно ферменту дикого типа во всех анализах, что означает, что этот вариант не участвует в канцерогенном исходе. Единственным вариантом, который действительно демонстрировал дефект, был белок R237C, ассоциированный с раком эндометрия.

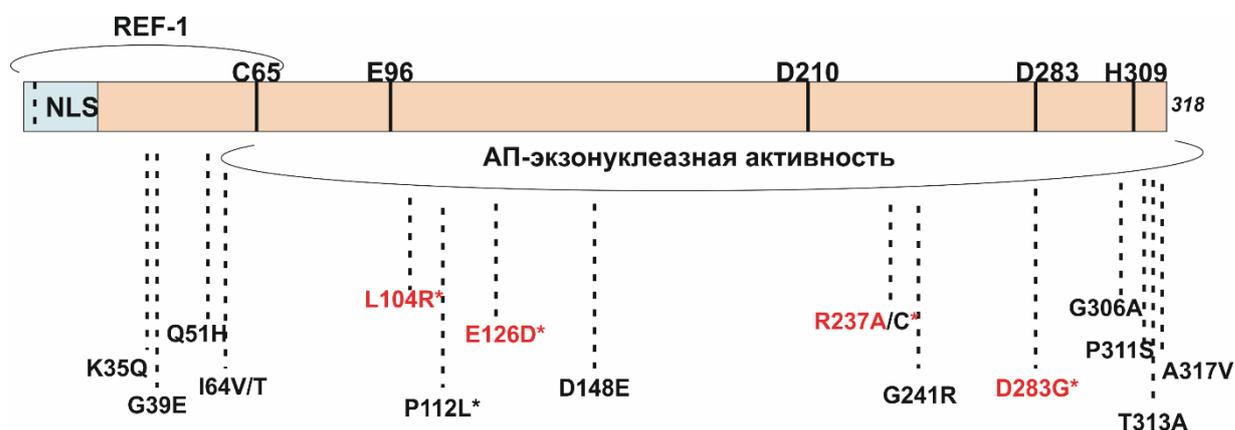


Рис. 16. Положения аминокислотных остатков, ассоциированных с SNP-заменами, в последовательности APE1 [202]. NLS – сигнальная последовательность ядерной локализации; REF-1 – редокс-регуляторная часть белка; * отмечены уникальные варианты, связанные с заболеваниями; красным цветом обозначены варианты со сниженной АП-эндонуклеазной активностью. Дополнительно обозначены функционально важные аминокислотные остатки (C65, E96, D210, D283 и H309).

Таким образом, можно сказать, что наследование мутаций в генах белков BER с потерей функции, ведущих к возникновению заболеваний человека, наблюдается в основном для ДНК-гликозилаз (MUTYH-ассоциированный полипоз и синдром наследственного колоректального рака, возникающий из-за дефекта ДНК-гликозилазы MUTYH; синдром гипер-IgM V – иммунодефицитное заболевание, возникающее в результате дефекта урацил-ДНК-гликозилазы), что вероятно связано с перекрывающейся субстратной специфичностью у ДНК-гликозилаз. Для APE1 нормальное функционирование является жизненно важным для выживания клетки, поскольку даже нокаут APE1 повышает частоту мутаций, чувствительность к окислительному стрессу и частоту образования опухолей [204,205], а нокаут ведет к эмбриональной летальности. Поэтому можно сделать вывод, что все существующие природные варианты APE1 должны обладать каталитической активностью не ниже некоторого порогового значения, достаточного для полноценной ферментативной активности в клетке. Тем не менее, поскольку АП-эндонуклеаза является многофункциональным ферментом, аминокислотные замены, ассоциированные с SNP, могут оказывать большое влияние как на различные каталитические функции APE1, так и на взаимодействия с другими ферментами BER или нуклеосомой. Вероятнее всего, для прогнозирования возможного заболевания человека вследствие нарушения репарации ДНК необходимо учитывать не SNP конкретного белка, а сочетание различных полиморфизмов белков BER [7,206].

1.4 Полиморфизмы полимеразы β (POL β)

POL β является основной ДНК-полимеразой, участвующей в BER, и обладает ДНК-полимеразной и dRP-лиазной активностями (рис. 17а). POL β представляет собой небольшой фермент (39 кДа), который, в отличие от репликативных ДНК-полимераз, не обладает какой-либо

экзонуклеазной корректирующей активностью. Это приводит к тому, что POL β способна ошибочно включать неправильный нуклеотид примерно один на каждые 10 000 [207]. Также POL β , как и многие другие ДНК-полимеразы, может катализировать присоединение рибонуклеотидов с эффективностью на четыре порядка ниже, чем для dNTP [208].

POL β состоит из двух основных доменов: 8 кДа, который отвечает за dRP-лиазную активность, и 31 кДа, отвечающий за ДНК-полимеразную активность. Домен 31 кДа имеет три субдомена, названных большой палец, ладонь и пальцы из-за их структурной схожести с рукой (рис. 176) [209].

Из литературных данных известно, что мутации в гене *pol β* обнаруживаются в 30% случаев исследованных опухолей, но не обнаруживаются в нормальных тканях [210]. Показано, что мутации, которые даже слегка изменяют конформацию или фолдинг белка, могут изменять его каталитическую активность, что приводит к аберрантному фенотипу [211].

В одной из работ было показано, что SNP-ассоциированная замена Leu22Pro, обнаруженная при раке желудка, приводит к потере dRP-лиазной активности [212] и к снижению в несколько раз эффективности связывания фермента с ДНК, однако нуклеотидилтрансферазная активность сохраняется. Примечательно, что Leu22 не является каталитическим остатком. Эту роль выполняет Lys72 [213], но Leu22 стабилизирует α -спираль структурного мотива спираль-шпилька-спираль (HhH) (аминокислотные остатки 55–79) [214]. Видимо, SNP-ассоциированные замены в этом домене могут препятствовать связыванию POL β с ДНК, удалению dRP группы на 5'-конце и заполнению бреши, приводя к накоплению промежуточных продуктов BER, что в конечном итоге приводит к снижению эффективности удаления повреждений.

Замены в пределах 31 кДа домена полимеразы могут привести к нарушению полимеразной функции. Например, вариант Glu295Lys, обнаруженный у пациентов с карциномой желудка, связывает ДНК с той же эффективностью, что и WT POL β , но не обладает полимеразной активностью, что делает его неполноценным участником BER [215]. Мутантная форма, содержащая замену Glu295Lys, также сохраняет dRP-лиазную активность. Glu295 расположен в субдомене большого пальца POL β [216]. На основании рентгеноструктурных данных можно предположить, что в отсутствие ДНК и дезоксирибонуклеотидтрифосфатов субдомен большого пальца пространственно ближе к субдомену ладони, а остаток Asp192 образует анионную связь с Arg258, тогда как Glu295 и Tyr296 образуют водородные связи с остатком Arg258. Замена Glu295Lys существенно изменяет полярность этого аминокислотного остатка и, как следствие этих изменений, Asp192 не может участвовать в стадии переноса дезоксирибонуклеотидтрифосфата.

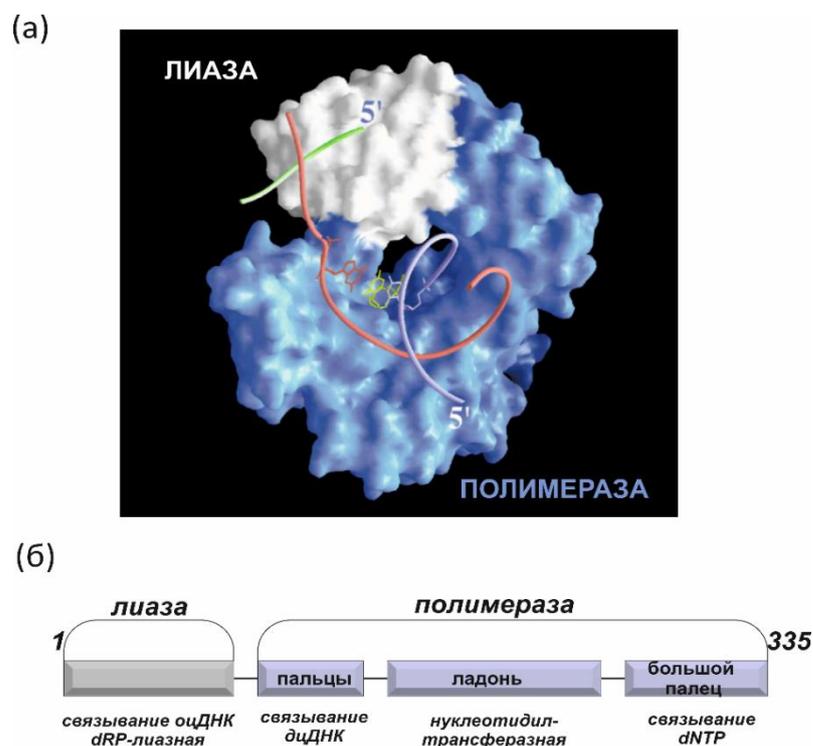


Рис. 17. (а) Кристаллографическая структура ДНК-полимеразы β в комплексе с ДНК-субстратом, содержащем брешь. (б) Структура ДНК-полимеразы β , иллюстрирующая основные домены/субдомены и их функции. [207]

Еще одним участком белка, критичным для правильного функционирования POL β , является, «гидрофобный шарнир», расположенный в полимеразном 31 кДа домене, который претерпевает конформационные перестройки во время связывания с dNTP и является критичным для обеспечения точности полимеразы. Мутации в гене, приводящие к заменам в аминокислотных остатках этой области, таких как Ile260, Ile174 или Tyr265, влияют на способность фермента различать правильные и неправильные dNTP, что может привести к усилению мутагенеза [217,218]. Эта гипотеза была подтверждена рядом работ, например, авторами одной из них было показано, что замена Ile174 на Ser приводит к активной форме белка, которая демонстрирует снижение точности встраивания правильного нуклеотида напротив G в матрице [218]. Авторами другой работы было показано, что вариант POL β Pro242Arg демонстрирует не только снижение точности, но и снижение скорости синтеза ДНК [219]. Еще одним вариантом, имеющим более низкую ДНК-полимеразную активность по сравнению с WT POL β , является Arg137Gln [219]. Этот полиморфный вариант POL β пока еще не связан ни с одним типом рака. Замена Arg на Gln приводит к потере положительного заряда и может привести к существенным изменениям биохимических свойств фермента. Кроме того, Arg137 в POL β является сайтом метилирования ферментом PRMT1 [220]. Известно, что замена Arg137Gln нарушает белок-белковые взаимодействия между POL β и PCNA [221]. Также было продемонстрировано, что замена Arg137Gln нарушает эмбриональное развитие у мышей и

повышает чувствительность к агентам, повреждающим ДНК, таким как H_2O_2 и метилметансульфонат [220].

Ещё один полиморфный вариант POL β Arg152Cys обнаруживают у пациентов с аденокарциномой прямой кишки. Замена Arg152, расположенного на поверхности белковой глобулы, на цистеин ведет к изменению общего заряда фермента [222]. Кроме того, известно, что Arg152 является сайтом метилирования в [223]. Анализ третичной структуры полиморфного варианта с помощью спектроскопии кругового дихроизма не показал наличия структурных отличий от фермента дикого типа. Однако этот вариант демонстрирует более низкую полимеразную активность при удлинении праймера и заполнении однонуклеотидной бреши в ДНК-дуплексе [224]. Эксперименты с ядерными экстрактами клеток НЕК293, экспрессирующими вариант POL β Arg152Cys и фермент дикого типа, показывают, что репарация ДНК-дуплексов, содержащих остаток уридина или тетрагидрофурана, происходит менее эффективно в случае POL β Arg152Cys [224].

Вариант POL β Asp160Gly локализован в субдомене ладони и обнаруживается у пациентов с карциномой почки [225]. Было показано, что эта замена увеличивает скорость реакции удлинения цепи праймера и заполнения однонуклеотидных пробелов [226]. Более высокая эффективность этих реакций по сравнению с ферментом дикого типа может быть связана с более сильным сродством этого SNP варианта к ДНК [226].

Полиморфный вариант POL β His285Asp был обнаружен у пациентов с раком прямой кишки [227]. Сравнение спектров кругового дихроизма показало, что общая укладка белковой глобулы у фермента дикого типа и этой мутантной формы не отличается [211]. Исследования предстационарной кинетики взаимодействия His285Asp с ДНК, содержащей разрыв, показали, что наблюдаемые константы скорости реакции были сходны между ферментом дикого типа и полиморфным вариантом ($k_{\text{obs}} = 14 \pm 2 \text{ c}^{-1}$ и $k_{\text{obs}} = 16 \pm 1 \text{ c}^{-1}$, соответственно); после быстрой каталитической стадии присоединения нуклеозидмонофосфата к ДНК следует более медленная стадия диссоциации комплекса фермента с продуктом. Константы диссоциации комплекса фермент–продукт оказались сравнимыми между мутантным и диким типом POL β ($K_{\text{d}} = 9,2 \pm 0,7 \text{ нМ}$ и $K_{\text{d}} = 6,7 \pm 0,8 \text{ нМ}$, соответственно) [211]. His285 расположен в α -спирали субдомена большого пальца. Эта спираль охватывает аминокислотные остатки 275–289, часть из которых важна для точности POL β . Данная α -спираль контактирует с ДНК вдоль малой бороздки, когда POL β находится в закрытой конформации (связана с ДНК), и становится возможным образование кармана для связывания dNTP. His285 находится в непосредственной близости от Lys289, а азот его имидазольного кольца образует водородную связь с карбонильным кислородом основной цепи Ile323. Взаимодействия атомов азота Lys289 и His285 с карбонильным кислородом Ile323,

по-видимому, важны для правильного расположения С-концевых неструктурированных аминокислотных остатков 320–335 [211].

Два полиморфных варианта POL β Glu288Lys и Lys289Met, расположенных на конце α -спирали в субдомене «пальцы», ассоциированы с раком прямой кишки [228,229]. Вариант POL β Glu288Lys не отличается по термостабильности и вторичной структуре от фермента дикого типа, однако имеет более низкую точность заполнения однонуклеотидного пробела напротив аденозина. Удивительно, но эта потеря точности характерна только для адениновых матриц, так как результаты анализа для ДНК-субстратов, содержащих другие основания, такие же, как и для POL β дикого типа [228]. Вариант Lys289Met чаще присоединяет некорректный нуклеозидмонофосфат напротив цитидина в ДНК из-за плохой дискриминации нуклеотидов в ходе трансферазной реакции [229].

Таким образом, если полиморфный вариант POL β не активен и не способен связывать ДНК, он все же может взаимодействовать с белками BER, мешая им выполнять свои функции и тем самым косвенно вызывая накопление повреждений. Варианты, которые имеют более низкую скорость катализа, могут быть мутагенными. Поскольку если SNP вариант связывает ДНК и медленно выполняет свою полимеразную функцию, это может привести к замедлению или остановке репликационной вилки, что приведет к двунитевому разрыву и, как следствие к общей нестабильности генома.

Известные данные для SNP-вариантов POL β суммированы в Таблице 8.

Таблица 8. SNP-варианты POL β

<i>SNP-вариант POLβ</i>	<i>активность</i>	<i>предположительные ассоциации с онкозаболеваниями</i>
Leu22Pro	снижено сродство к ДНК, нуклеотидилтрансферазная активность как у WT, dRP-лиазная активность отсутствует	рак желудка
Glu295Lys	сродство к ДНК как у WT, полимеразная активность отсутствует	карцинома желудка
Ile174Ser	активен, снижена точность встраивания напротив G	
Pro242Arg	снижена точность, снижена полимеразная активность	
Arg137Gln	снижена полимеразная активность	
Arg152Cys	снижена полимеразная активность	аденокарцинома прямой кишки
Asp160Gly	повышена полимеразная активность, повышено сродство к ДНК	карцинома почки
His285Asp	WT	рак прямой кишки
Glu288Lys	снижена точность встраивания напротив A	рак прямой кишки
Lys289Met	снижена точность встраивания напротив C	рак прямой кишки

1.5 Полиморфизмы ДНК-лигазы III α (LigIII α) и XRCC1

Лигаза III α (LigIII α) зашивает разрыв в цепи ДНК, оставшийся после того как POL β заполнит пробел и устранил dRP-группу. Существует три формы LigIII: α , β и митохондриальная; все они кодируются одним и тем же геном. LigIII α функционирует в клетке в комплексе с белком XRCC1, необходимым для ядерной локализации и защиты от протеолиза (рис. 18б). LigIII β обнаруживается только в мужских половых клетках, где, как полагают, она участвует в мейотической рекомбинации. Митохондриальная LigIII (mtLigIII) имеет N-концевой сигнал локализации и функционирует в репарации повреждений митохондриальной ДНК в отсутствие XRCC1.

После связывания с ДНК LigIII α оборачивает собой ДНК (рис. 18а). Это позволяет ДНК-связывающему домену изгибать ДНК и раскручивать ее, открывая доступ к разрыву ДНК для каталитического домена. Следствием такого взаимодействия LigIII α с ДНК-субстратом является то, что комплекс LigIII α -XRCC1 разрушает нуклеосомы, содержащие одностранные разрывы. В результате брешь в ДНК более доступна для действия POL β извне и, таким образом, активность POL β стимулируется на нуклеосомах с помощью комплекса LigIII α -XRCC1 [230].

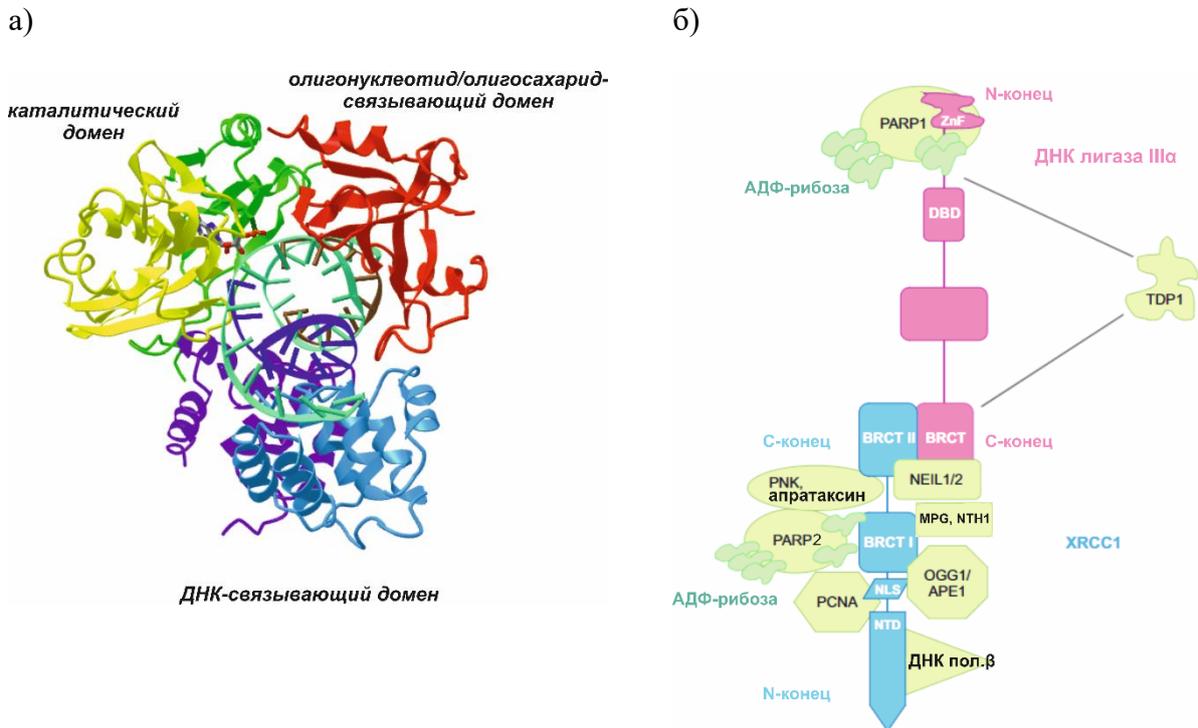


Рис. 18. ДНК-лигаза III α . (а) Структура комплекса ДНК-лигазы III α с ДНК, содержащей разрыв (в каталитическом домене присутствует ковалентно-связанная молекула АМФ) PDB3L2P. (б) Белковые партнеры комплекса ДНК-лигазы III α /XRCC1. Структурные домены ДНК-лигазы III α (розовый) и XRCC1 (синий), которые участвуют во взаимодействиях с другими белками репарации ДНК [2,231].

Подобно мышам с нокаутом APE1, мыши, содержащие нокаут LigIII α , являются эмбриональными летальными [232]. Хотя существует ряд полиморфных вариантов LigIII α ,

идентифицированных в базах данных (R30C, R100C, G190C, R224W, D349G, D679V, R780H, K811T, R867H, S887F, K898T, P899S, T927M), ни один из них еще не был функционально охарактеризован и/или ассоциирован с болезнью [233]. Поскольку ДНК-лигазы имеют решающее значение для ряда процессов репарации ДНК, а также для репликации, возможно, присутствие даже небольших изменений в лигазе, ведущих к сбоям в её работе, будет не совместимо с жизнью.

XRCC1 представляет собой ядерный белок, который действует как архитектурный фактор, обеспечивающий сборку мультибелковых комплексов благодаря мультидоменной структуре и высокому сродству к поли(АДФ-рибозе), облегчая тем самым сборку репарасом в BER и репарации одноцепочечных разрывов [234,235]. Для XRCC1 было идентифицировано довольно много SNP вариантов (R5H, R7P, V10M, V72A, R107H, E157K, P161L, N183S, R194W, A214V, R280H, K298N, T304A, P309S, R399Q, V381M, S485Y, E491K, L514P, H528Y, R559Q, R560W, Y576N, Y576S), причем некоторые из них встречаются с достаточно высокой частотой [161]. Был предпринят ряд попыток охарактеризовать три основных полиморфных варианта XRCC1 человека: Arg194Trp, Arg280His и Arg399Gln. Первый такой анализ показал, что Arg399Gln полностью сохраняет чувствительность к алкилирующему агенту метилметансульфонату (MMS) в клетках EM9 [236]. Тогда как в другом исследовании [237], Arg280His и Arg399Gln продемонстрировали слабое снижение репарационной активности в клетках того же типа, обработанных рядом генотоксинов. В работе [238] было показано, что Arg399Gln, в отличие от вариантов Arg194Trp или Arg280His, демонстрировал неспособность скорректировать индуцированное блеомицином увеличение частоты микроядер в клетках EM9. Еще одно исследование показало, что Arg280His лишь частично сохранял чувствительность к MMS в клетках EM9, демонстрируя снижение репарации одноцепочечных разрывов, в то время как Arg194Trp проявлял активность близкую к активности белка дикого типа [239]. Наконец, изучение ряда биохимических активностей нескольких вариантов XRCC1, включая Arg194Trp, Arg280His и Arg399Gln, показало, что Arg280His проявляет слабое снижение способности связываться с ДНК, демонстрируя при этом нормальное взаимодействие с белками-партнерами POL β , PARP1, LigIII α и PCNA [240]. Другие полиморфные варианты, а также редкие варианты P161L и Y576S не показали отличия от фермента дикого типа в процессах взаимодействия с указанными выше белками, а также с ДНК. Попытки охарактеризовать полиморфные варианты XRCC1 до сих пор не дали четкого понимания того, какие из них проявляют измененную активность. Хотя большинство данных указывает на то, что замена Arg280 на His ведет к дефекту функционирования XRCC1, тогда как доказательств того, что Arg194Trp обладает нарушенной функцией, в настоящее время нет. Несоответствие в экспериментальных результатах может быть связано с тем фактом, что описанные аминокислотные замены привносят лишь незначительный

и, следовательно, трудно обнаруживаемый дефект в активности белка, а также различиями в используемых для оценки функции белка методах и подходах. Всё это говорит в пользу необходимости применения нескольких независимых методов, которые бы принимали во внимание различные независимые молекулярные функции рассматриваемого белка для количественной оценки его функциональной способности.

1.6. Заключение

Стабильность генетической информации в живой клетке – ключ к ее нормальному функционированию. На сегодняшний день не остается сомнений, что повреждения ДНК играют важную роль в возникновении различных заболеваний, среди которых можно отметить онкологические, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные и другие. Процесс эксцизионной репарации оснований включает действие множества ферментов и отвечает за удаление из ДНК огромного числа повреждений. При этом этот процесс крайне важен для организма, поскольку мыши, дефицитные по ключевым участникам BER, таким как APE1, POL β и LigIII α , являются эмбрионально летальными. На моделях мышей также было установлено, что ДНК-гликозилазы, распознающие повреждения в ДНК, проявляют взаимодублирующие функции, обладая перекрывающимися спектрами субстратной специфичности. Таким образом, уменьшение активности одной из ДНК-гликозилаз не приводит к летальному исходу, но, как правило, сопровождается повышенным уровнем накопления мутаций в геноме.

Необходимо отметить, что у человека уменьшение общего уровня репарационной активности в процессе BER может быть вызвано природными однонуклеотидными полиморфизмами в генах ферментов репарации ДНК. Действительно, SNPs широко распространены в популяции людей, а взаимосвязь между SNP и этиологией некоторых заболеваний человека остается открытой областью исследований. При этом один из актуальных вопросов заключается в выяснении роли SNPs в предрасположенности к развитию различных заболеваний. Совокупность литературных данных позволяет предположить, что для предсказания риска развития того или иного заболевания у конкретного человека, скорее всего, необходимо рассматривать комбинацию полиморфизмов различных белков BER, а не отдельный полиморфизм в гене какого-то одного белка. Таким образом, обладая знаниями, открывающими более полную картину об уровне репарационной активности конкретного индивидуума, в перспективе, можно будет предсказать предрасположенность к заболеванию и, возможно, составить успешную стратегию лечения.

Однако сложность определения взаимосвязи между отдельными полиморфизмами в генах ферментов репарации и их эффектом на репарационную способность конкретного организма

заключается в том, что SNP-ассоциированные замены аминокислотных остатков ферментов репарации могут приводить как к потере функциональных свойств самих ферментов, так и нарушению координированного действия всех участников процесса репарации. В связи с этим в данной работе проведен детальный экспериментальный анализ каталитических свойств природных полиморфных вариантов ряда ферментов эксцизионной репарации оснований ДНК, а именно ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4 и АП-эндонуклеазы APE1 человека, и апробирован чувствительный флуоресцентный способ определения активности ключевых ферментов эксцизионной репарации оснований в клетках человека.

2. Материалы и методы

2.1. Растворы и реагенты

В работе были использованы: акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, персульфат аммония, мочеви́на, трисгидрооксиметиламинометан (Tris), дитиотреит (DTT), глицерин, тетраборат натрия, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), имидазол, одно- и двузамещенный фосфат натрия, одно- и двузамещенный фосфат калия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид магния, сульфат никеля (Sigma, США), агар, пептон, дрожжевой экстракт, изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (Thermo Fisher Scientific, США), перхлорат лития, уксусная кислота (Panreac, США), N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоно́вая кислота (HEPES), пиперидин, Coomassie G-250 (Serva, Германия), бычий сывороточный альбумин (BSA), 2-меркаптоэтанол (Ferah, Германия). Также были использованы отечественные препараты степени чистоты о.с.ч. Все растворы готовили на дважды дистиллированной воде.

Ферменты SMUG1, MBD4^{cat} и APE1 дикого типа, а также мутантные формы APE1 D210N, APE1 T268D и APE1 D308A предоставлены научным руководителем. Мутантная форма фермента APE1 N212A любезно предоставлена Канажевской Л.Ю. (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск).

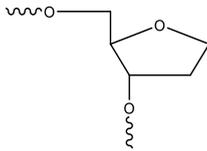
В работе были использованы олигодезоксирибонуклеотиды, приведенные в Таблице 9. В качестве ДНК-субстратов с нерасщепляемым ДНК-гликозилазами аналогом АП-сайта были использованы олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие в своей последовательности остаток 2-гидроксиметил-3-гидрокси-тетрагидрофурана (рисунок 19а, F-сайт). Для регистрации локальных конформационных изменений ДНК в субстраты, содержащие F-сайт, вводили флуоресцирующий аналог основания aPu в комплементарную цепь напротив повреждения. Для регистрации глобальных конформационных перестроек, происходящих со структурой ДНК-субстратов в процессе взаимодействия с ферментами, использовали FRET-пару: остаток 6-карбоксихлорофлоресцеина (FAM) в качестве флуорофора и остаток «black hole quencher 1» (BHQ1) в качестве тушителя. В качестве специфических ДНК-субстратов для ферментов SMUG1, AAG, NEIL1 и OGG1 использовали олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие такие повреждения, как U, ϵ A, Tg и ohoG, соответственно. В качестве неспецифического субстрата использовали канонический ДНК-дуплекс. Структуры F-сайта, поврежденных нуклеотидов и флуорофорных групп, используемых в работе, представлены на рисунке 19.

Таблица 9. Олигодезоксирибонуклеотиды, входящие в модельные ДНК-субстраты

Сокращение	Последовательность
F\G	5'-TCTCTCFCTTCC-3' 3'-AGAGAGGGGAAGG-5'
F\aPu	5'-TCTCTCFCTTCC-3' 3'-AGAGAG(<i>aPu</i>)GGAAGG-5'
FRET-F (1)	5'-FAM-GCTCAFGTACAGAGCTG-3' 3'-CGAGTGCATGTCTCGAC-BHQ1-5'
FRET-F (2)	5'-FAM-GCTCAFGTACAGAGCTG-3' 3'-BHQ1-CGAGTGCATGTCTCGAC-5'
U\G	5'-GCTCAUGTACAGAGCTG-3' 3'-CGAGTGCATGTCTCGAC-5'
FRET-U	5'-FAM-GCTCAUGTACAGAGCTG-3' 3'-CGAGTGCATGTCTCGAC-BHQ1-5'
F-зонд (для APE1)	5'-FAM-GCTCAFGTACAGAGCTGTTTTTCAGCTCTGTACGTGAGCps-BHQ1-3'
U-зонд (для UNG2, SMUG1, MBD4, TDG)	5'-FAM-GCTCAUGTACAGAGCTGTTTTTCAGCTCTGTACGTGAGCps-BHQ1-3'
εA-зонд (для AAG)	5'-FAM-GCTCAεAGTACAGAGCTGTTTTTCAGCTCTGTACGTGAGCps-BHQ1-3'
Tg-зонд (для NEIL1, NTHL1)	5'-FAM-GCTCATgGTACAGAGCTGTTTTTCAGCTCTGTACGTGAGCps-BHQ1-3'
охоG-зонд (для OGG1)	5'-FAM-GCTCAохоGGTACAGAGCTGTTTTTCAGCTCTGTACGTGAGCps-BHQ1-3'
C-зонд (зонд для проверки неспецифического расщепления)	5'-FAM-GCTCACGTACAGAGCTGTTTTTCAGCTCTGTACGTGAGCps-BHQ1-3'

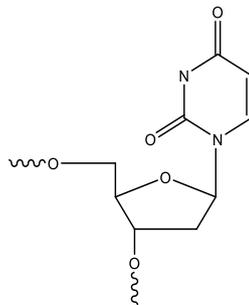
ps – тиофосфатная группа.

а)



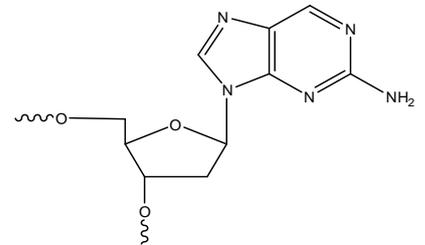
F

б)



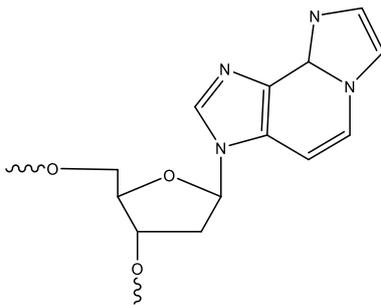
U

в)



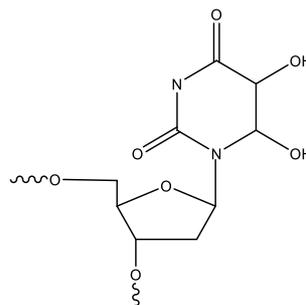
aPu

г)



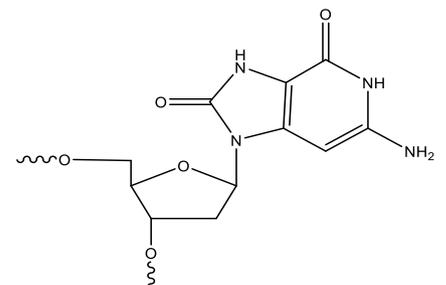
εA

д)



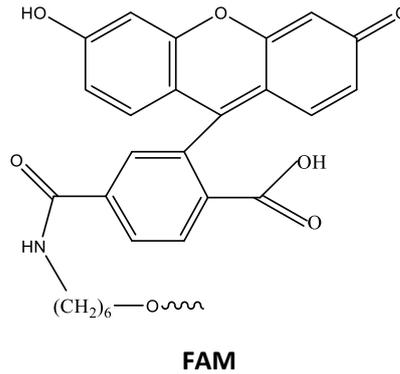
Tg

е)



охоG

ж)



з)

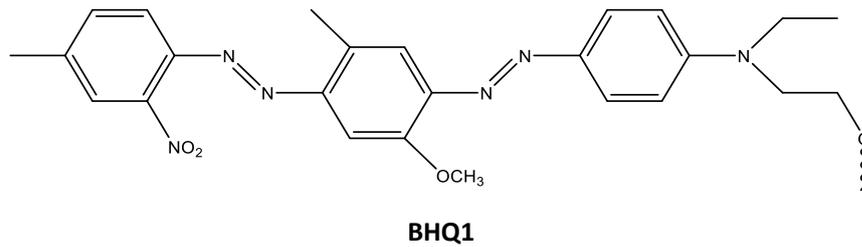


Рисунок 19. Структуры модифицированных нуклеозидов и красителей, использованных в работе модельных субстратов: (а) 2-гидроксиметил-3-гидрокси-тетрагидрофуран (F), (б) уридин (U), (в) 2-аминопурин (aPu), (г) 1,N⁶-этноаденозин (εA), (д) тимидингликоль (Tg), (е) 7,8-дигид ро-8-оксогуанозин (охоG), (ж) 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) и (з) black hole quencher 1 (BHQ1).

2.2. Введение ³²P-метки в олигодезоксирибонуклеотиды

Введение ³²P-метки на 5'-конец нефосфорилированных олигонуклеотидов F и U проводили согласно стандартной методике [241] с использованием T4-полинуклеотид киназы (СибЭнзим, Россия) и [γ-³²P]АТФ (Биосан, Россия). Для этого 30 мкл раствора, содержащего 20 пмоль олигонуклеотида, 60 пмоль [γ-³²P]АТФ (уд. акт. 3,3×10⁻³ мКи/пмоль), T4-полинуклеотид киназу (20 ед. акт.) в буфере (50 мМ Tris-HCl, pH 7.6, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит) выдерживали 60 минут при 37 °С. Меченый олигонуклеотид выделяли электрофорезом в денатурирующем 20% ПААГ. Радиоактивную полосу выявляли радиоавтографией и вырезали из геля. Меченый олигонуклеотид переносили из геля в раствор методом пассивной элюции, при встряхивании пробирки с кусочками геля в 150 мкл воды в течение 2 часов. Далее олигонуклеотид осаждали 10-кратным избытком 2 % раствора LiClO₄ в ацетоне. Осадок трижды промывали 200 мкл ацетона, высушивали в вакууме и растворяли в 100 мкл дважды дистиллированной воды. Концентрация полученного раствора меченого олигонуклеотида не превышала 2×10⁻⁷ М.

2.3. Зависимость степени расщепления специфического F/G-субстрата мутантными формами APE1 и его диким типом

Зависимости степени расщепления специфического F/G-субстрата, меченного по 5'-концу, катализируемого APE1 и его мутантными формами, от времени получали при концентрации фермента 0,1 мкМ и субстрата 1,0 мкМ. Реакцию проводили при 37°C в буфере BER (50 мМ Tris-HCl pH 7,5, 50 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ DTT, 5 мМ MgCl₂, и 7% глицерин). К 10 мкл буферного раствора, содержащего ³²P-меченный субстрат, добавляли 10 мкл фермента в том же буфере. После быстрого перемешивания реакционной смеси из неё отбирали аликвоты объемом 2 мкл, которые помещали в предварительно подготовленные пробирки, содержащие 3 мкл раствора 7 М мочевины, 100 мМ ЭДТА, 0,1% бромфенолового синего и 0,1% ксиленианола. Продукты расщепления разделяли в 20% ПААГ в денатурирующих условиях при комнатной температуре и напряжении 50 В/см. Полученные гели визуализировали с помощью радиоденситометра «Molecular Imager FX» (BioRad, США). Количественную обработку радиоавтографов выполняли с помощью программного пакета Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, США). Степень накопления продуктов рассчитывали, как отношение площадей пиков продуктов к сумме площадей пиков продуктов и пика исходного олигонуклеотида. Ошибка определения, как правило, не превышала 20%. Наблюдаемую константу скорости накопления продуктов реакции k_{cat} рассчитывали путем обработки кинетических кривых по уравнению (1).

$$[\text{Продукт}] = A \times [1 - \exp(-k_{cat} \times t)], \quad (1)$$

где A – амплитуда, k_{cat} - наблюдаемая константа скорости накопления продукта, t – время реакции.

Для изучения влияния pH на процессы формирования каталитически-компетентного комплекса и гидролиза фосфодиэфирной связи с помощью APE1 дикого типа был использован тот же самый подход. Отличия были лишь в соотношении фермента и субстрата (1 мкМ APE1/1 мкМ F/G-субстрата) и использовании буферов, имеющих pH от 5.5 до 9.0.

2.4. Регистрация накопления продукта гидролиза фосфодиэфирной связи FRET-F(1)-субстрата мутантными формами APE1, содержащими замены в активном центре, методом гель-электрофореза

Зависимость степени превращения FRET-F(1)-субстрата в процессе взаимодействия с различными мутантными формами APE1, содержащими замены в активном центре, определяли при 25°C в буфере BER следующим образом. К 2 мкл буферного раствора, содержащего 2 мкМ FRET-F(1)-субстрат, добавляли 2 мкл 0,05 мкМ фермента в том же буфере. Реакционную смесь

быстро перемешивали и через 30 секунд реакцию останавливали добавлением раствора 7 М мочевины, 25 мМ EDTA. Полученные образцы наносили на 20% ПААГ, содержащий 7 М мочевины, и проводили электрофорез при 50 В/см. Количество образующегося продукта определяли путем сканирования геля на приборе E-Box (“VILBER”, Франция) и обработки данных в программном пакете Gel-Pro Analyzer 4.0 (“Media Cybernetics”, США).

2.5. Регистрация накопления продуктов гидролиза фосфодиэфирной связи ДНК-субстратов ферментами SMUG1 и MBD4^{cat} методом гель-электрофореза

Все эксперименты по исследованию ферментативной реакции проводили в буфере BER при 25°C. Продукты анализировали электрофорезом в 20%-ном ПААГ, содержащем 7 М мочевины, с использованием FRET-U-субстрата. Зависимость степени превращения субстрата от времени определяли следующим образом. К 20 мкл буферного раствора, содержащего 10 мкМ FRET-U-субстрат, добавляли 20 мкл 2,0 мкМ фермента в том же буфере. Реакционную смесь быстро перемешивали и через определенные промежутки времени отбирали аликвоты объемом 2,0 мкл, которые переносили в предварительно подготовленные пробирки, содержащие 2,0 мкл раствора 7 М мочевины, 25 мМ EDTA и 0,1% ксиленцианола. Затем добавляли 1 мл 2%-ного раствора LiClO₄ в ацетоне, выдерживали 30 мин при -20°C и центрифугировали 10 мин (14 000 × g). Осадок промывали ацетоном, высушивали, растворяли в 10 мкл буферного раствора, содержащего 1,0 мкМ АП-эндонуклеазу Nfo и инкубировали при 25°C в течение 1 мин для гидролиза фосфодиэфирных связей в АП-сайтах. Реакцию останавливали добавлением раствора 7 М мочевины, 25 мкМ EDTA и 0,1% ксиленцианола. Полученные образцы наносили на ПААГ и проводили электрофорез при 50 В/см. Количество образующегося продукта определяли путем сканирования геля на приборе E-Box (“VILBER”, Франция) и обработки данных в программном пакете Gel-Pro Analyzer 4.0 (“Media Cybernetics”, США).

Ферментативную активность полиморфных вариантов ДНК-гликозилаз определяли относительно активности фермента дикого типа, которую принимали равной 1.

2.6. Эффективность расщепления ³²P-меченого U/G-субстрата мутантными формами SMUG1 и MBD4^{cat} и их дикими типами в присутствии каталитически неактивной формы APE1 D210N

Реакцию проводили при 37°C в буфере BER (50 мМ Tris-HCl pH 7,5, 50 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ DTT, 5 мМ MgCl₂, и 7% глицерин). К 5 мкл буферного раствора, содержащего 80 нМ ДНК-гликозилазу (SMUG1 или MBD4^{cat}) добавляли 5 мкл 200 нМ APE1 D210N в том же буфере, смесь выдерживали при 37°C в течение 20 мин, затем добавляли 10 мкл 200 нМ ³²P-меченого U/G-

субстрата в том же буфере. Реакционную смесь перемешивали и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Последующий гидролиз образовавшегося АП-сайта осуществляли путем обработки реакционной смеси 10% раствором пиперидина (15 мин, 56°C). Затем добавляли 1 мл 2%-ного раствора LiClO₄ в ацетоне, выдерживали 30 мин при –20°C и центрифугировали 10 мин (14 000 × g). Осадок промывали ацетоном, высушивали, растворяли в 5 мкл буфера состава 7 М мочевины, 25 мМ ЭДТА, 0,1% бромфенолового синего и 0,1% ксиленианола. Продукты расщепления разделяли в 20% ПААГ в денатурирующих условиях при комнатной температуре и напряжении 50 В/см. Полученные гели визуализировали с помощью радиоденситометра «Molecular Imager FX» (BioRad, США). Количественную обработку радиоавтографов выполняли с помощью программного пакета Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, США). Степень накопления продуктов рассчитывали, как отношение площадей пиков продуктов к сумме площадей пиков продуктов и пика исходного олигонуклеотида. Ошибка определения, как правило, не превышала 20%.

2.7. Сайт-направленный мутагенез генов APE1, SMUG1 и MBD4^{cat}

Сайт-направленный мутагенез в кодирующей последовательности генов APE1, SMUG1 и MBD4^{cat} был осуществлен по стандартной методике Agilent Technologies (США) с использованием плазмид pET11a для APE1, pET28c для SMUG1 и pET29b для MBD4^{cat}. Для этого были синтезированы соответствующие пары праймеров (Таблица 10).

Таблица 10. Праймеры, использованные для сайт-направленного мутагенеза

Фермент	Замена	Последовательность праймеров
APE1	Arg221Cys	прямой 5'- GCACATGAAGAAATTGACCTTTGCAACCCCAAGGGG -3' обратный 5'- CCCCTTGGGGTTGCAAAGGTCAATTTCTTCATGTGC -3'
	Asn222His	прямой 5'- GCACATGAAGAAATTGACCTTCGCCACCCCAAGGGG -3' обратный 5'- CCCCTTGGGGTGGCGAAGGTCAATTTCTTCATGTGC -3'
	Arg237Ala	прямой 5'- GGCTTCACGCCACAAGAGGCCCAAGGCTTCGGGG -3' обратный 5'- CCCCGAAGCCTTGGGCCTCTTGTGGCGTGAAGCC -3'
	Gly241Arg	прямой 5'- GCGCCAAGGCTTCAGGGAATTAAGTGCAGGC -3' обратный 5'- GCCTGCAGTAATCCCTGAAGCCTTGGCGC -3'
	Met270Ala	прямой 5'- GCCTACACSTTTTGGACTTATGCGATGAATGCTCGATCCAAGAATGTTGG -3' обратный 5'- CCAACATTCTTGGATCGAGTATTCATCGCATAAGTCCAAAAGGTGTAGGC -3'
	Met270Thr	прямой 5'- GCCTACACSTTTTGGACTTATACGATGAATGCTCGATCCAAGAATGTTGG -3' обратный 5'- CCAACATTCTTGGATCGAGTATTCATCGTATAAGTCCAAAAGGTGTAGGC -3'

	Pro311Ser	прямой 5' - GGCAGTGATCACTGTTCTATCACCCCTATACCTAGC -3' обратный 5' - GCTAGGTATAGGGTGATAGAACAGTGATCACTGCC -3'
SMUG1	Gly90Cys	прямой 5' - GAACCCTGGACSTTTTTGCATGGCCCAGACTGGGG -3' обратный 5' - CCCCAGTCTGGGCCATGCAAAAAGGTCCAGGGTTC -3'
	Pro240His	прямой 5' - GAAGGGCTCCTGCATCACTCTCCCCGTAACCCAC -3' обратный 5' - GTGGGTACGGGGAGAGTGATGCAGGAGCCCTTC -3'
	Asn244Ser	прямой 5' - CATCCCTCTCCCCGTCACCCACAGGCCAACAAG -3' обратный 5' - CTTGTTGGCCTGTGGGTGACGGGGAGAGGGATG -3'
	Asn248Tyr	прямой 5' - CGTAACCCACAGGCCTACAAGGGCTGGGAGGCAGTG -3' обратный 5' - CACTGCCTCCAGCCCTTGTAGGCCTGTGGGTTACG -3'
MBD4 ^{cat}	Ser470Leu	прямой 5' - СТАТАТТТСТСААТСТСГАСССТАГГСААААТТГГСААТАССТГ -3' обратный 5' - САГГАТТТГССАТТТТГССТАГГГТССГАТТГАГАААТАТАГ -3'
	Gly507Ser	прямой 5' - ГААСТТСТТАААСТСТТТСТСТТАСГАТСТТССГГС -3' обратный 5' - GCCCGAAGATCGTAGAGAGAAAGAGGTTTAAGAAGTTC -3'
	Arg512Trp	прямой 5' - СТТГГТСТТАСГАТСТТТГГГСАААААССАТТГТСААГ -3' обратный 5' - СТТГАСААТГГТТТТТГСССАААГАТСТГАГАГАССААГ -3'
	His557Asp	прямой 5' - ГАТТГГААГАСГАТТТГГГСАААААССАТТГТСААГ -3' обратный 5' - ГТГГТСТТСАГГГТССАССТГСТТССАСТС -3'

Продукты ПЦР-амплификации разделяли в 1% агарозном геле. Визуализацию осуществляли посредством окрашивания этидий-бромидом, который был добавлен в гель и в электродный буфер в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Для удаления «материнской» плазмиды смесь ПЦР-продуктов обрабатывали ферментом Dpn1 (Thermo Scientific, США) в течение 1 часа при 37°C. Полученными ДНК-продуктами трансформировали электрокомпетентные клетки *E. coli* штамма *Electro10*. Выделение мутантных плазмид осуществляли с помощью набора «GeneJET Plasmid Miniprep Kit» (Thermo Scientific, США). Наличие замен в последовательности плазмид (pET11a-APE1, pET28c-SMUG1, pET29b-MBD4^{cat}) было подтверждено с помощью секвенирования.

2.8. Выделение и очистка ДНК-гликозилазы ААГ и мутантных форм белка АРЕ1

ДНК-гликозилаза ААГ была выделена из линии клеток *E. coli* Rosetta II (DE3), трансформированных плазмидой pET11a, содержащей ген *aag*, кодирующий белок, усеченный с N-конца на 73 аминокислотных остатка. Для наработки мутантных форм белка АРЕ1 компетентные клетки *E. coli* штамма *Rosetta II (DE3)* трансформировали плазмидами pET11a-APE1, содержащими замены (Arg221Cys, Asn222His, Arg237Ala, Gly241Arg, Met270Ala, Met270Thr, Pro311Ser). Трансформацию осуществляли с помощью электропоратора Eporator (Eppendorf, Германия). Колонию-трансформант культивировали в питательной среде Лурия-

Бертани (LB) с ампициллином (100 мкг/мл) при 37°C и постоянном встряхивании (200 об/мин). При достижении $OD_{600} \sim 0,6-0,8$ проводили активацию T7 промотора путем добавления изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) до конечной концентрации 0,2 мМ. Культуру клеток выдерживали с ИПТГ в течение 17 часов при комнатной температуре и постоянном встряхивании (200 об/мин). Клетки осаждали центрифугированием в течение 20 минут при температуре 4°C на скорости 4000 об/мин. Все этапы очистки проводили при 4°C. Клеточный осадок суспендировали в буфере 20 мМ HEPES-KOH (pH 7,5), 40 мМ NaCl, с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Roche Diagnostics, Швейцария). Клеточную суспензию лизировали с использованием прессы Френча при 9,66 МПа. От клеточного дебриса лизаты освобождали центрифугированием при $40000 \times g$ в течение 45 мин при 4°C. Лизат наносили на анионообменную колонку Q Sepharose (GE Healthcare, США) объемом 20 мл, предварительно уравновешенную буфером 20 мМ HEPES-KOH (pH 7,5), 40 мМ NaCl. Целевой белок элюировали с колонки 50 мл буфера 20 мМ HEPES-KOH (pH 7,5), 40 мМ NaCl со скоростью 2,5 мл/мин. Полученный раствор, содержащий рекомбинантный белок, наносили на гепариновую колонку (1 мл) HiTrap Heparin HP (GE Healthcare, США) со скоростью 1 мл/мин. С помощью хроматографа FPLC АКТА Purifier 10 (GE Healthcare, США), в линейном градиенте хлорида натрия от 40 мМ до 600 мМ проводили фракционирование связанных белков. Гомогенность рекомбинантных белков проверяли с помощью 12% SDS-PAGE. Степень чистоты полученных рекомбинантных белковых препаратов составляла более 95% (рис. 20). Полученные препараты ферментов хранили в 50% глицерине при -20°C. Концентрацию белков определяли по методу Бредфорда на спектрофотометре NanoPhotometr N60 Touch (IMPLEN, Германия).

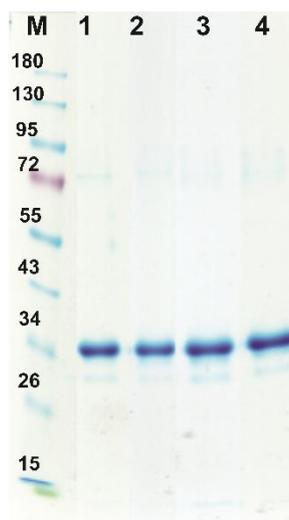


Рисунок 20. Пример проверки гомогенности рекомбинантных препаратов белка APE1 с помощью 12% SDS-PAGE. M - маркеры молекулярного веса (BioRad, USA), вес указан в кДа; 1 – APE1 N222H, 2 – APE1 R237A, 3 – APE1 M270A, 4 – APE1 M270T.

2.9. Выделение и очистка полиморфных вариантов каталитического домена ДНК-гликозилазы человека *MBD4^{cat}*, полноразмерной гликозилазы человека *SMUG1* и ядерного антигена пролиферирующих клеток *PCNA*

Полиморфные варианты каталитического домена ДНК-гликозилазы человека, *MBD4^{cat}* (аминокислотные остатки 426-580) и полноразмерной гликозилазы человека *SMUG1* были выделены из клеток *E. coli* Rosetta II (DE3), трансформированных плазмидами pET29b-*MBD4^{cat}* или pET28c-*SMUG1*, содержащими замены, перечисленные в Таблице 9. Ядерный антиген пролиферирующих клеток *PCNA* (proliferating cell nuclear antigen) был выделен из линии клеток *E. coli* Rosetta II (DE3), трансформированных плазмидой pET28c-*PCNA*. Культуру клеток выращивали в среде LB (1 л), содержащей 50 мкг/мл канамицина, при температуре 37°C до оптической плотности 0,6-0,8 на длине волны 600 нм. Индукцию транскрипции осуществляли путем добавления в раствор ИПТГ до конечной концентрации 0,2 мМ. После индукции культуру клеток инкубировали при комнатной температуре в течение 18 часов. Затем клетки осаждали центрифугированием (20 мин., 4000 об/мин) и готовили суспензию клеток в 20 мл буферного раствора 20 мМ HEPES-КОН (pH 7,5), 40 мМ NaCl, с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Roche Diagnostics, Швейцария). Клеточную суспензию лизировали с использованием пресса Френча при 9,66 МПа. От клеточного дебриса лизаты освобождали центрифугированием при $40000 \times g$ в течение 45 мин при 4°C. Увеличивали концентрацию соли в растворе до 100 мМ, лизат наносили на анионообменную колонку Q Sepharose (GE Healthcare, США) объемом 20 мл, предварительно уравновешенную буфером 20 мМ HEPES-КОН (pH 7,5), 100 мМ NaCl. Целевой белок элюировали с колонки 40 мл буфера 20 мМ HEPES-КОН (pH 7,5), 100 мМ NaCl со скоростью 2,5 мл/мин. Полученный раствор доводили NaCl до концентрации 500 мМ и имидазолом до концентрации 15 мМ, а затем наносили на Ni-хелатирующую предупакованную колонку (1 мл) NiTrap Chelating HP (GE Healthcare, США) со скоростью 1 мл/мин. С помощью хроматографа FPLC АКТА Purifier 10 (GE Healthcare, США), проводили фракционирование связанных белков в линейном градиенте имидазола от 15 мМ до 500 мМ. Гомогенность полученных рекомбинантных белков проверяли с помощью 12% SDS-PAGE. Степень чистоты полученных рекомбинантных белковых препаратов составляла 90-95%. Полученные рекомбинантные белки хранили в 50% глицерине при -20°C. Концентрацию белков определяли по методу Бредфорда на спектрофотометре NanoPhotometr N60 Touch (IMPLEN, Германия).

2.10. Спектры кругового дихроизма (КД)

Спектры КД для белков дикого типа *SMUG1*, *MBD4^{cat}* и *APE1*, а также их мутантных форм регистрировали с помощью спектрополяриметра Jasco J-600 (Jasco, Япония) при 5°C в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. Концентрация фермента в кювете составляла 1 мкМ.

Эксперименты проводили в буфере 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM KCl, 1 mM ЭДТА, 5 mM MgCl₂. В экспериментах по влиянию pH использовали буфер состава 50 mM KCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM DTT, 9% глицерин и либо 50 mM Tris-HCl pH 7,0 или 9,0, либо 50 mM HEPES-KOH pH 5,5. Спектры записывали при ширине полосы 1 нм и разрешении 1 нм при скорости сканирования 50 нм/мин. Каждый спектр представляет собой усредненный вариант 10 сканирований.

2.11. Анализ предстационарной кинетики ферментативных реакций методом «остановленного потока»

Для исследования предстационарной кинетики взаимодействия ферментов с ДНК-субстратами использовали метод «остановленного потока». Кинетические кривые регистрировали при 25°C на спектрофотометре остановленного потока SX.18MV (Applied Photophysics, Великобритания). Мертвое время прибора составляло 1,38 мс. Каждая кинетическая кривая представляет собой результат усреднения минимум трех экспериментальных кривых.

Таблица 11. Длины волн возбуждения и испускания флуоресценции для флуорофоров, использованных в работе

Флуорофор/тушитель	Длина волны возбуждения, нм	Длина волны в максимуме испускания, нм	Светофильтр
Тгр	290	345	WG-320
aPu	310	360	LG-370
FAM	494	525	OG-515
BHQ1*	534		

*Для тушителя флуоресценции BHQ1 приведена длина волны в максимуме спектра поглощения.

В Таблице 11 приведены длины волн возбуждения и испускания флуоресценции, использованных в работе флуорофоров, а также длина волны в максимуме спектра оптического поглощения тушителя флуоресценции BHQ1.

Все эксперименты проводили в буфере BER (раздел 2.3.) в условиях, близких к условиям одного оборота фермента. При наблюдении за флуоресценцией остатков триптофана в ферменте концентрация белка в реакционной смеси составляла 1 мкМ, а концентрация ДНК-субстрата варьировалась от 0,5 до 2,0 мкМ. При регистрации флуоресценции aPu или FRET-сигнала концентрация субстратов в ячейке составляла 1 мкМ, а концентрация ферментов варьировалась от 0,5 до 3,0 мкМ. Исключение составляли эксперименты по изучению взаимного влияния полиморфных вариантов APE1 и других участниками BER, а также эксперимент по изучению роли заряженных аминокислотных остатков в процессе связывания и каталитического превращения ДНК. В первом случае концентрация APE1 или его мутантных форм в реакционной

смеси составляла 10 нМ, а концентрация FRET-F-субстрата была равна концентрации белка-эффектора и составляла 1,0 мкМ. Во втором варианте исключения концентрация белка и ДНК-субстрата была равна и составляла 1,0 мкМ.

Конформационные изменения APE1, вызванные изменением pH, регистрировали путем мониторинга изменений интенсивности флуоресценции Trp следующим образом. Раствор 2 мкМ APE1 в буфере состава 50 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ DTT, 5 мМ MgCl₂, 7% глицерин и 5 мМ HEPES-KOH (pH 4,5) помещали в один из шприцов прибора и быстро смешивали с равным объемом щелочного буфера [50 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ DTT, 5 мМ MgCl₂, 7% глицерин и 95 мМ Трис-HCl (pH 8,8)] из другого шприца, чтобы обеспечить конечное значение pH 8,6 и конечную концентрацию APE1 1 мкМ в растворе. Для анализа перехода из щелочного pH в кислый смешивали 2 мкМ раствор фермента в буфере, состоящем из 50 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ DTT, 5 мМ MgCl₂, 7% глицерина и 5 мМ Трис-HCl (pH 7,9) с буфером 50 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ DTT, 5 мМ MgCl₂, 7% глицерина и 95 мМ HEPES-KOH (pH 4,8) для обеспечения конечного pH раствора 5,3.

Облучение белков ультрафиолетовым светом приводит к деградации остатков триптофана, что сопровождается снижением интенсивности флуоресценции (блечинг). Как правило, на кинетической кривой участок, отражающий протекание этого процесса располагается в конце кривой, после завершения каталитического цикла. Выбранный участок аппроксимировали экспоненциальной функцией (2) с помощью программы OriginPro8.1 (OriginLab Corp., США).

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

где y – значение флуоресценции в рассматриваемой области, x – время, соответствующего значения интенсивности флуоресценции на рассматриваемом участке кинетической кривой, t_1 – характеристическое время выгорания. Рассчитанные из уравнения (2) коэффициенты A_1 , t_1 и y_0 далее применяли для обработки всей кинетической кривой по уравнению (3).

$$F = ((y - y_0) \times \exp(t/t_1)) / A_1 + y_0 + A_1 - 1 \quad (3)$$

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

2.12. Статистическая обработка данных

Количественную обработку результатов экспериментов проводили путем оптимизации параметров, входящих в кинетические схемы. Для этого использовали метод нелинейной регрессии, включающий численное интегрирование дифференциальных уравнений, описывающих кинетику процесса [OriginPro8.1 (OriginLab Corp., США) и DynaFit (BioKin, США)].

Для расчета наблюдаемых констант скорости, характеризующих изменение интенсивности флуоресценции, использовали уравнение (4):

$$F_c = F_b + \sum_{i=1}^N A_i \exp(-k_i t) \quad (4)$$

где i – номер стадии, A_i – амплитуда изменения сигнала, k_i – наблюдаемая константа скорости.

Для определения минимальной кинетической схемы, описывающей взаимодействие фермента с субстратом, и расчета констант скорости всех элементарных стадий данной схемы использовали программу DynaFit (BioKin, США). Количественную обработку результатов экспериментов проводили путем оптимизации значений параметров, входящих в кинетические схемы. Эффективность и точность определения параметров для исследуемого процесса зависела от числа параметров граничных условий. Начальный диапазон кривых, как правило, отражал стадии связывания и давал возможность определить их константы скорости. При обработке следующего временного интервала ранее использованный механизм усложняли, например, добавляли к нему ещё одну равновесную или неравновесную стадию, при этом фиксировали константы, определенные для начальных стадий. После расчета констант скорости добавленных стадий проводили общую корректировку значений констант скорости путем одновременной оптимизации всех параметров системы. Такой пошаговый метод усложнения кинетической схемы позволил дискриминировать различные схемы фермент-субстратного взаимодействия и определить константы скорости и константы равновесия элементарных стадий, входящих в эти схемы.

Кинетические кривые, полученные при регистрации изменения флуоресценции Trp (рис. 27а) и FAM (рис. 27б) (раздел 3.2.2.) были обработаны с использованием уравнений 5 и 6, соответственно, для вычисления наблюдаемых констант скорости, характеризующих зарегистрированные процессы.

$$F_1 = F_0 + F_1 \times \exp(-k_1^{\text{Trp}} \times t) + F_2 \times [1 - \exp(-k_{\text{cat}}^{\text{Trp}} \times t)] \quad (5)$$

$$F_1 = F_0 + F_1 \times \exp(-k_1^{\text{FAM}} \times t) + F_2 \times \exp(-k_2^{\text{FAM}} \times t) + F_3 \times [1 - \exp(-k_{\text{cat}}^{\text{FAM}} \times t)] \quad (6)$$

Зависимость наблюдаемых констант скорости k_i от концентрации H^+ была аппроксимирована уравнением (7):

$$k_i = k_i^{EH^+} + \frac{(k_i^E - k_i^{EH^+})}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a,i}}} \quad (7)$$

где k_i^E и $k_i^{EH^+}$ — константы скорости, относящиеся к депротонированной и протонированной формам фермента, $K_{a,i}$ — константа равновесия.

Наблюдаемые константы скорости, полученные в присутствии и в отсутствие эффекторного белка (раздел 3.4.), рассчитывали, используя уравнение (8). Рассчитанные наблюдаемые константы скорости и стандартные отклонения использовали для расчета относительной активности фермента по уравнению (9), характеризующего влияние дополнительного белка на активность расщепления F-сайта, и расчета абсолютной погрешности по уравнению (10).

$$F_1 = F_0 + F_1 \times \exp(-k_{obs} \times t) \quad (8)$$

где F_0 – фоновая флуоресценция, F_1 – амплитуда сигнала, k_{obs} – наблюдаемая константа скорости, t – время регистрации сигнала.

$$f = k_{obs}^p / k_{obs}^o \quad (9)$$

где k_{obs}^p – наблюдаемая константа скорости в присутствии белка-эффектора, k_{obs}^o – наблюдаемая константа скорости расщепления субстрата ферментом APE1 в отсутствие белка-эффектора.

$$\Delta k = (k_{obs}^o \times \Delta k_{obs}^p + k_{obs}^p \times \Delta k_{obs}^o) / (k_{obs}^o)^2 \quad (10)$$

где k_{obs}^p – наблюдаемая константа скорости в присутствии белка-эффектора, k_{obs}^o – наблюдаемая константа скорости расщепления субстрата ферментом APE1 в отсутствие белка-эффектора, Δk_{obs}^o и Δk_{obs}^p – стандартные отклонения наблюдаемых констант скоростей в отсутствие и в присутствии белка-эффектора, соответственно.

Для расчёта критерия Стьюдента использовали интернет ресурс <https://byjus.com/maths/t-test-table/>.

2.13. Приготовление клеточного экстракта

Для анализа активности ферментов репарации ДНК с помощью ДНК-зондов использовали клетки рака яичника человека нескольких линий, а именно TOV112, 79, OVCAR3, MESOV, SCOV3 и TOV21. Клетки культивировали в среде DMEM (Gibco», «ThermoFisher Scientific», США) с 10%-ной фетальной сывороткой телят («Gibco», «Thermo FS»), 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ед./мл пенициллина в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Клетки механически снимали с поверхности культурального флакона, осаждали центрифугированием (1000 об/мин, 2 мин), ресуспендировали в растворе PBS и повторно центрифугировали (1000 об/мин, 2 мин). Данную процедуру повторяли дважды.

Лизис клеток проводили в буфере состава 10 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ EDTA, 0,5% CHAPS, 10% глицерин, 0,1 мМ PMSF, 0,5 мМ β-меркаптоэтанол. К клеточному осадку добавляли 150 мкл лизис-буфера, выдерживали на льду в течение 30 мин, затем центрифугировали (14500 об/мин, 10 мин). Общую концентрацию белка в полученном экстракте

измеряли по методу Бредфорда (концентрация белков, как правило, составляла 1–1,5 мкг/мкл). Клеточный экстракт готовили непосредственно перед проведением флуоресцентного анализа активности ферментов.

2.14. Определение чувствительности ДНК-зондов на очищенных препаратах ферментов

Калибровочные кривые, отражающие зависимость начальной скорости расщепления ДНК-зонда от концентрации целевого фермента, получали для каждого из представленных зондов (кроме зонда, содержащего неповрежденное основание) с использованием рекомбинантных ферментов. Кинетические кривые получали при взаимодействии 1×10^{-6} М ДНК-зонда и 1×10^{-6} М, 5×10^{-7} М, 1×10^{-7} М, 5×10^{-8} М, 1×10^{-8} М, 1×10^{-9} М целевого фермента, специфичного к данному зонду. В случае калибровочных кривых для монофункциональных ДНК-гликозилаз SMUG1 и AAG в реакционной смеси присутствовала АП-эндонуклеаза APE1 в концентрации 1×10^{-6} М, осуществляющая гидролиз АП-сайтов, образованных действием монофункциональных ДНК-гликозилаз. Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции FAM регистрировали при температуре 37°C на спектрофлуориметре Infinite 200 Pro (Tecan, Швейцария). Каждая кинетическая кривая представляет собой результат усреднения минимум трех экспериментальных кривых. Эксперименты проводили в буфере BER. Возбуждение флуоресценции проводили на длине волны 485 нм, изменение интенсивности флуоресценции ДНК-зонда регистрировали на длине волны 520 нм в интервале времени 15–3600 с.

Начальную скорость расщепления ДНК-зондов при заданной концентрации фермента рассчитывали, используя начальные линейные участки кинетических кривых. Зависимость начальной скорости от концентрации ферментов имела линейный вид, что позволяет использовать полученные зависимости в качестве калибровочных кривых для оценки концентрации целевых ферментов в клеточном экстракте.

2.15. Определение оптимального для анализа общего количества белка в клеточном экстракте

Клетки линии TOV112 лизировали в буфере состава 10 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ EDTA, 0,5% CHAPS, 10% глицерин, 0,1 мМ PMSF, 0,5 мМ β-меркаптоэтанол. Общая концентрация белка, измеренная по методу Бредфорда, составила 1,1 мкг/мкл. Регистрацию изменения интенсивности флуоресценции проводили для реакционных смесей, содержащих 1×10^{-6} М ДНК-зонд и клеточный экстракт с концентрацией по общему белку 500 мкг/мл, 250 мкг/мл, 100 мкг/мл, 50 мкг/мл. Спектры флуоресценции регистрировали в буфере BER при 37°C индивидуально для каждого типа ДНК-зонда. Каждая кинетическая кривая, представленная на рисунках, получена усреднением не менее трех экспериментальных кривых.

2.16. Определение активности ферментов BER в клеточном экстракте

Пробы готовили в 100 мкл буферного раствора, содержащего 50 мМ Tris-HCl pH 7,5, 50 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 7% глицерин и клеточный экстракт с концентрацией общего белка 250 мкг/мл. ДНК-зонд, содержащий определенный тип поврежденного нуклеотида (Таблица 5), добавляли к клеточному экстракту до конечной концентрации 1×10^{-6} М. Перемешивание (5 с, амплитуда кругового перемешивания 1 мм) и регистрацию FRET-сигнала проводили, используя спектрофлуориметр Infinite 200 Pro (Tecan, Швейцария) при 37°C. Длина волны возбуждения флуоресценции составляла $\lambda_{ex} = 485$ нм, регистрацию эмиссии проводили при длине волны $\lambda_{em} = 520$ нм. Максимальное время реакции составляло 3600 с. Каждый эксперимент повторяли трижды.

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Анализ влияния замен аминокислотных остатков активного центра APE1 в составе мутантных форм D210N, N212A, T268D, M270A и D308A на скорость и эффективность узнавания, связывания и превращения специфических субстратов

Как известно любой ферментативный процесс протекает через формирование фермент-субстратного комплекса, которое сопровождается образованием специфических контактов, необходимых для протекания каталитической реакции между участниками этого процесса. Взаимодействие фермента с субстратом схематически можно представить в виде каскада последовательных превращений: образование первичного комплекса, взаимная подстройка, ведущая к образованию каталитически компетентного комплекса, необратимая каталитическая стадия и диссоциация комплекса фермента с продуктом реакции для совершения следующего ферментативного цикла.

Конформационные переходы в молекуле фермента могут быть зарегистрированы по изменению интенсивности флуоресценции остатков триптофана, а в ДНК – путем введения в молекулу флуоресцентных аналогов оснований или FRET-пары.

Стадии узнавания и взаимной подстройки фермента и субстрата происходят на малых временах, поэтому для изучения этих процессов возможно использование специальных «струевых» подходов, которые позволяют регистрировать процессы в миллисекундном диапазоне времени [242]. В настоящей работе использовали метод «остановленного потока», который сочетает в себе возможности быстрого смешения реагентов (мертвое время составляет ~ 1 мс) с возможностью регистрации конформационных переходов во взаимодействующих молекулах в режиме реального времени за счет изменения интенсивности флуоресценции или FRET-сигнала.

Из данных, представленных в разделе Литературного обзора, о механизме действия APE1 мы можем сделать вывод, что на данный момент всё ещё существует неопределенность в отношении каталитического механизма реакции гидролиза фосфодиэфирной связи в АП-сайте и функции некоторых остатков активного центра в этом процессе. Поэтому на первом этапе наших исследований был проведен кинетический анализ функциональной роли аминокислотных остатков активного центра APE1 человека, а также определено влияние pH на эффективность образования фермент-субстратного комплекса и каталитическую стадию реакции для выяснения роли заряженных аминокислотных остатков активного центра при осуществлении ферментативной активности.

3.1.1. Определение относительной активности мутантных форм APE1

Аминокислотные остатки Asp210, Asn212, Thr268, Met270 и Asp308, важные для процессов связывания субстрата и катализа (рис. 21а, Таблица 12), были заменены путем сайт-направленного мутагенеза, чтобы получить следующие мутанты APE1: D210N, N212A, T268D, M270A, и D308A.

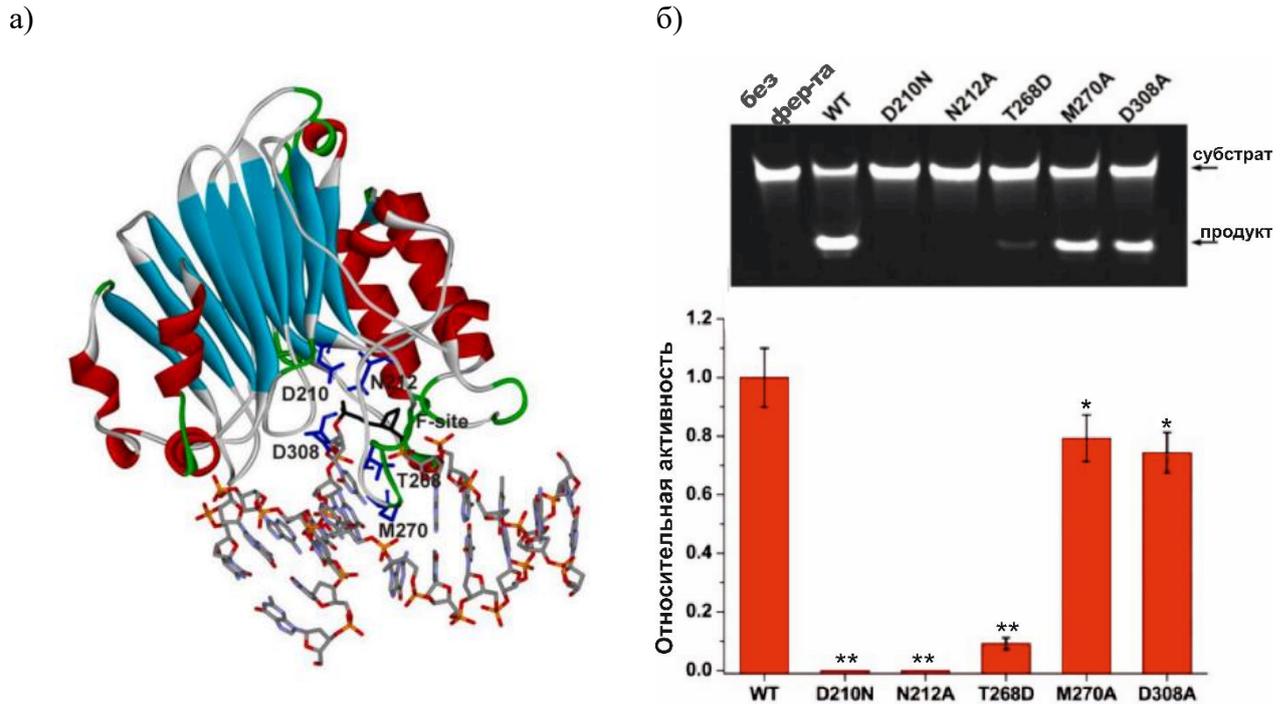


Рис. 21. Рентгеноструктурные данные о контактах между аминокислотными остатками активного центра АП-эндонуклеазы 1 и ДНК-субстратом (а). Относительная активность APE1 дикого типа и её мутантных форм в расщеплении F-сайта FRET-F(1)-субстрата (б). Концентрация субстрата составляла 2 мкМ, фермента 0,05 мкМ, время реакции 30 с. Статистически значимые эффекты мутантных замен APE1, отмечены $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**).

Относительную активность этих мутантных форм APE1 определяли, анализируя степень накопления продуктов реакции расщепления ДНК-субстрата методом гель-электрофореза (рис. 21б). Как видно из рисунка 21б, наиболее сильный эффект аминокислотной замены наблюдается в случае замен D210N и N212A, которые приводят к полной потере каталитической активности. Оба этих остатка, Asn212 и Asp210, координируют молекулу воды в активном центре фермента, которая действует как нуклеофил в реакции гидролиза АП-сайта в ДНК. Кроме того, полная потеря каталитической активности говорит о разрушении сети контактов в активном центре фермента с ДНК-субстратом.

Таблица 12. Функции некоторых аминокислотных остатков ДНК-связывающего сайта и активного центра АП-эндонуклеазы I, выявленные с помощью сайт-направленного мутагенеза

Аминокислотный остаток	Предположительная роль в связывании и катализе ДНК	Влияние замены на эффективность расщепления АП-сайта	Литературные источники
<i>Asp210</i>	активация молекулы воды в активном сайте фермента	замена D210N приводит к полной инактивации АП-эндонуклеазной и NIR активности	[175], [173], [176], [177], [174]
<i>Asn212</i>	координация воды и стабилизация переходного состояния; взаимодействие с гидролизуемой фосфатной группой	замена N212A приводит к полной утрате АП-эндонуклеазной активности	[172], [175], [178], [182]
<i>Thr268</i>	контакт с 5'-фосфатом соседнего 3'-нуклеотида АП-сайта	замена T268D приводит к снижению АП-эндонуклеазной и NIR активности	[183]
<i>Met270</i>	встраивается в малую бороздку ДНК, вытесняя основание напротив АП-сайта	замена M270A не влияет на АП-эндонуклеазную активность	[172]
<i>Asp308</i>	координация ионов Mg ²⁺	замена D308A приводит к снижению АП-эндонуклеазной и NIR активности	[178], [173], [181], [183]

Замена T268D также демонстрирует значительное влияние на АП-эндонуклеазную активность (снижение в 10 раз по сравнению с ферментом дикого типа). Замена T268D может сильно повлиять на взаимодействия АРЕ1 с ДНК вследствие возникновения электростатического отталкивания. Так как Thr268 входит в состав петли, пронизывающей спираль ДНК со стороны малой бороздки рядом с АП-сайтом, а его боковая цепь зажата между боковой цепью Met270 и рибозофосфатным остовом ДНК. Соответственно, аспартат в положении 268 должен влиять на связывание субстрата посредством стерических взаимодействий с боковой цепью Met270. Всё это дает основания предполагать, что влияние замены T268D нельзя объяснить только электростатическим отталкиванием, а нужно учитывать еще и природу субстрата, которая может влиять на положение боковой цепи Met270, которая в свою очередь встраивается в брешь, образовавшуюся в цепи ДНК после выворачивания поврежденного нуклеотида. По всей видимости именно с этим связан тот факт, что активность мутанта M270A сходна с активностью фермента дикого типа, так как замена метионина на аланин снижает вероятность стерических затруднений для взаимодействия фермента с субстратом. Полученные данные согласуются с результатами другого исследования [172], в котором авторы показали, что замена M270A не снижает активность АРЕ1 в расщеплении АП-сайта и указывают на то, что этот остаток не участвует в процессе выворачивания поврежденного нуклеотида. Таким образом, наиболее

вероятно, что функция Met270 состоит именно в стабилизации вывернутого состояния поврежденного нуклеотида. Также следует отметить, что в экспериментальных условиях (стационарный режим реакции в условиях 40-кратного избытка субстрата), использованных в наших исследованиях, мутантная форма APE1 D308A продемонстрировала сниженную на ~20% активность по сравнению с активностью фермента дикого типа, что согласуется с литературными данными о пониженной АП-эндонуклеазной активности этой мутантной формы [181, 183].

3.1.2. Конформационные изменения APE1 при взаимодействии с ДНК

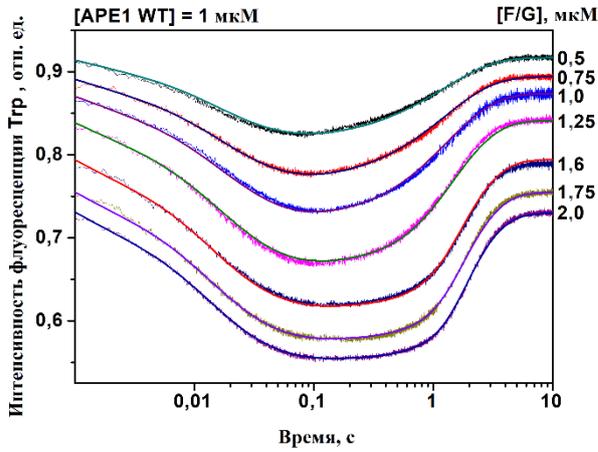
Чтобы подробно охарактеризовать роль остатков Asp210, Asn212, Thr268, Met270 и Asp308 в образовании фермент-субстратного комплекса, был проведен кинетический анализ конформационных изменений фермента в ходе взаимодействия с субстратом в предстационарных условиях. Для анализа конформационных изменений в этих условиях были выбраны ДНК-субстраты, содержащие F-сайт, поскольку они полностью расщеплялись за короткий промежуток времени, и для них исключен процесс «бличинга» в условиях продолжительного возбуждения светом. Учитывая, что конформационные изменения фермента играют важную роль в распознавании повреждений и формировании каталитического комплекса, мы регистрировали флуоресценцию остатков Trp фермента для изучения процесса конформационной динамики белка при взаимодействии мутантных форм APE1 с F/G-субстратом (рис. 22).

Кинетический механизм конформационных изменений APE1 дикого типа в ходе взаимодействия с ДНК, содержащей АП-сайт, уже изучался ранее в нашей лаборатории [243–245]. Анализ изменений интенсивности флуоресценции Trp позволил идентифицировать стадии связывания, расщепления ДНК и высвобождения продукта. Было показано, что снижение интенсивности флуоресценции на начальных временах кинетических кривых соответствует образованию каталитически компетентного комплекса.

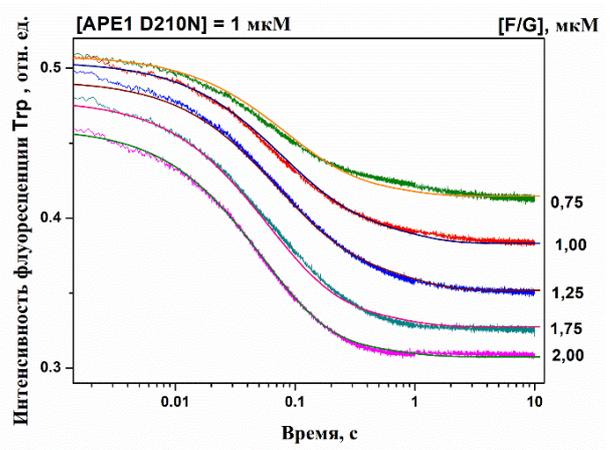
При распознавании и подстройке к АП-сайту ДНК, в ферменте имеют место по крайней мере, два конформационных перехода. Термодинамический анализ этих стадий выявил [246], что образование первичного фермент-субстратного комплекса сопровождается десольватацией полярных групп в области контакта фермент–ДНК и высвобождении высокоупорядоченных кристаллических молекул воды из бороздок ДНК. Этот этап может включать взаимодействие между фосфатными группами ДНК дуплекса с 5'- и 3'-стороны от F-сайта и аминокислотными остатками субстрат-связывающей области белка. Видимо именно в этот момент происходит встраивание аминокислотных остатков Arg177 и Met270 в большую и малую бороздки ДНК,

соответственно, что в свою очередь приводит к вытеснению кристаллической воды из структуры ДНК.

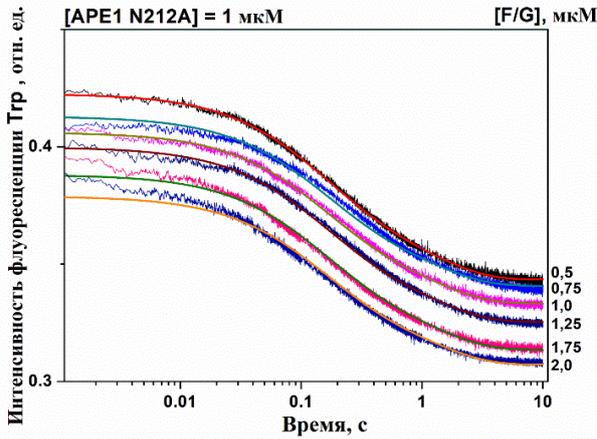
а)



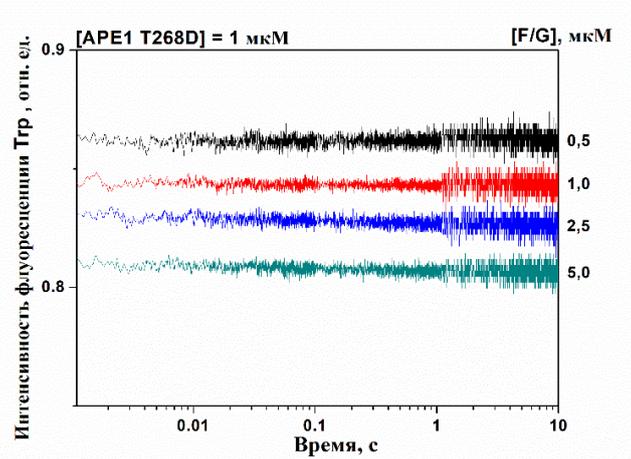
б)



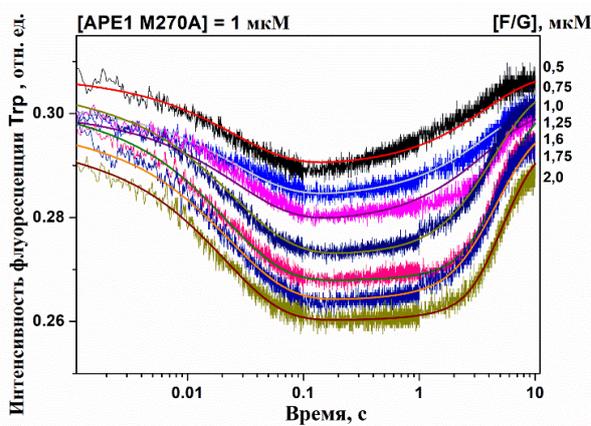
в)



г)



д)



е)

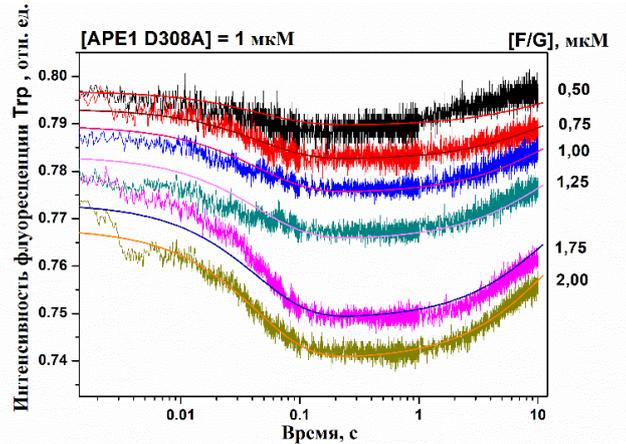


Рис. 22. Изменение интенсивности флуоресценции Trp при взаимодействии APE1 дикого типа (а) и мутантных форм — D210N (б), N212A (в), T268D (г), M270A (д) или D308A (е) — с F-субстратом. Концентрации ферментов и F/G-субстрата указаны на панелях.

На втором этапе взаимодействия APE1 с F-субстратом происходит специфическая перестройка первичного комплекса, включающая выворачивание F-сайта в активный центр фермента. Затем происходит каталитическая стадия процесса, которая приводит к образованию продуктов реакции и, следующая за ней стадия диссоциации комплекса фермент-продукт сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции Trp на более поздних временах (начиная примерно с 0,5 с) (рис. 22а). Каталитически неактивные мутанты D210N и N212A были способны связывать F-субстрат, о чем свидетельствует снижение флуоресценции Trp (рис. 22б и 22в), тогда как взаимодействие T268D APE1 с ДНК не вызывало изменений интенсивности флуоресценции Trp (рис. 22г). Этот эффект можно объяснить двумя моментами, во-первых, тем, что эта замена изменяет структуру интеркалирующей петли, что препятствует образованию комплекса [183], во-вторых, эти изменения ведут к изменению микроокружения двух остатков Trp (Trp267 и Trp280), находящихся в этой петле, тем самым блокируя их флуоресценцию. Взаимодействие обеих каталитически активных мутантных форм M270A и D308A с F-субстратом приводит к двухфазным изменениям интенсивности флуоресценции Trp (рис. 22д и 22е). Снижение интенсивности флуоресценции на начальных участках кинетических кривых соответствует образованию каталитически компетентного комплекса. Стадия каталитической реакции, приводящая к образованию продуктов, и последующая диссоциация комплекса фермент-продукт сопровождаются увеличением интенсивности флуоресценции Trp на более поздних временных интервалах (> 1 с). Следует также отметить, что по близости от Met270 располагаются остатки Trp267 и Trp280, поэтому замена M270A, приводящая к удалению объемного бокового радикала, потенциально, может оказывать эффект на регистрируемый сигнал как за счет потери функциональной группы, так и за счет влияния на интенсивность флуоресценции данных остатков Trp. Анализ кинетических кривых изменения интенсивности флуоресценции Trp позволил предположить, что минимальный кинетический механизм взаимодействия между каталитически неактивным мутантом (APE1 D210N или N212A) и ДНК-субстратом, содержащим F-сайт, включает в себя лишь два этапа, которые соответствуют равновесному связыванию (схема 1).

Константы скорости для прямой и обратной стадий реакции приведены в Таблице 13. Эти данные указывают на то, что обе замены, и D210N, и N212A, несколько повышают эффективность связывания фермента с субстратом по сравнению с WT ферментом. Этот результат согласуется с опубликованными ранее данными для N212A и D210N [173,176,177].

Таблица 13. Кинетические параметры стадий связывания и расщепления F/G-субстрата WT APE1 и его мутантными формами

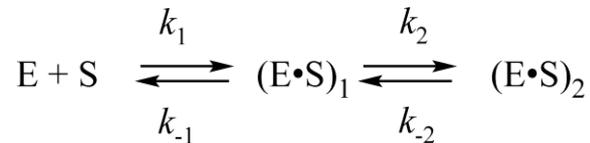
Константы	WT	D210N	N212A	M270A	D308A
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	450±80	9,4±0,1	11,2±0,2	490±130	0,8±0,2
k_{-1}, s^{-1}	490±50	1,00±0,04	0,64±0,04	450±140	18±1
$K_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	0,9	9,4	17,5	1,1	0,04
k_2, s^{-1}	150±30	1,8±0,1	0,12±0,06	59±3	—
k_{-2}, s^{-1}	16±3	0,43±0,01	1,5±0,1	5,31±0,32	—
K_2	9,4	4,2	0,08	11,1	—
$K_{\text{acc}} \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	8,5	48,9	18,9	13,3	0,04
$k_{\text{cat}}, \text{s}^{-1}$	1,0±0,1	—	—	0,35±0,01	2,3±0,5
$K_p \times 10^6, \text{M}$	50±10	—	—	25±9	—

$$K_i = k_i/k_{-i}$$

$$K_{\text{acc}} = K_1 + (K_1 \times K_2)$$

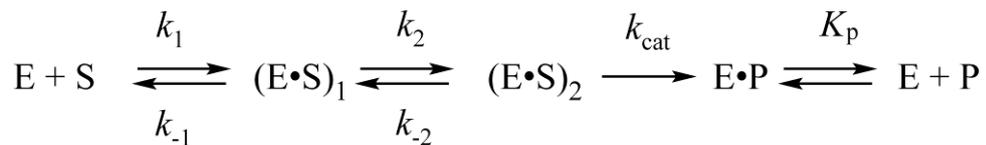
Схема 1. Кинетический механизм, отражающий процесс связывания APE1 D210N и N212A с ДНК-субстратом, содержащим F-сайт, полученный при обработке данных по изменению интенсивности флуоресценции

Trp или FRET-сигнала



где E — APE1 D210N или N212A; S — F/G или FRET-F-субстрат; (E·S)_i — комплексы фермент-субстрат.

Схема 2. Кинетический механизм расщепления F/G-субстрата APE1 WT и M270A, полученный при обработке данных по изменению интенсивности флуоресценции Trp.



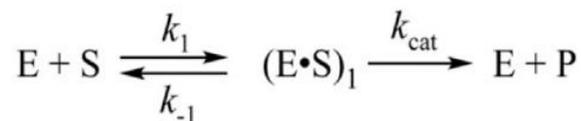
где E — APE1 WT или M270A; S — F/G-субстрат; (E·S)_i — комплексы фермент-субстрат; E·P — комплекс фермент-продукт; P — продукт реакции.

Экспериментальные данные, полученные для WT APE1 и каталитически активного мутанта M270A, соответствуют схеме 2, которая включает в себя двухстадийное равновесное связывание, необратимое образование комплекса фермент-продукт и равновесную диссоциацию этого комплекса. Константы скорости, рассчитанные для двух этих форм фермента, показали, что k_{cat} для M270A почти в 3 раза ниже по сравнению с k_{cat} WT (Таблица 13). Однако увеличение K_{acc} для M270A более чем в 1,5 раза нивелирует пониженную каталитическую активность, тем самым

давая суммарную активность APE1 M270A лишь незначительно ниже фермента WT (рис. 21), что согласуется с данными [172].

Для мутантной формы D308A не удалось разрешить одну из двух стадий связывания ДНК, и, следовательно, кинетические кривые (рис. 22e) были описаны схемой 3, отличающейся от дикого типа и M270A. K_{acc} рассчитанная для D308A оказалась на два порядка ниже по сравнению с K_{acc} WT. Скорее всего наблюдение такого эффекта для D308A связано с тем, что Asp308 образует водородные связи с двумя молекулами воды, координирующими Mg^{2+} в активном центре фермента [170,178]. Это предположение согласуется с данными, свидетельствующими о том, что ион Mg^{2+} влияет на связывание фермента с субстратом и диссоциацию комплекса фермент-продукт [181,243]. Вместе с тем для этой мутантной формы наблюдается ускорение каталитической стадии в 2,3 раза, что и приводит к тому, что мутантная форма APE1 D308A имеет относительную активность лишь на 20-25% ниже по сравнению с ферментом дикого типа (рис. 21). Интересно отметить, что влияние замены D308A на каталитическую константу скорости, полученную в стационарных условиях [183], сильно зависит от состава реакционного буфера и может быть, как выше соответствующей константы для фермента дикого типа (примерно в 3 раза в NIR условиях), так и ниже этого значения (примерно в 0,7 раза в BER условиях). Согласно другой работе [181] в зависимости буферных условий каталитическая эффективность мутантной формы APE1 D308A может быть либо равна, либо примерно в 4 раза снижена относительно фермента дикого типа. Данные, полученные с использованием метода остановленного потока в нашей работе, позволяют сделать заключение о том, что остаток Asp308 имеет большее значение именно на стадии связывания ДНК и образования каталитического фермент-субстратного комплекса.

Схема 3. Кинетический механизм расщепления F/G-субстрата APE1 D308A, полученный при обработке данных по изменению интенсивности флуоресценции Trp.



где E — APE1 D308A; S — F/G-субстрат; $(E \cdot S)_1$ — комплекс фермент-субстрат; P — продукт реакции.

3.1.3. Конформационные изменения ДНК в процессах комплексообразования и катализа

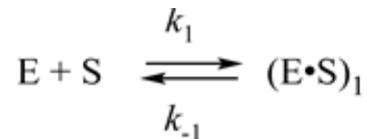
Кинетику конформационных изменений ДНК, индуцированных взаимодействием с APE1 и ее мутантными формами, исследовали с использованием флуоресцентного аналога нуклеотида,

aPu, расположенного напротив F-сайта (рис. 23), а также FRET-F(1)-субстрата, содержащего пару флуорофор/тушитель FAM/ВНQ1 на разных концах дуплекса (Таблица 9, раздел Материалы и методы) (рис. 24). Интенсивность флуоресценции aPu в ДНК зависит от микроокружения флуорофора [247,248]; в частности, увеличение гидрофобности в непосредственной близости от флуорофора снижает интенсивность флуоресценции aPu. Для фермента дикого типа было показано, что снижение интенсивности флуоресценции aPu, происходящее на малых временах кинетических кривых может свидетельствовать о встраивании остатков Arg177 и Met270 в большую и малую бороздки цепи ДНК, соответственно. В более поздние моменты реакции образование каталитически компетентного комплекса с последующим гидролизом 5'-фосфодиэфирной связи и диссоциацией комплекса фермент-продукт приводит к росту интенсивности флуоресценции aPu. Было обнаружено, что оба каталитически активных мутанта M270A и D308A имеют двухфазные кинетические кривые (рис. 23д и 23е), тогда как каталитически неактивные формы D210N и N212A проявляли только начальное снижение интенсивности флуоресценции aPu, что указывает на то, что имеет место только этап связывания ДНК (рис. 23б и 23в). Для T268D APE1 интенсивность флуоресценции aPu также не изменилась (рис. 23г), как и при регистрации флуоресценции Trp (рис. 22г), показывая, что процесс образования фермент-субстратного комплекса значительно затруднен.

Математическая обработка экспериментальных данных методом нелинейной регрессии позволила определить, что минимальная кинетическая схема для неактивных мутантных форм D210N и N212A содержит лишь одностадийное связывание ДНК-субстрата (схема 4), тогда как для активных мутантов M270A и D308A этот процесс дополнительно содержит необратимую каталитическую стадию и диссоциацию фермент-продукт (схема 5). Константы скоростей и равновесные константы представлены в Таблице 14. Сравнение констант скорости для WT и N212A показало, что замена N212A препятствует взаимодействию фермента с расщепляемой фосфодиэфирной связью, тем самым уменьшая константу скорости комплексообразования (k_1) в десять раз (Таблица 14). Кроме того, активные мутантные формы M270A и D308A имеют значительно меньшую скорость образования каталитически компетентного комплекса и меньшую стабильность этого комплекса судя по K_{acc} . С другой стороны, константа скорости каталитической стадии заметно (\sim в 2,5 раза) выше, что нивелирует эффект от снижения скорости образования каталитически компетентного комплекса при формировании комплекса, тем самым оставляя активность этих форм ферментов лишь немного ниже уровня активности фермента дикого типа. Интересно отметить, что при анализе кинетики конформационных изменений фермента (интенсивность флуоресценции Trp) и ДНК-субстрата (интенсивность флуоресценции aPu) были выявлены значительные отличия параметров K_{acc} и k_{cat} при их попарном сравнении

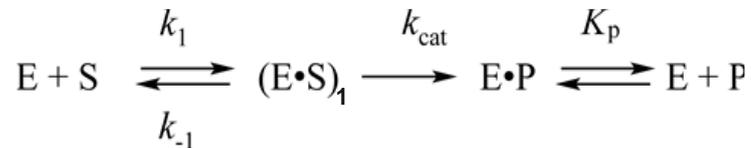
между ферментом дикого типа и мутантной формой APE1 M270A. Так, в зависимости от типа регистрации K_{acc} и k_{cat} для APE1 M270A могут быть как больше, так и меньше по сравнению с APE1 WT, что свидетельствует о комплексном эффекте от замены M270A, а именно отсутствие объемного бокового радикала метионина приводит не только к потере функциональной группы, но и, по-видимому, влияет на изменение интенсивности остатков Trp, расположенных в интеркалирующей петле. Такое влияние на интенсивность флуоресценции остатков Trp в свою очередь может оказывать эффект на рассчитанные параметры взаимодействия при анализе Trp-данных.

Схема 4. Кинетический механизм отражающий процесс связывания APE1 D210N и N212A с F/aPu-субстратом, зарегистрированный по изменению интенсивности флуоресценции aPu



E — APE1 D210N или N212A; S — F/aPu-субстрат; $(E \cdot S)_1$ — комплекс фермент/субстрат.

Схема 5. Кинетический механизм расщепления F/aPu или FRET-F-субстрата каталитически активными мутантами APE1 (M270A и D308A), полученный при обработке данных по изменению интенсивности флуоресценции aPu или FRET-сигнала



E — APE1 M270A или D308A; S — F/aPu или FRET-F-субстрат; $(E \cdot S)_1$ — комплекс фермент/субстрат; $E \cdot P$ — комплекс фермент/продукт; P — продукт реакции.

При образовании комплекса APE1–ДНК происходит изгибание ДНК спирали, что приводит к изменению расстояния между красителем и тушителем в FRET-паре. Действительно, в спектрах изменения флуоресценции FAM при взаимодействии каталитически неактивного D210N APE1 с FRET-F(1)-субстратом происходит уменьшение флуоресценции FAM на отрезке времени до 1 с, что свидетельствует о том, что образование фермент-субстратного комплекса приводит к изгибанию ДНК (рис. 24б). Для мутантной формы N212A APE1 эта стадия, полностью отсутствует (рис. 24в), что означает, что процесс распознавания повреждений, который включает конформационные изменения белка (рис. 22в) и локальные конформационные изменения ДНК (рис. 23в), блокируются для этого мутанта.

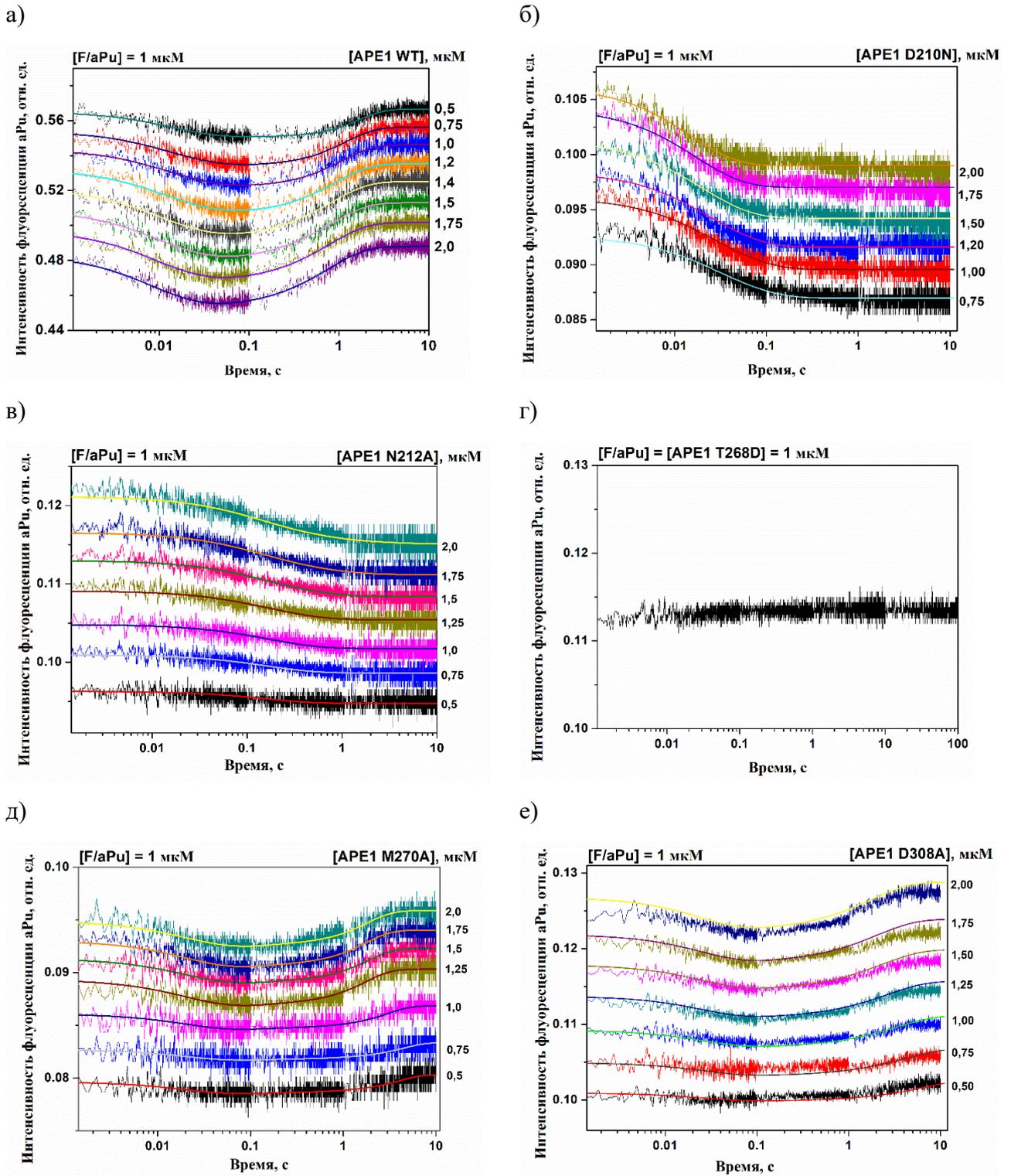
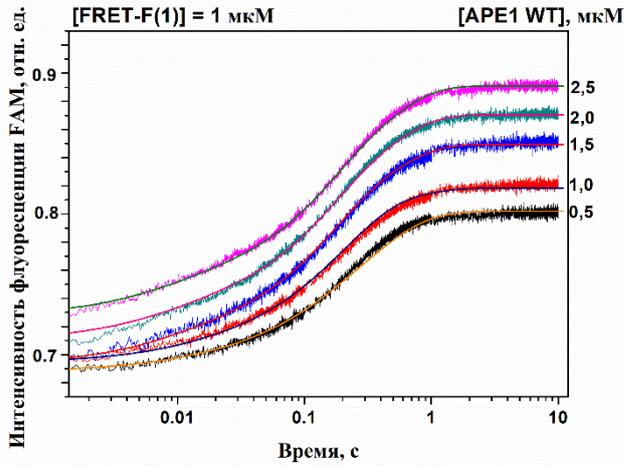


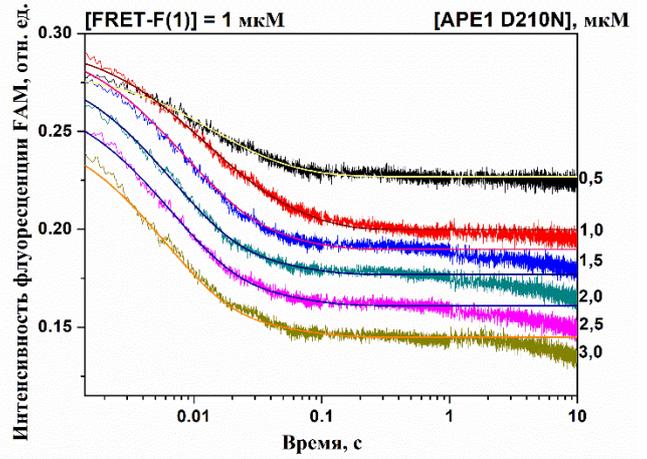
Рис. 23. Изменение интенсивности флуоресценции *aPu* при взаимодействии APE1 WT (а) и её мутантных форм D210N (б), N212A (в), T268D (г), M270A (д) или D308A (е) с F/aPu-субстратом. Концентрации ферментов и F/aPu-субстрата указаны на панелях.

Известно, что аминокислотный остаток Asn212 координирует фосфатную группу, расположенную с 5'-стороны от поврежденного нуклеотида в каталитическом фермент-субстратном комплексе. Суммируя эти факты, можно сделать вывод, что этот контакт необходим для инициации изгиба ДНК.

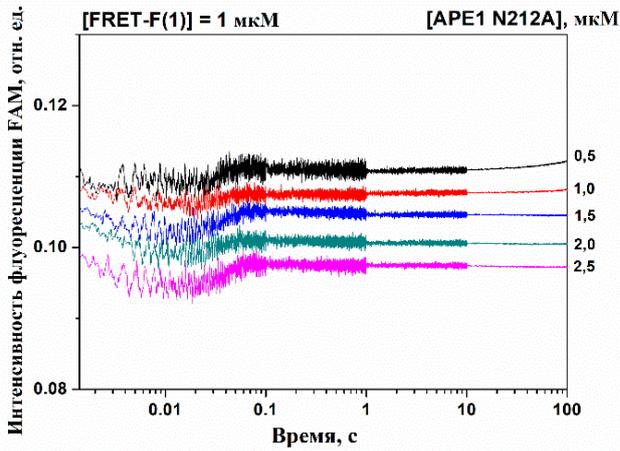
а)



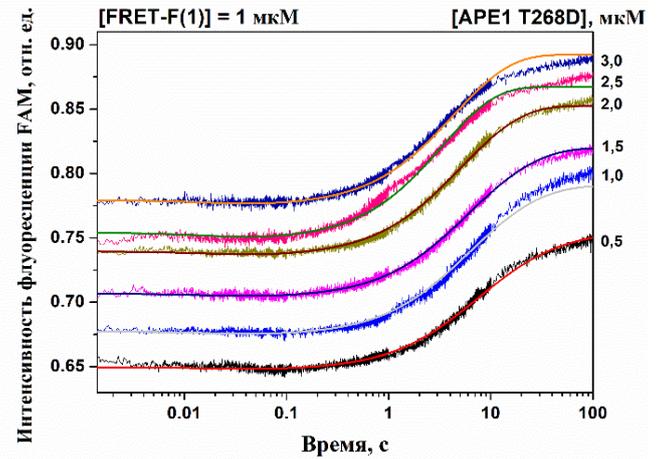
б)



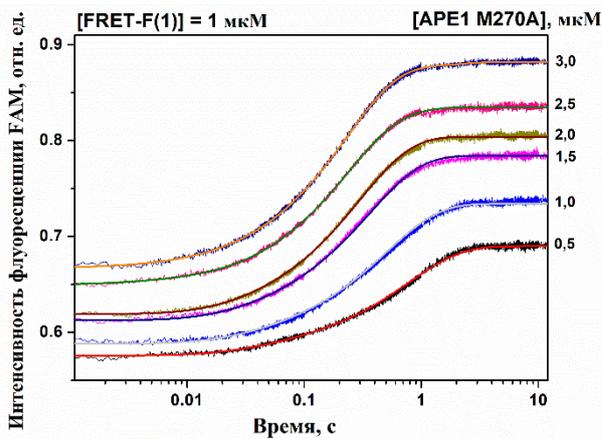
в)



г)



д)



е)

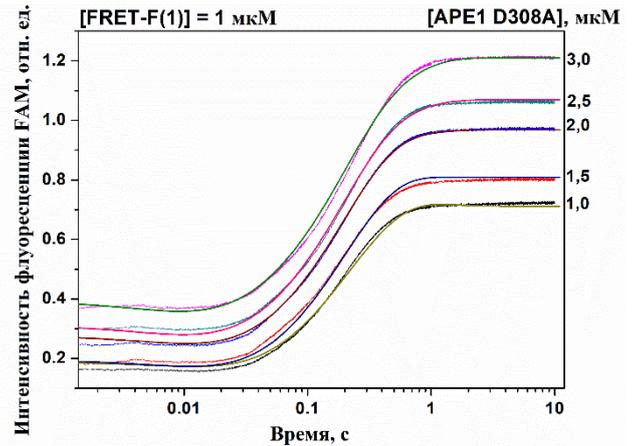


Рис. 24. Изменение интенсивности флуоресценции FAM при взаимодействии APE1 WT (а) и её мутантных форм D210N (б), N212A (в), T268D (г), M270A (д), D308A (е) с FRET-F(1)-субстратом. Концентрации ферментов и FRET-F-субстрата указаны на панелях.

В случае фермента дикого типа и активных мутантных форм, содержащих замены M270A и D308A, расщепление ДНК-субстрата приводит к значительному росту флуоресценции FAM, который перекрывается с начальной фазой снижения флуоресценции, протекающей во время связывания и изгибания субстрата. Следует отметить, что мутантная форма APE1 T268D, которая не вызывала изменений флуоресценции Trp и aPu вследствие неэффективного образования комплекса, также не приводила к уменьшению флуоресценции FAM, которое может свидетельствовать о процессе связывания субстрата с ферментом. Тем не менее, за счет образования некоторой доли каталитического комплекса удалось зарегистрировать медленный рост FRET-сигнала на временах, соответствующих стадии расщепления субстрата. Кинетические кривые, отражающие взаимодействие WT APE1 или любого каталитически активного мутанта с FRET-F(1)-субстратом, соответствовали схеме 5 (Таблица 15). Взаимодействие каталитически неактивного D210N APE1 с FRET-F(1)-субстратом соответствует схеме 1, которая содержит две обратимые стадии, характеризующие образование комплекса фермент-ДНК. Для мутантной формы APE1 T268D константа комплексообразования K_{acc} оказалась значительно снижена по сравнению с диким типом, что еще раз подтверждает участие этого аминокислотного остатка в формировании каталитически-компетентного комплекса.

Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод, что замена T268D значительно нарушает этап связывания ДНК и формирования каталитически компетентного комплекса, Asn212 имеет решающее значение для стадии изгибания ДНК и катализа, замена D210N увеличивает эффективность связывания и полностью блокирует каталитическую функцию фермента, замена D308A снижает эффективность связывания из-за нарушение координации Mg^{2+} и, наконец, что остаток Met270, участвующий в стабилизации вывернутого состояния поврежденного нуклеотида в активном центре фермента, играет важную роль на этапе образования каталитического фермент-субстратного комплекса.

Таблица 14. Кинетические параметры связывания и расщепления F/aPu-субстрата WT APE1 или его мутантными формами

Константы	WT	D210N	N212A	M270A	D308A
$k_1 \times 10^{-6}, M^{-1}c^{-1}$	55±7	36,6±0,8	6±2	5,2±1,2	2,5±1,0
k_{-1}, c^{-1}	5,9±0,9	1,4±0,1	3,6±1,2	50±20	20±3
$K_{acc} \times 10^{-6}, M^{-1}$	9,3±1,5	26,0±0,5	1,7±0,6	0,10±0,07	0,13±0,07
k_{cat}, c^{-1}	1,5±0,04	—	—	3,7±2,4	4±2
$K_p \times 10^6, M$	0,80±0,04	—	—	40±20	22±8

$$K_{acc} = k_1/k_{-1}$$

Таблица 15. Кинетические параметры связывания и расщепления FRET-F(1)-субстрата WT APE1 и его мутантами

Константы	WT	D210N	T268D	M270A	D308A
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	64±3	71±1	1,02±0,34	5,1±0,3	38±1
k_{-1}, s^{-1}	7,2±0,5	5,9±0,3	40±3	11±1	15,6±0,4
$K_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	9±1	12±1	0,02±0,01	0,46±0,12	2,4±0,1
k_2, s^{-1}	—	10,6±0,6	—	—	—
k_{-2}, s^{-1}	—	10,4±0,4	—	—	—
K_2	—	1±0,1	—	—	—
$K_{\text{acc}} \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	9±1	24±2	0,02±0,01	0,46±0,12	2,4±0,1
$k_{\text{cat}}, \text{s}^{-1}$	3,0±0,04	—	4,3±0,6	4,8±0,2	3,0±0,04
$K_p \times 10^6, \text{M}$	2,0±0,1	—	1,4±0,8	3,6±1,5	4,0±0,1

$$K_i = k_i/k_{-i}$$

$$K_{\text{acc}} = K_1 + (K_1 \times K_2)$$

3.2. Анализ функциональной роли заряженных аминокислотных остатков активного центра APE1

Используя подход рентгеноструктурного анализа, удалось установить, что в комплексе APE1-ДНК присутствует множество контактов, образованных между ДНК и заряженными аминокислотными остатками ДНК-связывающего сайта и активного сайта (рис. 12). Для расчета значений pK_a аминокислот, входящих в состав APE1, д.ф.-м.н. Воробьевым Ю.Н. проведено молекулярно-динамическое моделирование (МД-моделирование). В качестве исходного шаблона была использована рентгеновская структура APE1 с разрешением 1,95 Å (PDB 4LND). Средние значения констант для функционально важных аминокислотных остатков в APE1 и аминокислотных остатков, имеющих сдвиг pK_a более чем на ± 1 по сравнению со свободными аминокислотами, перечислены в Таблице 16. Все эти аминокислотные остатки были дополнительно подразделены на три группы: входящие в белковую глобулу; остатки, формирующие контакты с ДНК в ДНК-связывающем сайте; и аминокислотные остатки, принимающие участие в катализе. Полученные данные показали, что большинство аминокислотных остатков, имеющих сдвиг pK_a более чем на ± 1 , расположены в белковой глобуле или на поверхности белка. При этом всего несколько аминокислотных остатков, расположенных в ДНК-связывающем сайте и активном центре, имеют значение pK_a , которое отличается более чем на ± 1 единицу (Таблица 16). Полученные значения pK_a указывают на то, что микроокружение аминокислот в белке может существенно изменить их состояние ионизации, тем самым влияя на эффективность связывания ДНК и катализ.

Таблица 16. Сравнение расчётных значений констант ионизации pK_a аминокислотных остатков АРЕ1 с их значениями в свободном состоянии*

Локализация	Аминокислотный остаток	Расчётная pK_a	pK_0 свободной аминокислоты	$pK_a - pK_0$
ДНК-связывающий сайт	Lys-98	11,8	10,4	1,4
	Glu-126	3,4	4,4	-1,0
	Glu-154	0,9	4,4	-3,5
	Arg-156	15,0	12,0	3,0
	Arg-181	13,5	12,0	1,5
	Arg-185	15,8	12,0	3,8
	Arg-221	13,1	12,0	1,1
	Arg-73	12,8	12,0	0,8
	Arg177	12,6	12,0	0,6
Активный центр	Asp-210	2,5	4,0	-1,5
	His-309	10,3	6,6	3,7
	Tyr-171	9,6	9,6	0
Белковая глобула	Tyr-45	11,8	9,6	2,2
	Asp-50	1,1	4,0	-2,9
	Lys-63	12,3	10,4	1,9
	Asp-82	2,4	4,0	-1,6
	Lys-85	12,1	10,4	1,7
	Glu-87	2,4	4,4	-2,0
	Asp-90	2,9	4,0	-1,1
	Arg-136	13,4	12,0	1,4
	Glu-150	2,9	4,4	-1,5
	Asp-152	2,6	4,0	-1,4
	Glu-161	2,2	4,4	-2,2
	Glu-183	2,6	4,4	-1,8
	Arg-187	13,7	12,0	1,7
	Asp-189	1,8	4,0	-2,2
	Arg-202	13,1	12,0	1,1
	Lys-203	11,6	10,4	1,2
	Glu-216	3,2	4,4	-1,2
	Glu-217	3,3	4,4	-1,1
	Asp-219	1,1	4,0	-2,9
	Glu-236	2,2	4,4	-2,2
	Arg-237	13,1	12,0	1,1
	Glu-242	3,3	4,4	-1,1
	Asp-251	0,4	4,0	-3,6
	Arg-274	13,2	12,0	1,2
	Arg-281	15,6	12,0	3,6
	Tyr-284	11,7	9,6	1,1
Asp-297	1,7	4,0	-2,3	
Lys-299	13,7	10,4	3,3	
Arg-301	13,7	12,0	1,7	

* представлены значения pK_a функционально важных аминокислотных остатков и аминокислотных остатков, имеющих сдвиг pK_a более чем на ± 1 по сравнению со свободными аминокислотами.

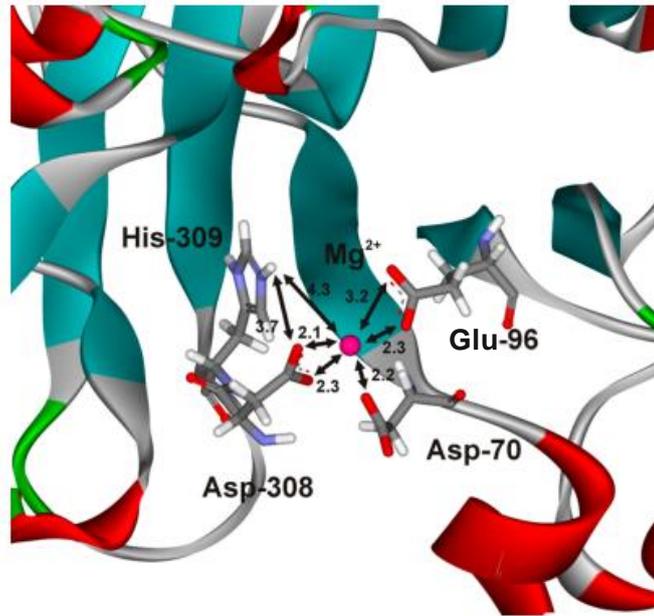


Рис. 25. Структура комплекса APE1- Mg^{2+} (PDB 4LND). Показаны расстояния (Å) между ионом Mg^{2+} и атомами важных аминокислотных остатков активного центра.

Необходимо отметить, что для одного из каталитически важных остатков, His309, pK_a значительно выше (на 3,7 ед.) по сравнению со свободной аминокислотой. Следует отметить, что значения pK_a всех остальных остатков гистидина в белке APE1, His119, His151, His215 и His255, претерпели небольшой сдвиг pK_a в диапазоне от $-0,1$ до $0,4$ ед. Столь значительный сдвиг pK_a , обнаруженный лишь для His309, представляет собой результат его специфического микроокружения, состоящего из трех остатков Asp70, Glu96 и Asp308, которые координируют ион Mg^{2+} в активном центре (рис. 25).

3.2.1. Влияние pH на конформацию белка APE1

Для определения степени изменения конформации APE1 при разных pH были записаны спектры кругового дихроизма (рис. 26а). Спектры КД APE1 содержат широкую полосу от 208 до 230 нм в отрицательной шкале, что характерно для α -спиральной структуры белка [249,250]. Из данных, представленных на рисунке 26а, видно, что увеличение pH с 5,5 до 9,0 не приводит к значительным изменениям вторичной структуры белка. Тем не менее, спектры КД позволяют оценить только глобальные изменения конформации белка и являются довольно грубым методом характеристики вторичной структуры белка. Поэтому, используя метод остановленного потока, были зарегистрированы изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp в белке, чтобы определить какие конформационные изменения происходят в ферменте в процессе увеличения или уменьшения pH (рис. 26б). Было обнаружено, что повышение pH приводит к росту интенсивности флуоресценции Trp, тогда как при переходе в более кислые значения pH

интенсивность флуоресценции Trp наоборот снижается. Кроме того, следует отметить, что при снижении рН, приводящем к протонированию фермента, уменьшение сигнала происходит быстрее (≤ 20 мс) и более амплитудно, чем в случае повышения рН, сопровождающегося депротонированием ионогенных групп. Эти данные указывают на изменения в микроокружении остатков Trp, которые можно объяснить двумя факторами: изменением степени ионизации аминокислотных остатков и локальными конформационными изменениями этих участков в белке.

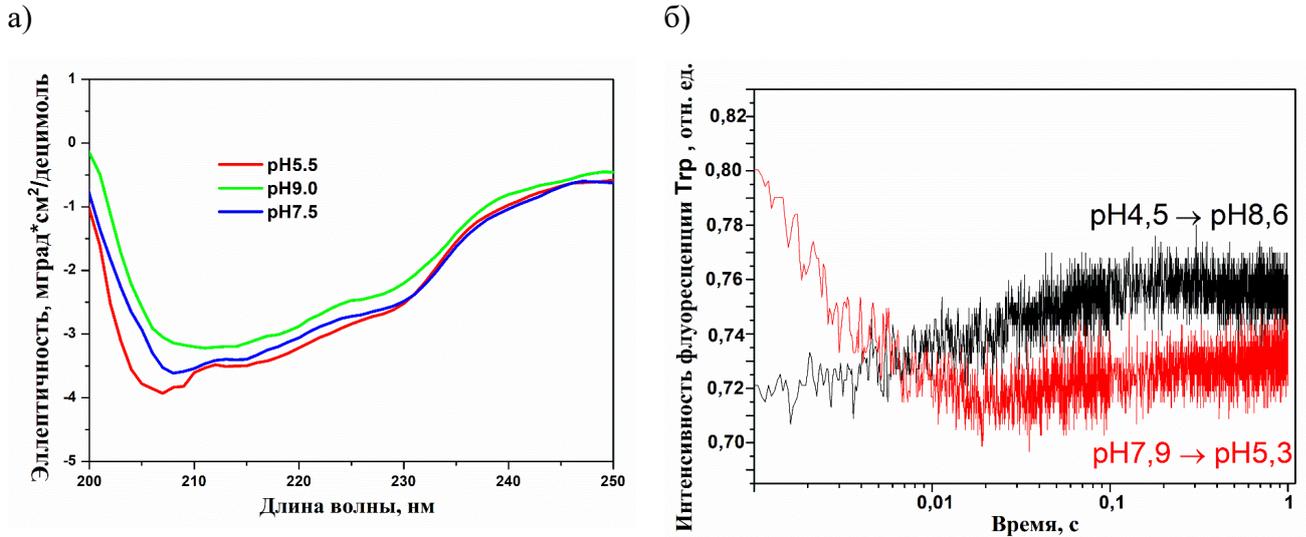
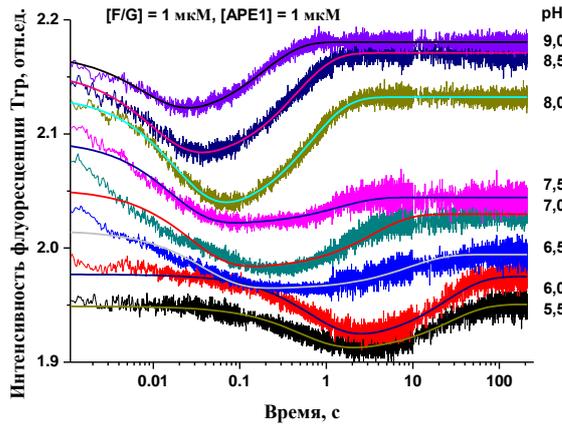


Рис. 26. (а) Спектры кругового дихроизма для APE1 при различных значениях рН. (б) Изменения интенсивности флуоресценции Trp, вызванные протонированием и депротонированием белковой глобулы. [APE1] = 1 мкМ.

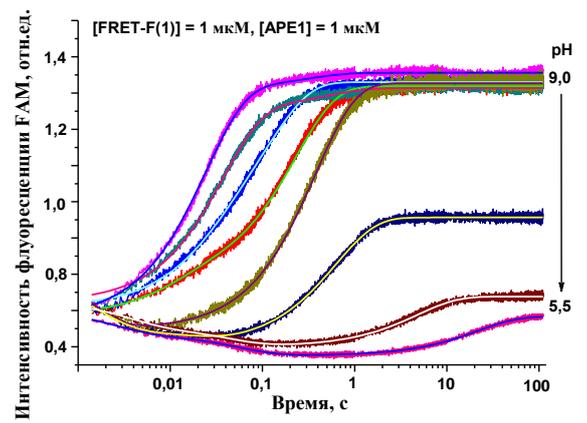
3.2.2. Влияние рН на связывание ДНК и катализ

Чтобы определить эффективность связывания APE1 с ДНК-дуплексом, содержащим F-сайт, при различных значениях рН, была изучена кинетика образования фермент-субстратного комплекса и катализа с использованием метода остановленного потока. Изменение интенсивности флуоресценции Trp в реакции APE1 с F/G-субстратом содержало несколько характерных фаз (рис. 27а), которые на основании предыдущих исследований, были идентифицированы как стадии связывания ДНК и катализа [243,245,251,252]. Уменьшение интенсивности флуоресценции на начальных участках кинетических кривых соответствует образованию каталитически компетентного комплекса. В ходе этого процесса в ферменте происходят по крайней мере два конформационных перехода [243,245,251,252]. Каталитическая стадия процесса, ведущая к образованию продукта и последующая диссоциация комплекса фермент-продукт, сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции Trp на более поздних временах (начиная с примерно 0,5 с). Как видно из кинетических кривых (рис. 27а), обе эти стадии зависят от рН.

а)



б)



в)

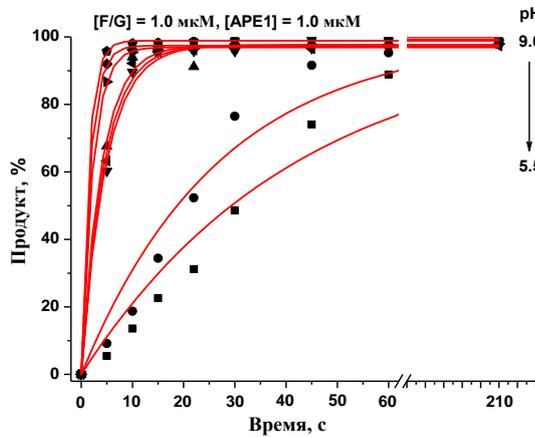


Рис. 27. Влияние pH на взаимодействие APE1 с F/G- и FRET-F(1)-субстратом. Конформационные изменения APE1 (а) и ДНК-субстрата (б) в процессе их взаимодействия при разных значениях pH. (в) Кинетика накопления продукта реакции, зарегистрированная методом гель-электрофореза [pH 5,5 (■), 6,0 (●), 6,5 (▲), 7,0 (◆), 7,5 (★), 8,0 (▼), 8,5 (◄) и 9,0 (►)].

Для анализа конформационных изменений, происходящих в ДНК в ходе расщепления F-сайта, использовали субстрат, содержащий FRET-пару FAM/BHQ1. Как видно на рисунке 27б, интенсивность флуоресценции FAM при взаимодействии APE1 с FRET-F(1)-субстратом снижается на временном отрезке до 1 с (для pH 5,5) и растет на более поздних временах. Вполне вероятно, что первоначальное уменьшение интенсивности сигнала отражает уменьшение расстояния между флуорофором (FAM) и тушителем (BHQ1), вызванное изгибанием ДНК при взаимодействии с APE1. Также следует отметить, что повышение pH вызывало визуальное исчезновение этой фазы из-за ускорения второй фазы процесса, приводящей к росту интенсивности флуоресценции FAM. Рост интенсивности флуоресценции FAM в этой фазе, скорее всего, отражает высвобождение продукта расщепления из комплекса фермента с ДНК. Действительно, анализ накопления продукта в ПААГ показал, что скорость каталитической

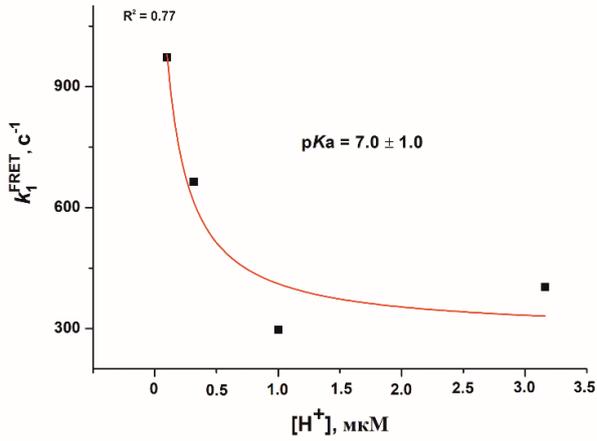
реакции сильно увеличивается с увеличением pH (рис. 27в). Кинетические кривые, полученные при анализе накопления продукта в ПААГ (рис. 27в), регистрации изменения флуоресценции Trp (рис. 27а) и FAM (рис. 27б) были обработаны с использованием уравнений (1), (5) и (6) (раздел 2.3. и 2.12. Материалы и методы), соответственно, для вычисления наблюдаемых констант скорости, характеризующих зарегистрированные процессы.

На рисунке 28 представлены зависимости полученных констант скорости от концентрации $[H^+]$, которые имеют гиперболический вид, свидетельствующий о равновесии протонированного и депротонированного состояний фермента. Гиперболический характер этих зависимостей позволил рассчитать значения pK_a фермента, которые влияют на различные этапы взаимодействия, а именно связывание ДНК и катализ. Было обнаружено, что стадия связывания ДНК, зарегистрированная с помощью FRET-анализа, происходит при значениях pH, близких к нейтральным (pK_a 6,4-7,0 (рис. 28а и 28б)). С другой стороны, связывание ДНК, исходя из данных изменения интенсивности флуоресценции Trp, вызванных конформационными изменениями в самой белке, протекает более эффективно при небольшом сдвиге в щелочную область pH (pK_a 7,9 (рис. 28г)).

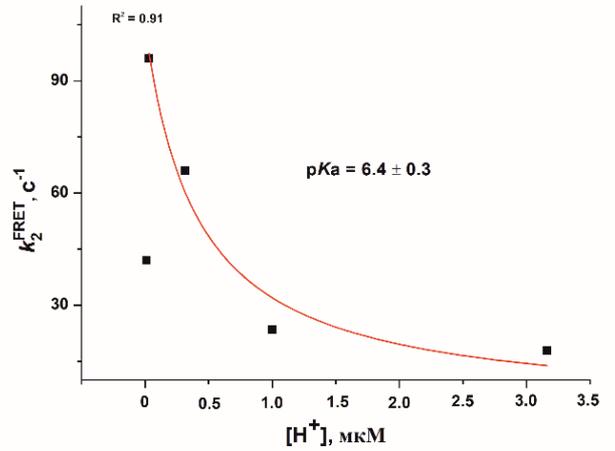
Следует отметить, что ДНК-связывающая область фермента содержит много основных аминокислотных остатков, таких как Lys и Arg, которые имеют более высокие значения pK_a (Таблица 14). Эти данные означают, что эффективность связывания ДНК не контролируется зарядом боковых радикалов аминокислотных остатков и, скорее всего, зависит от образования водородных связей, которые нарушаются с увеличением концентрации $[H^+]$. Однако, наблюдаемая константа скорости каталитической стадии, рассчитанная из данных для изменения интенсивности флуоресценции FAM и Trp, имеет значение pK_a от 8,5 до 9,0 (рис. 28в и 28д), демонстрируя сдвиг в ещё более щелочной диапазон значений pH.

По данным, полученным при МД-моделировании (Таблица 16), pK_a His309 в составе белка резко увеличена по сравнению с pK_a свободной аминокислоты (10,3 против 6,6), что может свидетельствовать о ключевой роли His309 в процессе катализа, как и предлагалось ранее [180].

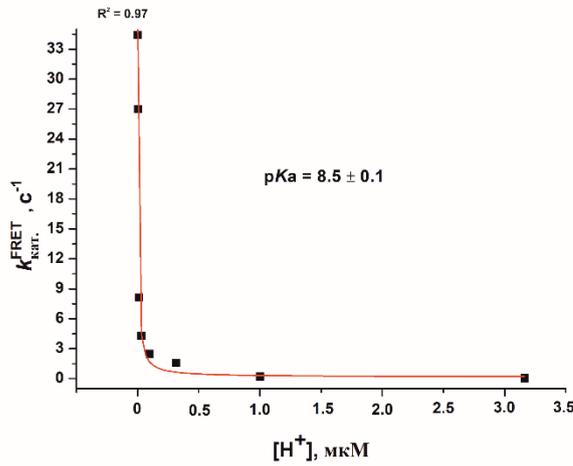
а)



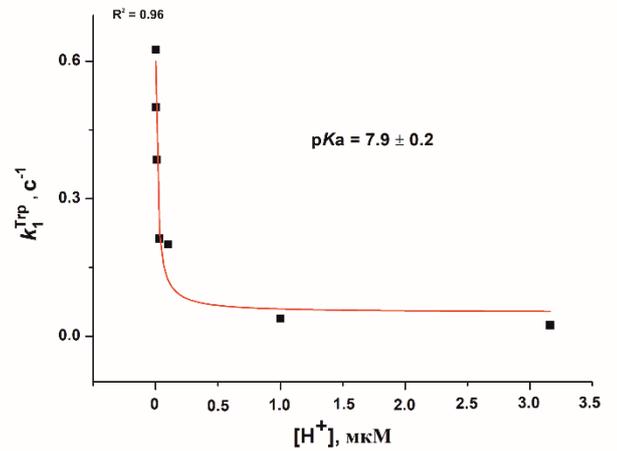
б)



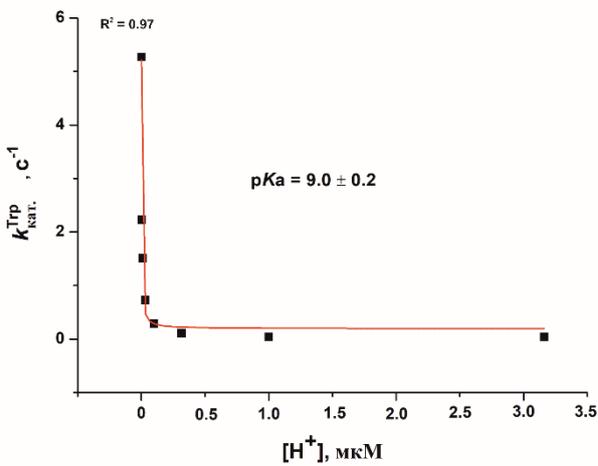
в)



г)



д)



е)

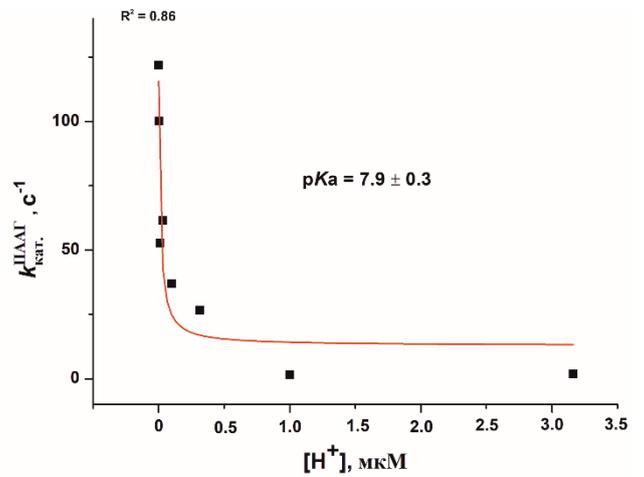


Рис. 28. Зависимость наблюдаемых констант скорости k_1 , k_2 и k_{cat} , полученных при регистрации спектров изменения флуоресценции FAM (а-в), Trp (г, д) или с помощью ПААГ (е) от концентрации H^+ . Полученные данные аппроксимировали гиперболическим уравнением (7) (раздел 2.10. Материалы и методы).

Тем не менее, другой щелочной аминокислотный остаток, Tyr171 ($pK_a = 9,6$), который может атаковать гидролизуемую фосфодиэфирную связь в форме фенолята [179], также может отвечать за эффективность каталитической стадии.

Прямой анализ накопления продуктов реакции методом гель-электрофореза в ПААГ (рис. 28e), который отражает суммарный процесс, включающий как этап связывания ДНК, так и катализ, демонстрирует среднее значение $pK_a = 7,9$, что является оптимальным для эффективного протекания обеих стадий взаимодействия APE1 с ДНК. Поэтому совокупность полученных данных позволяет сделать заключение о том, что функциональные роли His309 и Tyr171 на протяжении всей реакции находятся под контролем ионизированного состояния этих остатков. И это ионизированное состояние может быть молекулярным переключением между альтернативными каталитическими механизмами, включающими эти остатки в протонированных или депротонированных формах.

3.3. Анализ влияния полиморфизмов APE1 на процессы связывания, узнавания и катализа

Выбор потенциально значимых полиморфных вариантов APE1 был осуществлен с использованием базы данных NCBI dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Анализ потенциальной важности SNP был основан на принципе максимального изменения химической природы боковой группы аминокислоты, кодируемой соответствующим триплетом нуклеотидов. Пространственное расположение аминокислотного остатка рядом с ДНК-связывающим сайтом и/или активным сайтом фермента также было учтено ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/\(Conserved Domains and Protein Classification\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/(Conserved%20Domains%20and%20Protein%20Classification))). В соответствии с этими принципами было выбрано семь SNP для изучения их влияния на активность APE1 (Таблица 17). Потенциальная важность выбранных вариантов была проверена в базе данных BioMuta, содержащей данные об однонуклеотидных вариациях в геноме, ассоциированных с онкологическими заболеваниями (<https://hive.biochemistry.gwu.edu/biomuta/proteinview/P27695>).

Ранее установлено (раздел 3.1.), что взаимодействие APE1 с субстратом включает по крайней мере две обратимые стадии, соответствующие связыванию с ДНК-субстратом и распознаванию АП-сайта с последующей трансформацией исходного фермент-субстратного комплекса в каталитически компетентную конформацию. Затем происходит необратимая каталитическая стадия гидролиза 5'-фосфодиэфирной связи АП-сайта, за которой следует последняя стадия каталитического механизма - равновесная диссоциация комплекса фермент-продукт. Для анализа каталитических свойств SNP вариантов APE1 был использован тот же

подход. Конформационную динамику APE1 и модельных ДНК-субстратов изучали на коротких промежутках времени (от 1 мс до 20 с) в условиях, близких к одному обороту фермента. Конформационные изменения фермента регистрировали как изменения интенсивности флуоресценции Trp, а изменения ДНК как изменения флуоресценции остатка aPu, расположенного напротив F-сайта в комплементарной цепи.

Таблица 17. Аминокислотные замены, выбранные в качестве потенциально значимых полиморфных вариантов APE1

Замена	Положение в структуре фермента и функциональная роль	Онкологическое заболевание (по результатам BioMuta)
R221C	ДНК-связывающий сайт (8,0 Å расстояние между Nη1 Arg221 и атомом кислорода 3'-фосфатной группы второго нуклеотида с 3'-стороны от F-сайта).	колоректальный рак
N222H	ДНК-связывающий сайт (расстояния 4,5 и 5,0 Å между атомом Nδ2 Ans222 и двумя атомами O 5'- и 3'- фосфатных групп второго нуклеотида на 3'-стороне F-сайта).	нет данных
R237A	Внутренняя координация α-спиралей (расстояния 3,9 и 7,5 Å между Nη1 Arg237 и атомом Oε1 Glu217 и атомом Oδ1 Asp219, соответственно).	нет данных
G241R	Внешняя поверхность белковой глобулы.	нет данных
M270T	Активный сайт. Met270 встраивается в малую бороздку ДНК, тем самым смещая основание напротив АП-сайта.	нет данных
R274Q	Внутренняя координация вблизи активного центра (расстояния 2.6 и 3.0 Å между Nη1/Nη2 Arg274 и карбонильными атомами O Ala304 и Ser307 соответственно).	колоректальный рак
P311S	Структурный элемент в конце β-складки, граничащий с каталитической петлей.	нет данных

3.3.1. Анализ структуры SNP вариантов APE1 с помощью метода КД-спектроскопии

Степень изменения конформации белковой глобулы SNP вариантов APE1 после введения аминокислотной замены оценивали методом кругового дихроизма. Как видно из КД-спектров, представленных на рис. 29 все мутантные формы APE1 содержат две полосы в отрицательной области спектра с максимумами в районе 208 и 222 нм. Эти полосы характерны для α-спиральной структуры белка. На рис. 29 видно, что набор полученных спектров, при сохранении общего профиля, имеет отличия в интенсивности пиков. Однако, в связи относительно высоким уровнем шума и возможными отклонениями в концентрации белков, обусловленными точностью измерения по методу Бредфорда, можно предположить, что введенные аминокислотные замены не вносят каких-либо глобальных изменений в структуру белковой глобулы.

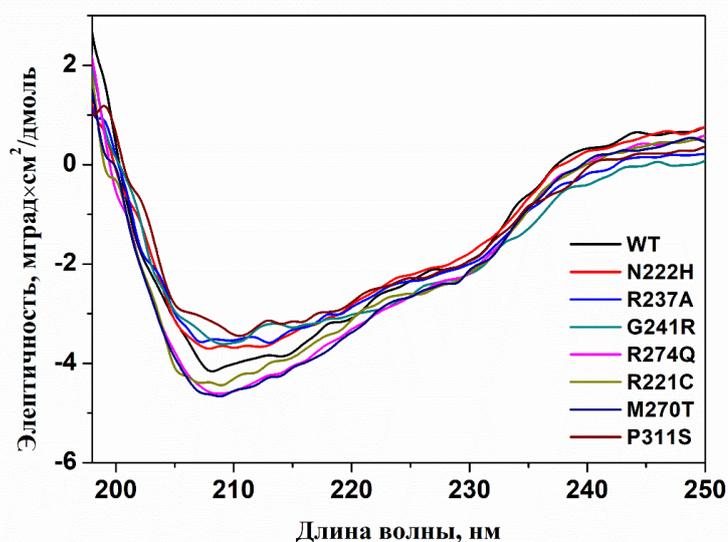


Рис. 29. Спектры кругового дихроизма APE1 дикого типа и SNP вариантов.

3.3.2. Определение относительной активности SNP вариантов APE1

Для определения активности полиморфных вариантов APE1 проводили анализ кинетики накопления продукта реакции в ПААГ. Результаты, полученные при взаимодействии ^{32}P -меченого F/G-субстрата с мутантными формами фермента представлены на рисунках 30а и 30б. Поскольку были использованы условия нескольких оборотов фермента, это позволило нам, применив для обработки результатов уравнение (1) (раздел 2.3. Материалы и методы), рассчитать значения наблюдаемой константы скорости (k_{obs}), которые представлены в виде гистограммы на рисунке 30в. Как показано на рисунке, наиболее сильное влияние на ферментативную активность оказывает замена R237A (Arg237 координирует расположение двух α -спиралей в белковой глобуле, $k_{\text{obs}} = 0,013 \text{ c}^{-1}$ по сравнению с $k_{\text{obs}} = 0,08 \text{ c}^{-1}$ для WT). Следует отметить, что замена G241R ведет к $\sim 50\%$ увеличению наблюдаемой константы скорости расщепления ДНК. Это увеличение активности может быть связано с появлением дополнительного положительного заряда на поверхности фермента, что приводит к более быстрому образованию первичного комплекса между белком и ДНК. Ранее в литературе [37] было упоминание лишь о снижении активности на $\sim 40\text{-}60\%$ для варианта R237A по сравнению с WT APE1, а для варианта G241R отмечено увеличение сайт специфической эндонуклеазной активности. Все остальные варианты APE1 проявили ферментативную активность на 30-40% ниже, чем у дикого типа.

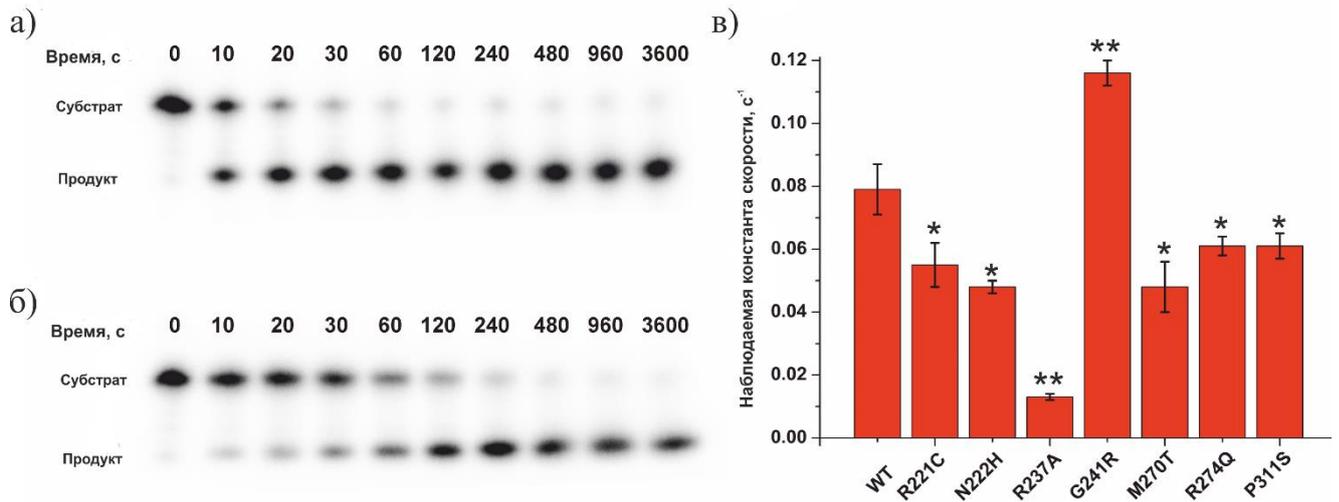


Рис. 30. Ферментативная активность APE1 дикого типа и его SNP вариантов в отношении F/G-субстрата. Анализ в ПААГ кинетики накопления продукта реакции для (а) дикого типа APE1, $k_{obs} = 0,008 \text{ c}^{-1}$ и (б) R237A APE1, $k_{obs} = 0,013 \text{ c}^{-1}$. (в) Относительная активность APE1 и его SNP вариантов. Концентрация фермента была 0,1 мкМ, ДНК-субстрата 1 мкМ. Статистические значимые эффекты мутантных замен APE1, отмечены $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**).

3.3.3. Конформационная динамика взаимодействия APE1 дикого типа и его SNP вариантов с ДНК-субстратом

Для выяснения того, на какие этапы ферментативного процесса в большей степени влияет аминокислотная замена, ассоциированная с SNP, был проведен анализ конформационных изменений фермента и ДНК-субстрата при их взаимодействии. Конформационные переходы, происходящие в молекулах APE1 WT и его SNP-вариантов при взаимодействии с F/G-субстратом, регистрировали по изменениям собственной флуоресценции остатков Trp в белке. Кинетические кривые, представленные на рис. 31, для различных концентраций F/G-субстрата свидетельствуют о многостадийности процесса. Анализ кинетических кривых, характеризующих взаимодействие SNP-вариантов APE1 с F/G-субстратом, показал, что минимальный кинетический механизм соответствует предложенному ранее для WT (схема 2) [243,245,251]. Несмотря на то, что кинетические кривые, характеризующие взаимодействие фермента дикого типа или его SNP-вариантов с ДНК, выглядят одинаково, пошаговый анализ позволяет предположить, что аминокислотные замены могут влиять как на стадии связывания ДНК, так и на каталитическую стадию ферментативного процесса по отдельности. Константы скоростей прямых и обратных реакций, а также равновесная константа диссоциации K_r , соответствующие схеме 2, приведены в Таблице 18.

Анализ конформационных изменений фермента указывает на незначительное влияние замены остатка Asn222, расположенного вблизи сайта связывания ДНК, на общую активность белка. Тем не менее замена N222H приводит к небольшому увеличению константы ассоциации

K_1 для образования первичного комплекса и увеличению общей константы связывания субстрата K_{ass} . Причина снижения активности варианта N222H скорее всего в снижении K_p (Таблица 18, $8,9 \times 10^{-6}$ М и 50×10^{-6} М для N222H и WT соответственно), величине, характеризующей диссоциацию комплекса фермента с продуктом реакции. Учитывая, что аминокислотный остаток Asn222 расположен в сайте связывания ДНК, его замена на положительно заряженный остаток His приводит к стабилизации комплекса с фермент-продукт, тем самым снижая эффективность работы фермента в условиях многооборотной реакции. Замена Met270, функция которого заключается во встраивании в двойную спираль для стабилизации вывернутого состояния поврежденного нуклеотида, не приводит к существенному влиянию ни на связывание с ДНК-субстратом, ни на катализ. Тем не менее, константа диссоциации фермента с продуктом реакции для варианта M270T (Таблица 18, 2×10^{-6} М) в 25 раз ниже K_p фермента дикого типа, что приводит к снижению эффективности фермента в условиях многооборотной реакции, как и в случае варианта N222H.

Анализ конформационной динамики молекулы фермента по изменению интенсивности флуоресценции остатков Tgr для варианта R237A (рис. 31г, Таблица 18) показал, что замена не оказывает существенного влияния на стадии узнавания и формирования каталитически компетентного комплекса (уменьшение K_{acc} $\sim 1,3$ раза), но ведет к снижению скорости каталитической стадии в $\sim 1,5$ раза и значительному увеличению K_p (в 11,6 раз). Следует отметить, что увеличение K_p (облегчение диссоциации комплекса фермент-продукт) не может оказать влияние на уменьшение каталитической активности фермента (рис. 30), в то время как совокупное уменьшение эффективности связывания ДНК и каталитической стадии приводит к общему понижению активности. Анализ результатов для фермента, несущего замену G241R, показал увеличение константы скорости образования первичного комплекса между APE1 и ДНК-субстратом. K_{acc} для фермента G241R ниже вдвое по сравнению с WT (Таблица 18, $4,6 \times 10^6$ и $8,5 \times 10^6$ М⁻¹ соответственно). При этом в случае варианта G241R обнаружено ускорение каталитической стадии: k_{cat} составляет $1,0$ с⁻¹ и $1,6$ с⁻¹ для WT и G241R соответственно (Таблица 18). Поэтому, можно заключить, что наблюдаемое увеличение активности мутантной формы, содержащей замену G241R, в основном обеспечивается увеличением каталитической константы скорости.

Замены R274Q и P311S (аминокислотные остатки расположены в области активного центра) оказывали существенное влияние на вторую стадию связывания ДНК-субстрата (K_2 в 30 и 8 раз меньше, чем для WT соответственно), что характеризует формирование каталитически компетентного комплекса. Расчет концентрации фермент-субстратного комплекса в условиях ПААГ-анализа ($[фермент] = 0,1$ мкМ, $[ДНК] = 1,0$ мкМ) показывает, что не более 30% фермента находится в комплексе с ДНК.

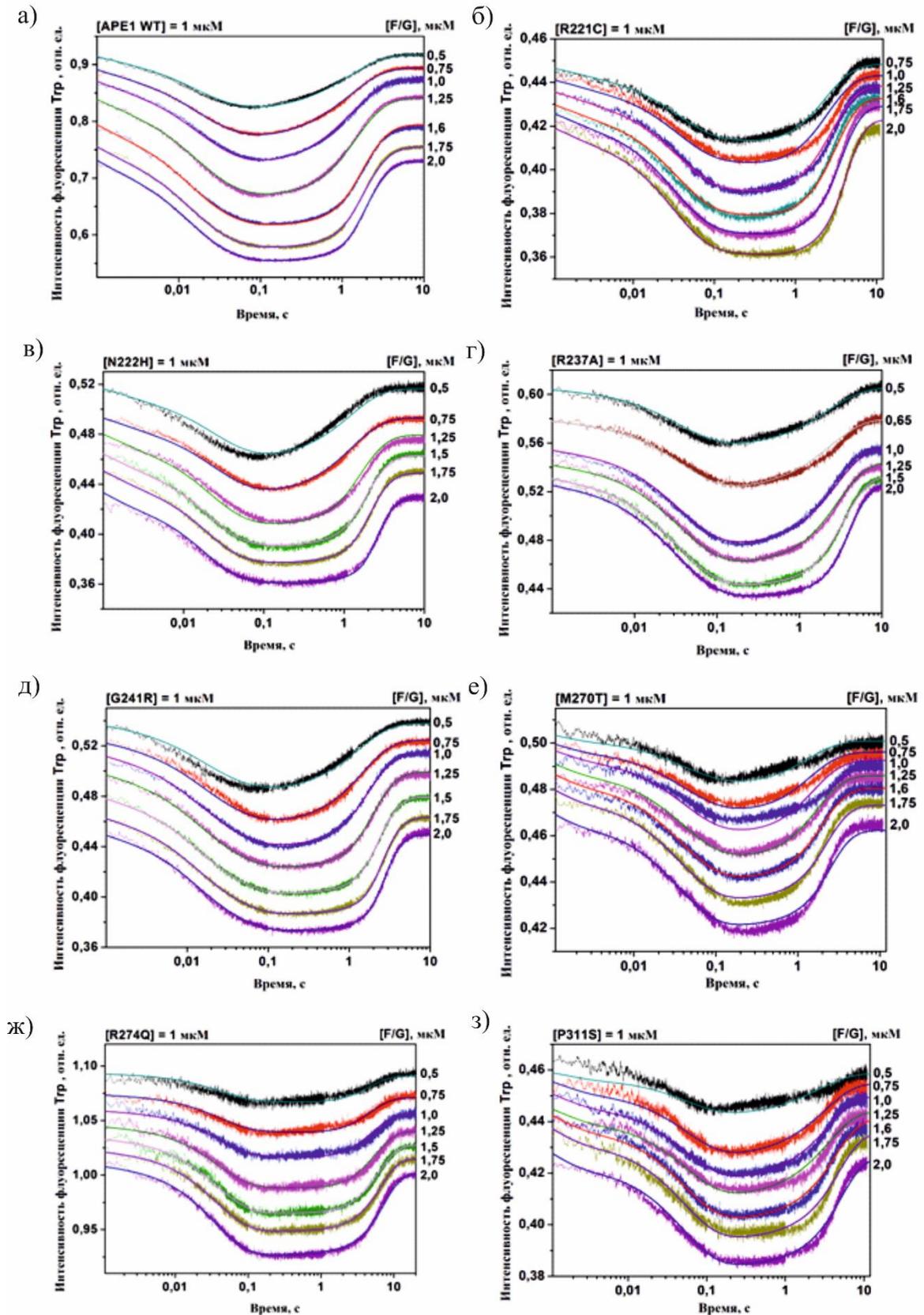


Рис. 31. Изменения интенсивности флуоресценции Trp в процессе взаимодействия WT APE1 (а), R221C APE1 (б), N222H APE1(в), R237A APE1 (г), G241R APE1 (д), M270T APE1 (е), R274Q APE1 (ж), P311S APE1 (з) с F/G-субстратом. Концентрация APE1 во всех экспериментах была 1.0 мкМ, концентрация F/G-субстрата варьировалась от 0.5 до 2.0 мкМ.

Таким образом, дестабилизация белковой глобулы в области активного центра существенно влияет на стадию образования каталитически компетентного комплекса и приводит к снижению ферментативной активности этих SNP-вариантов. Для варианта R221C наблюдается снижение K_{acc} примерно в 4 раза по сравнению с WT (Таблица 18). Кроме того, замена R221C, как и в случае вариантов R274Q и P311S оказывает большое влияние на вторую стадию связывания ДНК-субстрата, которая ведет к образованию каталитического комплекса (K_2 в 4,7 раза меньше, чем для WT).

Таблица 18. Кинетические параметры расщепления F/G-субстрата диким типом APE1 и его SNP-вариантами

Константы	WT	R221C	N222H	R237A	G241R	M270T	R274Q	P311S
$k_1 \times 10^{-6}, M^{-1} s^{-1}$	450±80	280±100	520±30	560±150	730±180	360±90	510±60	300±50
k_{-1}, s^{-1}	490±50	260±80	230±40	390±80	250±100	500±180	380±50	450±70
$K_1 \times 10^{-6}, M^{-1}$	0,9±0,3	1,1±0,7	2,3±0,5	1,4±0,7	2,9±1,8	0,7±0,4	1,3±0,3	0,7±0,2
k_2, s^{-1}	150±30	26±2	70±25	70±20	70±25	30±4	8,2±1,4	23±9
k_{-2}, s^{-1}	16±3	13±1	13±1	15±4	45±10	7,5±1,7	28±10	19±4
K_2	9,4±3,6	2,0±0,3	5,4±2,3	4,7±2,6	1,6±0,9	4,0±1,4	0,3±0,1	1,2±0,7
K_{acc}, M^{-1}	$8,5 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$12,4 \times 10^6$	$6,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$0,4 \times 10^6$	$0,8 \times 10^6$
k_{cat}, s^{-1}	1,0±0,1	1,1±0,2	1,2±0,1	0,6±0,1	1,6±0,3	1,2±0,2	1,0±0,4	0,9±0,2
$K_p \times 10^6, M$	50±10	25±10	8,9±1,3	580±170	110±40	2,0±0,2	480±80	130±80

$$K_i = k_i/k_{-i}$$

$$K_{acc} = K_1 \times K_2$$

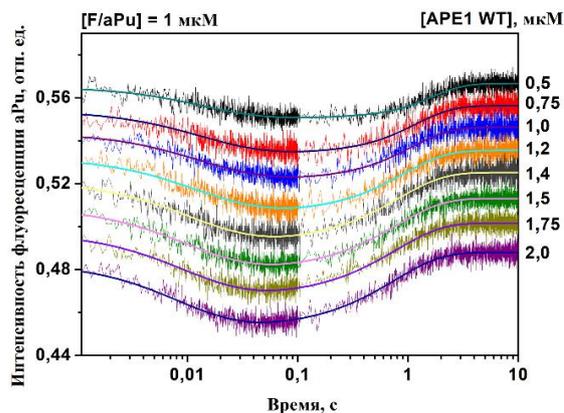
3.3.4. Конформационные изменения поврежденной ДНК, индуцированные APE1 дикого типа и SNP вариантами

Чтобы определить влияние аминокислотных замен в APE1 на конформационные изменения ДНК-субстрата, проводили регистрацию изменения интенсивности флуоресценции остатка aPu, расположенного напротив F-сайта в F/aPu-субстрате. На рисунке 32 видно, что в начальной фазе процесса до 50 мс интенсивность флуоресценции aPu уменьшается, с последующей фазой роста до 5 с. Известно, что интенсивность флуоресценции aPu в ДНК сильно зависит от микроокружения флуорофора [247,248,253], в частности, увеличение гидрофобности среды в непосредственной близости снижает интенсивность флуоресценции aPu. Таким образом уменьшение интенсивности флуоресценции, происходящее на начальном участке кинетических кривых может свидетельствовать о встраивании остатков Arg177 и Met270 в ДНК-дуплекс, со стороны большой и малой бороздки соответственно, что приводит к значительному изменению микроокружения остатка aPu в ДНК-субстрате. На более поздних временах увеличение

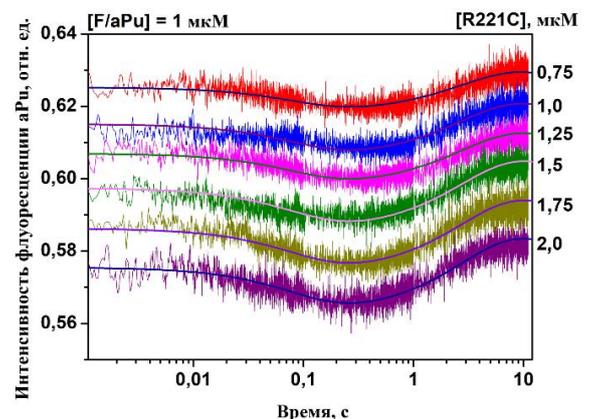
интенсивности флуоресценции aPu может свидетельствовать о протекании необратимой реакции гидролиза 5'-фосфодиэфирной связи и последующей диссоциации комплекса фермент-продукт. Анализ кинетических кривых, характеризующих взаимодействия APE1 WT и его SNP-вариантов R221C, N222H, R237A, G241R, M270T, R274Q и P311S с F/aPu-субстратом показал, что минимальный кинетический механизм (схема 5) немного отличается от механизма, предложенного ранее (схема 2). Эта схема содержит одну обратимую стадию, которая соответствует связыванию фермента с ДНК-субстратом и приводит к образованию каталитически активного комплекса, далее следует необратимая каталитическая стадия и равновесная стадия диссоциации комплекса фермент-продукт. Константы скоростей прямой и обратной реакций из схемы 5, а также константа равновесия K_r представлены в Таблице 19.

Сравнение констант скоростей связывания и каталитических стадий, полученных при регистрации флуоресценции aPu в ДНК-субстрате (рис. 32г, Таблица 19), показывает, что замена R237A влияет не только на стадии связывания ДНК-субстрата (K_{acc} составляет $9,3 \times 10^6$ и $3,9 \times 10^6$ M^{-1} для WT и R237A соответственно), но и приводит к уменьшению константы скорости катализа k_{cat} в $\sim 1,4$ раза. Кроме того, так же, как и в случае регистрации изменений интенсивности остатков Trp, в случае замены R237A происходит существенное увеличение константы диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции. При этом общее понижение активности данного SNP варианта связано именно с совокупным уменьшением эффективности процессов связывания субстрата и катализа. Для мутантных форм N222H и G241R также наблюдается уменьшение значения K_{acc} , но это не приводит к снижению скорости каталитической стадии ($1,8$ s^{-1} и $2,0$ s^{-1} для N222H и G241R соответственно).

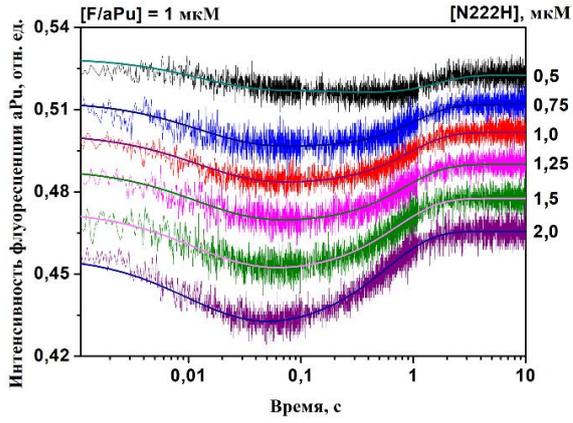
а)



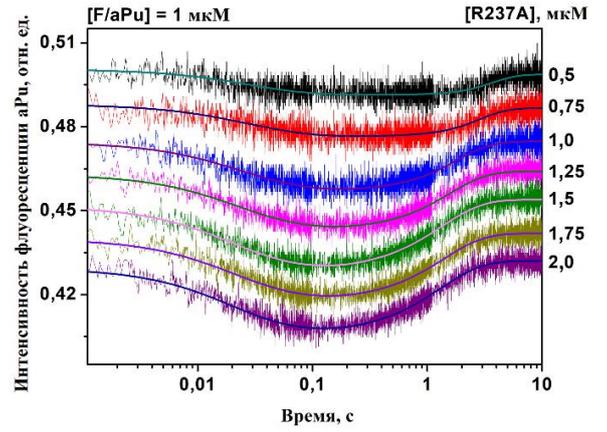
б)



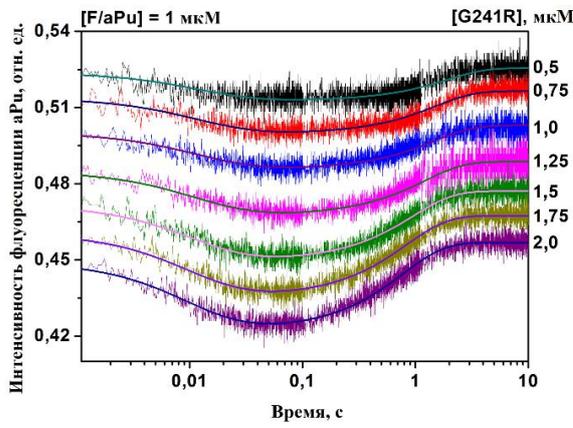
В)



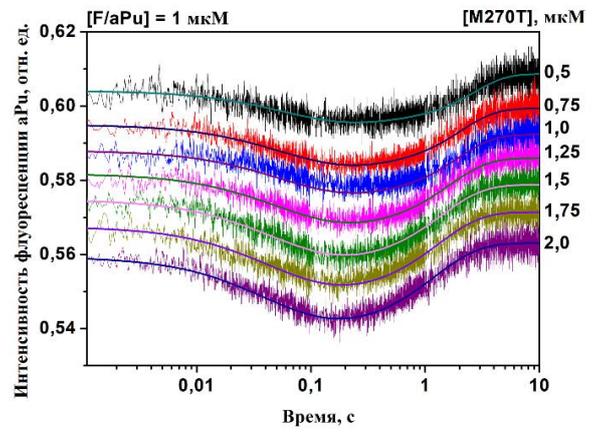
Г)



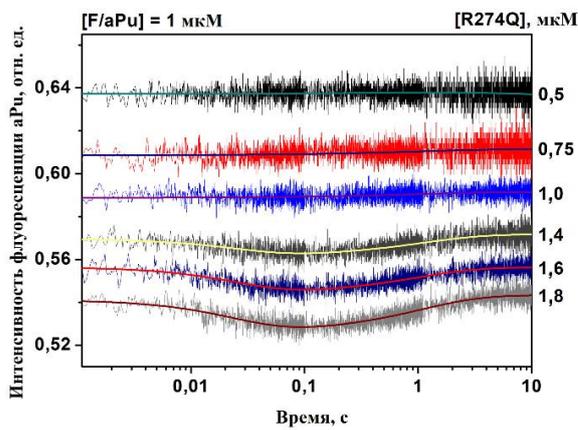
Д)



е)



Ж)



з)

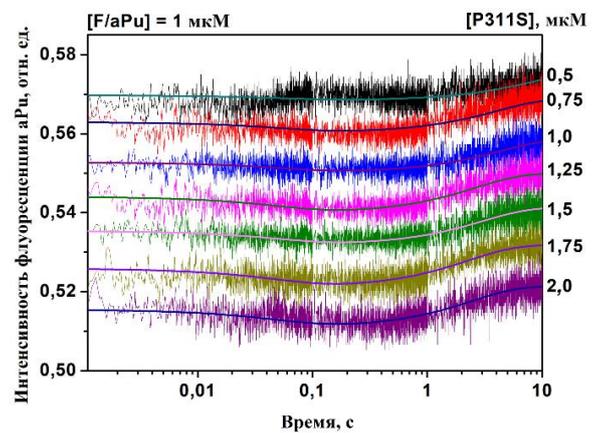


Рис. 32. Изменения интенсивности флуоресценции *aPu* в процессе взаимодействия WT APE1 (а), R221C APE1 (б), N222H APE1 (в), R237A APE1 (г), G241R APE1 (д), M270T APE1 (е), R274Q APE1 (ж), P311S APE1 (з) с F/aPu-субстратом. Концентрация F/aPu-субстрата во всех экспериментах была 1,0 мкМ, концентрация APE1 варьировалась от 0,5 до 2,0 мкМ.

Таблица 19. Кинетические параметры расщепления F/aPu-субстрата диким типом APE1 и его SNP вариантами

Константы	WT	R221C	N222H	R237A	G241R	M270T	R274Q	P311S
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	55±7	12±5	42±7	17±5	36±2	15±5	6±2	5±2
k_{-1}, s^{-1}	5,9±0,9	26±17	9,6±2,9	4,3±0,8	16±2	2,4±0,4	20±3	19±7
$K_{\text{acc}}, \text{M}^{-1}$	$9,3 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$6,2 \times 10^6$	$0,3 \times 10^6$	$0,26 \times 10^6$
$k_{\text{cat}}, \text{s}^{-1}$	1,49±0,04	1,2±0,4	1,8±0,1	1,1±0,1	2,0±0,1	1,0±0,1	1,8±0,4	1,3±0,4
$K_p \times 10^6, \text{M}$	0,80±0,04	50±25	2,8±1,2	220±80	2,2±0,6	9±2	1,4±0,2	60±15

$$K_{\text{acc}} = k_1/k_{-1}$$

Сравнение констант скорости и равновесия (Таблица 19) показывает, что замены R274Q и P311S (аминокислотные остатки в области активного центра фермента) приводят к более чем 10-кратному снижению значения константы ассоциации K_{acc} по сравнению с ферментом дикого типа, демонстрируя снижение активности этих мутантных форм APE1, как и в экспериментах с регистрацией изменения интенсивности флуоресценции Tgr. Замена R221C также приводит к замедлению фазы падения интенсивности флуоресценции *aPu* (рис. 32б). Как видно из Таблицы 19, эта замена приводит к снижению значения константы связывания примерно в 20 раз по сравнению с ферментом дикого типа.

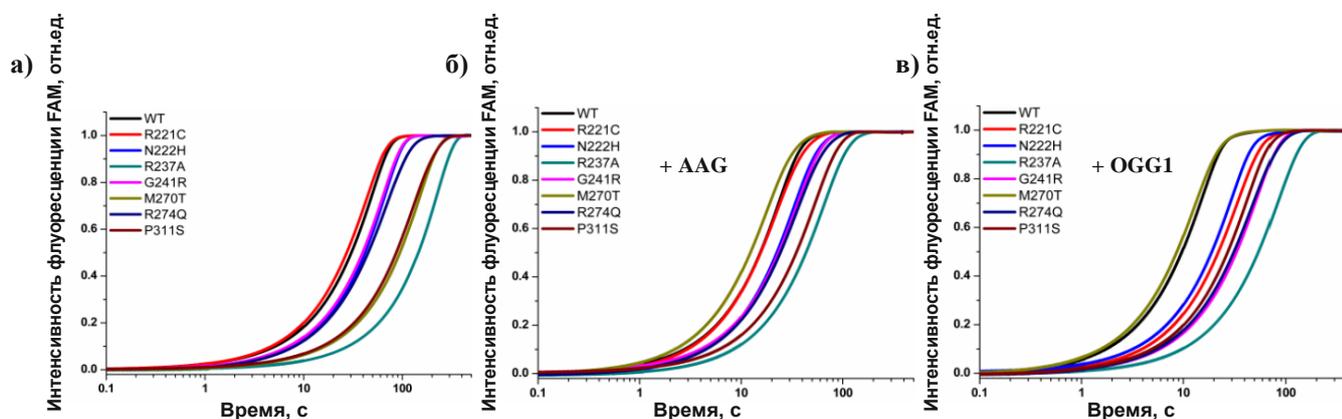
В экспериментах с регистрацией изменения интенсивности флуоресценции Tgr это отношение было меньше (Таблица 18), но это расхождение в значениях можно объяснить большей ошибкой, которая связана с небольшой амплитудой изменения интенсивности флуоресценции *aPu*. Также может быть, что замедление падения интенсивности флуоресценции *aPu* в этом случае связано с нарушением специфических контактов между Arg221 и ДНК.

В целом полученные данные свидетельствуют о том, что эти 7 природных SNP вариантов AP-эндонуклеазы 1 человека не проявляют каких-либо кардинальных изменений в своей каталитической активности, за исключением R237A. Поскольку нокаун активности APE1 повышает частоту мутаций, чувствительность к окислительному стрессу и частоту образования опухолей [204,205], а нокаут гена APE1 приводит к летальности эмбриона [254], то можно предположить, что все существующие природные варианты APE1 должны обладать каталитической активностью не ниже порогового значения, достаточного для полноценной ферментативной активности в клетке.

Поскольку АП-эндонуклеаза APE1 является многофункциональным ферментом, аминокислотные замены, индуцированные SNP, могут иметь влияние не только на ферментативные активности APE1, но и на регуляторные функции взаимодействия с другими ферментами пути BER. Поэтому следующим этапом наших исследований было изучение влияния SNP-ассоциированных замен в APE1 на функциональные взаимодействия с другими участниками BER.

3.4. Анализ влияния SNP-ассоциированных замен аминокислотных остатков APE1 на регуляцию активности фермента другими участниками BER

WT APE1 и семь его SNP вариантов были использованы для выявления влияния AAG, OGG1, UNG2, POL β , PCNA, и XRCC1 (далее по тексту эффекторы) на эффективность расщепления F-сайта. Выбор эффекторов был обусловлен тем, что мы хотели проанализировать возможное влияние ферментов BER, стоящих как выше по цепи реакций (ДНК-гликозилазы), так и ниже (POL β), а также белков-помощников (PCNA, и XRCC1), для которых имеются литературные данные, свидетельствующие о взаимодействии с APE1 [255,256], на активность APE1 дикого типа и его SNP вариантов. Для определения активности WT APE1 и его SNP вариантов, использовали FRET-меченый ДНК-субстрат (Таблица 9, FRET-F(2)), содержащий F-сайт в качестве специфического поврежденного нуклеотида и красителя FAM и BHQ1 на одном конце дуплекса. После расщепления, FRET-меченого ДНК-дуплекса ферментом APE1 и последующей диссоциации комплекса фермент-продукт происходит разрушение пары FAM-BHQ1, которое сопровождается ростом флуоресценции FAM. Как показано на рисунке 33, взаимодействие WT APE1 или его SNP вариантов с FRET-F(2)-субстратом вызывало рост сигнала флуоресценции до момента времени 500 с, в зависимости от SNP-варианта APE1 и наличия эффекторного белка. Наблюдаемые константы скорости k_{obs} фазы роста были рассчитаны по уравнению (8) (раздел 2.12. Материалы и методы) и приведены в Таблице 20.



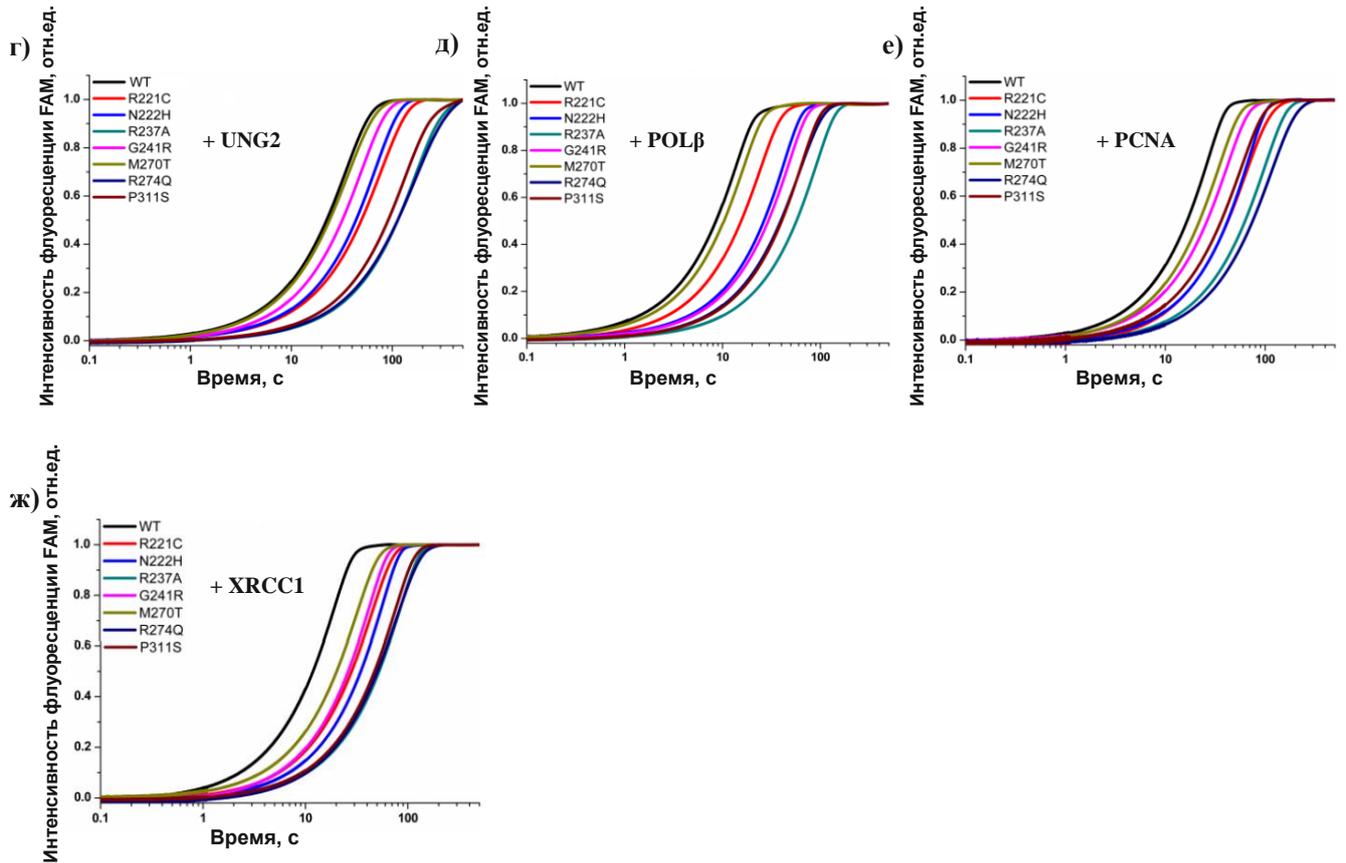


Рис. 33. Взаимодействие WT APE1 или его вариантов SNP с FRET-меченым субстратом. Интенсивность изменения флуоресценции FAM характеризуют активность вариантов WT и SNP APE1 без каких-либо добавок (а) или в присутствии AAG (б), OGG1 (в), UNG2 (г), Pol β (д), PCNA (е) или XRCC1 (ж). Концентрация WT APE1 или SNP вариантов была равна 10 нМ, концентрация FRET-F(2) субстрата 1,0 мкМ, концентрация белка-эффектора (AAG, OGG1, UNG2, Pol β , PCNA, XRCC1) 1,0 мкМ.

Сравнение полученных наблюдаемых констант скорости расщепления F-сайта для WT APE1 и его SNP вариантов в отсутствие эффекторных белков показали, что фермент R237A обладает в 5 раз меньшей активностью, что хорошо согласуется с полученными нами данными, а также опубликованными в литературе [203]. Однако следует отметить, что данные, полученные нами по определению активности SNP вариантов APE1 в отношении расщепления 13-звенного F/G-субстрата и 17-звенного FRET-F(2)-субстрата (Таблица 9, раздел Материалы и методы) немного отличаются друг от друга. Вероятно, эти отличия обусловлены не только различием контекста используемых субстратов, но и различием в способах детекции (PAGE для F/G-субстрата и изменение интенсивности флуоресценции FAM для FRET-F(2)-субстрата).

Наблюдаемые константы скорости, полученные в присутствии и в отсутствие эффекторного белка (по 3 повтора для каждого эксперимента), использовали для расчета относительной активности каждого SNP-варианта (ур. (9), раздел 2.12. Материалы и методы), характеризующей влияние дополнительного белка на скорость расщепления F-сайта. На рисунке 34 приведена относительная активность фермента APE1 дикого типа и его SNP-вариантов в

присутствии белков BER.. Активность фермента в отсутствие белков-эффекторов принята равной 1. Принимая во внимание точность использованного метода определения относительной активности, статистически значимыми считали отличия, превышающие 1,5 единицы.

Таблица 20. Наблюдаемые константы скорости (k_{obs} , s^{-1}) расщепления FRET-F(2)-субстрата APE1 дикого типа или его SNP вариантами в присутствии или отсутствие эффекторного белка

Белок-эффектор	Варианты APE1							
	WT	R221C	N222H	R237A	G241R	M270T	R274Q	P311S
Без эффектора	0,021 ± 0,001	0,023 ± 0,001	0,015 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,019 ± 0,001	0,041 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,008 ± 0,001
AAG	0,040 ± 0,001	0,039 ± 0,002	0,026 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,027 ± 0,001	0,051 ± 0,001	0,025 ± 0,001	0,018 ± 0,001
OGG1	0,049 ± 0,001	0,043 ± 0,001	0,033 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,029 ± 0,001	0,073 ± 0,004	0,019 ± 0,009	0,022 ± 0,001
UNG2	0,026 ± 0,002	0,014 ± 0,001	0,015 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,019 ± 0,001	0,026 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,007 ± 0,001
Polβ	0,074 ± 0,001	0,038 ± 0,001	0,023 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,029 ± 0,001	0,062 ± 0,002	0,016 ± 0,001	0,015 ± 0,001
PCNA	0,035 ± 0,001	0,013 ± 0,002	0,014 ± 0,001	0,009 ± 0,002	0,023 ± 0,001	0,026 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,016 ± 0,001
XRCC1	0,051 ± 0,003	0,021 ± 0,001	0,016 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,021 ± 0,001	0,029 ± 0,001	0,011 ± 0,002	0,012 ± 0,001

Для APE1 дикого типа эффект увеличения относительной активности более чем 2 раза наблюдался в присутствии OGG1, POLβ или XRCC1 (рис. 34). Интересно отметить, что о стимуляции АП-эндонуклеазной активности WT APE1 с помощью POLβ в литературе уже давно существует информация [257, 258], тогда как о стимулирующем эффекте XRCC1 на активность АП-эндонуклеазы появилась информация сравнительно недавно [255]. В настоящее время наиболее изученным как с точки зрения координации, так и функционального влияния, является взаимодействие между ферментами OGG1 и APE1 [259]. Полученные данные, свидетельствуют, что стимулирующие эффекты AAG и PCNA были менее чем в 2 раза, а UNG2 вызывал лишь незначительное усиление эффективности расщепления F-сайта APE1 WT. Стимуляция активности «быстродействующего» фермента APE1 другими участниками BER, показанная в нашем исследовании, в совокупности с известными данными о стимулировании ДНК-гликозилаз АП-эндонуклеазой, свидетельствует о сложном механизме координации этих ферментов при протекании всего ферментативного каскада BER.

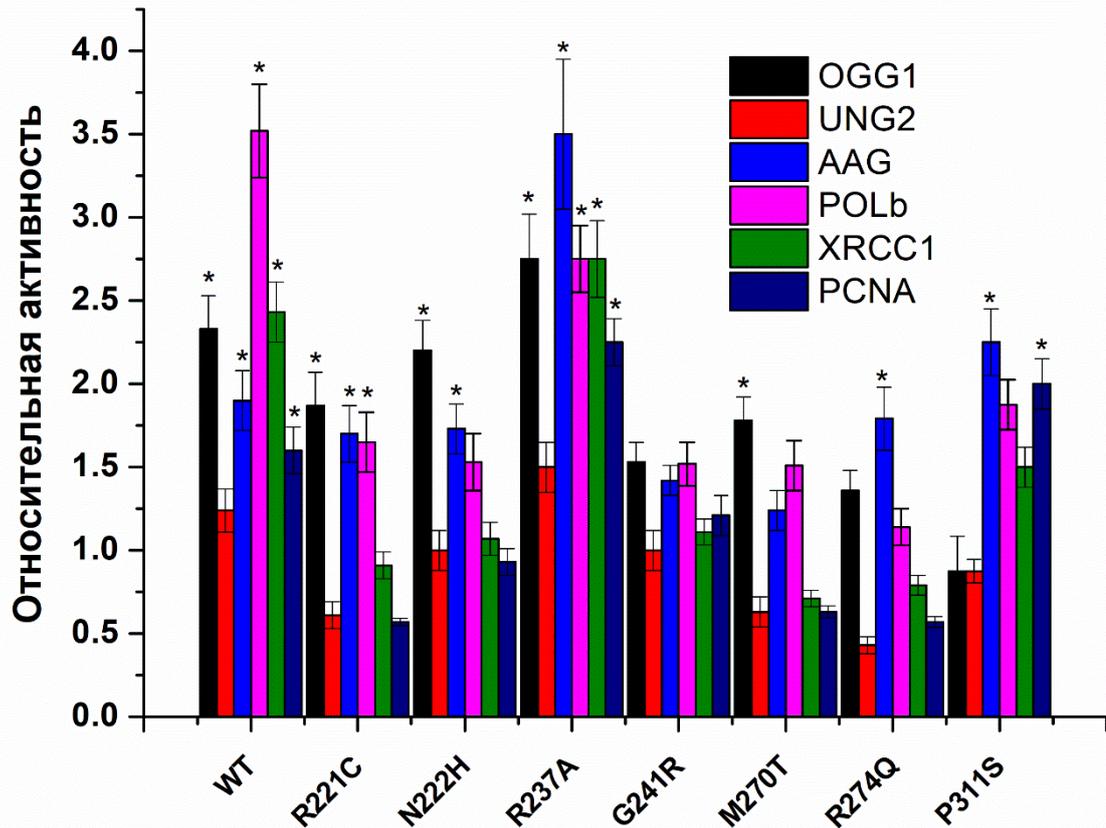


Рис. 34. Относительная активность фермента APE1 дикого типа и его SNP-вариантов в присутствии белков BER. Значение относительной активности рассчитывали по ур. (9), активность фермента в отсутствие белков-эффекторов соответствует 1. Эффекты, обнаруженные для дикого типа APE1 и его мутантных форм в присутствии белков BER, которые статистически отличались от таковых в отсутствие белков BER, отмечены * ($p \leq 0,05$).

Сравнение данных, полученных для WT и SNP-вариантов, позволяет предположить возможную роль каждого измененного (вследствие возникновения SNP) аминокислотного остатка во взаимодействии с другими участниками пути BER. Снижение или усиление относительной активности в расщеплении F-сайта для каждого SNP-варианта может указывать на то, вовлечен исследуемый аминокислотный остаток во взаимодействие с другими белками или нет. Опираясь на это предположение, мы обнаружили, что влияние некоторых белков BER на изменение относительной активности APE1 варьируется в пределах небольшого диапазона, что, скорее всего, указывает на отсутствие прямых контактов белка с аминокислотным остатком, измененным в результате возникновения SNP. Так, например, в случае UNG2 диапазон относительных единиц увеличения активности колеблется в небольшом диапазоне от 0,5 до 1,5 для всех протестированных вариантов APE1.

При этом некоторые SNP-варианты проявляли устойчивую тенденцию стимулирующего эффекта независимо от того, какой из белков-эффекторов был задействован. Например, замена

Arg237, расположенного на поверхности APE1, на Ala вызывает значительное увеличение активности расщепления F-сайта независимо от того, какой эффектор используется. Интересно отметить, что данные, полученные для R237A, свидетельствуют о том, что этот SNP-вариант обладает наименьшей каталитической активностью среди протестированных, но, с другой стороны, является одним из наиболее стимулируемых ферментов другими участниками пути BER. Анализ полученных результатов для варианта G241R показал, что появление остатка Arg на поверхности фермента вызывает заметное снижение влияния белков-эффекторов на относительную активность, что свидетельствует о том, что положительный заряд в этой области APE1 негативно влияет на взаимодействие с другими белками. Для варианта R221C, измененный аминокислотный остаток которого расположен на поверхности фермента вблизи сайта связывания ДНК, наблюдается сниженный эффект воздействия по сравнению с WT APE1 в случае всех используемых белков-эффекторов. Тогда как замена соседнего аминокислотного остатка N222H существенные отличия от WT, демонстрирует лишь в случаях с POL β , XRCC1 и PCNA, что может указывать на то, что Asn222 играет важную роль во взаимодействиях именно с этими ферментами. Все эти наблюдения подтверждают идею о том, что положительно заряженные остатки Arg, расположенные на поверхности белковой глобулы в разных областях APE1, потенциально могут участвовать в белок-белковых взаимодействиях, но оказывают различное влияние на активность APE1. По сравнению с WT вариант P311S более сильно стимулировался AAG и PCNA, но в меньшей степени UNG2, OGG1, POL β и XRCC1. Оба варианта фермента (M270T и R274Q), несущие замены в сайте связывания ДНК, наименее чувствительны, по сравнению с другими SNP-вариантами, к стимуляции белками BER. Это, скорее всего, можно объяснить тем, что возможности стимулирующего эффекта белков BER ограничиваются в следствие того, что происходит изменение сети контактов в области ДНК-связывающего сайта, вызываемое этими заменами.

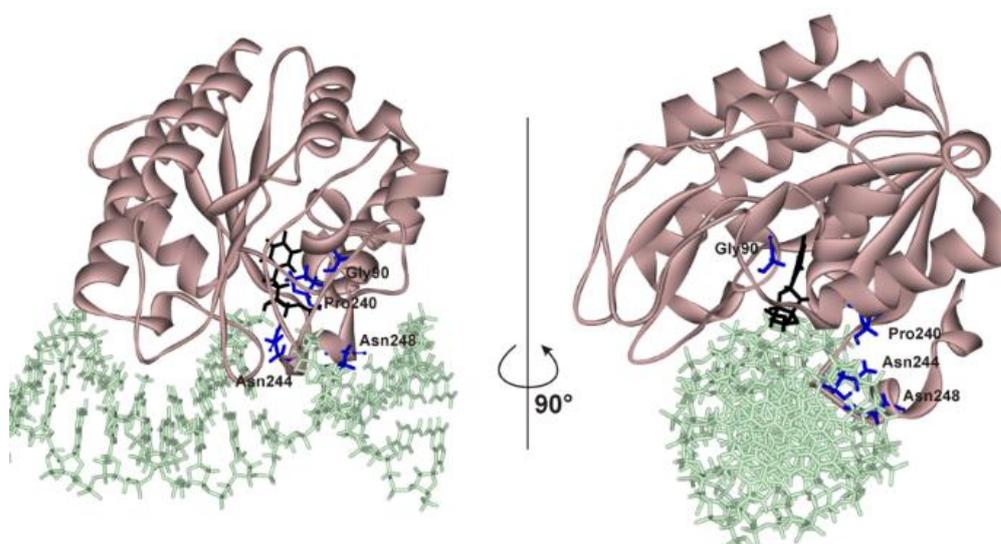
Таким образом, каждый из протестированных белков-эффекторов оказывает влияние на активность расщепления F-сайта АП-эндонуклеазой человека APE1 дикого типа и её SNP вариантами. Сравнительный анализ эффективности гидролиза поврежденной ДНК комплексом APE1 с различными белками BER позволил предположить вовлеченность измененных в следствие SNP аминокислотных остатков в белок-белковую координацию процесса репарации. Следует отметить, что аминокислотные замены R237A, M270T, R274Q и P311S оказывали значительное влияние на сродство APE1 к ДНК-субстрату и/или продукту, что также является важным фактором функционального взаимодействия белков, которое реализуется не только за счет прямых белок-белковых контактов, но и может быть обусловлено связыванием с ДНК, как, например, показано для пары APE1-OGG1 [259].

3.5. Анализ влияния полиморфизмов ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4^{cat} на процессы взаимодействия с ДНК-субстратом

Урацил – одно из наиболее распространенных повреждений ДНК, которое образуется либо при дезаминировании цитозина: как спонтанном [260–262], так и ферментативном [263,264], либо при ошибочном встраивании UMP во время репликативного синтеза [265]. Урацил в ДНК человека узнается и удаляется несколькими ДНК-гликозилазами: урацил-ДНК-гликозилазой (UNG2), тимин-ДНК-гликозилазой (TDG), специфичной к одноцепочечной ДНК монофункциональной урацил-ДНК-гликозилазой (SMUG1) и метил-СрG-связывающим ферментом 4 (MBD4) [266,267]. Необходимо отметить, что четыре ДНК-гликозилазы человека, обладающие способностью удалять урацил, имеют специализированную субстратную специфичность, связанную с биологической функцией этих ферментов: UNG2 и SMUG1, в основном удаляют урацил из одно- и двухцепочечной ДНК, а TDG и MBD4 – производные урацила, возникающие в процессах эпигенетической модификации ДНК [266].

Используя базу данных dbSNP NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), мы отобрали полиморфные варианты в экзонах генов, кодирующих полноразмерный фермент SMUG1 и каталитический домен фермента MBD4 (MBD4^{cat}) человека. Последующий анализ потенциальной важности SNP был основан на принципе изменения химической природы боковой группы аминокислоты, кодируемой соответствующим триплетом нуклеотидов, и пространственным расположением аминокислотного остатка вблизи ДНК-связывающего сайта и/или активного центра фермента (рис. 35). Для каждого фермента выбрали по четыре SNP (Таблица 21) для изучения их влияния на активность ДНК-гликозилаз.

а)



б)

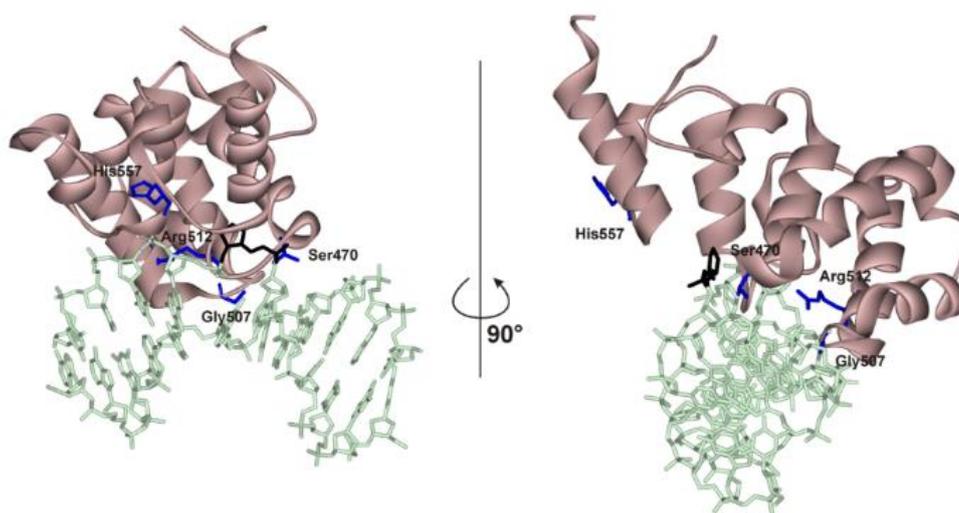


Рис. 35. Пространственное расположение аминокислотных остатков, подвергающихся заменам в случае отобранных SNP (Таблица 18) в структуре комплексов SMUG1 (а) и MBD4^{cat} (б) с ДНК.

Потенциальная важность выбранных вариантов была проверена по базе данных BioMuta, содержащей данные по онкологическим заболеваниям, обнаруженным у пациентов, в геноме которых присутствуют эти однонуклеотидные замены (<https://hive.biochemistry.gwu.edu/biomuta/proteinview/Q53HV7> для SMUG1 и <https://hive.biochemistry.gwu.edu/biomuta/proteinview/O95243> для MBD4).

Таблица 21. Аминокислотные замены, выбранные в качестве потенциально значимых полиморфных вариантов SMUG1 и MBD4^{cat}

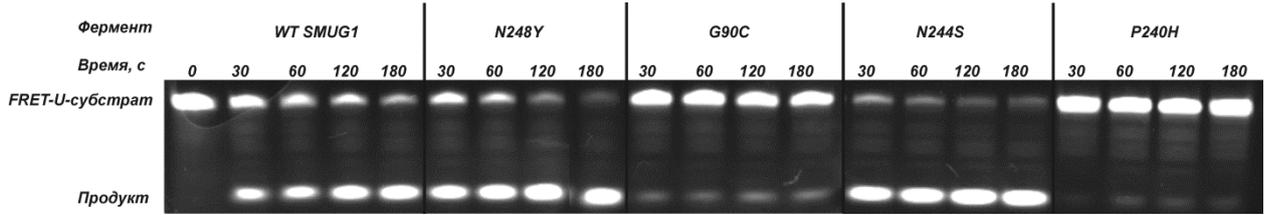
SMUG1	G90C	Часть области Gly87-Met91, отвечающая за распознавание заместителя в положении C5 пиримидинового основания.	рак легкого
	P240H	Часть интеркалирующей петли His239-Lys249, которая действует как «клин» и вставляется в двойную спираль ДНК в области поврежденного нуклеотида.	меланома
	N244S		рак легкого
	N248Y		рак печени
MBD4 ^{cat}	S470L	Часть петли Leu466-Gly471, участвующая в связывании ДНК	рак молочной железы
	G507S	Часть петли Leu503 – Leu511, участвующая в связывании ДНК	колоректальный рак
	R512W	Рядом с петлей Leu503 – Leu511, участвующей в связывании ДНК.	колоректальный рак
	H557D	Находится на поверхности и приводит к изменению заряда этого участка белка.	рак молочной железы

3.5.1. Анализ активности SNP вариантов SMUG1 и MBD4^{cat} методом разделения продуктов реакции в ПААГ

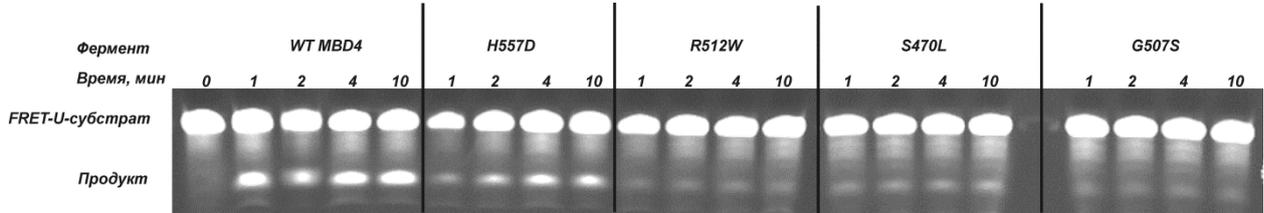
Для определения влияния отобранных SNP-ассоциированных аминокислотных замен в MBD4^{cat} и SMUG1 на ферментативную активность этих белков мы провели анализ накопления продуктов реакции с помощью электрофореза в ПААГ, что позволило оценить эффективность удаления урацила из модельных ДНК-субстратов ферментами дикого типа и их мутантными формами. Было показано, что эффективность удаления урацила ферментами дикого типа и их полиморфными вариантами существенно различается (рис. 36).

На основании анализа кинетических кривых накопления продуктов реакции при взаимодействии SMUG1 и его вариантов с FRET-U-субстратом (рис. 36в) и сравнения относительной активности ферментов (рис. 36д) можно сделать вывод, что замены N244S и N248Y приводят к увеличению скорости оборота фермента. Ранее сообщалось [267], что для фермента дикого типа скорость-лимитирующей стадией ферментативного процесса является диссоциация комплекса фермент-продукт; поэтому нарушение прямых взаимодействий между аминокислотными остатками в положениях 244 и 248 и ДНК приводит к дестабилизации комплекса фермент-продукт и сопровождается увеличением скорости оборота ферментов.

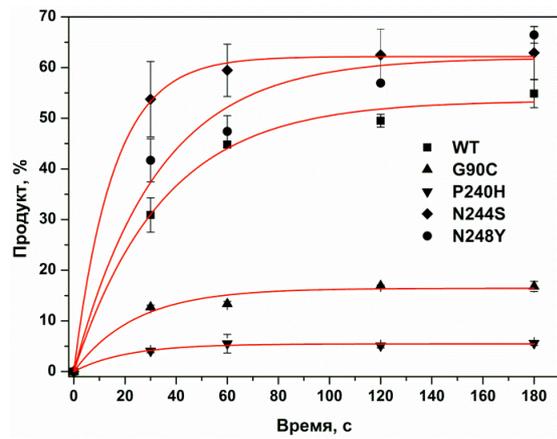
а)



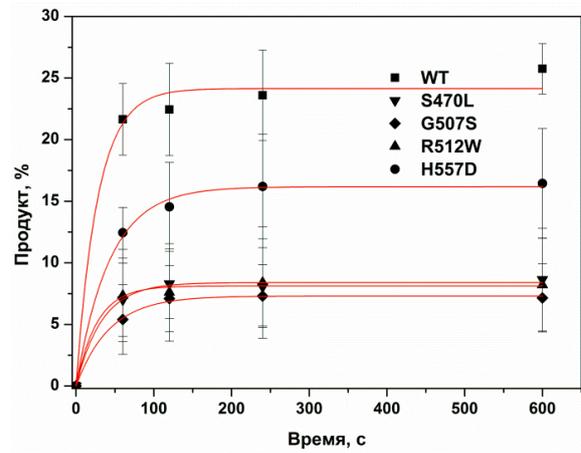
б)



в)



г)



д)

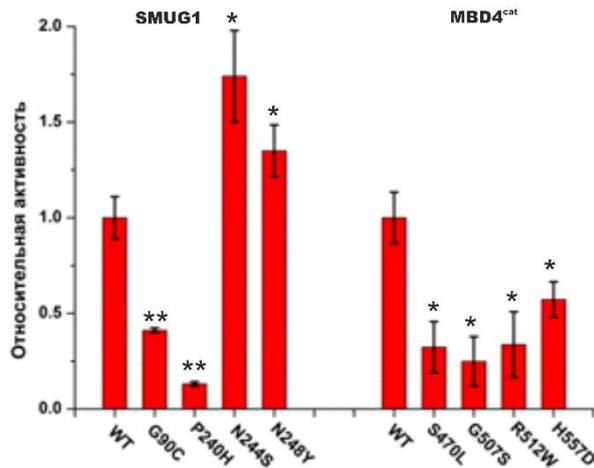


Рис. 36. Эффективность удаления урацила из FRET-U-субстрата под действием SMUG1 (а, в) и MBD4^{cat} (б, г) дикого типа (WT) и их полиморфных вариантов. [FRET-U-субстрат] = 5,0 мкМ, [фермент] = 1,0 мкМ. (д) Представлены относительные активности ферментов и их мутантных форм, нормированные на активность соответствующего фермента дикого типа. Статистические отличия эффектов, обнаруженных для мутантных форм SMUG1 и MBD4^{cat}, отмечены $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**).

Замена аминокислотного остатка Pro240 на His, играющего роль клина в интеркалирующей петле His239–Lys249, который встраивается в двойную спираль ДНК в районе поврежденного нуклеотида, приводит к значительному снижению каталитической активности фермента. Согласно модели фермент-субстратного комплекса, His240 образует сеть контактов с Arg140 и Trp251, что может приводить к ограничению конформационной подвижности всей петли His239–Lys249 и тем самым препятствовать формированию каталитически компетентного состояния фермента, что в свою очередь ведет к практически полной потере ферментативной активности данного SNP варианта. Замена G90C, расположенная в районе Gly87–Met91, отвечающем за узнавание заместителя в положении C5 пиримидинового основания, также значительно снижает активность.

Следует отметить, что активность MBD4^{cat} вариантов S470L, G507S и R512W составляла не более 30% от активности фермента дикого типа, а мутация H557D приводила к снижению активности на 50% (рис. 36б, 36г и 36д). Таким образом, для всех протестированных вариантов MBD4^{cat} наблюдается значительное снижение активности за счет нарушения локальных взаимодействий в области ДНК-связывающего сайта.

3.5.2. Анализ кинетики образования фермент-субстратных комплексов методом «остановленного потока»

Конформационные изменения ферментов в комплексах с ДНК-субстратами регистрировали по изменению интенсивности флуоресценции остатков Trp. Анализ кинетических данных позволил выявить стадии ферментативного процесса, которые наиболее подвержены влиянию SNP-ассоциированных аминокислотных замен. Кинетические кривые, характеризующие изменение интенсивности флуоресценции Trp при взаимодействии SMUG1 дикого типа с U-субстратом (рис. 37а), содержат фазу снижения интенсивности флуоресценции до ~0,3 с и фазу роста с плато через 5 с от начала реакции. Ранее было показано [268,269], что спад сигнала на начальном участке кинетической кривой соответствует образованию первичных неспецифических контактов с ДНК, а фаза роста интенсивности флуоресценции Trp в диапазоне 0,5–10 с соответствует стадиям гидролиза N-гликозидной связи и диссоциации комплекса фермент-продукт реакции. Установлено, что диссоциация комплекса фермент-продукт является скоростью-лимитирующей стадией ферментативного процесса. Полученные кинетические кривые аппроксимировали уравнением (4) (раздел 2.12. Материалы и методы), что позволило рассчитать значения наблюдаемых констант скорости процессов связывания и катализа (Таблице 22).

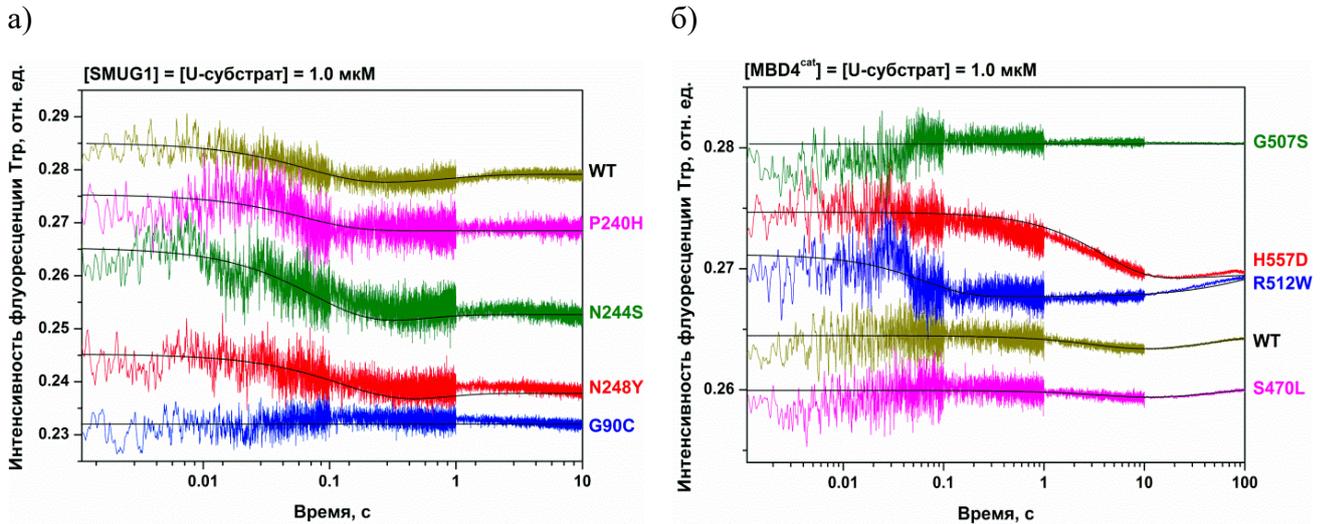


Рис. 37. Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp при взаимодействии SMUG1 (а) и MBD4^{cat} (б) дикого типа (WT) и полиморфных вариантов с U-субстратом (базовые линии искусственно смещены относительно друг друга для улучшения восприятия данных; это не сказывается на расчете значений кажущихся констант).

Сравнение кинетических кривых и наблюдаемых констант скорости для SMUG1 дикого типа с таковыми для полиморфных вариантов показывает, что в случае U-субстрата изменения интенсивности флуоресценции Trp в начальной области имеют сходный вид для всех вариантов, кроме варианта G90C. Таким образом, в случае мутантной формы G90C нарушается прохождение начальной стадии ферментативной реакции: связывание субстрата и узнавание урацила. В то же время замена P240H, также приводящая к драматическому снижению каталитической активности фермента, не влияет на стадию связывания с ДНК, поскольку на кинетических кривых наблюдается снижение интенсивности флуоресценции остатков Trp. По-видимому, блокирование ферментативной активности в случае P240H происходит на стадии перехода фермента в комплексе с субстратом в каталитически компетентную конформацию. Интересно отметить, что для более активных вариантов SMUG1, N248Y и N244S наблюдаемая константа (k_2) была соответственно в 1,7 и 2,1 раза выше, чем для фермента дикого типа.

На рис. 37б представлены кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp при взаимодействии MBD4^{cat} дикого типа и его полиморфных вариантов с U-субстратом. Согласно Петронзелли и соавт. [270], снижение интенсивности флуоресценции Trp в интервале времени 2 мс – 10 с характеризует образование первичного комплекса и поиск модифицированного основания, а рост в интервале 10–100 с соответствует образованию каталитически компетентной конформации фермента и началу накопления продукта. Как и в случае SMUG1, скорость-лимитирующей стадией ферментативного процесса является диссоциация комплекса фермент-продукт [269]. Интересно отметить, что замены S470L и H557D не влияли на значения наблюдаемых констант скорости в условиях эквимольного соотношения

фермент-субстрат. В то же время в случае избытка субстрата (рис. 36г и 36д) ферментативная активность этих мутантов MBD4^{cat} снижается, что свидетельствует о замедлении скорость-лимитирующей стадии. В случае варианта G507S, наименее активного среди всех проанализированных вариантов (рис. 36д), изменений интенсивности флуоресценции остатков Тгр не зарегистрировано (рис. 37б), что может быть связано со значительной дестабилизацией фермент-субстратного комплекса, поскольку остаток Gly507 является частью петли Leu503–Leu511, участвующей в связывании ДНК. В случае варианта R512W, содержащего дополнительный остаток Тгр в районе петли Leu503–Leu511, участвующей в связывании ДНК, регистрировали стадию взаимодействия этой петли с ДНК. Действительно, для R512W, в отличие от всех других вариантов, на начальном участке кинетической кривой происходит значительное снижение интенсивности флуоресценции Тгр, что, по-видимому, характеризует конформационную перестройку петли Leu503–Leu511 при образовании фермент-субстратного комплекса; в случае всех других мутантных форм MBD4^{cat} этот переход не был зарегистрирован.

Таблица 22. Кажущиеся константы скорости реакции SMUG1 и MBD4^{cat} дикого типа и их полиморфных вариантов с U-субстратом

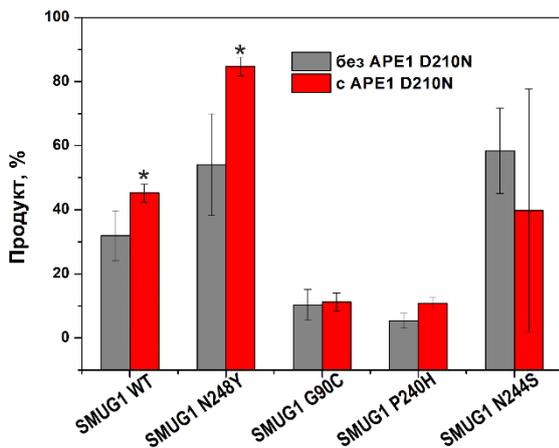
Фермент	$k_1, \text{с}^{-1}$	$k_2, \text{с}^{-1}$
SMUG1		
WT	14,4 ± 0,3	1,2 ± 0,1
G90C	-	-
P240H	16,0 ± 0,4	-
N244S	12,5 ± 0,4	2,5 ± 0,5
N248Y	7,0 ± 1,0	2,0 ± 0,8
MBD4 ^{cat}		
WT	0,28 ± 0,02	0,020 ± 0,002
S470L	0,22 ± 0,01	0,018 ± 0,001
G507S	-	-
R512W	15,5 ± 0,4	0,010 ± 0,001
H557D	0,25 ± 0,02	0,024 ± 0,003

Таким образом, на основании полученных данных по активности полиморфных вариантов двух урацил-ДНК-гликозилаз человека: SMUG1 и MBD4 – можно сделать вывод, что природные варианты этих ферментов могут различаться по эффективности удаления остатков урацила из ДНК. Показано, что повышенная ферментативная активность полиморфных вариантов SMUG1 N248Y и N244S обусловлена ускорением лимитирующей стадии процесса – диссоциации комплекса фермент-продукт. Для всех других проанализированных нами SNP-вариантов выявлена сниженная активность по сравнению с ферментами дикого типа, что может негативно отражаться на репарации геномной ДНК у носителей этих полиморфизмов.

3.5.3. Влияние APE1 на активность SNP вариантов SMUG1 и MBD4^{cat}

Для проверки эффекта АП-эндонуклеазы на SMUG1 и MBD4^{cat} мы использовали каталитически неактивную мутантную форму APE1 D210N, так как эксперименты с диким типом APE1 показали, что АП-эндонуклеаза способна расщеплять U-субстрат даже в отсутствие урацил-ДНК-гликозилаз. С использованием метода разделения реакционной смеси в ПААГ было установлено, что эффективность удаления урацила ферментами дикого типа и их полиморфными вариантами в присутствии и в отсутствие APE1 отличается. Так, анализ накопления продуктов реакции, полученных при взаимодействии ³²P-меченного U/G-субстрата с ДНК-гликозилазой SMUG1 и её SNP вариантами, прединкубированным с каталитически неактивной мутантной формой APE1 D210N показал, что для фермента дикого типа и варианта SMUG1 N248Y наблюдается увеличение скорости накопления продукта примерно на 25% (рис. 38а). Для полиморфных вариантов N244S, P240H и G90C достоверно значимых изменений не наблюдается.

а)



б)

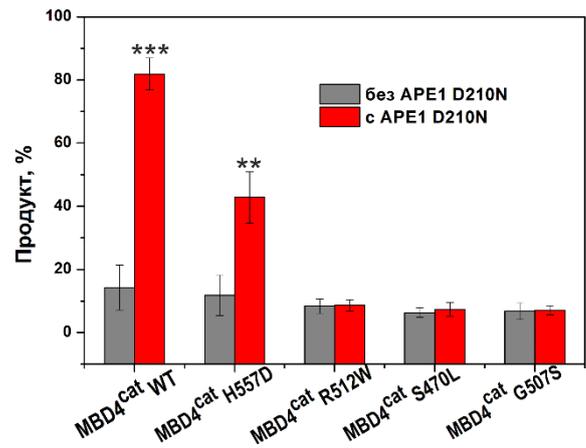


Рис. 38. Степень расщепления, ³²P-меченного U/G-субстрата ферментами SMUG1 (а) и MBD4^{cat} (б) дикого типа (WT) и их полиморфными вариантами в отсутствие или присутствии в реакционной смеси каталитически неактивной формы фермента APE1 D210N. ([U*/G-субстрата] = 200 нМ, [ДНК-гликозилазы] = 80 нМ, [APE1 D210N] = 200 нМ, время реакции 30 мин). Статистические отличия эффектов, обнаруженных в присутствии APE1 D210N, отмечены $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

При этом на активность фермента MBD4^{cat} дикого типа и SNP-варианта MBD4^{cat} H557D присутствие в реакционной смеси APE1 D210N оказывало еще больший стимулирующий эффект (рис. 38б). Как видно на рисунке 39б, скорость накопления продукта реакции увеличивается примерно в 4 и в 2,5 раза, соответственно для MBD4^{cat} дикого типа и MBD4^{cat} H557D. Для остальных протестированных мутантных форм MBD4^{cat} (R512W, S470L и G507S) изменения активности в присутствии APE1 D210N не наблюдалось. Таким образом, мы

обнаружили, что присутствие в реакционной смеси АП-эндонуклеазы 1 может оказывать различное действие на полиморфные варианты ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4^{cat}, как стимулирующее, так и нейтральное.

3.6. Апробация тест-системы определения активности ключевых ферментов-участников BER в клеточных экстрактах

Ранее в нашей лаборатории был предложен метод определения активности ряда ферментов эксцизионной репарации оснований в клеточных экстрактах на основе флуоресцентно-меченных ДНК-дуплексов, содержащих поврежденный нуклеотид [271]. В качестве поврежденных нуклеотидов использовали 7,8-дигидро-8-оксогуанозин (охоG), 5,6-дигидроуридин (DHU), уридин (U), 1,N6-этенoadенозин (εA) и АП-сайт. Набор ДНК-зондов, содержащих эти повреждения, позволил охарактеризовать активность нескольких ферментов репарации человека: АП-эндонуклеазы APE1; 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы OGG1; алкиладенин-ДНК-гликозилазы AAG; ДНК-гликозилаз UNG2, SMUG1, MBD4 и TDG, специфически узнающих урацил в ДНК; ДНК-гликозилаз NEIL1 и NTHL1, узнающих 5,6-дигидроуридин. Для определения активности АП-эндонуклеазы APE1 использовали ДНК-зонд, содержащий в составе F-сайт.

Анализ активности ферментов репарации ДНК с помощью данных дуплексных ДНК-зондов в клетках опухолевых линий человека различного гистологического происхождения, а именно A549, HeLa, MCF7, WT-7, HEK293T и HNC8, показал, что дуплексные ДНК-зонды, содержащие охоG и εA, расщепляемые ферментами OGG1 и AAG, соответственно, не обладают достаточной для регистрации активности чувствительностью [271]. Полученные данные свидетельствовали о том, что дуплексные ДНК-зонды не могут быть использованы для определения активности в клеточном экстракте, полученном менее чем из 10⁶ клеток. Кроме того, время анализа было ограничено до 2000 с для предотвращения неспецифической деградации ДНК-зонда клеточными нуклеазами.

В настоящей работе была проведена оптимизация структуры ДНК-зондов, направленная на улучшение их устойчивости к неспецифической деградации в клеточных экстрактах. ДНК-зонды, используемые в данной работе (рис. 39), представляли собой самокомплементарные олигодезоксирибонуклеотиды, несущие FRET-пару FAM/BHQ1 на концах цепи, а также содержащие в своем составе повреждение, специфичное для определенного фермента или группы ферментов (Таблица 9). В качестве поврежденных нуклеотидов использовали 7,8-дигидро-8-оксогуанозин (охоG), тимидин-гликоль (Tg), уридин (U), 1,N6-этенoadенозин (εA) и

F-сайт. Для предотвращения 3'-5'-экзонуклеазной деградации ДНК-зондов в клеточном экстракте 3'-концевой межнуклеотидный фосфатный остаток был заменен на тиофосфатную группу (ps).

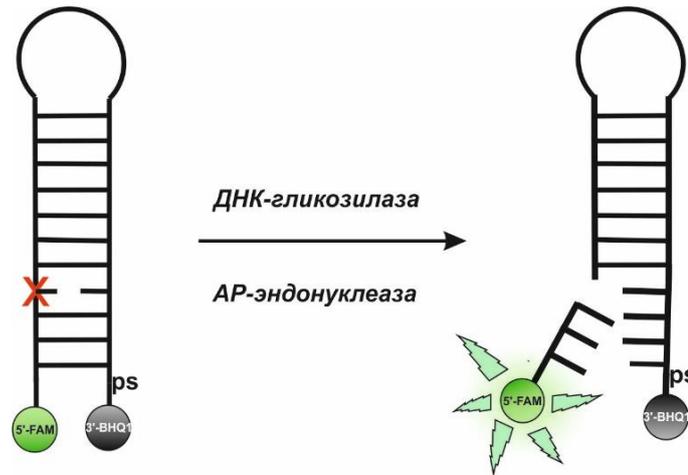


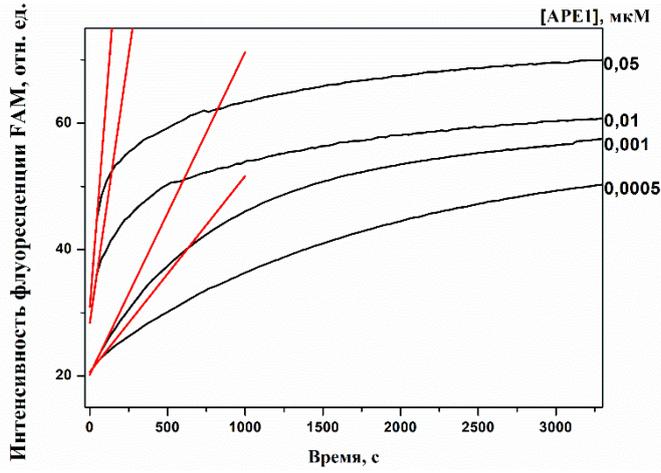
Рис. 39. Схематичное изображение подхода, используемого в тест-системе анализа активности ферментов ~~нуклеи~~ BER в клеточных экстрактах (* - повреждение, специфичное для анализируемого фермента).

Специфическое узнавание поврежденного нуклеотида и его удаление ДНК-гликозилазой с последующим расщеплением сахарофосфатного остова сопровождается значительным ростом сигнала флуоресценции FAM. Необходимо отметить, что для расщепления АП-сайтов, образующихся под действием монофункциональных ДНК-гликозилаз, в реакционной смеси должна присутствовать АП-эндонуклеаза. Кроме того, известно, что АП-эндонуклеаза APE1 оказывает стимулирующий эффект на активность ДНК-гликозилаз человека [272, 273], поэтому при анализе активности всех ДНК-гликозилаз в реакционную смесь добавляли APE1 в одинаковой концентрации 1,0 мкМ.

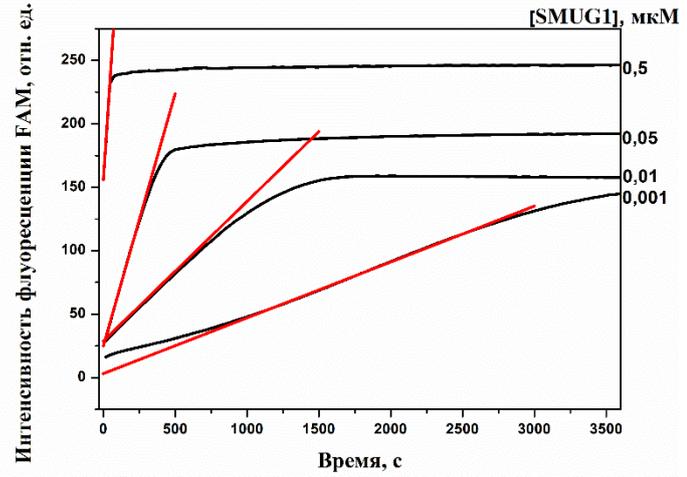
На рис. 40 представлены кинетические кривые, характеризующие расщепление ДНК-зондов АП-эндонуклеазой APE1 и ДНК-гликозилазами SMUG1, AAG, NEIL1 и OGG1.

Концентрация ДНК-зонда во всех экспериментах составляла 1,0 мкМ. Для получения кинетических кривых, характеризующих активность АП-эндонуклеазы человека APE1, использовали очищенный препарат фермента с концентрацией 5×10^{-10} - 1×10^{-6} М. В случае получения кривых для ДНК-гликозилаз использовали также очищенные препараты фермента с концентрацией 1×10^{-9} - 1×10^{-6} М, но в реакционную смесь добавляли АП-эндонуклеазу человека APE1 в концентрации 1,0 мкМ.

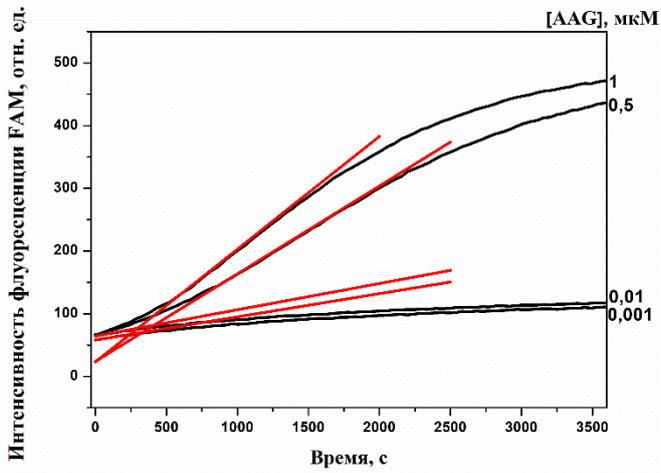
а)



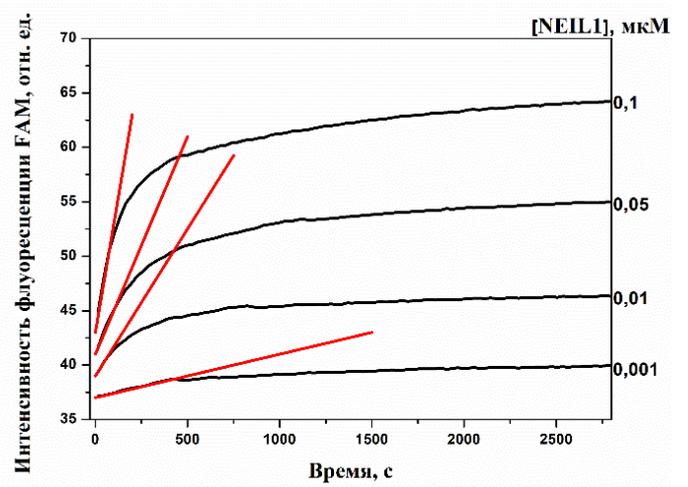
б)



в)



г)



д)

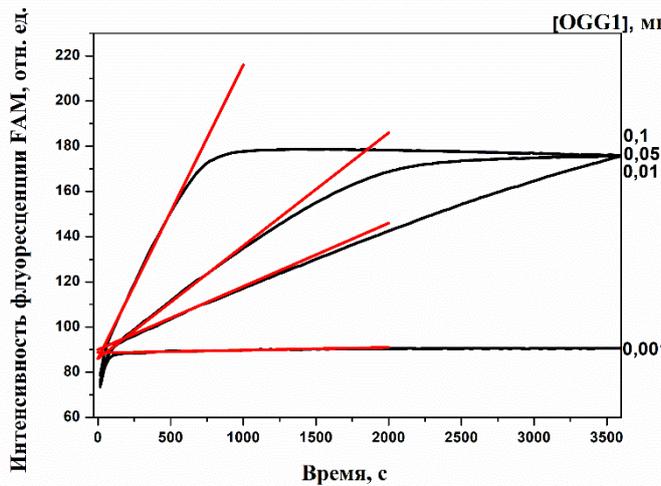
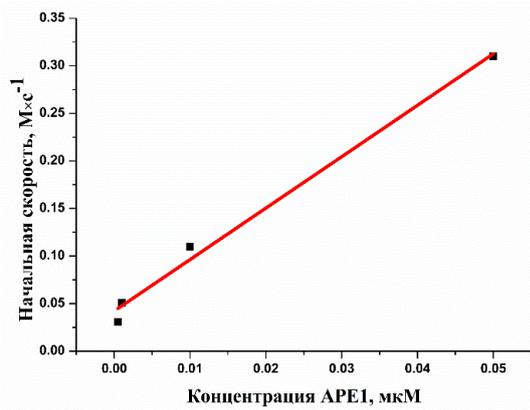
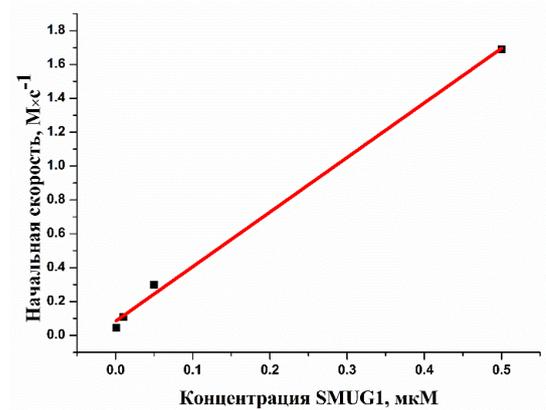


Рис. 40. Кинетические кривые, характеризующие расщепление ДНК-зондов, содержащих F (а), U (б), εA (в), Tg (z) и охоG (д), при взаимодействии с очищенными препаратами ферментов APE1, SMUG1, AAG, NEIL1 и OGG1, соответственно.

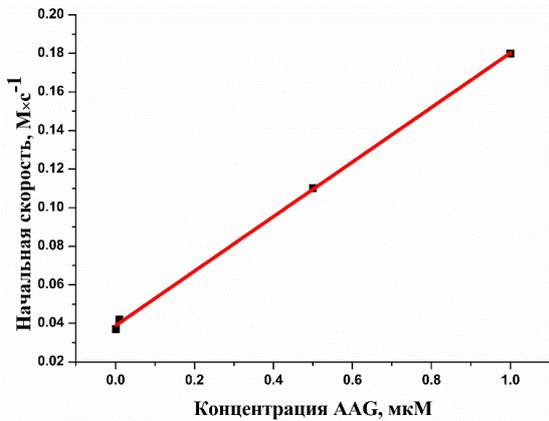
а)



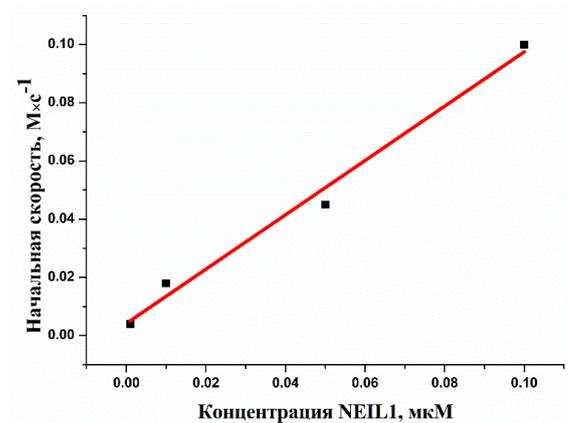
б)



в)



г)



д)

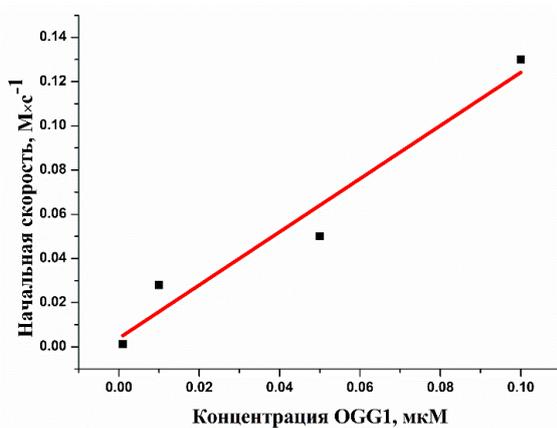


Рис. 41. Зависимость начальной скорости накопления продукта от концентрации APE1 (а), SMUG1 (б), AAG (в), NEIL1 (г) и OGG1 (д).

Начальную скорость расщепления ДНК-зондов оценивали, как наклон начального участка кинетических кривых (рис. 41). Зависимость начальной скорости от концентрации исследуемого фермента имела линейный вид и позволила оценить концентрацию целевого фермента в клеточном экстракте.

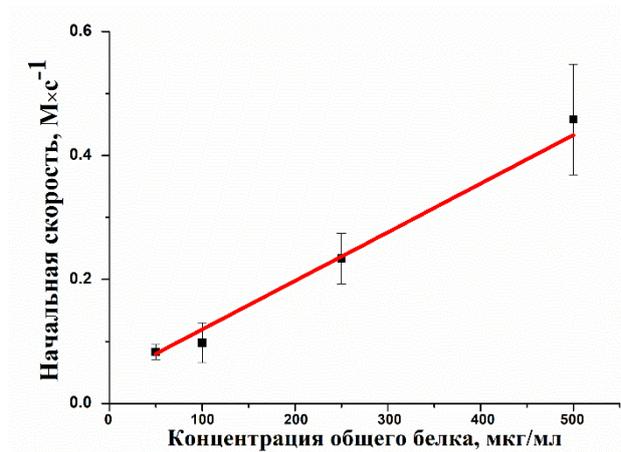
Для определения оптимального для анализа общего количества белка на примере экстракта клеток линии TOV112 провели сравнение относительной активности ферментов в клеточных

экстрактах, содержащих 50, 100, 250 и 500 мкг/мл общего белка. Для всех типов ДНК-зондов получены кинетические кривые, свидетельствующие об увеличении FRET-сигнала после добавления клеточного экстракта. Начальные участки кинетических кривых были аппроксимированы линейным уравнением, что позволило получить начальную скорость расщепления ДНК-зонда. Зависимость начальной скорости расщепления ДНК-зондов от общей концентрации белка в экстракте имела линейный вид в случае ДНК-зондов, содержащих F, U, Tg и ohoG (рис. 42). Однако в случае εA-зонда начальная скорость роста FRET-сигнала не коррелировала с концентрацией белков в клеточном экстракте. Следует отметить, что среди всех тестируемых модифицированных нуклеотидов удаление εA из ДНК может проходить по двум независимым механизмам: эксцизионной репарации оснований с помощью фермента AAG [274–276], приводящего к удалению поврежденного основания и генерации AP-сайта, и прямой репарации алкилированных нуклеотидов с помощью ДНК-диоксигеназы ABH2 [277,278], за счет окисления алкильного заместителя и его последующей деградации, приводящей к восстановлению структуры неповрежденного аденозина в составе ДНК. Можно предположить, что совместное узнавание εA-зонда ферментами, входящими в независимые пути удаления данного повреждения из ДНК, приводит к усложнению интерпретации полученных данных.

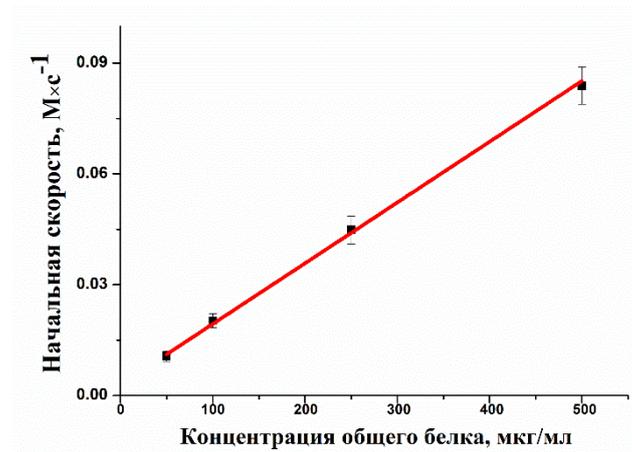
На основании полученных данных во всех дальнейших экспериментах по определению активности целевых ферментов использовали концентрацию общего белка 250 мкг/мл для каждого типа ДНК-зонда. Таким образом, для анализа активности с использованием 5 ДНК-зондов суммарно требуется не менее 125 мкг общего белка (100 мкл с концентрацией 250 мкг/мл на один зонд). Однако необходимо отметить, что в зависимости от линии клеток, 125 мкг белка может быть получено при лизисе ~100 тыс. клеток, что свидетельствует о перспективности данного метода для определения активности ферментов репарации в относительно небольшом числе клеток, например, полученных из крови человека с целью определения репарационного статуса организма.

Затем на примере нескольких линий клеток опухоли яичника человека TOV112, 79, OVCA3, MESOV, SCOV3 и TOV21 проведен сравнительный анализ активности тестируемых ферментов репарации в общих клеточных экстрактах. Для каждой клеточной линии были получены кинетические кривые, характеризующие расщепление ДНК-зондов (рис. 43), и определена начальная скорость.

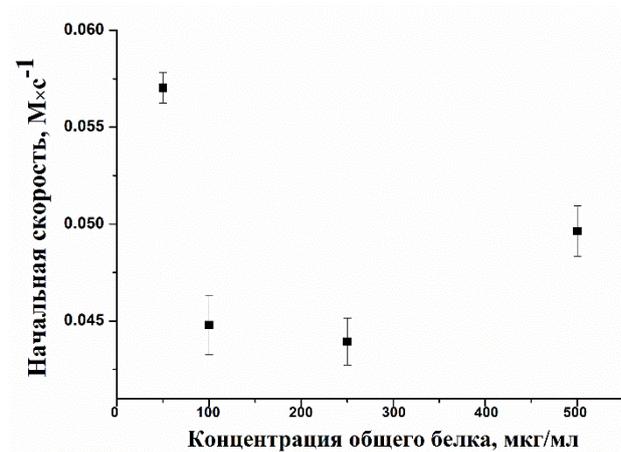
а)



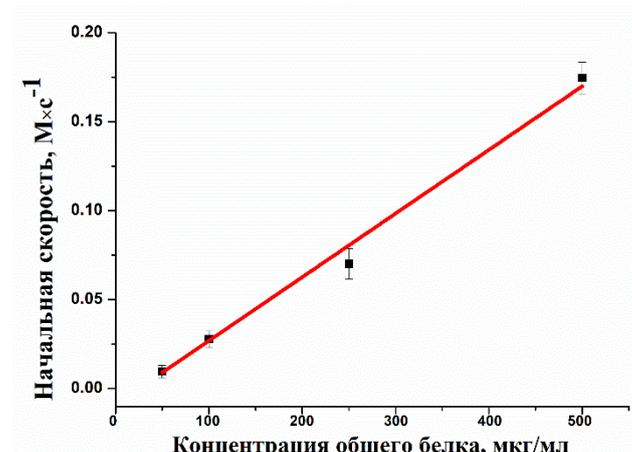
б)



в)



г)



д)

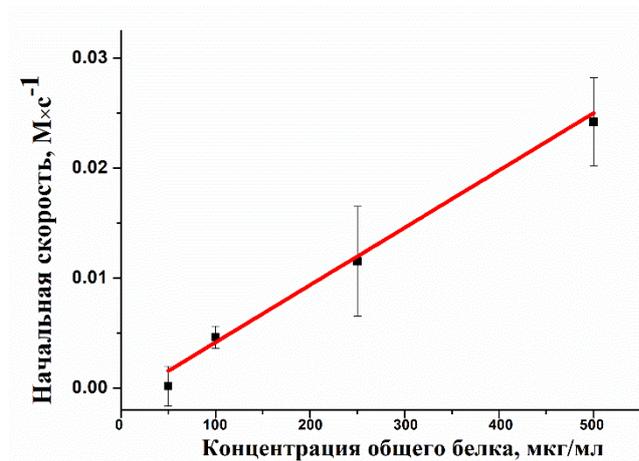


Рис. 42. Зависимость начальной скорости расщепления ДНК-зондов, содержащих F (а), U (б), εA (в), Tg (z) и ohoG (д) при инкубации с клеточным экстрактом линии клеток TOV112 для различных концентраций общего белка (50, 100, 250 и 500 мкг/мл).

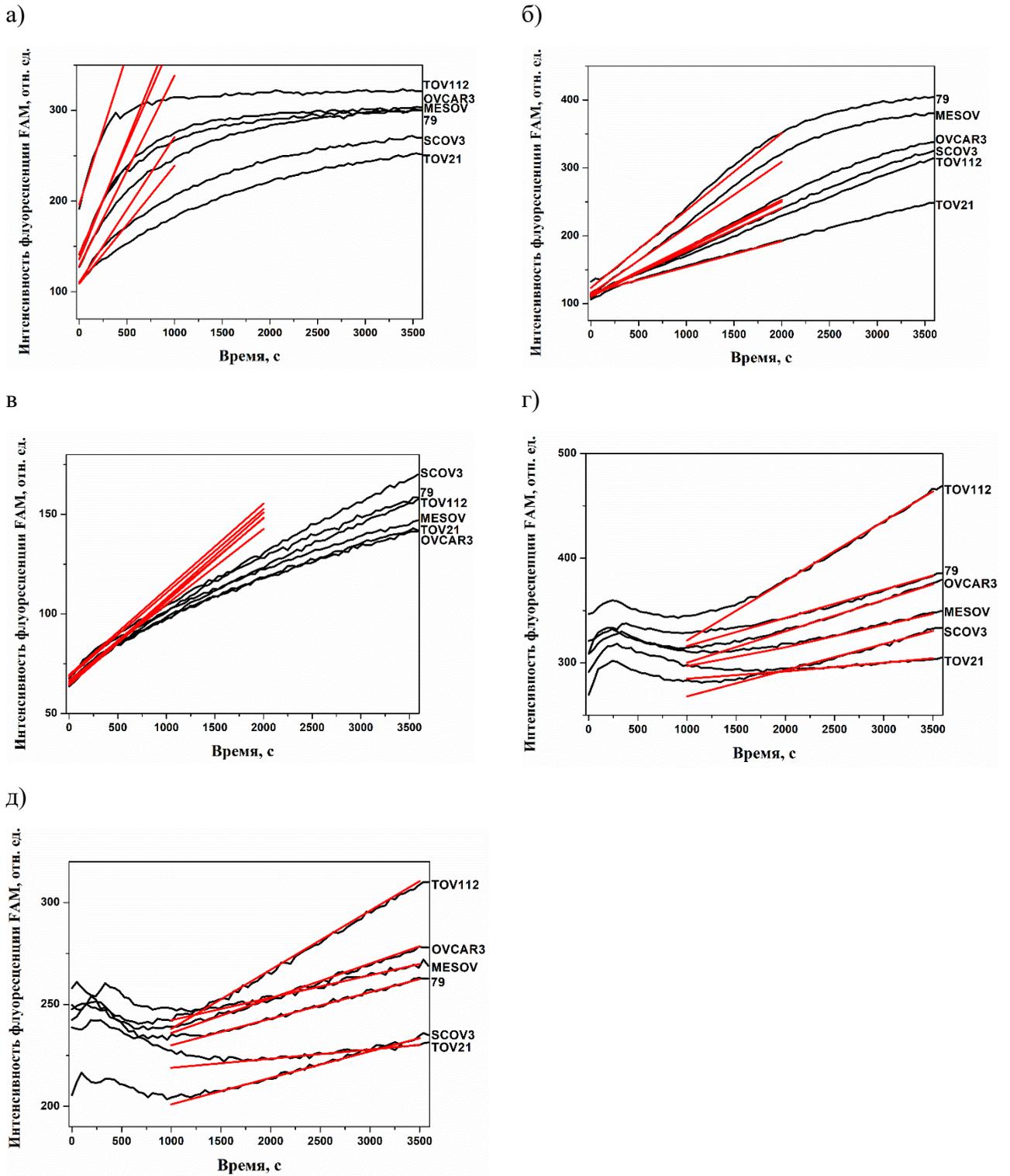


Рис. 43. Кинетические кривые, характеризующие расщепление ДНК-зондов, содержащих F (а), U (б), ϵ A (в), Tg (г) и ohoG (д), при инкубации с экстрактами клеточных линий TOV112, 79, OVCAR3, MESOV, SCOV3 и TOV21.

На основании полученных начальных скоростей расщепления ДНК-зондов можно проводить сравнительный анализ активности тестируемых ферментов в различных клеточных экстрактах. Кроме того, используя калибровочные кривые, полученных на очищенных рекомбинантных препаратах ферментов, была проведена оценка концентраций целевых ферментов в исследуемых экстрактах (Таблица 23, рис. 44). Следует отметить, что активность

тестируемого фермента в клеточном экстракте зависит не только от концентрации этого фермента, но и от других факторов, таких как присутствие в экстракте других участников BER и регуляторных белков, наличие совокупности полиморфных вариантов в данном конкретном ферменте и его эффекторах в конкретной клеточной линии, наличие посттрансляционных модификаций и др. В связи с этим, оценка концентрации ферментов в клеточном экстракте на основании сравнения с активностью рекомбинантного препарата этого фермента позволяет выполнить нормировку данных, полученных на разных экстрактах, и не является абсолютным значением концентрации фермента в экстракте.

Таблица 23. Оценка концентраций целевых ферментов в клеточных экстрактах линий рака яичников человека TOV112, 79, OVCAR3, MESOV, SCOV3 и TOV21

Линия клеток	Концентрация ферментов BER, нМ				
	APE1	UDG	AAG	NEIL1/NTH1	OGG1
TOV112	47 ± 5	5,1 ± 0,9	10,3 ± 0,7	42 ± 3	12,6 ± 1,5
TOV21	16 ± 3	2,2 ± 0,5	7,1 ± 0,9	3,3 ± 0,2	2,2 ± 0,5
79	26 ± 4	14,5 ± 4,3	7,7 ± 1,2	19 ± 5	5,8 ± 1,2
SCOV3	20 ± 4	3,7 ± 0,9	8,0 ± 0,5	15 ± 3	6,0 ± 0,8
MESOV	33 ± 7	5,5 ± 1,4	7,3 ± 0,8	12 ± 5	4,8 ± 0,9
OVCAR3	31 ± 8	4,1 ± 0,8	6,8 ± 0,6	21 ± 5	7,4 ± 1,7

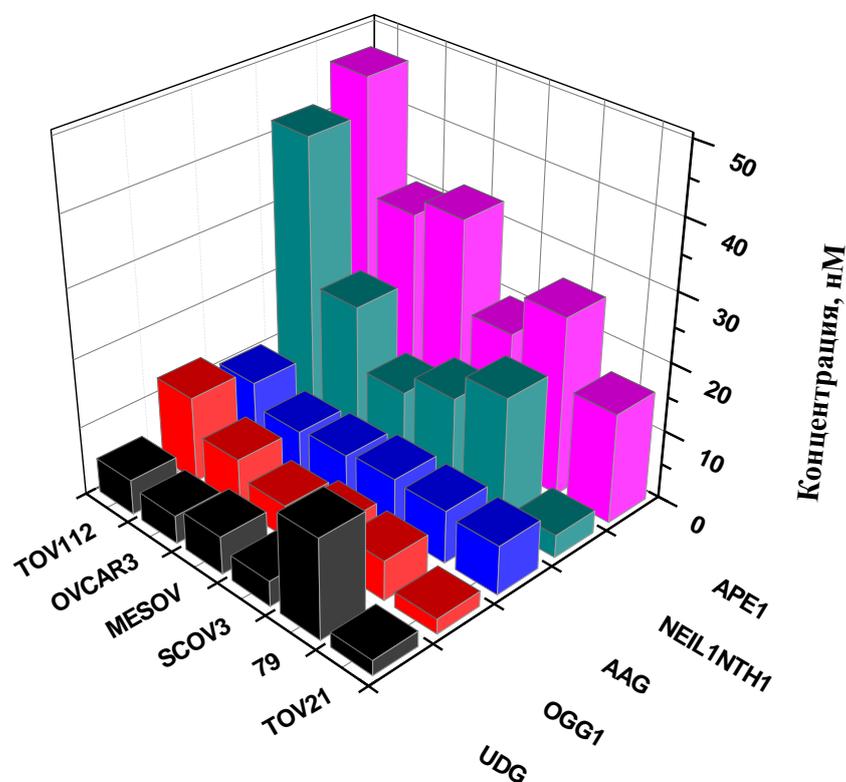


Рис. 44. Оценка концентрации целевых ферментов репарации в экстракте клеточных линий рака яичника человека TOV112, 79, OVCAR3, MESOV, SCOV3 и TOV21.

Сравнение полученных данных выявило значительную вариабельность концентрации ферментов репарации в различных клеточных линиях. Так, например, концентрация APE1 более чем в два раза выше в линии TOV112 по сравнению с линиями TOV21 и SCOV3. Необходимо также отметить, что клетки линии TOV112 содержали существенно более высокую концентрацию ферментов, отвечающих за удаление окисленных пиримидинов (Tg-зонд). При этом эффективность удаления алкилированных нуклеотидов на примере εА-зонда была примерно одинакова среди всех использованных клеточных линий. Однако, как было отмечено ранее, эффективность репарации алкилированных азотистых оснований, включая εА, может проходить по двум независимым путям, что осложняет интерпретацию полученных данных. Было обнаружено, что клетки линии TOV21 обладают пониженной репарационной активностью.

Для подтверждения достоверности различий уровня концентраций ферментов репарации в экстрактах клеточных линий нами, совместно с Ивановой О.В. (ФНКЦ ФХМ, Москва) был проведен анализ методом Вестерн-блот. Для анализа брали аликвоту того же клеточного экстракта, который использовался и для анализа нашей тест-системой. На рисунке 45 показаны различия количества APE1 в экстрактах клеточных линий SCOV3, 79, OVCAR3, TOV21, TOV112 и MESOV. В качестве контроля нанесения образцов использовали антитела к белку домашнего хозяйства – GAPDH. При сопоставлении результатов на рис. 44 и рис. 45 видно отсутствие строгой корреляции между концентрациями, оцененными по активности фермента и с помощью Вестерн-блоттинга. Таким образом, полученные данные подтверждают, что уровень продукции APE1 в клетке может не соответствовать активности этого фермента за счет влияния на активность таких факторов, как присутствие в экстракте других участников BER, а также наличие полиморфизмов и посттрансляционных модификаций.

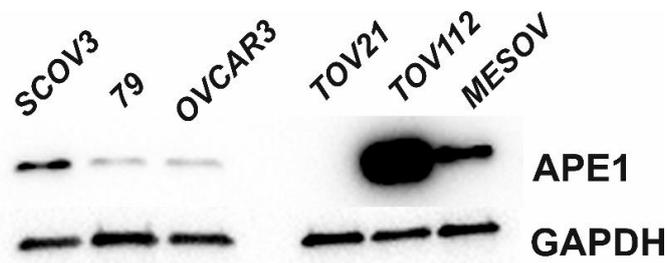


Рис. 45. Оценка количества белка APE1 в экстракте клеточных линий рака яичника человека SCOV3, 79, OVCAR3, TOV21, TOV112 и MESOV Вестерн-блот методом с использованием антител anti-APE1 (Abcam (ab137708) США) (1:5000) и anti-GAPDH (Abcam(ab8245) США) (1:2000) в качестве контроля нанесения, по протоколу производителя.

Полученные данные продемонстрировали перспективность предложенного метода, ввиду простоты его применения и анализа выходных результатов. Итоги данной работы могут стать основой для создания тест-системы анализа эффективности функционирования системы

эксцизионной репарации оснований ДНК в живых организмах. Учитывая множество преимуществ флуоресцентных методов, существует большой потенциал для расширения данной области, предоставляющей столь необходимые инструменты для определения индивидуального репарационного статуса организма пациента. Будущие персонализированные методы лечения, связанные с применением ДНК-модифицирующих химических препаратов, несомненно, должны быть взаимосвязаны с эффективностью работы ферментов, отвечающих за удаление ДНК-повреждений, вызываемых конкретными препаратами у каждого конкретного пациента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на многочисленные исследования, использующие самые разнообразные подходы, направленные на детальное понимание процессов функционирования ферментов репарации, до сих пор оставалась неопределенность функций тех или иных аминокислотных остатков в процессах формирования фермент-субстратных комплексов и каталитической реакции. Кроме того, активно развивающейся остается область белок-белковой координации и регуляции процесса репарации, в котором ферменты принимают последовательное участие, а также связь между общим уровнем репарационной активности и природными однонуклеотидными полиморфизмами в генах ферментов репарации ДНК.

В представленной работе проведено исследование взаимодействий мутантных форм ДНК-гликозилаз SMUG1, каталитического домена MBD4 и АП-эндонуклеазы человека APE1 с ДНК-субстратами, содержащими повреждение с использованием метода «остановленного потока». Данный метод позволяет регистрировать процессы взаимной подстройки фермента и субстрата в режиме реального времени, начиная с первых миллисекунд взаимодействия. В качестве повреждения, специфически расщепляемого APE1, был использован синтетический аналог АП-сайта – F-сайт. Для регистрации локальных конформационных изменений ДНК в субстраты, содержащие F-сайт, вводили флуоресцирующий аналог основания aPu, в комплементарную цепь напротив повреждения. Для регистрации глобальных конформационных перестроек, происходящих со структурой ДНК-субстратов в процессе взаимодействия с ферментами, использовали FRET-пару: остаток 6-карбоксивуоресцеина (FAM) в качестве флуорофора и остаток black hole quencher 1 (BHQ1) в качестве тушителя.

Суммируя полученные в результате исследований данные с информацией, представленной в литературе, можно сделать вывод о том, что аминокислотные остатки АП-эндонуклеазы 1 имеют определенные функции на каждом этапе взаимодействия с поврежденным ДНК-субстратом. Так, замена T268D приводит к нарушению этапов связывания ДНК и формирования каталитически-компетентного комплекса. Установлено, что две каталитически неактивные формы APE1, содержащие замену D210N или N212A, по-разному влияют на этапы, предшествующие стадиям катализа. Остаток Asn212 имеет решающее значение для стадии изгибания ДНК и катализа, в то время, как замена Asn 210 увеличивает эффективность связывания и полностью блокирует каталитическую функцию фермента. Функция Asp308 заключается в координации Mg^{2+} , а его замена на Ala приводит к снижению эффективности связывания ДНК-субстрата. Замена Met270, участвующего в стабилизации вывернутого состояния поврежденного нуклеотида в активном центре фермента, дестабилизирует фермент-

субстратный комплекс, но это не приводит к значительному снижению эффективности каталитической стадии.

Для того, чтобы внести ясность в вопросе по какому из предложенных на сегодняшний день механизмов происходит процесс гидролиза АП-сайта АП-эндонуклеазой 1, мы, используя подход МД-моделирования в совокупности с методами КД-спектроскопии и «остановленного потока» изучили влияние рН на стадии узнавания, связывания и катализа для ДНК-субстрата, содержащего повреждение. Полученные данные демонстрируют явное влияние рН на все стадии процесса. Так, при увеличении рН происходит ускорение формирования каталитически-компетентного фермент-субстратного комплекса, что неизбежно ведет к ускорению каталитической стадии. Кроме того, наши данные позволяют предположить, что роль ключевого аминокислотного остатка АП-эндонуклеазы 1 человека, выполняющего каталитическую стадию гидролиза фосфодиэфирной связи в поврежденном ДНК-субстрате (Tyr171 или His309), определяется рН среды, в которой происходит реакция.

Анализ влияния природных полиморфизмов на ферментативную активность APE1 и ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4 показал, что, если для некоторых вариантов ДНК-гликозилаз допустима практически полная потеря ферментативной активности (SMUG1 G90C и P240H, MBD4^{cat} S470L, G507S и R512W), то для APE1 активность фермента не может быть ниже порогового значения, необходимого для поддержания минимального уровня репарационной активности, достаточного для выживания организма. Такое различие в результатах, по-видимому, связано с тем, что в случае ДНК-гликозилаз их субстратная специфичность может дублироваться другими ферментами этого класса, в то время как снижение активности APE1 приводит к крайне негативным для организма последствиям.

Эффективность координированных взаимодействий между APE1 и ферментами, выполняющими свои функции как до (ДНК-гликозилазы: OGG1, UNG2, AAG), так и после APE1 (POL β) в процессе BER, а также с белковыми факторами (XRCC1 и PCNA) была определена по способности белков-эффекторов оказывать влияние на активность APE1 дикого типа и ряд природных полиморфных вариантов этого фермента. Показано, что аминокислотные остатки Arg221 и Arg237, располагающиеся на поверхности белковой глобулы важны для регуляции активности APE1 другими белками репарационного комплекса, но при этом оказывают различное влияние на активность APE1. Тогда как Asn222, по-видимому, принимает активное участие в контактах не со всеми протестированными белками, так, например, белки-эффекторы OGG1, UNG2 и AAG, практически не ведут к изменению активности этого SNP-варианта. Внесение аминокислотных замен в ДНК-связывающий центр APE1 приводит к нарушению координированных взаимодействий с другими участниками BER. В пользу этого вывода

свидетельствует факт, что оба SNP варианта APE1 M270T и R274Q наименее чувствительны к стимуляции протестированными белками-эффекторами по сравнению с другими полиморфными вариантами APE1. Появление дополнительного положительного заряда в белковой глобуле в случае замены G241R приводит к снижению эффекта стимуляции. На вариант P311S наибольший стимулирующий эффект оказывают AAG и PCNA. Кроме того, для дикого типа урацил-ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4^{cat}, а также их полиморфных вариантов SMUG1 N248Y и MBD4^{cat} H557D показан стимулирующий эффект каталитически не активной формы АП-эндонуклеазы APE1 D210N.

Апробированная на клеточных экстрактах тест-система для определения уровня активности ключевых ферментов BER, основанная на использовании флуоресцентно-меченных ДНК-зондов, показала свою эффективность и перспективность. Полученные с помощью данной тест-системы результаты свидетельствуют о значительной вариабельности концентрации ферментов репарации в клетках протестированных линий рака яичника человека, а именно TOV112, 79, OVCAR3, MESOV, SCOV3 и TOV21.

Таким образом, в данной работе на примере АП-эндонуклеазы человека APE1 выполнен анализ ферментативных свойств ряда искусственных мутантных форм, содержащих замены потенциально важных аминокислотных остатков в активном центре, а также выяснена роль ионогенных аминокислотных остатков фермента. В результате работы уточнена роль отдельных аминокислотных остатков активного центра APE1 и установлено влияние pH среды на процессы узнавания повреждения, формирования фермент-субстратного комплекса и стадию катализа. Проанализированы данные об известных SNP-ассоциированных вариантах ферментов SMUG1, MBD4 и APE1. Получены рекомбинантные препараты 15 новых SNP-вариантов данных ферментов, определены параметры взаимодействия данных ферментов с поврежденными ДНК-субстратами в индивидуальном состоянии и проанализировано влияние других участников процесса BER на их активность, что позволило сделать предположение о роли SNP-ассоциированных замен во взаимной координации ферментов в процессе репарации ДНК. В качестве практического применения полученных результатов в работе разработан способ определения активности ключевых ферментов эксцизионной репарации оснований, апробированный с использованием нескольких клеточных линий человека.

ВЫВОДЫ

1. Аминокислотные остатки активного центра АП-эндонуклеазы АРЕ1 выполняют определенные функции в процессах формирования каталитически компетентного комплекса и гидролиза фосфодиэфирной связи в поврежденном ДНК-субстрате: Thr268 критически важен на этапе связывания ДНК и формирования каталитически компетентного комплекса; Asn212 имеет решающее значение для стадии изгибания ДНК и катализа; Asp210, помимо катализа, играет важную роль на этапе связывания ДНК-субстрата; Asp308, ответственный за координацию иона Mg^{2+} в активном центре, также принимает участие на этапе связывания ДНК-субстрата; Met270 стабилизирует вывернутое состояние поврежденного нуклеотида в активном центре и важен на этапе формирования каталитического фермент-субстратного комплекса.
2. Скорость протекания стадий узнавания повреждения, формирования фермент-субстратного комплекса и катализа зависит от рН среды и увеличивается с ростом значения рН. Ионизация остатков Tyr171 и His309, выполняющих каталитическую стадию гидролиза фосфодиэфирной связи, может играть роль молекулярного переключателя между альтернативными каталитическими механизмами, включающими эти остатки в протонированных или депротонированных формах.
3. Ферментативная активность протестированных природных полиморфных вариантов АРЕ1 может быть, как выше (G241R), так и значительно ниже активности фермента дикого типа (R237A), но не может быть ниже порогового значения, необходимого для поддержания уровня репарации, достаточного для выживания организма. В то же время, природные полиморфизмы ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4 могут приводить к значительному уменьшению ферментативной активности (SMUG1 G90C и P240H, MBD4cat S470L, G507S и R512W), что не приводит к негативным последствиям, вследствие того, что субстратная специфичность ДНК-гликозилаз может дублироваться другими ферментами этого класса.
4. Впервые выявлено влияние природных полиморфизмов АП-эндонуклеазы 1 на регуляцию её активности другими участниками BER: ДНК-гликозилазами OGG1, UNG2, AAG, ДНК-полимеразой POL β и белковыми факторами XRCC1 и PCNA. Показано, что аминокислотные остатки, располагающиеся как на поверхности (Arg221, Arg237 и Gly241), так в глубине белковой глобулы АРЕ1 (Pro311) оказывают влияние на эффективность стимулирования активности АРЕ1; тогда как аминокислотные остатки, располагающиеся в ДНК-связывающем центре (N222, M270 и R274), наименее вовлечены в функциональные взаимодействия с протестированными белками-эффекторами.

Влияние полиморфных замен R221C, R237A, G241R, N222H, M270T, R274Q и P311S на эффективность стимулирования APE1 может быть связано, как с изменением эффективности белок-белковых взаимодействий в случае поверхностных аминокислотных остатков, так и с изменением сродства APE1 к ДНК-субстрату и/или продукту.

5. Разработан и апробирован способ определения активности ДНК-гликозилаз и АП-эндонуклеазы 1 в клетках человека с использованием флуоресцентно-меченных ДНК-зондов. Показано, что активность ферментов репарации в клеточных линиях рака яичника человека TOV112, 79, OVCAR3, MESOV, SCOV3 и TOV21 значительно варьирует, что в перспективе может быть использовано в качестве прогностического маркера устойчивости отдельных типов опухолей к химиотерапевтическим препаратам.

Список используемых сокращений

В настоящей работе использованы символы и сокращения в соответствии с рекомендациями Комиссии по номенклатуре Международного Союза чистой и прикладной химии (IUPAC) и Международного Союза биохимиков (IUB), а также следующие обозначения:

2-aPu	- 2-аминопурин;
8-охоG	- 2'-дезоксигуанидин-8-оксо-7,8-дигидрогуанозин;
APe1	- апуриновая/апириmidiновая эндонуклеаза человека 1;
ATP	- аденозин-5'-трифосфат;
BER	- эксцизионная репарация оснований (base excision repair);
BSA	- бычий сывороточный альбумин;
BHQ1	- black hole quencher 1;
CD	- круговой дихроизм;
dCMP	- 2'-дезоксидефосфат-5'-монофосфат;
DTT	- дитиотреитол;
F	- (3-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)-метил фосфат, тетрагидрофуран;
FAM	- 6-карбоксихлоресцеин;
FapyG	- 2,6-диамино-4-окси-5-формамидопиримидин;
FEN1	- флэп-эндонуклеаза 1;
F-сайт	- F-содержащий нуклеотид;
FRET	- резонансный перенос энергии флуоресценции;
HEPES	- N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота;
IPTG	- изопропил-1-тио-β-D-галактопиранозид;
LB-среда	- среда Лурия-Бертани;
LIGIIIα	- ДНК-лигаза IIIα
MD	- молекулярная динамика;
MBD4	- метилцитозин связывающий домен 4 урацил-ДНК-гликозилазы;
NIR	- инцизионная репарация оснований (nucleotide excision repair);
Nth	- эндонуклеаза VI <i>E.coli</i> ;
OGG1	- 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза;
PCNA	- ядерный антиген пролиферирующих клеток;
PDB ID	- идентификационный номер в базе данных кристаллических структур;
Polβ	- ДНК-полимераза β;
Ref1	- окислительно-восстановительный фактор 1;
SSB	- одноцепочечный разрыв в ДНК;

SMUG1	- урацил-ДНК-гликозилаза, предпочитающая одноцепочечные участки ДНК;
TDG	- тимин-ДНК-гликозилаза;
Tg	- 2'-дезокси-тимингликоль;
Tris	- трис-(гидроксиметил)аминометан;
U	- 2'-дезокси-уридин;
UDG	- урацил-ДНК-гликозилаза;
WT	- дикий тип (фермента);
XRCC1	- фактор, участвующий в репарации повреждений ДНК, вызванных УФ-излучением или алкилирующими агентами;
АП-сайт	- апуриновый/апиримидиновый сайт;
АФК	- активные формы кислорода;
ВЭЖХ	- высокоэффективная жидкостная хроматография;
ПААГ	- электрофорез в полиакриламидном геле;
д.ц. ДНК	- двухцепочечная ДНК;
о.ц. ДНК	- одноцепочечная ДНК;
ПЦР	- полимеразная цепная реакция;
УФ-излучение	- ультрафиолетовое излучение;
ФЭУ	- фотоэлектронный умножитель;
ЭДТА	- этилендиаминтетрауксусная кислота;

Список литературы

1. Bjelland S., Seeberg E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation // *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2003. Vol. 531, № 1–2. P. 37–80.
2. Moor N.A., Lavrik O.I. Protein–Protein Interactions in DNA Base Excision Repair // *Biochem*. 2018. Vol. 83, № 4. P. 411–422.
3. Beard W.A., Horton J.K., Prasad R., Wilson S.H. Eukaryotic base excision repair: New approaches shine light on mechanism // *Annu. Rev. Biochem*. 2019. Vol. 88. P. 137–162.
4. Abbotts R., Wilson D.M. Coordination of DNA single strand break repair // *Free Radic. Biol. Med*. 2017. Vol. 107, № September 2016. P. 228–244.
5. Pascucci B., Maga G., Hübscher U., Bjoras M., Seeberg E., Hickson I.D., Villani G., Giordano C., Cellai L., Dogliotti E. Reconstitution of the base excision repair pathway for 7,8-dihydro-8-oxoguanine with purified human proteins // *Nucleic Acids Research*. 2002. Vol. 30, № 10.
6. Zhuo Z., Lin A., Zhang J., Chen H., Li Y., Yang Z., Li L., Li S., Cheng J., He J. Genetic variations in base excision repair pathway genes and risk of hepatoblastoma: a seven-center case-control study // *Am J Cancer Res*. 2021. Vol. 11, № 3. P. 849–857.
7. Marsden C.G., Dragon J.A., Wallace S.S., Sweasy J.B. Base Excision Repair Variants in Cancer // *Methods in Enzymology*. 1st ed. Elsevier Inc., 2017. Vol. 591. 119–157 p.
8. Лаврик О.И., Ходырева С.Н. Как клетка ремонтирует ДНК // *Наука из первых рук*. 2007. Vol. 3, № 15. С. 82-89.
9. Odell I.D., Wallace S.S., Pederson D.S. Author manuscript // *J Cell Physiol*. 2013. Vol. 228, № 2. P. 258–266.
10. Huffman J.L., Sundheim O., Tainer J.A. DNA base damage recognition and removal: New twists and grooves // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen*. 2005. Vol. 577, № 1-2 SPEC. ISS. P. 55–76.
11. Krokan H.E., Bjørå M. Base Excision Repair // *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5a012583. 2013. Vol. 5. P. 1–22.
12. Friedberg E.C., Meira L.B. Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage Version 7 // *DNA Repair (Amst)*. 2006. Vol. 5, № 2. P. 189–209.

13. Vartanian V., Lowell B., Minko I.G., Wood T.G., Ceci J.D., George S., Ballinger S.W., Corless C.L., McCullough A.K., Lloyd R.S. The metabolic syndrome resulting from a knockout of the NEIL1 DNA glycosylase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. Vol. 103, № 7. P. 1864–1869.
14. Cortázar D., Kunz C., Selfridge J., Lettieri T., Saito Y., MacDougall E., Wirz A., Schuermann D., Jacobs A.L., Siegrist F., Steinacher R., Jiricny J., Bird A., Schär P. Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability // *Nature*. 2011. Vol. 470. P. 419–425.
15. Cortellino S., Xu J., Sannai M., Moore R., Caretti E., Cigliano A., Le Coz M., Devarajan K., Wessels A., Soprano D., Abramowitz L.K., Bartolomei M.S., Rambow F., Bassi M.R., Bruno T., Fanciulli M., Renner C., Klein-Szanto A.J., Matsumoto Y., Kobi D., Davidson I., Alberti C., Larue L., Bellacosa A. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair // *Cell*. Elsevier Inc., 2011. Vol. 146, № 1. P. 67–79.
16. Xie Y., Yang H., Cunanan C., Okamoto K., Shibata D., Pan J., Barnes D.E., Lindahl T., McIlhatton M., Fishel R., Miller J.H. Deficiencies in Mouse Msh and Ogg1 Result in Tumor Predisposition and G to T Mutations in Codon 12 of the K-Ras Oncogene in Lung Tumors // *Cancer Research*. 2004. Vol. 64. P. 3096–3102.
17. Chan M.K., Ocampo-Hafalla M.T., Vartanian V., Jaruga P., Kirkali G., Koenig K.L., Brown S., Lloyd R.S., Dizdaroglu M., Teebor G.W. Targeted deletion of the genes encoding NTH1 and NEIL1 DNA N-glycosylases reveals the existence of novel carcinogenic oxidative damage to DNA // *DNA Repair (Amst)*. 2009. Vol. 8, № 7. P. 786–794.
18. Kemmerich K., Dingler F.A., Rada C., Neuberger M.S. Germline ablation of SMUG1 DNA glycosylase causes loss of 5-hydroxymethyluracil- and UNG-backup uracil-excision activities and increases cancer predisposition of *Ung^{-/-} Msh2^{-/-}* mice // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40, № 13. P. 6016–6025.
19. D'Errico M., Parlanti E., Pascucci B., Fortini P., Baccarini S., Simonelli V., Dogliotti E. Single nucleotide polymorphisms in DNA glycosylases: From function to disease // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. Vol. 107, № December 2016. P. 278–291.
20. Caldecott K.W. XRCC1 protein; Form and function // *DNA Repair (Amst)*. 2019. Vol. 81, № July. P. 102664.
21. Moriya M., Grollman A.P. Mutations in the mutY gene of *Escherichia coli* enhance the frequency of targeted G:C:T:A transversions induced by a single 8-oxoguanine residue in single-stranded DNA // *Mol Gen Gene*. Springer-Verlag, 1993. Vol. 239. P. 72–76.

22. Bjørås M., Luna L., Johnson B., Hoff E., Haug T., Rognes T., Seeberg E. Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites // *EMBO J.* 1997. Vol. 16, № 20. P. 6314–6322.
23. Girard P.M., Guibourt N., Boiteux S. The Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: A 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase/AP lyase whose lysine 241 is a critical residue for catalytic activity // *Nucleic Acids Res.* 1997. Vol. 25, № 16. P. 3204–3211.
24. Weiss J.M., Goode E.L., Ladiges W.C., Ulrich C.M. Polymorphic Variation in hOGG1 and Risk of Cancer: A Review of the Functional and Epidemiologic Literature // *Mol. Carcinog.* 2005. Vol. 42. P. 127–141.
25. Chang C.-H., Hsiao C.-F., Chang G.-C., Tsai Y.-H., Chen Y.-M., Huang M.-S., Su W.-C., Hsieh W.-S., Yang P.-C., Chen C.-J., Hsiung C.A. Original Contribution Interactive Effect of Cigarette Smoking With Human 8-Oxoguanine DNA N-Glycosylase 1 (hOGG1) Polymorphisms on the Risk of Lung Cancer: A Case-Control Study in Taiwan // *Am. J. Epidemiol.* 2009. Vol. 170, № 6. P. 695–701.
26. Curtin K., Samowitz W.S., Wolff R.K., Ulrich C.M., Caan B.J., Potter J.D., Slattery M.L. Assessing Tumor Mutations to Gain Insight into Base Excision Repair Sequence Polymorphisms and Smoking in Colon Cancer // *Cancer Epi-demiol Biomarkers Prev.* 2009. Vol. 18, № 12. P. 3384–3392.
27. Claudine Dherin, J. Pablo Radicella M.D. and S.B. Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human α -hOgg1 protein and the polymorphic α -hOgg1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations // *Nucleic Acids Res.* 1999. Vol. 27, № 20. P. 4001–4007.
28. Janssen K., Schlink K., Götte W., Hippler B., Kaina B., Oesch F. DNA repair activity of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) in human lymphocytes is not dependent on genetic polymorphism Ser326/Cys326 // *Mutat. Res. - DNA Repair.* 2001. Vol. 486, № 3. P. 207–216.
29. Hill J.W., Evans M.K. Dimerization and opposite base-dependent catalytic impairment of polymorphic S326C OGG1 glycosylase // *Nucleic Acids Res.* 2006. Vol. 34, № 5. P. 1620–1632.
30. Audebert M., Radicella J.P., Dizdaroglu M. Effect of single mutations in the OGG1 gene found in human tumors on the substrate specificity of the Ogg1 protein // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28, № 14. P. 2672–2678.
31. Sidorenko V.S., Grollman A.P., Jaruga P., Dizdaroglu M., Zharkov D.O. Substrate specificity and excision kinetics of natural polymorphic variants and phosphomimetic mutants of human 8-

- oxoguanine-DNA glycosylase // FEBS J. 2009. Vol. 276, № 18. P. 5149–5162.
32. Mao G., Pan X., Zhu B.B., Zhang Y., Yuan F., Huang J., Lovell M.A., Lee M.P., Markesbery W.R., Li G.M., Gu L. Identification and characterization of OGG1 mutations in patients with Alzheimer's disease // Nucleic Acids Res. 2007. Vol. 35, № 8. P. 2759–2766.
 33. Jacob K.D., Hooten N.N., Tadokoro T., Lohani A., Barnes J., Evans M.K. Alzheimer's disease-associated polymorphisms in human OGG1 alter catalytic activity and sensitize cells to DNA damage // Free Radic. Biol. Med. Elsevier, 2013. Vol. 63. P. 115–125.
 34. Paz-Elizur T., Krupsky M., Blumenstein S., Elinger D., Schechtman E., Livneh Z. DNA repair activity for oxidative damage and risk of lung cancer // J. Natl. Cancer Inst. 2003. Vol. 95, № 17. P. 1312–1319.
 35. Paz-Elizur T., Ben-Yosef R., Elinger D., Vexler A., Krupsky M., Berrebi A., Shani A., Schechtman E., Freedman L., Livneh Z. Reduced repair of the oxidative 8-oxoguanine DNA damage and risk of head and neck cancer // Cancer Res. 2006. Vol. 66, № 24. P. 11683–11689.
 36. Fearon E.R. Human Cancer Syndromes: Clues to the Origin and Nature of Cancer // Science. 1997. Vol. 278, № 7. P. 1043–1050.
 37. Forsbring M., Vik E.S., Dalhus B., Karlsen T.H., Bergquist A., Schrumpf E., Bjørås M., Boberg K.M., Alseth I. Catalytically impaired hMYH and NEIL1 mutant proteins identified in patients with primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma // Carcinogenesis. 2009. Vol. 30, № 7. P. 1147–1154.
 38. Chevillard S., Radicella J.P., Levalois C., Lebeau J., Poupon M.-F., Oudard S., Dutrillaux B., Boiteux S. Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours // Oncogene. 1998. Vol. 16. P. 3083–3086.
 39. Kim K.Y., Han W., Noh D.Y., Kang D., Kwack K.B. Impact of genetic polymorphisms in base excision repair genes on the risk of breast cancer in a Korean population // Gene. 2013. Vol. 532, № 2. P. 192–196.
 40. Przybyłowska K., Kabzinski J., Sygut A., Dziki L., Dziki A., Majsterek I. An association selected polymorphisms of XRCC1, OGG1 and MUTYH gene and the level of efficiency oxidative DNA damage repair with a risk of colorectal cancer // Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen. Elsevier B.V., 2013. Vol. 745–746. P. 6–15.
 41. Lu M., Sun L., Zhou J., Zhang J. Assessment of the association between hOGG1 C8069G polymorphism and colorectal cancer // Tumor Biol. 2014. Vol. 35, № 3. P. 2373–2377.

42. Ramaniuk V.P., Nikitchenko N.V., Savina N.V., Kuzhir T.D., Rolevich A.I., Krasny S.A., Sushinsky V.E., Goncharova R.I. Polymorphism of DNA repair genes OGG1, XRCC1, XPD and ERCC6 in bladder cancer in Belarus // *Biomarkers*. 2014. Vol. 19, № 6. P. 509–516.
43. Ma L., Chu H., Wang M., Shi D., Zhong D., Li P., Tong N., Yin C., Zhang Z. hOGG1 Ser326Cys polymorphism is associated with risk of bladder cancer in a Chinese population: A case-control study // *Cancer Sci*. 2012. Vol. 103, № 7. P. 1215–1220.
44. Sacca S.C., Bolognesi C., Battistella A., Bagnis A., Izzotti A. Gene-environment interactions in ocular diseases // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen*. 2009. Vol. 667, № 1–2. P. 98–117.
45. Szaflik J.P., Cuchra M., Przybylowska-Sygut K., Dziki L., Kurowska A.K., Gacek M., Drzewoski J., Szaflik J., Majsterek I. Association of the 399Arg/Gln XRCC1, the 194 Arg/Trp XRCC1, the 326Ser/Cys OGG1, and the 324Gln/His MUTYH gene polymorphisms with clinical parameters and the risk for development of primary open-angle glaucoma // *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. Elsevier B.V.*, 2013. Vol. 753, № 1. P. 12–22.
46. Vinson J.A. Oxidative stress in cataracts // *Pathophysiology*. 2006. Vol. 13, № 3. P. 151–162.
47. Zhang Y., Zhang L., Song Z., Sun D.L., Liu H.R., Fu S.B., Liu D.R., Liu P. Genetic polymorphisms in DNA repair genes OGG1, APE1, XRCC1, and XPD and the risk of age-related cataract // *Ophthalmology*. 2012. Vol. 119, № 5. P. 900–906.
48. Coppedè F., Migheli F., Ceravolo R., Bregant E., Rocchi A., Petrozzi L., Unti E., Lonigro R., Siciliano G., Migliore L. The hOGG1 Ser326Cys polymorphism and Huntington's disease // *Toxicology*. 2010. Vol. 278, № 2. P. 199–203.
49. Berger F., Vaslin L., Belin L., Asselain B., Forlani S., Humbert S., Durr A., Hall J. The impact of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in OGG1 and XPC on the age at onset of Huntington disease // *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. Elsevier B.V.*, 2013. Vol. 755, № 2. P. 115–119.
50. Taherzadeh-Fard E., Saft C., Wiczorek S., Epplen J.T., Arning L. Age at onset in Huntington's disease: Replication study on the associations of ADORA2A, HAP1 and OGG1 // *Neurogenetics*. 2010. Vol. 11, № 4. P. 435–439.
51. Coppedè F., Mancuso M., Gerfo A.L., Manca M.L., Petrozzi L., Migliore L., Siciliano G., Murri L. A Ser326Cys polymorphism in the DNA repair gene hOGG1 is not associated with sporadic Alzheimer's disease // *Neurosci. Lett*. 2007. Vol. 414, № 3. P. 282–285.

52. Parildar-Karpuzoğlu H., Dođru-Abbasođlu S., Hanagasi H.A., Karadađ B., Grvit H., Emre M., Uysal M. Single nucleotide polymorphisms in base-excision repair genes hOGG1, APE1 and XRCC1 do not alter risk of Alzheimer's disease // *Neurosci. Lett.* 2008. Vol. 442, № 3. P. 287–291.
53. Lillenes M.S., Espeseth T., Stoen M., Lundervold A.J., Frye S.A., Rootwelt H., Reinvang I., Tonjum T. DNA base excision repair gene polymorphisms modulate human cognitive performance and decline during normal life span // *Mech. Ageing Dev. Elsevier Ireland Ltd*, 2011. Vol. 132, № 8–9. P. 449–458.
54. Rosamond W., Flegal K., Friday G., Furie K., Go A., Greenlund K., Haase N., Ho M., Howard V., Kissela B., Kittner S., Lloyd-Jones D., McDermott M., Meigs J., Moy C., Nichol G., O'Donnell C.J., Roger V., Rumsfeld J., Sorlie P., Steinberger J., Thom T., Wasserthiel-Smoller S., Hong Y. Heart disease and stroke statistics - 2007 Update: A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee // *Circulation.* 2007. Vol. 115, № 5. P. 69-171.
55. Libby P., Ridker P.M., Hansson G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis // *Nature.* 2011. Vol. 473, № 7347. P. 317–325.
56. Andreassi M.G., Foffa I., Manfredi S., Botto N., Cioppa A., Picano E. Genetic polymorphisms in XRCC1, OGG1, APE1 and XRCC3 DNA repair genes, ionizing radiation exposure and chromosomal DNA damage in interventional cardiologists // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2009. Vol. 666, № 1–2. P. 57–63.
57. Gokkusu C., Cakmakoglu B., Dasdemiir S., Tulubas F., Elitok A., Tamer S., Seckin S., Umman B. Association between genetic variants of DNA repair genes and coronary artery disease // *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* 2013. Vol. 17, № 4. P. 307–313.
58. Hsu P.C., Wang C.L., Su H.M., Juo S.H., Lin T.H., Voon W.C., Shin S.J., Lai W.T., Sheu S.H. The hOGG1 Ser326Cys gene polymorphism and the risk of coronary ectasia in the Chinese population // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. Vol. 15, № 1. P. 1671–1682.
59. Ohtsubo T., Nishioka K., Yamaiso Y., Iwai S., Shimokawa H., Oda H., Fujiwara T., Nakabeppu Y. Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28, № 6. P. 1355–1364.
60. Fromme J.C., Banerjee A., Huang S.J., Verdine G.L. Structural basis for removal of adenine mispaired with 8-oxoguanine by MutY adenine DNA glycosylase // *Nat. Mater.* 2004. Vol. 427,

- № 6975. P. 652–656.
61. Yang H., Clendenin W.M., Wong D., Demple B., Slupska M.M., Chiang J.H., Miller J.H. Enhanced activity of adenine-DNA glycosylase (Myh) by apurinic/aprimidinic endonuclease (Ape1) in mammalian base excision repair of an A/GO mismatch // *Nucleic Acids Res.* 2001. Vol. 29, № 3. P. 743–752.
 62. Hayashi H., Tominaga Y., Hirano S., McKenna A.E., Nakabeppu Y., Matsumoto Y. Replication-associated repair of Adenine:8-oxoguanine mispairs by MYH // *Curr. Biol.* 2002. Vol. 12, № 4. P. 335–339.
 63. Xie Y., Yang H., Cunanan C., Okamoto K., Shibata D., Pan J., Barnes D.E., Lindahl T., McIlhatton M., Fishel R., Miller J.H. Deficiencies in Mouse Myh and Ogg1 Result in Tumor Predisposition and G to T Mutations in Codon 12 of the K-Ras Oncogene in Lung Tumors // *Cancer Res.* 2004. Vol. 64, № 9. P. 3096–3102.
 64. Sakamoto K., Tominaga Y., Yamauchi K., Nakatsu Y., Sakumi K., Yoshiyama K., Egashira A., Kura S., Yao T., Tsuneyoshi M., Maki H., Nakabeppu Y., Tsuzuki T. MUTYH-null mice are susceptible to spontaneous and oxidative stress-induced intestinal tumorigenesis // *Cancer Res.* 2007. Vol. 67, № 14. P. 6599–6604.
 65. Bjørge M.D., Hildrestrand G.A., Scheffler K., Suganthan R., Rolseth V., Kuśnierczyk A., Rowe A.D., Vågbø C.B., Vetlesen S., Eide L., Slupphaug G., Nakabeppu Y., Bredy T.W., Klungland A., Bjørås M. Synergistic Actions of Ogg1 and Mutyh DNA Glycosylases Modulate Anxiety-like Behavior in Mice // *Cell Rep.* 2015. Vol. 13, № 12. P. 2671–2678.
 66. Sieber O.M., Lipton L., Crabtree M., Heinimann K., Fidalgo P., Phillips R.K.S., Bisgaard M.-L., Orntoft T.F., Aaltonen L.A., Hodgson S.V., Thomas H.J.W., Tomlinson I.P.M. Multiple Colorectal Adenomas, Classic Adenomatous Polyposis, and Germ-Line Mutations in MYH // *N. Engl. J. Med.* 2003. Vol. 348, № 9. P. 791–799.
 67. Kline C.N., Joseph N.M., Grenert J.P., Van Ziffle J., Yeh I., Bastian B.C., Mueller S., Solomon D.A. Inactivating MUTYH germline mutations in pediatric patients with high-grade midline gliomas // *Neuro. Oncol.* 2016. Vol. 18, № 5. P. 752–753.
 68. A R Dallosso, S Dolwani, N Jones, S Jones, J Colley, J Maynard, S Idziaszczyk, V Humphreys, J Arnold, A Donaldson, D Eccles, A Ellis, D G Evans, I M Frayling, F J Hes, R S Houlston, E R Maher, M Nielsen, S Parry, E Tyler, V Moskvina, J P Cheadle J.R.S. Inherited predisposition to colorectal adenomas caused by multiple rare alleles of MUTYH but not OGG1, NUDT1, NTH1 or NEIL 1, 2 or 3 // *Gastroenterology.* 2008. Vol. 57, № 9.

69. Jasperson K.W., Tuohy T.M., Neklason D.W., Burt R.W. Hereditary and Familial Colon Cancer // *Gastroenterology*. W.B. Saunders, 2010. Vol. 138, № 6. P. 2044–2058.
70. Sheila S. David V.L.O. & S.K. Base-excision repair of oxidative DNA damage // *Nature*. 2007. Vol. 447. P. 941–950.
71. Banerjee A., Santos W.L., Verdine G.L. Structure of a DNA Glycosylase Searching for Lesions // *Science*. 2006. Vol. 311. P. 1153–1157.
72. Lee A.J., Wallace S.S. Hide and seek: How do DNA glycosylases locate oxidatively damaged DNA bases amidst a sea of undamaged bases? // *Free Radic. Biol. Med.* Elsevier B.V., 2017. Vol. 107, № November 2016. P. 170–178.
73. Kundu S., Brinkmeyer M.K., Livingston A.L., David S.S. Adenine removal activity and bacterial complementation with the human MutY homologue (MUTYH) and Y165C, G382D, P391L and Q324R variants associated with colorectal cancer // *DNA Repair (Amst)*. 2009. Vol. 8, № 12. P. 1400–1410.
74. D'Agostino V.G., Minoprio A., Torreri P., Marinoni I., Bossa C., Petrucci T.C., Albertini A.M., Ranzani G.N., Bignami M., Mazzei F. Functional analysis of MUTYH mutated proteins associated with familial adenomatous polyposis // *DNA Repair (Amst)*. 2010. Vol. 9, № 6. P. 700–707.
75. Goto M., Shinmura K., Nakabeppu Y., Tao H., Yamada H., Tsuneyoshi T., Sugimura H. Adenine DNA glycosylase activity of 14 Human MutY homolog (MUTYH) variant proteins found in patients with colorectal polyposis and cancer // *Hum. Mutat*. 2010. Vol. 31, № 11.
76. Miyaishi A., Osawa K., Osawa Y., Inoue N., Yoshida K., Kasahara M., Tsutou A., Tabuchi Y., Sakamoto K., Tsubota N., Takahashi J. MUTYH Gln324His gene polymorphism and genetic susceptibility for lung cancer in a Japanese population // *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2009. Vol. 28, № 1. P. 1–6.
77. Brinkmeyer M.K., David S.S. Distinct functional consequences of MUTYH variants associated with colorectal cancer: Damaged DNA affinity, glycosylase activity and interaction with PCNA and Hus1 // *DNA Repair (Amst)*. 2015. Vol. 34. P. 39–51.
78. Wallace S.S., Murphy D.L., Sweasy J.B. Base excision repair and cancer // *Cancer Lett.* Elsevier Ireland Ltd, 2012. Vol. 327, № 1–2. P. 73–89.
79. Lindahl T. An N-Glycosidase from *Escherichia coli* That Releases Free Uracil from DNA Containing Deaminated Cytosine Residues (deoxyuridine/DNA repair/heteroduplex DNA) //

- Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1974. Vol. 71, № 9. P. 3649–3653.
80. Nilsen H., Otterlei M., Haug T., Solum K., Nagelhus T.A., Skorpen F., Krokan H.E. Nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylases are generated by alternative splicing and transcription from different positions in the UNG gene // *Nucleic Acids Res.* 1997. Vol. 25, № 4. P. 750–755.
 81. Wollen Steen K., Doseth B.P., Westbye M., Akbari M., Kang D., Falkenberg M., Slupphaug G. MtSSB may sequester UNG1 at mitochondrial ssDNA and delay uracil processing until the dsDNA conformation is restored // *DNA Repair (Amst).* Elsevier B.V., 2012. Vol. 11, № 1. P. 82–91.
 82. Kozhukhar N. The efficiency of the translesion synthesis across abasic sites by mitochondrial DNA polymerase is low in mitochondria of 3T3 cells // *Mitochondrial DNA Part A DNA Mapping, Seq. Anal.* Taylor and Francis Ltd., 2016. Vol. 27, № 6. P. 4390–4396.
 83. Akbari M., Otterlei M., Diaz-Peña J., Aas Per A., Kavli B., Liabakk N.B., Hagen L., Imai K., Durandy A., Slupphaug G., Krokan H.E. 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.* 2004. Vol. 32, № 18. P. 5486–5498.
 84. Ko R., Bennett S.E. Physical and functional interaction of human nuclear uracil-DNA glycosylase with proliferating cell nuclear antigen // *DNA Repair (Amst).* 2005. Vol. 4, № 12. P. 1421–1431.
 85. Parlanti E. Human base excision repair complex is physically associated to DNA replication and cell cycle regulatory proteins // *Nucleic Acids Res.* 2007. Vol. 35, № 5. P. 1569–1577.
 86. Otterlei M., Warbrick E., Nagelhus T.A., Haug T., Slupphaug G., Akbari M., Aas Per A., Steinsbekk K., Bakke O., Krokan H.E. Post-replicative base excision repair in replication foci // *EMBO J.* 1999. Vol. 18, № 13. P. 3834–3844.
 87. Xue J.H. Uracil-DNA glycosylase UNG promotes tet-mediated DNA demethylation // *J. Biol. Chem.* 2016. Vol. 291, № 2. P. 731–738.
 88. Nilsen H., Rosewell I., Robins P., Skjelbred C.F., Andersen S., Slupphaug G., Daly G., Krokan H.E., Lindahl T., Barnes D.E. Uracil-DNA glycosylase (UNG)-deficient mice reveal a primary role of the enzyme during DNA replication // *Mol. Cell.* 2000. Vol. 5, № 6. P. 1059–1065.
 89. Nilsen H., Rosewell I., Robins P., Skjelbred C.F., Andersen S., Slupphaug G., Daly G., Krokan H.E., Lindahl T., Barnes D.E. Gene-targeted mice lacking the Ung uracil-DNA glycosylase develop B-cell lymphomas // *Oncogene.* 2003. Vol. 22, № 35. P. 5381–5386.
 90. Di Noia J.M., Neuberger M.S. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation //

- Annu. Rev. Biochem. 2007. Vol. 76. P. 1–22.
91. Imai K. Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination // *Nat. Immunol.* 2003. Vol. 4, № 10. P. 1023–1028.
 92. Broderick P., Bagratuni T., Vijayakrishnan J., Lubbe S., Chandler I., Houlston R.S. Evaluation of NTHL1, NEIL1, NEIL2, MPG, TDG, UNG and SMUG1 genes in familial colorectal cancer predisposition // *BMC Cancer.* 2006. Vol. 6, № 243. P. 1–7.
 93. Moon Y.W., Park W.S., Vortmeyer A.O., Weil R.J., Lee Y.S., Winters T.A., Zhuang Z., Fuller B.G. Mutation of the uracil DNA glycosylase gene detected in glioblastoma // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 1998. Vol. 421, № 2. P. 191–196.
 94. Kvaløy K., Nilsen H., Steinsbekk K.S., Nedal A., Monterotti B., Akbari M., Krokan H.E. Sequence variation in the human uracil-DNA glycosylase (UNG) gene // *Mutat. Res. - DNA Repair.* 2001. Vol. 461, № 4. P. 325–338.
 95. Haushalter K.A., Stukenberg P.T., Kirschner M.W., Verdine G.L. Identification of a new uracil-DNA glycosylase family by expression cloning using synthetic inhibitors // *Curr. Biol.* 1999. Vol. 9, № 4. P. 174–185.
 96. Nilsen H., Rosewell I., Robins P., Skjelbred C.F., Andersen S., Slupphaug G., Daly G., Krokan H.E., Lindahl T., Barnes D.E. Excision of deaminated cytosine from the vertebrate genome: Role of the SMUG1 uracil-DNA glycosylase // *EMBO J.* 2001. Vol. 20, № 15. P. 4278–4286.
 97. Pettersen H.S., Sundheim O., Gilljam K.M., Slupphaug G., Krokan H.E., Kavli B. Uracil-DNA glycosylases SMUG1 and UNG2 coordinate the initial steps of base excision repair by distinct mechanisms // *Nucleic Acids Res.* 2007. Vol. 35, № 12. P. 3879–3892.
 98. Jobert L., Skjeldam H.K., Dalhus B., Galashevskaya A., Vågbø C., Bjørås M., Nilsen H. The Human Base Excision Repair Enzyme SMUG1 Directly Interacts with DKC1 and Contributes to RNA Quality Control // *Mol. Cell.* 2013. Vol. 49, № 2. P. 339–345.
 99. Kemmerich K., Dingler F.A., Rada C., Neuberger M.S. Germline ablation of SMUG1 DNA glycosylase causes loss of 5-hydroxymethyluracil- and UNG-backup uracil-excision activities and increases cancer predisposition of *Ung*^{-/-}*Msh2*^{-/-} mice // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40, № 13. P. 6016–6025.
 100. Muller-Weeks S., Mastran B., Caradonna S. The nuclear isoform of the highly conserved human uracil-DNA glycosylase is an M(r) 36,000 phosphoprotein // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, № 34. P. 21909–21917.

101. Iakovlev D.A., Alekseeva I.V., Vorobjev Y.N., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. The role of active-site residues Phe98, His239, and Arg243 in DNA binding and in the catalysis of human uracil–DNA glycosylase SMUG1 // *Molecules*. 2019. Vol. 24, № 17.
102. Marian C., Tao M., Mason J.B., Goerlitz D.S., Nie J., Chanson A., Freudenheim J.L., Shields P.G. Single nucleotide polymorphisms in uracil-processing genes, intake of one-carbon nutrients and breast cancer risk // *Eur. J. Clin. Nutr.* 2011. Vol. 65. P. 683–689.
103. Abdel-Fatah T.M.A. Single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase (SMUG1) deficiency is linked to aggressive breast cancer and predicts response to adjuvant therapy // *Breast Cancer Res. Treat.* 2013. Vol. 142, № 3. P. 515–527.
104. Oliveira D.M. Identification of different mutational profiles in cancers arising in specific colon segments by next generation sequencing // *Oncotarget*. 2018. Vol. 9, № 35. P. 23960–23974.
105. Sjolund A.B., Senejani A.G., Sweasy J.B. MBD4 and TDG: Multifaceted DNA glycosylases with ever expanding biological roles // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* Elsevier B.V., 2013. Vol. 743–744. P. 12–25.
106. Yu-Fei He G.-L.X. Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA // *Science*. 2011. Vol. 333 2.
107. Deaton A.M., Bird A. CpG islands and the regulation of transcription // *Genes Dev.* 2011. Vol. 25. P. 1010–1022.
108. Weber A.R. Biochemical reconstitution of TET1–TDG–BER-dependent active DNA demethylation reveals a highly coordinated mechanism // *Nat. Commun.* 2016. Vol. 7. P. 1–13.
109. Vasovcak P., Krepelova A., Menigatti M., Puchmajerova A., Skapa P., Augustinakova A., Amann G., Wernstedt A., Jiricny J., Marra G., Wimmer K. Unique mutational profile associated with a loss of TDG expression in the rectal cancer of a patient with a constitutional PMS2 deficiency // *DNA Repair (Amst)*. 2012. Vol. 11, № 7. P. 616–623.
110. Ito S., Shen L., Dai Q., Wu S.C., Collins L.B., Swenberg J.A., He C., Zhang Yi Supporting Online Material Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine // *Science*. 2011. Vol. 333. P. 1300–1303.
111. Cortázar D., Kunz C., Selfridge J., Lettieri T., Saito Y., MacDougall E., Wirz A., Schuermann D., Jacobs A.L., Siegrist F., Steinacher R., Jiricny J., Bird A., Schär P. Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability // *Nature*. 2011. Vol. 470, № 7334.

- P. 419–423.
112. Maiti A. Crystal structure of human thymine DNA glycosylase bound to DNA elucidates sequence-specific mismatch recognition // *PNAS*. 2008. P. 8890–8895.
 113. Sjolund A. A Germline Polymorphism of Thymine DNA Glycosylase Induces Genomic Instability and Cellular Transformation // *PLoS Genet*. 2014. Vol. 10, № 11. P. 1–12.
 114. Yang X. Genetic variants and risk of esophageal squamous cell carcinoma: A GWAS-based pathway analysis // *Gene*. Elsevier B.V., 2015. Vol. 556, № 2. P. 149–152.
 115. Ruczinski I. A population-based study of dna repair gene variants in relation to non-melanoma skin cancer as a marker of a cancer-prone phenotype // *Carcinogenesis*. 2012. Vol. 33, № 9. P. 1692–1698.
 116. Broderick P. Evaluation of NTHL1, NEIL1, NEIL2, MPG, TDG, UNG, and SMUG1 genes in familial colorectal cancer predisposition // *BMC Cancer*. 2006. Vol. 6. P. 1–7.
 117. Ohki I., Shimotake N., Fujita N., Jee J.-G., Ikegami T., Nakao M., Shirakawa M. Solution Structure of the Methyl-CpG Binding Domain of Human MBD1 in Complex with Methylated DNA tumor suppressor genes become aberrantly hypermeth-ylated in cancer cells (Sutcliffe et al while DNA hypomethylation has been shown to lead to elevated mutati // *Cell*. 2001. Vol. 105. P. 487–497.
 118. Wakefield R.I.D. The solution structure of the domain from MeCP2 that binds to methylated DNA // *J. Mol. Biol*. 1999. Vol. 291, № 5. P. 1055–1065.
 119. Cortellino S., Turner D., Masciullo V., Schepis F., Albino D., Daniel R., Skalka A.M., Meropol N.J., Alberti C., Larue L., Bellacosa A. The base excision repair enzyme MED1 mediates DNA damage response to antitumor drugs and is associated with mismatch repair system integrity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2003. Vol. 100, № 25. P. 15071–15076.
 120. Millar C.B., Guy J., Sansom O.J., Selfridge J., MacDougall E., Hendrich B., Keightley P.D., Bishop S.M., Clarke A.R., Bird A. Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice // *Science*. 2002. Vol. 297, № 5580. P. 403–405.
 121. Wong E., Yang K., Kuraguchi M., Werling U., Avdievich E., Fan K., Fazzari M., Jin B., Brown A.M.C., Lipkin M., Edelman W. Mbd4 inactivation increases C→T transition mutations and promotes gastrointestinal tumor formation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2002. Vol. 99, № 23. P. 14937–14942.
 122. Pinto M. MBD4 mutations are rare in gastric carcinomas with microsatellite instability // *Cancer*

- Genet. Cytogenet. 2003. Vol. 145, № 2. P. 103–107.
123. Xiong X.D., Luo X.P., Liu X., Jing X., Zeng L.Q., Lei M., Hong X.S., Chen Y. The MBD4 Glu346Lys polymorphism is associated with the risk of cervical cancer in a Chinese population // *Int. J. Gynecol. Cancer*. 2012. Vol. 22, № 9. P. 1552–1556.
 124. Miao R. Tagging single nucleotide polymorphisms in MBD4 are associated with risk of lung cancer in a Chinese population // *Lung Cancer*. 2008. Vol. 62, № 3. P. 281–286.
 125. Shin M.C. Glu346Lys polymorphism in the methyl-CpG binding domain 4 gene and the risk of primary lung cancer // *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2006. Vol. 36, № 8. P. 483–488.
 126. Chow E., Lipton L., Lynch E., D'Souza R., Aragona C., Hodgkin L., Brown G., Winship I., Barker M., Buchanan D., Cowie S., Nasioulas S., du Sart D., Young J., Leggett B., Jass J., Macrae F. Hyperplastic Polyposis Syndrome: Phenotypic Presentations and the Role of MBD4 and MYH // *Gastroenterology*. W.B. Saunders, 2006. Vol. 131, № 1. P. 30–39.
 127. Dong J., Hu Z., Shu Y., Pan S., Chen W., Wang Y., Hu L., Jiang Y., Dai J., Ma H., Jin G., Shen H. Potentially Functional Polymorphisms in DNA Repair Genes and Non-Small-Cell Lung Cancer Survival: A Pathway-Based Analysis // *Mol. Carcinog.* 2012. Vol. 51. P. 546–552.
 128. Engelward B.P. Base excision repair deficient mice lacking the Aag alkyladenine DNA glycosylase // *Genetics*. 1997. Vol. 94. P. 13087–13092.
 129. Bouziane M. Promoter structure and cell cycle dependent expression of the human methylpurine-DNA glycosylase gene // *Mutat. Res. - DNA Repair*. 2000. Vol. 461, № 1. P. 15–29.
 130. van Loon B., Samson L.D. Alkyladenine DNA glycosylase (AAG) localizes to mitochondria and interacts with mitochondrial single-stranded binding protein (mtSSB) // *DNA Repair (Amst)*. 2013. Vol. 12, № 3. P. 177–187.
 131. Campalans A., Marsin S., Nakabeppu Y., O'Connor T.R., Boiteux S., Radicella J.P. XRCC1 interactions with multiple DNA glycosylases: A model for its recruitment to base excision repair // *DNA Repair (Amst)*. 2005. Vol. 4, № 7. P. 826–835.
 132. Miao F. 3-Methyladenine-DNA glycosylase (MPG protein) interacts with human RAD23 proteins // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 37. P. 28433–28438.
 133. Baldwin M.R., O'Brien P.J. Human AP endonuclease 1 stimulates multiple-turnover base excision by alkyladenine DNA glycosylase // *Biochemistry*. 2009. Vol. 48, № 25. P. 6022–6033.
 134. Lau A.Y., Schä O.D., Samson L., Verdine G.L., Ellenberger T. Crystal Structure of a Human

- Alkylbase-DNA Repair Enzyme Complexed to DNA: Mechanisms for Nucleotide Flipping and Base Excision // Krokan Harvard Medical School et al. David and Williams, 1998. Vol. 95. P. 249–258.
135. Wirtz S. Both base excision repair and O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase protect against methylation-induced colon carcinogenesis // *Carcinogenesis*. 2010. Vol. 31, № 12. P. 2111–2117.
136. Meira L.B., Bugni J.M., Green S.L., Lee C.W., Pang B., Borenshtein D., Rickman B.H., Rogers A.B., Moroski-Erkul C.A., McFaline J.L., Schauer D.B., Dedon P.C., Fox J.G., Samson L.D. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice // *J. Clin. Invest.* 2008. Vol. 118, № 17. P. 2516–2525.
137. Ikeda S. Purification and characterization of human NTH1, a homolog of *Escherichia coli* endonuclease III // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, № 34. P. 21585–21593.
138. Kuo C.F. Atomic structure of the DNA repair [4Fe-4S] enzyme endonuclease III // *Science* (80-). 1992. Vol. 258, № 5081. P. 434–440.
139. Dou H. Interaction of the human DNA glycosylase NEIL1 with proliferating cell nuclear antigen: The potential for replication-associated repair of oxidized bases in mammalian genomes // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283, № 6. P. 3130–3140.
140. Hegde M.L., Hazra T.K., Mitra S. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells // *Cell Res.* 2008. Vol. 18, № 1. P. 27–47.
141. Doublé S. The crystal structure of human endonuclease VIII-like 1 (NEIL1) reveals a zincless finger motif required for glycosylase activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004. Vol. 101, № 28. P. 10284–10289.
142. Prakash A., Carroll B.L., Sweasy J.B., Wallace S.S., Doublé S. Genome and cancer single nucleotide polymorphisms of the human NEIL1 DNA glycosylase: Activity, structure, and the effect of editing // *DNA Repair (Amst)*. 2014. Vol. 14, № 1. P. 17–26.
143. Wiederhold L., Leppard J.B., Kedar P., Karimi-Busheri F., Rasouli-Nia A., Weinfeld M., Tomkinson A.E., Izumi T., Prasad R., Wilson S.H., Mitra S., Hazra T.K. AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells // *Mol. Cell.* 2004. Vol. 15, № 2. P. 209–220.
144. Hegde M.L. Prereplicative repair of oxidized bases in the human genome is mediated by NEIL1 DNA glycosylase together with replication proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. Vol.

- 110, № 33. P. E3090–E3099.
145. Vartanian V., Lowell B., Minko I.G., Wood T.G., Ceci J.D., George S., Ballinger S.W., Corless C.L., McCullough A.K., Lloyd R.S. The metabolic syndrome resulting from a knockout of the NEIL1 DNA glycosylase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. Vol. 103, № 6. P. 1864–1869.
146. Shinmura K. Inactivating mutations of the human base excision repair gene NEIL1 in gastric cancer // *Carcinogenesis*. 2004. Vol. 25, № 12. P. 2311–2317.
147. Roy L.M. Human polymorphic variants of the NEIL1 DNA glycosylase // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282, № 21. P. 15790–15798.
148. Bandaru V., Sunkara S., Wallace S.S., Bond J.P. A novel human DNA glycosylase that removes oxidative DNA damage and is homologous to *Escherichia coli* endonuclease VIII // *DNA Repair (Amst)*. 2002. Vol. 1, № 7. P. 517–529.
149. Das A., Rajagopalan L., Mathura V.S., Rigby S.J., Mitra S., Hazra T.K. Identification of a zinc finger domain in the human NEIL2 (Nei-like-2) protein // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 45. P. 47132–47138.
150. Das A., Rajagopalan L., Mathura V.S., Rigby S.J., Mitra S., Hazra T.K. NEIL2-initiated, APE-independent repair of oxidized bases in DNA: Evidence for a repair complex in human cells // *DNA Repair (Amst)*. 2006. Vol. 5, № 12. P. 1439–1448.
151. Grin I.R., Khodyreva S.N., Nevinsky G.A., Zharkov D.O. Deoxyribose phosphate lyase activity of mammalian endonuclease VIII-like proteins // *FEBS Lett.* 2006. Vol. 580, № 20. P. 4916–4922.
152. Banerjee D., Mandal S.M., Das A., Hegde M.L., Das S., Bhakat K.K., Boldogh I., Sarkar P.S., Mitra S., Hazra T.K. Preferential repair of oxidized base damage in the transcribed genes of mammalian cells // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 8. P. 6006–6016.
153. Chakraborty A. Neil2-null mice accumulate oxidized DNA bases in the transcriptionally active sequences of the genome and are susceptible to innate inflammation // *J. Biol. Chem.* 2015. Vol. 290, № 41. P. 24636–24648.
154. Schomacher L. Neil DNA glycosylases promote substrate turnover by Tdg during DNA demethylation // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. Vol. 23, № 2. P. 116–124.
155. Dey S. Increased risk of lung cancer associated with a functionally impaired polymorphic variant of the human DNA glycosylase NEIL2 // *DNA Repair (Amst)*. 2012. Vol. 11, № 6. P. 570–578.
156. Krokeide S.Z. Human NEIL3 is mainly a monofunctional DNA glycosylase removing

- spiroimidiohydantoin and guanidinohydantoin // DNA Repair (Amst). 2013. Vol. 12, № 12. P. 1159–1164.
157. Liu M., Doublé S., Wallace S.S. Neil3, the final frontier for the DNA glycosylases that recognize oxidative damage // Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen. Elsevier B.V., 2013. Vol. 743–744. P. 4–11.
158. Sejersted Y., Hildrestrand G.A., Kunke D., Rolseth V., Krokeide S.Z., Neurauter C.G., Suganthan R., Atneosen-Åsegg M., Fleming A.M., Saugstad O.D., Burrows C.J., Luna L., Bjørås M.. Endonuclease VIII-like 3 (Neil3) DNA glycosylase promotes neurogenesis induced by hypoxia-ischemia // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2011. Vol. 108, № 46. P. 18802–18807.
159. Regnell C.E., Hildrestrand G.A., Sejersted Y., Medin T., Moldestad O., Rolseth V., Krokeide S.Z., Suganthan R., Luna L., Bjørås M., Bergersen L.H. Hippocampal adult neurogenesis is maintained by Neil3-dependent repair of oxidative DNA lesions in neural progenitor cells // Cell Rep. 2012. Vol. 2, № 3. P. 503–510.
160. Skarpengland T. Neil3-dependent base excision repair regulates lipid metabolism and prevents atherosclerosis in Apoe-deficient mice // Sci. Rep. 2016. Vol. 6, № February. P. 1–13.
161. Wilson D.M. Variation in base excision repair capacity // Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen. Elsevier B.V., 2011. Vol. 711, № 1–2. P. 100–112.
162. Li M., Wilson D.M. Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 // Antioxid. Redox Signal. 2014. Vol. 20, № 4. P. 678–707.
163. Robson C.N., Hickson I.D. Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/aprimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in E.coli xth (exonuclease III) mutants // Nucleic Acids Research. 1991. Vol. 19. 5519–5523 p.
164. Demple B., Harrison L. Repair of oxidative damage to dna: Enzymology and Biology // Annu. Rev. Biochem. 1994. Vol. 63. P. 915–948.
165. Thakur S. A review on protein-protein interaction network of APE1/Ref-1 and its associated biological functions // Cell Biochem Funct. 2015. Vol. 33. P. 101–112.
166. Abshire E.T., Chasseur J., Bohn J.A., Rizzo P. A., Del Freddolino P.L., Goldstrohm A.C., Trievel R.C. The structure of human Nocturnin reveals a conserved ribonuclease domain that represses target transcript translation and abundance in cells // Nucleic Acids Res. 2018. Vol. 46, № 12. P. 6257–6270.
167. Beloglazova N.G., Kirpota O.O., Starostin K.V., Ishchenko A.A., Yamkovoy V.I., Zharkov D.O.,

- Douglas K.T., Nevinsky G.A. Thermodynamic, kinetic and structural basis for recognition and repair of abasic sites in DNA by apurinic/apyrimidinic endonuclease from human placenta // *Nucleic Acids Res.* 2004. Vol. 32, № 17. P. 5134–5146.
168. Gorman M.A. The crystal structure of the human DNA repair endonuclease HAP1 suggests the recognition of extra-helical deoxyribose at DNA abasic sites // *EMBO J.* 1997. Vol. 16, № 21. P. 6548–6558.
169. Beernink P.T. Two divalent metal ions in the active site of a new crystal form of human apurinic/apyrimidinic endonuclease, Ape1: Implications for the catalytic mechanism // *J. Mol. Biol. Academic Press*, 2001. Vol. 307, № 4. P. 1023–1034.
170. Manvilla B.A. Biological Crystallography Structure of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 with the essential Mg²⁺ cofactor // *Acta Crystallogr. Sect. D.* 2013. Vol. 69. P. 2555–2562.
171. Tsutakawa S.E. Conserved structural chemistry for incision activity in structurally non-homologous apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 and endonuclease IV DNA repair enzymes // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288, № 12. P. 8445–8455.
172. Mol C.D. DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 DNA repair and coordination. 2000. Vol. 403, № January. P. 451–456.
173. Manvilla B.A. Structure of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 with the essential Mg²⁺ cofactor // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. International Union of Crystallography*, 2013. Vol. 69, № 12. P. 2555–2562.
174. Tsutakawa S.E. Conserved Structural Chemistry for Incision Activity in Structurally Non-homologous Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease APE1 and Endonuclease IV DNA Repair Enzymes // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288. P. 8445–8455.
175. Erzberger J.P., Wilson D.M. 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.* 1999. Vol. 290, № 2. P. 447–457.
176. Maher R.L., Bloom L.B. Pre-steady-state Kinetic Characterization of the AP Endonuclease Activity of Human AP Endonuclease 1 // *J. Biol. Chem. Elsevier*, 2007. Vol. 282, № 42. P. 30577–30585.
177. Rothwell D.G. Substitution of Asp-210 in HAP1 (APE/Ref-1) eliminates endonuclease activity

- but stabilises substrate binding // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28, № 11. P. 2207–2213.
178. Freudenthal B.D., Beard W.A., Cuneo M.J., Dyrkheeva N.S., Wilson S.H. Capturing snapshots of APE1 processing DNA damage // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2015. Vol. 22, № 11. P. 924–931.
179. Mundle S.T., Fattal M.H., Melo L.F., Coriolan J.D., O'Regan N.E., Strauss P.R. Novel role of tyrosine in catalysis by human AP endonuclease 1 // *DNA Repair (Amst)*. 2004. Vol. 3, № 11. P. 1447–1455.
180. Mundle S.T., Delaney J.C., Essigmann J.M., Strauss P.R. Enzymatic mechanism of human apurinic/aprimidinic endonuclease against a THF AP site model substrate // *Biochemistry*. 2009. Vol. 48, № 1. P. 19–26.
181. Masuda Y., Bennett R.A.O., Demple B. Rapid dissociation of human apurinic endonuclease (Ape1) from incised DNA induced by magnesium // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, № 46. P. 30360–30365.
182. Kanazhevskaya L.Yu., Koval V.V., Lomzov A.A., Fedorova O.S. The role of Asn-212 in the catalytic mechanism of human endonuclease APE1: Stopped-flow kinetic study of incision activity on a natural AP site and a tetrahydrofuran analogue // *DNA Repair (Amst)*. Elsevier B.V., 2014. Vol. 21. P. 43–54.
183. Redrejo-Rodríguez M. Structural comparison of AP endonucleases from the exonuclease III family reveals new amino acid residues in human AP endonuclease 1 that are involved in incision of damaged DNA // *Biochimie*. 2016. Vol. 128–129. P. 20–33.
184. Aboelnga M.M., Wetmore S.D. Unveiling a Single-Metal-Mediated Phosphodiester Bond Cleavage Mechanism for Nucleic Acids: A Multiscale Computational Investigation of a Human DNA Repair Enzyme // *J. Am. Chem. Soc.* 2019. Vol. 141. P. 8646–8656.
185. Lowry D.F. Investigation of the role of the histidine-aspartate pair in the human exonuclease III-like abasic endonuclease, Ape1 // *J. Mol. Biol.* 2003. Vol. 329, № 2. P. 311–322.
186. Fairlamb M.S. Visualizing the coordination of apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1) and DNA polymerase β during base excision repair // *J. Biol. Chem.* The Authors, 2023. Vol. 299, № 5. P. 104636.
187. Whitaker A.M., Freudenthal B.D. APE1: A skilled nucleic acid surgeon // *DNA Repair (Amst)*. Elsevier, 2018. Vol. 71, № August. P. 93–100.
188. Whitaker A.M. Base excision repair of oxidative DNA damage: from mechanism to disease // *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2017. Vol. 22. P. 1493–1522.

189. Whitaker A.M., Flynn T.S., Freudenthal B.D. Molecular snapshots of APE1 proofreading mismatches and removing DNA damage // *Nat. Commun.* 2018.
190. Izumi T., David Henner W., Mitra S. Negative Regulation of the Major Human AP-Endonuclease, a Multifunctional Protein // *Biochemistry.* 1996. Vol. 35. P. 14679–14683.
191. Xanthoudakis S., Curran T. Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity // *EMBO J.* 1992. Vol. 11, № 2. P. 653–665.
192. Shah F. Exploiting the Ref-1-APE1 node in cancer signaling and other diseases: from bench to clinic // *npj Precis. Oncol.* 2017. Vol. 1, № 19. P. 1–19.
193. Georgiadis M.M., Luo M., Gaur R.K., Delaplane S., Li X., Kelley M.R. Evolution of the redox function in mammalian apurinic/aprimidinic endonuclease // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2008. Vol. 643, № 1–2. P. 54–63.
194. Fomenko D.E., Gladyshev V.N. Identity and Functions of CxxC-Derived Motifs // *Biochemistry.* 2003. Vol. 42. P. 11214–11225.
195. Luo M., Zhang J., He H., Su D., Chen Q., Gross M.L., Kelley M.R., Georgiadis M.M. Characterization of the Redox Activity and Disulfide Bond Formation in Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease // *Biochemistry.* 2011. Vol. 51. P. 695–705.
196. Bazlekowa-Karaban M., Prorok P., Baconnais S., Taipakova S., Akishev Z., Zembrzuska D., Popov A.V., Endutkin A.V., Groisman R., Ishchenko A.A., Matkarimov B.T., Bissenbaev A., Le Cam E., Zharkov D.O., Tudek B., Saparbaev M. Mechanism of stimulation of DNA binding of the transcription factors by human apurinic/aprimidinic endonuclease 1, APE1 // *DNA Repair (Amst).* Elsevier, 2019. Vol. 82, № August. P. 102698.
197. Hadi M.Z. Functional characterization of Ape1 variants identified in the human population. // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28, № 20. P. 3871–3879.
198. Daviet S. Major oxidative products of cytosine are substrates for the nucleotide incision repair pathway // *DNA Repair (Amst).* 2007. Vol. 6, № 1. P. 8–18.
199. Lirussi L. APE1 polymorphic variants cause persistent genomic stress and affect cancer cell proliferation // *Oncotarget.* 2016. Vol. 7, № 18.
200. George C., Doss P., Nagasundaram N. Investigating the Structural Impacts of I64T and P311S Mutations in APE1-DNA Complex: A Molecular Dynamics Approach // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, № 2. P. 1–11.

201. Pieretti M., Khattar N.H., Smith S.A. Common polymorphisms and somatic mutations in human base excision repair genes in ovarian and endometrial cancers // *Mutat. Res. - Mutat. Res. Genomics*. 2001. Vol. 432, № 3–4. P. 53–59.
202. Illuzzi J.L. Functional Assessment of Population and Tumor-Associated APE1 Protein Variants // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 6.
203. Hadi M.Z., Coleman M.A., Fidelis K., Mohrenweiser H.W., Wilson III D.M. Functional characterization of Ape1 variants identified in the human population // *Nucleic Acids Research*. 2000. Vol. 28. 3871–3879 p.
204. Huamani J. Spontaneous Mutagenesis Is Enhanced in Apex Heterozygous Mice // *Mol. Cell. Biol.* 2004. Vol. 24, № 18. P. 8145–8153.
205. Unnikrishnan A. Oxidative stress alters base excision repair pathway and increases apoptotic response in apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox factor-1 haploinsufficient mice // *Free Radic. Biol. Med. Elsevier Inc.*, 2009. Vol. 46, № 11. P. 1488–1499.
206. Wallace S.S., Murphy D.L., Sweasy J.B. Base excision repair and cancer // *Cancer Lett. Elsevier Ireland Ltd*, 2012. Vol. 327, № 1–2. P. 73–89.
207. Idriss H.T., Al-Assar O., Wilson S.H. DNA polymerase β // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2002. Vol. 34, № 4. P. 321–324.
208. Kunkel T.A. The mutational specificity of DNA polymerase- β during in vitro DNA synthesis. Production of frameshift, base substitution, and deletion mutations // *J. Biol. Chem. Elsevier*, 1985. Vol. 260, № 9. P. 5787–5796.
209. Robert W. Sobol, Rajendra Prasad, Andrea Evenski, Audrey Baker, Xiao-Ping Yang J.K.H.& S.H.W. The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity. 2000.
210. Starcevic D., Dalal S., Sweasy J.B. Cell Cycle Is There a Link Between DNA Polymerase Beta and Cancer? // *Cell Cycle*. 2004. Vol. 3, № 8. P. 998–1001.
211. Murphy D.L. The Asp285 Variant of DNA Polymerase Beta Extends Mismatched Primer Termini via Increased Nucleotide Binding // *Biochemistry*. 2008. Vol. 47. P. 8048–8057.
212. Dalal S., Chikova A., Jaeger J., Sweasy J.B. The Leu22Pro tumor-associated variant of DNA polymerase beta is dRP lyase deficient // *Nucleic Acids Res.* 2008. Vol. 36, № 2. P. 411–422.
213. Prasad R., Batra V.K., Yang X.P., Krahn J.M., Pedersen L.C., Beard W.A., Wilson S.H. Structural

- insight into the DNA polymerase β deoxyribose phosphate lyase mechanism // DNA Repair (Amst). 2005. Vol. 4, № 12. P. 1347–1357.
214. Lyu P.C. α -Helix stabilization by natural and unnatural amino acids with alkyl side chains // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1991. Vol. 88, № 12. P. 5317–5320.
215. Lang T. The E295K DNA Polymerase Beta Gastric Cancer-Associated Variant Interferes with Base Excision Repair and Induces Cellular Transformation // Mol. Cell. Biol. 2007. Vol. 27, № 15. P. 5587–5596.
216. Sawaya M.R., Pelletier H., Kumar A., Wilson S.H., Kraut J. Crystal structure of rat DNA polymerase β : Evidence for a common polymerase mechanism // Science. 1994. Vol. 264, № 5167. P. 1930–1935.
217. Dalal S. Prostate-Cancer-Associated I260M Variant of DNA Polymerase Is a Sequence-Specific Mutator // Biochemistry. 2005. Vol. 44. P. 50.
218. Yamtich J. et al. Hinge Residue I174 Is Critical for Proper dNTP Selection by DNA Polymerase β // Biochemistry. 2010. Vol. 49. P. 2326–2334.
219. Yamtich J., Starcevic D., Lauper J., Smith E., Shi I., Rangarajan S., Jaeger J., Sweasy J.B. Population-specific variation in haplotype composition and heterozygosity at the POLB locus // DNA Repair (Amst). 2009. Vol. 8, № 5. P. 579–584.
220. Pan F. Mutation of DNA Polymerase β R137Q Results in Retarded Embryo Development Due to Impaired DNA Base Excision Repair in Mice OPEN // Nat. Publ. Gr. 2016. Vol. 6.
221. Guo Z. Human DNA polymerase β polymorphism, Arg137Gln, impairs its polymerase activity and interaction with PCNA and the cellular base excision repair capacity // Nucleic Acids Res. 2009. Vol. 37, № 10. P. 3431–3441.
222. Pelletier H. Crystal structures of human DNA polymerase β complexed with DNA: Implications for catalytic mechanism, processivity, and fidelity // Biochemistry. 1996. Vol. 35, № 39. P. 12742–12761.
223. Chan K. Overexpression of DNA polymerase β results in an increased rate of frameshift mutations during base excision repair // Mutagenesis. 2007. Vol. 22, № 3. P. 183–188.
224. Zhou T. R152C DNA Pol β mutation impairs base excision repair and induces cellular transformation // Oncotarget. 2016. Vol. 7, № 6. P. 6902–6915.
225. Sato Y., Yoshizato T., Shiraishi Y., Maekawa S., Okuno Y., Kamura T., Shimamura T., Sato-

- Otsubo A., Nagae G., Suzuki H., Nagata Y., Yoshida K., Kon A., Suzuki Y., Chiba K., Tanaka H., Niida A., Fujimoto A., Tsunoda T., Morikawa T., Maeda D., Kume H., Sugano S., Fukayama M., Aburatani H., Sanada M., Miyano S., Homma Y., Ogawa S. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma // *Nat. Genet.* 2013. Vol. 45, № 8. P. 860–867.
226. Wang M., Li E., Lin L., Kumar A.K., Pan F., He L., Zhang J., Hu Z., Guo Z. Enhanced activity of variant DNA polymerase β (D160G) contributes to cisplatin therapy by impeding the efficiency of NER // *Mol. Cancer Res.* 2019. Vol. 17, № 10. P. 2077–2088.
227. Lang T. A DNA polymerase mutant from colon cancer cells induces mutations // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004. Vol. 101, № 16. P. 6074–6079.
228. Murphy D.L. The E288K Colon Tumor Variant of DNA Polymerase β Is a Sequence Specific Mutator // *Biochemistry.* 2012. Vol. 51. P. 5269–5275.
229. Alnajjar K.S., Garcia-Barboza B., Negahbani A., Nakhjiri M., Kashemirov B., McKenna Ch., Goodman M.F., Sweasy J.B. A change in the rate-determining step of polymerization by the K289M DNA polymerase β cancer-associated variant // *Biochemistry.* 2017. Vol. 56, № 15. P. 2096–2105.
230. Odell I.D. Nucleosome Disruption by DNA Ligase III-XRCC1 Promotes Efficient Base Excision Repair // *Mol. Cell. Biol.* 2011. Vol. 31, № 22. P. 4623–4632.
231. Ellenberger T., Tomkinson A.E. Eukaryotic DNA Ligases: Structural and Functional Insights Nucleotidyltransferases (NTases): a superfamily of phosphotransferase enzymes with conserved sequence motifs that includes DNA and RNA ligases and mRNA capping enzymes (15) // *Annu. Rev. Biochem.* 2008. Vol. 77. P. 313–338.
232. Puebla-Osorio N., Lacey D.B., Alt F.W., Zhu Ch. Early Embryonic Lethality Due to Targeted Inactivation of DNA Ligase III // *Mol. Cell. Biol.* 2006. Vol. 26, № 10. P. 3935–3941.
233. Wilson D.M. Variation in base excision repair capacity // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2011. Vol. 711, № 1–2. P. 100–112.
234. Thompson L.H., West M.G. XRCC1 keeps DNA from getting stranded // *Mutat. Res. - DNA Repair.* 2000. Vol. 459, № 1. P. 1–18.
235. Caldecott K.W. XRCC1 and DNA strand break repair // *DNA Repair (Amst).* 2003. Vol. 2, № 9. P. 955–969.
236. Taylor R.M., Thistlethwaite A., Caldecott K.W. Central Role for the XRCC1 BRCT I Domain in Mammalian DNA Single-Strand Break Repair // *Mol. Cell. Biol.* 2002. Vol. 22, № 8. P. 2556–

- 2563.
237. Pachkowski B.F. XRCC1 Genotype and Breast Cancer: Functional Studies and Epidemiologic Data Show Interactions between XRCC1 Codon 280 His and Smoking // *Cancer Res.* 2006. Vol. 66, № 5. P. 2860–2868.
238. Qu T., Morii E., Oboki K., Lu Yu., Morimoto K. Micronuclei in EM9 cells expressing polymorphic forms of human XRCC1 // *Cancer Lett.* 2005. Vol. 221, № 1. P. 91–95.
239. Takanami T. The Arg280His polymorphism in X-ray repair cross-complementing gene 1 impairs DNA repair ability // *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2005. Vol. 582, № 1–2. P. 135–145.
240. Berquist B.R., Singh D.K., Fan J., Kim D., Gillenwater E., Kulkarni A., Bohr V.A., Ackerman E.J., Tomkinson A.E., Wilson III D.M. Functional capacity of XRCC1 protein variants identified in DNA repair-deficient Chinese hamster ovary cell lines and the human population // *Nucleic Acids Res.* 2010. Vol. 38, № 15. P. 5023–5035.
241. Green M.R., Joseph Sambrook Peter. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* // Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2012. Vol. 33, № 1.
242. Caldin E.F. *Techniques and Applications of Fast Reactions in Solution* (Gettins, W. J.; Wyn-Jones, E.; ed.s) // *J. Chem. Educ.* 1981. Vol. 58, № 1. P. A30.
243. Miroshnikova A.D., Kuznetsova A.A., Vorobjev, Yu.N., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. Effects of mono- and divalent metal ions on DNA binding and catalysis of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 // *Mol. Biosyst. Royal Society of Chemistry*, 2016. Vol. 12, № 5. P. 1527–1539.
244. Timofeyeva N.A., Koval V.V., Knorre D.G., Zharkov D.O., Saparbaev M.K., Ishchenko A.A., Fedorova O.S. Conformational Dynamics of Human AP Endonuclease in Base Excision and Nucleotide Incision Repair Pathways // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2009. Vol. 26, № 5. P. 637–652.
245. Kanazhevskaya L.Yu., Koval V.V., Zharkov D.O., Strauss P.R., Fedorova O.S. Conformational transitions in human AP endonuclease 1 and its active site mutant during abasic site repair // *Biochemistry.* 2010. Vol. 49, № 30. P. 6451–6461.
246. Miroshnikova A.D., Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. Thermodynamics of damaged DNA binding and catalysis by human AP endonuclease 1 // *Acta Naturae.* 2016. Vol. 8, № 1. P. 103–110.
247. Ward D.C., Reich E., Stryer L. *Fluorescence Studies of Nucleotides and Polynucleotides* // *J. Biol. Chem.* 1969. Vol. 244, № 5. P. 1228–1237.

248. Jean J.M., Hall K.B. 2-Aminopurine fluorescence quenching and lifetimes: Role of base stacking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000. Vol. 98, № 1. 37–41 p.
249. Greenfield N.J. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data // *Anal. Biochem.* 1996. Vol. 235, № 1. P. 1–10.
250. Pelton J.T., McLean L.R. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure // *Anal. Biochem.* 2000. Vol. 277, № 2. P. 167–176.
251. Timofeyeva N.A., Koval V.V., Knorre D.G., Zharkov D.O., Sapparbaev M.K., Ishchenko A.A., Fedorova O.S. Conformational dynamics of human AP endonuclease in base excision and nucleotide incision repair pathways // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2009. Vol. 26, № 5. P. 637–652.
252. Kanazhevskaya L.Yu., Koval V.V., Vorobjev Yu.N., Fedorova O.S. Conformational dynamics of human ap endonuclease in base excision and nucleotide incision repair pathways // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2012. Vol. 26, № 6. P. 637–652.
253. Rachofsky E.L., Osman R., Ross J.B.A. Probing Structure and Dynamics of DNA with 2-Aminopurine: Effects of Local Environment on Fluorescence // *Biochemistry.* 2001. Vol. 40. P. 34.
254. Xanthoudakis S. The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. Vol. 93, № 17. P. 8919–8923.
255. Moor N., Vasil'eva I., Lavrik O. Functional role of N-terminal extension of human ap endonuclease 1 in coordination of base excision dna repair via protein–protein interactions // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, № 9.
256. Xia L. Human 3-methyladenine-DNA glycosylase: Effect of sequence context on excision, association with PCNA, and stimulation by AP endonuclease // *J. Mol. Biol.* 2005. Vol. 346, № 5. P. 1259–1274.
257. Bennett R.A.O. Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase β in the base excision repair pathway // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997. Vol. 94, № 14. P. 7166–7169.
258. Liu Y. Coordination of steps in single-nucleotide base excision repair mediated by apurinic/aprimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase β // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282, № 18. P. 13532–13541.
259. Raper A.T., Maxwell B.A., Suo Z. Dynamic Processing of a Common Oxidative DNA Lesion by the First Two Enzymes of the Base Excision Repair Pathway // *J. Mol. Biol.*, 2021. Vol. 433, № 5. P. 166811.

260. Lari S.U., Chen C.Y., Vertéssy B.G., Morré J., Bennett S.E. Quantitative determination of uracil residues in *Escherichia coli* DNA: Contribution of ung, dug, and dut genes to uracil avoidance // DNA Repair (Amst). 2006. Vol. 5, № 12. P. 1407–1420.
261. Lewis C.A. Cytosine deamination and the precipitous decline of spontaneous mutation during Earth's history // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2016. Vol. 113, № 29. P. 8194–8199.
262. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // Nature. 1993. Vol. 362. P. 709–715.
263. Jaszczur M., Bertram J.G., Pham P., Scharff M.D., Goodman M.F. AID and APOBEC3G haphazard deamination and mutational diversity // Cell. Mol. Life Sci. 2013. Vol. 70, № 17. P. 3089–3108.
264. Rebhandl S., Huemer M., Greil R., Geisberger R. AID / APOBEC deaminases and cancer ABSTRACT : // Oncoscience. 2015. Vol. 2, № 4. P. 320–333.
265. Ladner R. The Role of dUTPase and Uracil-DNA Repair in Cancer Chemotherapy // Curr. Protein Pept. Sci. 2001. Vol. 2, № 4. P. 361–370.
266. Jacobs A.L., Schär P. DNA glycosylases: In DNA repair and beyond // Chromosoma. 2012. Vol. 121, № 1. P. 1–20.
267. Visnes T. Uracil in DNA and its processing by different DNA glycosylases // Phil. Trans. R. Soc. B. 2009. Vol. 364. P. 563–568.
268. Kuznetsova A.A., Iakovlev D.A., Misovets I.V., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. Pre-steady-state kinetic analysis of damage recognition by human single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase SMUG1 // Mol. Biosyst. Royal Society of Chemistry, 2017. Vol. 13, № 12. P. 2638–2649.
269. Iakovlev D.A., Alekseeva I.V., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. Role of Arg243 and His239 Residues in the Recognition of Damaged Nucleotides by Human Uracil-DNA Glycosylase SMUG1 // Biochem. 2020. Vol. 85, № 5. P. 594–603.
270. Petronzelli F., Riccio A., Markham G.D., Seeholzer S.H., Stoerker J., Genuardi M., Yeung A.T., Matsumoto Y., Bellacosa A. Biphasic kinetics of the human DNA repair protein MED1 (MBD4), a mismatch-specific DNA N-glycosylase // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275, № 42. P. 32422–32429.
271. Kladova O.A., Iakovlev D.A., Groisman R., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. An Assay for the Activity of Base Excision Repair Enzymes in Cellular Extracts Using Fluorescent DNA Probes // Biochem. 2020.

272. Kladova O.A., Alekseeva I.V., Saparbaev M., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. 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.* 2020. Vol. 21. P. 7174.
273. Kladova O.A., Bazlekowa-Karaban M., Baconnais S., Piétrement O., Ishchenko A.A., Matkarimov B.T., Iakovlev D.A., Vasenko A., Fedorova O.S., Le Cam E., Tudek B., Kuznetsov N.A., Saparbaev M. The role of the N-terminal domain of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1, APE1, in DNA glycosylase stimulation // *DNA Repair (Amst)*. 2018. Vol. 64. P. 10–25.
274. Saparbaev M., Langouet S., Privezentzev C.V., Guengerich F.P., Cai H., Elder R.H., Laval J. 1,N(2)-ethenoguanine, a mutagenic DNA adduct, is a primary substrate of Escherichia coli mismatch-specific uracil-DNA glycosylase and human alkylpurine-DNA-N-glycosylase // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 30. P. 26987–26993.
275. O'Brien P.J., Ellenberger T. Dissecting the broad substrate specificity of human 3-methyladenine-DNA glycosylase // *J. Biol. Chem.* 2003/12/23. 2004. Vol. 279, № 11. P. 9750–9757.
276. Kuznetsov N.A., Kiryutin A.S., Kuznetsova A.A., Panov M.S., Barsukova M.O., Yurkovskaya A.V., Fedorova O.S. The formation of catalytically competent enzyme-substrate complex is not a bottleneck in lesion excision by human alkyladenine DNA glycosylase // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2016/03/31. 2017. Vol. 35, № 5. P. 950–967.
277. Ringvoll J., Moen M.N., Nordstrand L.M., Meira L.B., Pang B., Bekkelund A., Dedon P.C., Bjelland S., Samson L.D., Falnes P.Ø., Klungland A. AlkB homologue 2-mediated repair of ethenoadenine lesions in mammalian DNA. // *Cancer Res.* 2008. Vol. 68, № 11. P. 4142–4149.
278. Kuznetsov N.A., Kanazhevskaya L.Y., Fedorova O.S. DNA Demethylation in the Processes of Repair and Epigenetic Regulation Performed by 2-Ketoglutarate-Dependent DNA Dioxygenases // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. P. 10540.