

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
ИМ. Д. Г. КНОРРЕ

На правах рукописи

Булгаков Никита Алексеевич

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

1.5.4 — биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Научные руководители:

к.б.н. Юдкина Анна Владимировна

Академик РАН, д.б.н. Жарков Дмитрий Олегович

Новосибирск – 2026

Оглавление

1	ВВЕДЕНИЕ.....	5
2	ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	10
2.1	Основные типы повреждений ДНК и причины их возникновения	10
2.1.1	Активные формы кислорода и азота и повреждения ДНК, образующиеся под их воздействием	10
2.1.2	Дезаминирование азотистых оснований	14
2.1.3	Алкилирование и продукты электрофильного присоединения	15
2.1.4	Апурин-апиримидиновые сайты	17
2.1.5	Повреждения ДНК, образующиеся под воздействием физических факторов	18
2.1.6	Мисматчи	20
2.2	Репарация повреждений ДНК.....	20
2.2.1	Реактивация.....	20
2.2.2	Мисматч репарация	21
2.2.3	Эксцизионная репарация нуклеотидов.....	21
2.2.4	Эксцизионная репарация оснований	23
2.3	ДНК-гликозилазы	24
2.3.1	Общий механизм поиска повреждения	24
2.3.2	Общий механизм катализа удаления поврежденного основания	28
2.3.3	Разнообразие ДНК-гликозилаз.....	29
2.4	Заключение	49
3	Материалы и методы	51
3.1	Материалы	51
3.1.1	Реактивы	51
3.1.2	Буферы и смеси.....	51
3.1.3	Ферменты	52
3.1.4	Олигодезоксирибонуклеотиды.....	53
3.1.5	Нитроксильные спиновые метки	55
3.1.6	Плазмиды и бактериальные штаммы	56
3.1.7	Хроматографические сорбенты и колонки	56
3.2	Методы.....	57
3.2.1	Сайт-направленный мутагенез	57
3.2.2	Выделение плазмидной ДНК	57
3.2.3	Наработка и выделение белков Fpg и Nei	57
3.2.4	Выделение и очистка ОДН	59
3.2.5	Введение радиоактивной метки на 5'-конец ОДН	60

3.2.6	Селективное окисление тимина до тимингликоля с помощью тетраоксида осмия	60
3.2.7	Получение двуцепочечного ОДН	60
3.2.8	Капиллярный термофорез.....	60
3.2.9	Подготовка образцов для ЭПР экспериментов.....	61
3.2.10	Исследование доступности растворителя к радикальному центру спин-метки в комплексе EsoFpg-ДНК методом модуляции огибающей сигналов электронного спинового эха (ESEEM).....	61
3.2.11	Получение спектров непрерывного электронного-парамагнитного резонанса	62
3.2.12	Молекулярная динамика.....	63
3.2.13	Получение субстратов, содержащих АП-сайт.....	64
3.2.14	Получение ДНК-белковых сшивок.....	64
3.2.15	Хроматографическое выделение ДНК-белковой сшивки	65
3.2.16	Кристаллизация ДНК-белковых сшивок Nei <i>E. coli</i> и сбор дифракционных данных	65
3.2.17	Обработка дифракционных данных и получение модели кристаллической структуры ДНК-белковых сшивок Nei <i>E. coli</i>	66
3.2.18	Анализ каталитической активности Nei <i>E. coli</i> на двуцепочечном ДНК-субстрате	67
3.2.19	Определение кинетических параметров Nei <i>E. coli</i> на дцОДН.....	67
3.2.20	Анализ термической денатурации вариантов Fpg <i>L. lactis</i> с помощью высокоскоростной дифференциальной сканирующей флуориметрии	67
3.2.21	Оптимизация условий стационарной кинетики ферментативной реакции, катализируемой мутантными вариантами Fpg <i>L. lactis</i>	68
3.2.22	Определение кинетических параметров вариантов Fpg <i>L. lactis</i> с заменами остатков 219-222 в реакции с субстратами 23АП//compC, 23АП//compA и 23ohU//compC	69
3.2.23	Определение кинетической константы k_2 вариантов Fpg <i>L. lactis</i> с заменами остатков 219-222 в реакции с 8-охоG-содержащим субстратом в условиях кинетики одного оборота	69
3.2.24	Комплементационный тест: рифампициновый форвард-тест в <i>E. coli</i> CC104 fpg mutY	70
4	Результаты и обсуждение	72
4.1	Изучение электростатического потенциала в активном центре EsoFpg с помощью pH-чувствительной нитроксильной спин-метки, конъюгированной с ДНК-лигандом....	72
4.1.1	Связывание EsoFpg с дцДНК-лигандами, содержащими брешь со спин-меткой	73
4.1.2	Доступность растворителя к радикальному центру спин-метки в комплексе EsoFpg-ДНК по данным ESEEM.....	75

4.1.3	Молекулярно-динамическое моделирование положения спин-метки в комплексе EcoFpg–ДНК	77
4.1.4	Сдвиг pK_a в окружении спин-метки при инактивирующей мутации E2Q как индикатор изменения электростатики активного центра EcoFpg	78
4.2	Изучение механизма распознавания окислительного повреждения ДНК путём анализа мутантных вариантов LlaFpg с рандомизированными заменами в тетрапептидной петле 219–222	84
4.2.1	Анализ консервативности петли LlaFpg, отвечающей за распознавание повреждения	85
4.2.2	Получение мутантных вариантов LlaFpg по составу тетрапептидной петли и проверка их укладки	87
4.2.3	Влияние замен остатков в тетрапептидной петле LlaFpg на каталитическую эффективность расщепления АП-сайта	89
4.2.4	Влияние замен в тетрапептидной петле LlaFpg на специфичность к основанию напротив АП-сайта	93
4.2.5	Влияние замен в тетрапептидной петле LlaFpg на эффективность удаления 5-гидроксиурацила	95
4.2.6	Влияние замен в тетрапептидной петле LlaFpg на эффективность удаления 8-охоG	98
4.2.7	Конформация петли, связывающей повреждение, коррелирует с активностью LlaFpg	102
4.2.8	Петля, связывающая повреждение, в контексте суперсемейства H2tH	105
4.2.9	Эволюция субстратной специфичности в суперсемействе H2tH	107
4.3	Анализ взаимодействия аминокислотных остатков активного центра Nei <i>E. coli</i> с основанием напротив повреждения	108
4.3.1	Получение структур ковалентных конъюгатов Nei–ДНК с различными основаниями напротив повреждения	108
4.3.2	ДНК-белковый интерфейс EcoNei	113
4.3.3	Распознавание основания напротив повреждения	117
4.3.4	Биохимическая проверка <i>син</i> -ориентации пиримидина напротив повреждения	120
5	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	124
6	ВЫВОДЫ	127
7	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	128
7.	СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	133

1 ВВЕДЕНИЕ

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

Чаще всего с АФК реагируют основания пуринового ряда, давая в качестве окислительных продуктов: 8-оксогуанин (8-охоG), 2,6-диамино-4-гидрокси-5-формамидопиримидин (FapyG), 8-оксоаденин (8-охоA), 4,6-диамино-5-формамидопиримидин (FapyA) и др. Одно из наиболее распространённых окислительных повреждений — это 8-охоG, которое часто используется как маркер окислительного стресса. Присутствие 8-охоG в ДНК оказывает мутагенное влияние вследствие того, что в *син*-конформации 8-охоG образует Хугстинговскую пару с аденином. Как итог, при наличии в ДНК 8-охоG после 1-го раунда репликации может возникать трансверсия G//C→T//A, которая представляет собой одну из основных причин возникновения рака у человека с сигнатурами SBS18 и SBS36. Для борьбы с этими последствиями практически все живые организмы имеют специализированную ферментативную систему — «GO-систему», которая состоит из 3-х ферментов: 1) 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза (Fpg у бактерий и OGG1 у эукариот), которая удаляет 8-охоG из пары 8-охоG//C, 2) 8-охоG//A-специфичная аденин-ДНК-гликозилаза, удаляющая аденин из пары 8-охоG//A (MutY у бактерий и MUTYH у эукариот), 3) 8-охоGTPase (MutT у бактерий и MTH1 у эукариот), которая предотвращает включение 8-охоG в ДНК из пула окисленных нуклеозидтрифосфатов, гидролизуя d(8-охоG)TP.

Тем не менее, основания пиримидинового ряда тоже реагируют с АФК, хоть и с меньшей частотой. Пиримидины образуют иной ряд повреждений, подвергаясь действию АФК. Это обусловлено не только отличием пиримидинового кольца от пуринового, но, в частности, и наличием метильной группы в 5-м положении для Т и 5-meC. Наиболее распространёнными примерами таких повреждений служат тимингликоль (Tg) и урацилгликоль (Ug), дигидротимин (h₂T) и дигидроурацил (h₂U), 5-гидроксиурацил (ohU) и 5-гидроксицитозин (hoC). Присутствие окисленных пиримидинов в ДНК может привести к образованию мисматчей и апурин-апиримидиновых сайтов (АП-сайтов),— все эти повреждения

приводят к таким мутагенным повреждениям ДНК как мисматчи или апурин-апириимидиновые сайты (АП-сайты), которые также приводят к трансверсиям. Для удаления этого ряда повреждений у прокариот есть 2 фермента с перекрывающейся субстратной специфичностью: эндонуклеаза VIII (Nei) и эндонуклеаза III (Nth), в то время как у эукариот за это ответственен фермент NTHL1.

Сегодня ДНК-гликозилазы разделены на структурные суперсемейства, внутри которых у разных ферментов может быть различная субстратная специфичность, но основным критерием для классификации остаётся именно структурное сходство (структурные мотивы, домены). Интересно, что такие ферменты как Fpg и Nei находятся в одном суперсемействе — H2tH или «спираль–2 поворота–спираль» — и, помимо структурного сходства, эти ферменты имеют высокую гомологию в аминокислотной последовательности, а также одинаковые механизмы удаления повреждённого основания из ДНК. При этом субстратная специфичность для ферментов отличается: для Fpg основной субстрат *in vivo* — окисленные пурины, такие как 8-охоG и FapyG (хотя не меньшая активность проявляется и на окисленных пиримидинах *in vitro*), для Nei же наоборот, основные субстраты *in vivo* — окисленные пиримидины, например Tg, при том что Nei также способен удалять окисленные пурины, но с меньшей эффективностью.

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

Цель настоящей работы заключалась в детальном изучении механизмов узнавания и удаления окислительных повреждений из ДНК формамидопиримидин-ДНК-гликозилазой (Fpg) и эндонуклеазой VIII (Nei) — репрезентативными ферментами двух главных групп суперсемейства «спираль–2 поворота–спираль», сходными по структуре, но имеющими разную субстратную специфичность.

Были поставлены следующие задачи:

1. Оценить электростатический потенциал активного центра Fpg *Escherichia coli* дикого типа и каталитически неактивного мутантного варианта Fpg E2Q с помощью конъюги-

рованной к двуцепочечному олигонуклеотиду нитроксильной спин-метки с использованием методов спектроскопии непрерывного ЭПР и модуляции огибающей сигналов электронного спинового эха (ESEEM).

2. Определить функциональную роль тетрапептидной петли 219–222 Fpg *Lactococcus lactis* в узнавании окислительного повреждения ферментом дикого типа и его мутантными вариантами с рандомизированными заменами аминокислотных остатков петли.

3. Установить пространственную структуру ковалентных конъюгатов Nei *E. coli* с ДНК и определить ключевые структурные особенности, отвечающие за способность Nei удалять повреждённые основания напротив всех канонических оснований.

Научная новизна работы. Был разработан новый методический подход к экспериментальной оценке электростатического потенциала в активном центре ДНК-гликозилазы, связанной с ДНК-субстратом, основанный на нитроксильной спин-метке и методах непрерывного ЭПР и ESEEM. Впервые экспериментально зарегистрировано смещение pK_a спин-метки в активном центре инактивирующего мутанта E2Q Fpg *E. coli* относительно фермента дикого типа, отражающее изменение электростатики каталитической диады аминокислотных остатков Pro1–Glu2.

Получена и охарактеризована библиотека мутантных вариантов Fpg *L. lactis* с рандомизированными заменами в тетрапептидной петле 219–222 и установлен специфический вклад петли в узнавание 8-оксогуанина.

Впервые получены кристаллические структуры ковалентных конъюгатов Nei *E. coli* с ДНК, содержащей C, G или T напротив повреждения. Установлено, что пиримидиновые основания напротив повреждения переходят в *син*-конформацию относительно *N*-гликозидной связи, тогда как пуриновые основания сохраняют *анти*-конформацию и образуют водородную связь с остатком Gln69 интеркалирующей петли 69–71. Количественно охарактеризован стерический вклад в дискриминацию комплементарного основания ферментом Nei *E. coli* через серию ДНК-субстратов с модифицированными по C5-положению пиримидинами.

Теоретическая и практическая значимость работы. Ферменты суперсемейства «спираль–2 поворота–спираль» вовлечены в процессы распознавания и удаления широкого ряда наиболее распространённых повреждений ДНК — окислительных повреждений ДНК. Понимание детальных молекулярных механизмов узнавания и удаления повреждений потенциально открывает 2 области практического применения: со стороны белковой инженерии, результаты работы будут полезны для создания ферментов с заданной субстратной специфичностью, а также со стороны здравоохранения для разработки ингибиторов таких

ферментов с целью уменьшения антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана методика регистрации электростатического потенциала в активном центре ДНК-гликозилаз в комплексе с ДНК-субстратом, основанная на ковалентной конъюгации нитроксильной спин-метки с субстратом и регистрации сдвига pK_a спин-метки методами непрерывного ЭПР и ESEEM (модуляции огибающей сигналов электронного спинового эха).

2. Инактивирующая замена остатка Glu2 на Gln в белке Fpg приводит к проявлению буферной ёмкости активного центра в диапазоне pH 7,00–7,37 и смещению pK_a спин-метки в основную сторону на $0,5 \pm 0,1$, что отражает изменение электростатического потенциала активного центра и свидетельствует об участии остатка Glu2 в переносе протона в ходе реакции.

3. Тетрапептидная петля в С-концевом домене белка Fpg, несмотря на свою невысокую консервативность, вносит ключевой вклад в узнавание окисленных пуринов: рандомизация её аминокислотного состава приводит к резкому падению эффективности удаления 8-оксогуанина при сохранении общей структуры белка, сродства к ДНК и активности по отношению к альтернативным субстратам (АП-сайт, 5-гидроксиурацил).

4. Способность Nei *E. coli* узнавать все канонические основания напротив повреждения обусловлена тем, что белок образует неспецифичную водородную связь с атомом N3 пуриновых оснований и разворачивает пиримидиновые основания вокруг N-гликозидной связи, исключая возможность специфичных контактов.

Степень достоверности и апробация результатов.

Ovcherenko S. S.*, **Bulgakov N. A.***, Litvinov I. A., Shernyukov A. V., Kuznetsov D. A., Endutkin A. V., Zharkov T. D., Kupryushkin M. S., Kirilyuk I. A., Zharkov D. O., Bagryanskaya E. G. Probing electrostatics in a DNA repair enzyme with a pH-sensitive nitroxyl spin label // J. Phys. Chem. B. – 2026. – V. 130. – No. 13. – P. 3603–3616. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5c07587

* — равный вклад

Bulgakov N. A., Amanova M. M., Endutkin A. V., Makasheva K. A., Coste F., Castaing B., Golyshev V. M., Lomzov A. A., Yudkina A. V., Zharkov D. O. Randomization of the damaged base-capping loop rewires substrate specificity in formamidopyrimidine–DNA glycosylase // Biochemistry. – 2026. – V. – No. – P. – DOI.

Bulgakov N. A., Endutkin A. V., MacCarthy C., Shevtsov M. B., Kapranov I. A., Yudkina A. V., Borshchevskiy V. I., Zharkov D. O. Unique structural mode for opposite-base tolerance in endonuclease VIII // DNA Repair. – 2026. – V. – No. – P. – DOI: 10.1016/j.dnarep.2026.103962

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 146 страницах, содержит 48 рисунков и 21 таблицу. Библиография включает 277 литературных источников.

Личный вклад соискателя.

Автором лично и в полном объёме проводились следующие работы: сайт-направленный мутагенез для получения мутантного варианта Fpg *E. coli* E2Q, наработка и выделение всех белков *E. coli*, все биохимические эксперименты (за исключением кинетики фермента Nei), участие в обработке данных ЭПР, подготовка ковалентных конъюгатов Nei с ДНК и их кристаллизация с последующим установлением их кристаллических структур, анализом и депонированием в базу данных Protein Data Bank.

Отдельные эксперименты и расчёты выполнены соавторами: получение и анализ спектров непрерывного ЭПР и ESEEM — к. ф.-м. н. С. С. Овчеренко (НИОХ СО РАН); синтез нитроксильных спин-меток — к. х. н. И. А. Кирилюк (НИОХ СО РАН); синтез олигонуклеотидов для ЭПР-экспериментов — к. х. н. Т. Д. Жарков (ИХБФМ СО РАН); молекулярно-динамическое моделирование комплексов Fpg *E. coli* со спин-мечеными лигандами — к. х. н. А. В. Шернюков (ННХ СО РАН), молекулярно-динамическое моделирование мутантных вариантов Fpg *L. lactis* — к. ф.-м. н. В. М. Голышев и к. ф.-м. н. А. А. Ломзов (ИХБФМ СО РАН); выделение мутантных вариантов Fpg *L. lactis* — К. А. Макашева и к. б. н. А. В. Юдкина (ИХБФМ СО РАН); комплементационный тест — М. М. Аманова (ИХБФМ СО РАН); сбор дифракционных данных на станции BL02U17 (SSRF) — И. А. Капранов и д. ф.-м. н. В. И. Борщевский (МФТИ); кинетика Nei — к. х. н. А. В. Ендуткин (ИХБФМ СО РАН).

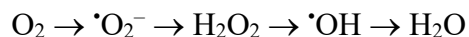
2 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

2.1 Основные типы повреждений ДНК и причины их возникновения

ДНК, хранящая всю генетическую информацию и представляющая собой наиболее долгоживущий биополимер клетки, постоянно находится под действием эндогенных и экзогенных факторов, что приводит к образованию повреждений, причём число известных типов таких повреждений на два порядка превышает число канонических оснований [1]. Природа образуемых повреждений крайне разнообразна — от окисления и дезаминирования оснований ДНК до образования АП-сайтов и ковалентных сшивок между цепями ДНК или цепью ДНК и белками. Накопление таких повреждений приводит к образованию мутаций в клетке, что в отсутствие репарации неминуемо ведёт к клеточной гибели [1,2].

2.1.1 Активные формы кислорода и азота и повреждения ДНК, образующиеся под их воздействием

Аэробный метаболизм, обеспечивающий клетку энергией за счёт переноса электронов по дыхательной цепи на молекулярный кислород, неизбежно сопровождается образованием активных форм кислорода (АФК) — частично восстановленных интермедиатов между O_2 и H_2O , повреждающих в том числе и ДНК самой клетки за счёт высокой реакционной способности [3]. Образование АФК можно представить в виде упрощённой схемы [4]:



Молекулярный кислород (O_2) в основном (триплетном, $^3O_2$) состоянии значительно уступает по реакционной способности синглетному кислороду ($^1O_2$). Переход в возбуждённое синглетное состояние требует затрат энергии, поэтому такое возбуждение, как правило, обусловлено воздействием УФ-облучения или присутствием фотосенсибилизаторов, например флавиносодержащих молекул или хлорофиллов [5].

Следующая частица в ряду восстановления кислорода — супероксид-анион-радикал ($\cdot O_2^-$). Он несколько более реакционноспособен, чем молекулярный кислород, что видно при сравнении стандартных восстановительных потенциалов одноэлектронного восстановления: $-0,33$ В для кислорода и $+0,89$ В для супероксид-анион-радикала [5]. Источники его образования разнообразны: ферментативные реакции (реакции с участием ксантиноксидазы), окисление распространённых восстановителей в клетке (глицеральдегида, флавиносодержащих молекул, тиоловых групп цистеинов и др.) [6], взаимодействие с гемсодержа-

щими белками (гемоглобин, миоглобин) [7]. Однако наиболее значимый источник супероксид-анион-радикала — митохондриальная электрон-транспортная цепь, в частности комплексы I, II и III [8].

При получении ещё одного электрона и пары протонов супероксид-анион-радикал превращается в перекись водорода (H_2O_2) — относительно слабый окислитель. Однако опасность перекиси водорода заключается в её способности при одноэлектронном восстановлении образовывать чрезвычайно реакционноспособную частицу — гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$), восстановительный потенциал которого значительно выше, чем у перекиси (+2,31 В вместо +0,39 В). Образование гидроксильного радикала существенно облегчается в присутствии ионов переходных металлов (Fe^{2+} , Cu^+ , Mn^{2+}) или при УФ-облучении [5].

С АФК реагируют все азотистые основания ДНК, однако их подверженность окислению определяется окислительно-восстановительным потенциалом. Среди канонических оснований наименьшим потенциалом окисления обладает гуанин [9], поэтому его окисленная форма — 8-охоG (Рисунок 1) — представляет собой наиболее распространённый маркер окислительного стресса [10]. Помимо этого, присутствие 8-охоG в ДНК наиболее мутагенно, поскольку 8-охоG способен образовывать 2 стабильные пары оснований в ДНК: 8-охоG//C (классическая Уотсон-Криковская пара, где 8-охоG находится в нативной *анти*-конформации) и 8-охоG//A (Хугстиновская пара, где 8-охоG находится в *син*-конформации) [11]. Именно неканоническая пара 8-охоG//A приводит к наибольшему количеству трансверсий G//C → T//A в клетке [11].

Атака гидроксильного радикала по C8 положению пуринового кольца приводит к образованию двух основных продуктов окисления гуанина: 8-охоG или FapyG (Рисунок 1). Аденин подвергается окислению аналогичным образом. Под действием синглетного кислорода гуанин окисляется с образованием спироиминодигидантоина, циануровой и оксалуровой кислот.

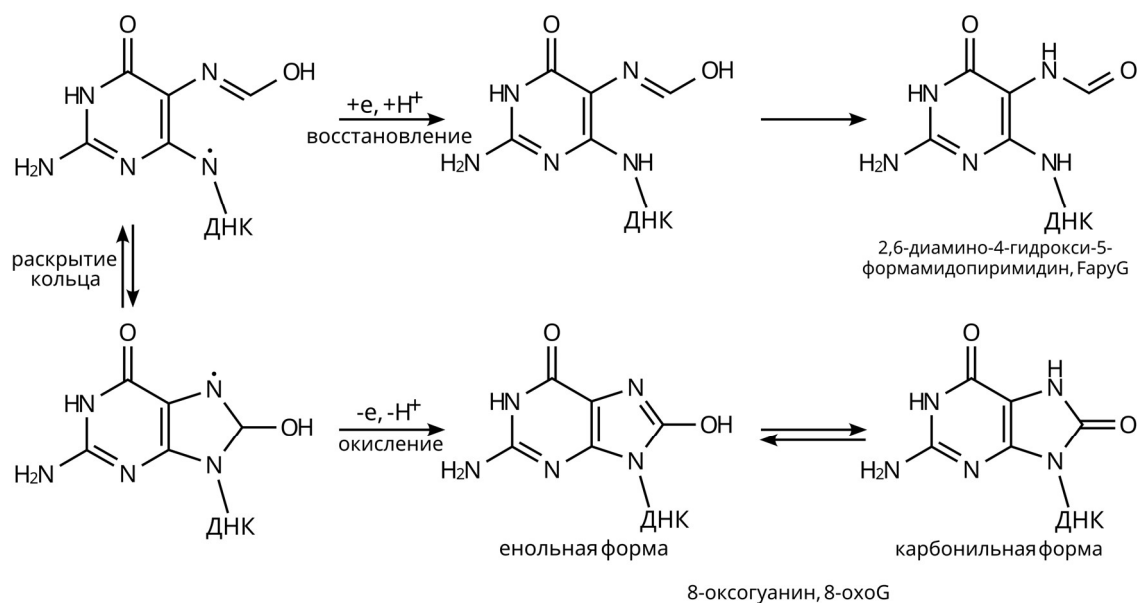


Рисунок 1. Схема окисления гуанина под действием АФК (по [2]).

Пиримидиновые основания также подвергаются окислению АФК, хотя и с меньшей частотой. Спектр их повреждений отличается от пуриновых, что обусловлено как различиями в структуре кольца, так и наличием метильной группы в 5-м положении у тимина (Т) и 5-метилцитозина (5-meC) (Рисунок 2) [12]. Соответственно, набор основных окислительных повреждений для тимина и цитозина во многом совпадает (Рисунок 3А-П).

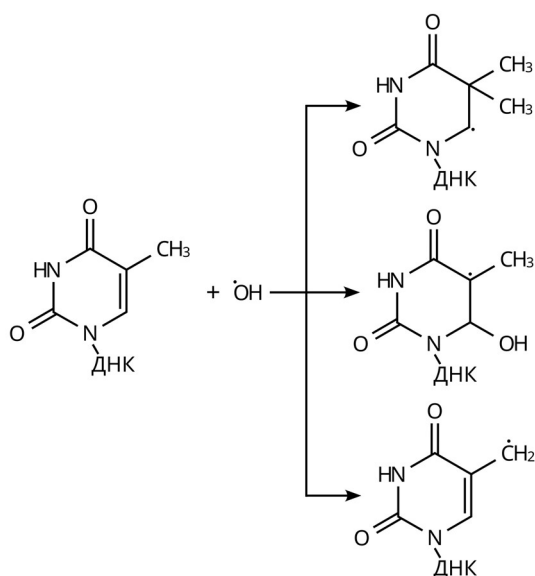
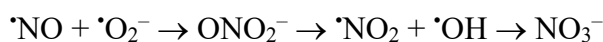


Рисунок 2. Взаимодействие тимина с гидроксильным радикалом приводит к образованию 3-х различных радикалов (по [2]).

Оксид азота (II) $\bullet\text{NO}$, несмотря на радикальную природу, выполняет важную сигнальную функцию в клетке [13] и образуется из аргинина и кислорода под действием NO-синтазы [14]. Высокая реакционная способность $\bullet\text{NO}$ обусловила развитие различных механизмов его деактивации в клетке [15]. Значительно более опасным производным является пероксинитрит ONO_2^- , который преимущественно образуется при взаимодействии $\bullet\text{NO}$ с супероксид-анион-радикалом (хотя возможен и его синтез из азотистой кислоты и перекиси водорода):



Пероксинитрит — основной агент среди активных форм азота, повреждающий основания ДНК, причём наиболее часто атакуется гуанин. Спектр образуемых под действием пероксинитрита продуктов включает 8-охоГ и 8-нитрогуанин, а при дальнейшем окислении — спироиминодигидантоин и оксазолон [16] (Рисунок 3XXIX, XXXI, XXXII). Пероксинитрит неустойчив: при протонировании он разлагается с образованием гидроксильного радикала и диоксида азота NO_2 [12].

Стоит упомянуть, что в ходе метаболических реакций в клетке образуется диоксид углерода CO_2 , который как кислотный оксид реагирует с водой с образованием карбонатных ионов HCO_3^- и CO_3^{2-} . Эти ионы способны взаимодействовать с гидроксильным радикалом, образуя карбонат-анион-радикал $\text{CO}_3^{\bullet-}$. Хотя карбонат-анион-радикал менее реакционноспособен, чем $\bullet\text{OH}$, он тем не менее способен повреждать ДНК, приводя к образованию не только 8-охоГ, но и спироиминодигидантоина [17] (Рисунок 3XXXII).

Таким образом, в процессе нормального клеточного метаболизма образуется большое число низкомолекулярных высокореакционных соединений, которые при взаимодействии с ДНК неизбежно реагируют с образованием разнообразного спектра повреждений.

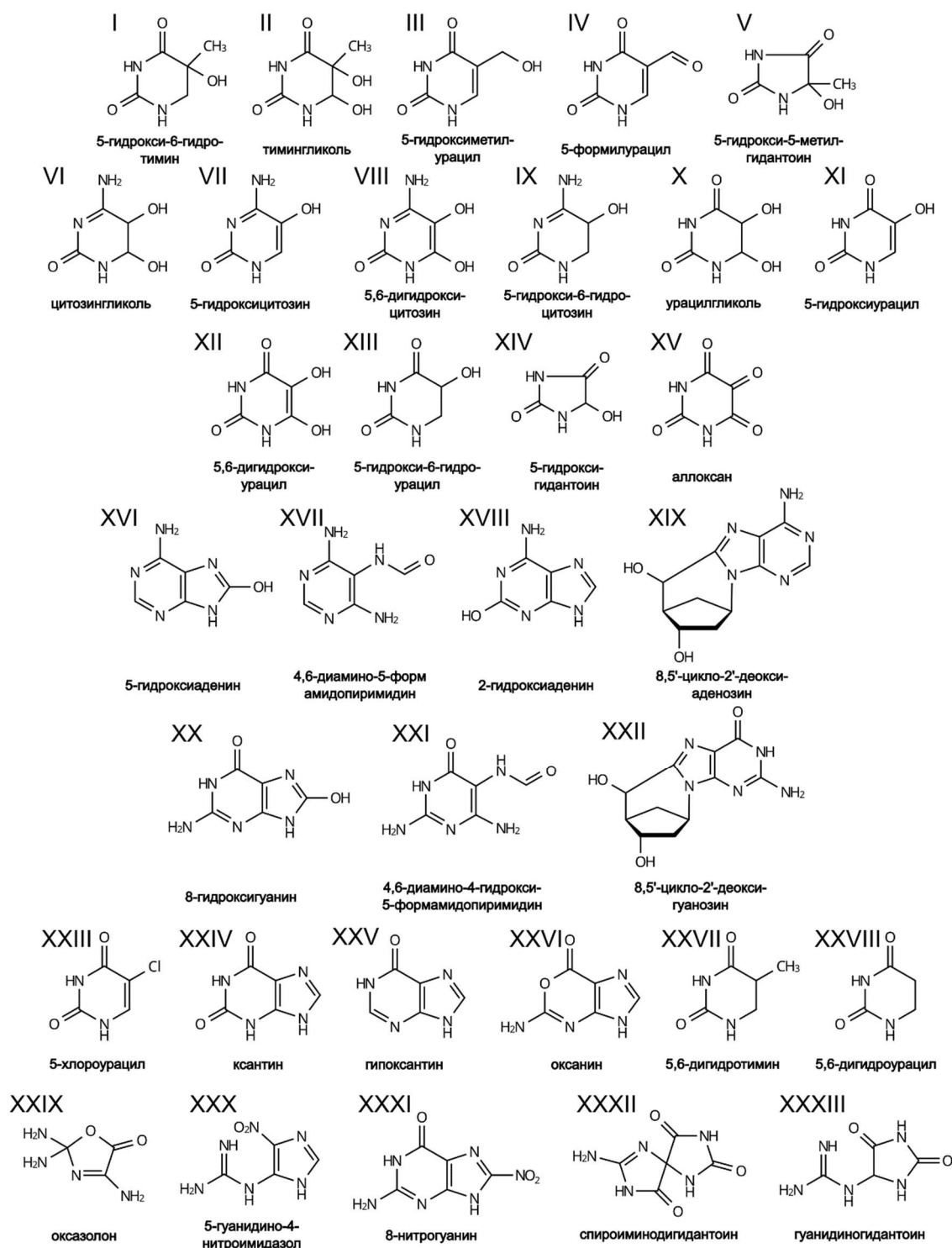


Рисунок 1. Наиболее распространенные окислительные повреждения азотистых оснований.

2.1.2 Дезаминирование азотистых оснований

Помимо модификации колец азотистых оснований различными радикалами возможны реакции с участием экзоциклических групп. Наиболее подвержена таким реакциям аминогруппа: при дезаминировании она гидролитически замещается на карбонильную

группу. Экзоциклическая аминогруппа присутствует в цитозине, аденине и гуанине, причём дезаминирование цитозина протекает легче всего (в клетке млекопитающего в сутки происходит ~100–500 событий дезаминирований цитозина на геном, тогда как аденин дезаминируется примерно на два порядка медленнее) [1]. Кроме pH среды и температуры, скорость дезаминирования значительно увеличивают экзогенные факторы: УФ-излучение [18], гидросульфит натрия [19] и азотистая кислота/оксид азота (III) [20,21]. Потеря аминогруппы у тимина приводит к появлению в ДНК урацила, у аденина — к образованию гипоксантина, у гуанина — ксантина (Рисунок 3XXIV, XXV). Присутствие таких оснований повышает частоту мутаций: дезаминированные основания образуют нехарактерные пары при репликации, что приводит к транзициям G//C → A//T или наоборот, в зависимости от того, какое основание было дезаминировано [22] (Рисунок 3).

2.1.3 Алкилирование и продукты электрофильного присоединения

Азотистые основания ДНК, благодаря наличию нуклеофильных центров, вступают в реакции с электрофилами, и алкилирование представляет собой характерный пример таких реакций. В качестве алкилирующих агентов могут выступать как экзогенные ксенобиотики, так и эндогенные электрофилы. К экзогенным относятся канцерогены (например, метилхлорид — один из распространённых мутагенов, образующийся при горении биомассы [23], N-нитрозосоединения и алифатические эпоксиды), а также противоопухолевые препараты — моно- и бифункциональные алкилирующие агенты: метилметансульфонат (MMS), N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (MNNG), темозоломид, хлорамбуцил, мелфалан, иприт, а также препараты платины (цисплатин), образующие с ДНК внутри- и межцепочечные сшивки [24,25]. Внутриклеточным источником метильных групп служит S-аденозилметионин — кофермент ферментативных реакций метилирования [1,26], способный в меньшей степени самостоятельно метилировать ДНК [27,28]. Ещё одним источником алкилирующих агентов в клетке является перекисное окисление липидов: образующиеся при этом активные карбонильные соединения (малоновый альдегид, 4-гидроксиноненаль, акролеин) также ведут себя как электрофилы по отношению к ДНК [29].

Атака электрофильными агентами затрагивает следующие атомы: в аденине — N1, N3, N6 и N7; в гуанине — N1, N2, N3, N7 и O6; в цитозине — N3, N4 и O2; в тимине — N3, O2 и O4 [30]. Характер образующегося повреждения зависит от природы электрофила. При атаке простыми алкилирующими агентами возникают моноалкилированные основания: наиболее распространенный образующийся продукт — N⁷-метилгуанин (N⁷-meG), сам по себе слабо мутагенный, но склонный к спонтанной депуринизации с образованием АП-сай-

тов; N³-метиладенин (N³-meA), который блокирует репликативные ДНК-полимеразы и является основным цитотоксическим продуктом алкилирования; O⁶-метилгуанин (O⁶-meG) и O⁴-метилтимин (O⁴-meT) обладают выраженным мутагенным потенциалом, поскольку O⁶-meG при репликации образует пару с тимином, вызывая характерные трансверсии G//C → A//T [24,25]. Взаимодействие ДНК с бифункциональными электрофилами — активными метаболитами винилхлорида (хлорацетальдегидом, хлорэтиленоксидом), а также с уже упомянутыми продуктами перекисного окисления липидов — приводит к образованию экзоциклических аддуктов с дополнительным пятичленным кольцом: 1,N⁶-этенаденина (εA), 3,N⁴-этенцитозина (εC), N²,3-этенгуанина (εG) и 1,N²-этенгуанина (Рисунок 4) [24,25]. Малоновый альдегид и 4-гидроксиноненаль дополнительно дают аддукты, содержащие от двух до четырёх конденсированных циклов; некоторые из них, в частности M₁G (Рисунок 4), способны образовывать как межцепочечные сшивки ДНК, так и ДНК-белковые сшивки, что дополнительно затрудняет продвижение репликативного аппарата [29].

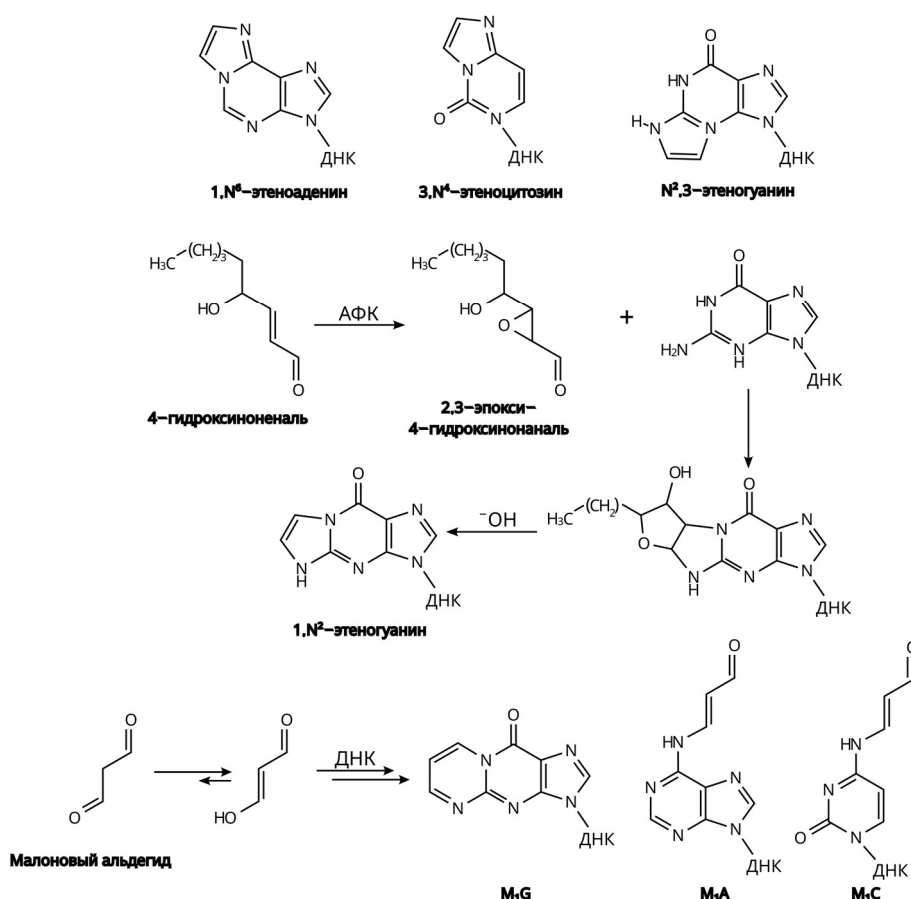


Рисунок 2. Продукты электрофильного присоединения активных карбонильных соединений к азотистым основаниям ДНК (по [2]).

Поскольку электрофильная атака затрагивает атомы, участвующие в образовании водородных связей между основаниями, она нарушает формирование правильных комплементарных пар, что приводит к транзициям и трансверсиям в ДНК [31].

2.1.4 Апурин-апиримидиновые сайты

Помимо мутагенных модификаций оснований, описанных выше, важным типом повреждений ДНК являются апурин/апиримидиновые сайты (АП-сайты). Они образуются как ферментативно — при удалении повреждённого основания ДНК-гликозилазами [32], так и спонтанно за счет гидролиза *N*-гликозидной связи в водной среде в ходе жизнедеятельности клетки, что делает АП-сайт самым распространенным спонтанным повреждением в клетке [33]. Несмотря на то, что механизм спонтанной потери основания одинаков для всех нуклеотидов, апуринизация протекает в ~20 раз быстрее апириминизации [34], а гуанины теряются в ~1,5 раза чаще аденинов [35]. Скорость образования АП-сайтов возрастает при понижении pH [36] и генотоксическом стрессе [35]. В клетке *E. coli* АП-сайт возникает примерно один раз за поколение (при делении раз в час при 37°C) [22]. В значительно большем геноме млекопитающих стационарное число АП-сайтов при физиологических условиях оценивается ~0,1–1 на 10⁶ нуклеотидов [35].

В клетке АП-сайты существуют в равновесии между открытой альдегидной и закрытой полуацетальной формой [37]. Вследствие своей химической природы АП-сайты крайне реакционноспособны. Альдегидные АП-сайты могут подвергаться окислению по различным положениям рибозного кольца с образованием окисленных вариантов лишенных основания повреждений, таких как 2-дезоксириболактонфосфат [38,39], 2,3-дигидрокси-4-оксобутил фосфат [40], 5'-(2-фосфорил-1,4-диоксобутан) [41,42] и других.

Кроме того, фосфодиэфирная связь при АП-сайте нестабильна и легко подвергается β-элиминированию под действием нуклеофильных агентов и/или ионов металлов с образованием одноцепочечного разрыва [43], что может привести к аресту репликативной вилки. Как альдегидные, так и окисленные АП-сайты электрофильны, и легко могут захватывать нуклеофильные молекулы в клетке, такие как белки (что приводит к образованию ДНК-белковых сшивок [44]), другие основания ДНК (что приводит к образованию сшивок нуклеиновых кислот), низкомолекулярные нуклеофильные агенты клетки (например, полиамины) или ксенобиотики. Таким образом, несмотря на распространенность АП-сайтов, они крайне цитотоксичны и мутагенны повреждения. Цитотоксичность АП-сайтов обусловлена их склонностью к образованию разрывов ДНК и формированию различных классов других блокирующих повреждений. В то время как мутагенность АП-сайтов обусловлена прежде всего отсутствием кодирующего основания: при наличии АП-сайта в матричной цепи ДНК-полимераза не может корректно подобрать комплементарный нуклеотид. Выбор включаемого нуклеотида зависит от внутренних свойств ДНК-полимеразы и условий в клетке. Эксперименты *in vitro* показали, что напротив АП-сайта ДНК-полимеразами се-

мейств А и В чаще всего включается дезоксиаденозинмонофосфат — закономерность, получившая название «Правило А» [45], однако это правило далеко не универсально, особенно в отношении эукариотических транслезионных ДНК-полимераз. Таким образом, для предотвращения этих последствий АП-сайт должен быть быстро отрепарирован (см. разд. 2.2.4) [2].

2.1.5 Повреждения ДНК, образующиеся под воздействием физических факторов

2.1.5.1 Ультрафиолетовое излучение

Ультрафиолетовое (УФ-) излучение представляет собой значимый физический фактор, повреждающий ДНК. УФ-спектр принято разделять на три области: UVC (100–280 нм), UVB (280–320 нм) и UVA (320–400 нм). UVC и большая часть UVB поглощаются озоновым слоем, тогда как UVB и UVA достигают поверхности Земли и воздействуют на живые организмы [46]. Механизмы повреждения ДНК зависят от длины волны: UVB поглощается азотистыми основаниями непосредственно (максимум поглощения ДНК ≈ 260 нм) и вызывает прямые фотохимические реакции между соседними основаниями, тогда как UVA действует преимущественно опосредованно — через возбуждение эндогенных фотосенсибилизаторов (флавинов, порфиринов) и последующую генерацию АФК, главным образом синглетного кислорода [46].

Наиболее распространёнными повреждениями, возникающими под действием УФ-излучения, являются димеры соседних пиримидиновых оснований, причем в подавляющем большинстве случаев в димеризацию будет вовлечено основание тимина. Реакционная способность тимина обусловлена двойной связью C5–C6 в кольце [47], которая легко подвергается фотоиндуцированному циклоприсоединению с аналогичной связью C5=C6 или карбонильной группой C4=O соседнего пиримидина [48,49]. В результате чего образуются два основных класса фотоповреждений — циклобутановые пиримидиновые димеры [47,50], которые представляют собой большинство фотоповреждений, и пиримидин-пиримидиновые [6–4] фотопродукты (Рисунок 5), составляющие примерно четверть от общего числа фотопродуктов [51]. Такие повреждения объёмны, искажают структуру ДНК-дуплекса, вследствие чего они затрудняют репликацию [52].

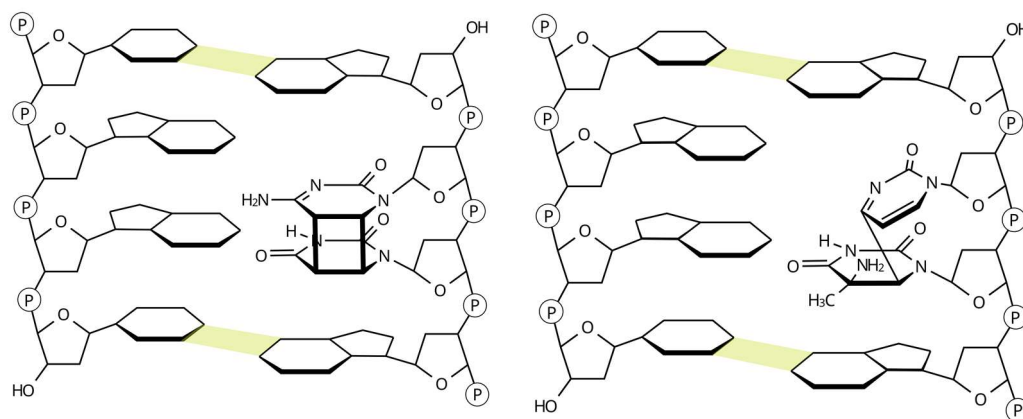


Рисунок 3. Циклобутановые пиримидиновые димеры (слева) и пиримидин-пиримидоновые [6–4] фотопродукты (справа) (по [2]).

2.1.5.2 Ионизирующее излучение

Ионизирующее излучение оказывает на ДНК одно из наиболее опасных мутагенных воздействий, поскольку повреждает молекулу двумя путями. Прямое воздействие приводит к ионизации самих азотистых оснований и остатков дезоксирибозы [53]. Опосредованное действие связано с ионизацией окружающих молекул, в первую очередь воды (радиолиз), в результате которого в клетке образуются высокореакционноспособные гидроксильные радикалы ($\bullet\text{OH}$), гидратированные электроны (e^-_{aq}) и атомарный водород ($\text{H}\bullet$), а также более стабильный пероксид водорода [12,53,54]. В клетках млекопитающих на опосредованный путь приходится около 60–70% всех вызванных излучением повреждений ДНК, где ключевой повреждающий агент — это именно $\bullet\text{OH}$ [53].

Поскольку при действии ионизирующего излучения локальная концентрация $\bullet\text{OH}$ и других АФК значительно возрастает, спектр возникающих повреждений существенно расширяется по сравнению с фоновым окислительным стрессом. В ДНК возникают как одно- (оц-), так и двухцепочечные (дц-) разрывы [54–57], окислительные модификации оснований (8-охоG, тимингликоль, формамидопиримидины ФаруG и ФаруA, 5-гидроксицитозин и др., Рисунок 3), АП-сайты, а также ковалентные сшивки ДНК–белок [53]. При дозе 1 Гр таких излучений как рентгеновские лучи, γ -излучение в клетке млекопитающего образуется ориентировочно 1000–2000 модифицированных оснований, около 1000 оц-разрывов, ~150 сшивок ДНК–белок и порядка 40 дц-разрывов [53,58].

Характерную особенность радиационного повреждения, отличающей его от повреждений эндогенной природы, представляет собой кластерность: в пределах 1–2 витков двойной спирали ДНК может возникать несколько повреждений одновременно (локально множественно повреждённые сайты) [53,58]. Такие кластерные повреждения представляют особую проблему для систем эксцизионной репарации оснований, так как одновременное

действие ДНК-гликозилаз на противоположных цепях способно превратить два близкорасположенных модифицированных основания в двухцепочечный разрыв [59,60].

2.1.6 Мисматчи

Следует также отметить, что не все ошибки, возникающие в ДНК, сводятся к химической модификации оснований. Мисматчи — это пары канонических оснований, но не относящиеся к классическим Уотсон–Криковским парам оснований (Wobble-пары, например G//T, A//C) — возникают при ошибках в работе ДНК-полимераз в ходе репликации [61,62], а также как следствие спонтанного дезаминирования 5-метилцитозина в тимин, что формирует G//T пару в составе двойной спирали [1,63]. В отсутствие своевременной репарации такие мисматчи фиксируются как точечные мутации уже в следующем раунде репликации [61].

2.2 Репарация повреждений ДНК

Как упоминалось в предыдущем разделе, повреждения ДНК разнообразны по своей природе: от малых модификаций оснований и мисматчей, практически не искажающих структуру двойной спирали, до межцепочечных сшивок и двуцепочечных разрывов, существенно нарушающих структуру ДНК и затрудняющих репликацию и транскрипцию. Для устранения всего разнообразия повреждений в клетке функционируют системы репарации, обеспечивающие поддержание целостности генома.

Ниже рассмотрены преимущественно прокариотические системы репарации на примере *E. coli*. Эукариотические механизмы в целом аналогичны и основаны на работе гомологичных белков, различаясь главным образом составом привлекаемых вспомогательных факторов и сложностью регуляции.

2.2.1 Реактивация

Наиболее простой путь исправления повреждения ДНК — прямая реактивация. В этом случае специфичный фермент непосредственно восстанавливает нативную структуру повреждённого основания без вырезания нуклеотида из цепи.

Первым обнаруженным ферментом репарации ДНК была светозависимая фотолиаза, катализирующая прямое расщепление циклобутановых пиримидиновых димеров (см разд. 2.1.5.1, Рисунок 5) обратно до двух пиримидинов [64]. Для исправления пиримидин-пиримидиновых [6–4] фотосшивок (Рисунок 3) необходима другая фотолиаза из того же семейства, действующая по аналогичному механизму [2].

Другой пример прямой реактивации — метилтрансферазы O6-AGT I и O6-AGT II, которые удаляют метильные группы с O⁶-метилгуанина и O⁴-метилтимина, перенося их на

цистеин в активном центре метилтрансферазы [65]. К ферментам прямой репарации относится также AlkB, действующий преимущественно на N¹-метиладенин и N³-метилцитозин. Используя α-кетоглутарат и Fe(II) в качестве кофакторов, AlkB окисляет метильную группу через промежуточное образование N¹-гидроксиметиладенина или N³-гидроксиметилцитозина, высвобождая нативное основание и молекулу формальдегида.

Благодаря отсутствию необходимости в разрыве ДНК, привлечении дополнительных белков и ресинтезе повреждённого участка прямая реактивация является одним из наиболее быстрых и точных путей репарации, полностью восстанавливающим исходное основание за один каталитический цикл.

2.2.2 Мисматч репарация

Мисматч-репарация — высококонсервативная система, играющая важную роль в поддержании целостности генома. Мисматч-репарация ответственна за исправление некорректно спаренных нуклеотидов в ДНК (мисматчей).

Репарация инициируется связыванием димера MutS с мисматчем в ДНК [66]. Затем димер MutL присоединяется к комплексу MutS–ДНК и гидролизует молекулу АТФ, что служит сигналом для активации MutH [67]. MutH вносит оц-разрыв в неметилованную цепь ДНК с 5'-стороны ближайшей последовательности GATC (причём эта последовательность может располагаться с любой стороны от мисматча) [68]. MutL также стимулирует геликазу II [69], которая за счёт гидролиза АТФ расплетает ДНК, формируя одноцепочечный участок. Этот шаг необходим, поскольку последующие экзонуклеазы обладают высокой специфичностью именно к одноцепочечной ДНК [70]. В зависимости от расположения разреза относительно мисматча привлекаются разные экзонуклеазы: с 3'→5'-активностью — ExoI [71] или ExoX [72], с 5'→3'-активностью — ExoVII или RecJ [71]. После удаления повреждённого участка холофермент ДНК-полимераза III достраивает цепь на образовавшемся одноцепочечном участке, а NAD⁺-зависимая ДНК-лигаза LigA устраняет оставшийся одноцепочечный разрыв [73,74].

2.2.3 Эксцизионная репарация нуклеотидов

Наряду с фотореактивацией, фотоповреждения могут репарироваться и без участия света, по пути эксцизионной репарации нуклеотидов (ЭРН) [75,76]. В клетках эукариот путь фотореактивации отсутствует, и именно ЭРН представляет собой основную систему репарации фотоповреждений. Однако ЭРН устраняет значительно более широкий спектр повреждений, сильно искажающих структуру ДНК. Помимо циклобутановых пиримидиновых

димеров и [6-4]-фотопродуктов (Рисунок 5), к субстратам ЭРН относятся АП-сайты, разнообразные объёмные аддукты: полициклические аддукты с ароматическими углеводородами (например, BPDE-N²-dG, образующийся при метаболической активации бензпирена), аддукты препаратов платины (внутрицепочечные сшивки Pt-d(GpG) и Pt-d(ApG) от цисплатина), псораленовые моно- и диаддукты, межцепочечные сшивки (как от бифункциональных алкилирующих агентов типа иприта, так и индуцированные продуктами перекисного окисления липидов), ДНК-белковые сшивки и даже участки тройных спиралей [77,78]. Общая черта всех субстратов ЭРН — это не конкретная химическая природа повреждения, а выраженное искажение геометрии двойной спирали, которое и распознаётся комплексом белков ЭРН [78].

ЭРН инициируется димеризацией белка UvrA, сопряжённой с гидролизом АТФ [79]. Димер (UvrA)₂ специфически связывается с повреждённой ДНК, узнавая широкий спектр искажений её структуры [80,81]. Связывание (UvrA)₂ с АТФ повышает его специфичность к повреждённой ДНК примерно в 4 раза, а при дополнительном взаимодействии с UvrB константа ассоциации возрастает суммарно в ~20 раз (для псораленового аддукта — от $K_a = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ до $\sim 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) [82].

Сегодня принято считать основной функцией (UvrA)₂ доставку белка UvrB к повреждениям, нарушающим спиральную укладку дДНК: после формирования стабильного комплекса UvrB–ДНК (UvrA)₂ диссоциирует, и футпринт на ДНК сокращается с ~33 до ~19 пар оснований [83]. Примечательно, что все конформационные перестройки при образовании комплексов (UvrA)₂, (UvrA)₂·UvrB, (UvrA)₂·UvrB–ДНК и UvrB–ДНК требуют гидролиза АТФ. Поиск повреждения происходит при движении комплекса (UvrA)₂·UvrB вдоль ДНК; при обнаружении объёмного повреждения ДНК дополнительно раскручивается и изгибается за счёт гидролиза АТФ, после чего β-шпилька UvrB вклинивается между цепями ДНК, что стабилизирует комплекс UvrB–ДНК и выворачивает повреждённое основание из спирали [84]; (UvrA)₂ при этом диссоциирует с затратой АТФ [85]. К сформированному комплексу UvrB–ДНК привлекается эндонуклеаза UvrC, которая вносит одноцепочечный разрыв с 3'-стороны, примерно на расстоянии в 5 нуклеотидов от повреждения, а затем второй разрыв с 5'-стороны, примерно на расстоянии в 8 нуклеотидов от повреждения [85].

Далее ДНК-геликаза II (UvrD) помогает высвободить UvrC и повреждённую цепь ДНК, оставляя UvrB на участке с брешью. После этого ДНК-полимераза I (PolI) связывается с ДНК со стороны свободного 3'-конца, вытесняя UvrB в ходе синтеза недостающего фрагмента ДНК [86]. Оставшийся одноцепочечный разрыв зашивает NAD⁺-зависимая ДНК-лигаза LigA [74].

2.2.4 Эксцизионная репарация оснований

В отличие от объёмных, сильно искажающих структуру ДНК повреждений, репарируемых по пути ЭРН, значительная часть возникающих в ДНК повреждений представляет собой точечные модификации оснований — продукты дезаминирования, окисления и алкилирования (см. разд. 2.1), которые слабо искажают геометрию двойной спирали и, зачастую, по форме близки к каноническим основаниям. Тем не менее, именно такие повреждения составляют подавляющее большинство всех возникающих в геноме модификаций и, в отсутствие репарации, способны приводить к мутациям и клеточной гибели. За их распознавание и удаление ответственна система эксцизионной репарации оснований (ЭРО), которая, подобно другим описанным выше системам репарации, представляет собой многоступенчатый мультиферментный процесс с последовательной сменой ферментов на субстрате.

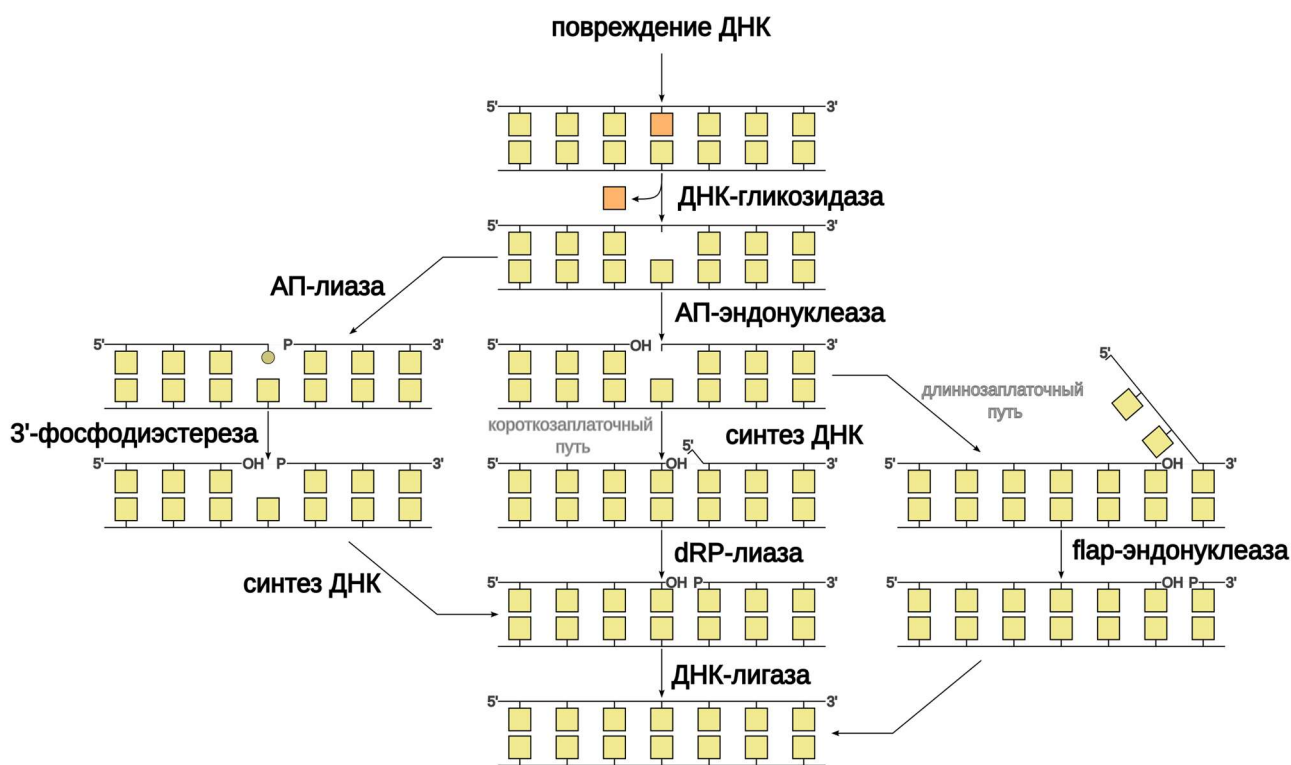


Рисунок 4. Общая схема эксцизионной репарации оснований.

Первый этап ЭРО (Рисунок 6) — действие ДНК-гликозилаз, которые узнают повреждённое основание в ДНК и гидролизуют *N*-гликозидную связь между ним и сахарофосфатным остовом, удаляя повреждённое основание, но оставляя сахарофосфатный остов интактным. Поскольку модификации оснований ДНК разнообразны по своей химической природе (см. раздел 2.1) в клетке существует целый набор ДНК-гликозилаз, специфичных к определённым типам повреждений (см. раздел «ДНК-гликозилазы»).

В зависимости от того, является ли ДНК-гликозилаза моно- или бифункциональной, в результате её действия в ДНК образуется либо апурин-/апиримидиновый (АП-) сайт, либо

однонуклеотидная брешь, ограниченная фосфатами. В первом случае — после работы монофункциональной ДНК-гликозилазы — к АП-сайту привлекаются АП-эндонуклеазы (Xth/ExoIII или Nfo/EndoIV у *E. coli*) [2,87], которые вносят разрыв с 5'-стороны АП-сайта; при этом на 3'-конце разрыва остаётся свободная ОН-группа, а на 5'-конце — остаток 2'-дезоксирибозо-5'-фосфата (dRP) [88]. Во втором случае — после действия бифункциональной ДНК-гликозилазы, обладающей сопутствующей АП-лиазной активностью, — на 3'-конце образующегося разрыва оказывается не ОН-группа, а блокирующий фосфат (в случае только реакции β -элиминирования — α,β -ненасыщенный альдегид, в случае реакций β,δ -элиминирования — фосфат). Такой 3'-блок также удаляется ферментом Xth/ExoIII, обладающим 3'-фосфатазной и 3'-фосфодиэстеразной активностями, что высвобождает 3'-ОН-группу, необходимую для последующей работы ДНК-полимеразы [88].

Свободная 3'-ОН-группа служит точкой старта для ДНК-полимеразы I (PolI), которая достраивает образовавшуюся брешь [89]. Здесь возможны два альтернативных пути дальнейших событий. При короткозаплаточном пути ЭРО dRP-лиазная активность белков RecJ или Frg удаляет единственный блокирующий остаток dRP, и ДНК-полимераза I встраивает один нуклеотид. При длиннозаплаточном пути ЭРО PolI вытесняет цепь с 5'-стороны от разрыва, синтезируя участок длиной 2–20 нуклеотидов и формируя одноцепочечный свисающий конец (flap), который затем удаляется 5'→3'-экзонуклеазной активностью той же PolI. В обоих случаях финальным этапом является лигирование оставшегося одноцепочечного разрыва NAD⁺-зависимой ДНК-лигазой LigA [11].

2.3 ДНК-гликозилазы

2.3.1 Общий механизм поиска повреждения

Узнавание повреждения ДНК-гликозилазой — многостадийный процесс, селективность которого нарастает на каждом последующем шаге [90,91]. Несмотря на существенные структурные и эволюционные различия между суперсемействами ДНК-гликозилаз (см. разд. 2.3.3), общая последовательность этих шагов консервативна. Известны редкие исключения, при которых отдельные элементы схемы существенно модифицированы (например, AlkC и AlkD из *Bacillus cereus*, репарирующие алкилированные основания без их выворачивания из спирали [92]), но они не получили широкого эволюционного распространения.

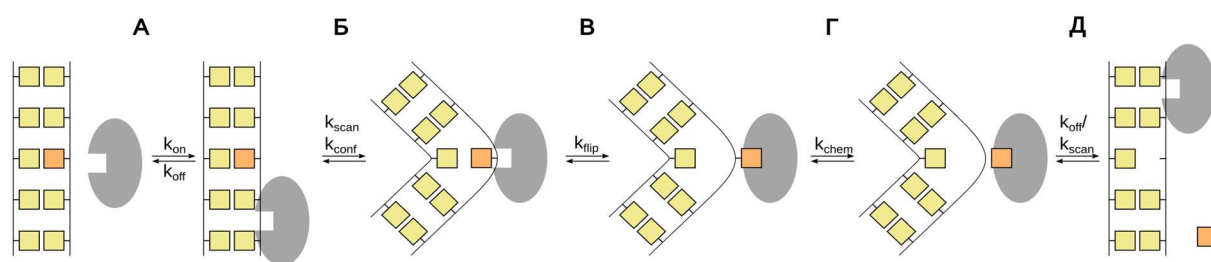


Рисунок 5. Упрощенная схема поиска и удаления поврежденного основания ДНК-гликозилазой.

В общем, механизм поиска поврежденного основания ДНК-гликозилазой можно разбить на последовательные шаги.

Шаг 1 — неспецифическое связывание с ДНК и поиск повреждения. Подобно многим другим ДНК-связывающим белкам, ДНК-гликозилазы взаимодействуют неспецифично с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом за счёт положительно заряженной ДНК-связывающей поверхности и способны скользить вдоль двойной спирали [93,94] (Рисунок 7А). Прямые наблюдения отдельных молекул методом флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения (TIRFM) показали, что в отсутствие повреждения ДНК-гликозилазы (Fpg, Nei и Nth *E. coli*) преимущественно перемещаются между молекулами субстрата посредством трёхмерной диффузии, тогда как после обнаружения и удаления повреждения около трети ферментов остаётся на ДНК и продолжает одномерный поиск следующего сайта [95].

Локальные конформационные особенности повреждённого участка ДНК служат структурным сигналом, повышающим сродство фермента к повреждённому сайту на ранних стадиях поиска. Так, повреждение ДНК может дестабилизировать спаривание оснований или вызвать другие локальные изменения в структуре ДНК дуплекса. Несмотря на то, что субстраты ЭРО представляют собой небольшие повреждения, не сильно искажающие структуру ДНК (в отличие, например, от субстратов ЭРН), структура ДНК в месте наличия поврежденного основания может все же отличаться от интактной из-за нарушения образования Уотсон-Криковских пар. Атипичные взаимодействия положительно заряженных аминокислотных остатков активного центра фермента при скольжении вдоль сахарофосфатного остова ДНК в месте повреждения служат достаточной причиной для первичного отбора повреждений относительно гигантского избытка неповрежденных оснований ДНК. Это увеличивает сродство ДНК-гликозилазы к субстрату. Так, дестабилизирующее действие поврежденного основания было проиллюстрировано в структуре ДНК, содержащей 8-охоG: несмотря на формирование Уотсон-Криковской пары C//8-охоG, температура плавления

ления олигомерных ДНК дуплексов падала на $\sim 7\text{--}15^\circ\text{C}$ относительно неповрежденного субстрата [96]. Кроме того, с помощью анализа химических сдвигов ^{31}P ЯМР в растворе была зарегистрирована отличная конформация фосфата с 3'-стороны от окисленного нуклеотида (Рисунок 8) в олигомерной ДНК [97]. Более того, регистрация скорости обмена имино-протонов с растворителем методом CLEANEX-PM ЯМР показала, что пара 8-охоG//C даже устойчивее нативной G//C во внутриспиральном положении (константа равновесия внеспиральной формы в 1,1–2,5 раз ниже), тогда как Хугстиновская пара *син*-8-охоG//A, напротив, демонстрирует на 3–4 порядка бóльшую склонность к выворачиванию 8-охоG из спирали [98].

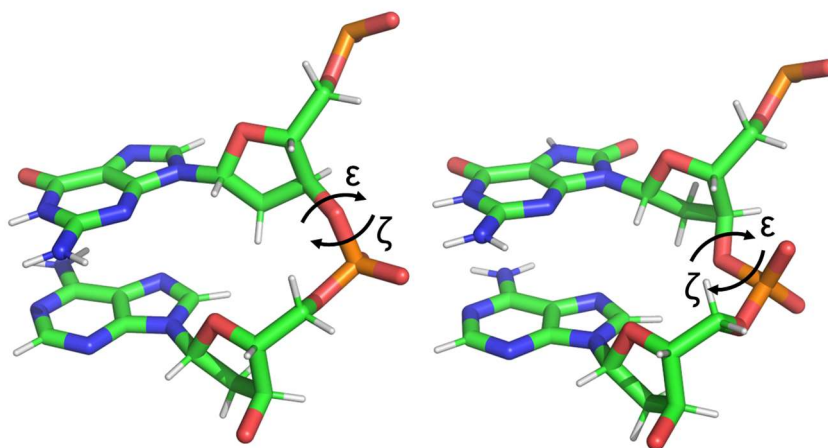


Рисунок 8. Конформационная лабильность сахаро-фосфатного остова при наличии 8-охоG в ДНК (PDB ID:5L06 и 6ALU, по [97]).

6ALU Аналогичная конформационная лабильность характерна и для другого распространенного субстрата ДНК-гликозилаз — тимингликоля (Tg). В отличие от ароматических канонических оснований, Tg представляет собой насыщенный гидратированный продукт с двумя хиральными центрами (C5 и C6), что лишает его замкнутой π -системы и нарушает плоскую геометрию пиримидинового кольца (Рисунок 9). Как следствие, Tg практически не способен участвовать в стэкинге с соседними основаниями: температура плавления додекамерного дцОДН, содержащего Tg, оказывается на 13°C ниже по сравнению с неповрежденным аналогом [99]. Двумерная ЯМР-спектроскопия показала, что в паре Tg//A в контексте 5'-ATgA-3' тимингликоль находится преимущественно во внеспиральном положении [100], а в контексте 5'-GTgC-3' поврежденный участок заметно разупорядочен [101]. Таким образом, уже в отсутствие фермента, Tg демонстрирует выраженную тенденцию к внеспиральному состоянию — свойство, которое, как и в случае 8-охоG, может использоваться ДНК-гликозилазами для эффективного узнавания повреждения на фоне избытка интактной ДНК.

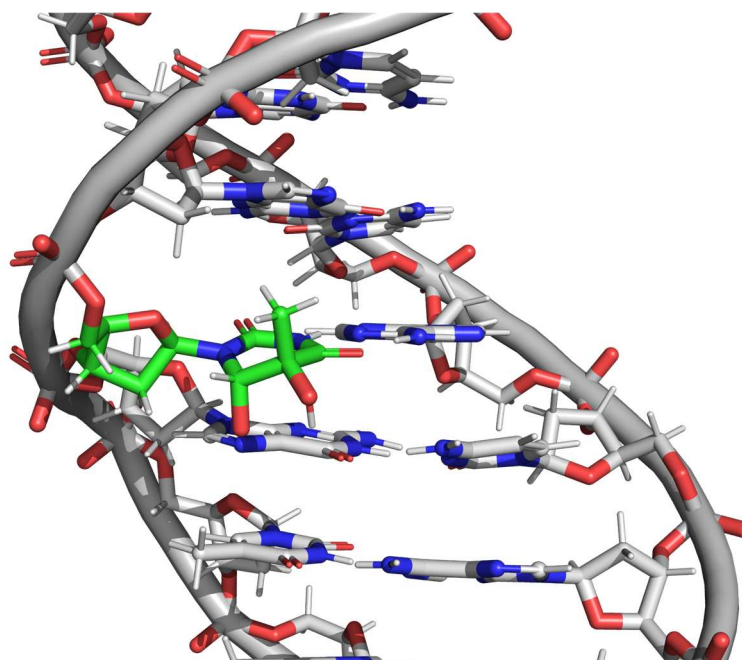


Рисунок 9. Нарушение стекинга внутри дцДНК из-за неплоского строения Tg (PDB ID: 2KH5, по [100]).

Шаг 2 — переход в промежуточный комплекс с изгибом ДНК. При обнаружении потенциального субстрата фермент образует более прочный комплекс с ДНК, сопровождающийся изгибом двойной спирали в месте повреждения на $45\text{--}90^\circ$ (в зависимости от конкретной гликозилазы) и дополнительной локальной дестабилизацией дуплекса (Рисунок 7Б) [11]. Такое искажение облегчает последующее выворачивание повреждённого нуклеотида из спирали. Вероятность успешного перехода на этот этап тем выше, чем легче повреждённый участок подвергается деформации; таким образом, внутренняя конформационная нестабильность ДНК, обусловленная наличием повреждённого основания, напрямую способствует его узнаванию [90,102].

Шаг 3 — выворачивание повреждённого нуклеотида в активный центр. На заключительном этапе узнавания повреждённый нуклеотид выворачивается из спирали в специализированный субстрат-связывающий карман фермента, где стабилизируется множественными контактами с фосфатными группами остова и боковыми группами аминокислот активного центра. Образующаяся в ДНК полость заполняется одним или несколькими аминокислотными остатками фермента, интеркалирующими в место выворачивания, что препятствует обратному встраиванию основания и дополнительно стабилизирует изогнутую конформацию [103]. Выворачивание необходимо по стерическим соображениям: атом C1', по которому происходит нуклеофильная атака при гидролизе *N*-гликозидной связи, в нативной В-форме ДНК недоступен для каталитических групп фермента (Рисунок 7Г). Сам каталитический акт — гидролиз *N*-гликозидной связи и, для бифункциональных ферментов, последующее β - или β,δ -элиминирование сахарофосфатного остова — рассмотрен в разделе «Общий механизм катализа удаления повреждённого основания» (Рисунок 7Д).

2.3.2 Общий механизм катализа удаления поврежденного основания

По типу нуклеофила, атакующего C1' дезоксирибозы, и, как следствие, по типу образующегося в ДНК продукта (см. разд. 2.2.4) ДНК-гликозилазы делятся на моно- и бифункциональные. У монофункциональных ферментов нуклеофилом служит молекула воды, активированная боковым радикалом аспартата или глутамата активного центра; гидролиз *N*-гликозидной связи приводит к высвобождению повреждённого основания и образованию АП-сайта. У бифункциональных ферментов нуклеофилом выступает атом азота — ϵ -аминогруппа лизина (например, Lys249 у hOGG1) или α -аминогруппа *N*-концевого остатка (Pro1 у Fpg и Nei *E. coli*); образующееся основание Шиффа далее таутомеризуется в енамин и инициирует расщепление сахарофосфатного остова по механизму β - или β,δ -элиминирования, что и составляет АП-лиазную активность бифункциональных ферментов. Чем выше нуклеофильность атакующего атома азота, тем глубже протекает элиминирование (Рисунок 10) [104].

Независимо от природы нуклеофила, общий механизм гидролиза *N*-гликозидной связи для ДНК-гликозилаз всех суперсемейств описывается как диссоциативный (S_N1 -подобный) с выраженным оксокарбениевым характером переходного состояния: связь C1'–N разрывается раньше образования связи с нуклеофилом, а на C1' развивается частичный положительный заряд, стабилизируемый через кислород O4' сахара. Ключевую роль в катализе играет активация уходящей группы — протонирование повреждённого основания или электростатическая стабилизация его уходящей формы — что существенно ускоряет реакцию по сравнению с неферментативным гидролизом [104,105].

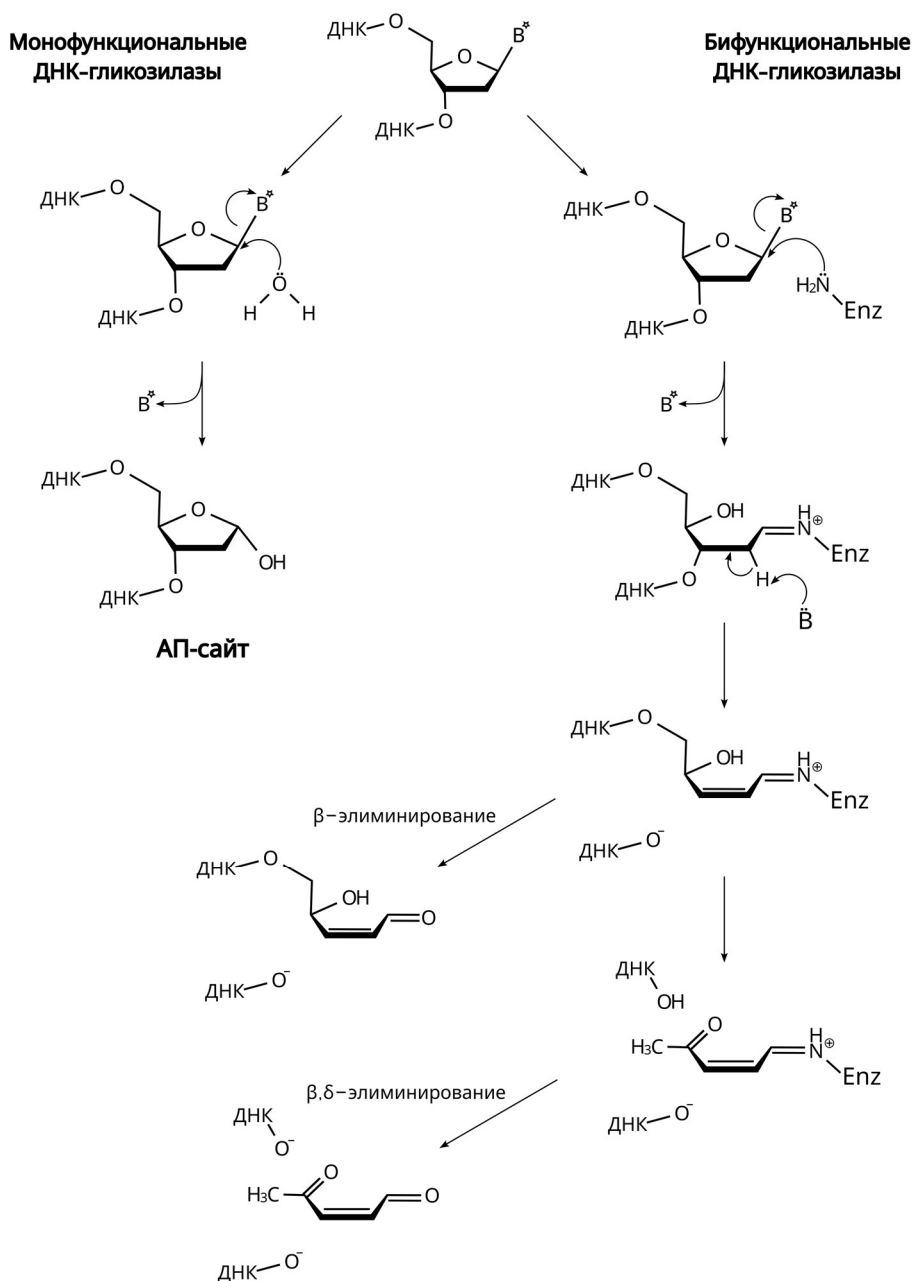


Рисунок 6. Общий механизм удаления поврежденного основания ДНК-гликозилазами (по [104]).

2.3.3 Разнообразие ДНК-гликозилаз

Сегодня ДНК-гликозилазы разделены на несколько суперсемейств на основании структурных особенностей. Кроме того, ДНК-гликозилазы отличаются по спектру удаляемых ими повреждений: некоторые (как например Fpg или Nei, Таблица 1) обладают широкой субстратной специфичностью, а есть и такие, которые способны узнавать и выщеплять лишь одно конкретное повреждение (например Ung, см. разд. 2.3.3.2, Таблица 1, Таблица 2).

В таблице 1 приведены основные суперсемейства ДНК-гликозилаз: α/β укладка, спираль-шпилька-спираль (Helix-hairpin-Helix, HhH) и спираль-2 поворота-спираль (Helix-

two turns–Helix, H2tH), а также HEAT-like repeat и спираль-поворот-спираль (Helix–turn–Helix). Далее будут рассмотрены основные особенности каждого суперсемейства.

Таблица 1. Наиболее изученные представители различных суперсемейств ДНК-гликозилаз в клетках *E. coli* и у человека.

<i>E. coli</i>	Человек	Субстратная специфичность	Суперсемейство
Ung	UNG	U из любого ДНК-контекста	α/β
Nth	NTHL1	Окисленные пиримидины	HhH
–	OGG1	Окисленные пурины	HhH
MutY	MUTYH	A или 2-OH-A напротив G или 8-охоG;	HhH
Tag	–	Алкилированные по кольцу пурины	HhH
AlkA	–	Алкилированные по кольцу пурины, гипоксантин	HhH
Fpg	–	Окисленные пурины	H2tH
Nei	–	Окисленные пиримидины	H2tH
–	NEIL1 NEIL2 NEIL3	Окисленные пурины и пиримидины	H2tH
YcaQ	–	Межцепочечные сшивки	HtH_42
AlkD (<i>B. cereus</i>)	–	N ³ -meA, N ⁷ -meG, аддукты ДНК и циклопропилпирролоиндолов	HEAT-like repeat

2.3.3.1 ДНК-гликозилазы, которые не выворачивают основание

В начале XXI века были охарактеризованы 2 новых суперсемейства, включающие монофункциональные ДНК-гликозилазы, которые не выворачивают поврежденное основание, в отличие от ферментов других суперсемейств (см разд. 2.3.2) [92,106].

2.3.3.1.1 Суперсемейство HEAT-like repeat

Первым из новых было изучено и охарактеризовано суперсемейство HEAT-like repeat (HLR). Акроним HEAT обозначает четыре белка, в которых этот мотив был впервые описан: huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A и TOR [106]. Суперсемейство HLR было охарактеризовано путем получения кристаллической структуры фермента AlkD, который включал лишь HEAT-подобные повторы — пара антипараллельных α -спиралей, соединенных петлями переменной длины. Сам по себе фермент образует правостороннюю суперспираль — соленоид с отчетливой вогнутой и выпуклой поверхностями, при том вогнутая поверхность необходима для связывания с дцДНК [106]. Интересно, что субстраты

для AlkD это 3-метиладенин (N^3 -meA) и 7-метилгуанин (N^7 -meG) [107], а также фермент удаляет значительно более объёмные аддукты природных генотоксинов из класса циклопропилпирролоиндолов: ятакемицин, дуокармицин и CC-1065 [108,109]. Гомологичный AlkD фермент AlkC избирательно удаляет N^3 -алкилпурины (N^3 -meA, N^3 -meG), тогда как активность на N^7 -meG пренебрежимо мала [110,111]. Что еще более удивительно, AlkD практически не изгибает ДНК для осуществления катализа [112,113], а вот AlkC напротив изгибает ДНК на $\sim 60^\circ$ без последующего выворачивания поврежденного основания [111].

2.3.3.1.2 Суперсеме́йство НТН_42

Суперсеме́йство НТН_42 или AlkZ-like включает ДНК-гликозилазы, которые состоят из трёх tandemных мотивов «крылатая спираль–поворот–спираль» (winged helix-turn-helix, wHtH — α/β -мотивы с характерными «крыльями» из β -шпилек), образующих положительно заряженную вогнутую поверхность, геометрически комплементарную дуплексной ДНК [92]. Суперсеме́йство НТН_42 включает 2 подсемейства: AZL (AlkZ-like) объединяет белки, ассоциированные с кластерами генов биосинтеза (КГБ) природных генотоксинов; каждый представитель AZL специфичен к аддуктам антибиотика, синтезируемого организмом-хозяином, и обеспечивает самозащиту, например AlkZ (*Streptomyces sahachiroi*) — репарирует межцепочечные сшивки ДНК, образованные азиномицином [92]; подсемейство YsaQ-like охватывает белки, не ассоциированные с КГБ, первый охарактеризованный член подсемейства, расщепляющий межцепочечные сшивки, образованные например азотистыми ипритами [114].

2.3.3.2 Суперсеме́йство α/β -укладка (урацил-ДНК-гликозилазы)

Удаление урацила (см разд 2.1.2) из ДНК осуществляет целое суперсеме́йство (состоящее из 6 семейств, Таблица 2) ДНК-гликозилаз — урацил-ДНК-гликозилаз (или суперсеме́йство α/β -укладка), обладающих схожей субстратной специфичностью и схожим строением. И хотя гомология аминокислотных последовательностей представителей различных семейств урацил-ДНК-гликозилаз не велика, тем не менее последовательности аминокислот, формирующие активный центр, остаются довольно консервативными [115].

Таблица 2. Представители семейств из суперсеме́йства ДНК-гликозилаз α/β -укладка.

Семейство	Представители	Субстраты
Семейство 1 (UNG)	UNG1/UNG2 (человек), Ung (<i>E. coli</i>)	U в оц/дцДНК
Семейство 2 (MUG/TDG)	TDG (человек), MUG (<i>E. coli</i>)	U//G, T//G, 5fC
Семейство 3 (SMUG1)	SMUG1 (позвоночные)	U, 5-hmU, 5fU
Семейство 4	UDGa (термофилы), UdgX (<i>M. smegmatis</i>)	U в дцДНК
Семейство 5 (UDGb)	UDGb (термофилы)	U, гипоксантин, ксантин
Семейство 6 (HDG)	HDG <i>M. acetivorans</i>	гипоксантин

Наиболее изученный представитель данного суперсемейства — UNG из семейства 1 (урацил-ДНК-гликозилазы человека и *E. coli* практически идентичны как по аминокислотному составу, так и по общей укладке, за исключением неупорядоченных элементов на N-конце человеческих ферментов, ответственных за локализацию в клетке) [115]. UNG — монофункциональная ДНК-гликозилаза, которая представляет собой однодоменный белок с массой 25 кДа, состоящий из β -листа из 4-х параллельных тяжей, окруженного как минимум 2-мя α -спиралями [115]. Эти структурные особенности и послужили сигнатурой для суперсемейства. В отличие от ДНК-гликозилаз других суперсемейств, UNG проявляет активность не только на дцДНК, но и на оцДНК. Интересно, что полученные структуры фермента в апоформе и с лигандом (ДНК) практически не отличаются (PDB ID: 1AKZ, 1SSP, RMSD = 1,251), тем не менее, изменение положения мотивов все же происходит: формируется более компактный активный центр [116]. При этом, как только повреждение найдено, фермент изгибает ДНК всего на $\sim 20^\circ$, после чего Leu272 выталкивает урацил из спирали, заполняя возникающую брешь (см. разд. 2.3.2). В активном центре находится урацил-связывающий карман, окружение в котором позволяет узнавать урацил относительно остальных пиримидинов посредством стерических ограничений и специфической сети водородных связей. Далее остаток Asp145 активирует молекулу воды, которая нуклеофильно атакует C1', замещая при этом поврежденное основание, что приводит к гидролизу N-гликозидной связи. Примечательно, что в структуре UDG с ДНК [PDB ID 1SSP] удаленный урацил остался внутри урацил-связывающего кармана [116].

2.3.3.3 Суперсемейство спираль–шпилька–спираль или Nth

ДНК-гликозилазы суперсемейства спираль–шпилька–спираль (Helix–hairpin–Helix, HhH) обладают уникальной способностью узнавать и удалять структурно разнородные модифицированные азотистые основания [117]. Типичная архитектура ферментов суперсемейства HhH включает два домена. N-концевой домен содержит шестиспиральную бочку, в составе которой расположен мотив HhH-GPD, обеспечивающий контакт с ДНК посредством взаимодействия с фосфатным остовом. С-концевой домен несёт кластер [4Fe-4S] (исключение составляет фермент OGG1, у которого кластер [4Fe-4S] отсутствует [118]), координированный четырьмя консервативными остатками цистеина, и формирует часть ДНК-связывающей бороздки. Между доменами располагается каталитический сайт. Такая дву-доменная организация, при которой ДНК «зажимается» между доменами, а повреждённое основание выворачивается из двойной спирали в активный центр фермента, является общей чертой всего суперсемейства. Мотив HhH-GPD структурного суперсемейства представляет собой две α -спирали, соединённые шпилькой, за которыми следует глицин-пролиновая

петля и каталитически необходимый остаток аспаргиновой кислоты, который либо напрямую активирует каталитический нуклеофил (молекулу воды), либо стабилизирует переходное состояние [119].

К суперсемейству Nth относятся несколько семейств ДНК-гликозилаз: Nth (эндо-нуклеаза III), OGG1 (8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза человека), MutY/MUTYH (аденин-ДНК-гликозилаза), AlkA (3-метиладенин-ДНК-гликозилаза II), MBD4, а также недавно описанные ферменты, такие как TAG — 3-метиладенин-ДНК-гликозилаза I, принадлежность которой к суперсемейству была установлена лишь после определения её трёхмерной структуры [120] (Таблица 3).

Таблица 3. Наиболее изученные представители суперсемейства ДНК-гликозилаз Nth.

<i>E. coli</i>	Человек	Субстраты
Nth (EndoIII)	NTHL1	Окисленные пиримидины: Tg//A, ohC//G, ohU//G, h ₂ U//A, h ₂ T//A
MutY	MUTYH	A//8-охоG (основной), A//G (слабо)
AlkA	—	N ³ -meA, N ³ -meG, N ⁷ -meG, O ² -meC, O ² -meT
TAG	—	N ³ -meA
—	OGG1	8-охоG//C, FapyG//C, 8-охоA//C
—	MBD4	T//G и U//G в CpG-сайтах (продукты дезаминирования N ⁵ -meC и C)

Все представители суперсемейства Nth — бифункциональные ДНК-гликозилазы, то есть обладающие еще и АП-лиазной активностью (см разд. 2.3.2, Рисунок 7):

Несмотря на общую архитектуру и каталитический механизм (удаление поврежденного основания → образование основания Шиффа → β-элиминирование), ферменты Nth-суперсемейства распознают принципиально различные субстраты (Таблица 3). Структурная основа этого разнообразия заключается в строении «кармана» для повреждённого основания и наличии дополнительных доменов/мотивов.

2.3.3.4 Суперсемейство спираль–два поворота–спираль или Fpg/Nei

Суперсемейство спираль–два поворота–спираль (Helix–two turn–Helix, H2tH) объединяет бифункциональные ДНК-гликозилазы, распространённые среди бактерий и некоторых эукариот. Принадлежность к суперсемейству определяется консервативной трёхмерной укладкой, общим механизмом катализа и характерным набором структурных мотивов — прежде всего мотивом «спираль–два поворота–спираль» в С-концевом домене, представляющим собой пару α-спиралей, разделённых петлёй из двух последовательных поворотов [121,122]. К суперсемейству относятся бактериальные ферменты: Fpg (формаидопирими-

дин-ДНК-гликозилаза, также известная как MutM по названию гена *mutM*) и Nei (эндонуклеаза VIII, EndoVIII), а также эукариотические NEIL1, NEIL2 и NEIL3, которые отличаются спектром узнаваемых оснований, но сохраняют общую архитектуру с H2tH-мотивом (Таблица 4) [123].

Прототипическим представителем суперсемейства служит формамидопиримидин-ДНК-гликозилаза *Escherichia coli* (EcoFpg, UniProt P05523), продукт гена *mutM*, состоящий из 269 аминокислотных остатков [124]. Субстраты EcoFpg — прежде всего 8-охоG, а также FapyG и FapyA: продукты раскрытия имидазольного кольца пурина при окислительном стрессе (см. разд. 2.1.1, Рисунок 3, Таблица 4) [125]. Второй хорошо охарактеризованный бактериальный фермент — эндонуклеаза VIII *E. coli* (EcoNei, UniProt P50465, 263 аминокислотных остатка (а. о.), ген *nei*). Её мишени: окисленные пиримидины: тимингликоль (Tg), 5,6-дигидроурацил (h2U), 5-гидроксиурацил (ohU), 5-гидроксицитозин (ohC), а кроме того спироимидогидантоины (Sp, Gh) — продукты последующего окисления 8-охоG (Таблица 4) [126]. Среди других бактериальных гомологов структурно охарактеризованы: BstFpg из *Bacillus stearothermophilus* (UniProt P84131, 274 а. о.); LlaFpg из *Lactococcus lactis* (UniProt P42371, 273 а. о.); TthFpg из *Thermus thermophilus* (UniProt O50606, 267 а. о.).

Таблица 4. Субстратная специфичность ферментов суперсемейства H2tH.

<i>E. coli</i>	Человек	Основные субстраты (и структурные предпочтения)
EcoFpg	Нет прямого гомолога (функциональную роль выполняет OGG1)	8-охоG, FapyG, FapyA [127]
EcoNei	Эволюционный предшественник белков NEIL	Tg, h2U, ohU, ohC, Sp, Gh [126,128]
—	NEIL1	Tg, h2U, ohU, ohC, FapyG, FapyA, Sp, Gh (Широкий профиль; предпочитает bubble-ДНК, оцДНК) [129,130]
—	NEIL2	ohU, ohC, h2U (Более узкий профиль; строго предпочитает участки bubble-ДНК) [131]
—	NEIL3	Sp, Gh (Специфичен к продуктам сильного окисления; предпочитает оцДНК, fork-структуры и G-квадруплексы) [132,133]

Все ферменты суперсемейства имеют общую двудоменную архитектуру (Рисунок 11): N-концевой домен — β -сэндвич с каталитически важными остатками активного центра; C-концевой домен содержит мотив H2tH и мотив цинкового пальца (см. подразд.

«ММотив спираль–2 поворота–спираль» и «Мотив цинкового пальца»). Кристаллические структуры представителей суперсемейства приведены в таблице 5.

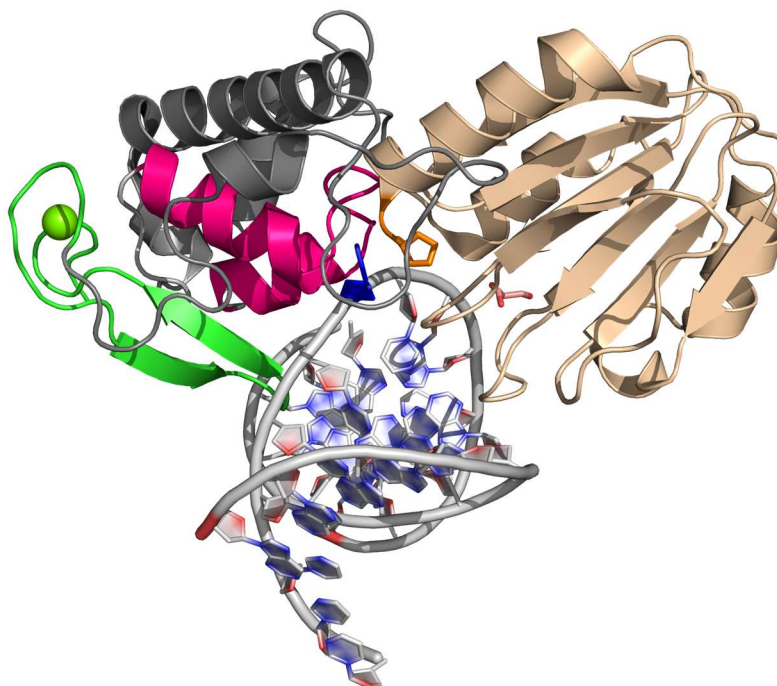


Рисунок 11. Кристаллическая структура LlaFpg в комплексе с дцДНК, содержащей нерасщепляемый карбоциклический аналог FapyG (PDB ID: 1XC8). Оранжевым обозначена каталитическая диада остатков Pro–Glu; бежевым обозначен N-концевой домен; розовым обозначены остатки, формирующие мотив спираль–2 поворота–спираль; серым обозначены остатки, формирующие петлю, координирующую повреждение; зелёным обозначены остатки, формирующие мотив цинкового пальца; синим обозначено вывернутое поврежденное основание ДНК.

Таблица 5. Полученные структуры кристаллических комплексов ДНК-гликозилаз суперсемейства H2tH в апо-форме и в комплексе с ДНК.

Фермент	Организм	Форма	Общее количество структур	Диапазон разрешений (Å)
Fpg	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Комплекс с ДНК	42	1,60 – 2,60
Fpg	<i>Escherichia coli</i>	Комплекс с ДНК	1	2,10
Nei	<i>Escherichia coli</i>	Апо-форма	3	2,05 – 2,80
Nei	<i>Escherichia coli</i>	Комплекс с ДНК	6	1,25 – 2,60
Fpg	<i>Lactococcus lactis</i>	Комплекс с ДНК	22	1,65 – 2,55
Fpg	<i>Thermus thermophilus</i>	Апо-форма	1	1,90
NEIL1	<i>Homo sapiens</i>	Апо-форма	3	1,48 – 2,60
NEIL1	<i>Homo sapiens</i>	Комплекс с ДНК	23	2,30 – 2,91
NEIL3	<i>Homo sapiens</i>	Апо-форма	3	2,21 – 2,60
NEIL3	<i>Mus musculus</i>	Апо-форма	2	2,00
NEIL3	<i>Mus musculus</i>	Комплекс с ДНК	2	2,00 – 2,28

2.3.3.4.1 Структурные мотивы

Для детального понимания механизма взаимодействия ДНК-гликозилаз H2tH с субстратами будет рассмотрена структурная организация ферментов этого суперсемейства.

Fpg Tth	1	PELPEVETTRRRRLRPLVLGQTLRQVVRDPARYR-----NTALAEGRRILEVDRRGK	52
Fpg Eco	1	PELPEVETSRRGIEPHLVGATILHAVVRN---GRLRWPVSEEIY-RLSDQPVLSVQRRAK	56
Fpg Bst	1	PELPEVETIRRTLPLIVGKTIEDVRIFWPNIIRHPRD-SEAFARMIGQTVRGLERRGK	59
Fpg Lla	1	PELPEVETVRRELEKRIVGQKIISIEATYPRM--VLTG-FEQLKKELTGKTIQGISRRGK	57
Nei Eco	1	PEGPEIRRAADNLEAAIKGKPLTDVWF-AFP-----Q-LKPYQSQLIGQHVTHVETRGK	52
Fpg Tth	53	FLLFALEGGVELVAHLGNTGGFRL-----EPTPH-TRAALVLEG-RTLYFHDPRRFGR	103
Fpg Eco	57	YLLLE-LPEGWIIHHLGMSGSLRILP--EELPPEK-HDHVDLVMSNGKVLRYTDPRRFGA	112
Fpg Bst	60	FLKFL-LDRDALISHLRMEGRYAVASAL--EPLEPHT-HVVFCTDGSSELRYRDVRKEGT	115
Fpg Lla	58	YLIFEIGDDFRLISHLRMEGKYRLAT-L-DAPREKHDH-LTMKF-ADGQLIYADVRRKEGT	113
Nei Eco	53	ALLTHFSNDLTLYSHNQLYGVWRVVDTG-EEPQTTRVLRVKLQT-ADKTILLYS---ASD	107
Fpg Tth	104	LFGVRRGDYREIPLLLRLGPEPLSE-AFAFPGFFRGLK---ESARPLKALLLDQRLAAG	158
Fpg Eco	113	WLWT-KE-LEGHNVLTHLGPEPLSD-DFNGEYLHQK---CAKKKTAIKPWLMDNKLVVG	165
Fpg Bst	116	MHVYAKEEADRRPPLAELGPEPLSP-AFSPAVALAER---AVKTKRSVKALLLDQTVVAG	170
Fpg Lla	114	WELISTDQVLPYFLKKKIGPEP-TYDEDF--D-EKLFREKLRKSTKKIKPYLLEQTLVAG	169
Nei Eco	108	IEMLTPEQLTTHPFLQRVGPVDLDP-NLTPEVVKERLLSPRFRN-RQFAGLLLDQAFLAG	165
Fpg Tth	159	VGNIIYADEALFRARLSPFRPARSLTEEEARRLYRALREVLAEAVELGGSTLSDQSYRQPD	218
Fpg Eco	166	VGNIIYASESLFAAGIHPDRLASSLSLAECCELLARVIKAVLLRSIEQGGTTL--KDFLQSD	223
Fpg Bst	171	FGNIIYVDESFLFRAGILPGRPAASLSSKEIERLHEEMVATIGEAVMKGGSIV--RTYVNTQ	228
Fpg Lla	170	LGNIIYVDEVWLAKIHPKETNQLIESSIHLHDSIIIEILQKAIKLGSSIT--RTYSA-L	226
Nei Eco	166	LGNILRVEILWQVGLTGNHKAKDLNAAQLDALAHALLEIPRFSYAT-R-----	212
Fpg Tth	219	GLPGG-----FQTRHAVYGREGLPCAPAGRPVERRVVAGRGTHFCPTCQGE GP	266
Fpg Eco	224	GKPGY-----FAQELQVYGRKGEPGRVCGTPIVATKHAQRAFYCRQCQK---	268
Fpg Bst	229	GEAGT-----FQHNLVYVGRQGNPCRCGTPIEKTVVAGRGTHYCPRCQR---	273
Fpg Lla	227	GSTGK-----MQNELQVYGKTGEKSRCGAEIQKIKVAGRGTHFCPVCCQK---	272
Nei Eco	213	---GQVDENKHNHGFALFRFKVFRDGEPCERCPSIIEKTTLSSPFYWCPCQH---	262

Рисунок 12. Выравнивание последовательностей наиболее изученных бактериальных представителей суперсемейства H2tH. Жёлтым обозначена каталитическая диада PE; фиолетовым обозначены остатки аминокислот, координирующие фосфаты в ДНК; голубым обозначены остатки интеркалирующей триады; розовым обозначены остатки, формирующие мотив спираль–2 поворота–спираль; оранжевым обозначены остатки тетрапептидной петли, координирующей поврежденные основания; синим обозначены остатки цистеинов, координирующие цинк в цинковом пальце. Выравнивание аминокислотных последовательностей было построено относительно фиксированного выравнивания структуры FoldMason [134] с помощью алгоритма MAFFT в режиме L-INS-i [135].

Мотив спираль–2 поворота–спираль

Две из четырёх α -спиралей С-концевого домена формируют H2tH-мотив, который вместе с мотивом цинкового пальца образует ДНК-связывающую поверхность этого домена (Рисунок 11, Рисунок 12). H2tH-мотив контактирует исключительно с фосфодиэфирным остовом ДНК — с фосфатами P^0 , P^{-1} и P^{-2} (P^0 — фосфат с 3'-стороны от повреждённого основания), не образуя прямых водородных связей с основаниями [123]. Связывание ДНК не сопровождается крупномасштабными конформационными перестройками домена, однако сама ДНК сильно изогнута в области повреждения ($\sim 60^\circ$), и именно геометрия этого изгиба определяет ориентацию H2tH-мотива относительно фосфатного остова.

Ключевым контактным остатком служит абсолютно консервативный аспарагин (Asn168 в EcoFpg, Рисунок 12): его боковая цепь образует водородную связь с фосфатом

P^{-1} , а амидная группа основной цепи — с P^0 , формируя бидентатный контакт с двумя последовательными фосфатами (Рисунок 14). Вместе с тремя другими консервативными остатками — Lys56 и His70 *N*-концевого домена и Arg258 мотива цинкового пальца — остаток Asn168 образует кооперативную сеть водородных связей с остовом ДНК; к ней примыкает консервативный остаток Lys57, образующий солевые мостики с P^{-1} и P^{-2} . Помимо связывания ДНК, остаток Asn168 играет структурную роль и в активном центре: в EcoNei его амидный азот образует водородную связь с $O\epsilon 2$ каталитического остатка Glu2, напрямую сопрягая ДНК-связывающий мотив с каталитической диадой остатков Pro1–Glu2 (Рисунки 12, 13, 14) [123].

Помимо статического захвата фосфатов, H2tH-мотив непосредственно участвует в элементарном шаге сканирования: асимметрия его контактов с целевой и комплементарной цепями ДНК обеспечивает поцепочечное перемещение фермента (см. разд. 2.3.3.4.2) [136].

Мотив цинкового пальца

C-концевой домен содержит характерный цистеиновый (Cys)₄-цинковый палец: ион Zn^{2+} координируется четырьмя остатками цистеина, а несущая его β -шпилька контактирует с фосфатами по обе стороны от повреждённого нуклеозида [137]. Мотив абсолютно необходим для формирования каталитически компетентного комплекса: мутации координирующих а. к. о. цистеина [138]; EcoFpg Cys→Ala/His/Ser [139] снижают сродство к ДНК и полностью подавляют каталитическую активность.

Абсолютно консервативный остаток аргинина (Arg258 в EcoFpg, Arg264 в BstFpg, Arg260 в LlaFpg, Arg252 в EcoNei) контактирует с фосфатами с обеих сторон от повреждённого нуклеозида, сближая 5'- и 3'-фосфаты до 5,4 Å (в отличие от 6,7 Å в В-ДНК); такое локальное сжатие остова механически облегчает выворачивание основания в активный центр [137].

Мутации ключевых остатков цинкового пальца и остатков прилегающих к нему позиций (в EcoNei — Arg171 в β -повороте, Gln261 в основании пальца) снижают на 3–4 порядка величину k_{cat}/K_M на ДНК-субстратах, содержащих повреждение, причём мутантный вариант Q261A формирует ковалентный интермедиат белок–ДНК, но не активен на стадии β -элиминирования [140]. Это указывает на аллостерическую роль мотива цинкового пальца: он передаёт сигнал от участка распознавания повреждения к каталитическому центру.

Структурный элемент β -шпильки, контактирующий с фосфатами, сохранён у всего суперсемейства, но способ его стабилизации варьируется: бактериальные Fpg и Nei используют цистеиновый (Cys)₄-цинковый палец, человеческий NEIL1 — «бесцинковый палец», стабилизированный сетью водородных связей (PDB ID: 1TDH; [141]), в то же время NEIL2

— (Cys)₂(His)₂, PDB ID: 6VJI [142]. Функциональная роль β-шпильки по взаимодействию с фосфатами остова ДНК остаётся неизменной.

Роль пролин–глутаминовой петли в катализе

Пролин–глутаминовая петля ДНК-гликозилаз H2tH принимает прямое участие в удалении поврежденного основания из ДНК, с последующим β- и β/δ-элиминированием (Рисунок 13).

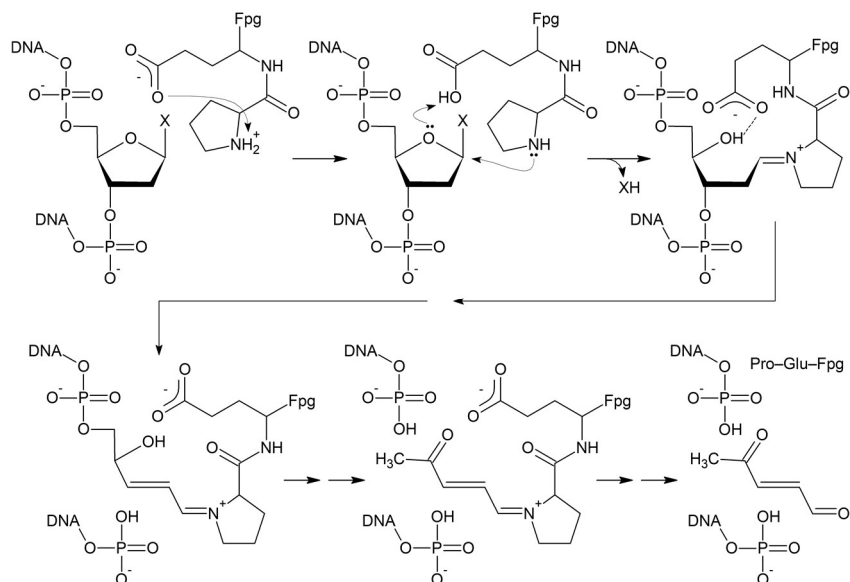


Рисунок 13. Каталитический механизм удаления поврежденного основания из ДНК ДНК-гликозилазами суперсемейства H2tH.

Остаток Pro1 является каталитическим нуклеофилом: его α-аминогруппа атакует C1' дезоксирибозы повреждённого нуклеотида, замещая повреждённое основание и формируя ковалентный аминальный интермедиат, который далее перегруппировывается в основание Шиффа (см. разд. 2.3.3.4.3). Ключевая роль остатка Pro1 подтверждена структурно — на множестве ковалентных комплексов фермент–ДНК, полученных восстановлением промежуточного основания Шиффа боргидридом натрия (см. Таблица 5), — и функционально: замена остатка Pro1→Glu1 в LlaFpg снижала способность расщеплять дцОДН с 8-охоG//C в 700–2000 раз при сохранении связывания с ДНК и способности образовывать основание Шиффа с АП-сайтом [143]; замена остатка Pro1→Thr1 в EcoFpg инактивировала фермент при сохранении способности формировать основание Шиффа [144].

В BstFpg [145] остаток Glu2 действует как N-кэп [146] спирали αE — карбоксильная группа взаимодействует с амидными группами остатков Gly173 и Tyr176, стабилизируя макродиполь спирали, направленный к ДНК; и стабилизирует оксокарбениевый ион — положительный заряд на C1', возникающий при удалении повреждённого основания. Серия из четырёх высокоразрешенных структур LlaFpg (PDB: 1NNJ, 1PJ, 1PJI, 1PM5; 1.80–1.90 Å,) показала, что карбоксильная группа остатка Glu2 имеет одно и то же положение во

всех комплексах и формирует водородные связи с С4'-ОН раскрытого дезоксирибозного кольца [147]. Это подтвердилось и для комплекса. Молекулярно-динамическое (МД-) моделирование мутанта E2Q показало, что протонирование остатка Glu2 играет ключевую роль в дискриминации: при протонированном остатке Glu2 свободная энергия связывания значительно ниже для 8-охоG, чем для G, тогда как при депротонированном остатке Glu2 различие нивелируется [148]. Стоит отметить, что мутантные варианты BstFpg E2Q и EcoFpg E2Q не проявляют гликозилазной активности, но при этом сохраняют лиазную активность [137,149]. Таким образом, остаток Glu2 выступает как общий кислотный катализатор: карбоксильная боковая группа способствует раскрытию кольца дезоксирибозы и формированию основания Шиффа с остатком Pro1.

В ковалентном комплексе EcoNei с ДНК [123] остаток Glu2 формирует сильную водородную связь с С4'-ОН раскрытого дезоксирибозного кольца (расстояние 2.57 Å), стабилизируя его конформацию.

Интеркалирующая петля

Для того, чтобы стабилизировать вывернутое поврежденное основание в ДНК-гликозилазах присутствуют остатки, которые интеркалируют внутрь образовавшейся полости в ДНК (см. разд. 2.3.2, Рисунок 12, Рисунок 14). Этот структурный мотив организован триадой аминокислот, но для Fpg и Nei организация первичной последовательности отлична: петля сформирована тремя аминокислотными остатками, однако их расположение в структуре различается.

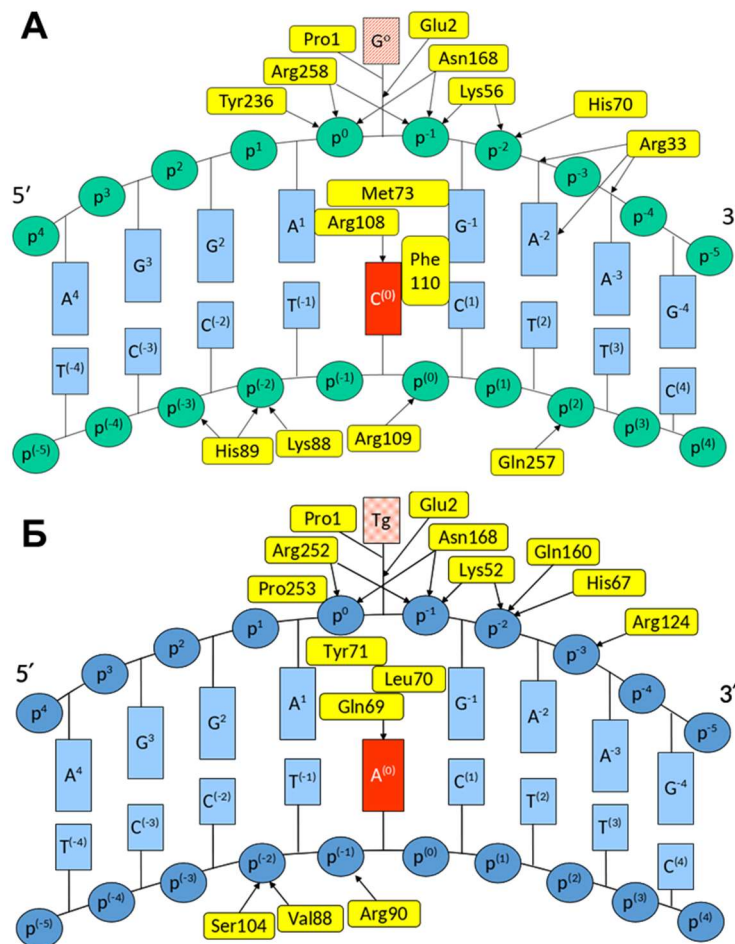


Рисунок 14. Схема активного центра Fpg и Nei: сравнение остатков интеркалирующей триады и каталитической диады, взаимодействующих с сахарофосфатным остовом ДНК. А — схема активного центра EcoFpg; Б — схема активного центра EcoNei [121].

В Fpg интеркалирующую петлю образует триада Phe/Met/Arg (Phe114/Met77/Arg112 в BstFpg, Phe110/Met73/Arg108 в EcoFpg; [143,145,150]). Остаток фенилаланина активно внедряется в стэкинг двойной спирали с 5'-стороны от цитозина, комплементарного повреждению, искривляя целевую пару на 28–44°; Fpg механически «прошупывает» деформируемость каждой пары — режим, зафиксированный в серии структур «интеркалирующих комплексов» (interogation complexes, IC) IC1–IC3 (PDB: 2F5N, 2F5P, 2F5O) [151]. Исследование методом остановленной струи показывает, что соотношение прямой и обратной констант внедрения клина даёт уже на этой стадии >70-кратную разницу при взаимодействии фермента с 8-охоG//C относительно G//C — клин не столько стабилизирует связывание фермента с ДНК, сколько замедляет сканирование для более тщательной проверки [152] (Рисунок 14).

Мутантный анализ подтверждает роль клина: F114A/F110A лишают фермент способности искривлять пару 8-охоG//C и узнавать повреждение при сохранении активности на АП-сайтах, тогда как F110W, наоборот, «проверяет» все пары подряд, образуя множество переходных комплексов [152].

Остаток метионина (Met77 в BstFpg/Met73 в EcoFpg) заполняет полость, возникающую при выворачивании повреждённого основания; мутант M77A теряет способность стабилизировать вывернутый нуклеозид [153]. Остаток аргинина (Arg112 в BstFpg/Arg108 в EcoFpg) дополнительно заполняет ту же полость и формирует ключевые водородные связи с комплементарным цитозином (см. подразд. «Распознавание комплементарного основания», Рисунок 14).

Внутриспиральное узнавание

Несмотря на минимальное химическое различие между 8-охоG и G (один атом кислорода при C8 и протон при N7), ДНК-белковые интерфейсы (для 2х типов комплексов: комплекс с неповрежденной ДНК с G//C — IC и комплекс с поврежденной ДНК с 8-охоG//C — encounter complex (EC)) отличались перестройкой конформации сахарного остатка повреждённого нуклеотида: вместо C2'-эндо (характерной для G в B-ДНК) наблюдалась C4'-экзо конформация, вызванная стерическим столкновением между группой C8=O 8-охоG и атомом C2' дезоксирибозы. Это столкновение сокращает расстояние C8—C2' с ~3,0 Å в свободной ДНК до ~2,6 Å, что достаточно для детекции ферментом [153,154].

Поврежденное основание в EC остаётся внутри спирали, однако геометрия его взаимодействия с Phe114 и Met77 из BstFpg количественно отличается от ситуации в парном IC, что интерпретируется как следствие ослабленного стэкинга и изменённого электронного окружения 8-охоG (Рисунок 15). Таким образом, распознавание нормального и повреждённого оснований происходит до стадии выворачивания и обеспечивается механическим откликом пары на деформацию, навязываемую остатками-зондами [153,154].

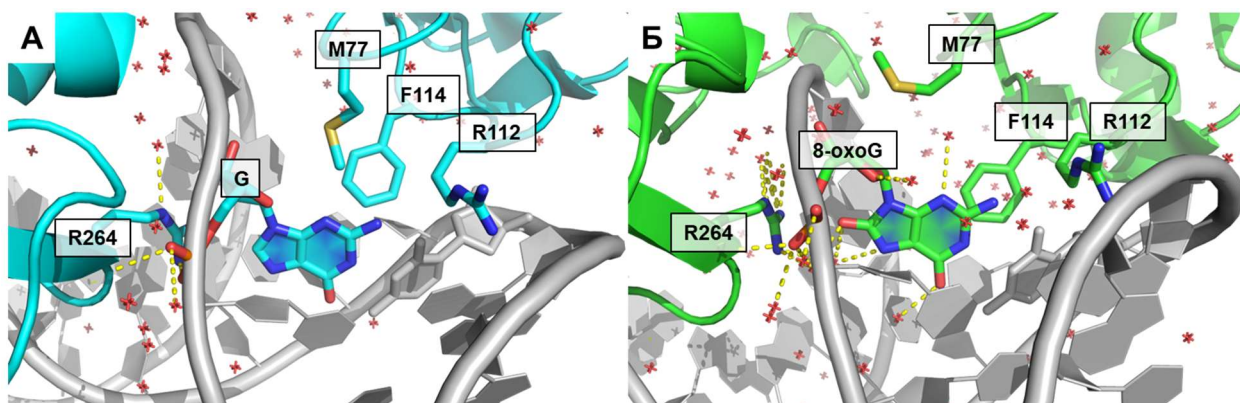


Рисунок 15. Сравнение взаимодействий интеркалирующей триады BstFpg с ДНК: А — взаимодействие фермента с парой G//C внутри спирали ДНК в IC (PDB ID: 2F5O) [151] Б — взаимодействие фермента с парой 8-охоG//C внутри спирали ДНК в EC (PDB ID: 3G08) [154]. Молекулы воды показаны красными звездочками; нековалентные взаимодействия ключевых остатков (триада M77, R112, F114 и R264), дискриминирующих G от 8-охоG внутри спирали ДНК, молекул воды и поврежденного основания в пределах 3,5 Å показаны желтыми пунктирными линиями.

Вычислительные данные подтвердили, что пары 8-охоG//C в свободной ДНК обладают динамическим поведением, существенно отличающимся от G//C: 8-охоG демонстрирует повышенную подвижность и тенденцию к переходу в *син*-конформацию, что может быть детектировано ферментом при внутриспиральном вклинивании [155].

Распознавание комплементарного основания

Помимо распознавания самого повреждённого основания, ДНК-гликозилазы суперсемейства H2tH проявляют чувствительность и к основанию, спаренному с повреждённым: оно остаётся в спирали после выворачивания повреждённого нуклеозида в активный центр и непосредственно контактирует с ферментом. В Fpg эту функцию выполняет один остаток — Arg112 (*B. stearothermophilus*) / Arg109 (*L. lactis*) / Arg108 (*E. coli*) — единственный аминокислотный остаток, формирующий специфические контакты с комплементарным основанием [145]. МД-симуляции дополнительно показали, что в ходе выворачивания поврежденного остатка Arg112 проникает в стопку спирали в позицию вывернутого основания и формирует бидентатные водородные связи с O2 и N3 цитозина, напрямую конкурируя с 8-охоG (Рисунок 16) [150,154].

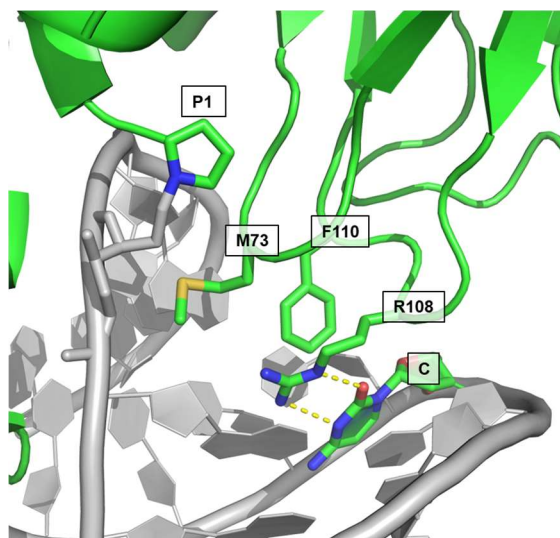


Рисунок 16. Формирование псевдо-Уотсон-Криковского взаимодействия между остатком Arg108 EcoFpg и остатком C ДНК напротив повреждения (PDB ID:1K82, по [150]).

Эти взаимодействия объясняют убывание субстратной специфичности к основанию напротив повреждения в ряду, установленному группой Grollman для Fpg: 8-охоG//C > 8-охоG//G > 8-охоG//C >> 8-охоG//A [128]. Биологическое значение этого ряда состоит в координации с ГО-системой: эффективное исключение 8-охоG//A из числа субстратов предотвращает фиксацию G//C → T//A трансверсий, которая возникнет при репликации. Репарация 8-охоG//A представляет собой специфичную задачу для MutY, удаляющего аденин из Хугстиновской пары 8-охоG//A [156].

Nei *E. coli* демонстрирует аналогичное предпочтение по комплементарному основанию: для $h_2U//G$ k_{cat}/K_M в 2300 раз выше, чем для $h_2U//A$ [140]. В Nei распознавание основания напротив выполняет триада остатков Gln69/Leu70/Tyr71 в ином структурном расположении: остаток Tyr71 вклинивается в ДНК и обеспечивает изгиб, остатки Leu70 и Gln69 заполняют полость вывернутого основания и контактируют с комплементарным аденином (Рисунок 14) [140]. Тройная замена а. к. о. QLY→AAA снижает k_{cat}/K_M реакции на 3–6 порядков, делеция а. к. о. ΔQLY приводит к снижению k_{cat}/K_M ниже предела обнаружения; оба мутанта способны образовывать ковалентный интермедиат, но не способны проводить последующую реакцию β-элиминирования [140].

Вычислительные данные подтверждают общий способ связывания всех окисленных пуринов (8-охоG, FapyG, FapyA) в активном центре EcoFpg: все они занимают сходные позиции, формируя стэкинг с остатком Met73 и контакты с остатками Arg108 и Phe110 интеркалирующей петли [157,158].

Петля, координирующая повреждение

Основываясь на выравнивании последовательностей ДНК-гликозилаз (Рисунок 12), можно заметить, что петля, координирующая повреждение, представлена только для подсемейства Fpg, но не Nei, что также подтверждается при наложении и анализе кристаллических структур ковалентных конъюгатов соответствующих ферментов с ДНК [137,143,145,147,150].

При более детальном анализе структур комплексов Fpg с ДНК (как ковалентных конъюгатов, так и нековалентных комплексов), можно заметить особенность: петля, при отсутствии повреждённого азотистого основания, разупорядочена и не наблюдается в кристаллических структурах как для ДНК с АП-сайтом, так и для ковалентных комплексов, где повреждение уже удалено [143,147,151]. Однако, петля становится упорядоченной, когда возможна координация О6 кислорода 8-охоG за счёт связывания амидными группами пептидного остова петли (Рисунок 11) [125,137].

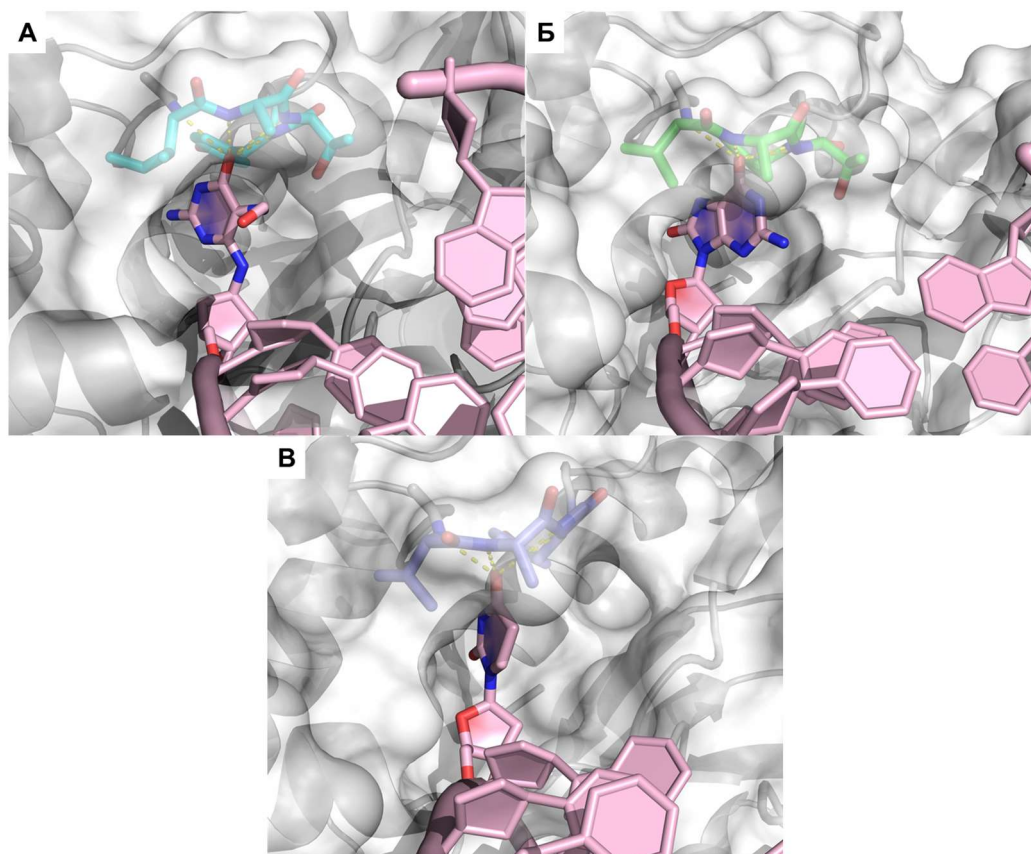


Рисунок 17. Формирование кармана, связывающего повреждение тетрапептидных петлей в кристаллических структурах Fpg с поврежденной ДНК. Упорядоченная форма тетрапептидной петли при наличии поврежденного основания: А — координирование FaruG петель LlaFpg (PDB ID: 1XC8) [125]; Б — координирование 8-охоG петель BstFpg (PDB ID: 1R2Y) [137]; В — координирование hoU (PDB ID: 1R2Z) петель BsrFpg [137]. Желтыми пунктирными линиями показаны водородные связи между амидными атомами азота остова петли и повреждением в ДНК.

2.3.3.4.2 Поиск повреждения ДНК-гликозилазами суперсемейства «спираль–2 поворота–спираль»

Одномерная диффузия

Fpg в одномолекулярных экспериментах перемещаются вдоль вытянутой λ -ДНК в реальном времени [159]. Количественная модель сканирования, построенная по одномолекулярным данным, показывает, что за одно связывание ($\tau \approx 1,2$ с) фермент сканирует 450–600 п.н. с охватом 60–75 % оснований; на поврежденных субстратах коэффициент диффузии падает примерно в 10 раз, а время жизни комплекса увеличивается до 3,5 с — прямое кинетическое подтверждение задержки фермента на повреждении [95,160].

Поцепочечное перемещение фермента вдоль ДНК

BstFpg закристаллизован в неотклоненном (IC) и отклоненном (slanted complex, SC) состояниях, различающихся смещением на один нуклеотид по одной из цепей при сохранении контактов на другой (Рисунок 18) [136]. Оба состояния имеют близкие энергетиче-

ские минимумы ($\Delta \approx 0,6$ ккал/моль, барьер перехода $\approx 2,3$ ккал/моль; мутация R112A самопроизвольно переводит фермент в SC), что независимо подтверждается расчётом потенциалов средней силы на высокомолекулярной ДНК. Таким образом, благодаря большому количеству закристаллизованных комплексов BstFpg с ДНК (Таблица 5) удалось зарегистрировать как именно происходит поиск повреждения — это не одновременное перемещение фермента по обеим цепям ДНК, а последовательность полушагов по цепям поочерёдно, энергетически выгодная за счёт сохранения части контактов с ДНК на каждом промежуточном этапе.

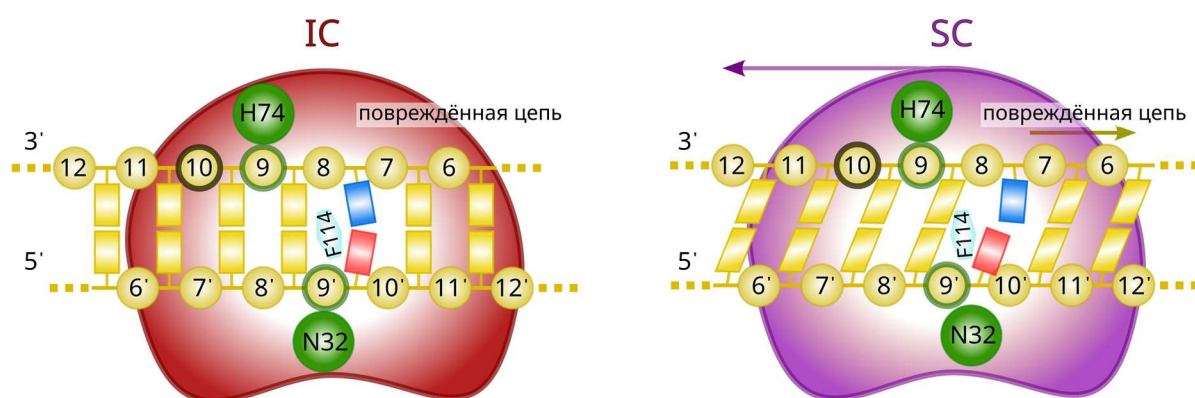


Рисунок 7. Поцепочечное перемещение BstFpg вдоль ДНК: неотклонённом (IC) и отклонённом (SC) комплексах (по [136]).

Распознавание повреждения в активном центре

После обнаружения деформированной пары при сканировании повреждённое основание выворачивается из дуплекса в активный центр фермента. Верификация повреждения происходит на каждом этапе выворачивания и реализуется как многоступенчатый «динамический чекпойнт» — на каждом шаге геометрически близкий немодифицированный G отбраковывается специфическими контактами активного центра.

Энергетический барьер выворачивания 8-охоG из связанной с Fpg ДНК в 3–5 раз ниже, чем в случае канонического G (вычислительные оценки: 4–7 ккал/моль для 8-охоG против 11–22 ккал/моль для G [154,161]) — что соответствует кинетической дискриминации в 4–5 порядков. Расчёты допускают два пути выворачивания повреждения: через малую (6–7 ккал/моль) и через большую (3–4 ккал/моль) бороздки [162]). Это полностью согласуется с имеющимися кристаллографическими данными: интеркалирующая триада остатков Met/Arg/Phe Fpg вклинивается в ДНК со стороны малой бороздки и заполняет полость, образовавшуюся на месте вывернутого нуклеотида, тогда как само повреждённое основание

оказывается экспонированным в сторону большой бороздки перед фиксацией в активном сайте фермента [151].

Ключевые точки дискриминации в ходе выворачивания детально проанализированы в работах [161,163] и распределены по углу экструзии проверяемого основания относительно оси спирали ДНК. Если активный центр не достигает каталитически компетентной конформации (как при попадании в него немодифицированного G), срабатывает «поздний чекпоинт» — возврат основания во внутриспиральное состояние [164]:

Стадия I (~40°) — первичная дискриминация по протонированию N7: N7-H 8-охоG не образует H-связь с амидом остова остатка Gly264 BstFpg (Gly259 в EcoFpg) и контактирует с фосфатом P^{+1} ; для канонического G формируются H-связь N7→NH-Gly264 и катион- π -стэкинг Arg263–G, удерживающие β -шпильку цинкового пальца ближе к остову ДНК [161].

Стадия II (~90°) — критическая точка дискриминации: абсолютно консервативный остаток аспарагина H2tH-мотива (Asn168 в EcoFpg) образует H-связь с экзоциклическим O8 8-охоG (отсутствующим у G); параллельно Уотсон-Криковская грань 8-охоG стабилизируется двумя H-связями с фосфатом P^{+1} [161].

Стадия III (~150°) — а. к. о. Pro1 как каталитический нуклеофил, протонированный при физиологическом pH (расчётный $pK_a \approx 9,3$), образует H-связь с экзоциклическим O8 8-охоG. Аналогичный контакт остатка Pro1 с атомом N7 канонического G даёт менее благоприятный энергетический минимум — N7 геометрически менее доступен. На участке 150°→280° свободная энергия системы 8-охоG падает примерно на 14 ккал/моль; для G профиль на этом отрезке остаётся практически плоским, что явно указывает на предпочтение выворачивания поврежденного нуклеотида из ДНК, а не нативного [161].

Стадия IV (~260–280°) — прекаталитический комплекс: вывернутый 8-охоG фиксируется сетью H-связей N7-HN-Ser219 и O6 ↔ амиды остова петли (а. к. о. 217-221 в EcoFpg), координирующей повреждение; одновременно остатки Asn168 и Arg258 EcoFpg удерживают нуклеотид, связывая P^0 и P^{-1} . Для неповрежденного основания G активный центр работает как анти-фильтр: депротонированный N7 отталкивается от карбонильной группы остатка Ser219, H-связи с петлей не формируются, и G смещается в альтернативное положение к остаткам Arg79 и Gly77 [161].

2.3.3.4.3 Каталитический механизм удаления повреждения

В каталитическом процессе удаления повреждения выделяют четыре стадии: (1) нуклеофильная атака α -аминогруппы остатка Pro1 на C1' дезоксирибозы повреждённого нуклеозида с образованием аминального интермедиата и вытеснением повреждённого основа-

ния (вероятно, по механизму S_N1 — через оксокарбениевый ионный интермедиат, стабилизированный взаимодействием с остатком Glu2); (2) перегруппировка аминального интермедиата в основание Шиффа (имин); (3) β -элиминирование — разрыв 3'-фосфодиэфирной связи; (4) δ -элиминирование — разрыв 5'-фосфодиэфирной связи, завершающее удаление сахарного остатка. Каталитические стадии осуществляются с минимальной перестройкой макромолекулярного остова [145].

Структурная картина каталитической компетентности активного центра подробно описана для ковалентного комплекса BstFpg с ДНК (PDB: 1L1Z, 1,70 Å), полученного восстановлением основания Шиффа боргидридом натрия. В нём чётко видна ковалентная связь между остатком Pro1 и атомом C1' дезоксирибозы, а также упорядоченная молекула воды на расстоянии 3,5 Å от C2', идеально ориентированная для отрыва pro-S-протона H2'β (диастереотопного протона на той же грани сахара, что и уходящий 3'-фосфат) — потенциальный общий основной катализатор β -элиминирования. Петля, координирующая повреждение ($\beta F\text{-}\alpha 10$, остатки Val222–Tyr225 в BstFpg; см. подразд. «Петля, координирующая повреждение»), четырьмя последовательными амидными группами основной цепи образует водородные связи с Об 8-охоG, формируя структуру, функционально аналогичную оксианионной лунке сериновых протеаз — она активирует повреждённое основание как уходящую группу, связывая распознавание с катализом. β - и δ -элиминирование облегчаются обширными контактами атомов кислорода 3'- и 5'-фосфатных групп с положительно заряженными остатками Arg264 и Lys60 и H-донором остатка Tyr242 (нумерация BstFpg), электростатически стабилизирующими анионы уходящих фосфатных групп [145].

По совокупности данных, полученных с помощью предстационарной кинетики, а также методом остановленной струи с временным интервалом от 2 мс до 10 с можно выделить следующие стадии [90,165–167]:

1. $E+S \rightarrow (E \cdot S)_1$ — первичное неспецифическое связывание ($K_1 = 3,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ для 8-охоG).
2. $(E \cdot S)_1 \rightarrow (E \cdot S)_2$ — начальная дестабилизация ДНК вокруг повреждённого нуклеотида, формирование излома.
3. $(E \cdot S)_2 \rightarrow (E \cdot S)_3$ — внедрение а. к. о. клина, дестабилизация целевой пары оснований.
4. $(E \cdot S)_3 \rightarrow (E \cdot S)_4$ — выворачивание 8-охоG из дуплекса в активный центр фермента.
5. $(E \cdot S)_4 \rightarrow (E \cdot S)_5$ — тонкая подгонка активного центра; заполнение полости в дуплексе остатками R и M.
6. $(E \cdot S)_5 \rightarrow (E \cdot P)$ — каталитические стадии (расщепление *N*-гликозидной связи + β/δ -элиминирование). Обратимы на начальном этапе.
7. $(E \cdot P) \rightarrow E+P$ — высвобождение продукта. Лимитирующая стадия общего цикла.

Для неповреждённой ДНК процесс не продвигается далее стадий 2–3. Для неспецифических субстратов (h_2U) стадии 3–4 упрощены.

Лимитирующая стадия каталитического цикла Fpg не химическая реакция, а регенерация фермента (стадия 7) — высвобождение продукта и возврат белка в исходную каталитически компетентную конформацию [167]. Более того, обнаружено, что химическая стадия вырезания основания обратима. Укладка петли распознавания соответствует стадиям 4–5 кинетической схемы (минутная временная шкала) и представляет собой энтропийно-движимый процесс.

Биологическая целесообразность такой кинетической организации очевидна: при крайне низкой частоте повреждений в геноме (~ 1 на 10^6 – 10^7 нуклеотидов) фермент тратит подавляющую часть времени на поиск и распознавание, а не на каталитический оборот. Оптимизация скоростей стадий поиска и распознавания, а не скорости каталитического оборота, максимизирует эффективность фермента *in vivo*.

2.3.3.4.4 Обобщённая модель действия ДНК-гликозилаз

Интеграция структурных, кинетических, термодинамических и одномолекулярных данных позволяет сформулировать обобщённую модель взаимодействия Fpg/Nei с ДНК как трёхфазный процесс на трёх временных шкалах:

Фаза сканирования ($\sim$ миллисекунды на основание) — неспецифическое связывание и одномерная диффузия с непрерывным внедрением аминокислотного клина (остаток Phe110 в EcoFpg, Tyr71 в EcoNei) и тестированием деформируемости нуклеотидной пары (см. раздел «Поиск повреждения»).

Фаза распознавания (секунды на выворачивание, минуты на упорядочение петли) — выворачивание основания при сниженном барьере (4–7 ккал/моль для 8-охоG против 11–22 ккал/моль для G) и многоступенчатый динамический чекпоинт, верифицирующий повреждение по N7, O8, Arg108 (в EcoFpg) и геометрии прекалалитического сайта (см. раздел «Распознавание повреждения в активном центре»).

Фаза катализа ($\sim$ минуты на оборот) — S_N1 -замещение с последующим β/δ -элиминированием. Лимитирующая стадия всего цикла не удаление повреждения, а регенерация фермента. Такая кинетическая организация отражает эволюционную оптимизацию Fpg/Nei для поиска и распознавания, а не для каталитического оборота: при крайне низкой плотности повреждений в геноме (~ 1 на 10^6 – 10^7 нуклеотидов) скорость каталитического оборота не лимитирует функцию фермента *in vivo*.

2.4 Заключение

Суперсемейство ДНК-гликозилаз H2tH — одно из наиболее детально охарактеризованных среди всех систем эксцизионной репарации оснований. Установлена общая архитектура ферментов [122,145], описаны ключевые функциональные элементы — мотив спираль–2 поворота–спираль, цинковый палец, интеркалирующая петля, пролин–глутаминовая каталитическая диада и петля, координирующая повреждение — и сформулирован общий механизм действия: от одномерной диффузии с активным интеркалированием фенилаланинового/тирозинового клина [151] до многостадийной верификации повреждения в активном центре [161] и последовательного β/δ -элиминирования с регенерацией фермента как лимитирующей стадией каталитического цикла [166].

Вместе с тем, при более пристальном рассмотрении оказывается, что ряд принципиальных аспектов этого механизма сохраняет нетривиальную степень неопределённости. Так, представления о состояниях протонирования каталитической диады остатков Pro1–Glu2 и об электростатике вокруг активного центра опираются преимущественно на молекулярно-динамическое моделирование [148] и анализ pH-зависимостей кинетических параметров, тогда как прямые экспериментальные оценки pK_a каталитически значимых остатков в составе комплекса фермент–ДНК остаются единичными, а вклад отдельных остатков в электростатическое окружение — скорее реконструированным, чем измеренным. Петля, координирующая повреждение, взаимодействует с 8-охоG в активном центре не через боковые радикалы, а через амидные протоны пептидного остова остатков 222–225 (в BstFpg), формируя структуру, аналогичную оксианионной лунке сериновых протеаз [137,145]; такая организация делает эту петлю особенно чувствительной к конформации (из-за последующей координации повреждения), однако вклады основной цепи и боковых радикалов петли в каталитическую эффективность и распознавание разных окисленных оснований напротив разных комплементарных оснований до сих пор не изучены систематически. Наконец, если для Fpg структурная основа специфичности по комплементарному основанию раскрыта через псевдо-Уотсон-Криковское взаимодействие остатка Arg с цитозином напротив 8-охоG [145,150] и хорошо согласуется с наблюдаемым порядком k_{cat}/K_M по парам 8-охоG/(T/G/C/A) [128], то для Nei аналогичная картина отсутствует: кинетические данные [140] показывают, что активность EcoNei на паре h2U//A примерно в 2300 раз ниже, чем на паре h2U//G, — т. е. дискриминация по комплементарному основанию у Nei действительно реализуется, и наименее благоприятное основание напротив — аденин. Однако какой именно аминокислотный остаток фермента её обеспечивает, и как геометрия ковалентного

комплекса Nei меняется при варьировании комплементарного основания остается не ясным, так как прямых кристаллографических данных, отвечающих на эти вопросы, опубликовано не было.

Совокупность этих нерешённых вопросов показывает, что полная физико-химическая картина действия ДНК-гликозилаз суперсемейства спираль–2 поворота–спираль, несмотря на продвинутость имеющейся модели, требует дальнейшего экспериментального уточнения.

3 Материалы и методы

3.1 Материалы

3.1.1 Реактивы

В работе были использованы: бычий сывороточный альбумин (БСА; «New England Biolabs», США), этилендиаминтетраацетат (EDTA), 1,4-дителиотреитол (DTT), ампициллин, канамицин, агароза, мочеви́на, бакто-триптон, бакто-дрожжевой экстракт, бакто-агар, формамид, борная кислота (H_3BO_3), 2-амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диол (Tris), N,N'-метиленбисакриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), гидрофосфат натрия (Na_2HPO_4), дигидрофосфат натрия (NaH_2PO_4), хлорид натрия (NaCl), хлорид калия (KCl), сульфат аммония ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), изопропил-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ), 2-меркаптоэтанол, фенилметилсульфонил фторид (PMSF), кумасси бриллиантовый синий R-250, краситель ксиленцианол, краситель бромфеноловый синий, (все — «MP Biomedicals», США), набор ДНК-маркеров 1 kb, дезоксинуклеотидтрифосфаты: dATP, dGTP, dCTP, dTTP и их смесь (dNTP) («Сибэнзим», Россия), глицерин, додецилсульфат натрия (SDS), («PanReac», Испания), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), акриламид (все — «Диаэм», Россия), набор для выделения плазмидной ДНК, набор для очистки плазмидной ДНК гель-электрофорезом («Qiagen», Германия), боргидрид натрия (NaBH_4), лимонная кислота, цитрат натрия, метанол, уксусная кислота, (все — «Реахим», Россия), бромистый этидий («Helicon», Россия), γ -[^{32}P]ATP с удельной активностью 1,00 МБк/мкл (Лаборатория биотехнологии ИХБФМ СО РАН), остальные реактивы и растворители квалификации х. ч. и о. с. ч. отечественного производства. Тетраоксид осмия OsO_4 был любезно предоставлен д. х. н. Соколовым М. Н. (заведующий лабораторией синтеза комплексных соединений ИХХ СО РАН). Для работы с бактериальными клетками использовали одноразовую культуральную посуду фирмы «Becton Dickinson», США. Для скрининга условий кристаллизации использовались наборы условий: Index, Crystall screen 1/2 («Hampton research», США) или JCSGplus, PACTpremier, SG1 («Molecular Dimensions», Великобритания). Для всех процедур использовалась бидистиллированная или деионизированная вода класса milliQ (18,2 мОм/см), за исключением приготовления микробиологических сред, проводившегося с использованием дистиллированной воды.

3.1.2 Буферы и смеси

В работе были использованы следующие буферы и смеси (далее по тексту приводятся без расшифровки состава):

- **Раствор для окрашивания с кумасси:**
40%-ный метанол (v/v), 10%-ная уксусная кислота (v/v),
1 мг/мл кумасси бриллиантовый синий R-250.
- **Буфер для элюции ДНК из акриламидного геля:**
100 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 1 мМ EDTA.
- **FDLB (×2):**
80% формамид, 20 мМ Na-EDTA, 0,1% ксиленцианол, 0,1% бромфеноловый синий.
- **LB:**
10 г/л бакто-триптона, 5 г/л бакто-дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl.
- **SLB (×2):**
2%-ный (w/v) SDS, 10%-ный (v/v) глицерин, 5%-ный (v/v) 2-меркаптоэтанол,
62,5 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 0,1%-ный (w/v) бромфеноловый синий.
- **SOC:**
20 г/л бакто-триптона, 5 г/л бакто-дрожжевого экстракта, 20 мМ глюкоза,
10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ MgSO₄.
- **TAE (×1):**
40 мМ Tris-ацетат (pH 8,0), 1 мМ EDTA.
- **TBE (×1):**
90 мМ Tris, 90 мМ H₃BO₃, 2 мМ EDTA.
- **TE (×1):**
10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 1 мМ EDTA.

3.1.3 Ферменты

В работе использовали полинуклеотидкиназу бактериофага T4 производства «Биосан» (Россия), полимеразу Q5 High Fidelity Hot Start («New England Biolabs», США), урацил-ДНК-гликозилазу UNG («Сибэнзим», Россия), рестриктазу MspI («Сибэнзим», Россия) или ее изошизомер DpnI («Agilent», США), ДНК-полимеразу Pfu (любезно предоставлена Натальей Торгашевой, лаборатория геномной и белковой инженерии ИХБФМ СО РАН). Дикий тип Fpg *E. coli*, Fpg *L. lactis* и Nei *E. coli*, а также мутантный вариант Fpg *E. coli* E2Q были выделены соискателем самостоятельно по описанным методикам в разд. 3.2.3. Варианты ДНК-гликозилазы Fpg *L. lactis*, несущие мутации по а. к. о. тетрапептидной петли 219-222 были предоставлены руководителем работы. В работе были изучены следующие мутантные формы фермента по положениям 219-222 (Таблица 6).

Таблица 6. Варианты ДНК-гликозилазы Fpg *L. lactis*, несущие мутации по аминокислотным остаткам тетрапептидной петли 219-222.

Номер а. к. о. Fpg <i>L. lactis</i>	А. к. о. дикого типа Fpg <i>L. lactis</i>	А. к. о. мутантных форм Fpg <i>L. lactis</i>				
219	I	E	R	R	N	W
220	R	D	Q	S	P	P
221	T	M	H	A	H	G
222	Y	M	G	D	G	R

3.1.4 Олигодезоксирибонуклеотиды

Для получения мутантного варианта Fpg *E. coli* E2Q, экспериментов по измерению констант Михаэлиса и констант скорости для LlaFpg, а также выполнения экспериментов с Nei использовались олигодезоксирибонуклеотиды (ОДН), синтезированные в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН (Таблица 7). ОДН для ЭПР-экспериментов были синтезированы в лаборатории химии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН к. х. н. Жарковым Т. Д. (Таблица 7).

Таблица 7. ОДН, использовавшиеся в работе.

Название олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида, 5'→3'	Модификация
Олигонуклеотиды для <i>Fpg E. coli</i>		
E2Q_frw	GAGATATACATATGCCTCAATTACCCGAAGTTGAAACC	
E2Q_rev	GGTTTCAACTTCGGGTAATTGAGGCATATGTATATCTC	
10-NO•	CTCTCCCTTC-[X]	X = нитроксильная спин-метка
NO•-11	[X]-TCCTTTCTCTCT	X = нитроксильная спин-метка
comp22	AGAGGAAAGGACGAAGGGAGAG	
comp23-1	AGAGGAAAGGACCGAAGGGAGAG	
comp23-2	AGAGGAAAGGAGCGAAGGGAGAG	
TAMRA-comp22	[X]-AGAGGAAAGGACGAAGGGAGAG	X = TAMRA
TAMRA-comp23	[X]-AGAGGAAAGGACCGAAGGGAGAG	X = TAMRA
Олигонуклеотиды для <i>Fpg L. lactis</i>		
23oG	CTCTCCCTTCXCTCCTTTCTCT,	X = 8-oxoG
23U	CTCTCCCTTCXCTCCTTTCTCT	X = U
23ohU	CTCTCCCTTCXCTCCTTTCTCT	X = ohU
23F	CTCTCCCTTCXCTCCTTTCTCT	X = THF
23compC	AGAGGAAAGGAGCGAAGGGAGAG	-
23compA	AGAGGAAAGGAGAGAAGGGAGAG	-
Олигонуклеотиды для <i>Nei E. coli</i>		
xtal-mod	CCAGGATGAAGCC	Селективное окисление Т в Тg с помощью OsO ₄
xtal-comp-C	GGCTTCCTCCTGG	
xtal-comp-G	GGCTTCGTCCTGG	
xtal-comp-T	GGCTTCTTCCTGG	
kin-ohU	AGAGGAAAGGAGXGAAGGGAGAG	X = ohU
kin-comp-T	CTCTCCCTTCTCTCCTTTCTCT	
kin-comp-EtU	CTCTCCCTTCXCTCCTTTCTCT	X = 5-этинилурацил
kin-comp-AlkU	CTCTCCCTTCXCTCCTTTCTCT	X = 5-(окта-1,7-диин-1-ил)-урацил

Для синтеза всех ОДН использовались коммерчески доступные амидофосфиты (Glen Research, США). ОДН, содержащие спиновую нитроксильную метку, прикрепленную к 5'- или 3'-концу через гексаметиленовый линкер, были получены также к. х. н. Жарковым Т. Д. (Рисунок 19):

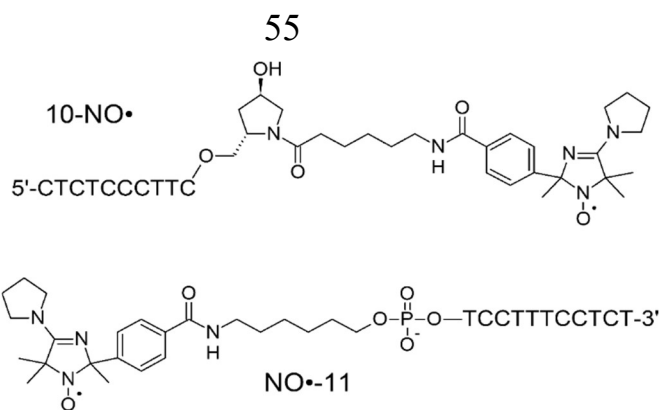


Рисунок 19. Конъюгированная нитроксильная спин-метка.

Таблица 8. дцОДН и молярные соотношения оцОДН, использовавшиеся для ЭПР-экспериментов и капиллярного термофореза.

Название дцДНК	Олигонуклеотиды	Структура дцДНК ^a
gap1-NO•	10-OH NO•-11 comp22	метка (1, 0625) 5'-CTCTCCCTTC TCCTTTCTCT-3' (1) (1, 0625) 3'-GAGAGGGAAGCAGGAAAGGAGA-5'
gap2-NO•	10-OH NO•-11 comp23-1	метка (1, 0625) 5'-CTCTCCCTTC TCCTTTCTCT-3' (1) (1, 0625) 3'-GAGAGGGAAGCCAGGAAAGGAGA-5'
NO•-gap1	10-NO• OH-11 comp22	метка (1) 5'-CTCTCCCTTC TCCTTTCTCT-3' (1, 0625) (1, 0625) 3'-GAGAGGGAAGCAGGAAAGGAGA-5' (1, 0625)
NO•-gap2	10-NO• OH-11 comp23-1	метка (1) 5'-CTCTCCCTTC TCCTTTCTCT-3' (1, 0625) (1, 0625) 3'-GAGAGGGAAGCCAGGAAAGGAGA-5' (1, 0625)

Все ОДН подвергались очистке с помощью обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке LiChrosorb RP-18 (Merck, США) и, при необходимости, с помощью электрофореза в 20%-м денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ).

3.1.5 Нитроксильные спиновые метки

Синтез 2-(2-((2,5-диоксопирролидиноокси)карбонил)фенил)-2,5,5-триметил-4-(пирролидино)-2,5-дигидро-1Н-имидазол-1-оксила (Рисунок 20А) и 2-(4-(2-гидроксиэтилкарбомил)фенил)-2,5,5-триметил-4-(пирролидино)-2,5-дигидро-1Н-имидазол-1-оксила (Рисунок 20Б) выполнялся в НИОХ СО РАН им. Воровцова в лаборатории азотистых соединений к.х.н. И. А. Кирилюком.

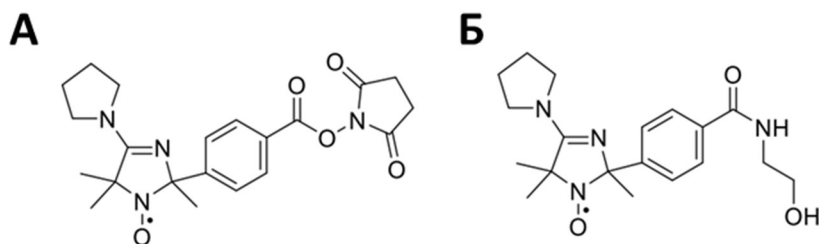


Рисунок 20. Структуры нитроксильных спин-меток, использованных в работе.

3.1.6 Плазмиды и бактериальные штаммы

В работе использовали плазмиды для суперпродукции белков на основе векторов pFLAG-CTC-Fpg-Lla (для суперпродукции Fpg *L. lactis*, любезно предоставлена проф. Бертраном Кастаном, университет Орлеана, Франция), pET_24b(+) (для суперпродукции вариантов Fpg *E. coli* и WT Nei *E. coli*).

В работе использовали штаммы *E. coli*: XL1-Blue, (электрокомпетентные клетки), DH5 α , BL21(DE3), Rosetta2, T7express (химически компетентные клетки). Все штаммы предоставлены руководителем работы. Все клетки хранили в 20%-ном растворе глицерина при -70°C до использования.

3.1.7 Хроматографические сорбенты и колонки

Для очистки радиоактивно меченых ОДН после введения метки использовали сорбент C18 NenSorb («PerkinElmer Life Sciences», США).

Для очистки рекомбинантных белков использовали хроматографические колонки «HiTrap SP HP», «HiTrap Heparin HP» и «monoQ 5/50» (все — «GE Healthcare», США).

3.2 Методы

3.2.1 Сайт-направленный мутагенез

Получение мутантного варианта Fpg *E. coli* E2Q осуществляли методом сайт-направленного мутагенеза. Реакционная смесь объемом 25 мкл включала 50 мкг плазмиды pET_24b(+), содержащую ген Fpg *E. coli*, по 0,5 мкМ каждого праймера (E2Q_fw, E2Q_rev, Таблица 8), 0,2 мМ смесь всех дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP), коммерчески доступный реакционный буфер для ДНК-полимеразы Pfu («Agilent», США) и 1 единицу активности ДНК-полимеразы Pfu. Программа для проведения ПЦР состояла из следующих циклов: 1 цикл нагрева смеси до 95°C в течение 30 с, 30 циклов: нагрев до 95°C в течение 10 с, затем нагрев до 62°C в течение 30 с, после нагрев до 72°C в течение 3-х минут. Для проверки наработки линеаризованной плазмиды использовали аликвоту 5 мкл из реакционной смеси и наносили на 1%-й агарозный гель с 0,05% бромистого этидия. После подтверждения наработки целевого гена в условиях ПЦР, 5 мкл реакционной смеси использовали для трансформации ультракомпетентных клеток NEB5 α . Из 3–5 колоний выделялись плазмиды для последующего секвенирования целевой области, содержащей мутацию в гене Fpg *E. coli*, по методу Сенгера в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН. Плазмида, содержащая ДНК мутантного варианта Fpg *E. coli* E2Q, использовалась для дальнейшей наработки мутантного белка (см раздел 3.2.3).

3.2.2 Выделение плазмидной ДНК

Для выделения плазмидной ДНК в колбу, содержащую 3–5 мл среды LB и ампицилин в концентрации 100 мкг/мл, вносили колонию трансформированных клеток и выращивали на качалке при 250 об./мин в течение ночи (16–18 ч) при 37°C. Выделение плазмидной ДНК из клеточной суспензии проводили щелочным лизисом по протоколу производителя с использованием набора QIAGEN Plasmid Mini Kit («Agilent», США). Выделенные плазмиды анализировали гель-электрофорезом в 1%-м геле. При необходимости подтверждали наличие мутаций секвенированием по Сэнгеру в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН.

3.2.3 Нарботка и выделение белков Fpg и Nei

Для выделения белка Fpg *L. lactis* использовали плазмиду pFLAG-CTC-Lla-Fpg, для Fpg *E. coli* и Nei *E. coli* использовали плазмиду pET_24b(+), несущие соответствующий ген, которые трансформировали в штамм *E. coli* BL21(DE3), Rosetta2 или T7. Из ампициллин-устойчивых колоний трансформированных клеток (плазмидой pFLAG-CTC-Lla-Fpg) или

канамицин-устойчивых колоний трансформированных клеток (плазмидой pET_24b(+)) выращивали ночную культуру, которую инокулировали в 2–4 л среды LB (см. разд. 3.1.2), содержащей ампициллин или канамицин в концентрации 100 мкг/мл. Клеточную культуру выращивали при 37°C при постоянном перемешивании (240 об./мин) до оптической плотности $OD_{595} = 0,4$. При достижении необходимого значения оптической плотности, температуру снижали до 16°C и растили клеточную культуру до $OD_{595} = 0,6$. Суперпродукцию белка индуцировали добавлением изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до 100 мкМ, индукция продолжалась 16 ч при постоянном перемешивании (240 об./мин). Клетки собирали центрифугированием при 12×10^3 g в течение 30 мин при 4°C. Клеточный осадок ресуспендировали в 100 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ EDTA. Клеточные сериновые протеазы ингибировали добавлением PMSF до 1 мМ концентрации и последующем непрерывном перемешивании в течение 30 мин на льду. Далее добавляли NaCl до 1 М при постоянном перемешивании в течение 30 мин на льду. Лизис клеток проводили ультразвуком на приборе УДН-2Т с суммарным импульсом 3–4 минуты (импульс — 30 с, пауза — 40–60 с), выдерживая клетки на льду. Клеточный дебрис отделяли центрифугированием 12×10^3 g 30 мин при 4°C. Белок из супернатанта осаждали сульфатом аммония до 80% насыщения в течение 2 ч на льду. Собирали белок центрифугированием 14×10^3 g 30 мин при 4°C. Белковый осадок хранили на –70°C до последующего хроматографического выделения целевого белка.

Для очистки белковый осадок растворяли в буфере А, содержащем 100 мМ Tris- HCl (pH 7,5), 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT. Перед нанесением на колонку, раствор фильтровали с использованием фильтра Millex HV («Millipore», США) с размером пор 0,22 или 0,45 мкм. Раствор наносили на предварительно уравновешенную буфером А колонку «HiTrap SP HP», содержащую смолу SP-сефароза (5 мл), колонку промывали 20 мл буфера А и элюировали белок градиентом концентрации NaCl от 100 мМ до 1 М в буфере А, общим объемом 25 мл (примерно 5 объемов колонки). Выделение проводили с использованием системы АКТА purifier («GE Healthcare», США). Фракции собирали с использованием коллектора фракций Frac-920 («GE Healthcare», США). Фракции основного пика поглощения на 280 нм, содержащие целевой белок, элюировались при ~600 мМ NaCl. Анализ фракций осуществляли электрофорезом в системе Лэммли с последующей визуализацией белков окрашиванием кумасси (см. разд. 3.1.2). Фракции, содержащие целевой белок, объединяли, разбавляли буфером А до 100 мМ NaCl и наносили на предварительно уравновешенную тем же буфером колонку «HiTrap Heparin HP», содержащую гепарин-сефарозу (5 мл). Белок с колонки элюировали градиентом концентрации NaCl от 100 мМ до 1 М в буфере А. Фракции целевого белка элюировались при ~600 мМ NaCl. Анализ фракций осуществляли электрофорезом в

буферной системе Лэммли с последующим окрашиванием кумасси. Для визуализации результатов использовали гель-документирующую систему Infinity ST5 («Vilber Lourmat», Франция). Фракции, содержащие целевой белок со степенью чистоты более 95% объединяли и диализировали против буфера для хранения фермента, содержащего 50% глицерина (v/v), 1 мМ DTT, 1 мМ EDTA, 400 мМ NaCl, 100 мМ Tris-HCl (pH 7,5). Концентрацию выделенного белка определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop («Thermo Fisher Scientific», Нидерланды). Полученный белок хранили при -20°C до последующих экспериментов.

3.2.4 Выделение и очистка ОДН

Для очистки ОДН от нецелевых продуктов ОДН проводили гель-электрофорез в 20%-м полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях (8 М мочевины). Водный раствор ОДН (около 4 опт. ед. A260), смешивали с формамидом в отношении 1:1 и наносили на гель. После разделения продуктов целевую полосу с ОДН детектировали под УФ-лампой с длиной волны 254 нм на флюоресцирующей подложке, после чего вырезали соответствующий фрагмент геля, измельчали гель и дважды элюировали буфером для элюции из геля (см разд. 3.1.2) при 10°C минимум 2 раза по 2 ч. От фрагментов акриламидного геля очищались с помощью центрифугирования итогового раствора 5 мин при 6000 g, затем отбирали супернатант, содержащий ОДН. Далее раствор, содержащий целевой ОДН, очищали обращеннофазовой хроматографией на сорбенте C_{18} NenSorb («PerkinElmer Life Sciences», США). Для этого перед нанесением образца сорбент упаковывали в колонку, смачивали 1 мл метанола, промывали водой, а затем уравнивали 3 мл буфера, содержащего 100 мМ Tris-HCl pH 7,5, 1 мМ EDTA. После уравнивания колонки наносили образец. Колонку с образцом промывали последовательно 3 мл буфера, содержащего 100 мМ Tris-HCl pH 7,5, 1 мМ EDTA, и 3 мл воды. ОДН элюировали с колонки 60% метанолом в воде. Раствор ОДН в водно-спиртовой смеси упаривали досуха в вакуумном испарителе (CentriVar, «Labconco», США) и растворяли в необходимом объеме $0,1 \times \text{TE}$, выход и концентрацию очищенного ОДН определяли спектрофотометрически с использованием NanoDrop («Thermo Fisher Scientific», Нидерланды). В случае, если ОДН содержал радиоактивную метку, концентрация меченного ОДН определялась путем нанесения нормированных по концентрации аликвот реакционной смеси после кинирования и после очистки с помощью обращеннофазовой хроматографии на сорбенте C_{18} NenSorb на 20% денатурирующий ПААГ с последующим сравнением интенсивностей образцов в программе QuantityOne (BioRad, США).

3.2.5 Введение радиоактивной метки на 5'-конец ОДН

При необходимости введения радиоактивной метки на 5'-конец ОДН использовали стандартную методику [168]. Реакцию проводили в буфере, содержащем 70 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ DTT. На 200 пмоль ОДН в объеме 20 мкл добавляли 20 ед. акт. полинуклеотидкиназы фага Т4 и 2 МБк [γ -³²P]АТР. После инкубации в течение 60 мин при 37°C, реакцию останавливали прогреванием в течение 5 мин при 95°C. Из реакционной смеси отбирали аликвоты по 0,5 мкл для дальнейшего определения выхода меченого ОДН. Меченый ОДН отделяли от не вступившего в реакцию [γ -³²P]АТР обращеннофазовой хроматографией на колонке с сорбентом C₁₈ Nensorb («PerkinElmer», США) (см. разд. 3.2.4).

3.2.6 Селективное окисление тимина до тимингликоля с помощью тетраоксида осмия

Для окисления тимина в ОДН до тимингликоля использовали 662 нмоль ОДН xtal-mod (см. разд. 3.2.4, Таблица 7) и 8,3 мкмоль OsO₄ в 10 мл 5% раствора пиридина в воде. Реакция протекала при комнатной температуре 30 мин при постоянном перемешивании. По окончании реакции избыток OsO₄ экстрагировали в 2 мл хлороформа, водный раствор с ОДН отделяли делительной воронкой и упаривали досуха в вакуумном испарителе (CentriVar, «Labconco», США). После, высушенный оцОДН растворялся в 100 мкл 0,1× ТЕ (см. разд. 3.1.2), разделяли продукты реакции окисления с помощью электрофореза в 20%-м денатурирующем ПААГ и очищали с помощью обращеннофазовой хроматографии на колонке с сорбентом C₁₈ Nensorb (см. разд. 3.2.4). Таким образом был получен итоговый препарат ОДН, содержащий до 80% тимингликоля.

3.2.7 Получение двуцепочечного ОДН

Отжиг проводили с полуторакратным молярным избытком немеченой комплементарной цепи в следующем режиме: 2 мин при 95°C, 5 мин при 37°C, 30 мин при комнатной температуре. Полученные дцОДН хранили при -20°C.

Для получения дцОДН для ЭПР экспериментов использовались молярные соотношения оцОДН из таблицы 8, отжиг проводили путем смешивания оцОДН при комнатной температуре и термостатированием на льду 2–3 часа.

3.2.8 Капиллярный термофорез

Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 50 нМ дцОДН, меченный TAMRA (gap1-NO•, gap2-NO•, NO•-gap1, или NO•-gap2, Таблица 8), 20 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 10% глицерин и 10–20 мкМ Fpg *E. coli*. Измерения

проводили с помощью прибора Monolith NT.115 («NanoTemper Technologies», Германия) в канале, детектирующем красное/зеленое свечение на средней мощности облучающего лазера. Для количественной обработки данных использовали программу SigmaPlot 11.0 (SPSS, США).

3.2.9 Подготовка образцов для ЭПР экспериментов

Точное значение pH в растворах было измерено перед каждым экспериментом с использованием прибора Starter 3100 Bench pH Mer с микроэлектродом («Mler Toledo», Швейцария).

Для построения pH-зависимых калибровочных кривых водорастворимой спинметки (см. разд. 3.1.5, Рисунок 20), использовали 100 нМ спин-метку в 25 мМ Na-фосфатном буфере (pH 4,93) или использовали 25 мМ Na-фосфатный буфер (pH 5,85–8,15) и 100 мМ NaCl.

Для построения pH-зависимых калибровочных кривых ОДН NO•-11 (см. разд. 3.1.4, Таблица 8), использовали 100 нМ ОДН в 25 мМ Na-фосфатном буфере (pH 4,90–8,60) и 100 мМ NaCl.

Для построения pH-зависимых калибровочных кривых дцОДН gar1-NO•, использовали 100 нМ дцОДН в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 4,58 или pH 9,92) и 100 мМ NaCl или в 20 мМ Na-фосфатном буфере (pH 5,85–8,15) и 100 мМ NaCl.

Для построения pH-зависимых калибровочных кривых дцОДН gar2-NO•, использовали 100 нМ дцОДН в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 4,58 или pH 9,92) и 100 мМ NaCl или в 10 мМ Na-фосфатном буфере (pH 5,66–7,96) и 100 мМ NaCl.

Для получения спектров непрерывного ЭПР комплексов Fpg *E. coli* WT или мутантного варианта Fpg *E. coli* E2Q с дцОДН gar1-NO• или gar2-NO• соответствующие образцы дцОДН со спин-меткой готовились в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 6,60–8,14) и 100 мМ NaCl и затем смешивались с одним из вариантов EcoFpg и инкубировались на льду в течение 30 мин.

3.2.10 Исследование доступности растворителя к радикальному центру спинметки в комплексе EcoFpg-ДНК методом модуляции огибающей сигналов электронного спинового эха (ESEEM)

ESEEM эксперименты выполнялись на сконструированном широкополосном импульсном ЭПР-спектрометре в X-диапазоне [169] в сотрудничестве с к.ф.-м.н. Овчеренко С. С. в лаборатории магнитной радиоспектроскопии НИОХ СО РАН им. Н. Н. Ворожцова. Образцы содержали Fpg *E. coli* W или мутантного варианта Fpg *E. coli* E2Q, дцОДН gar1-

NO• или gap2-NO•, 50 mM Na-фосфатный буфер (pH 7,76) и 100 mM NaCl. После чего к ним добавлялись дейтерированная вода и дейтерированный глицерин (глицерин-d8) до конечной концентрации, приведенной в таблице 9.

Таблица 9. Соотношение дейтерированных воды и глицерина в смеси для ESEEM.

Образец	Растворитель (% D ₂ O, % глицерин-d8)
NO•-11	50% 50%
gap1-NO•	50% 50%
gap2-NO•	50% 50%
WT EcoFpg-gap1-NO•	13,6% 50%
WT EcoFpg-gap2-NO•	13,6% 50%
E2Q EcoFpg-gap1-NO•	9,3% 50%
E2Q EcoFpg-gap2-NO•	9,3% 50%

Итоговые реакционные смеси объемом 20 мкл помещались в кварцевые пробирки (внутренний диаметр 1,9 мм, внешний диаметр 2,9 мм) и подвергались ESEEM. Использовалась 3-х импульсная схема ESEEM. Спектры были получены при 9,7 ГГц частоте микроволн, индуктивного поля 354,8 мТ (в соответствии с максимумом интенсивности снятого эхо-ЭПР спектра используемого радикала), 700 Гц частоты повторений, 16 нс длительности каждого из 3-х импульсов, интервал между 1-м и 2-м импульсами — 200 нс, между 2-м и 3-м импульсами — 260 нс. В ходе эксперимента время варьировалось от 4 нс до 5260 нс. Мощность каждого импульса составляла 15 Вт. Эксперименты проводились при 80 К.

3.2.11 Получение спектров непрерывного электронного-парамагнитного резонанса

Спектры получали в сотрудничестве с Овчеренко С. С. в лаборатории магнитной радиоспектроскопии НИОХ СО РАН им. Н. Н. Ворожцова в X-диапазоне (9 ГГц) с помощью ELEXSYS E580 спектрометра («Bruker», США), оборудованном ER 4119HS резонатором и ER 4131VT термостатом. Образцы объемом 20 мкл помещались в капилляры (общий объем 50 мкл). Спектры для калибровочных кривых (водорастворимой спин-метки (см. разд. 3.1.5), ОДН NO•-11, дцОДН gap1-NO• и gap2-NO• (см разд. 3.1.4)) были получены при 9,87 ГГц частоте микроволн, 2 мВ силе микроволн, 10,24 мс временной константе, 20 мс времени конверсии, 1024 точки, 100 кГц частоте модуляции, 0,02 мТ (водорастворимой спин-метки) или 0,05 мТ (ОДН NO•-11, дцОДН gap1-NO• и gap2-NO•) амплитуды модуляции. Параметры для непрерывных ЭПР спектров комплексов Fpg *E. coli* WT или мутантного

варианта Fpg *E. coli* E2Q с дцОДН gap1-NO• или gap2-NO• были получены при 9,87 ГГц частоте микроволн, 20 мВ силе микроволн, 10,24 мс временной константе, 29,40 мс времени конверсии, 1024 точки, 100 кГц частоте модуляции, 0,05 мТ амплитуде модуляции. Все эксперименты выполнялись при 25°C. Непрерывные ЭПР спектры моделировались с использованием программы EasySpin v5.2.36 [170].

3.2.12 Молекулярная динамика

Молекулярно-динамическое моделирование Fpg *E. coli* в комплексе со спин-мечеными олигами было выполнено в НИОХ СО РАН им. Ворожцова в лаборатории магнитной радиоспектроскопии к. х. н. А. В. Шернюковым. Симуляция выполнялась в программном пакете Amber24 [171] с использованием силовых полей: ff14SB [172] для белков, parmbsc1 [173] для ДНК, модифицированного GAFF 1.81 [174] для спиновой метки, zinc AMBER (ZAFF, [175]) для иона Zn^{2+} в Fpg *E. coli*.

Свободный дуплекс gap1-NO• релаксировали методом моделируемого отжига в имплицитном растворителе с последующей симуляцией в эксплицитной воде длительностью 100–500 нс на конфигурацию; для анализа использовались последние 50 нс траекторий.

Визуализация результатов выполнялась в PyMol v3.0.3 («Schrödinger», США).

МД моделирование мутантных вариантов LlaFpg по тетрапептидной петле 219–222 выполнено в сотрудничестве с к.ф.-м.н. В. М. Голышевым и к.ф.-м.н. А. А. Ломзовым (лаборатория структурной биологии ИХБФМ СО РАН). Стартовые структуры комплексов LlaFpg–ДНК строили на основе кристаллической структуры 1XC8 [125]: полный комплекс белок–ДНК с реальной последовательностью, использованной в экспериментах (включая 8-охоG), предсказывали в AlphaFold3 [176] и совмещали с экспериментальной структурой 1XC8 по C α -атомам. При необходимости целевой нуклеотид заменяли на другой повреждённый, а торсионный угол χ подстраивали, переводя 8-охоG, ohU или остающийся напротив повреждения аденин в *анти*- либо *син*-конформацию; остатки 219–222 заменяли в UCSF Chimera [177]. Таким образом, каждый вариант LlaFpg моделировали в 11 комплексах — 8-охоG(*анти*)/C(*анти*), 8-охоG(*син*)/C(*анти*), ohU(*анти*)/C(*анти*), ohU(*син*)/C(*анти*), ohU(*анти*)/A(*анти*), ohU(*син*)/A(*анти*), ohU(*анти*)/A(*син*), ohU(*син*)/A(*син*), AP/C, AP/A(*анти*), AP/A(*син*), — что в сумме составило 66 траекторий. В качестве замены альдегидного AP-сайта использовали (3-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)метилфосфат (THF).

Состояния протонирования задавали для pH 7,5 с помощью pdb2pqr v3.7.1 [178], кроме Pro1 (моделировали депротонированным) и Glu2 (протонированным) — в соответствии с их предкаталитическими состояниями ионизации [179]. Использовали силовое поле

AMBER: ff19SB [180] для белка, OL21 [181] для нативной ДНК и modXNA [182] для 8-охоG и ohU; параметры для THF взяты из [183]; для Zn^{2+} применяли `frmod.ionskm_1264_orc`, а для Na^+ — параметры Li/Merz [184]. Системы сольватировали водой OPC (слой 12 Å) с периодическими граничными условиями при 100 мМ Na^+ ; минимизацию проводили по протоколу [185]. МД моделирование выполняли при 310K в NPT-ансамбле в течение 100 нс на комплекс; для анализа использовали последние 50 нс каждой траектории.

Взвешенную сумму популяций конформаций сегмента $^{219}IR...ST^{228}$ рассчитывали с весом w_i для каждого кадра траектории:

$$w_i = \begin{cases} 1, & rmsd_i \leq \mu_{oxoG(syn):C} \\ e^{-\frac{(rmsd_i - \mu_{oxoG(syn):C})^2}{2\sigma_{oxoG(syn):C}^2}}, & rmsd_i > \mu_{oxoG(syn):C} \end{cases}$$

Индекс устойчивости корреляции между конформацией петли и активностью фермента оценивали методом анализа чувствительности с подвыборками Монте-Карло [186]: выборку прореживали, случайным образом удаляя k точек без возвращения, в 500 независимых повторях. Рассчитывали долю устойчивых выборок (RFk) и определяли точки излома (k_{crit}), при которых корреляция перестаёт быть значимой, для уровней значимости $\alpha = 0,05, 0,01, 0,005$ и $0,001$. Индекс устойчивости корреляции (доля точек данных, которую можно удалить до потери значимости корреляции) рассчитывали как $RI = k_{crit}/N$, где N — число точек данных в анализе (в нашем случае $N=30$).

3.2.13 Получение субстратов, содержащих АП-сайт

ОДН, содержащие АП-сайты, получали непосредственно перед экспериментом. Для этого дцОДН 23U//compC, дцОДН 23U//compA, либо оцОДН 23U (см. разд. 3.1.4, Таблица 7), содержащие урацил, были обработаны 2 ед. акт. UNG в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 1 мМ EDTA и 1 мМ DTT, при 37°C в течение 30 мин. Полученная смесь, содержащая ОДН с АП-сайтом (23АП//compC, или 23АП//compA, или оц-23АП), использовалась для дальнейших экспериментов. Оценку глубины протекания реакции производили путем обработки аликвоты 100 мМ NaOH 2 мин при 95°C и разделением продуктов реакции с помощью ПААГ гель-электрофореза.

3.2.14 Получение ДНК-белковых сшивок

Для аналитического получения ДНК-белковых сшивок (для LlaFpg), реакционная смесь содержала 50 нМ радиоактивно меченного (см. разд. 3.2.5) дцОДН 23АП//compC (см. разд. 3.1.4, Таблица 7) и 10-ти кратный избыток фермента WT Fpg *E. coli* или WT Fpg *L. lactis*) 25 мМ Na-фосфатный буфер, 100 мМ NaBH₄, 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT. Реакция протекала 30 мин при 37°C, остановка реакции осуществлялась добавлением равного объема SLB

(см. разд. 3.1.2) и прогревом образцов в течение 1 мин при 95°C. Продукты реакции разделяли с помощью гель-электрофореза в буферной системе Лэммли и анализировали радиолюминесцентным сканированием экрана Image Screen K («Kodak», США) с использованием прибора Typhoon FLA 9500 («GE Healthcare», США). Для количественной обработки данных использовали программу «Quantity One» v 4.6.3 («Bio-Rad», США) и SigmaPlot 11.0 (SPSS, США).

Для получения ДНК-белковой сшивки в препаративных количествах реакционная смесь содержала 5 мкМ дцОДН для кристаллизации (см. разд. 3.1.4, Таблица 7), 5-ти кратный молярный избыток *Nei* *E. coli*, 25 мМ Na-фосфатный буфер, 50 мМ NaCl, 50 мМ NaBH₄, 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, реакция протекала 30 мин при 37°C. Для остановки реакции добавляли раствор глюкозы до конечной концентрации 400 мМ и инкубировали смесь в течение 10 мин при 37°C. Далее полученную ДНК-белковую сшивку очищали хроматографически.

3.2.15 Хроматографическое выделение ДНК-белковой сшивки

Для получения гомогенного препарата ДНК-белковой сшивки *Nei* с ДНК реакционную смесь растворяли в буфере А, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂ и 1 мМ DTT. Перед нанесением на колонку, раствор фильтровали с использованием фильтра Millex HV («Millipore», США) с размером пор 0,22 или 0,45 мкм. Раствор наносили на предварительно уравновешенную буфером А колонку «MonoQ 5/50 GL column» («Danaher», США, 1 мл) (см. разд. 3.2.3), колонку промывали 5 мл буфера А и элюировали ДНК-белковую сшивку градиентом концентрации NaCl от 100 мМ до 1 М в буфере А общим объемом 10 мл. Выделение проводили с использованием системы АКТА purifier («GE Healthcare», США). Фракции собирали с использованием коллектора фракций Frac-920 («GE Healthcare», США). Фракции основного пика поглощения на 280 нм, содержащие целевую ДНК-белковую сшивку, элюировались при ~460 мМ NaCl. Фракции анализировали гель-электрофорезом в буферной системе Лэммли с последующим окрашиванием кумасси. Фракции, содержащие целевую ДНК-белковую сшивку, объединяли и концентрировали с помощью центрифужных концентраторов Amicon («Millipore», США) до 1,7–2,8 мг/мл.

3.2.16 Кристаллизация ДНК-белковых сшивок *Nei E. coli* и сбор дифракционных данных

Кристаллы ДНК-белковых сшивок были получены при 21°C методом сидячей капли: ДНК-белковые сшивки, полученные в разд. 3.2.15, смешивались с 0,1 М Na-цитратным бу-

фером (pH 6,0–7,0) и 1,0–2,4 М (NH₄)₂SO₄. Для кристаллизации использовались 96-ти луночные планшеты с 3-мя каплями («Molecular Dimensions», Великобритания), смешивание раствора ДНК-белковой сшивки и раствора осадителя и отсаживание капель осуществлял робот NT8v4 («Formulatrix», Индонезия). Суммарный объем капель составлял 300 нл, смешивание раствора ДНК-белковой сшивки и раствора осадителя осуществлялось в соотношениях: 1:2, 1:1 и 2:1. Кристаллы вырастали за одну-две недели. Сбор дифракционных данных осуществлялся на станции BL02U17 Шанхайского источника синхротронного излучения (Shanghai Synchrotron Radiation Facility, SSRF) в сотрудничестве с И. А. Капрановым и д. ф-м. н. В. И. Борщевским из центра исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний (СММ) при МФТИ.

3.2.17 Обработка дифракционных данных и получение модели кристаллической структуры ДНК-белковых сшивок *Nei E. coli*

С помощью программы XDS [187] обрабатывались (интегрировались интенсивности всех рефлексов, а также осуществлялся подсчет статистики на каждой оболочке) наборы дифракционных имиджей для определения набора имиджей с лучшим статистически значимым разрешением ($CC(1/2) \geq 12,5$, $I/\sigma \geq 1$), в результате чего был получен файл XDS_ASCII.HKL.

Далее в программе Aimless (часть пакета программ CCP4, [188]) проводилось шкалирование интегрированных данных (XDS_ASCII.HKL) с получением значений разрешения модели кристаллической структуры, основываясь на статистике ($CC(1/2) \geq 12,5$), с получением итогового mtz-файла.

В CCP4cloud [189] с помощью MR phaser [190] проводилось молекулярное замещение, с использованием полиаланиновой модели кристаллической структуры ДНК-белковых сшивок *Nei E. coli* из Protein Data Bank (PDB ID: 1K3W). С помощью modelcraft [191,192] была перестроена модель с учетом реальных боковых радикалов аминокислотных остатков последовательности.

На следующем шаге осуществлялось уточнение модели, которое проводилось с помощью Refmac5 [193] и чередовалась с достроением модели в Coot [194], до финальных значений $R \leq 0,1 \times \text{финального разрешения}$, $R_{\text{free}} \approx R + 0,05$.

Качество финальных моделей проверяли с помощью phenix.molprobity [195].

После валидации полученные структуры были депонированы лично соискателем в Protein Data Bank [196].

Для анализа финальных структур и последующей визуализации данных использовались программы: Pymol («Schrödinger», США), PDBePISA [197], 3DNA [198], MDTRA [199] и ProteinTools [200].

3.2.18 Анализ каталитической активности Nei *E. coli* на двуцепочечном ДНК-субстрате

Для определения активности Nei *E. coli* на дцОДН (см. разд. 3.1.4, Таблица 7) реакционная смесь объемом 10 мкл содержала: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 нМ радиоактивно меченного (см. разд. 3.2.5) дцОДН и 5 нМ Nei *E. coli*. Реакцию проводили 5 мин при 37°C и останавливали добавлением 5 мкл FDLB (см. разд. 3.1.2). Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20%-м ПААГ в денатурирующих условиях с последующей визуализацией радиолюминесцентным сканированием экрана Image Screen K («Kodak», США) системой Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare, США). Результаты обрабатывали с использованием программы «Quantity One» v 4.6.3 («Bio-Rad», США) и SigmaPlot 11.0 (SPSS, США).

3.2.19 Определение кинетических параметров Nei *E. coli* на дцОДН

Для определения кинетических параметров Nei *E. coli* на радиоактивном меченном дцОДН (см. разд. 3.2.5) в условиях стационарной кинетики Михаэлиса–Ментен использовали реакционную смесь суммарного объема 10 мкл, содержащую 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 3–100 нМ радиоактивно меченного (см. разд. 3.2.5) дцОДН (см. разд. 3.1.4, Таблица 7) и 2 нМ Nei *E. coli* (для субстратов ohU//T), 4 нМ Nei *E. coli* (для субстратов ohU//EtU) или 5 нМ Nei *E. coli* (для субстратов ohU//AlkU). Смесь инкубировали 5 мин при 37°C и останавливали реакцию добавлением 5 мкл FDLB (см. разд. 3.1.2). Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20%-м ПААГ в денатурирующих условиях и визуализировали как описано в разд. 3.2.5. Количество образуемого продукта не превышало 15% от общей концентрации субстрата. Значения констант K_M и k_{cat} получали с помощью аппроксимации на кривую нелинейной регрессии гиперболической функции в программе SigmaPlot v11.0 (SPSS, США).

3.2.20 Анализ термической денатурации вариантов Fpg *L. lactis* с помощью высокоскоростной дифференциальной сканирующей флуориметрии

Анализируемая смесь содержала один из мутантных вариантов белка LlaFpg (Таблица 6) в концентрации 5 мкМ, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT. Смесь объемом 10 мкл отбирали с помощью стеклянного капилляра и анализировали

с помощью прибора Tycho NT.6 («NanoTemper», Германия). Термическую денатурацию проводили в режиме повышения температуры с 35°C до 95°C со скоростью 30°C/мин. В ходе анализа при возбуждении на длине волны 290 нм следили за изменением флуоресценции остатков ароматических аминокислот (Trp и Tyr) в составе фермента на длинах волн 330 нм и 350 нм, а также за их соотношением. Положение точки перегиба кривых денатурации, соответствующее температуре плавления (T_m) белковой глобулы в модели двух состояний, рассчитывали с помощью встроенного программного обеспечения прибора.

3.2.21 Оптимизация условий стационарной кинетики ферментативной реакции, катализируемой мутантными вариантами Fpg *L. lactis*

Для определения кинетических параметров ферментативной реакции в условиях стационарной кинетики Михаэлиса–Ментен необходимо было подобрать оптимальные концентрации мутантных форм ДНК-гликозилаз, при которых доля образуемого продукта в процессе инкубации не превышала 20%. Для этого реакцию проводили при 37°C в течение 5 мин в смеси общим объемом 10 мкл, содержащей 50 нМ ОДН-субстрат (23АП//compC, или 23АП//compA, или оц-23АП, или 23ohU//compC (см. разд. 3.1.4)), 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT и один из мутантных вариантов фермента Fpg *L. lactis* (Таблица 6), концентрации которого варьировались от 0,5 нМ до 2000 нМ. Затем реакцию останавливали добавлением равного объема FDLB (10 мкл) и прогреванием при 80°C в течение 1 мин и последующей инкубацией на льду до нанесения проб на гель. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20%-м ПААГ в денатурирующих условиях и визуализировали как описано ранее в разд. 3.2.5. В результате были получены следующие оптимальные для условий стационарной кинетики концентрации мутантных вариантов ДНК-гликозилазы Fpg (Таблица 10).

Таблица 10. Концентрации вариантов LlaFpg для субстратов в условиях кинетики Михаэлиса–Ментен.

Мутантная форма Fpg <i>L. lactis</i>	Оптимальная концентрация фермента для ДНК-субстрата, нМ		
	23АП//compC	23АП//compA	23ohU//compC
EDMM	0,5	1	2
RSAD	0,5	2	5
RQHG	3	5	5
NPGR	1	2	2
WPHG	0,5	2	2
WT	0,5	0,5	2

3.2.22 Определение кинетических параметров вариантов Fpg *L. lactis* с заменами остатков 219-222 в реакции с субстратами 23АП//compC, 23АП//compA и 23ohU//compC

Для определения кинетических параметров мутантных вариантов ДНК-гликозилазы Fpg *L. lactis* с заменами а. о. 219–222 EDMM, NPGR, RSAD, RQHG, WPHG, а также фермента WT на соответствующем радиоактивно меченом дц-ДНК-субстрате (см. разд. 3.1.4) в условиях стационарной кинетики Михаэлиса–Ментен, реакционная смесь суммарного объема 20 мкл содержала: 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, фермент в оптимальной концентрации (см. разд. 3.2.21) и изотопно разбавленный ДНК-субстрат, содержащий во всех реакциях 5 нМ γ [^{32}P]-меченую компоненту (см. разд. 3.2.5), в то время как общая концентрация ДНК-субстрата варьировалась от 5 нМ до 500 нМ. Реакцию проводили 5 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением равного объема FDLB (см. разд. 3.1.2) и прогреванием в течение не более 1 мин при 80°C (для субстратов 23АП//compC и 23АП//compA) или 1 мин при 95°C (для субстрата 23ohU//compC) с последующей инкубацией образцов на льду. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20%-м ПААГ в денатурирующих условиях и визуализировали как описано в разд. 3.2.5. Обсчет количества образуемого продукта вели как описано в разд. 3.2.18. Полученные данные из 3–6 независимых экспериментов аппроксимировали на кривую нелинейной регрессии гиперболической функции ($v = \frac{k_2[E][S]}{K_M + [S]}$, в координатах зависимости скорости реакции от концентрации субстрата) в программе SigmaPlot v11.0 (SPSS, США). В случаях, когда насыщение фермента субстратом не было достигнуто, было невозможно определить отдельно значения K_M и k_2 , поэтому определяли отношение $\frac{k_2}{K_M}$ (константу эффективности K_{SP}), которое получали с помощью расчета тангенса угла наклона линейного участка зависимости скорости реакции от концентрации субстрата.

3.2.23 Определение кинетической константы k_2 вариантов Fpg *L. lactis* с заменами остатков 219-222 в реакции с 8-охоG-содержащим субстратом в условиях кинетики одного оборота

Для определения параметра k_2 мутантных вариантов ДНК-гликозилазы Fpg *L. lactis* с заменами а. к. о. 219–222 (Таблица 6) в реакции расщепления флуоресцентно меченого дц-ДНК-субстрата 23oG–FAM//compC (см. разд. 3.1.4) в условиях кинетики одного оборота реакционная смесь объемом 90 мкл содержала: 2 мкМ фермент, 200 нМ дцОДН, 50 мМ

Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT. Реакцию проводили при 37°C, отбирая аликвоты по 10 мкл через определенные промежутки времени с начала реакции (от 30 с до 24 ч для мутантных форм Fpg). Реакцию останавливали, добавляя равный объем раствора 80%-го формамида с 20 mM Na-EDTA и прогревая при 95°C в течение 1 мин. Поскольку фаза всплеска WT ДНК-гликозилазы Fpg *L. lactis* отличалась на несколько порядков от мутантных форм, то для определения k_2 использовали временной интервал реакций от 1 с до 30 с. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20%-м ПААГ в денатурирующих условиях как описано в разд. 3.2.5. Полученные данные из 3–6 независимых экспериментов аппроксимировали на кривую экспоненциального роста ($y = a(1 - \exp(-k_2t))$, в координатах зависимости количества продукта от времени) в программе SigmaPlot v11.0 (SPSS, США).

3.2.24 Комплементационный тест: рифампициновый форвард-тест в *E. coli* CC104 fpg mutY

Работа выполнялась совместно с М. М. Амановой ЛГБИ ИХБФМ СО РАН. Частоту форвардных мутаций к устойчивости к рифампицину определяли по описанной ранее методике [201] с использованием штаммов *E. coli* CC104 (F' (lacproB lacI378 lacZ503) ara Δ(lacproB)XIII rpsL) и CC104 fpg mutY (CC104 fpg::mini-Tet mutY::Kan); последний штамм использовали либо нетрансформированным, либо трансформированным плазмидой pFLAF-CTC-Fpg-Lla, несущей вставку одного из вариантов гена LlaFpg ($n = 5$ для каждого штамма; эксперименты выполняли в разные дни, отдельно засевая независимые колонии из замороженного стока). Достоверность наблюдаемых межштаммовых различий оценивали методом множественных сравнений ANOVA.

Чтобы получить плазмиду, экспрессирующую неактивный LlaFpg (pFLAF-CTC-Fpg-LlaΔH2TH), из плазмиды pFLAF-CTC-Fpg-Lla с помощью эндонуклеазы рестрикции HindIII удаляли 210-нуклеотидный фрагмент. Удаление приводит к утрате аминокислотных остатков 144–213, охватывающих ДНК-связывающий мотив H2tH и α-спираль, предшествующую тетрапептидной петле. Полученный делеционный вариант фермента полностью лишён каталитической активности и используется как отрицательный контроль в комплементационном тесте. Рестрикция ферментом HindIII и лигирование выполнялась М. М. Амановой.

Для подтверждения продукции гетерологичного белка в клетках, осадки клеток, выросшие в 20-мл LB, лизировали ультразвуком в 1 мл буфера TE ($\times 1$), с добавлением 200 mM NaCl. Для подтверждения продукции мутантных белков *in vivo* (по аналогии с протоколом [202]) реакционная смесь (10 мкл) содержала 50 нМ соответствующего меченого дуплекса

8-oxoG//C, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 6 mM EDTA, 1 mM DTT и 5 мкл лизата. Реакцию проводили в течение 30 мин и анализировали глубину протекания реакции с помощью разделения продуктов в 20%-м денатурирующем ПААГ с последующей визуализацией как описано в разд 3.2.5.

4 Результаты и обсуждение

4.1 Изучение электростатического потенциала в активном центре EsoFpg с помощью pH-чувствительной нитроксильной спин-метки, конъюгированной с ДНК-лигандом

Каталитический механизм ДНК-гликозилаз суперсемейства H2tH в целом хорошо изучен и подробно описан в Литературном обзоре (см. разд. 2.3.3.4.3). Его функциональное ядро — *N*-концевой пролин-глутаматный дипептид Pro1–Glu2: аминокислота остатка Pro1 атакует C1' повреждённого нуклеотида, а остаток Glu2 — по совокупности структурных, кинетических и расчётных данных — переносит протон на O4' дезоксирибозы и одновременно стабилизирует переходное состояние. Сама нуклеофильная атака идёт в направлении C1' → O4' с участием молекулы воды [145,150,203]. Молекулярно-динамические и квантово-механические (КМ/ММ) расчёты pK_a остатков Pro1 и Glu2 демонстрируют, что взаимная активация остатков Pro1 и Glu2 запускает катализ [179]. Однако, прямого экспериментального подтверждения изменённой ионизации остатков Pro1–Glu2 в составе активного центра до сих пор получено не было.

Прямое измерение состояний ионизации отдельных остатков в белок–ДНК-комплексах методически затруднено. ЯМР требует больших количеств изотопно-меченного белка и ограничен массой комплекса (~30–50 кДа); традиционные расчётные методы (Пуассон–Больцман, pK_a -предсказание) опираются на статические структуры и эмпирические потенциалы [204,205]. Альтернатива таким методам — ЭПР-спектроскопия с использованием pH-чувствительных нитроксильных спин-меток. Радикальный центр такой метки содержит ионизируемую группу с pK_a в физиологическом диапазоне; протонирование меняет распределение спиновой плотности и регистрируется как сдвиг изотропной константы сверхтонкого взаимодействия A_N в спектре [206,207]. Метки этого типа уже применялись для измерения поверхностного потенциала липидных бислоев и локальной электростатики в белках и пептидах [208–210]; однако, к ферментам, «работающим» с нуклеиновыми кислотами, они до настоящей работы не применялись.

Таким образом, в рамках текущей работы был разработан подход, чтобы экспериментально оценить ионизированное состояние каталитической пары остатков Pro1–Glu2 в EsoFpg с помощью встраивания нитроксильной pH-чувствительной спин-метки в ДНК-лиганд. Метка сконструирована на основе 4-пирролидино-2,5-дигидроимидазол-1-оксида: эти нитроксиды имеют pK_a в диапазоне 7,0–7,5 и повышенную устойчивость к восстановлению в биологических средах [211]. Синтез сукцинимид-активированного предшественника

метки и её ковалентное присоединение к 5'- или 3'-концу ДНК через гексаметиленовый аминоклипер описаны в разделе «Материалы и методы» (см. разд. 3.1.4). В качестве ДНК-лиганда был выбран дцДНК-дуплекс с одно- или динуклеотидной брешью (Таблица 8), имитирующий продукт β/δ -элиминирования EcoFpg: такой лиганд формирует достаточно стабильный комплекс с ферментом, что ранее показано для родственного BstFpg, для которого получены кристаллические структуры с однонуклеотидной брешью в составе ДНК [145]. Размещение метки именно в брешью сближает её с активным центром. Сравнение pH-зависимости спектров для комплексов фермента WT и каталитически неактивного мутанта E2Q позволяет напрямую отнести наблюдаемые электростатические изменения к состоянию ионизации каталитической пары а. к. о. Pro1–Glu2.

4.1.1 Связывание EcoFpg с дцДНК-лигандами, содержащими брешью со спин-меткой

Для размещения спин-метки вблизи активного центра EcoFpg были сконструированы четыре варианта дцДНК-дуплексов на основе последовательности (Рисунок 21), для которой ранее были подробно кинетически охарактеризованы удаления повреждённых оснований [128,212]. Конструкции дцОДН со спин-меткой были организованы следующим образом: брешья длиной один или два нуклеотида, сформированная на этапе сборки дуплекса из 1 комплементарной цепи и двух более коротких цепей, и спин-метка, ковалентно присоединённая через гексаметиленовый аминоклипер к 5'- или 3'-концу ОДН, фланкирующего брешью. Такой набор позволяет одновременно проверить какое из положений метки обеспечивает максимальное сближение с дипептидом Pro1–Glu2 и при этом сохраняется приемлемая стабильность дуплекса. Карман связывания и узнавания повреждения у Fpg, по структурным данным, достаточно просторный и пластичный [150] — это давало основание ожидать, что хотя бы одна из конструкций обеспечит требуемое сближение.

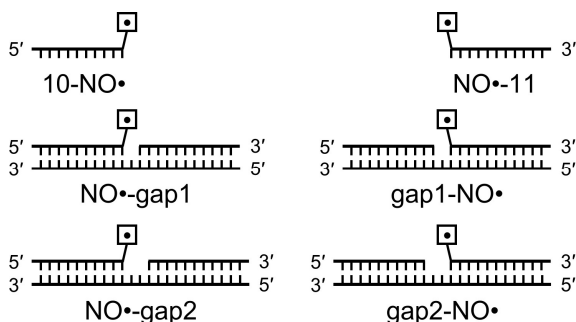


Рисунок 21. Схематичное изображение использованных дцДНК-дуплексов со спин-меткой. Положение нитроксильной спин-метки указано квадратом с точкой внутри.

Сродство EcoFpg к каждой из четырёх спин-меченных конструкций (gap1-NO•, gap2-NO•, NO•-gap1, NO•-gap2) оценено методом микромасштабного термофореза. Для детекции

связывания на 5'-конец комплементарной цепи каждого дуплекса введён флуоресцентный краситель TAMRA. Связывание EсоFpg с каждой из конструкций давало выраженное изменение профиля термодиффузии (Рисунок 22), позволяющее определить K_d . Полученные значения K_d для четырёх дуплексов находились в диапазоне 2,3–3,7 мкМ (Таблица 11): дуплексы с однонуклеотидной брешью связывались несколько прочнее, чем с двунуклеотидной, а положение метки (5'- или 3'-сторона брешии) на сродство практически не влияло. По порядку величины эти значения согласуются с литературными данными по аффинности EсоFpg к неповреждённой дцДНК (0,25–12 мкМ) и к продукту β/δ -элиминирования (1,8–2,0 мкМ), полученными для субстратов разной длины и последовательности другими методами (анализом электрофоретической подвижности и кинетикой остановленной струи [128,165,213]). Систематические количественные расхождения с этими данными ожидаемы: микромасштабный термофорез регистрирует сродство в условиях термодиффузионного градиента, в отличие от подвижности комплекса в неденатурирующем ПААГ электрофорезе (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) и кинетики остановленной струи. Из оценённых K_d следовало, что при концентрациях фермента и ДНК более 10 мкМ доля комплексов превысит 50% — этого достаточно для последующих ЭПР-измерений.

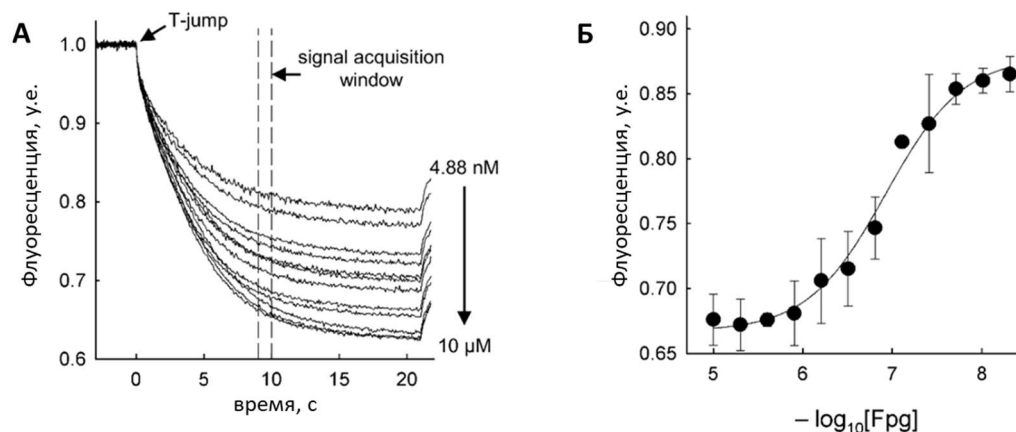


Рисунок 22. Связывание EсоFpg со спин-мечеными ДНК-дуплексами, анализируемое методом микромасштабного термофореза. А — Пример флуоресцентных кривых термодиффузии для дуплекса *gar1*-NO• при варьировании концентрации фермента. Б — Кривая связывания для *gar1*-NO•; показано среднее $\pm$ стандартное отклонение трёх независимых экспериментов, линия — аппроксимация моделью однократного связывания.

Таблица 11. Константы диссоциации комплексов EsoFpg с дцДНК, содержащими одно- или двунуклеотидную брешь со спин-меткой.

Вариант дцДНК	K_d , мкМ ^a
gap1-NO•-TAMRA	$2,5 \pm 0,4$
gap2-NO•-TAMRA	$3,0 \pm 0,3$
NO•-gap1-TAMRA	$2,3 \pm 0,6$
NO•-gap2-TAMRA	$3,7 \pm 0,6$

^a Среднее $\pm$ стандартная ошибка трёх независимых экспериментов.

Для выбора оптимальной конструкции для последующих ЭПР-измерений в составе комплекса с ферментом дополнительно методом непрерывного ЭПР X-диапазона была оценена доля дуплексной формы каждого из четырёх меченных ОДН: наибольшая доля дуплексного состояния (около 86% при pH 7,5) наблюдалась для gap1-NO• и gap2-NO•; эти две конструкции и были выбраны для дальнейших экспериментов. Приоритетным субстратом послужил gap1-NO•: он сочетал максимальную долю дуплекса с наиболее воспроизводимым формированием комплекса с ферментом.

4.1.2 Доступность растворителя к радикальному центру спин-метки в комплексе EsoFpg–ДНК по данным ESEEM

Для проверки того, что радикальный центр спин-метки в комплексе EsoFpg–ДНК действительно расположен на границе фермент–ДНК, а не экспонирован в раствор, доступность растворителя была измерена методом ESEEM. Метод чувствителен к концентрации дейтерированных молекул растворителя в радиусе ~ 5 Å от радикального центра и ранее применялся для оценки гидратации модельных мембранных систем [214]. После калибровки ответа метода на свободной спин-метке в смесях H₂O/D₂O с глицерином/глицерином-d8 (см. разд. 3.2.10) был установлен линейный отклик ESEEM-амплитуды на объёмные доли дейтерированных компонентов (Таблица 9):

$$A = \alpha_{\text{obs}} \times (0.942 \times d(\text{D}_2\text{O}) + 1.271 \times d(\text{глицерин-d8}))$$

где $d(\text{D}_2\text{O})$ и $d(\text{глицерин-d8})$ — объёмные доли D₂O и глицерина-d8 соответственно, α_{obs} — наблюдаемый фактор доступности растворителя, а коэффициенты 0,942 и 1,271 получены из линеаризации экспериментальной зависимости.

Эксперименты выполнены в водно-глицериновой смеси 1:1 (v/v) для свободного ОДН NO•-11, для дуплексов gap1-NO• и gap2-NO•, а также для комплексов этих дуплексов с EsoFpg WT и каталитически неактивным мутантом EsoFpg E2Q. Для всех образцов с ферментом долю связанной с белком метки независимо оценивали по данным непрерывного ЭПР при комнатной температуре (см. разд. 3.2.11) и использовали для коррекции α_{obs} на вклад несвязанной фракции:

$$\alpha_{\text{Fpg-ДНК}} = \frac{\alpha_{\text{obs}} - \alpha_{\text{obs, ДНК}} \times (1-p)}{p}$$

где $\alpha_{\text{obs, ДНК}}$ — α_{obs} для соответствующего ДНК-лиганда без фермента, а p — доля метки в составе комплекса.

Для свободных NO•-11, gap1-NO• и gap2-NO• значения α_{obs} составили ~0,8 (Таблица 12), что отвечает радикальному центру, преимущественно экспонированному в раствор. Связывание EcoFpg — как WT, так и E2Q — существенно снижало доступность метки растворителю: значения $\alpha_{\text{Fpg-DNA}}$ для всех четырёх комплексов лежали в узком диапазоне 0,41–0,52, без значимой зависимости от длины бреши (1 или 2 нт) или варианта фермента. Отсюда следует, что в комплексе EcoFpg–ДНК спин-метка существенно изолирована от объёмного растворителя и располагается на границе раздела белок–ДНК. Однако ESEEM по построению регистрирует только степень изоляции от растворителя, а не положение метки относительно конкретных остатков белка — формально метка может находиться на любой обводнённой границе раздела фермент–ДНК. Для прямой оценки её положения относительно дипептида Pro1–Glu2 было выполнено независимое МД-моделирование (см. разд. 3.2.12), описанное далее.

Таблица 12. Доступность растворителя к радикальному центру спин-метки в свободных ДНК-лигандах и в комплексах с EcoFpg по данным ESEEM. Эксперименты при pH 8,14.

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

^а Ошибка оценивалась как 6% от значения амплитуды ESEEM.

^б Оценено из спектров непрерывного ЭПР X-диапазона при комнатной температуре.

^в Доступность растворителя для метки, связанной с ферментом, скорректированная на долю свободной метки.

4.1.3 Молекулярно-динамическое моделирование положения спин-метки в комплексе EcoFpg–ДНК

Для независимой оценки того, насколько близко радикальный центр спин-метки подходит к каталитической паре остатков Pro1–Glu2 в комплексе EcoFpg–ДНК, были выполнены расчёты МД. Спин-метка содержит стереогенный центр и амидную связь с заторможенным вращением, поэтому для каждого комплекса рассматривались четыре её конфигурации — *R-trans*, *S-trans*, *R-cis* и *S-cis*. Стартовой структурой для комплекса EcoFpg–gap1-NO• послужила кристаллическая структура ковалентного комплекса EcoFpg с ДНК (PDB ID: 1K82) [150]. Из неё реконструировали геометрию комплекса с брешь-содержащей ДНК: разорвали ковалентную связь C1'–N(P1) в восстановленном основании Шиффа, смоделировали 3'-конец как продукт β/δ -элиминирования и встроили спин-метку на 5'-конец нуклеотида, фланкирующего брешь, с последующей минимизацией энергии. Траектории длительностью 200 нс при 300 К в эксплицитной воде получены для всех четырёх конфигураций метки; для наиболее энергетически выгодной *R-trans* конфигурации дополнительно набрана расширенная траектория длительностью 1,6 мкс.

Во всех четырёх независимых траекториях спин-метка занимала примерно одно и то же положение на границе фермент–ДНК. Подвижность гексаметиленового линкера в комплексе была существенно ограничена, и метка следовала за движением белка как единое целое (Рисунок 23). Несмотря на наличие однонуклеотидной брешы, дцДНК сохраняла закрытую В-форму на протяжении всех траекторий — это согласуется с экспериментально оценённой долей дуплексной формы для gap1-NO• (~86%). На расширенной траектории 1,6 мкс ДНК дополнительно сдвигалась в сторону кармана узнавания повреждения, и радикальный центр оказывался в области 3'-гидроксила нуклеотида, фланкирующего брешь. Распределения расстояний от радикального центра до каталитических остатков, рассчитанные по последним 50 нс траектории, оказались унимодальными и составили $8,9 \pm 0,5$ Å до атома азота N-концевой аминогруппы остатка Pro1 и $14,0 \pm 0,7$ Å до атомов карбоксильной группы остатка Glu2 (Oε1, Oε2). Доступность растворителя, рассчитанная для смоделированного ансамбля по той же геометрии, что и в ESEEM-эксперименте, составила 0,56 — в пределах ошибки экспериментально измеренного значения $0,52 \pm 0,06$.

Таким образом, МД моделирование подтверждает, что в комплексе EcoFpg–gap1-NO• радикальный центр спин-метки находится на расстоянии 9–14 Å от каталитической пары остатков Pro1–Glu2; при этом метка не входит непосредственно в активный центр, что согласуется с регистрируемой в ESEEM остаточной (не нулевой) доступностью раствори-

телю. Такое позиционирование оптимально для регистрации электростатического потенциала, создаваемого ионизуемыми остатками активного центра, без прямого участия метки в каталитическом цикле.

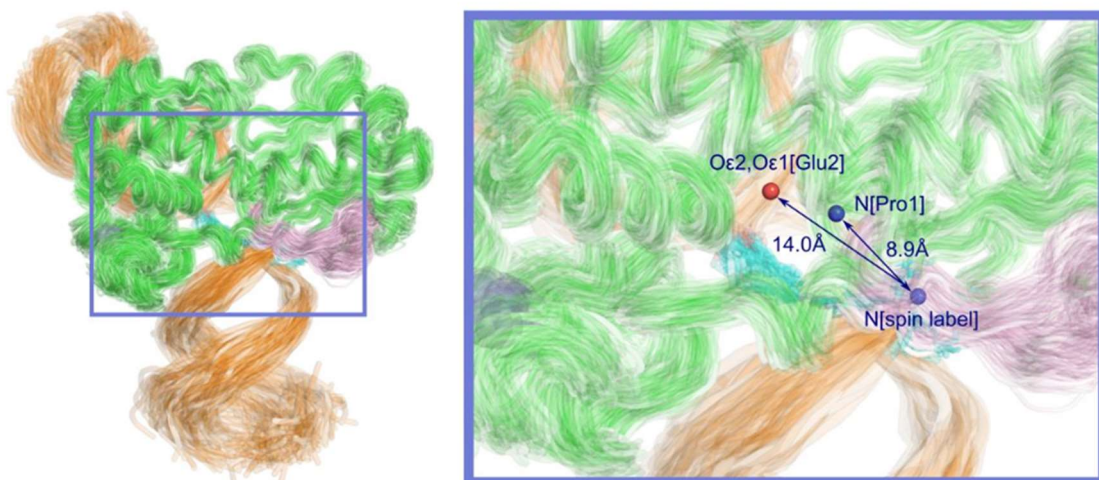


Рисунок 23. МД-ансамбль для комплекса EcoFpg-gar1-NO• в *R-trans* конфигурации спин-метки. Белок EcoFpg окрашен зелёным, петля связывания повреждённого нуклеотида — розовым, ДНК — оранжевым, спин-метка — голубым. Левая панель — наложение 500 снимков последних 50 нс расширенной 1,6-мкс траектории. Правая панель (область, выделенная рамкой) — увеличенное изображение положения спин-метки относительно P1 и E2 с указанием средних расстояний между интересующими атомами.

4.1.4 Сдвиг pK_a в окружении спин-метки при инактивирующей мутации E2Q как индикатор изменения электростатики активного центра EcoFpg

Сродство EcoFpg к меченым дуплексам и положение спин-метки на границе фермент–ДНК вблизи каталитической пары остатков Pro1–Glu2 установлены, что позволяет перейти к ключевому эксперименту — измерению pH-зависимости спектров ЭПР для комплексов с ферментом WT и его каталитически неактивным мутантом E2Q. Сравнение этих pH-зависимостей позволяет напрямую отнести наблюдаемые электростатические изменения к остатку Glu2 и через него — к ионизационному состоянию каталитической пары остатков Pro1–Glu2.

Спектры непрерывного ЭПР X-диапазона были зарегистрированы для всех четырёх комбинаций «вариант фермента × лиганд» (EcoFpg WT и EcoFpg E2Q с gar1-NO• и gar2-NO•) в диапазоне pH 6,60–8,14. Этот диапазон выбран по двум соображениям. Первое: pK_a свободной спин-метки в составе ДНК-дуплекса находится в пределах 7,7–7,8, и регистрация её перехода между протонированной и депротонированной формами требует охвата как минимум одной единицы pH в обе стороны от pK_a . Второе: расчётные оценки pK_a остатка Pro1 в комплексе Fpg–ДНК лежат в диапазоне 5–7,5, а pK_a остатка Glu2 — в диапазоне 5,5–7,5 [179], то есть ионизация каталитической пары ожидается именно в выбранном окне. Нижняя (pH 6,60) и верхняя (pH 8,14) границы заданы сохранением структурной и каталитической стабильности EcoFpg.

Спектры комплексов содержали вклад как самой связанной формы, так и остаточных свободных одноцепочечных и дуплексных компонентов. Из каждого спектра поэтому вычитался спектр дуплексного лиганда той же концентрации без фермента; рН-зависимости спектров для свободных gar1-NO• и gar2-NO• оказались одинаковы (Рисунок 24), и в качестве общей базовой линии для всех четырёх образцов использовался спектр gar2-NO• — это минимизировало ошибку вычитания. Данные на рисунке 24 аппроксимировались уравнением Хендерсона–Хассельбаха:
$$A_N = \frac{A_N(R) + A_N(RH^+) \times 10^{pKa - pH}}{1 + 10^{pKa - pH}}$$

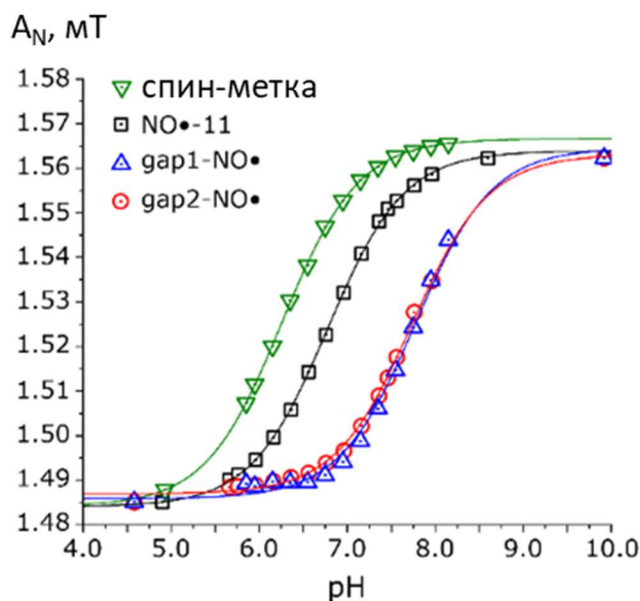


Рисунок 24. Зависимость A_N (усреднённая константа сверхтонкого взаимодействия с атомом азота) от рН для спектров непрерывного ЭПР свободной спин-метки и конъюгированной с ДНК. Спин-метка в составе различных соединений обозначена фигурами различных цветов: свободная спин-метка — перевёрнутые зеленые треугольники, NO•-11 — черные квадраты, gar1-NO• — синие треугольники и gar2-NO• — красные кружки.

Полученные после вычитания спектры комплексов приведены на рисунке 25; характерная анизотропия спектров и положение крайних компонент сверхтонкой структуры зависели от рН.

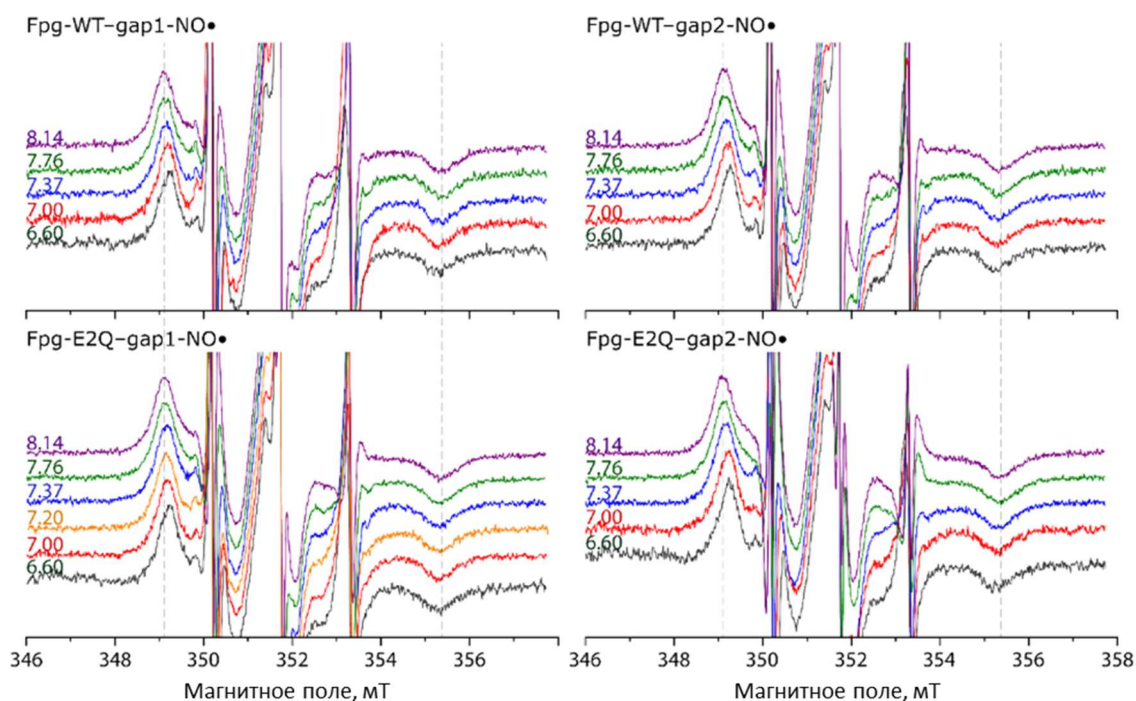


Рисунок 25. Спектры непрерывного ЭПР X-диапазона комплексов EcoFpg WT-gap1-NO•, EcoFpg WT-gap2-NO•, EcoFpg-E2Q-gap1-NO• и EcoFpg-E2Q-gap2-NO• после процедуры вычитания базовой линии при pH 6,60 (чёрный), 7,00 (красный), 7,20 (жёлтый), 7,37 (синий), 7,76 (зелёный) и 8,14 (фиолетовый). Для наглядности спектры смещены к одному и тому же центральному положению. Концентрация комплексов — 50 мкМ.

Расстояние между низкополевым и высокополевым компонентами спектра прямо отражает значение Z-компоненты тензора сверхтонкого взаимодействия с азотом A_{Nzz} , чувствительной к состоянию ионизации спин-метки. Зависимости A_{Nzz} от pH для всех четырёх комплексов аппроксимировались уравнением Хендерсона–Хассельбаха:

$$A_N = \frac{A_{Nzz}(R) + A_{Nzz}(RH^+) \times 10^{pK_a - pH}}{1 + 10^{pK_a - pH}}, \text{ с фиксированными значениями } A_{Nzz}(R) = 3,592 \text{ мТ и } A_{Nzz}(RH^+) = 3,401 \text{ мТ,}$$

отвечающими, соответственно, депротонированной и протонированной формам спин-метки. Для трёх из четырёх комплексов одна-единственная pK_a удовлетворительно описывала весь набор данных: $6,80 \pm 0,03$ для EcoFpg WT-gap1-NO•, $7,20 \pm 0,06$ для EcoFpg WT-gap2-NO• и $7,23 \pm 0,06$ для EcoFpg E2Q-gap2-NO• (Рисунок 26). Близость pK_a для двух комплексов с двунуклеотидной брешью говорит о том, что в этой геометрии радикальный центр спин-метки расположен слишком далеко от дипептида P1–E2/E2Q, чтобы регистрировать вклад его ионизации в локальный электростатический потенциал.

Принципиально иное поведение демонстрировал комплекс EcoFpg-E2Q-gap1-NO• (Рисунок 26). При pH ниже 7,00 значения A_{Nzz} для него совпадали со значениями для аналогичного комплекса с ферментом WT. В диапазоне pH 7,00–7,37 на pH-зависимости A_{Nzz} регистрировался отчётливый перегиб (показан стрелкой на рисунке 26Б), после которого

значения для E2Q-комплекса плавно переходили на ту же кривую, что и для обоих комплексов с динуклеотидной брешью. Аппроксимация всей кривой одной pK_a в этом случае была неудовлетворительной; данные хорошо описывались сигмоидальной функцией с двумя pK_a — это соответствует наличию буферной ёмкости в окрестности pH 7,2, как ранее наблюдалось для гидратированных поверхностей сшитых полимеров и мезопористых материалов с ионизируемыми группами вблизи радикального центра спин-метки [215,216].

Сдвиг pK_a , регистрируемый pH-чувствительной нитроксильной спин-меткой, складывается на полярностный и электростатический вклады: $\Delta pK_a = \Delta pK_a^{\text{pol}} + \Delta pK_a^{\text{el}}$. Электростатический вклад связан с поверхностным потенциалом ψ соотношением $\Delta pK_a^{\text{el}} = \frac{e\psi}{\ln(10)kT}$ (e — элементарный заряд, k — постоянная Больцмана, T — температура) [206,217]. При сравнении комплексов EcoFpg-WT и EcoFpg-E2Q с gap1-NO• в первом приближении полярностным вкладом можно пренебречь: рентгеноструктурные сравнения комплексов WT и E2Q показывают, что замена не вызывает заметных конформационных перестроек активного центра [137], а замена $\text{COO}^- \rightarrow \text{CONH}_2$ практически изоморфна по объёму, то есть гидрофобное окружение и геометрия кармана в окрестности спин-метки сохраняются. В этом приближении весь наблюдаемый сдвиг следует относить к электростатическому вкладу: смещение pK_a метки в основную сторону на $\sim 0,5 \pm 0,1$ единицы при pH $> 7,37$ отвечает изменению локального поверхностного потенциала на величину $\psi \approx -30 \pm 6$ мВ при переходе от EcoFpg-WT к EcoFpg-E2Q. Это значение — верхняя оценка чисто электростатического вклада: остаточный сдвиг ΔpK_a^{pol} , связанный с заменой ориентированного диполя карбоксилата на диполь амидной группы, в данной схеме не отделяется от электростатического и должен учитываться при дальнейших количественных сравнениях.

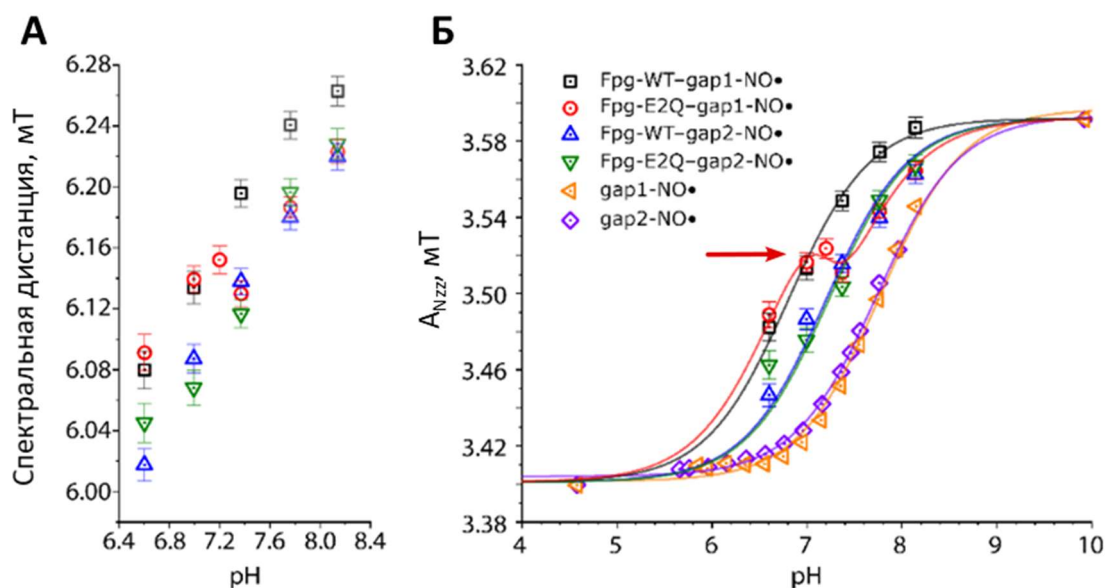


Рисунок 26. А — Зависимость расстояния между низкополювым и высокополювым компонентами спектра непрерывного ЭПР от pH для комплексов EcoFpg WT-gap1-NO• (чёрные квадраты), EcoFpg E2Q-gap1-NO• (красные кружки), EcoFpg WT-gap2-NO• (синие треугольники) и EcoFpg E2Q-gap2-NO• (перевернутые зелёные треугольники) при pH 6,60–8,14. Красной стрелкой отмечен перегиб на кривой EcoFpg E2Q-gap1-NO• при pH 7,2, отсутствующий у трёх других комплексов. Б — Значения A_{Nzz} , рассчитанные из расстояний на панели А для комплексов и из изотропных значений A_N для свободных дуплексов (gap1-NO• — оранжевые треугольники влево, gap2-NO• — фиолетовые ромбы) из Рисунка 23. Сплошные линии — аппроксимации уравнением Хендерсона-Хассельбаха (см. формулу в тексте) с $A_{Nzz}(R)$ и $A_{Nzz}(RH^+)$ как варьируемыми параметрами для свободных дуплексов и фиксированными значениями $A_{Nzz}(R) = 3,592$ мТ, $A_{Nzz}(RH^+) = 3,401$ мТ для комплексов;

На спектрах приведена регистрация непосредственно только спин-метки, а наблюдаемая по сдвигу A_{Nzz} величина — это pK_a самой нитроксильной группы в её локальном электростатическом окружении. Эта pK_a интегрально отражает потенциал, создаваемый всеми заряженными группами в радиусе порядка дебаевской длины вокруг радикального центра, и потому не равна pK_a какого-либо одного остатка белка или ДНК. Природа репортёра объясняет, почему систематический разбор данных требует не одной, а серии контрольных измерений.

Полученный набор pK_a образует естественный градиент влияния электростатического окружения на спин-метку (Рисунок 25 и Рисунок 26Б). Свободная метка в составе дцДНК-дуплекса даёт pK_a 7,7–7,8, но при связывании EcoFpg WT с gap2-NO• наблюдаемая pK_a составляет $7,20 \pm 0,06$ — снижение на ~0,5 единицы по сравнению со свободным дуплексом отражает электростатический вклад белок-связывающего канала в целом, без значимого вклада со стороны дипептида Pro1-Glu2 (метка слишком удалена от него в этой геометрии). Сокращение брешы на один нуклеотид (gap1-NO• с EcoFpg WT) даёт дополнительный сдвиг: до $6,80 \pm 0,03$ — именно эта прибавка ~0,4 единицы и относится к электростатическому вкладу остатков активного центра. Замена остатка Glu2 на изоморфный по

объёму, но электронейтральный остаток Gln2 (gap1-NO• с EcoFpg E2Q) приводит к появлению буферного плеча в окрестности pH 7,2, частично возвращающего систему к «дальнему» отклику gap2-комплексов: выпадение карбоксильной группы остатка Glu2 убирает приблизительно ту же добавку, которую даёт сближение метки с активным центром на одну позицию.

Появление буферного плеча у E2Q-комплекса связано именно с ионизацией остатка Pro1, что опирается на отсутствие в окрестности спин-метки других потенциально титруемых групп с pK_a в интервале от 6 до 9. Четыре цистеина EcoFpg координируют ион Zn^{2+} цинкового пальца С-домена (остатки Cys243, Cys246, Cys263, Cys266) [150] и в составе тетраэдрической координации имеют резко сдвинутые pK_a (как правило, < 5), фактически выпадая из титрования в физиологическом окне. Остатков гистидина в активном центре EcoFpg нет вообще. Поверхностные остатки Lys/Arg ДНК-связывающего канала к замене E2Q нечувствительны, и при сравнении WT/E2Q в одинаковых комплексах с ДНК вклад от них не регистрируется. Перераспределение pK_a в окрестности спин-метки, регистрируемое только в комплексе EcoFpg-E2Q-gap1-NO• и только в узком pH-диапазоне 7,00–7,37, наиболее естественно интерпретируется как отклик на изменённую ионизацию P1.

Замены каталитического остатка Glu2 (E2Q, E2K, E2G) описаны как соматические мутации в опухолях и как редкие герминальные варианты в популяции для всех трёх H2tH-гомологов EcoFpg у человека — NEIL1, NEIL2 и NEIL3, причём наиболее частой из них является именно E2Q [218,219]. Полученные в работе данные — первое прямое экспериментальное свидетельство того, что эта замена перераспределяет ионизационное состояние каталитической пары и инактивирует фермент по крайней мере отчасти через утрату активации N-концевого остатка пролина, а не исключительно через прямое выпадение остатка Glu2 из переноса протона на O4'.

Таким образом, представленный подход с конъюгацией спин-метки позволил получить прямое экспериментальное подтверждение того, что в активном центре EcoFpg ионизация каталитической пары остатков Pro1–Glu2 отличается от референсных значений изолированных аминокислот и зависит от наличия остатка Glu2. Более того, разработанный подход — pH-чувствительная нитроксильная спин-метка, ковалентно встраиваемая в брешь ДНК-лиганда, в сочетании с ESEEM-контролем доступности растворителя и МД моделированием положения метки — не привязан к Fpg: он переносится на Nei, человеческие NEIL1–NEIL3 и вообще на любой белково-нуклеиновый комплекс, для которого удаётся собрать лиганд с меткой вблизи интересующего центра.

4.2 Изучение механизма распознавания окислительного повреждения ДНК путём анализа мутантных вариантов LlaFpg с рандомизированными заменами в тетрапептидной петле 219–222

ДНК-гликозилазы суперсемейства H2tH распознают широкий спектр повреждённых при окислительном стрессе пуриновых и пиримидиновых оснований ДНК (см. разд. 2.3.3.4). Для ферментов этого суперсемейства определено более 120 структур — как в свободном состоянии, так и в комплексах с ДНК, — однако механизмы распознавания субстратов по-прежнему до конца не понятны (см. разд. 2.3.3.4.2). Главная причина — особое строение сайта связывания повреждённого основания: он формируется преимущественно гибкой петлёй, остающейся неструктурированной или частично структурированной в большинстве комплексов фермент–ДНК [220,221]. Связывание ДНК с ДНК-гликозилазой происходит на границе между доменами в положительно заряженной бороздке фермента, на дне которой располагается глубокий карман, обеспечивающий комплементарность фермента при связывании с субстратом [150].

Структурные данные не показывают прямого взаимодействия Fpg с атомом О8 8-охоG, который непосредственно отличает повреждение от канонического основания. В нескольких структурах LlaFpg и BstFpg, связанных со специфическими или неспецифическими, содержащими основание субстратами (8-охоG или ohU), петля частично разупорядочена — определяемые остатки или боковые радикалы разрешены не полностью или вовсе отсутствуют [125,137,203]. В комплексах Fpg, не содержащих целевого основания (т. е. с аналогом АП сайта или сшитых после вырезания основания), петля всегда разупорядочена [143,145,150]. При этом, по литературным данным, полная делеция тетрапептида, связывающего повреждённое основание, в EcoFpg приводит к утрате активности по отношению к 8-охоG, но лишь минимально влияет на активность в отношении других субстратов — ФаруG, ФаруА, спириминогидантоина и гуанидиногидантоина (см. разд. 2.3.3.4.1). Петля, следовательно, по-разному вовлечена в распознавание разных субстратов даже в пределах группы окисленных пуринов.

Только три структуры указывают на прямое взаимодействие петли и окислительного повреждения. Структура комплекса LlaFpg с дцДНК, содержащей карбоциклический ФаруG (нерасщепляемый аналог), демонстрирует, что тетрапептидная петля 219–222 LlaFpg координирует именно О6 ФаруG амидными группами пептидного остова [125]. Каталитически инактивированный мутант BstFpg E2Q в комплексе с ДНК, содержащей 8-охоG или 5,6-дигидроурацил (h₂U), демонстрирует ту же координацию: тетрапептидная петля 222–225 связывает либо О6 8-охоG, либо О4 h₂U [137] (Рисунок 27).

На основании этих структур было сформулировано предположение, что несмотря на появление атома кислорода в 8-м положении гуанина, координация повреждённого основания происходит за счёт взаимодействия амидов пептидного остова и О6 8-охоG; роль такого распознавания в общей субстратной специфичности фермента стала предметом проверки. В качестве объекта исследования был выбран LlaFpg: разрешение его структуры в комплексе с FapyG (1,95 Å) [125] выше разрешения структуры BstFpg с 8-охоG (2,34 Å) [137] и позволяет более чётко детектировать ориентацию боковых радикалов а. к. о. и нуклеотидов, что важно при внесении мутаций в последовательность тетрапептидной петли и анализе вклада таких мутаций.

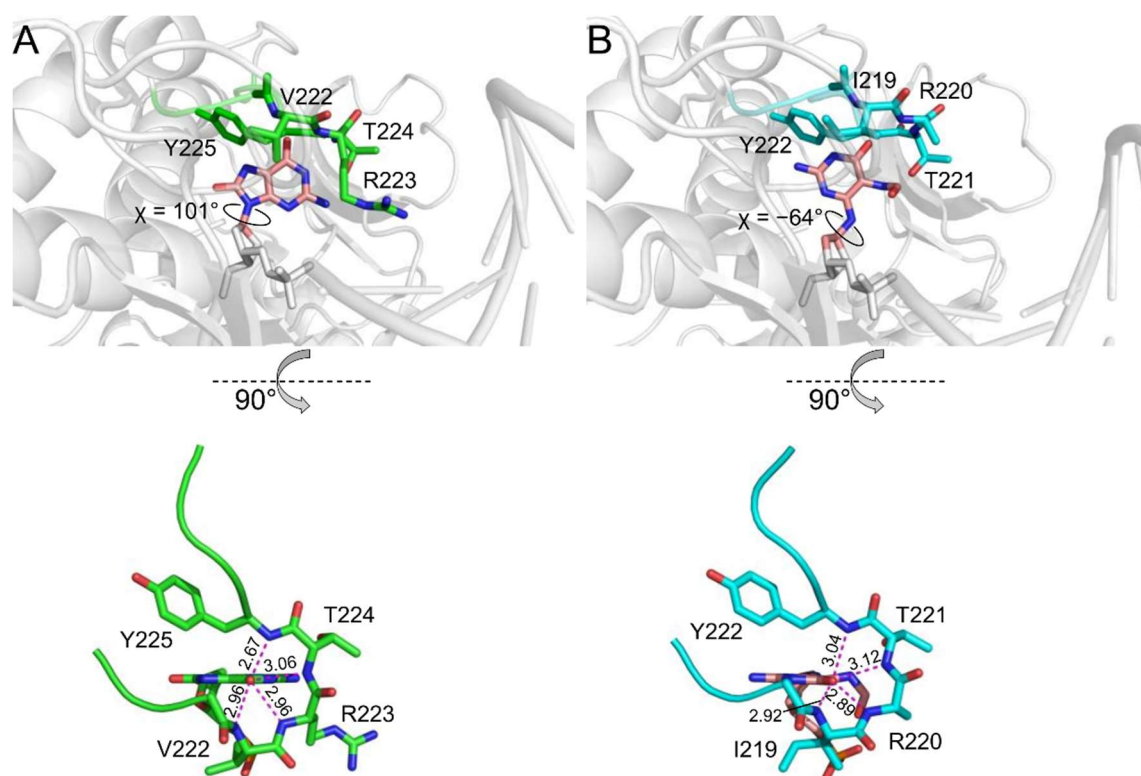


Рисунок 27. Ориентация повреждённого основания в структурах комплекса LlaFpg с ДНК, содержащей карбоциклический аналог FapyG (А; PDB ID 1XC8, [125]), и комплекса BstFpg с ДНК, содержащей 8-охоG (Б; PDB ID 1R2Y, [137]). На нижних изображениях показаны только повреждение и связывающая его петля; расстояния между атомом О6 и атомами азота амидных групп основной цепи указаны в Å.

4.2.1 Анализ консервативности петли LlaFpg, отвечающей за распознавание повреждения

Для проверки гипотезы о вкладе тетрапептидной петли в распознавание повреждённого основания была проанализирована консервативность ее состава в Fpg. Чтобы исключить влияние других гликозилаз суперсемейства H2tH (бактериальный Nei, животные NEIL и растительный/грибной MMH), последовательности отбирали по строгим критериям: N-концевой домен должен идентифицироваться в базе данных консервативных доменов NCBI

как специфический хит семейства cd08966 (EcoFpg-like_N) [222]; вблизи С-конца должен присутствовать мотив -CXXCQ-, относящийся к цинковому пальцу; для обеспечения таксономической сбалансированности выборки оставляли не более одной последовательности на таксономическое семейство (уровень family по NCBI Taxonomy). Было получено 428 последовательностей Fpg. Консервативность анализировали в программах WebLogo [223] и AMAS со стандартным набором свойств аминокислот по Тейлору [224,225], допуская до 2% атипичных остатков в каждой позиции выравнивания.

Распределение длин петли в 428 последовательностях, консенсусный состав по результатам выравнивания и степень консервативности физико-химических свойств аминокислот, картированная на последовательность LlaFpg, представлены на рисунке 28. Хотя петля длиной четыре остатка была представлена в 345 последовательностях из 428 (81%), длина петли варьировала от 2 до 9 остатков (Рисунок 28А). Консервативность собственно последовательности петли тоже умеренная: во второй позиции (остаток Arg220 в LlaFpg) встречается широкий набор полярных и заряженных а. к. о., а в первой (остаток Ile219) и четвёртой (остаток Tyr222) — преимущественно гидрофобные и ароматические. Для такого, казалось бы, важного структурного мотива размер и последовательность оказались довольно вариабельны на фоне других, каталитически важных структурных элементов суперсемейства H2tH, таких как N-концевая каталитическая петля, ДНК-связывающий спираль—два поворота—спираль мотив и мотив цинкового пальца (Рисунок 28В).

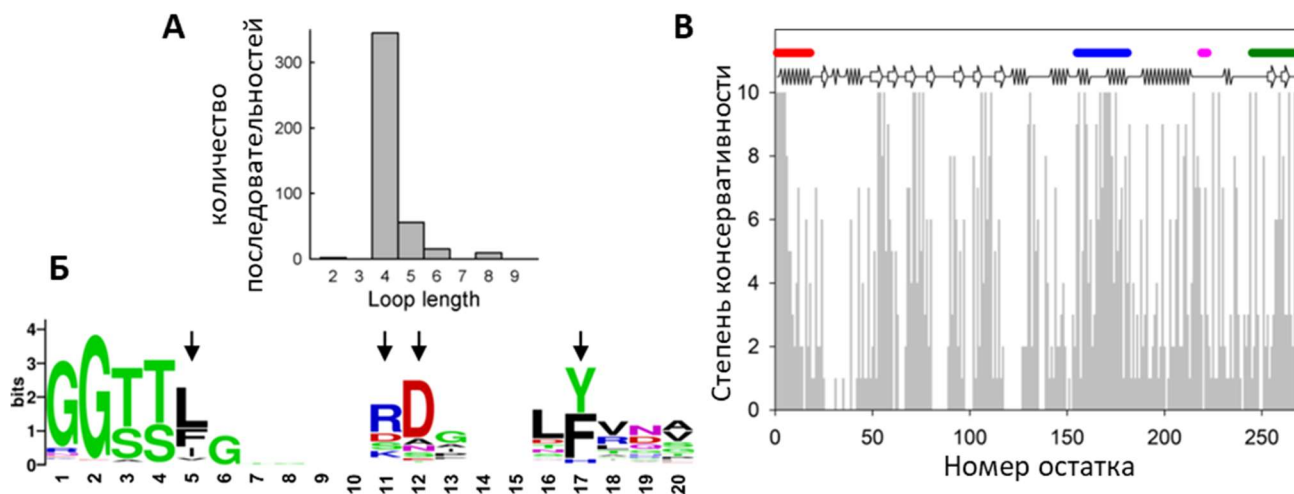


Рисунок 28. А — Распределение длин петли, ответственной за связывание повреждения, в 428 последовательностях Fpg. Б — Консенсусный состав петли (sequence logo), построенный в WebLogo [223] на основании выравнивания тех же 428 последовательностей. Высота столбцов отражает информативность позиции в битах ($\max \log_2 20 \approx 4,32$), высота буквы — частоту, взвешенную на информативность. Стрелки указывают положение остатков петли LlaFpg (²¹⁹IRTY²²²) в выравнивании. В — Сохранение физико-химических свойств аминокислот в тех же 428 белках Fpg, картированное на последовательность LlaFpg. Показана степень консервативности (СК), $0 \leq СК \leq 10$, где 0 означает отсутствие консервативности, а 10 — абсолютную консервативность [224]. Элементы вторичной структуры (α -спирали в виде зигзагов и β -тяжи в виде стрелок) схематически показаны в верхней части графика. Красные, синие, пурпурные и зелёные горизонтальные полосы обозначают

N-концевую каталитическую спираль, мотив спираль–два поворота–спираль, тетрапептидную петлю и мотив цинкового пальца соответственно.

В структурах LlaFpg петля и её продолжение приблизительно до остатка Thr228 принимают две разные конформации. Одна наблюдается в структуре LlaFpg с нерасщепляемым карбоциклическим аналогом FaruG [125]: тетрапептид ²¹⁹IRTY²²² организован так, чтобы удерживать экзоциклический атом кислорода пиримидинового кольца основания, а боковые цепи самой петли практически полностью экспонированы в растворитель. Вторая конформация обнаружена в структуре LlaFpg в комплексе с тетрагидрофураном (PDB ID 1PJJ) [147]: петля отведена от ДНК, и это единственный комплекс LlaFpg–ДНК без повреждённого основания, в котором остов петли полностью прослеживается. В остальных структурах LlaFpg без целевого основания петля разупорядочена. Имеющиеся структурные данные согласуются с моделью, в которой тетрапептидная петля упорядочивается вокруг повреждённого основания при связывании истинного субстрата и разупорядочивается в его отсутствие.

Анализ консервативности петли, участвующей в распознавании повреждения у Fpg, показал, что в большой выборке гомологов последовательность и даже длина исследуемого тетрапептида весьма переменны. Руководствуясь этим наблюдением, а также описанным выше отсутствием контактов боковых цепей с повреждённым основанием в области петли, было принято решение провести рандомизацию а. к. о. петли *in silico*, заместить данный участок тетрапептидами со случайной последовательностью и проанализировать последствия таких замен.

4.2.2 Получение мутантных вариантов LlaFpg по составу тетрапептидной петли и проверка их укладки

Были сгенерированы и выделены пять мутантных вариантов LlaFpg, в которых тетрапептидная петля ²¹⁹IRTY²²² была заменена на рандомизированные последовательности ²¹⁹EDMM²²², ²¹⁹NPGR²²², ²¹⁹RQHG²²², ²¹⁹RSAD²²² и ²¹⁹WPHG²²² (Таблица 6, далее — мутантные варианты по петле; подбор последовательностей и предварительная характеристика выполнены К. А. Макашевой и к. б. н. А. В. Юдиной ЛГБИ ИХБФМ СО РАН). Два из пяти мутантных вариантов — NPGR и WPHG — содержат остаток Pro во второй позиции; пептидная связь, предшествующая остатку Pro, не имеет N–H-донора, что исключает образование одной из четырёх потенциальных водородных связей между амидными группами петли и Об повреждённого основания.

На стадии дизайна мутантов для каждой из пяти выбранных рандомизированных последовательностей было выполнено гомологическое моделирование с помощью сервера

SwissModel [226] и структуры LlaFpg (код PDB 1XC8) в качестве шаблона. Целью моделирования было убедиться, что выбранные тетрапептиды не вносят очевидных стерических конфликтов с соседними структурными элементами петли и не предполагают существенной перестройки остова петли, и ни один из пяти вариантов таких конфликтов не показал. Все пять мутантных вариантов LlaFpg были экспрессированы и очищены по протоколу, разработанному ранее для EcoFpg (см. разд. 3.2.3); гомогенность препаратов была проанализирована с помощью ПААГ ЭФ в буферной системе Лэммли. Степень чистоты всех препаратов составляла не менее 95% (Рисунок 27А).

Дополнительно общее качество полученных белковых препаратов и трёхмерная организация белковых глобул были проверены методом высокоскоростной дифференциальной сканирующей флуориметрии (Рисунок 29Б). Кривые денатурации всех мутантных вариантов имели общую форму, согласующуюся с кривой WT, а их температуры плавления (T_m) лежали в узком диапазоне 56,8–59,0°C (Таблица 13). T_m WT LlaFpg оказалась на 3–5°C ниже, чем у каждого из мутантов. Такое смещение, по-видимому, отражает повышенную жёсткость рандомных тетрапептидов по сравнению с природной петлёй: нативная последовательность ²¹⁹IRTY²²² функционально подвижна и из-за чего возникает энтропийный «штраф», тогда как случайные четыре остатка с большей вероятностью образуют локально более стабильную (хотя и каталитически непродуктивную) укладку. Так или иначе, ни один из мутантов не дестабилизирован относительно WT, и общая организация белковой глобулы у них сохранена.

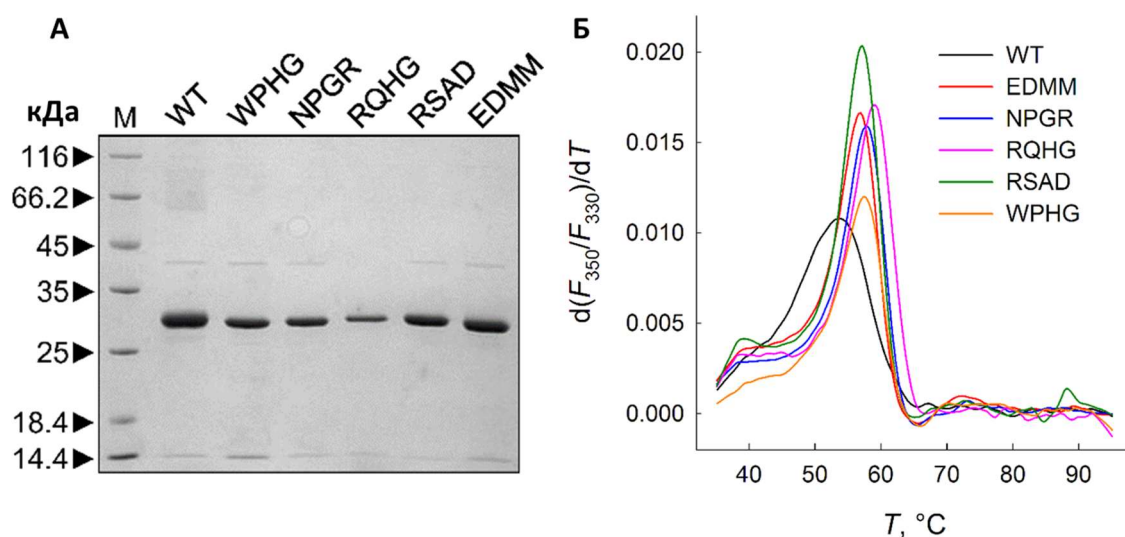


Рисунок 29. Анализ степени чистоты и термостабильности мутантных вариантов LlaFpg по петле 219–222. А — Гель, окрашенный кумасси, после электрофореза препаратов LlaFpg WT и мутантных вариантов в системе Лэммли; М — маркеры подвижности белков; стрелки указывают молекулярную массу в кДа. Расчётная масса целевого белка составляет 30,7 кДа. Б — Кривые термической денатурации мутантных вариантов LlaFpg по данным высокоскоростной дифференциальной сканирующей флуориметрии, представленные как первая производная отношения интенсивностей флуоресценции при 350 нм и 330 нм по температуре. Варианты LlaFpg обозначены линиями разных цветов: EDMM — красная, RSAD — зелёная, RQHG — розовая, NPGR — синяя, WPHG — жёлтая, WT — чёрная.

Таблица 13. Температуры плавления LlaFpg WT и мутантных вариантов по петле 219–222, рассчитанные из данных высокоскоростной дифференциальной сканирующей флуориметрии.

Фермент	T _m , °C
WT	53,8
EDMM	56,8
NPGR	57,8
RQHG	59,0
RSAD	57,1
WPHG	57,5

4.2.3 Влияние замен остатков в тетрапептидной петле LlaFpg на каталитическую эффективность расщепления АП-сайта

Помимо удаления повреждённых оснований, Fpg расщепляет АП-сайты по механизму β - и β/δ -элиминирования, которое инициируется нуклеофильной атакой α -аминогруппы N-концевого остатка пролина Pro1 по C1' остатка дезоксирибозы (см. разд 2.3.3.4.3) [227,228]. Кристаллические структуры комплексов Fpg с нерасщепляемыми аналогами АП-сайтов показывают, что повреждённый нуклеотид оказывается во внеспиральном положении, но не образует прямых контактов с тетрапептидной петлёй, которая в большинстве этих структур разупорядочена [143,145,150]. Активность мутантных вариантов на субстрате, содержащем АП-сайт, соответственно, позволяет проверить, как замены в петле сказываются на стадиях каталитического цикла, в которых сама петля непосредственно не участвует, — нуклеофильной атаке остатка Pro1 и последующих реакциях β/δ -элиминирования.

Активность мутантных вариантов LlaFpg была измерена на дцДНК-субстрате, содержащем АП-сайт напротив цитозина АП//С, полученном обработкой соответствующего урацил-содержащего дуплекса урацил-ДНК-гликозилазой Ung *E. coli*. Практически все мутантные варианты были способны расщеплять АП-сайт содержащий субстрат, хотя и медленнее фермента WT (Рисунок 30Б). Исключением был мутантный вариант RQHG, для которого расщепление было самым слабым, но всё же детектируемым (Рисунок 30А).

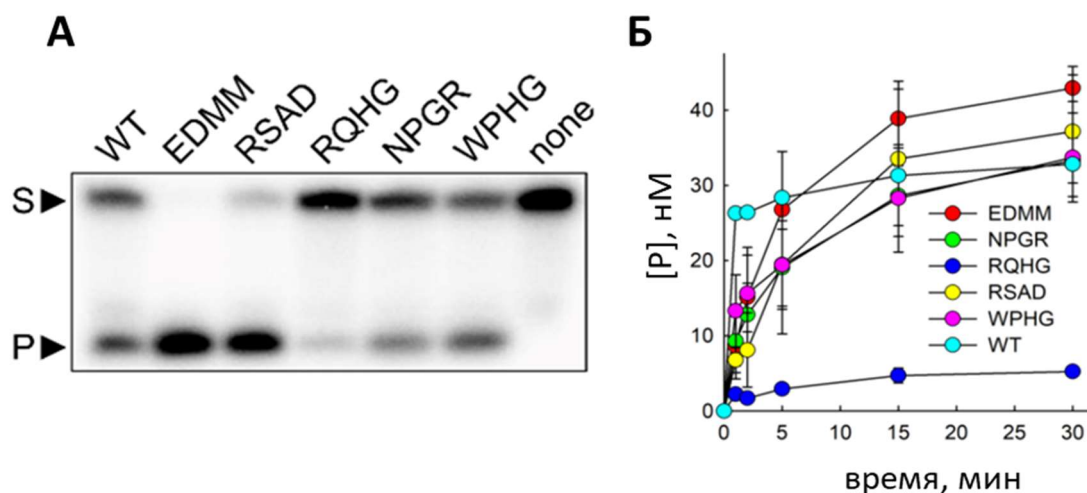


Рисунок 30. А — Радиоавтограф геля после разделения продуктов ферментативной реакции LlaFpg WT и мутантных вариантов с дцДНК-субстратом, содержащим АП//С. Б — Накопление продуктов β/δ -элиминирования АП-сайта во времени. Данные для вариантов LlaFpg обозначены кружками разных цветов: WT — голубым, EDMM — красным, NPGR — зелёным, RQHG — синим, RSAD — жёлтым, WPHG — розовым. Приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего из трёх независимых экспериментов; концентрация субстрата 50 нМ, концентрация фермента 5 нМ.

Для определения кинетических параметров в условиях кинетики Михаэлис–Ментен для каждого мутантного варианта была подобрана концентрация фермента, обеспечивающая линейное накопление продукта во времени (расщепление субстрата $\leq 20\%$ за 5 мин — приближение начальных скоростей v_0 при стационарном режиме $[E] \ll [S]$) (Рисунок 31А); значения концентраций варьировали от 0,5 нМ до 5 нМ. Значения K_M и k_{cat} , полученные аппроксимацией зависимостей v_0 от $[S]_0$ уравнением гиперболической функции (Рисунок 31Б), приведены в таблице 14. Варианты EDMM, NPGR и WPHG сохраняли около половины от активности WT по константе специфичности k_{cat}/K_M ; уменьшение этой величины было связано как с увеличением K_M (EDMM и WPHG), так и с падением k_{cat} (NPGR). Согласно данным по накоплению продукта расщепления АП-сайта во времени (Рисунок 28Б), вариант RQHG проявил наихудшую активность — k_{cat}/K_M для него было в ~ 15 раз меньше, чем у WT, причём замены сильнее сказались на скорости катализа (k_{cat}), чем на сродстве. Для варианта RSAD накопление продукта было самым быстрым, но насыщение субстратом в условиях эксперимента не достигалось. Тогда k_{cat}/K_M определяли из наклона линейной зависимости v_0 от $[S]_0$ (приближение $[S] \ll K_M$); полученное значение оказалось примерно в 7 раз меньше, чем у WT, тогда как сами k_{cat} и K_M для RSAD напрямую сравнивать с остальными вариантами было невозможно. В целом можно отметить, что ожидаемо, белок WT обладал большей активностью на субстрате АП//С относительно мутантных вариантов, однако, для практически всех мутантных вариантов k_{cat}/K_M лежала в пределах одного порядка в сравнении с WT. Таким образом, мутации в тетрапептидной петле не оказывают существенного влияния на эффективность катализа.

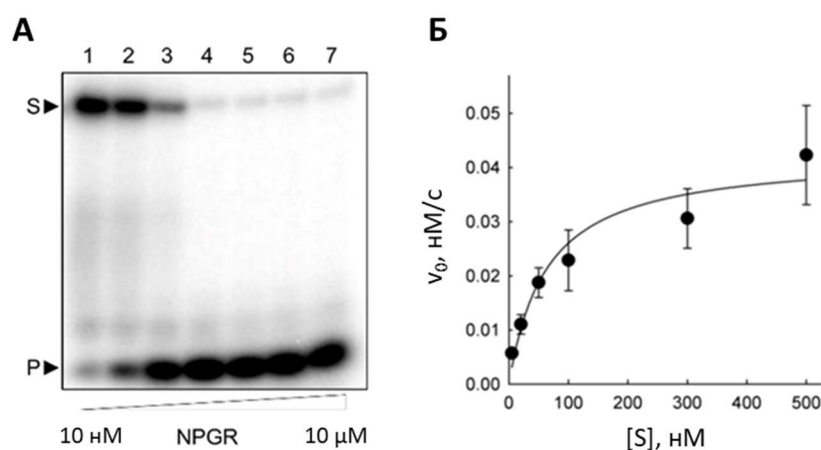


Рисунок 31. А — Пример радиоавтографа геля после разделения продуктов ферментативных реакций варианта NPGR LlaFpg для подбора оптимальных условий регистрации в режиме Михаэлис–Ментен. Б — пример зависимости скорости накопления продукта от концентрации субстрата АП//С для варианта NPGR LlaFpg (1 нМ); данные аппроксимированы уравнением нелинейной регрессии гиперболической функции. Приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего трёх независимых экспериментов.

Таблица 14. Кинетические константы расщепления субстрата АП//С вариантами LlaFpg в условиях стационарной кинетики^а.

Вариант LlaFpg	K_M , нМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мкМ ⁻¹ ·с ⁻¹	Относитель. WT ^б
WT	71 $\pm$ 22	0,10 $\pm$ 0,01	1,4 $\pm$ 0,5	1,00
EDMM	230 $\pm$ 120	0,16 $\pm$ 0,04	0,70 $\pm$ 0,40	0,49
NPGR	62 $\pm$ 23	0,042 $\pm$ 0,005	0,68 $\pm$ 0,26	0,48
RQHG	170 $\pm$ 130	0,016 $\pm$ 0,005	0,094 $\pm$ 0,078	0,07
RSAD	n/s ^в	n/s	0,20 $\pm$ 0,04	0,14
WPHG	140 $\pm$ 70	0,13 $\pm$ 0,02	0,93 $\pm$ 0,49	0,66

^а Значение $\pm$ стандартная ошибка среднего из 3–4 независимых экспериментов.

^б Соотношение k_{cat}/K_M мутантного варианта и WT LlaFpg на том же субстрате.

^в n/s — насыщение субстратом не было достигнуто; k_{cat}/K_M определено из наклона линейной зависимости v_0 от $[S]_0$ (приближение $[S] \ll K_M$).

Чтобы убедиться, что мутации в тетрапептидной петле не изменяют сам механизм расщепления АП-сайта, для каждого мутантного варианта была проведена реакция образования ДНК-белковой сшивки. Промежуточный интермедиат — основание Шиффа (альди-миновая связь) между α -иминогруппой остатка Pro1 и C1' дезоксирибозы — необратимо восстанавливается боргидридом натрия до стабильного третичного амина [229]. Как видно на рисунке 32, в присутствии NaBH₄ все мутантные варианты, как и LlaFpg и EcoFpg WT, образуют медленно мигрирующую полосу, соответствующую ковалентному комплексу фермент–ДНК. Замены в петле, следовательно, не затрагивают каталитическую химию реакции: фермент атакует C1' дезоксирибозы α -иминогруппой остатка Pro1.

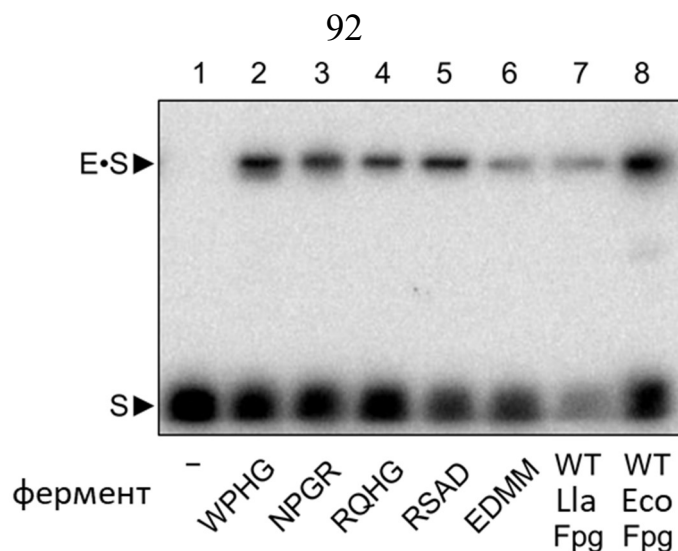


Рисунок 32. Радиоавтограф геля после разделения продуктов образования ДНК-белковой сшивки (E·S) с помощью боргидрида натрия между LlaFpg и EcoFpg WT и мутантными вариантами LlaFpg с субстратом АП//С.

Для оценки сродства мутантных вариантов LlaFpg к ДНК, содержащей АП-сайт, был применён метод задержки в геле (EMSA) их комплексов с дцДНК-дуплексами, содержащими нерасщепляемый структурный аналог полуацетальной формы АП-сайта — THF, напротив С или А (Рисунок 33А). В присутствии всех вариантов LlaFpg в неденатурирующем ПААГ возникала полоса, мигрирующая выше свободного дуплекса и соответствующая комплексу Fpg–дцДНК; при повышении концентрации белка появлялась ещё более медленно мигрирующая полоса, по-видимому, соответствующая неспецифическому связыванию второй молекулы фермента с неповреждённой частью дуплекса. Значения K_d определяли из степени образования быстро-мигрирующего (специфического) комплекса, аппроксимируя кривые связывания моделью одноцентровой гиперболической функции (Рисунок 33Б; Таблица 15). Все мутантные варианты сохраняли сродство к ДНК того же порядка, что и WT LlaFpg: значения K_d лежали в диапазоне 0,4–3,3 нМ для THF//С и 0,6–3,9 нМ для THF//А. Это ожидаемо, поскольку основная часть взаимодействий в комплексе Fpg–ДНК образована электростатическими контактами с фосфодиэфирным остовом ДНК [213], а тетрапептидная петля в эти контакты вкладывает не вносит.

Для двух из пяти мутантов — EDMM и WPHG — формально измеренные величины K_d комплексов с субстратом THF//С оказались в 4–5 раз ниже, чем для WT (0,4–0,5 по сравнению с 2,2 нМ для WT). Поскольку «активная фракция» при низкой каталитической активности должна, наоборот, завышать кажущуюся K_d , это аномалия указывает скорее на иное: мутанты, не способные эффективно завершить катализ на повреждённом субстрате, медленнее диссоциируют от THF-аналога и в равновесном EMSA это регистрируется как кажущееся повышение сродства. Различия между вариантами в условиях EMSA, иными

словами, могут отражать не только сродство, но и время удержания на лиганде; важно отметить, что ни у одного из мутантных вариантов сродство к повреждённой ДНК не подавлено.

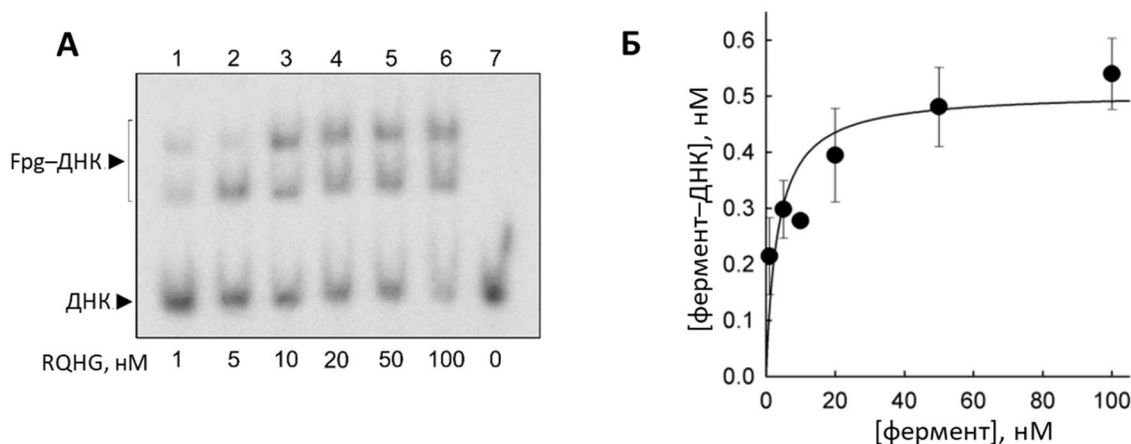


Рисунок 33. Связывание мутантных вариантов LlaFpg с ДНК-субстратом, содержащим THF//C. А — Радиоавтограф геля, демонстрирующий связывание дцДНК с нерасщепляемым аналогом АП-сайта (THF); концентрация фермента указана под изображением геля. Б — Кривая связывания варианта RQHG с ДНК-дуплексом, содержащим THF//C. Приведены средние значения $\pm$ стандартное отклонение из трёх независимых экспериментов; данные аппроксимированы уравнением гиперболической функции связывания.

Таблица 15. Константы диссоциации комплексов вариантов LlaFpg с дцДНК-дуплексами THF//C и THF//A^a.

Фермент	$K_d(\text{THF//C}), \text{нМ}$	$K_d(\text{THF//A}), \text{нМ}$
WT	$2,2 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,4$
EDMM	$0,5 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,4$
NPGR	$3,0 \pm 1,1$	$3,9 \pm 0,6$
RQHG	$3,3 \pm 1,3$	$3,8 \pm 1,0$
RSAD	$1,5 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,3$
WPHG	$0,4 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,2$

^a Значение $\pm$ стандартная ошибка среднего из 3–4 независимых экспериментов.

Таким образом, на стадиях каталитического цикла, в которых тетрапептидная петля непосредственно не участвует (нуклеофильная атака остатка Pro1 на C1' и β/δ -элиминирование), мутантные варианты LlaFpg сохраняют сродство к повреждённой ДНК, базовый каталитический механизм и активность того же порядка, что и WT (за исключением RQHG, для этого мутантного варианта снижение активности было примерно на 1,2 порядка), а значит мутации в петле не приводят к инактивации фермента.

4.2.4 Влияние замен в тетрапептидной петле LlaFpg на специфичность к основанию напротив АП-сайта

В реакциях с 8-охоG-содержащими субстратами Fpg демонстрирует выраженную специфичность к основанию напротив повреждения: расщепление ДНК-субстрата с 8-

охоG//C протекает в значительно большей степени, чем на аналогичном субстрате, но с 8-охоG//A, поскольку удаление 8-охоG из последней пары приведёт к фиксации мутации G//C → T//A [11,12]. Основную роль в распознавании основания напротив выполняет остаток Arg (Arg109 в LlaFpg), который проникает внутрь дуплекса после выворачивания 8-охоG из спирали и образует водородные связи с остатком цитозина, оставшимся внутри (см. разд. 2.3.3.4.1) [143,145,150]. Данные кинетики остановленного потока и МД расчёты указывают, что в случае аденина такие водородные связи не образуются [90,179]. Однако Fpg проявляет меньшее предпочтение к основанию напротив повреждений, которые отличаются от 8-охоG [127]. Предпочтение С над А отражает поэтому (по-крайней мере отчасти) способность фермента стабилизировать внеспиральное положение повреждения в каталитически компетентном состоянии и предотвращать его возвращение в дуплекс (см. разд. 2.3.3.4.1).

Чтобы определить, как замены в тетрапептидной петле LlaFpg сказываются на специфичности к основанию напротив повреждения, в условиях стационарной кинетики были измерены кинетические параметры расщепления дцДНК-субстрата с АП//А (Таблица 16). Для WT LlaFpg значения k_{cat}/K_M для субстратов АП//С и АП//А различались в пределах ошибки измерения — фермент WT на этом субстрате не обнаруживает выраженного предпочтения С над А, в отличие от субстратов с 8-охоG (см. далее). Вариант EDMM по активности на АП//А стал сравним с ферментом WT, тогда как на субстрате, содержащем АП//С, был менее активен. Вариант RSAD продемонстрировал лишь умеренное снижение активности: 4-кратное снижение k_{cat}/K_M относительно WT, но в меньшей степени, чем на субстрате АП//С, поэтому суммарно расщеплял АП//А несколько эффективнее. Варианты NPGR, RQHG и WPHG были более чем в 10 раз менее активны на АП//А по сравнению с диким типом. NPGR и WPHG при этом проявляли заметное предпочтение АП//С над АП//А, тогда как для RQHG падение активности было сравнимым на обоих субстратах. При попарном сравнении активностей на АП//С и АП//А для всех шести вариантов LlaFpg линейной корреляции выявить не удалось (коэффициент корреляции Пирсона $r = 0,561$, $p = 0,247$) (Рисунок 34); статистическая мощность для $n = 6$ невелика, поэтому такое значение p следует трактовать как отсутствие тесной взаимосвязи, но не как её доказательство. Мутанты по петле, таким образом, сохраняют способность расщеплять АП-сайты и напротив С, и напротив А, но единой закономерности по предпочтению одного основания над другим не прослеживается (Рисунок 34).

Таблица 16. Кинетические константы расщепления субстрата АП//А вариантами LlaFpg в условиях стационарной кинетики^а.

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

^а Значение ± стандартная ошибка среднего из 3–4 независимых экспериментов.

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

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

^г n/s — насыщение субстратом не было достигнуто; k_{cat}/K_M определено из тангенса угла наклона прямой на графике v_0 от $[S]_0$.

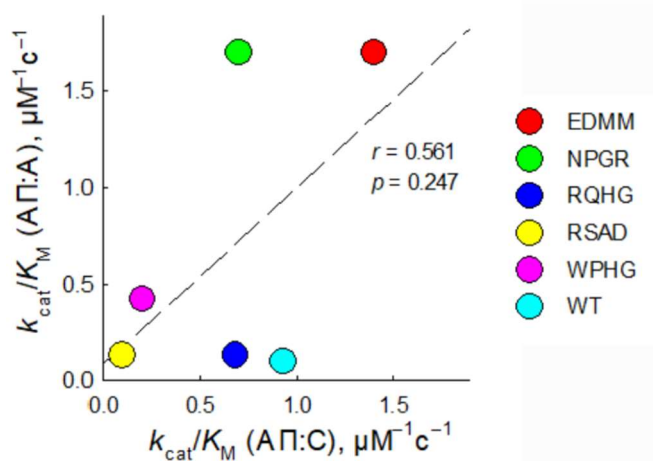


Рисунок 34. Корреляция между активностью вариантов LlaFpg на субстратах АП//А и АП//С. Данные для вариантов LlaFpg обозначены кружками разных цветов: WT — голубым, EDMM — красным, NPGR — зелёным, RQHG — синим, RSAD — жёлтым, WPHG — розовым.

4.2.5 Влияние замен в тетрапептидной петле LlaFpg на эффективность удаления 5-гидроксиурацила

Хотя 8-охоG, ФаруG и ФаруА считаются основными субстратами для Fpg на основании биохимических и генетических данных [124,230–234], фермент способен удалять и ряд окисленных пиримидинов из ОДН субстратов (см. разд. 2.3.3.4). Из высокомолекулярной ДНК, повреждённой γ -излучением или H_2O_2 , эти повреждения, однако, не удаляются, несмотря на то, что окисленные пиримидины присутствуют там в заметных количествах [235]. К таким «неспецифическим» субстратам относятся, в частности, 5,6-дигидроурацил (h_2U) и 5-гидроксиурацил (ohU): на модельных дцДНК они удаляются ферментом так же эффективно, как и 8-охоG, но в составе геномной ДНК, вероятно, остаются нетронутыми [90,212,232,236].

Чтобы оценить, влияют ли замены в тетрапептидной петле на узнавание окисленных пиримидинов, в условиях стационарной кинетики на дцДНК-субстрате с ohU//C были измерены кинетические параметры всех мутантных вариантов LlaFpg (Рисунок 35, Таблица 17). Все мутантные варианты сохраняли каталитическую эффективность того же порядка, что и WT: EDMM, NPGR и WPHG — в 3,4–4,3 раза ниже по k_{cat}/K_M ; для RSAD и RQHG падение активности было более выраженным, в 7,7 и 17 раз соответственно. Активности на субстратах ohU//C и АП//С для всех шести вариантов LlaFpg оказались согласованными (Рисунок 36, коэффициент корреляции Пирсона $r = 0,870$, $p = 0,0243$); с учётом малого количества вариантов LlaFpg ($n = 6$) эту корреляцию следует рассматривать как иллюстративную, но согласованное изменение активности на двух разных типах субстрата у одних и тех же мутантов хорошо видно из самих данных.

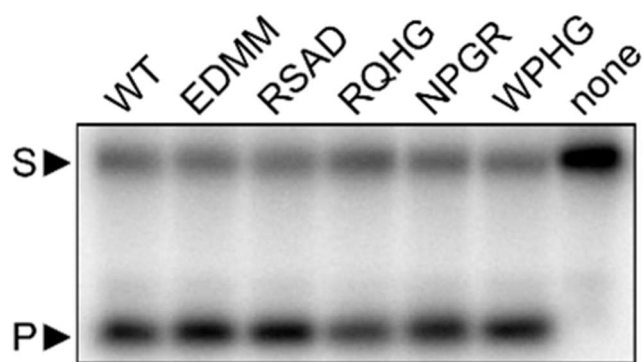


Рисунок 35. Радиоавтограф геля после разделения продуктов ферментативной реакции LlaFpg WT и мутантных вариантов с дцДНК-субстратом, содержащим ohU//C, после 60 мин инкубации; концентрация субстрата 50 нМ, концентрация фермента 5 нМ.

Таблица 17. Кинетические константы расщепления субстрата ohU//C диким типом и мутантными вариантами LlaFpg в условиях стационарной кинетики^a.

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

^a Значение ± стандартная ошибка среднего из 3–4 независимых экспериментов.

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

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

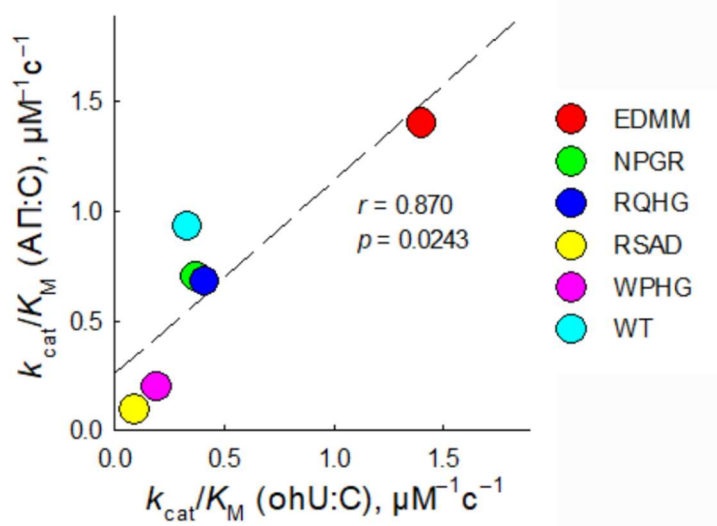


Рисунок 36. Корреляция между активностью вариантов LlaFpg на субстратах АП//С и ohU//С. Данные для вариантов LlaFpg обозначены кружками разных цветов: WT — голубым, EDMM — красным, NPGR — зелёным, RQHG — синим, RSAD — жёлтым, WPHG — розовым.

Дополнительно в условиях стационарной кинетики была проанализирована активность всех вариантов на дцДНК-субстрате с ohU//А (Таблица 18). В отличие от пар АП//С, АП//А и ohU//С, пара ohU//А стабилизирована водородными связями [237], что должно затруднить выворачивание повреждённого нуклеотида из спирали. WT LlaFpg на ohU//А был в ~2,5 раза менее активен, чем на ohU//С или АП//А, в основном за счёт более высокого K_M . Как и на ohU//С, активность мутантных вариантов снижалась умеренно: от 1,6 раза у WPHG до 7,1 раза у NPGR. Активности на ohU//С и ohU//А для шести вариантов выглядели согласованными (Рисунок 37А, $r = 0,853$, $p = 0,0308$), тогда как между активностью на ohU//А и АП//А явной согласованности не наблюдалось (Рисунок 37Б, $r = 0,490$, $p = 0,323$).

Таблица 18. Кинетические константы расщепления субстрата ohU//А диким типом и мутантными вариантами LlaFpg в условиях стационарной кинетики^а.

Фермент	K_M , нМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мкМ ⁻¹ ·с ⁻¹	Отн. WT ^б	Отн. АП//А ^в	Отн. ohU//С ^г
WT	330 ± 80	$(1,9 ± 0,2) × 10^{-1}$	0,58 ± 0,15	1,00	0,34	0,41
EDMM	97 ± 39	$(1,6 ± 0,2) × 10^{-2}$	0,16 ± 0,07	0,28	0,10	0,44
NPGR	n/s ^д	n/s	0,082 ± 0,009	0,14	0,63	0,20
RQHG	270 ± 110	$(4,1 ± 0,7) × 10^{-2}$	0,15 ± 0,07	0,26	1,17	1,68
RSAD	n/s	n/s	0,15 ± 0,02	0,26	0,35	0,78
WPHG	73 ± 15	$(2,6 ± 0,2) × 10^{-2}$	0,35 ± 0,07	0,61	3,50	1,06

^а Значение ± стандартная ошибка среднего из 3–5 независимых экспериментов.

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

^в Соотношение k_{cat}/K_M для субстрата ohU//А относительно АП//А для того же фермента.

^г Соотношение k_{cat}/K_M для субстрата ohU//А относительно ohU//С для того же фермента.

^д n/s — насыщение субстратом не было достигнуто; k_{cat}/K_M определено из тангенса угла наклона прямой на графике v_0 от $[S]_0$.

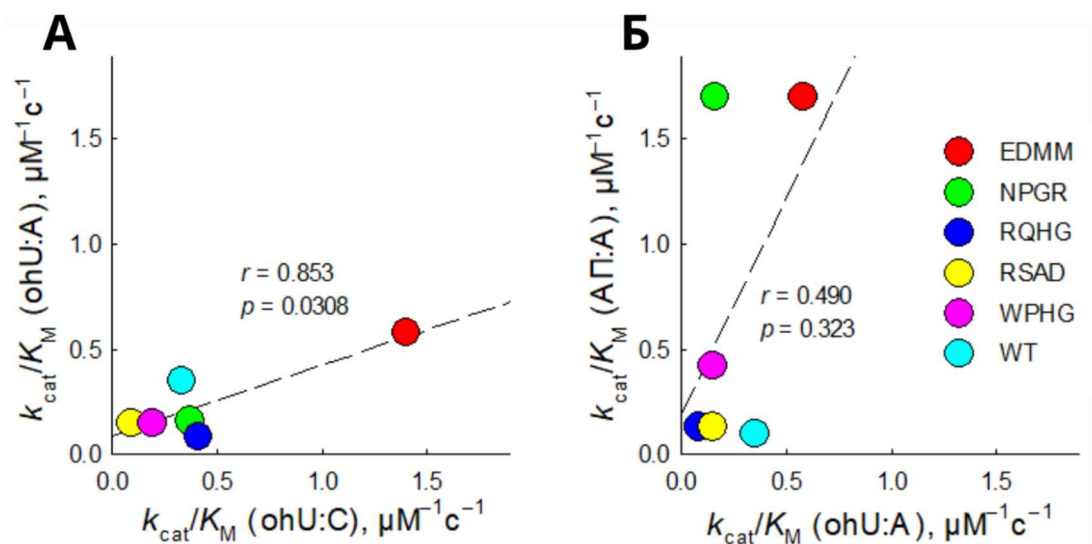


Рисунок 37. А — Корреляция между активностью вариантов LlaFpg на субстратах ohU//A и ohU//C. Б — Корреляция между активностью вариантов LlaFpg на субстратах AP//A и ohU//A. Данные для вариантов LlaFpg обозначены кружками разных цветов: WT — голубым, EDMM — красным, NPGR — зелёным, RQHG — синим, RSAD — жёлтым, WPHG — розовым.

Хотя отдельные варианты заметно различались по каталитической эффективности (наибольшее снижение у RQHG и RSAD), в целом активность всех вариантов LlaFpg на ohU и на AP-сайте изменялась в существенно меньшей степени, чем на 8-охоG, а основание напротив повреждения слабо сказывалось на эффективности катализа. Иными словами, при удалении ohU замены в тетрапептидной петле влияют на активность LlaFpg значительно слабее, чем это требовалось бы, если бы петля играла критическую роль в распознавании данного субстрата; в этом отношении ohU распознаётся LlaFpg скорее как AP-сайт, чем как специфическое повреждённое основание.

4.2.6 Влияние замен в тетрапептидной петле LlaFpg на эффективность удаления 8-охоG

После того как было показано, что в отсутствие требований к узнаванию повреждённого основания (AP-сайт) и при удалении окисленного пиримидина (ohU) активность мутантных вариантов LlaFpg снижается лишь умеренно, был проверен ключевой вопрос: как замены в тетрапептидной петле сказываются на удалении целевого субстрата Fpg — 8-охоG.

Активность мутантных вариантов LlaFpg на дцДНК-субстрате с 8-охоG//C была измерена в условиях стационарной кинетики (Рисунок 38). При концентрации фермента 5 нМ и субстрата 50 нМ за 60 мин WT LlaFpg расщеплял субстрат на половину, тогда как для всех пяти мутантных вариантов накопление продукта было слабым: количества образовавшегося продукта оказалось недостаточно для надёжного определения K_M и k_{cat} в стационарных условиях.

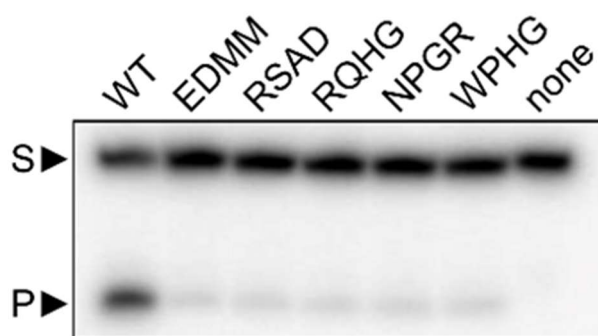


Рисунок 38. Радиоавтограф геля после разделения продуктов ферментативной реакции LlaFpg WT и мутантных вариантов с дцДНК-субстратом, содержащим 8-охоG//C, после 60 мин инкубации; концентрация субстрата 50 нМ, концентрация фермента 5 нМ.

Поэтому, для характеристики каталитической стадии была применена кинетика одного оборота: концентрация фермента (2 мкМ) на порядок превышала концентрацию субстрата (200 нМ), что обеспечивало, по существу, одно событие расщепления на молекулу фермента. В этих условиях зависимости накопления продукта от времени для всех мутантных вариантов хорошо аппроксимировались моноэкспоненциальной функцией $[P] = a(1 - \exp(-k_{\text{obs}} t))$ (Рисунок 39А); полученные наблюдаемые константы скорости первого порядка k_{obs} приведены в таблице 19. Для WT LlaFpg величина k_{obs} составила $(1,1 \pm 0,2) \times 10^{-2} \text{ с}^{-1}$, для всех пяти мутантных вариантов k_{obs} оказалась на 2–3 порядка меньше — от $\sim 5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ для RSAD до $\sim 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ для NPGR. Среди мутантных вариантов NPGR осуществлял катализ немного быстрее остальных, RSAD и EDMM — медленнее, однако все пять величин k_{obs} лежали в пределах одного порядка. Линейность k_{obs} по концентрации фермента в указанных условиях не контролировалась, поэтому полученные величины следует рассматривать как нижнюю оценку каталитической константы химической стадии: при наличии вклада ассоциации или конформационного отбора истинная константа гидролиза может быть выше. Для целей настоящего раздела принципиален лишь масштаб различия между мутантными вариантами и диким типом, который сохраняется и при поправке на возможные кинетические артефакты.

Таблица 19. Наблюдаемые константы скорости первого порядка k_{obs} для мутантных вариантов и WT LlaFpg на субстрате 8-охоG//C в условиях кинетики одного оборота^а.

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

^а Значение $\pm$ стандартная ошибка среднего из трёх независимых экспериментов.

Чтобы подтвердить, что выявленное *in vitro* снижение активности мутантных вариантов LlaFpg на субстратах, содержащих 8-охоG, проявляется и в составе клеточной хромосомы, был проведён комплементационный тест в штамме *E. coli* CC104 *fpg mutY*, у которого инактивированы две основные ферментативные системы защиты от мутагенного действия 8-охоG. Из-за этого штамм имеет повышенную в ~100 раз спонтанную частоту трансверсий G//C → T//A, которые регистрируются по форвардному тесту устойчивости к рифампицину. Введение в штамм плазмиды, кодирующей активный Fpg, восстанавливает удаление 8-охоG и снижает частоту мутаций. Эксперименты с устойчивостью к рифампицину выполнены М. М. Амановой. Отрицательным контролем служила плазида pFlag-LlaFpgΔH2TH, полученная из pFlag-WT-LlaFpg удалением 210-нуклеотидного фрагмента соответствующим утрате а. к. о. 144–213, охватывающих ДНК-связывающий мотив H2tH и предшествующую тетрапептидной петле α-спираль — такой делеционный вариант полностью теряет активность. Штамм CC104 *fpg mutY* был трансформирован плазмидой, кодирующей WT LlaFpg, делеционный вариант LlaFpgΔH2TH либо один из мутантных вариантов по тетрапептидной петле; контролем нормального уровня мутагенеза служил штамм CC104 с интактными хромосомными копиями *fpg* и *mutY*, трансформированный pFlag-LlaFpgΔH2TH (n = 5 для каждой комбинации).

Введение плазмиды с диким типом LlaFpg снижало частоту мутаций в штамме CC104 *fpg mutY* приблизительно на два порядка, до уровня WT CC104 (Рисунок 39Б) что соответствует полной комплементации хромосомной активности Fpg. Введение плазмид со всеми пятью мутантными вариантами по тетрапептидной петле, как и плазмиды с делеционным вариантом, не приводило к статистически значимому снижению частоты мутаций. Это согласуется с *in vitro* данными по кинетике одного оборота. Контроль продукции мутантных белков непосредственно в этих культурах *E. coli* не проводился, и формально нельзя исключить, что часть наблюдаемого эффекта связана с пониженным уровнем экспрессии или ускоренной деградацией отдельных мутантов *in vivo*; однако сродство к ДНК и каталитическая компетентность на АП-сайте у мутантных вариантов сохранены (см. разд. 4.2.4), что указывает на потерю способности узнавать 8-охоG наиболее вероятной, а значит и невозможность удаления этого повреждения из ДНК.

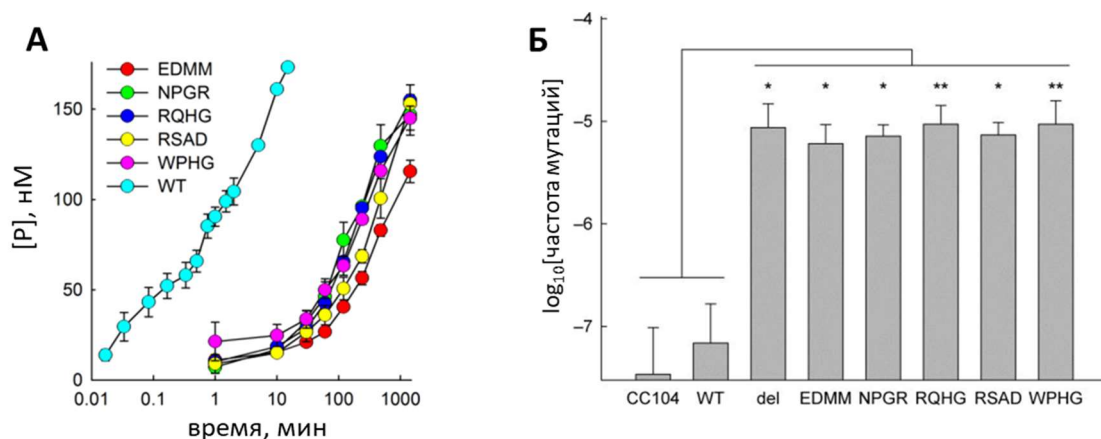


Рисунок 39. А — Накопление продукта во времени в условиях кинетики одного оборота под действием WT и мутантных вариантов LlaFpg (концентрация субстрата 200 нМ, концентрация фермента 2 мкМ) на субстрате, содержащем 8-охоG//С. Данные для вариантов LlaFpg обозначены кружками разных цветов: WT — голубым, EDMM — красным, NPGR — зелёным, RQHG — синим, RSAD — жёлтым, WPHG — розовым. Приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего из трёх независимых повторов. Б — Частота форвард-мутаций, приводящих к устойчивости к рифампицину в штамме CC104 *fpg mutY*, трансформированном плазмидой, кодирующей WT LlaFpg (WT), неактивный делеционный вариант LlaFpg Δ H2TH (del) или один из мутантных вариантов по тетрапептидной петле. CC104 — дикий тип CC104, трансформированный плазмидой LlaFpg Δ H2TH (контроль нормального уровня мутагенеза).

Сравнение активностей пяти мутантных вариантов LlaFpg по тетрапептидной петле 219–222 на четырёх типах субстратов (АП-сайт, 8-охоG, ohU и их пары с С либо А напротив) демонстрирует, что замены а. к. о. в этой петле резко снижают эффективность удаления 8-охоG: на 2–3 порядка по k_{obs} в условиях кинетики одного оборота и до полной потери активности *in vivo* в комплементационном тесте, но не значительно затрагивают активность на АП-сайте и на окисленном пиримидине ohU. Сродство к ДНК и базовый каталитический механизм β/δ -элиминирования у мутантных вариантов при этом сохраняются. Эти наблюдения согласуются с моделью, в которой точная геометрия тетрапептидной петли в LlaFpg критична для распознавания именно 8-охоG, тогда как удаление окисленного пиримидина ohU и расщепление АП-сайтов толерантны к её конформации. Низкая консервативность последовательности петли в гомологах Fpg тем самым не противоречит её центральной роли в распознавании 8-охоG: распознавание обеспечивается амидами пептидного остова, а боковые цепи петли в этом контакте напрямую не участвуют, что и допускает значительную вариабельность последовательности при сохранении основной функции аминокислотных остатков активного центра Fpg *E. coli*.

4.2.7 Конформация петли, связывающей повреждение, коррелирует с активностью LlaFpg

Как обсуждалось выше, сегмент $^{219}\text{IR}\dots\text{ST}^{228}$ петли, связывающей повреждение, в структурах LlaFpg принимает две различные конформации (Рисунок 40А): «активную», в которой петля замкнута вокруг экзоциклического атома кислорода повреждённого основания (карбоциклический аналог FapyG, PDB ID 1XC8 [125]), и «неактивную», в которой петля отведена от ДНК (комплекс с аналогом АП-сайта, PDB ID 1PJJ [147]); среднеквадратичное отклонение координат (RMSD) между C α -атомами этого сегмента в двух структурах составляет 4,1 Å. Активная укладка обнаружена также в BstFpg в комплексе с 8-охоG- и h₂U-содержащей ДНК [137] и устойчиво сохраняется в ходе МД моделирования LlaFpg и BstFpg [179,238]. Чтобы проверить, сопряжена ли конформация петли с каталитической активностью фермента на конкретном субстрате, было проведено МД моделирование WT и всех мутантных вариантов LlaFpg со всеми субстратами, использованными в кинетических экспериментах в сотрудничестве с к.ф.-м.н. В. М. Голышевым и к.ф.-м.н. А. А. Ломзовым (лаборатория структурной биологии ИХБФМ СО РАН).

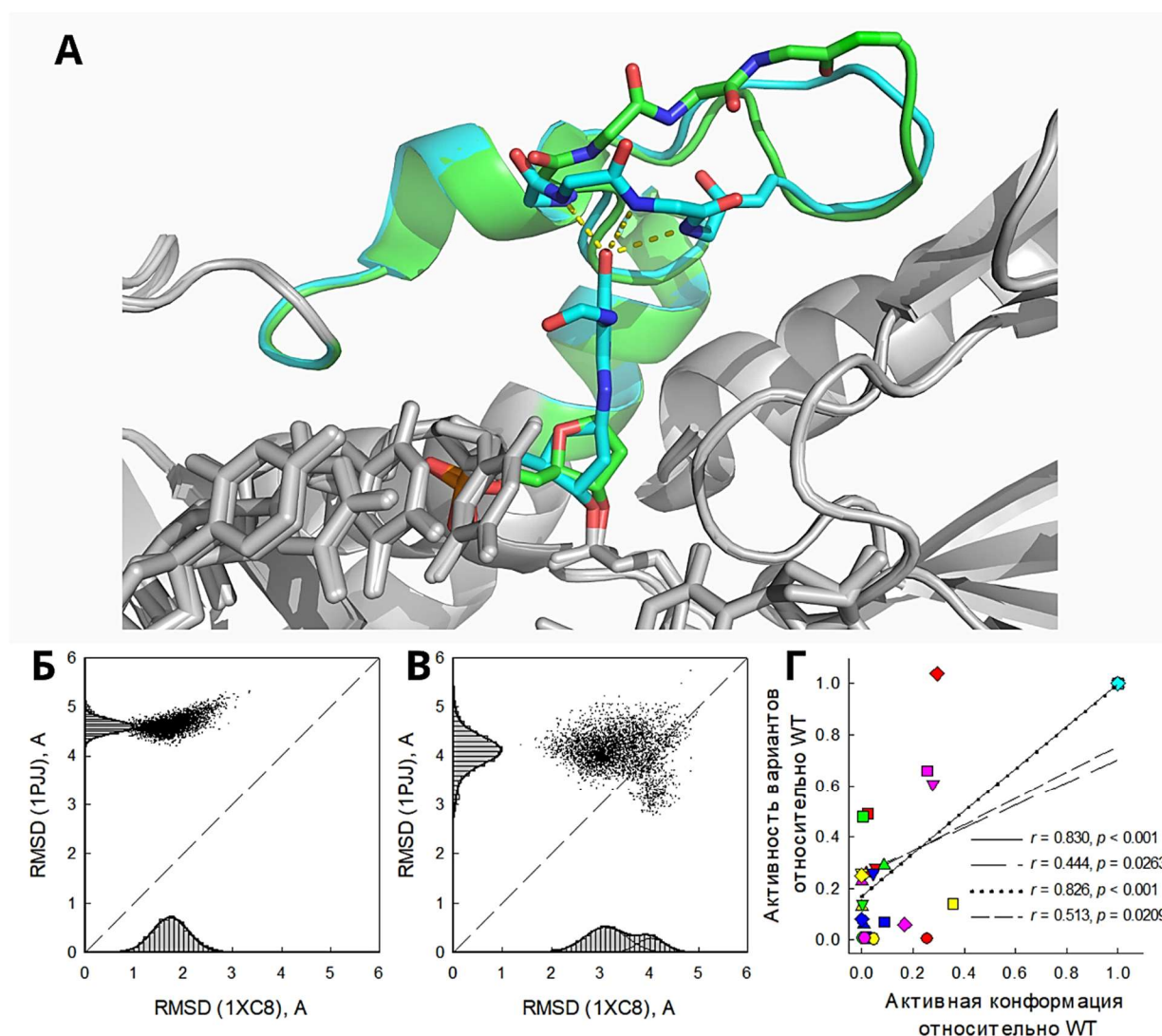


Рисунок 40. А — две конформации петли, связывающей повреждение, в LlaFpg в комплексе с ДНК, содержащей повреждённое основание (1XC8, голубой) или аналог АП-сайта (1PJJ, зелёный). Б, В — распределение расстояний (RMSD) от сегмента $^{219}\text{IR} \dots \text{ST}^{228}$ до структур 1XC8 и 1PJJ в ходе молекулярно-динамического моделирования WT LlaFpg в комплексе с ДНК 8-охоG(*син*)/C (Б) или 8-охоG(*анти*)/C (В). Г — корреляция между долей траектории, проведённой в активной конформации, и активностью вариантов LlaFpg (кружки — 8-охоG/C, треугольники — ohU/C, перевёрнутые треугольники — ohU/A, квадраты — АП/C, ромбы — АП/A; цветовая кодировка: голубой — WT, красный — EDMM, зелёный — NPGR, синий — RQHG, жёлтый — RSAD, пурпурный — WPHG).

Поскольку ориентация 8-охоG, ohU и остающегося напротив повреждения аденина может различаться, эти нуклеотиды моделировали как в стандартной *анти*-, так и в *син*-конформации (для цитозина напротив повреждения принимали только *анти*-конформацию ввиду его прочных взаимодействий с остатком Arg109). Таким образом, каждый вариант LlaFpg был просчитан в 11 комплексах: 8-охоG(*анти*)/C(*анти*), 8-охоG(*син*)/C(*анти*), ohU(*анти*)/C(*анти*), ohU(*син*)/C(*анти*), ohU(*анти*)/A(*анти*), ohU(*син*)/A(*анти*), ohU(*анти*)/A(*син*), ohU(*син*)/A(*син*), АП/C, АП/A(*анти*), АП/A(*син*), что в сумме составило 66 траекторий. Полная структура белка во всех 66 расчётах в основном выходила на равновесие к 50 нс, что позволило анализировать более подвижную динамику петли на последних 50 нс траектории (5000 кадров). Для этого в каждом кадре совмещали остатки,

фланкирующие гибкий участок ($^{188}\text{ET}\dots\text{KL}^{214}$ и $^{230}\text{KM}\dots\text{AE}^{251}$), и вычисляли RMSD между C α -атомами сегмента $^{219}\text{IR}\dots\text{ST}^{228}$ в модели и в структурах 1XC8 и 1PJJ (Рисунок 40Б, В). Для предположительно биологически значимой модели — WT LlaFpg в комплексе с 8-охоG(*syn*)/C — оба распределения были одновершинными, причём конформация оказалась значительно ближе к 1XC8 ($1,74 \pm 0,37$ Å), чем к 1PJJ ($4,60 \pm 0,13$ Å) (Рисунок 40Б). При старте из структуры WT/8-охоG(*anti*)/C (Рисунок 14В) МД давала распределение с двумя менее выгодными пиками по расстоянию до 1XC8 ($3,10 \pm 0,44$ Å и $4,02 \pm 0,28$ Å) и одним пиком по расстоянию до 1PJJ ($4,11 \pm 0,31$ Å). Принимая 1XC8 за «активную» конформацию, а динамику WT/8-охоG(*syn*)/C — за наиболее близкое к ней приближение, для каждой траектории, рассчитывали взвешенную сумму кадров, попадающих в «активный» диапазон (формула приведена в разделе 3.2.12); в случае конформационной неоднозначности в дальнейшем анализ брали наибольшее значение.

Сопоставление взвешенных сумм с относительной активностью вариантов LlaFpg на различных субстратах выявило значимую корреляцию (Рисунок 40Г, сплошная линия; $r = 0,830$, $p < 0,001$). Анализ порога чувствительности (k_{crit}) методом Монте-Карло со случайным прореживанием выборки (500 итераций) подтвердил, что значимость корреляции не обусловлена отдельными точками с высоким рычагом: индекс устойчивости корреляции (Robustnes Index, *RI*) составил 0,63 при $\alpha = 0,05$, то есть более 60 % точек можно случайным образом удалить, прежде чем корреляция полностью исчезнет (Рисунок 16). В частности, значимость и сила корреляции не изменялись при исключении из анализа всех траекторий с 8-охоG (Рисунок 14Г, пунктирная линия; $r = 0,826$, $p < 0,001$). При исключении всех траекторий WT LlaFpg или всех траекторий WT вместе с траекториями 8-охоG (Рисунок 40Г, длинный и короткий штрих соответственно) коэффициент корреляции снижался, но сама корреляция оставалась значимой ($r = 0,444$, $p = 0,0263$ и $r = 0,513$, $p = 0,0209$ соответственно). Таким образом, конформация петли, наблюдаемая в структуре 1XC8, действительно отражает активную конформацию LlaFpg как для 8-охоG, так и для других субстратов.

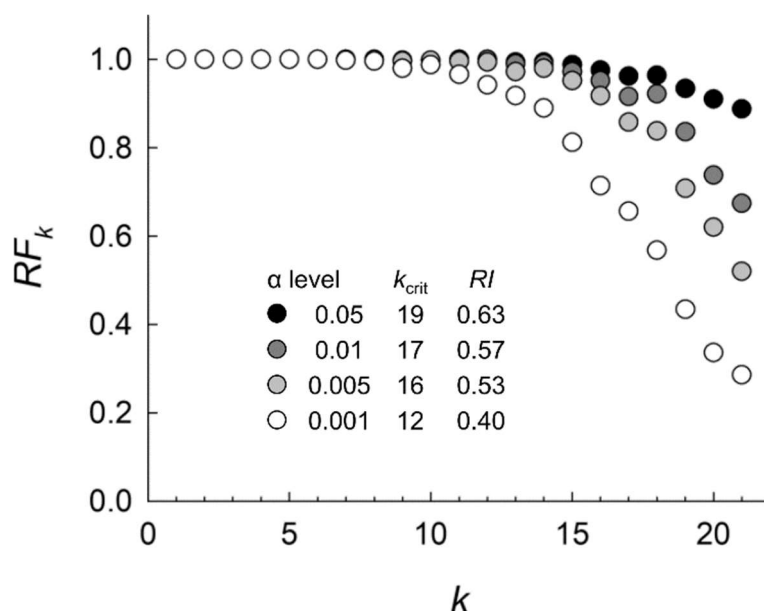


Рисунок 41. График чувствительности для корреляции между конформацией петли и активностью LlaFpg. Доля робастности (Robustness Fraction, RF_k — доля случайно выбранных подвыборок размера $N - k$, для которых коэффициент корреляции Пирсона значим на заданном уровне α) отложена против числа удалённых точек (k). Наименьшее k , при котором $RF_k < 0,95$, принимали за k_{crit} при расчёте индекса устойчивости корреляции (RI). Приведены значения k_{crit} и RI для уровней значимости $\alpha = 0,05, 0,01, 0,005$ и $0,001$.

4.2.8 Петля, связывающая повреждение, в контексте суперсемейства H2tH

ДНК-гликозилазы суперсемейства H2tH распознают широкий спектр окисленных пуриновых и пиримидиновых оснований. В этой группе обычно выделяют шесть основных семейств, два из которых бактериальные (Fpg и Nei), а четыре встречаются у эукариот и их вирусов (NEIL1, NEIL2, NEIL3 и MMH) [239–241]. Хотя к настоящему моменту решено более сотни структур этих белков, как в свободном состоянии, так и в комплексах с ДНК (Таблица 5), механизмы узнавания субстратов по-прежнему понятны слабо. Главная причина — особое строение сайта связывания повреждения, образованного преимущественно гибкой петлёй, которая в большинстве комплексов фермент–ДНК остаётся неупорядоченной или упорядочена лишь частично. В суперсемействе H2tH, помимо Fpg, структуры фермента в комплексе с ДНК, содержащей повреждённое основание, доступны для NEIL1 мимивируса и человека [220,221,242], и во всех них петля, связывающая повреждение, разрешена не полностью. Более того, признаки разупорядоченности петля проявляет даже в ряде структур BstFpg и LlaFpg, связанных с их целевыми или неспецифическими субстратами с основанием (отдельные остатки или боковые цепи разрешены не полностью либо отсутствуют) [125,137,151,203,243], и почти всегда разупорядочена (за исключением 1PJ и родственных структур) в комплексах Fpg с АП-сайтом или сшитых после вырезания основания [138,143,145,147,150,244]. С другой стороны, для NEIL1 предполагается, что важную роль в распознавании повреждения играют множественные способы взаимодействия с вывернутым основанием [242].

Примечательно, что последовательность и конформация петли, связывающей повреждение, у не-Fpg представителей суперсемейства H2tH полностью отличаются от таковых у Fpg: петля может быть укороченной или свёрнутой совершенно иначе (Рисунок 42). Ни одна из этих структур, по-видимому, не содержит тетрапептидной «покрывающей» петли, аналогичной петле Fpg. Даже в расширенном наборе структур NEIL1 человека в комплексе с ДНК, несущей различные окисленные основания [242], петля, связывающая повреждение, частично разупорядочена и взаимодействует с целевым основанием совершенно иначе, чем у Fpg. По опубликованным данным, полная делеция петли, связывающей повреждение, в EcoFpg отменяет вырезание 8-охоG, но лишь минимально сказывается на активности в отношении FapyG, FapyA, Sp, Gh и АП-сайтов [245]. Это ставит вопрос: что именно в 8-охоG требует специального структурного элемента — тетрапептидной петли — для эффективного вырезания?

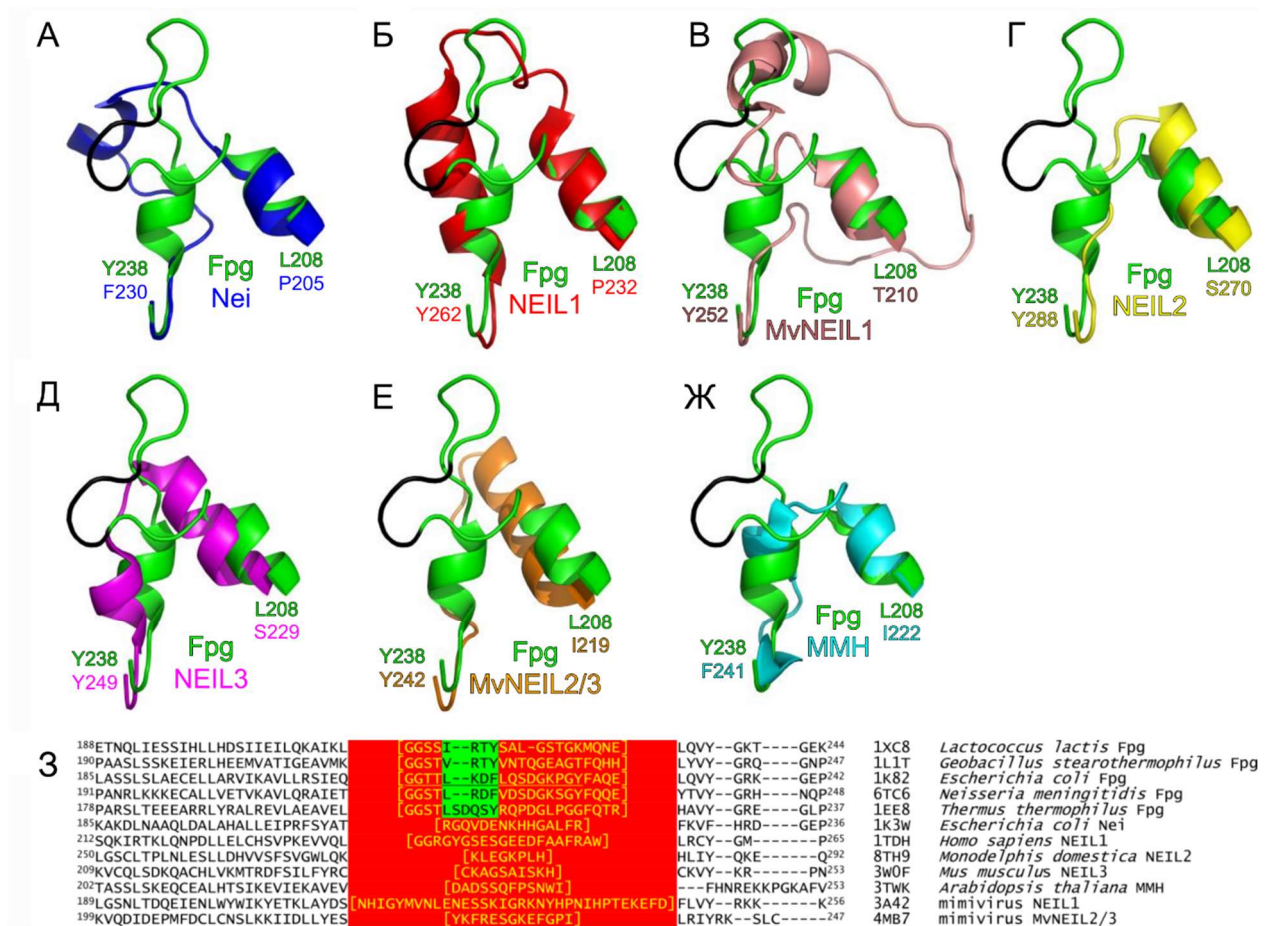


Рисунок 42. Гомология последовательности и структуры в области петли у белков суперсемейства H2tH. А–Ж — структуры петли и окружающих фрагментов ферментов семейства Nei, совмещённые с соответствующим фрагментом структуры LlaFpg 1XC8 (зелёный на А–Ж, тетрапептидная петля LlaFpg окрашена чёрным): Nei *E. coli* (1Q3B [246], А, синий), NEIL1 человека (1TDH [141], Б, красный), NEIL1 мимивируса (3A42 [247], В, розовый), NEIL2 серого короткохвостого опоссума (8TH9 [248], Г, жёлтый), NEIL3 мыши (3W0F [249], Д, пурпурный), NEIL2/3 мимивируса (4MB7 [247], Е, оранжевый) и MMH *Arabidopsis* (3TWK [245], Ж, голубой). 3 — структурное выравнивание избранных ДНК-гликозилаз суперсемейства H2tH, выполненное методом jFATCAT в гибком режиме [250,251] на основе показанных записей PDB. Красными блоками отмечены фрагменты, структура которых сильно различается между представителями суперсемейства; зелёными блоками показана тетрапептидная петля белков Fpg; подчёркнута часть EcoFpg, удалённая в мутанте Δ212–228.

Совокупность полученных данных позволяет предположить, что природная последовательность тетрапептидной петли либо важна для правильного позиционирования 8-охоG в сайте связывания, либо тем или иным образом сопрягает связывание субстрата с каталитическим аппаратом фермента (остатки Pro1, Glu2 и Glu5). Примечательно, что удаление каталитического остатка Pro1 делает пентапептид ²²⁰RTYSA²²⁴ подвижным и невидимым на карте электронной плотности LlaFpg в комплексе с ДНК, содержащей карбоциклический FaryG [125]. Кроме того, если на карбоциклических 8-охоG и N⁷-бензил-FaryG природная петля частично сомкнута вокруг атома O6 [203,252], то в комплексе с карбоциклическим MeHyd (5-гидрокси-5-метилгидантоином) — субстратом, отклоняющим а. к. о. Pro1 от его нормального каталитического положения, — она полностью разупорядочена [243]. Эти наблюдения указывают, что петля может участвовать в катализе, например, сопрягая динамику сайта связывания повреждения и N-концевой α-спирали или влияя на pK_a каталитических остатков.

Вопрос каким образом мутантные варианты сохраняют способность удалять ohU, а делеционные мутанты сохраняют активность в отношении FaryG/FaryA, Gh и Sp, остаётся открытым. Поскольку Gh, Sp и (в меньшей степени) ohU и Fary-производные дестабилизируют дуплекс ДНК [237,253–258], взаимодействия с тетрапептидной петлёй для них могут быть необязательны, но важны для удержания относительно стабильного 8-охоG во вне-спиральном положении. Исследование EcoFpg методом остановленного потока с родственным пиримидиновым субстратом h₂U показало, что h₂U в комплексе фермент–субстрат примерно в 50 раз стабильнее в вывернутом состоянии, чем 8-охоG [90]. Более того, структуры NEIL1 человека в комплексе с дуплексами, несущими разные повреждения, вместе с расчётами методом квантовой/молекулярной механики выявили три метастабильные конформации петли, две из которых каталитически компетентны, но различаются профилем свободной энергии разрыва N-гликозидной связи [242]. Можно предположить, что и у Fpg несколько конформаций петли способны поддерживать катализ для разных субстратов, однако конформации, выгодные для удаления 8-охоG, легче нарушаются мутациями в петле.

4.2.9 Эволюция субстратной специфичности в суперсемействе H2tH

Полученные результаты также проливают свет на возможные силы, направлявшие эволюцию суперсемейства H2tH-гликозилаз. Все представители этой группы, кроме Fpg, специфичны к удалению повреждённых пиримидинов и оснований с насыщенным кольцом — структурно разнородной группе повреждений, включающей те, что, вероятно, преобладали в бескислородной атмосфере ранней Земли [259]. Таким образом, можно предположить, что гибкость и низкая консервативность остатков петли в суперсемействе в целом

отражают необходимость узнавать широкий набор атипичных оснований [260]. В этом сценарии Nei возник первым, а белки Fpg представляют собой позднее приобретение у бактерий, эволюционировавшее для репарации одного конкретного повреждения — 8-охоG, которое, по-видимому, стало распространённым лишь после Великого кислородного события (~2,4–2,0 млрд лет назад) и почти всеобщего перехода к энергетическому метаболизму на основе O₂. С другой стороны, археи и некоторые клады бактерий приспособили для репарации 8-охоG белки большого предкового суперсемейства спираль–шпилька–спираль (HhH) — OGG1, OGG2 и AGOG [117,261,262]. Специализация Fpg позволила получить очень эффективный фермент для репарации 8-охоG (в каталитическом отношении гораздо более эффективный, чем OGG1), который тем не менее унаследовал от Nei способность вырезать широкий спектр повреждений, включая окисленные пиримидины.

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

4.3.1 Получение структур ковалентных конъюгатов Nei–ДНК с различными основаниями напротив повреждения

Помимо специфичности к самому повреждению, ДНК-гликозилазы суперсемейства H2tH обладают предпочтением к основанию напротив повреждения — свойством, обусловленным архитектурой триады остатков интеркалирующей петли β4/β5 (см. разд. 2.3.3.4.1). Для Nei *E. coli* ранее были опубликованы биохимические кинетические данные, согласно которым фермент способен расщеплять субстраты с любым из четырёх канонических оснований напротив окисленного остатка [140,246,263]. Структурный механизм такой широкой толерантности оставался при этом неизвестным: единственная имеющаяся в Protein Data Bank структура EcoNei в комплексе с ДНК (далее — Nei-X:A, 1K3W) была получена восстановлением боргидридом натрия ковалентного интермедиата фермента с 13-нуклеотидным дцОДН с тупыми концами, содержащим А напротив восстановленного АП-сайта (2-дезоксирибит, dRbl), и связанным с EcoNei через C1'[dRbl]–N[P1] [123]. Таким образом, до сих пор выводы о возможном взаимодействии EcoNei с основанием напротив повреждения делались исключительно на основании кинетических данных.

Из имеющихся кинетических данных вытекало ожидаемое объяснение: EcoNei формирует с каждым из четырёх оснований напротив повреждения специфический набор водородных связей, обеспечивающий схожие каталитические параметры, однако прямых структурных данных, подтверждающих кинетические эксперименты до сих пор получено

не было. Для проверки этой гипотезы в рамках текущей работы были получены кристаллические структуры ковалентных конъюгатов EcoNei с дцОДН той же последовательности, что и в структуре 1K3W, но содержащих С, G или Т (Таблица 7) напротив сшивки Nei–ДНК (далее — Nei-X:С, Nei-X:G и Nei-X:Т соответственно). Дальнейший детальный анализ ДНК-белковых взаимодействий в полученных структурах и сравнение с опубликованной структурой Nei-X:A, а также биохимическая проверка смены конформации пиримидинового нуклеозида напротив повреждения с помощью кинетики на субстратах с С5-замещёнными аналогами (Таблица 7) позволили установить механизмы толерантности EcoNei к природе основания напротив повреждения.

В первую очередь была выделена рекомбинантная ДНК-гликозилаза EcoNei (см. разд. 3.2.3) [264], а также подготовлены необходимые субстраты для фермента. Для этого 13-нуклеотидный дцОДН с одиночным остатком Т в позиции (Таблица 7), соответствующей повреждению, окислялся OsO₄ до тимингликоля (Tg) (см. разд. 3.2.6) [264] по описанной методике. смесь стереоизомеров Tg использовалась для дальнейших экспериментов без дополнительного разделения [265]. Tg-содержащий дуплекс был получен гибридизацией с комплементарной цепью, содержащей С, G или Т в позиции напротив повреждения, и инкубировался с EcoNei в присутствии NaBH₄ для получения восстановленного основания Шиффа ковалентно сшитого через остаток Pro1 фермента и образующийся при удалении поврежденного основания дезоксирибит (dRbl) (см. разд. 3.2.14). Полученные ковалентные конъюгаты Nei–ДНК очищались с помощью ионообменной хроматографии на MonoQ (см. разд. 3.2.15) и использовались для кристаллизации. Сбор дифракционных данных осуществлялся в сотрудничестве с И. А. Капрановым и д.ф.-м.н. В. И. Борщевским (ЦММ МФТИ). При индексировании и интегрировании дифракционных данных с помощью XDS [187] выбирались наборы с наилучшей статистикой (наборы с наибольшим разрешением при значениях $CC_{1/2}$ 12,5–15,0), далее интегрированные данные шкалировались с помощью Aimless [188] с получением итогового разрешения для будущих моделей (см. разд. 3.2.17). Фазовая проблема для всех трёх наборов данных решена методом молекулярного замещения в MRphaser [190] с использованием полиаланиновой модели структуры 1K3W (см. разд. 3.2.17) [123] для минимизации модельного смещения. Построение реальных боковых радикалов аминокислотных остатков моделей осуществлялось с помощью modelcraft [191,192]. Для каждого набора данных получена пространственная группа P4₃22 с одной молекулой ковалентного конъюгата в элементарной ячейке. Далее выполнялась достройка моделей в Coot [194] а. к. о.–выбросов из неразрешенных областей карты Рамачандрана, выбор конформеров боковых радикалов а. к. о., позиционирование нуклеотидов, молекул воды и

сульфат-ионов) и уточнение в Refmac5 [193] (см. разд. 3.2.17). Итоговые модели кристаллических структур имеют высокое разрешение: 1,75 Å (Nei-X:C), 1,85 Å (Nei-X:G) и 1,80 Å (Nei-X:T) (Таблица 20). Все три структуры депонированы в Protein Data Bank под идентификаторами 9VRM (Nei-X:C), 9VR3 (Nei-X:G) и 9VR4 (Nei-X:T). Все четыре комплекса (включая известный Nei-X:A) кристаллизовались в близких условиях и имеют одну пространственную группу, что снижает вероятность артефактов кристаллизации. Общий вид и наложение полученных структур приведены на рисунке 43.

Таблица 20. Сбор дифракционных данных и финальная статистика после уточнения структур ковалентных конъюгатов Nei-ДНК.

	9VR3	9VR4	9VR5
Комплекс	Nei-X:G	Nei-X:T	Nei-X:C
Длина волны (Å)	0,979	0,979	0,979
Пространственная группа	<i>P</i> ₄ 22	<i>P</i> ₄ 22	<i>P</i> ₄ 22
Элементарная ячейка			
a (Å)	77,03	74,92	74,72
b (Å)	77,03	74,92	74,72
c (Å)	164,11	167,33	166,86
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Диапазон разрешений ^a (Å)	45,38–1,85 (1,89–1,85)	44,76–1,80 (1,84–1,80)	44,64–1,75 (1,78–1,75)
R _{pim} ^b (%)	5,1 (84,0)	7,2 (71,2)	4,9 (81,4)
Рефлексы ^a : все уникальные	918506 (18466) 42300 (2227)	1073884 (43154) 45122 (2616)	1132719 (30475) 48567 (2555)
CC _{1/2} (%)	99,9 (16,8)	99,8 (15,5)	99,9 (26,5)
Избыточность	21,7 (8,3)	23,8 (16,5)	23,3 (11,9)
< <i>I</i> >/<σ>	12,8 (1,0)	9,3 (1,2)	12,2 (1,0)
Полнота (%)	99,4 (85,5)	100 (100)	99,9 (97,9)
R-фактор: work (%) free (%)	19,4 23,7	20,7 23,7	18,7 21,6
Количество атомов: белок ДНК растворитель Zn сульфаты	2067 444 274 1 4	2076 451 308 1 2	2070 467 359 1 2
B-фактор: вся структура белок ДНК растворитель Zn	41,4 33,9 70,2 50,4 40,0	39,0 33,5 61,0 43,5 27,4	36,3 30,7 56,2 42,5 25,4
Wilson B-фактор	27	24	23
R.m.s.: связи (Å) углы (°)	0,012 1,83	0,011 1,64	0,012 1,78
Карта Рамачандрана: наиболее разрешенные (%) допустимые (%)	96,0 4,0	96,8 3,2	97,2 2,8
Clash score	5,20	4,32	3,24

^a В скобках приведены значения для оболочки наивысшего разрешения

$$^b R_{pim} = \sum_h \sum_i \left(\frac{1}{n_h - 1} \right)^{1/2} \frac{|I_{hi} - \langle I_h \rangle|}{\sum_h \sum_i \langle I_h \rangle}$$

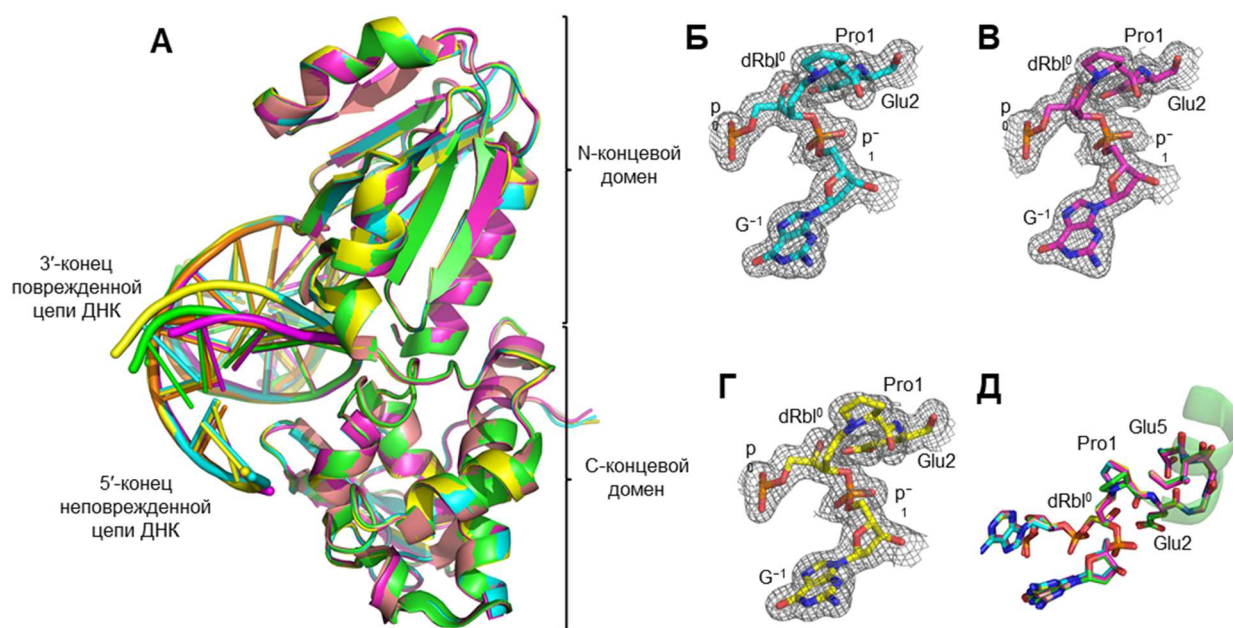


Рисунок 43. Структура комплексов Nei–ДНК и вид активного центра. А — Наложение структур EcoNei, ковалентно связанных с ДНК, содержащей А (структуры 1K3W — зелёный, и 1K3X — оранжевый [123]), С (Nei-X:C, голубой), G (Nei-X:G, пурпурный) и Т (Nei-X:T, жёлтый) напротив повреждения. Б–Г — Крупный план шивки dRbl–Pro1 для комплексов Nei-X:C (Б), Nei-X:G (В) и Nei-X:T (Г) с визуализацией экспериментальной электронной плотности ($2F_o - F_c$) на уровне 1σ . Д — Наложение, показывающее конформацию а. к. о. Pro1 и N-концевой части спирали αA .

Поскольку Tg удаляется ферментом EcoNei в ходе реакции с образованием АП-сайта и последующего β -элиминирования, в полученных ковалентных конъюгатах поврежденное основание уже отсутствует — фермент остаётся ковалентно связан со стабилизированным dRbl остатком в позиции удаленного основания. Удаленный Tg отсутствует и в кармане связывания во всех четырёх структурах: Tg удалялся ещё на стадии формирования ковалентного интермедиата и далее на стадиях хроматографической очистки и концентрирования.

Общая архитектура белковой части комплексов оказалась практически одинаковой во всех четырёх структурах, со среднеквадратичным отклонением (RMSD) Ca атомов между Nei-X:A [123] и новыми структурами 0,234 Å (Nei-X:C), 0,223 Å (Nei-X:G) и 0,247 Å (Nei-X:T) (Рисунок 43, Таблица 20). Как описывалось в разделе литературного обзора, посвящённом архитектуре H2tH-ферментов (см. разд 2.3.3.4.1), EcoNei состоит из двух доменов — N-концевого (остатки 1–111) и С-концевого (остатки 135–262), соединённых линкером. При связывании с ДНК происходит относительное смещение доменов на $\sim 10^\circ$ по углу между доменами и $\sim 50^\circ$ по торсионному углу [123,246]. При сравнении новых комплексов с Nei-X:A, междоменные углы и торсионные углы различались в пределах $\pm 1^\circ$ — замена основания напротив повреждения не вызывает глобальных конформационных перестроек белка. Локальные перестройки отдельных остатков (P1, R124, Q69) обсуждаются в соответствующих подразделах ниже.

В структуре Nei-X:A петля, формирующая часть кармана для связывания повреждённого основания (остатки 215–222), не разрешена [123]; то же характерно для всех структур ДНК-гликозилаз суперсемейства H2tH в комплексе с ДНК, в которой повреждённое основание уже удалено в стабилизированном интермедиате (см. разд. 4.2) [138,143,145,147,150,221,244,248,266,267]. В новых полученных нами структурах эта петля также не разрешена из-за отсутствующей электронной плотности, хотя удалось достроить остаток Gly222 во всех трёх случаях. Отсутствие электронной плотности в области остатков 215–222 — общее свойство постреактивного состояния EcoNei, не зависящее от природы основания напротив повреждения.

Кроме отсутствующей петли 215–222, во всех четырёх структурах наблюдается заметная подвижность петли, соединяющей β -цепи $\beta 5$ и $\beta 6$ в N-концевом домене (остатки 77–88): В-факторы в этой области были максимальными в каждой из четырёх моделей, а боковые радикалы принимали разнообразные конформации. Анализ кристаллических контактов с использованием сервера PISA [197] показал, что петля 77–88 не участвует в межмолекулярных контактах ни в одной из четырёх структур. Наблюдаемая подвижность, следовательно, связана с собственными тепловыми флуктуациями комплекса EcoNei–ДНК, а не с особенностями кристаллической упаковки. Петля 77–88 удалена от каталитического центра и от ДНК-связывающих остатков; её вклад в катализ и узнавание повреждения, по-видимому, отсутствует.

Атипично для каталитического остатка Pro1 принимает две альтернативные конформации: в Nei-X:A (только в структуре 1K3W) кольцо остатка Pro1 расположено под углом 53° – 58° к кольцу остатка Pro1 во всех остальных структурах, что обусловлено наибольшими изменениями в торсионных углах $\chi 1$ (N–C α –C β –C γ) и $\chi 2$ (C α –C β –C γ –C δ) (Рисунок 43Д). Конформация остатка сахара dRbl и других каталитических остатков (Glu2, Glu5) при этом идентична во всех четырёх структурах, что указывает на отсутствие функционального значения данной альтернативной конформации остатка Pro1 в 1K3W.

4.3.2 ДНК-белковый интерфейс EcoNei

Из 13 пар оснований ДНК-дуплекса в структуре Nei-X:A [123] не разрешены терминальные пары (C $^{+6}$:G $^{(-6)}$ и C $^{-6}$:G $^{(+6)}$, Рисунок 44); кроме того, в 1K3X не разрешена вторая от 3'-конца пара (C $^{-5}$:G $^{(+5)}$), а в 1K3W — остатки T $^{(+3)}$ –G $^{(+5)}$ комплементарной цепи. В полученных нами структурах концы ДНК разрешены лучше: в Nei-X:C и Nei-X:T не разрешены лишь 5'- и 3'-концевые нуклеотиды поврежденной цепи, а в Nei-X:G дополнительно отсутствует второй нуклеотид поврежденной цепи с 5'-конца. Лучшая разрешённость концов ДНК указывает на стабилизацию ДНК-белкового интерфейса в условиях кристаллизации и

в принятой пространственной группе. EcoNei полностью или частично покрывает остатки $A^{+1}-A^{-3}$ поврежденной цепи и $C^{(-3)}-C^{(+1)}$, $T^{(+3)}-G^{(+6)}$ комплементарной цепи, площадь контакта составляет $703-736 \text{ \AA}^2$ и $336-406 \text{ \AA}^2$ соответственно (Рисунок 44).

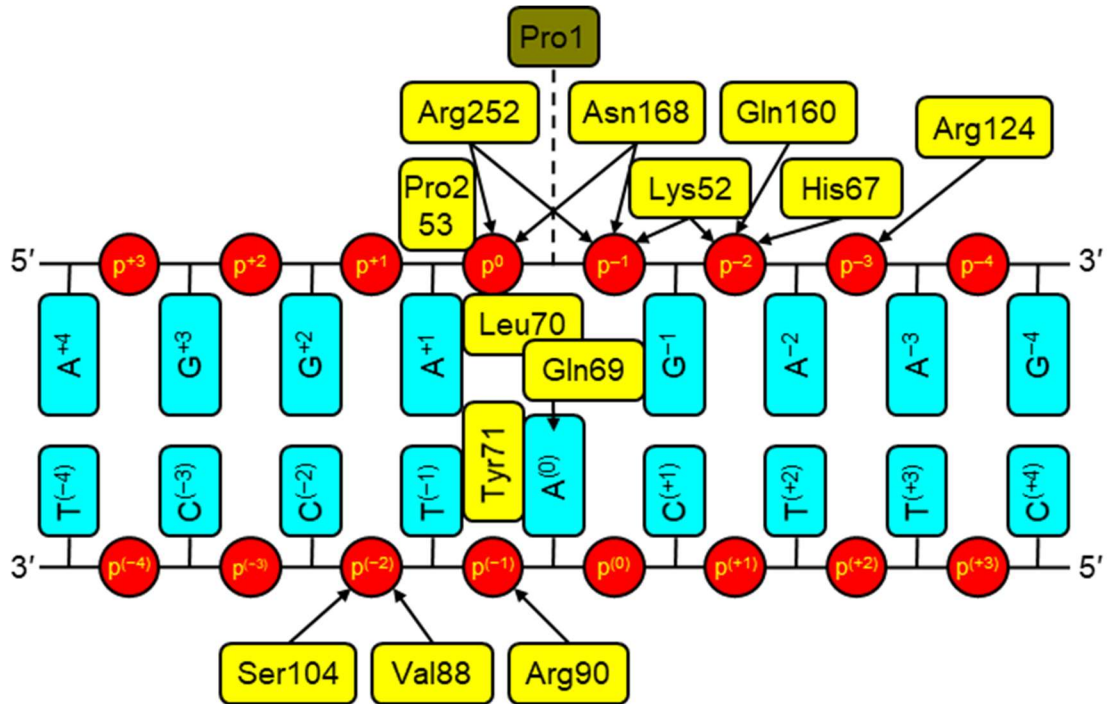


Рисунок 44. Организация ДНК-белковых взаимодействий в EcoNei. Схема контактов основана на кристаллической структуре EcoNei с ДНК [123]. Нумерация нуклеотидов: ноль — позиция повреждения или основания напротив; положительные и отрицательные номера отсчитываются от нулевой позиции в сторону 5'- и 3'-конца цепи соответственно; номера в скобках — для неповрежденной цепи. Пунктирная линия обозначает ковалентную сшивку с остатком Pro1 в реакционном интермедиате.

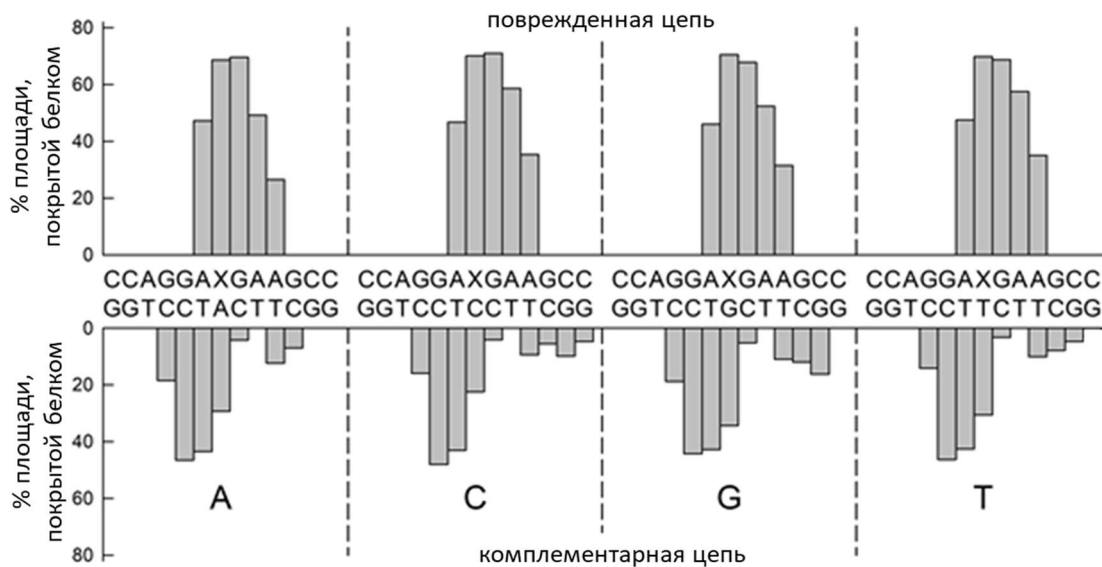


Рисунок 45. Покрывание белком EcoNei нуклеотидов ДНК в комплексах Nei-ДНК. Для анализа ДНК-белковых взаимодействий в Nei-X:A использовалась структура 1K3X [123], содержащая больше разрешённых нуклеотидов в сравнении с 1K3W.

Практически все ДНК-гликозилазы, включая EsoNei, изгибают ДНК в месте повреждения (см. разд. 2.3.1), облегчая выворачивание повреждённого основания из спирали в активный центр (см. разд. 2.3.1). В структуре Nei-X:A угол скручивания между парами оснований, фланкирующими повреждение, составляет $\sim 45^\circ$ [123]. В Nei-X:C и Nei-X:T этот угол несколько меньше — около 39° , а в Nei-X:G больше — около 52° . Ещё одно отличие Nei-X:G: ДНК в этом комплексе слегка раскручена, суммарное скручивание на сравнимом числе шагов пар оснований оказалась на 3° – 5° меньше, чем в остальных структурах. Промежуточное значение угла скручивания в Nei-X:A не позволяет интерпретировать наблюдаемую вариацию как простую дихотомию «пурин/пиримидин»; различия в деформации ДНК скорее отражают разное число и геометрию контактов основания напротив повреждения с интеркалирующей петлёй и разное количество водородных связей с остатком Gln69 в каждом из комплексов.

Несмотря на разную природу основания напротив повреждения, основные ДНК-белковые контакты во всех четырёх структурах сохраняются (Рисунок 45). Некоторая нерегулярность наблюдается во взаимодействиях с межнуклеозидными фосфатами шага $G^{+2}A^{+1}/T^{(-1)}C^{(-2)}$ с 5'-стороны от повреждения: N ζ остатка Lys246 из мотива цинкового пальца образует слабую водородную связь с P^{+1} поврежденной цепи в Nei-X:A (только 1K3W), Nei-X:C и Nei-X:G, но не в остальных структурах, оставаясь во всех случаях достаточно близко к этому фосфату для электростатических взаимодействий. Боковой радикал остатка Val88 «прижимается» к фосфату P^{-2} комплементарной цепи, принимая различные конформации; водородная связь амида остова остатка Val88 и кислорода фосфата нуклеотида $C^{(-2)}$ при этом сохраняется. Наиболее пластичная часть интерфейса сформирована остатком Arg124 междоменного линкера, взаимодействующим с фосфатной группой P^{-3} поврежденной цепи: в Nei-X:A и Nei-X:G боковой радикал остатка Arg124 принимает несколько конформаций, в одной из которых образует одну или две сильные водородные связи с P^{-3} (через различные атомы гуанидиновой группы), тогда как в Nei-X:C и Nei-X:T он зафиксирован в единственной конформации («in»), сближенной с фосфатом P^{-3} .

С помощью модуля построения сетей водородных связей сервиса ProteinTools [200] в полученных структурах идентифицирован ряд устойчивых водородных сетей между боковыми радикалами, по-видимому, важных для функционирования белка. Наиболее значимые сети образованы остатками (I) Arg7, Asp11, Thr49 и Tyr209 и (II) Glu5, Tyr169, Ser208 и Arg212. Эти сети сходятся на N-концевой каталитической α -спирали (αA), связывая её с β -сэндвичем кора N-концевого домена, ДНК-связывающим мотивом «спираль–2 поворота–спираль» (спирали αH и αI) и неразрешённой петлёй (215–222), формирующей карман для связывания повреждения (Рисунок 46A). Дополнительно, сеть из остатков Asn168, Arg171

и Ser250 расположена сразу за остатком Tyr268 и связывает ДНК, мотив H2tH и цинковый палец (Рисунок 46А). В совокупности эти три сети охватывают все функционально значимые элементы EcoNei за исключением интеркалирующей петли ⁶⁹QLY⁷¹. Ещё одна сеть включает остатки Arg124, Arg151 и Asp159 (Рисунок 46Б): Oδ2[Asp159] образует раздвоенную водородную связь с гуанидиновой группой остатка Arg151, прочно фиксируя двуповоротную часть мотива H2tH, в которой расположен остаток Asp159, на С-концевом домене EcoNei. Остаток Arg124 принадлежит междоменному линкеру; ранее предполагалось, что пара остатков Arg124–Asp159 формирует ионный «замок», удерживающий «закрытую» конформацию белка после смыкания доменов на ДНК через изгиб в области остатков Gln123–Arg124 [246]. Новые структуры, однако, показывают, что этот замок недостаточно прочен: в Nei-X:С и Nei-X:Т R124 обнаружен лишь в одной «in»-конформации, сближенной с P⁻³ (Рисунок 46Б) и не контактирующей с остатком Asp159; в Nei-X:А и Nei-X:G остаток Arg124 имеет несколько конформаций, одна из которых образует одну или две сильные водородные связи с P⁻³ (с остатком Asp159 или без него), а остальные («out»-конформации) взаимодействуют с ДНК слабее, но контактируют с остатком Asp159. Наличие нескольких структур с разными основаниями напротив повреждения позволяет разделить идентифицированные сети на две группы. Стабильные сети связывают все основные функциональные элементы EcoNei, принадлежащие обоим доменам белка, жёстко фиксируя каталитический остов вокруг повреждённого нуклеотида. Лабильная сеть остатков Arg124–Arg151–Asp159, напротив, перестраивается, компенсируя зависящие от природы основания напротив повреждения вариации скрутки и изгиба ДНК; пластичность контактов остатков Arg124–Asp159–ДНК может играть роль в инициации смыкания доменов при связывании ДНК, наблюдаемого у H2tH-ферментов [123,142,244,246,248,268], а также в обратном размыкании доменов при высвобождении продукта.

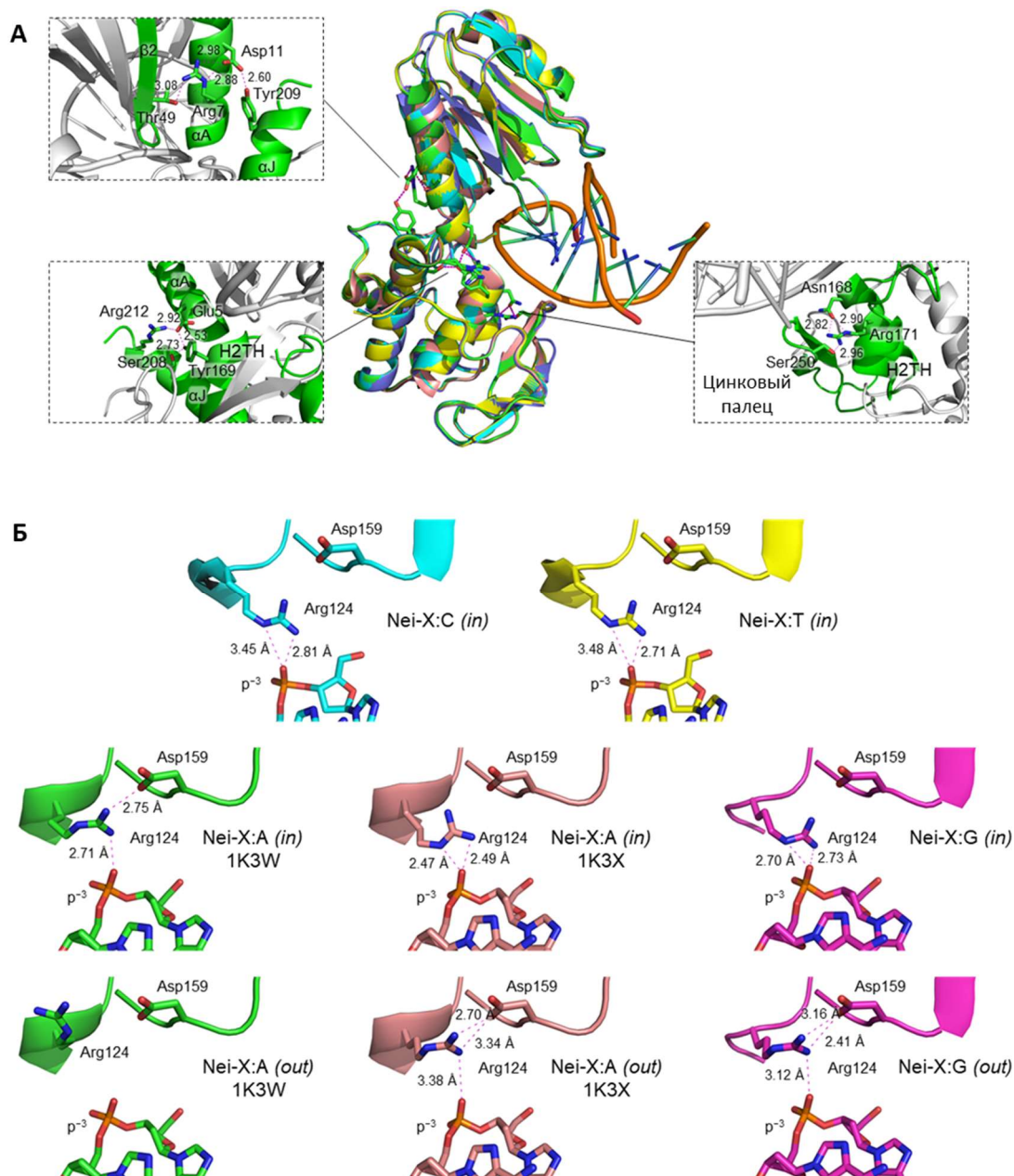


Рисунок 46. Сети водородных связей в структурах Nei-X:N. А — Сети, охватывающие каталитическую спираль αA, β-сэндвич кора N-концевого домена, мотив H2tH, неразрешенную в структуре петлю 215–222 и цинковый палец. На центральном структурном наложении цветовая схема та же, что и на рисунке 47А. Для ясности боковые цепи ДНК и аминокислотных остатков показаны только для Nei-X:A. На вставках — увеличенные изображения локальных сетей водородных связей, отображенных на структуре Nei-X:A и переориентированных для лучшей видимости; цифры — межатомные расстояния между донорами и акцепторами в Å. Б — Различные взаимодействия остатков Arg124 междоменного линкера и Asp159 мотива H2tH с ДНК в четырех структурах. Конформации Arg124 обозначены как «in» и «out».

4.3.3 Распознавание основания напротив повреждения

Наиболее неожиданная особенность полученных структур обнаружилась при детальном анализе взаимодействий EcoNei с основанием напротив повреждения (Рисунок 47). В Nei-X:A [123] Nε2 остатка Gln69 образует одну водородную связь с N3 аденина напротив повреждения. Атом N3 не специфичен для А и изостеричен N3 G и O2 пиримидинов; исходя из этого, можно было ожидать, что в новых комплексах сформируются водородные связи

$\text{Ne}\epsilon 2[\text{Gln}69]\text{--N}3[\text{G}^{(0)}]$, $\text{Ne}\epsilon 2[\text{Gln}69]\text{--O}2[\text{C}^{(0)}]$ и $\text{Ne}\epsilon 2[\text{Gln}69]\text{--O}2[\text{T}^{(0)}]$, стабилизирующие основание напротив повреждения вне зависимости от его природы. Ожидание оправдалось лишь частично. Только в комплексе Nei-X:G возникли предсказанные взаимодействия: остаток Gln69 образовал две водородные связи с $\text{G}^{(0)}$, $\text{O}\epsilon 1[\text{Gln}69]\text{--N}2[\text{G}^{(0)}]$ и $\text{Ne}\epsilon 2[\text{Gln}69]\text{--N}3[\text{G}^{(0)}]$ (Рисунок 47Б); петля и основание напротив повреждения практически не изменили своё положение по сравнению с Nei-X:A . Когда же в позицию напротив повреждения помещалось пиримидиновое основание, оно поворачивалось на 180° вокруг *N*-гликозидной связи в *син*-конформацию, в результате чего O2 оказывался обращён в большую бороздку ДНК и не взаимодействовал с ферментом (Рисунок 47А, В). Основание Т при этом сильнее наклонялось к экваториальной плоскости дезоксирибозного кольца с сопутствующим изменением конформации сахара на O4'-эндо (Рисунок 47В), тогда как для dC, dG и dA сохранялся C4'-экзо. В Nei-X:C и Nei-X:T боковой радикал остатка Gln69, освободившись от взаимодействий с основанием напротив повреждения, выходил из брешы между A^{+1} и G^{-1} и образовывал водородную связь $\text{O}\epsilon 1[\text{Gln}69]\text{--N}2[\text{G}^{-1}]$ с экзоциклической аминогруппой G^{-1} (Рисунок 47В). Это сопровождалось небольшим разворотом ($\sim 15^\circ$) G^{-1} вокруг *N*-гликозидной связи в пространство, освободившееся от бокового радикала остатка Gln69. Атом $\text{Ne}\epsilon 2[\text{Gln}69]$, вместо взаимодействий с ДНК (что наблюдается в Nei-X:A [123] и Nei-X:G), образовывал водородные связи с $\text{O}\eta[\text{Tyr}71]$ или $\text{O}\gamma[\text{Ser}104]$, а также располагался на расстоянии около 3,5 Å от молекул воды. Объёмные боковые радикалы остатков Leu70 и Tyr71 во всех структурах оставались в брешы между A^{+1} и G^{-1} , образуемой при изломе ДНК и выворачивании остатка сахара; остаток Tyr71 вклинивался между $\text{N}^{(0)}$ и $\text{T}^{(-1)}$, способствуя изгибанию ДНК. Прямых водородных связей между ферментом и атомами Уотсон–Криковской грани оснований С или Т в полученных структурах не обнаружено; обращённый в большую бороздку атом N3 основания Т гидратирован отдельной молекулой воды, а N4 основания С формирует водный мостик через большую бороздку к N6 основания A^{+1} . Анализ кристаллических контактов с использованием сервера PISA [197] подтвердил, что петля ${}^{69}\text{QLY}^{71}$ и основание напротив повреждения в Nei-X:C , Nei-X:G и Nei-X:T не вовлечены во взаимодействия с симметрическими молекулами кристалла; наблюдаемая ориентация пиримидинов, следовательно, не является артефактом упаковки.

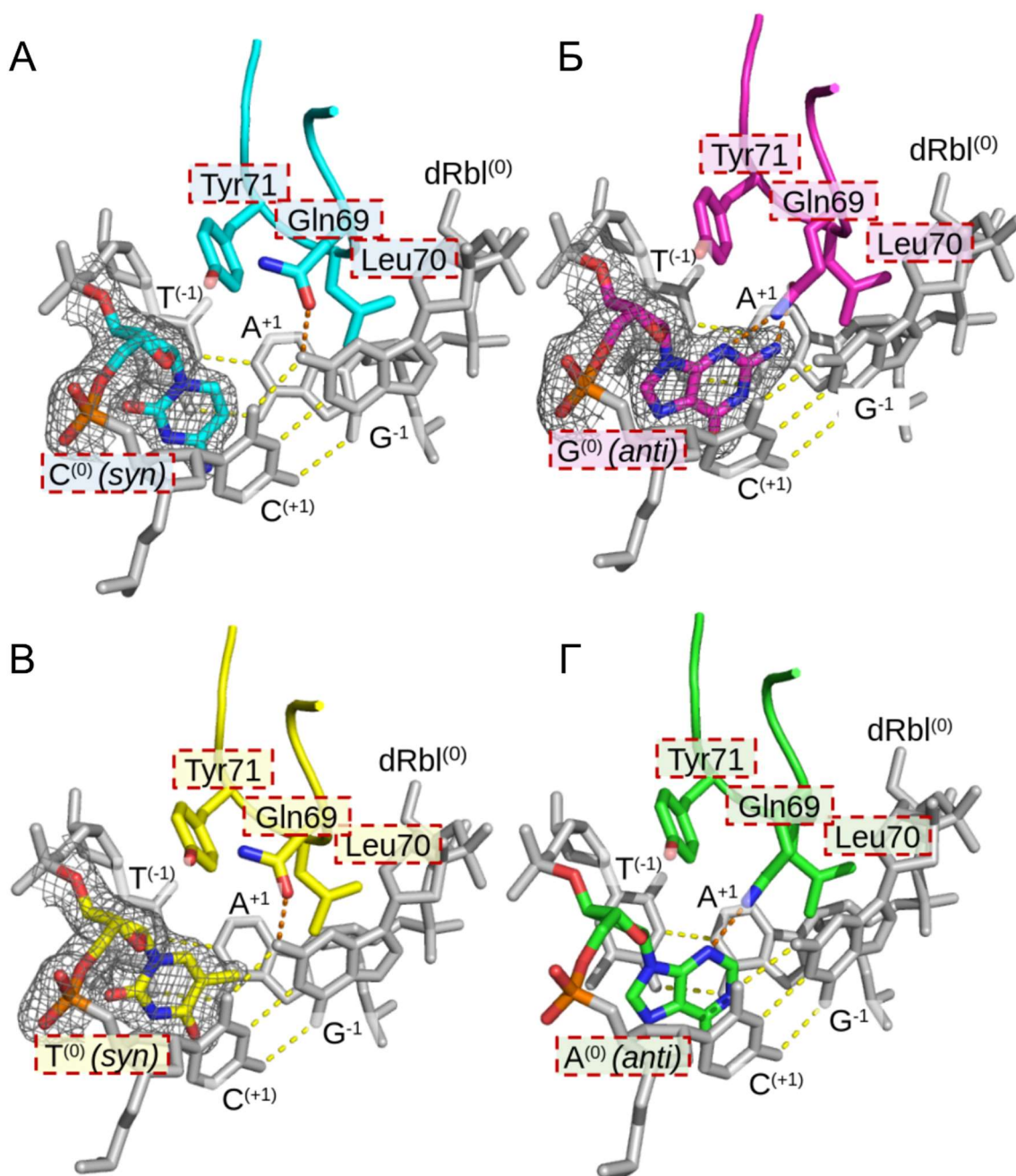


Рисунок 8. Взаимодействие EcoNei с основанием напротив повреждения в ДНК. А–Г — Крупный план бреши в ДНК, возникающей после удаления повреждённого нуклеотида, и интеркалирующей петли 69QLY71 в комплексах: А — Nei-X:C (голубой), Б — Nei-X:G (пурпурный), В — Nei-X:T (жёлтый) и Г — Nei-X:A (зелёный) [123]. Для А–В показана экспериментальная электронная плотность ($2F_o - F_c$) на уровне 1σ . Д — Конформации основания напротив повреждения С (атомы углерода — голубые) и Т (атомы углерода — жёлтые).

Высокое разрешение полученных структур (1,75 Å и 1,80 Å для Nei-X:C и Nei-X:T соответственно) позволило однозначно установить ориентацию основания напротив повреждения. EcoNei, таким образом, связывает дцОДН с пиримидиновым основанием напротив повреждения без специфических контактов с этим основанием: *син*-ориентация скрывает Уотсон–Криковскую грань пиримидина, направляя ребро C5=C6 внутрь спирали ДНК. Поскольку все четыре структуры получены с одной и той же последовательностью дцОДН,

нельзя полностью исключить, что наблюдаемая *син*-ориентация пиримидинов дополнительно стабилизируется водородной связью $O\epsilon 1[Gln69]-N2[G^{-1}]$, доступной только при наличии G в позиции -1; решение структур с другими нуклеотидами в окружении повреждения позволит проверить общность данного механизма. Из внутриспиральной ориентации C5=C6 ребра вытекает прямое предсказание: введение объёмного заместителя в положение C5 пиримидинового кольца напротив повреждения должно стерически препятствовать размещению комплементарного нуклеотида в спирали и снижать эффективность расщепления.

4.3.4 Биохимическая проверка *син*-ориентации пиримидина напротив повреждения

Для биохимической проверки структурного вывода о *син*-ориентации пиримидинового основания напротив повреждения была измерена активность EcoNei на субстратах, содержащих напротив повреждения T или два аналога урацила с объёмными заместителями у атома C5: 5-этилиурацил (EtU) и 5-(окта-1,7-диин-1-ил)-урацил (C8-AlkU) (см. разд. 3.2.19) [269,270] (Таблица 21). Биохимические эксперименты выполнялись к. х. н. А. В. Ендуткиным ЛГБИ ИХБФМ СО РАН. В качестве повреждения был выбран 5-гидроксиурацил (ohU): Tg имеет стереоизомеры, расщепляемые EcoNei с заметно различающейся эффективностью [271], тогда как для ohU уже опубликованы кинетические данные на 23-нуклеотидном дцОДН [140,246]. Ранее было показано, что ни сам EcoNei, ни его человеческие гомологи NEIL1 и NEIL2 не расщепляют дцОДН, содержащий EtU или C8-AlkU [272], то есть эти основания представляют собой нерасщепляемые модифицированные по C5 положению пиримидиновые нуклеозиды в позиции напротив повреждения, то есть не выступают субстратами фермента.

В одной временной точке (5 мин инкубации) количество продукта реакции расщепления для субстратов с EtU или C8-AlkU напротив повреждения оказалось примерно в 3 раза ниже, чем для субстрата с T напротив повреждения (Рисунок 48А). В условиях стационарной кинетики (Рисунок 48Б, Таблица 21) для EtU и C8-AlkU напротив повреждения значение k_{cat} снижалось в 1,7–2,1 раза по сравнению с T, тогда как K_M увеличивалось в 2 раза для EtU и в 4 раза для C8-AlkU. Константа специфичности k_{cat}/K_M снижалась в 4,1 раза для EtU и в 7,2 раза для C8-AlkU относительно T. Полученное значение k_{cat}/K_M для ohU//T ($4,2 \times 10^{-2} \text{ нМ}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) согласуется по порядку величины с ранее опубликованными данными для расщепления ohU EcoNei на 23-нуклеотидном дцОДН [140,246].

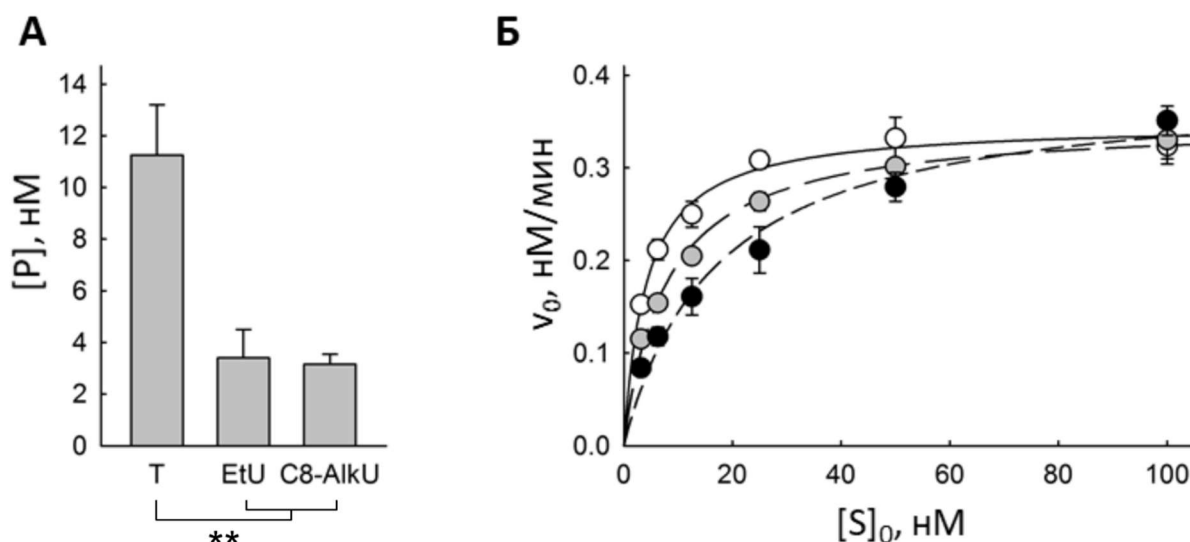


Рисунок 48. Эффективность расщепления субстратов с 5-замещёнными пиримидиновыми основаниями напротив повреждения (ohU) ферментом EcoNei. А — Количество образования продукта реакции расщепления ohU ферментом Nei за 5 минут в зависимости от основания напротив повреждения. Б — Зависимость скорости накопления продукта от концентрации субстрата в стационарных условиях. Белые кружки — ohU//T, серые — ohU//EtU, чёрные — ohU//C8-AlkU. Данные аппроксимированы уравнением Михаэлиса–Ментен. Для А и Б приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего трёх независимых экспериментов. Для А $** p < 0,01$ (статистическая значимость различий определена с помощью t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони).

Таблица 21. Кинетические параметры EcoNei в условиях стационарной кинетики для субстратов, содержащих различные 5-замещённые пиримидиновые основания напротив повреждения (ohU)^а.

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

^а Среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего трёх независимых экспериментов.

Полученные кинетические данные согласуются со структурным выводом: введение объёмного заместителя в положение С5 пиримидинового кольца напротив повреждения снижает эффективность расщепления EcoNei, причём эффект более выражен для более объёмного C8-AlkU, чем для EtU. Примечательно, что K_M возрастает заметно сильнее, чем падает k_{cat} ($\times 4$ против $\times 2$ для C8-AlkU) — это указывает на преимущественное нарушение стадии связывания и выворачивания повреждённого нуклеотида (которое отражается в K_M), а не химической стадии разрыва *N*-гликозидной связи (которая отражается в k_{cat}). Такое распределение эффекта согласуется со стерической моделью: объёмный С5-заместитель пиримидина, обращённый внутрь спирали в *син*-конформации, создаёт препятствие именно на этапе посадки фермента на ДНК. Сохранение определённого уровня активности (а не

полное её исчезновение) указывает на то, что нуклеотид напротив повреждения, по-видимому, обладает некоторой свободой *син-/анти*-равновесия в растворе, и природные пиримидиновые основания или их аналоги могут также распознаваться в *анти*-конформации; тем не менее в кристалле комплементарный пиримидиновый нуклеотид принимает энергетически наиболее выгодную *син*-конформацию.

Таким образом, получены и решены дифракционные данные для структур ковалентных конъюгатов EcoNei с дцОДН, содержащим С, G или Т напротив повреждения, депонированы три кристаллические структуры ковалентных конъюгатов EcoNei с дцОДН, содержащим С, G или Т напротив повреждения (Nei-X:C, Nei-X:G, Nei-X:T; PDB ID: 9VRM, 9VR3, 9VR4). Сравнение этих структур с ранее описанной структурой Nei-X:A [123] позволило установить пространственный механизм толерантности EcoNei к основанию напротив повреждения для использованной последовательности дцОДН. Оба пуриновых основания, А и G, распознаются единственной неспецифической водородной связью с N3, тогда как комплементарные пиримидины поворачиваются на 180° вокруг N-гликозидной связи в *син*-конформацию и не образуют каких-либо специфических контактов с ферментом. Высокое разрешение для структур Nei-X:C и Nei-X:T (1,75 Å и 1,80 Å соответственно) позволило однозначно установить ориентацию основания. Биохимическое подтверждение этой структурной интерпретации получено в кинетических экспериментах: введение объёмного заместителя у C5 пиримидинового кольца напротив повреждения снижает константу специфичности EcoNei в 4,1–7,2 раза, причём преимущественно за счёт K_M , что согласуется с внешнеспиральной ориентацией ребра C5=C6 в *син*-конформации и стерическим препятствием связыванию.

Анализ серии полученных структур позволил также идентифицировать стабильные и лабильные сети водородных связей в EcoNei. Стабильные сети охватывают все основные функциональные элементы фермента, принадлежащие обоим доменам, жёстко фиксируя каталитический остов вокруг повреждённого нуклеотида. Лабильная сеть с участием остатков Arg124, Arg151 и Asp159 перестраивается, компенсируя зависящие от природы основания напротив повреждения вариации скрутки и изгиба ДНК, и может играть роль в смыкании и размыкании доменов при связывании ДНК и высвобождении продукта.

Поворот пиримидинового основания напротив повреждения в *син*-конформацию как механизм решения проблемы толерантности к комплементарному основанию ранее не был описан ни для одной ДНК-гликозилазы. *Син*-конформация пуриновых нуклеотидов в белково-ДНК-комплексах нередко наблюдается в ДНК-полимеразах, осуществляющих транслезионный синтез [273–276], где она позволяет использовать Хугстиновскую грань

основания для распознавания. Среди ДНК-гликозилаз *син*-конформация G напротив повреждения зафиксирована в Fpg *B. stearothermophilus* (PDB ID: 1L2D [145]), MMH *A. thaliana* (PDB ID: 3TWM [245]) и NEIL1 мимивируса (PDB ID: 3VK7 [220]), однако все эти ферменты содержат триаду интеркалирующих остатков Fpg-типа (M/R/F петель $\beta 4/\beta 5$ и $\beta 7/\beta 8$), и атомы O6 и N7 *син*-dG в них изостеричны атомам N3 и O4 *анти*-dC, распознаваясь тем же остатком R интеркалирующей триады. В недавно решённой структуре NEIL1 человека с ДНК, содержащей мочевины [277] — структуре H2tH-семейства с A напротив повреждения — основание напротив повреждения остаётся в *анти*-конформации, а R вытеснен из контакта с ним; во всех остальных структурах NEIL1 человека с C напротив повреждения комплементарный C находится в *анти*-конформации и связан с R [221,242]. EcoNei, таким образом, является первым описанным примером белка, в кристалле которого внутриспиральные пиримидины обычной В-ДНК принимают *син*-конформацию с маскировкой их Уотсон–Криковской грани. Является ли наблюдаемая *син*-ориентация активно индуцированной EcoNei или пассивно допускаемой геометрией интеркалирующей петли ⁶⁹QLY⁷¹ — вопрос, требующий дальнейших экспериментов: молекулярной динамики, мутагенеза остатка Gln69, а также структур с другими нуклеотидными контекстами в окружении повреждения. Дальнейшие структурные исследования других ДНК-гликозилаз с различными основаниями напротив повреждения покажут, используется ли данный механизм более широко.

5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На текущий момент, суперсемейство ДНК-гликозилаз «спираль–2 поворота–спираль» изучено подробнее многих других белков репарации: известна пространственная архитектура ферментов, понятен общий механизм реакции, определены каталитические остатки, измерены константы отдельных стадий реакции. И всё же оставался открытым ряд вопросов касательно фундаментального функционирования фермента на каждой стадии катализа: как при образовании специфических контактов во время связывания с субстратом, так и во время непосредственно стадии катализа. В частности, экспериментально не были показаны состояния протонирования/депротонирования каталитической диады остатков Pro1–Glu2, таким образом ничего не было известно об электростатике активного центра фермента непосредственно во время катализа. Кроме того, несмотря на кристаллические данные с разрешенной петлёй, координирующей повреждение в Fpg, был неясен вклад основной цепи и боковых радикалов петли в каталитическую эффективность и распознавание разных окисленных оснований, а также неизвестны структурные основы субстратной специфичности Nei к основаниям напротив повреждения.

Настоящая работа представляет собой исследование, которое дополняет существующие знания о механизмах работы ферментов Fpg/Nei, формируя целостную картину катализа, и закрывает поставленные вопросы с помощью прямых экспериментальных подходов: ЭПР-спектроскопия спин-метки, конъюгированной с ДНК-лигандом в комплексе с вариантами Fpg, рандомизация функционально важной петли в Fpg и измерение кинетических параметров мутантных вариантов фермента на ДНК-субстратах и рентгеновская кристаллография серии ковалентных конъюгатов фермента Nei с ДНК.

Впервые была разработана pH-чувствительная спин-метка со значением pKa близким к физиологическим значениям pH, а также методика конъюгирования метки к ДНК и измерен электростатический потенциал активного центра фермента дикого типа и инактивированного варианта Fpg с помощью такого лиганда. Ионизация каталитической диады Pro1–Glu2 до сих пор оценивалась только методами МД-моделирования. Оказалось, что pH-чувствительная нитроксильная спин-метка, помещённая в брешь ДНК-лиганда, пригодна как репортёр: она располагается в 9 Å от α -аминогруппы остатка Pro1 и регистрирует создаваемый активным центром электростатический потенциал. Инактивирующая замена Glu2 $\rightarrow$ Gln сдвигает наблюдаемую pKa метки на $0,5 \pm 0,1$ единицы и создаёт буферное плечо при pH 7,00–7,37. Из чего следует, что такая замена меняет ионизационное состояние диады целиком, а не просто убирает акцептор протона. Разработанный экспериментальный подход без принципиальных изменений переносится на другие ферменты суперсемейства H2tH (EcoNei и человеческие NEIL1–NEIL3) и на белок-нуклеиновые комплексы в целом.

Более того, в будущем метод может быть усовершенствован (создание более компактных и структурно ригидных меток, объединение с продвинутыми протоколами ЭПР и ЯМР, а также МД). Углублённое понимание электростатических движущих сил в ферментативном катализе будет способствовать рациональному дизайну ингибиторов, нацеленных на пути репарации ДНК при онкологических заболеваниях, открывая путь к новым терапевтическим стратегиям.

Петля, координирующая повреждённое основание, у Fpg слабо консервативна, хотя её делеция приводит к инактивации фермента на субстрате, содержащем 8-охоG, но лишь минимально сказывается на активности в отношении FapyG, FapyA, Sp, Gh и АП-сайтов. В рамках текущей работы впервые было показано, что варианты Fpg *L. lactis* со случайными а. к. о. на месте тетрапептида ²¹⁹IRTY²²² сохранили укладку глобулы, наномолярное сродство к ДНК и механизм β/δ-элиминирования, но активность мутантных вариантов упала на 2–3 порядка на субстрате с целевым повреждением 8-охоG. Другие окислительные повреждения (такие как АП-сайт и 5-гидроксиурацил), мутантные варианты расщепляли с соизмеримой эффективностью, что и дикий тип Fpg. Помимо этого, частота мутаций с мутантными вариантами в комплементационном тесте в штамме *E. coli* CC104 с делецией генов *fpg* и *mutY* не снижали частоту мутаций относительно делеционного штамма. На основании структурных данных можно предположить, что у Fpg несколько конформаций петли способны поддерживать катализ для разных субстратов, однако конформации, выгодные для удаления 8-охоG, легче нарушаются мутациями в петле. Можно заключить, что узнавание 8-охоG выглядит как позднее приобретение суперсемейства H2tH, расширяющее способность Nei-подобных ферментов работать с широким набором окисленных пиримидинов. С более практической точки зрения, эволюционную пластичность тетрапептидной петли у ферментов H2tH можно использовать для изменения их субстратной специфичности к другим повреждённым или синтетическим неприродным основаниям, создавая новые инструменты для биоаналитики и молекулярно-биологических методов.

Кристаллизация ковалентных конъюгатов Nei *E. coli* с ДНК, содержащей C, G или T напротив повреждения, позволила получить ответ на вопрос, почему фермент способен удалять окисленные основания из ДНК со схожей активностью с любым основанием напротив, а также была обнаружена уникальная особенность: пурины остаются в *анти*-конформации и удерживаются водородными связями с а. к. о. интеркалирующей триады, в то время как для пиримидинов не было обнаружено предсказанных взаимодействий из-за изменения конформации нуклеозида — пиримидиновые основания поворачиваются вокруг *N*-гликозидной связи в *син*-конформацию, прячут Уотсон–Криковскую грань в большую бороздку

и с белком не контактируют вовсе. При увеличении длины заместителя при С5 атоме в пиримидине константа специфичности падает в 4–7 раз, преимущественно за счёт K_M . Для ДНК-гликозилаз такая особенность взаимодействия с комплементарным основанием напротив повреждения описана впервые.

Таким образом, представленная работа не только формирует целостную картину механизмов катализа ферментов суперсемейства «спираль–2 поворота–спираль», но и выстраивает несколько очевидных продолжений для дальнейшей работы, связанной как с изучением механизмов реакции других ДНК-связывающих белков, так и с применением полученных данных для изменения свойств ферментов для прикладных целей.

6 ВЫВОДЫ

1. Разработана методика на основе рН-чувствительной спиновой метки 2-(2-((2,5-диоксопирролидинокси)карбонил)фенил)-2,5,5-триметил-4-(пирролидино)-2,5-дигидро-1Н-имидазол-1-оксила, позволяющая определять электростатический потенциал внутри активного центра фермента при физиологических значениях рН с помощью импульсного ЭПР. С её использованием показано, что замена остатка Glu2 на Gln в формаидопиримидин-ДНК-гликозилазе (Fpg) *Escherichia coli* смещает значение pK_a метки в основную сторону на $0,5 \pm 0,1$ по шкале рН и приводит к изменению характера кривых титрования при рН 7,00–7,37, что отражает изменение электростатического потенциала активного центра при инактивирующей замене и подтверждает важность остатка Glu2 как акцептора протона в ходе реакции.

2. Варианты фермента Fpg *Lactococcus lactis* со случайной последовательностью петли 219–222, сохраняя общую стабильность белка, сродство к повреждённой ДНК и каталитический механизм, теряют способность расщеплять субстраты, содержащие 8-оксогуанин, но не альтернативные субстраты (апурин-апиримидиновый сайт или 5-гидроксиурацил), что указывает на ключевой вклад этой петли в узнавание окисленных пуринов в ДНК.

3. В кристаллических структурах ковалентных конъюгатов эндонуклеазы VIII (Nei) *E. coli* с ДНК, пуриновые нуклеотиды напротив повреждения сохраняют *анти*-конформацию и образуют водородную связь между атомом N3 и остатком Gln69 интеркалирующей петли, тогда как пиримидиновые нуклеотиды находятся в *син*-конформации и контактов с белком вообще не образуют. Существование такой структуры в фермент-субстратном комплексе в ходе реакции подтверждается снижением эффективности расщепления ДНК с ростом объёма заместителя при C5 пиримидинового нуклеотида напротив повреждения. Подобный способ адаптировать все канонические нуклеотиды в фермент-субстратном комплексе уникален для Nei и объясняет способность этого фермента узнавать широкий спектр окислительных повреждений напротив их естественных комплементарных партнеров.

7 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

1,N ⁶ -εA	1,N ⁶ -этенoadенин
3,N ⁴ -εC	3,N ⁴ -этенoцитозин
5-caC	5-карбоксицитозин
5-fC	5-формилцитозин
5-fU	5-формилурацил
5-hmU	5-гидроксиметилурацил
5-meC	5-метилцитозин
6-4PP	(6-4)-фотопродукт пиримидин-пиримидона
8-охоA	8-оксоаденин
8-охоG	8-оксогуанин; 2-амино-7,9-дигидро-1H-пурин-6,8-дион
AlkA	3-метиладенин-ДНК-гликозилаза II
AlkB	ДНК-диоксигеназа AlkB <i>E. coli</i>
AlkC	3-метиладенин-ДНК-гликозилаза AlkC (<i>Bacillus cereus</i>)
AlkD	3-метиладенин-ДНК-гликозилаза AlkD (<i>Bacillus cereus</i>)
AlkU	5-(α-этоксид-α-карбамоилметил)урацил (модифицированное основание)
AlkZ	ДНК-гликозилаза AlkZ
aPu	2-аминопурин
AZL	AlkZ-like, подсемейство ДНК-гликозилаз, родственных AlkZ
BstFpg	формаидопиримидин-ДНК-гликозилаза <i>Bacillus stearothermophilus</i>
C8-AlkU	5-(окта-1,7-диин-1-ил)-урацил
CLEANEX-PM	phase-modulated CLEAN chemical EXchange, импульсная последовательность ЯМР для измерения скорости обмена имино/амидных протонов с растворителем
CPD	cyclobutane pyrimidine dimer, циклобутановый пиримидиновый димер
DEER	double electron-electron resonance, двойной электрон-электронный резонанс
dNTP	дезоксинуклеозидтрифосфат (смесь dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
dRbl	2-дезоксирибит (восстановленный аналог АП-сайта)
DTT	1,4-дитиотреитол (см. также ДТТ)
DXL	disulfide cross-linking, дисульфидный кросслинкинг
EC	encounter complex, комплекс встречи фермента с повреждённым сайтом ДНК
EcoFpg	формаидопиримидин-ДНК-гликозилаза <i>E. coli</i>
EDTA	этилендиамин-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота

EndoIII	endonuclease III, эндонуклеаза III (Nth)
EndoVIII	endonuclease VIII, эндонуклеаза VIII (Nei)
ESEEM	electron spin echo envelope modulation, модуляция огибающей сигналов электронного спинового эха
EtU	5-этинилурацил
FAM	6-carboxyfluorescein, 6-карбоксифлуоресцеин (флуоресцентная метка)
FapyA	4,6-диамино-5-формаидопиримидин
FapyG	2,6-диамино-4-гидрокси-5-формаидопиримидин
Fpg	formamidopyrimidine-DNA glycosylase, формаидопиримидин-ДНК-гликозилаза
Gh	guanidinohydantoin, гуанидиногидантоин
H2tH	helix-two turns-helix, спираль–2 поворота–спираль — структурный мотив и суперсемейство ДНК-гликозилаз
HEAT	повтор, встречающийся в белках Huntingtin, EF3, PR65A, TOR (название суперсемейства)
HEPES	4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
HhH	helix-hairpin-helix, спираль–шпилька–спираль — структурный мотив и суперсемейство ДНК-гликозилаз
HLR	HEAT-like repeat, HEAT-подобный повтор — структурный мотив и суперсемейство ДНК-гликозилаз
h ₂ T	5,6-дигидротимин
h ₂ U	5,6-дигидроурацил
IC	interrogation complex, интеррогационный комплекс
ICL	interstrand cross-link, межцепочечная сшивка ДНК
k_{cat}	каталитическая константа реакции
K _d	равновесная константа диссоциации
K_M	константа Михаэлиса
LigA	NAD ⁺ -зависимая ДНК-лигаза <i>E. coli</i>
LlaFpg	формаидопиримидин-ДНК-гликозилаза <i>Lactococcus lactis</i>
LRC	lesion recognition complex, комплекс распознавания повреждения
MBD4	methyl-CpG-binding domain protein 4, белок 4, содержащий метил-CpG-связывающий домен
MeHyd	5-гидрокси-5-метилгидантоином
MMS	метилметансульфонат
MNNG	N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин

MTH1	8-оксо-dGTPаза человека
MutH	эндонуклеаза MutH (система мисматч репарации <i>E. coli</i>)
MutL	белок MutL (система мисматч репарации <i>E. coli</i>)
MutM	формамидопиримидин-ДНК-гликозилаза <i>E. coli</i> (= Fpg)
MutS	белок-сенсор MutS (система мисматч репарации <i>E. coli</i>)
MutT	8-оксо-dGTPаза <i>E. coli</i>
MutY	аденин-ДНК-гликозилаза <i>E. coli</i>
MUTYH	аденин-ДНК-гликозилаза человека
NAD ⁺	никотинамидадениндинуклеотид (окисленная форма)
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Национальный центр биотехнологической информации (США)
Nei	endonuclease VIII, эндонуклеаза VIII <i>E. coli</i>
NEIL1	Nei-like 1, Nei-подобная ДНК-гликозилаза 1 человека
NEIL2	Nei-like 2, Nei-подобная ДНК-гликозилаза 2 человека
NEIL3	Nei-like 3, Nei-подобная ДНК-гликозилаза 3 человека
Nfo	АП-эндонуклеаза IV <i>E. coli</i> (= EndoIV)
Nth	endonuclease III, эндонуклеаза III <i>E. coli</i>
NTHL1	Nth-like 1, Nth-подобная ДНК-гликозилаза 1 человека
N ³ -meA	N ³ -метиладенин
N ³ -meG	N ³ -метилгуанин
N ⁷ -meA	N ⁷ -метиладенин
N ⁷ -meG	N ⁷ -метилгуанин
OGG1	8-oxoguanine-DNA glycosylase 1, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза 1 человека
ohC	5-гидроксицитозин
ohU	5-гидроксиурацил
O ⁴ -meT	O ⁴ -метилтимин
O ⁶ -meG	O ⁶ -метилгуанин
PDB	Protein Data Bank
pK _a	отрицательный десятичный логарифм константы кислотности
PMF	potential of mean force, потенциал средней силы
PMSF	фенилметилсульфонилфторид
PolI	DNA polymerase I, ДНК-полимераза I <i>E. coli</i>
RMSD	root-mean-square deviation, среднеквадратичное отклонение координат
SC	slanted complex, наклонённый комплекс

SDS	sodium dodecyl sulfate, додецилсульфат натрия
SMUG1	single-strand-selective monofunctional UDG, одноцепочечно-специфичная монофункциональная UDG
Sp	spiroiminodihydantoin, спироиминодигидантоин
TAMRA	тетраметилкарбоксиродамин (флуоресцентная метка)
TDG	thymine-DNA glycosylase, тимин-ДНК-гликозилаза
TEMED	N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
Tg	thymine glycol, тимингликоль (5,6-дигидрокси-5,6-дигидротимин)
THF	tetrahydrofuran, (3-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)метилфосфат — нерасщепляемый аналог АП-сайта
TIRFM	total internal reflection fluorescence microscopy, флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения
Tris	2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол
T _m	melting temperature, температура плавления
UDG	uracil-DNA glycosylase, урацил-ДНК-гликозилаза (общее название суперсемейства)
UDGa	урацил-ДНК-гликозилаза семейства 4 (термофилы)
UDGb	урацил-ДНК-гликозилаза семейства 5
UDGX	урацил-ДНК-гликозилаза семейства 6 (<i>M. smegmatis</i>)
Ug	uracil glycol, урацилгликоль
UNG	uracil-N-glycosylase, урацил-ДНК-гликозилаза семейства 1 (человек, <i>E. coli</i>)
UvrA	субъединица UvrA эксцизионной репарации нуклеотидов <i>E. coli</i>
UvrB	субъединица UvrB эксцизионной репарации нуклеотидов <i>E. coli</i>
UvrC	субъединица UvrC эксцизионной репарации нуклеотидов <i>E. coli</i>
UvrD	DNA helicase II, ДНК-геликаза II <i>E. coli</i>
WT	wild-type, дикий тип (нативный, немутантный вариант фермента)
Xth	АП-эндонуклеаза III (ExoIII) <i>E. coli</i>
YTM	ятакемицин (природный генотоксин)
εA	1,N ⁶ -этенoadенин
εC	3,N ⁴ -этенoцитозин
εG	N ² ,3-этенoгуанин
а. к. о.	аминокислотный остаток (аминокислотные остатки)
АКС	активные карбонильные соединения
АП	апуриновый-апиримидиновый

АТФ	аденозин-5'-трифосфат
АФК	активные формы кислорода
БСА	бычий сывороточный альбумин
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
дц	двуцепочечный(ая)
дцДНК	двуцепочечная ДНК
дцОДН	двуцепочечный олигодезоксирибонуклеотид
ИПТГ	изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
КГБ	кластер генов биосинтеза
МД	молекулярная динамика
ОДН	олигодезоксирибонуклеотид(ы), олигодезоксирибонуклеотидный
оц	одноцепочечный(ая)
оцДНК	одноцепочечная ДНК
п. н.	пар нуклеотидов
п. о.	пар оснований
ПААГ	полиакриламидный гель
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНК	рибонуклеиновая кислота
СК	степень консервативности
УФ	ультрафиолетовое (излучение)
ЭПР	электронный парамагнитный резонанс
ЭРН	эксцизионная репарация нуклеотидов (см. также NER)
ЭРО	эксцизионная репарация оснований (см. также BER)
ЯМР	ядерный магнитный резонанс

В тексте также использовались одно- и трёхбуквенные обозначения аминокислотных остатков и азотистых оснований по номенклатуре IUPAC, а также общепринятые сокращения единиц измерения системы СИ.

7. СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature*. – 1993. – V. 362. – № 6422. – P. 709–715.
2. Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W., Wood R.D., Schultz R.A., Ellenberger T. DNA Repair and Mutagenesis. – 2nd ed. – Washington, DC: ASM Press, 2006. – 1118 p.
3. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. – 4th ed. – New York: W.H. Freeman, 2005. – 1100 p.
4. Davies K.J. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: A new paradigm for oxidative stress // *IUBMB Life*. – 1999. – V. 48. – № 1. – P. 41–47.
5. Active Oxygen in Chemistry / Eds. C.S. Foote, J.S. Valentine, A. Greenberg, J.F. Liebman. – Dordrecht: Springer, 1995. – 342 p.
6. Haugaard N. Cellular mechanisms of oxygen toxicity // *Physiol. Rev.* – 1968. – V. 48. – № 2. – P. 311–373.
7. Aranda R., Cai H., Worley C.E., Levin E.J., Li R., Olson J.S., Phillips G.N., Richards M.P. Structural analysis of fish versus mammalian hemoglobins: Effect of the heme pocket environment on autooxidation and heme loss // *Proteins*. – 2009. – V. 75. – № 1. – P. 217–230.
8. Figueira T.R., Barros M.H., Camargo A.A., Castilho R.F., Ferreira J.C.B., Kowaltowski A.J., Sluse F.E., Souza-Pinto N.C., Vercesi A.E. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: From molecular mechanisms to human health // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – V. 18. – № 16. – P. 2029–2074.
9. Crespo-Hernández C.E., Close D.M., Gorb L., Leszczynski J. Determination of redox potentials for the Watson-Crick base pairs, DNA nucleosides, and relevant nucleoside analogues // *J. Phys. Chem. B*. – 2007. – V. 111. – № 19. – P. 5386–5395.
10. Gedik C.M., Collins A., ESCODD Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study // *FASEB J.* – 2005. – V. 19. – № 1. – P. 82–84.
11. Zharkov D.O. Base excision DNA repair // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2008. – V. 65. – № 10. – P. 1544–1565.
12. Riley P.A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1994. – V. 65. – № 1. – P. 27–33.
13. Röszer T. The Biology of Subcellular Nitric Oxide. – Dordrecht: Springer, 2012.
14. Perez K.M., Laughon M. Sildenafil in term and premature infants: A systematic review // *Clin. Ther.* – 2015. – V. 37. – № 11. – P. 2598–2607.e1.
15. Janeway C.A., Travers P., Walport M., Capra J.D. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. – 4th ed. – New York: Garland Publishing, 1999. – 635 p.
16. Lonkar P., Dedon P.C. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: Reconciling chemical mechanisms and biological fates // *Int. J. Cancer*. – 2011. – V. 128. – № 9. – P. 1999–2009.
17. Lee Y.A., Yun B.H., Kim S.K., Margolin Y., Dedon P.C., Geacintov N.E., Shafirovich V. Mechanisms of oxidation of guanine in DNA by carbonate radical anion, a decomposition product of nitrosoperoxy carbonate // *Chem. Eur. J.* – 2007. – V. 13. – № 16. – P. 4571–4581.
18. Lemaire D.G., Ruzsicska B.P. Kinetic analysis of the deamination reactions of cyclobutane dimers of thymidyl-3',5'-2'-deoxycytidine and 2'-deoxycytidyl-3',5'-thymidine // *Biochemistry*. – 1993. – V. 32. – № 10. – P. 2525–2533.
19. Hayatsu H. Bisulfite modification of nucleic acids and their constituents // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 1976. – V. 16. – P. 75–124.
20. Schuster H. The reaction of nitrous acid with deoxyribonucleic acid // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1960. – V. 2. – № 5. – P. 320–323.
21. Kavli B., Slupphaug G., Krokan H.E. Genomic uracil in biology, immunity and cancer // *DNA Damage, DNA Repair and Disease. V. 1* / Eds. M. Dizdaroglu, R.S. Lloyd. – Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2020. – P. 220–248.
22. Lindahl T. DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base excision-repair // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 1979. – V. 22. – P. 135–192.
23. Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation: BEIR VII, Phase I, Letter Report / National Research Council (US) Board on Radiation Effects Research. – Washington, DC: National Academies Press, 1998.
24. Drabløs F., Feyzi E., Aas P.A., Vaagbø C.B., Kavli B., Bratlie M.S., Peña-Díaz J., Otterlei M., Slupphaug G., Krokan H.E. Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance // *DNA Repair*. – 2004. – V. 3. – № 11. – P. 1389–1407.

25. Shrivastav N., Li D., Essigmann J.M. Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation // *Carcinogenesis*. – 2010. – V. 31. – № 1. – P. 59–70.
26. Lutz W.K. Endogenous genotoxic agents and processes as a basis of spontaneous carcinogenesis // *Mutat. Res.* – 1990. – V. 238. – № 3. – P. 287–295.
27. Barrows L.R., Magee P.N. Nonenzymatic methylation of DNA by S-adenosylmethionine in vitro // *Carcinogenesis*. – 1982. – V. 3. – № 3. – P. 349–351.
28. Rydberg B., Lindahl T. Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction // *EMBO J.* – 1982. – V. 1. – № 2. – P. 211–216.
29. Marnett L.J. Oxyradicals and DNA damage // *Carcinogenesis*. – 2000. – V. 21. – № 3. – P. 361–370.
30. Singer B., Kuśmierk J.T. Chemical mutagenesis // *Annu. Rev. Biochem.* – 1982. – V. 51. – P. 655–693.
31. Gros L., Ishchenko A.A., Saparbaev M. Enzymology of repair of etheno-adducts // *Mutat. Res.* – 2003. – V. 531. – № 1–2. – P. 219–229.
32. Chatterjee N., Walker G.C. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2017. – V. 58. – № 5. – P. 235–263.
33. De Bont R., van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data // *Mutagenesis*. – 2004. – V. 19. – № 3. – P. 169–185.
34. Lindahl T., Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid // *Biochemistry*. – 1972. – V. 11. – № 19. – P. 3610–3618.
35. Yudkina A.V., Zharkov D.O. The hidden elephant: Modified abasic sites and their consequences // *DNA Repair*. – 2025. – V. 148. – P. 103823.
36. Shapiro R. Damage to DNA caused by hydrolysis // *Chromosome Damage and Repair* / Eds. E. Seeberg, K. Kleppe. – New York: Plenum Press, 1981. – P. 3–18.
37. Wilde J.A., Bolton P.H., Mazumder A., Manoharan M., Gerlt J.A. Characterization of the equilibrating forms of the aldehydic abasic site in duplex DNA by oxygen-17 NMR // *J. Am. Chem. Soc.* – 1989. – V. 111. – № 5. – P. 1894–1896.
38. Greenberg M.M. Abasic and oxidized abasic site reactivity in DNA: Enzyme inhibition, cross-linking, and nucleosome catalyzed reactions // *Acc. Chem. Res.* – 2014. – V. 47. – № 2. – P. 646–655.
39. Faure V., Constant J.-F., Dumy P., Saparbaev M. 2'-deoxyribonolactone lesion produces G→A transitions in *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32. – № 9. – P. 2937–2946.
40. Greenberg M.M., Weledji Y.N., Kroeger K.M., Kim J. In vitro replication and repair of DNA containing a C2'-oxidized abasic site // *Biochemistry*. – 2004. – V. 43. – № 48. – P. 15217–15222.
41. Greenberg M.M., Weledji Y.N., Kroeger K.M., Kim J., Goodman M.F. In vitro effects of a C4'-oxidized abasic site on DNA polymerases // *Biochemistry*. – 2004. – V. 43. – № 9. – P. 2656–2663.
42. Kroeger K.M., Kim J., Goodman M.F., Greenberg M.M. Effects of the C4'-oxidized abasic site on replication in *Escherichia coli*. An unusually large deletion is induced by a small lesion // *Biochemistry*. – 2004. – V. 43. – № 43. – P. 13621–13627.
43. Lindahl T., Andersson A. Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid // *Biochemistry*. – 1972. – V. 11. – № 19. – P. 3618–3623.
44. Nakamura J., Nakamura M. DNA-protein crosslink formation by endogenous aldehydes and AP sites // *DNA Repair*. – 2020. – V. 88. – P. 102806.
45. Taylor J.-S. New structural and mechanistic insight into the A-rule and the instructional and non-instructional behavior of DNA photoproducts and other lesions // *Mutat. Res.* – 2002. – V. 510. – № 1–2. – P. 55–70.
46. Sinha R.P., Häder D.P. UV-induced DNA damage and repair: a review // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2002. – V. 1. – № 4. – P. 225–236.
47. Setlow R.B. The photochemistry, photobiology, and repair of polynucleotides // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 1968. – V. 8. – P. 257–295.
48. Smith K.C. Photochemistry of the nucleic acids // *Photophysiology*. V. 2 / Ed. A.C. Giese. – New York: Academic Press, 1964. – P. 329–388.
49. Varghese A.J. Photochemistry of uracil and uridine // *Biochemistry*. – 1971. – V. 10. – № 23. – P. 4283–4290.

50. Wacker A., Dellweg H., Träger L., Kornhauser A., Lodemann E., Türk G., Selzer R., Chandra P., Ishimoto M. Organic photochemistry of nucleic acids // *Photochem. Photobiol.* – 1964. – V. 3. – № 4. – P. 369–394.
51. Mitchell D.L., Nairn R.S. The biology of the (6-4) photoproduct // *Photochem. Photobiol.* – 1989. – V. 49. – № 6. – P. 805–819.
52. Hayes F.N., Williams D.L., Ratliff R.L., Varghese A.J., Rupert C.S. Effect of a single thymine photodimer on the oligodeoxythymidylate-polydeoxyadenylate interaction // *J. Am. Chem. Soc.* – 1971. – V. 93. – № 19. – P. 4940–4942.
53. Ward J.F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: Identities, mechanisms of formation, and reparability // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 1988. – V. 35. – P. 95–125.
54. von Sonntag C. Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair: A Chemical Perspective. – Berlin; Heidelberg: Springer, 2006. – 523 p.
55. Breen A.P., Murphy J.A. Reactions of oxyl radicals with DNA // *Free Radic. Biol. Med.* – 1995. – V. 18. – № 6. – P. 1033–1077.
56. Isabelle V., Prévost C., Spothheim-Maurizot M., Sabattier R., Charlier M. Radiation-induced damages in single- and double-stranded DNA // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1995. – V. 67. – № 2. – P. 169–176.
57. Iliakis G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells // *Bioessays.* – 1991. – V. 13. – № 12. – P. 641–648.
58. Goodhead D.T. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1994. – V. 65. – № 1. – P. 7–17.
59. Georgakilas A.G. Processing of DNA damage clusters in human cells: current status of knowledge // *Mol. Biosyst.* – 2008. – V. 4. – № 1. – P. 30–35.
60. Sage E., Shikazono N. Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis // *Free Radic. Biol. Med.* – 2017. – V. 107. – P. 125–135.
61. Kunkel T.A., Erie D.A. DNA mismatch repair // *Annu. Rev. Biochem.* – 2005. – V. 74. – P. 681–710.
62. Kunkel T.A., Erie D.A. Eukaryotic mismatch repair in relation to DNA replication // *Annu. Rev. Genet.* – 2015. – V. 49. – P. 291–313.
63. Pfeifer G.P. Mutagenesis at methylated CpG sequences // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2006. – V. 301. – P. 259–281.
64. Rupert C.S. Photoreactivation of transforming DNA by an enzyme from bakers' yeast // *J. Gen. Physiol.* – 1960. – V. 43. – № 3. – P. 573–595.
65. Sassanfar M., Dosanjh M.K., Essigmann J.M., Samson L. Relative efficiencies of the bacterial, yeast, and human DNA methyltransferases for the repair of O6-methylguanine and O4-methylthymine. Suggestive evidence for O4-methylthymine repair by eukaryotic methyltransferases // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266. – № 5. – P. 2767–2771.
66. Wu T.H., Marinus M.G. Deletion mutation analysis of the mutS gene in *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – № 9. – P. 5948–5952.
67. Spampinato C., Modrich P. The MutL ATPase is required for mismatch repair // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – № 13. – P. 9863–9869.
68. Grilley M., Griffith J., Modrich P. Bidirectional excision in methyl-directed mismatch repair // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – № 16. – P. 11830–11837.
69. Guarné A., Ramon-Maiques S., Wolff E.M., Ghirlando R., Hu X., Miller J.H., Yang W. Structure of the MutL C-terminal domain: a model of intact MutL and its roles in mismatch repair // *EMBO J.* – 2004. – V. 23. – № 21. – P. 4134–4145.
70. Modrich P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair // *Annu. Rev. Genet.* – 1991. – V. 25. – P. 229–253.
71. Cooper D.L., Lahue R.S., Modrich P. Methyl-directed mismatch repair is bidirectional // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – № 16. – P. 11823–11829.
72. Viswanathan M., Lovett S.T. Exonuclease X of *Escherichia coli*. A novel 3'-5' DNase and DnaQ superfamily member involved in DNA repair // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – № 42. – P. 30094–30100.
73. Iyer R.R., Pluciennik A., Burdett V., Modrich P.L. DNA mismatch repair: Functions and mechanisms // *Chem. Rev.* – 2006. – V. 106. – № 2. – P. 302–323.
74. Schofield M.J., Hsieh P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2003. – V. 57. – P. 579–608.
75. Boyce R.P., Howard-Flanders P. Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in *E. coli* K-12 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1964. – V. 51. – № 2. – P. 293–300.

76. Setlow R.B., Carrier W.L. The disappearance of thymine dimers from DNA: an error-correcting mechanism // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1964. – V. 51. – № 2. – P. 226–231.
77. Sancar G.B. DNA photolyases: Physical properties, action mechanism, and roles in dark repair // *Mutat. Res.* – 1990. – V. 236. – № 2–3. – P. 147–160.
78. Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Unsal-Kaçmaz K., Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints // *Annu. Rev. Biochem.* – 2004. – V. 73. – P. 39–85.
79. Myles G.M., Sancar A. Isolation and characterization of functional domains of UvrA // *Biochemistry.* – 1991. – V. 30. – № 16. – P. 3834–3840.
80. Selby C.P., Sancar A. Structure and function of the (A)BC excinuclease of *Escherichia coli* // *Mutat. Res.* – 1990. – V. 236. – № 2–3. – P. 203–211.
81. Snowden A., Kow Y.W., Van Houten B. Damage repertoire of the *Escherichia coli* UvrABC nuclease complex includes abasic sites, base-damage analogues, and lesions containing adjacent 5' or 3' nicks // *Biochemistry.* – 1990. – V. 29. – № 31. – P. 7251–7259.
82. Eichman B.F., Mooers B.H., Alberti M., Hearst J.E., Ho P.S. The crystal structures of psoralen cross-linked DNAs: drug-dependent formation of Holliday junctions // *J. Mol. Biol.* – 2001. – V. 308. – № 1. – P. 15–26.
83. Orren D.K., Sancar A. The (A)BC excinuclease of *Escherichia coli* has only the UvrB and UvrC subunits in the incision complex // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1989. – V. 86. – № 14. – P. 5237–5241.
84. Moolenaar G.F., Höglund L., Goosen N. Clue to damage recognition by UvrB: residues in the beta-hairpin structure prevent binding to non-damaged DNA // *EMBO J.* – 2001. – V. 20. – № 21. – P. 6140–6149.
85. Moolenaar G.F., Herron M.F., Monaco V., van der Marel G.A., van Boom J.H., Visse R., Goosen N. The role of ATP binding and hydrolysis by UvrB during nucleotide excision repair // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – № 11. – P. 8044–8050.
86. Orren D.K., Selby C.P., Hearst J.E., Sancar A. Post-incision steps of nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. Disassembly of the UvrBC-DNA complex by helicase II and DNA polymerase I // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V. 267. – № 2. – P. 780–788.
87. Kanno S.-I., Kuzuoka H., Sasao S., Hong Z., Lan L., Nakajima S., Yasui A. A novel human AP endonuclease with conserved zinc-finger-like motifs involved in DNA strand break responses // *EMBO J.* – 2007. – V. 26. – № 8. – P. 2094–2103.
88. Demple B., Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: Enzymology and biology // *Annu. Rev. Biochem.* – 1994. – V. 63. – P. 915–948.
89. Gruber C.C., Walker G.C. Incomplete base excision repair contributes to cell death from antibiotics and other stresses // *DNA Repair.* – 2018. – V. 71. – P. 108–117.
90. Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., Vorobjev Y.N., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Fedorova O.S. Pre-steady-state kinetic study of substrate specificity of *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase // *Biochemistry.* – 2007. – V. 46. – № 2. – P. 424–435.
91. Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Fedorova O.S. Kinetics of substrate recognition and cleavage by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – V. 33. – № 12. – P. 3919–3931.
92. Mullins E.A., Warren G.M., Bradley N.P., Eichman B.F. Structure of a DNA glycosylase that unhooks interstrand cross-links // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2017. – V. 114. – № 17. – P. 4400–4405.
93. Francis A.W., David S.S. *Escherichia coli* MutY and Fpg utilize a processive mechanism for target location // *Biochemistry.* – 2003. – V. 42. – № 3. – P. 801–810.
94. Mechetin G.V., Endutkin A.V., Diatlova E.A., Zharkov D.O. Inhibitors of DNA glycosylases as prospective drugs // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – № 9. – P. 3118.
95. Nelson S.R., Dunn A.R., Kathe S.D., Warshaw D.M., Wallace S.S. Two glycosylase families diffusively scan DNA using a wedge residue to probe for and identify oxidatively damaged bases // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2014. – V. 111. – № 20. – P. E2091–E2099.
96. Singh S.K., Szulik M.W., Ganguly M., Khutsishvili I., Stone M.P., Marky L.A., Gold B. Characterization of DNA with an 8-oxoguanine modification // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – V. 39. – № 15. – P. 6789–6801.
97. Gruber D.R., Toner J.J., Miears H.L., Shernyukov A.V., Kiryutin A.S., Lomzov A.A., Endutkin A.V., Grin I.R., Petrova D.V., Kupryushkin M.S., Yurkovskaya A.V., Johnson E.C., Okon M., Bagryanskaya E.G., Zharkov D.O., Smirnov S.L. Oxidative damage to epigenetically methylated sites affects DNA stability, dynamics and enzymatic demethylation // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – V. 46. – № 20. – P. 10827–10839.

98. Ovcherenko S.S., Shernyukov A.V., Nasonov D.M., Endutkin A.V., Zharkov D.O., Bagryan-skaya E.G. Dynamics of 8-oxoguanine in DNA: Decisive effects of base pairing and nucleotide context // *J. Am. Chem. Soc.* – 2023. – V. 145. – № 10. – P. 5613–5617.
99. Brown K.L., Adams T., Jasti V.P., Basu A.K., Stone M.P. Interconversion of the cis-5R,6S- and trans-5R,6R-thymine glycol lesions in duplex DNA // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – V. 130. – № 35. – P. 11701–11710.
100. Kung H.C., Bolton P.H. Structure of a duplex DNA containing a thymine glycol residue in solution // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – № 14. – P. 9227–9236.
101. Kao J.Y., Goljer I., Phan T.A., Bolton P.H. Characterization of the effects of a thymine glycol residue on the structure, dynamics, and stability of duplex DNA by NMR // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – № 24. – P. 17787–17793.
102. Friedman J.I., Stivers J.T. Detection of damaged DNA bases by DNA glycosylase enzymes // *Biochemistry.* – 2010. – V. 49. – № 24. – P. 4957–4967.
103. Roberts R.J., Cheng X. Base flipping // *Annu. Rev. Biochem.* – 1998. – V. 67. – P. 181–198.
104. Stivers J.T., Jiang Y.L. A mechanistic perspective on the chemistry of DNA repair glycosylases // *Chem. Rev.* – 2003. – V. 103. – № 7. – P. 2729–2759.
105. Berti P.J., McCann J.A.B. Toward a detailed understanding of base excision repair enzymes: transition state and mechanistic analyses of N-glycoside hydrolysis and N-glycoside transfer // *Chem. Rev.* – 2006. – V. 106. – № 2. – P. 506–555.
106. Andrade M.A., Bork P. HEAT repeats in the Huntington's disease protein // *Nat. Genet.* – 1995. – V. 11. – № 2. – P. 115–116.
107. Robinson E.H., Metz A.H., O'Quin J., Eichman B.F. A new protein architecture for processing alkylation damaged DNA: the crystal structure of DNA glycosylase AlkD // *J. Mol. Biol.* – 2008. – V. 381. – № 1. – P. 13–23.
108. Mullins E.A., Shi R., Eichman B.F. Toxicity and repair of DNA adducts produced by the natural product yatakemycin // *Nat. Chem. Biol.* – 2017. – V. 13. – № 9. – P. 1002–1008.
109. Mullins E.A., Dorival J., Tang G.-L., Boger D.L., Eichman B.F. Structural evolution of a DNA repair self-resistance mechanism targeting genotoxic secondary metabolites // *Nat. Commun.* – 2021. – V. 12. – № 1. – P. 6942.
110. Alseth I., Rognes T., Lindbäck T., Solberg I., Robertsen K., Kristiansen K.I., Mainieri D., Lillehagen L., Kolstø A.-B., Bjørås M. A new protein superfamily includes two novel 3-methyl-adenine DNA glycosylases from *Bacillus cereus*, AlkC and AlkD // *Mol. Microbiol.* – 2006. – V. 59. – № 5. – P. 1602–1609.
111. Shi R., Mullins E.A., Shen X.-X., Lay K.T., Yuen P.K., David S.S., Rokas A., Eichman B.F. Selective base excision repair of DNA damage by the non-base-flipping DNA glycosylase AlkC // *EMBO J.* – 2018. – V. 37. – № 1. – P. 63–74.
112. Mullins E.A., Shi R., Parsons Z.D., Yuen P.K., David S.S., Igarashi Y., Eichman B.F. The DNA glycosylase AlkD uses a non-base-flipping mechanism to excise bulky lesions // *Nature.* – 2015. – V. 527. – № 7577. – P. 254–258.
113. Parsons Z.D., Bland J.M., Mullins E.A., Eichman B.F. A catalytic role for C-H/ π interactions in base excision repair by *Bacillus cereus* DNA glycosylase AlkD // *J. Am. Chem. Soc.* – 2016. – V. 138. – № 36. – P. 11485–11488.
114. Bradley N.P., Washburn L.A., Christov P.P., Watanabe C.M.H., Eichman B.F. *Escherichia coli* YcaQ is a DNA glycosylase that unhooks DNA interstrand crosslinks // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – V. 48. – № 13. – P. 7005–7017.
115. Parikh S.S., Walcher G., Jones G.D., Slupphaug G., Krokan H.E., Blackburn G.M., Tainer J.A. Uracil-DNA glycosylase-DNA substrate and product structures: Conformational strain promotes catalytic efficiency by coupled stereoelectronic effects // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2000. – V. 97. – № 10. – P. 5083–5088.
116. Jiang Y.L., Stivers J.T., Song F. Base-flipping mutations of uracil DNA glycosylase: substrate rescue using a pyrene nucleotide wedge // *Biochemistry.* – 2002. – V. 41. – № 37. – P. 11248–11254.
117. Trasviña-Arenas C.H., Demir M., Lin W.-J., David S.S. Structure, function and evolution of the helix-hairpin-helix DNA glycosylase superfamily: Piecing together the evolutionary puzzle of DNA base damage repair mechanisms // *DNA Repair.* – 2021. – V. 108. – P. 103231.
118. Bruner S.D., Norman D.P., Verdine G.L. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA // *Nature.* – 2000. – V. 403. – № 6772. – P. 859–866.

119. Norman D.P.G., Chung S.J., Verdine G.L. Structural and biochemical exploration of a critical amino acid in human 8-oxoguanine glycosylase // *Biochemistry*. – 2003. – V. 42. – № 6. – P. 1564–1572.
120. Drohat A.C., Kwon K., Krosky D.J., Stivers J.T. 3-Methyladenine DNA glycosylase I is an unexpected helix-hairpin-helix superfamily member // *Nat. Struct. Biol.* – 2002. – V. 9. – № 9. – P. 659–664.
121. Zharkov D.O., Shoham G., Grollman A.P. Structural characterization of the Fpg family of DNA glycosylases // *DNA Repair*. – 2003. – V. 2. – № 8. – P. 839–862.
122. Sugahara M., Mikawa T., Kumasaka T., Yamamoto M., Kato R., Fukuyama K., Inoue Y., Kuramitsu S. Crystal structure of a repair enzyme of oxidatively damaged DNA, MutM (Fpg), from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8 // *EMBO J.* – 2000. – V. 19. – № 15. – P. 3857–3869.
123. Zharkov D.O., Golan G., Gilboa R., Fernandes A.S., Gerchman S.E., Kycia J.H., Rieger R.A., Grollman A.P., Shoham G. Structural analysis of an *Escherichia coli* endonuclease VIII covalent reaction intermediate // *EMBO J.* – 2002. – V. 21. – № 4. – P. 789–800.
124. Tchou J., Kasai H., Shibutani S., Chung M.H., Laval J., Grollman A.P., Nishimura S. 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1991. – V. 88. – № 11. – P. 4690–4694.
125. Coste F., Ober M., Carell T., Boiteux S., Zelwer C., Castaing B. Structural basis for the recognition of the FapydG lesion (2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) by formamidopyrimidine-DNA glycosylase // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – № 42. – P. 44074–44083.
126. Jiang D., Hatahet Z., Blaisdell J.O., Melamede R.J., Wallace S.S. *Escherichia coli* endonuclease VIII: cloning, sequencing, and overexpression of the nei structural gene and characterization of nei and nei nth mutants // *J. Bacteriol.* – 1997. – V. 179. – № 11. – P. 3773–3782.
127. Boiteux S., Coste F., Castaing B. Repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: Properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N-glycosylases // *Free Radic. Biol. Med.* – 2017. – V. 107. – P. 179–201.
128. Tchou J., Bodepudi V., Shibutani S., Antoshechkin I., Miller J., Grollman A.P., Johnson F. Substrate specificity of Fpg protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – № 21. – P. 15318–15324.
129. Hailer M.K., Slade P.G., Martin B.D., Rosenquist T.A., Sugden K.D. Recognition of the oxidized lesions spiroiminodihydantoin and guanidinohydantoin in DNA by the mammalian base excision repair glycosylases NEIL1 and NEIL2 // *DNA Repair*. – 2005. – V. 4. – № 1. – P. 41–50.
130. Hazra T.K., Izumi T., Boldogh I., Imhoff B., Kow Y.W., Jaruga P., Dizdaroglu M., Mitra S. Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2002. – V. 99. – № 6. – P. 3523–3528.
131. Hazra T.K., Kow Y.W., Hatahet Z., Imhoff B., Boldogh I., Mokkapati S.K., Mitra S., Izumi T. Identification and characterization of a novel human DNA glycosylase for repair of cytosine-derived lesions // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – № 34. – P. 30417–30420.
132. Krokeide S.Z., Laerdahl J.K., Salah M., Luna L., Cederkvist F.H., Fleming A.M., Burrows C.J., Dalhus B., Bjørås M. Human NEIL3 is mainly a monofunctional DNA glycosylase removing spiroiminodihydantoin and guanidinohydantoin // *DNA Repair*. – 2013. – V. 12. – № 12. – P. 1159–1164.
133. Zhou J., Fleming A.M., Averill A.M., Burrows C.J., Wallace S.S. The NEIL glycosylases remove oxidized guanine lesions from telomeric and promoter quadruplex DNA structures // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43. – № 8. – P. 4039–4054.
134. Gilchrist C.L.M., Mirdita M., Steinegger M. Multiple protein structure alignment at scale with FoldMason // *Science*. – 2026. – V. 391. – № 6784. – P. 485–488.
135. Katoh K., Standley D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – V. 30. – № 4. – P. 772–780.
136. Qi Y., Nam K., Spong M.C., Banerjee A., Sung R.-J., Zhang M., Karplus M., Verdine G.L. Strandwise translocation of a DNA glycosylase on undamaged DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2012. – V. 109. – № 4. – P. 1086–1091.
137. Fromme J.C., Verdine G.L. DNA lesion recognition by the bacterial repair enzyme MutM // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – № 51. – P. 51543–51548.

138. Biela A., Coste F., Culard F., Guerin M., Goffinont S., Gasteiger K., Cieřla J., Winczura A., Kazimierzczuk Z., Gasparutto D., Carell T., Tudek B., Castaing B. Zinc finger oxidation of Fpg/Nei DNA glycosylases by 2-thioxanthine: biochemical and X-ray structural characterization // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – V. 42. – № 16. – P. 10748–10761.
139. Tchou J., Michaels M.L., Miller J.H., Grollman A.P. Function of the zinc finger in *Escherichia coli* Fpg protein // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – № 35. – P. 26738–26744.
140. Kropachev K.Y., Zharkov D.O., Grollman A.P. Catalytic mechanism of *Escherichia coli* endonuclease VIII: Roles of the intercalation loop and the zinc finger // *Biochemistry.* – 2006. – V. 45. – № 39. – P. 12039–12049.
141. Doublie S., Bandaru V., Bond J.P., Wallace S.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. – V. 101. – № 28. – P. 10284–10289.
142. Eckenroth B.E., Cao V.B., Averill A.M., Dragon J.A., Doublie S. Unique structural features of mammalian NEIL2 DNA glycosylase prime its activity for diverse DNA substrates and environments // *Structure.* – 2021. – V. 29. – № 1. – P. 29–42.e4.
143. Serre L., Pereira de Jesus K., Boiteux S., Zelwer C., Castaing B. Crystal structure of the *Lactococcus lactis* formamidopyrimidine-DNA glycosylase bound to an abasic site analogue-containing DNA // *EMBO J.* – 2002. – V. 21. – № 12. – P. 2854–2865.
144. Sidorkina O.M., Laval J. Role of the N-terminal proline residue in the catalytic activities of the *Escherichia coli* Fpg protein // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – № 14. – P. 9924–9929.
145. Fromme J.C., Verdine G.L. Structural insights into lesion recognition and repair by the bacterial 8-oxoguanine DNA glycosylase MutM // *Nat. Struct. Biol.* – 2002. – V. 9. – № 7. – P. 544–552.
146. Richardson J.S., Richardson D.C. Amino acid preferences for specific locations at the ends of alpha helices // *Science.* – 1988. – V. 240. – № 4859. – P. 1648–1652.
147. Pereira de Jesus K., Serre L., Zelwer C., Castaing B. Structural insights into abasic site for Fpg specific binding and catalysis: comparative high-resolution crystallographic studies of Fpg bound to various models of abasic site analogues-containing DNA // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – V. 33. – № 18. – P. 5936–5944.
148. Nam K., Verdine G.L., Karplus M. Analysis of an anomalous mutant of MutM DNA glycosylase leads to new insights into the catalytic mechanism // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – V. 131. – № 51. – P. 18208–18209.
149. Lavruchin O.V., Lloyd R.S. Involvement of phylogenetically conserved acidic amino acid residues in catalysis by an oxidative DNA damage enzyme formamidopyrimidine glycosylase // *Biochemistry.* – 2000. – V. 39. – № 49. – P. 15266–15271.
150. Gilboa R., Zharkov D.O., Golan G., Fernandes A.S., Gerchman S.E., Matz E., Kycia J.H., Grollman A.P., Shoham G. Structure of formamidopyrimidine-DNA glycosylase covalently complexed to DNA // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – № 22. – P. 19811–19816.
151. Banerjee A., Santos W.L., Verdine G.L. Structure of a DNA glycosylase searching for lesions // *Science.* – 2006. – V. 311. – № 5764. – P. 1153–1157.
152. Kuznetsov N.A., Bergonzo C., Campbell A.J., Li H., Mechetin G.V., de los Santos C., Grollman A.P., Fedorova O.S., Zharkov D.O., Simmerling C. Active destabilization of base pairs by a DNA glycosylase wedge initiates damage recognition // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43. – № 1. – P. 272–281.
153. Sung R.-J., Zhang M., Qi Y., Verdine G.L. Structural and biochemical analysis of DNA helix invasion by the bacterial 8-oxoguanine DNA glycosylase MutM // *J. Biol. Chem.* – 2013. – V. 288. – № 14. – P. 10012–10023.
154. Qi Y., Spong M.C., Nam K., Banerjee A., Jiralerspong S., Karplus M., Verdine G.L. Encounter and extrusion of an intrahelical lesion by a DNA repair enzyme // *Nature.* – 2009. – V. 462. – № 7274. – P. 762–766.
155. Cheng X., Kelso C., Hornak V., de los Santos C., Grollman A.P., Simmerling C. Dynamic behavior of DNA base pairs containing 8-oxoguanine // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – V. 127. – № 40. – P. 13906–13918.
156. Grollman A.P., Moriya M. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within // *Trends Genet.* – 1993. – V. 9. – № 7. – P. 246–249.
157. Song K., Hornak V., de los Santos C., Grollman A.P., Simmerling C. Computational analysis of the mode of binding of 8-oxoguanine to formamidopyrimidine-DNA glycosylase // *Biochemistry.* – 2006. – V. 45. – № 36. – P. 10886–10894.

158. Song K., Kelso C., de los Santos C., Grollman A.P., Simmerling C. Molecular simulations reveal a common binding mode for glycosylase binding of oxidatively damaged DNA lesions // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – V. 129. – № 47. – P. 14536–14537.
159. Dunn A.R., Kad N.M., Nelson S.R., Warshaw D.M., Wallace S.S. Single Qdot-labeled glycosylase molecules use a wedge amino acid to probe for lesions while scanning along DNA // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – V. 39. – № 17. – P. 7487–7498.
160. Lee A.J., Warshaw D.M., Wallace S.S. Insights into the glycosylase search for damage from single-molecule fluorescence microscopy // *DNA Repair.* – 2014. – V. 20. – P. 23–31.
161. Li H., Endutkin A.V., Bergonzo C., Campbell A.J., de los Santos C., Grollman A., Zharkov D.O., Simmerling C. A dynamic checkpoint in oxidative lesion discrimination by formamidopyrimidine-DNA glycosylase // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44. – № 2. – P. 683–694.
162. Bergonzo C., Campbell A.J., de los Santos C., Grollman A.P., Simmerling C. Energetic preference of 8-oxoG eversion pathways in a DNA glycosylase // *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – V. 133. – № 37. – P. 14504–14506.
163. Li H., Endutkin A.V., Bergonzo C., Fu L., Grollman A., Zharkov D.O., Simmerling C. DNA deformation-coupled recognition of 8-oxoguanine: Conformational kinetic gating in human DNA glycosylase // *J. Am. Chem. Soc.* – 2017. – V. 139. – № 7. – P. 2682–2692.
164. Qi Y., Spong M.C., Nam K., Karplus M., Verdine G.L. Entrapment and structure of an extrahelical guanine attempting to enter the active site of a bacterial DNA glycosylase, MutM // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – № 2. – P. 1468–1478.
165. Koval V.V., Kuznetsov N.A., Zharkov D.O., Ishchenko A.A., Douglas K.T., Nevinsky G.A., Fedorova O.S. Pre-steady-state kinetics shows differences in processing of various DNA lesions by *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32. – № 3. – P. 926–935.
166. Kuznetsov N.A., Zharkov D.O., Koval V.V., Buckle M., Fedorova O.S. Reversible chemical step and rate-limiting enzyme regeneration in the reaction catalyzed by formamidopyrimidine-DNA glycosylase // *Biochemistry.* – 2009. – V. 48. – № 48. – P. 11335–11343.
167. Koval V.V., Kuznetsov N.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S. Real-time studies of conformational dynamics of the repair enzyme *E. coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase and its DNA complexes during catalytic cycle // *Mutat. Res.* – 2010. – V. 685. – № 1–2. – P. 3–10.
168. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* – 3rd ed. – Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – 2344 p.
169. Isaev N.P., Melnikov A.R., Lomanovich K.A., Dugin M.V., Ivanov M.Y., Polovyanenko D.N., Veber S.L., Bowman M.K., Bagryanskaya E.G. A broadband pulse EPR spectrometer for high-throughput measurements in the X-band // *J. Magn. Reson. Open.* – 2023. – V. 14–15. – P. 100092.
170. Stoll S., Schweiger A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR // *J. Magn. Reson.* – 2006. – V. 178. – № 1. – P. 42–55.
171. Case D.A., Cheatham T.E., Darden T., Gohlke H., Luo R., Merz K.M., Onufriev A., Simmerling C., Wang B., Woods R.J. The Amber biomolecular simulation programs // *J. Comput. Chem.* – 2005. – V. 26. – № 16. – P. 1668–1688.
172. Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K.E., Simmerling C. ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB // *J. Chem. Theory Comput.* – 2015. – V. 11. – № 8. – P. 3696–3713.
173. Ivani I., Dans P.D., Noy A., Pérez A., Faustino I., Hospital A., Walther J., Andrio P., Goñi R., Balaceanu A., Portella G., Battistini F., Gelpí J.L., González C., Vendruscolo M., Loughton C.A., Harris S.A., Case D.A., Orozco M. Parmbsc1: a refined force field for DNA simulations // *Nat. Methods.* – 2016. – V. 13. – № 1. – P. 55–58.
174. Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.W., Kollman P.A., Case D.A. Development and testing of a general amber force field // *J. Comput. Chem.* – 2004. – V. 25. – № 9. – P. 1157–1174.
175. Peters M.B., Yang Y., Wang B., Füsti-Molnár L., Weaver M.N., Merz K.M. Structural survey of zinc containing proteins and the development of the zinc AMBER force field (ZAFF) // *J. Chem. Theory Comput.* – 2010. – V. 6. – № 9. – P. 2935–2947.
176. Abramson J., Adler J., Dunger J., Evans R., Green T., Pritzel A., Ronneberger O., Willmore L., Ballard A.J., Bambrick J., Bodenstein S.W., Evans D.A., Hung C.-C., O'Neill M., Reiman D., Tunyasuvunakool K., Wu Z., Žemgulytė A., Arvaniti E., Beattie C., Bertolli O., Bridgland A., Cherepanov A., Congreve M., Cowen-Rivers A.I., Cowie A., Figurnov M., Fuchs F.B., Gladman H., Jain R., Khan Y.A., Low C.M.R., Perlin K., Potapenko A., Savy P., Singh S., Stecula A.,

- Thillaisundaram A., Tong C., Yakneen S., Zhong E.D., Zielinski M., Židek A., Bapst V., Kohli P., Jaderberg M., Hassabis D., Jumper J.M. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 // *Nature*. – 2024. – V. 630. – № 8016. – P. 493–500.
177. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis // *J. Comput. Chem.* – 2004. – V. 25. – № 13. – P. 1605–1612.
178. Unni S., Huang Y., Hanson R.M., Tobias M., Krishnan S., Li W.W., Nielsen J.E., Baker N.A. Web servers and services for electrostatics calculations with APBS and PDB2PQR // *J. Comput. Chem.* – 2011. – V. 32. – № 7. – P. 1488–1491.
179. Popov A.V., Endutkin A.V., Vorobjev Y.N., Zharkov D.O. Molecular dynamics simulation of the opposite-base preference and interactions in the active site of formamidopyrimidine-DNA glycosylase // *BMC Struct. Biol.* – 2017. – V. 17. – № 1. – P. 5.
180. Tian C., Kasavajhala K., Belfon K.A.A., Raguet L., Huang H., Migués A.N., Bickel J., Wang Y., Pincay J., Wu Q., Simmerling C. ff19SB: Amino-acid-specific protein backbone parameters trained against quantum mechanics energy surfaces in solution // *J. Chem. Theory Comput.* – 2020. – V. 16. – № 1. – P. 528–552.
181. Zgarbová M., Šponer J., Jurečka P. Z-DNA as a touchstone for additive empirical force fields and a refinement of the alpha/gamma DNA torsions for AMBER // *J. Chem. Theory Comput.* – 2021. – V. 17. – № 10. – P. 6292–6301.
182. Love O., Galindo-Murillo R., Roe D.R., Dans P.D., Cheatham T.E., Bergonzo C. modXNA: A modular approach to parametrization of modified nucleic acids for use with Amber force fields // *J. Chem. Theory Comput.* – 2024. – V. 20. – № 21. – P. 9354–9363.
183. Bignon E., Claerbout V.E.P., Jiang T., Morell C., Gillet N., Dumont E. Nucleosomal embedding reshapes the dynamics of abasic sites // *Sci. Rep.* – 2020. – V. 10. – № 1. – P. 17314.
184. Li Z., Song L.F., Li P., Merz K.M. Systematic parametrization of divalent metal ions for the OPC3, OPC, TIP3P-FB, and TIP4P-FB water models // *J. Chem. Theory Comput.* – 2020. – V. 16. – № 7. – P. 4429–4442.
185. Berdugin A.A., Golyshev V.M., Lomzov A.A. Structural basis of the phosphoramidate N-benzimidazole group's influence on modified primer extension efficiency by Taq DNA polymerase // *Vavilovskii Zhurnal Genet. Selekcii*. – 2025. – V. 29. – № 7. – P. 1073–1083.
186. Huber P.J., Ronchetti E.M. Robust covariance and correlation matrices // *Robust Statistics*. – 2nd ed. – Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2009. – P. 199–237.
187. Kabsch W. XDS // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2010. – V. 66. – № 2. – P. 125–132.
188. Evans P.R., Murshudov G.N. How good are my data and what is the resolution? // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2013. – V. 69. – № 7. – P. 1204–1214.
189. Krissinel E., Uski V., Lebedev A., Winn M., Ballard C. Distributed computing for macromolecular crystallography // *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* – 2018. – V. 74. – № 2. – P. 143–151.
190. McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D., Winn M.D., Storoni L.C., Read R.J. Phaser crystallographic software // *J. Appl. Crystallogr.* – 2007. – V. 40. – № 4. – P. 658–674.
191. Bond P.S., Cowtan K.D. ModelCraft: an advanced automated model-building pipeline using Buccaneer // *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* – 2022. – V. 78. – № 9. – P. 1090–1098.
192. Krissinel E., Lebedev A.A., Uski V., Ballard C.B., Keegan R.M., Kovalevskiy O., Nicholls R.A., Pannu N.S., Skubák P., Berrisford J., Fando M., Lohkamp B., Wojdyr M., Simpkin A.J., Thomas J.M.H., Oliver C., Vonrhein C., Chojnowski G., Basle A., Purkiss A., Isupov M.N., McNicholas S., Lowe E., Triviño J., Cowtan K., Agirre J., Rigden D.J., Uson I., Lamzin V., Tews I., Bricogne G., Leslie A.G.W., Brown D.G. CCP4 Cloud for structure determination and project management in macromolecular crystallography // *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* – 2022. – V. 78. – № 9. – P. 1079–1089.
193. Potterton E., Briggs P., Turkenburg M., Dodson E. A graphical user interface to the CCP4 program suite // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2003. – V. 59. – № 7. – P. 1131–1137.
194. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. Features and development of Coot // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2010. – V. 66. – № 4. – P. 486–501.
195. Williams C.J., Headd J.J., Moriarty N.W., Prisant M.G., Videau L.L., Deis L.N., Verma V., Keedy D.A., Hintze B.J., Chen V.B., Jain S., Lewis S.M., Arendall W.B., Snoeyink J., Adams P.D., Lovell S.C., Richardson J.S., Richardson D.C. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation // *Protein Sci.* – 2018. – V. 27. – № 1. – P. 293–315.
196. wwPDB consortium Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – V. 47. – № D1. – P. D520–D528.

197. Krissinel E., Henrick K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state // *J. Mol. Biol.* – 2007. – V. 372. – № 3. – P. 774–797.
198. Lu X.-J., Olson W.K. 3DNA: a versatile, integrated software system for the analysis, re-building and visualization of three-dimensional nucleic-acid structures // *Nat. Protoc.* – 2008. – V. 3. – № 7. – P. 1213–1227.
199. Popov A.V., Vorobjev Y.N., Zharkov D.O. MDTRA: a molecular dynamics trajectory analyzer with a graphical user interface // *J. Comput. Chem.* – 2013. – V. 34. – № 4. – P. 319–325.
200. Ferruz N., Schmidt S., Höcker B. ProteinTools: a toolkit to analyze protein structures // *Nucleic Acids Res.* – 2021. – V. 49. – № W1. – P. W559–W566.
201. Miller J.H. *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria.* – Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992. – 876 p.
202. Endutkin A.V., Panferova E.P., Barmatov A.E., Zharkov D.O. DNA glycosylases for 8-oxoguanine repair in *Staphylococcus aureus* // *DNA Repair.* – 2021. – V. 105. – P. 103160.
203. Sadeghian K., Flaig D., Blank I.D., Schneider S., Strasser R., Stathis D., Winnacker M., Carell T., Ochsenfeld C. Ribose-protonated DNA base excision repair: a combined theoretical and experimental study // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2014. – V. 53. – № 38. – P. 10044–10048.
204. Vascon F., Gasparotto M., Giacomello M., Cendron L., Bergantino E., Filippini F., Righetto I. Protein electrostatics: From computational and structural analysis to discovery of functional fingerprints and biotechnological design // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* – 2020. – V. 18. – P. 1774–1789.
205. Iwahara J., Pettitt B.M., Yu B. Direct measurements of biomolecular electrostatics through experiments // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2023. – V. 82. – P. 102680.
206. Voinov M.A., Smirnov A.I. Spin labels and spin probes for measurements of local pH and electrostatics by EPR // *Electron Paramagnetic Resonance. V. 22 / Eds. B.C. Gilbert, D.M. Murphy, V. Chechik.* – Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010. – P. 71–106.
207. Voinov M.A., Kirilyuk I.A., Smirnov A.I. Spin-labeled pH-sensitive phospholipids for interfacial pK_a determination: synthesis and characterization in aqueous and micellar solutions // *J. Phys. Chem. B.* – 2009. – V. 113. – № 11. – P. 3453–3460.
208. Voinov M.A., Rivera-Rivera I., Smirnov A.I. Surface electrostatics of lipid bilayers by EPR of a pH-sensitive spin-labeled lipid // *Biophys. J.* – 2013. – V. 104. – № 1. – P. 106–116.
209. Smirnov A.I., Ruuge A., Reznikov V.A., Voinov M.A., Grigor'ev I.A. Site-directed electrostatic measurements with a thiol-specific pH-sensitive nitroxide: differentiating local pK and polarity effects by high-field EPR // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – V. 126. – № 29. – P. 8872–8873.
210. Voinov M.A., Ruuge A., Reznikov V.A., Grigor'ev I.A., Smirnov A.I. Mapping local protein electrostatics by EPR of pH-sensitive thiol-specific nitroxide // *Biochemistry.* – 2008. – V. 47. – № 20. – P. 5626–5637.
211. Kirilyuk I.A., Bobko A.A., Grigor'ev I.A., Khramtsov V.V. Synthesis of the tetraethyl substituted pH-sensitive nitroxides of imidazole series with enhanced stability towards reduction // *Org. Biomol. Chem.* – 2004. – V. 2. – № 7. – P. 1025–1030.
212. Zaika E.I., Perlow R.A., Matz E., Broyde S., Gilboa R., Grollman A.P., Zharkov D.O. Substrate discrimination by formamidopyrimidine-DNA glycosylase: a mutational analysis // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – № 6. – P. 4849–4861.
213. Ishchenko A.A., Vasilenko N.L., Sinitsina O.I., Yamkovoy V.I., Fedorova O.S., Douglas K.T., Nevinsky G.A. Thermodynamic, kinetic, and structural basis for recognition and repair of 8-oxoguanine in DNA by Fpg protein from *Escherichia coli* // *Biochemistry.* – 2002. – V. 41. – № 24. – P. 7540–7548.
214. Milov A.D., Samoilova R.I., Shubin A.A., Grishin Y.A., Dzuba S.A. ESEEM measurements of local water concentration in D₂O-containing spin-labeled systems // *Appl. Magn. Reson.* – 2008. – V. 35. – № 1. – P. 73–94.
215. Molochnikov L.S., Kovalyova E.G., Grigor'ev I.A., Zagorodni A.A. Direct measurement of H⁺ activity inside cross-linked functional polymers using nitroxide spin probes // *J. Phys. Chem. B.* – 2004. – V. 108. – № 4. – P. 1302–1313.
216. Kovaleva E.G., Molochnikov L.S., Golovkina E.L., Hartmann M., Kirilyuk I.A., Grigoriev I.A. Electrical potential near hydrated surface of ordered mesoporous molecular sieves assessed by EPR of molecular pH-probes // *Microporous Mesoporous Mater.* – 2015. – V. 203. – P. 1–7.
217. Fernandez M.S., Fromherz P. Lipoid pH indicators as probes of electrical potential and polarity in micelles // *J. Phys. Chem.* – 1977. – V. 81. – № 18. – P. 1755–1761.

218. Hao J.-J., Lin D.-C., Dinh H.Q., Mayakonda A., Jiang Y.-Y., Chang C., Jiang Y., Lu C.-C., Shi Z.-Z., Xu X., Zhang Y., Cai Y., Wang J.-W., Zhan Q.-M., Wei W.-Q., Berman B.P., Wang M.-R., Koeffler H.P. Spatial intratumoral heterogeneity and temporal clonal evolution in esophageal squamous cell carcinoma // *Nat. Genet.* – 2016. – V. 48. – № 12. – P. 1500–1507.
219. Chen S., Francioli L.C., Goodrich J.K., Collins R.L., Kanai M., Wang Q., Alföldi J., Watts N.A., Vittal C., Gauthier L.D., Poterba T., Wilson M.W., Tarasova Y., Phu W., Grant R., Yohannes M.T., Koenig Z., Farjoun Y., Banks E., Donnelly S., Gabriel S., Gupta N., Ferriera S., Tolonen C., Novod S., Bergelson L., Roazen D., Ruano-Rubio V., Covarrubias M., Llanwarne C., Petrillo N., Wade G., Jeandet T., Munshi R., Tibbetts K., Genome Aggregation Database Consortium, O'Donnell-Luria A., Solomonson M., Seed C., Martin A.R., Talkowski M.E., Rehm H.L., Daly M.J., Tiao G., Neale B.M., MacArthur D.G., Karczewski K.J. A genomic mutational constraint map using variation in 76,156 human genomes // *Nature.* – 2024. – V. 625. – № 7993. – P. 92–100.
220. Imamura K., Averill A., Wallace S.S., Doublé S. Structural characterization of viral ortholog of human DNA glycosylase NEIL1 bound to thymine glycol or 5-hydroxyuracil-containing DNA // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287. – № 6. – P. 4288–4298.
221. Zhu C., Lu L., Zhang J., Yue Z., Song J., Zong S., Liu M., Stovicek O., Gao Y.Q., Yi C. Tautomerization-dependent recognition and excision of oxidation damage in base-excision DNA repair // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2016. – V. 113. – № 28. – P. 7792–7797.
222. Marchler-Bauer A., Derbyshire M.K., Gonzales N.R., Lu S., Chitsaz F., Geer L.Y., Geer R.C., He J., Gwadz M., Hurwitz D.I., Lanczycki C.J., Lu F., Marchler G.H., Song J.S., Thanki N., Wang Z., Yamashita R.A., Zhang D., Zheng C., Bryant S.H. CDD: NCBI's conserved domain database // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43. – № D1. – P. D222–D226.
223. Crooks G.E., Hon G., Chandonia J.-M., Brenner S.E. WebLogo: A sequence logo generator // *Genome Res.* – 2004. – V. 14. – № 6. – P. 1188–1190.
224. Livingstone C.D., Barton G.J. Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation // *Comput. Appl. Biosci.* – 1993. – V. 9. – № 6. – P. 745–756.
225. Taylor W.R. The classification of amino acid conservation // *J. Theor. Biol.* – 1986. – V. 119. – № 2. – P. 205–218.
226. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., de Beer T.A.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – V. 46. – № W1. – P. W296–W303.
227. Bailly V., Verly W.G., O'Connor T., Laval J. Mechanism of DNA strand nicking at apurinic/apyrimidinic sites by *Escherichia coli* [formamidopyrimidine]DNA glycosylase // *Biochem. J.* – 1989. – V. 262. – № 2. – P. 581–589.
228. Castaing B., Fourrey J.L., Hervouet N., Thomas M., Boiteux S., Zelwer C. AP site structural determinants for Fpg specific recognition // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – V. 27. – № 2. – P. 608–615.
229. Zharkov D.O., Rieger R.A., Iden C.R., Grollman A.P. NH₂-terminal proline acts as a nucleophile in the glycosylase/AP-lyase reaction catalyzed by *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) protein // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – № 8. – P. 5335–5341.
230. Boiteux S., Gajewski E., Laval J., Dizdaroglu M. Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein formamidopyrimidine-DNA glycosylase: excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization // *Biochemistry.* – 1992. – V. 31. – № 1. – P. 106–110.
231. Michaels M.L., Cruz C., Grollman A.P., Miller J.H. Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1992. – V. 89. – № 15. – P. 7022–7025.
232. Karakaya A., Jaruga P., Bohr V.A., Grollman A.P., Dizdaroglu M. Kinetics of excision of purine lesions from DNA by *Escherichia coli* Fpg protein // *Nucleic Acids Res.* – 1997. – V. 25. – № 3. – P. 474–479.
233. Asagoshi K., Yamada T., Okada Y., Terato H., Ohyama Y., Seki S., Ide H. Recognition of formamidopyrimidine by *Escherichia coli* and mammalian thymine glycol glycosylases. Distinctive paired base effects and biological and mechanistic implications // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – № 32. – P. 24781–24786.
234. Krishnamurthy N., Zhao X., Burrows C.J., David S.S. Superior removal of hydantoin lesions relative to other oxidized bases by the human DNA glycosylase hNEIL1 // *Biochemistry.* – 2008. – V. 47. – № 27. – P. 7137–7146.

235. Endutkin A.V., Zharkov D.O. Substrate specificities of DNA glycosylases in vitro and in vivo // *DNA Damage, DNA Repair and Disease*. V. 1 / Eds. M. Dizdaroglu, R.S. Lloyd. – Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2020. – P. 175–203.
236. Dizdaroglu M., Coskun E., Jaruga P. Repair of oxidatively induced DNA damage by DNA glycosylases: Mechanisms of action, substrate specificities and excision kinetics // *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* – 2017. – V. 771. – P. 99–127.
237. Thiviyanathan V., Somasunderam A., Volk D.E., Hazra T.K., Mitra S., Gorenstein D.G. Base-pairing properties of the oxidized cytosine derivative, 5-hydroxy uracil // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – V. 366. – № 3. – P. 752–757.
238. Amara P., Serre L., Castaing B., Thomas A. Insights into the DNA repair process by the formamidopyrimidine-DNA glycosylase investigated by molecular dynamics // *Protein Sci.* – 2004. – V. 13. – № 8. – P. 2009–2021.
239. Wallace S.S., Bandaru V., Kathe S.D., Bond J.P. The enigma of endonuclease VIII // *DNA Repair.* – 2003. – V. 2. – № 5. – P. 441–453.
240. Kathe S.D., Barrantes-Reynolds R., Jaruga P., Newton M.R., Burrows C.J., Bandaru V., Dizdaroglu M., Bond J.P., Wallace S.S. Plant and fungal Fpg homologs are formamidopyrimidine DNA glycosylases but not 8-oxoguanine DNA glycosylases // *DNA Repair.* – 2009. – V. 8. – № 5. – P. 643–653.
241. Liu M., Doublié S., Wallace S.S. Neil3, the final frontier for the DNA glycosylases that recognize oxidative damage // *Mutat. Res.* – 2013. – V. 743–744. – P. 4–11.
242. Liu M., Zhang J., Zhu C., Zhang X., Xiao W., Yan Y., Liu L., Zeng H., Gao Y.Q., Yi C. DNA repair glycosylase hNEIL1 triages damaged bases via competing interaction modes // *Nat. Commun.* – 2021. – V. 12. – № 1. – P. 4108.
243. Le Bihan Y.-V., Angeles Izquierdo M., Coste F., Aller P., Culard F., Gehrke T.H., Essalhi K., Carell T., Castaing B. 5-Hydroxy-5-methylhydantoin DNA lesion, a molecular trap for DNA glycosylases // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – V. 39. – № 14. – P. 6277–6290.
244. Landová B., Šilhán J. Conformational changes of DNA repair glycosylase MutM triggered by DNA binding // *FEBS Lett.* – 2020. – V. 594. – № 18. – P. 3032–3044.
245. Duclos S., Aller P., Jaruga P., Dizdaroglu M., Wallace S.S., Doublié S. Structural and biochemical studies of a plant formamidopyrimidine-DNA glycosylase reveal why eukaryotic Fpg glycosylases do not excise 8-oxoguanine // *DNA Repair.* – 2012. – V. 11. – № 9. – P. 714–725.
246. Golan G., Zharkov D.O., Feinberg H., Fernandes A.S., Zaika E.I., Kycia J.H., Grollman A.P., Shoham G. Structure of the uncomplexed DNA repair enzyme endonuclease VIII indicates significant interdomain flexibility // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – V. 33. – № 15. – P. 5006–5016.
247. Prakash A., Eckenroth B.E., Averill A.M., Imamura K., Wallace S.S., Doublié S. Structural investigation of a viral ortholog of human NEIL2/3 DNA glycosylases // *DNA Repair.* – 2013. – V. 12. – № 12. – P. 1062–1071.
248. Eckenroth B.E., Bumgarner J.D., Matsumoto-Elliott O., David S.S., Doublié S. Structural and biochemical insights into NEIL2's preference for abasic sites // *Nucleic Acids Res.* – 2023. – V. 51. – № 22. – P. 12508–12521.
249. Liu M., Imamura K., Averill A.M., Wallace S.S., Doublié S. Structural characterization of a mouse ortholog of human NEIL3 with a marked preference for single-stranded DNA // *Structure.* – 2013. – V. 21. – № 2. – P. 247–256.
250. Prlic A., Bliven S., Rose P.W., Bluhm W.F., Bizon C., Godzik A., Bourne P.E. Pre-calculated protein structure alignments at the RCSB PDB website // *Bioinformatics.* – 2010. – V. 26. – № 23. – P. 2983–2985.
251. Li Z., Jaroszewski L., Iyer M., Sedova M., Godzik A. FATCAT 2.0: towards a better understanding of the structural diversity of proteins // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – V. 48. – № W1. – P. W60–W64.
252. Coste F., Ober M., Le Bihan Y.-V., Izquierdo M.A., Hervouet N., Mueller H., Carell T., Castaing B. Bacterial base excision repair enzyme Fpg recognizes bulky N7-substituted-FapydG lesion via unproductive binding mode // *Chem. Biol.* – 2008. – V. 15. – № 7. – P. 706–717.
253. Haraguchi K., Delaney M.O., Wiederholt C.J., Sambandam A., Hantosi Z., Greenberg M.M. Synthesis and characterization of oligodeoxynucleotides containing formamidopyrimidine lesions and nonhydrolyzable analogues // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – V. 124. – № 13. – P. 3263–3269.
254. Wiederholt C.J., Greenberg M.M. Fapy.dG instructs Klenow exo(-) to misincorporate deoxyadenosine // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – V. 124. – № 25. – P. 7278–7279.

255. Delaney M.O., Greenberg M.M. Synthesis of oligonucleotides and thermal stability of duplexes containing the beta-C-nucleoside analogue of Fapy*dG // *Chem. Res. Toxicol.* – 2002. – V. 15. – № 11. – P. 1460–1465.
256. Chinyengetere F., Jamieson E.R. Impact of the oxidized guanine lesion spiroiminodihydantoin on the conformation and thermodynamic stability of a 15-mer DNA duplex // *Biochemistry.* – 2008. – V. 47. – № 8. – P. 2584–2591.
257. Yennie C.J., Delaney S. Thermodynamic consequences of the hyperoxidized guanine lesion guanidinohydantoin in duplex DNA // *Chem. Res. Toxicol.* – 2012. – V. 25. – № 8. – P. 1732–1739.
258. Khutsishvili I., Zhang N., Marky L.A., Crean C., Patel D.J., Geacintov N.E., Shafirovich V. Thermodynamic profiles and nuclear magnetic resonance studies of oligonucleotide duplexes containing single diastereomeric spiroiminodihydantoin lesions // *Biochemistry.* – 2013. – V. 52. – № 8. – P. 1354–1363.
259. Prorok P., Grin I.R., Matkarimov B.T., Ishchenko A.A., Laval J., Zharkov D.O., Saparbaev M. Evolutionary origins of DNA repair pathways: Role of oxygen catastrophe in the emergence of DNA glycosylases // *Cells.* – 2021. – V. 10. – № 7. – P. 1591.
260. O'Brien P.J. Catalytic promiscuity and the divergent evolution of DNA repair enzymes // *Chem. Rev.* – 2006. – V. 106. – № 2. – P. 720–752.
261. Faucher F., Duclos S., Bandaru V., Wallace S.S., Doublé S. Crystal structures of two archaeal 8-oxoguanine DNA glycosylases provide structural insight into guanine/8-oxoguanine distinction // *Structure.* – 2009. – V. 17. – № 5. – P. 703–712.
262. Coste F., Goffinont S., Cros J., Gaudon V., Guérin M., Garnier N., Confalonieri F., Flament D., Suskiewicz M.J., Castaing B. Structural and functional determinants of the archaeal 8-oxoguanine-DNA glycosylase AGOG for DNA damage recognition and processing // *Nucleic Acids Res.* – 2022. – V. 50. – № 19. – P. 11072–11092.
263. Blaisdell J.O., Hatahet Z., Wallace S.S. A novel role for Escherichia coli endonuclease VIII in prevention of spontaneous G→T transversions // *J. Bacteriol.* – 1999. – V. 181. – № 20. – P. 6396–6402.
264. Rieger R.A., McTigue M.M., Kycia J.H., Gerchman S.E., Grollman A.P., Iden C.R. Characterization of a cross-linked DNA-endonuclease VIII repair complex by electrospray ionization mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2000. – V. 11. – № 6. – P. 505–515.
265. McTigue M.M., Rieger R.A., Rosenquist T.A., Iden C.R., de los Santos C.R. Stereoselective excision of thymine glycol lesions by mammalian cell extracts // *DNA Repair.* – 2004. – V. 3. – № 3. – P. 313–322.
266. Rieux C., Goffinont S., Coste F., Tber Z., Cros J., Roy V., Guérin M., Gaudon V., Bourg S., Biela A., Aucagne V., Agrofoglio L., Garnier N., Castaing B. Thiopurine derivative-induced Fpg/Nei DNA glycosylase inhibition: Structural, dynamic and functional insights // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – № 6. – P. 2058.
267. Huskova A., Dinesh D.C., Srb P., Boura E., Veverka V., Silhan J. Model of abasic site DNA cross-link repair; from the architecture of NEIL3 DNA binding domains to the X-structure model // *Nucleic Acids Res.* – 2022. – V. 50. – № 18. – P. 10436–10448.
268. Zhdanova P.V., Ishchenko A.A., Chernonosov A.A., Zharkov D.O., Koval V.V. Dynamics and conformational changes in human NEIL2 DNA glycosylase analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry // *J. Mol. Biol.* – 2022. – V. 434. – № 2. – P. 167334.
269. Gierlich J., Burley G.A., Gramlich P.M.E., Hammond D.M., Carell T. Click chemistry as a reliable method for the high-density postsynthetic functionalization of alkyne-modified DNA // *Org. Lett.* – 2006. – V. 8. – № 17. – P. 3639–3642.
270. Fantoni N.Z., El-Sagheer A.H., Brown T. A hitchhiker's guide to click-chemistry with nucleic acids // *Chem. Rev.* – 2021. – V. 121. – № 12. – P. 7122–7154.
271. Miller H., Fernandes A.S., Zaika E., McTigue M.M., Torres M.C., Wente M., Iden C.R., Grollman A.P. Stereoselective excision of thymine glycol from oxidatively damaged DNA // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32. – № 1. – P. 338–345.
272. Endutkin A.V., Yudkina A.V., Zharkov T.D., Barmatov A.E., Petrova D.V., Kim D.V., Zharkov D.O. Repair and DNA polymerase bypass of clickable pyrimidine nucleotides // *Biomolecules.* – 2024. – V. 14. – № 6. – P. 681.
273. Hsu G.W., Ober M., Carell T., Beese L.S. Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase // *Nature.* – 2004. – V. 431. – № 7005. – P. 217–221.
274. Zhang H., Eoff R.L., Kozekov I.D., Rizzo C.J., Egli M., Guengerich F.P. Versatility of Y-family *Sulfolobus solfataricus* DNA polymerase Dpo4 in translesion synthesis past bulky N2-alkylguanine adducts // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284. – № 6. – P. 3563–3576.

275. Kirouac K.N., Ling H. Unique active site promotes error-free replication opposite an 8-oxoguanine lesion by human DNA polymerase ϵ // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2011. – V. 108. – № 8. – P. 3210–3215.
276. Batra V.K., Shock D.D., Beard W.A., McKenna C.E., Wilson S.H. Binary complex crystal structure of DNA polymerase β reveals multiple conformations of the templating 8-oxoguanine lesion // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2012. – V. 109. – № 1. – P. 113–118.
277. Tomar R., Minko I.G., Sharma P., Kellum A.H., Lei L., Harp J.M., Iverson T.M., Lloyd R.S., Egli M., Stone M.P. Base excision repair of the N-(2-deoxy-d-erythro-pentofuranosyl)-urea lesion by the hNEIL1 glycosylase // *Nucleic Acids Res.* – 2023. – V. 51. – № 8. – P. 3754–3769.