

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

На правах рукописи

Давлетгильдеева Анастасия Тимуровна

**КИНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ АР-ЭНДОНУКЛЕАЗ ИЗ
РАЗНЫХ СТРУКТУРНЫХ СЕМЕЙСТВ**

1.5.4 – биохимия

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

Научный руководитель:

д.х.н. Кузнецов Н. А.

Новосибирск – 2022

Содержание

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. Повреждения ДНК: формирование, пути удаления и ферментативные свойства ключевых участников репарации – АР-эндонуклеаз (Обзор литературы).....	11
1.1. Источники и последствия возникновения повреждений ДНК.....	11
1.1.1. Гипоксантин.....	11
1.1.2. Альфа-аномеры нуклеотидов.....	12
1.1.3. 2'-Дезокси-5,6-дигидроуридин.....	13
1.1.4. Этенпроизводные азотистых оснований.....	13
1.1.5. 2'-Дезоксиуридин.....	15
1.1.6. Апуриновые/апиридиновые сайты.....	17
1.1.6.1 Формирование АР-сайтов.....	17
1.1.6.1.1 Спонтанный гидролиз <i>N</i> -гликозидной связи.....	17
1.1.6.1.2. Ферментативный гидролиз <i>N</i> -гликозидной связи.....	19
1.1.6.2. Последствия возникновения АР-сайтов в ДНК.....	20
1.1.6.3. Пути репарации АР-сайтов.....	21
1.1.6.3.1. Эксцизионная репарация оснований (BER).....	23
1.1.6.3.2. Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER).....	26
1.2. АР-эндонуклеазы.....	27
1.2.1. Структурное семейство Xth.....	28
1.2.1.1. АР-эндонуклеаза <i>E. coli</i> Xth.....	28
1.2.1.2. АР-эндонуклеаза человека hAPE1.....	29
1.2.1.2.1. АР-эндонуклеазная активность hAPE1.....	30
1.2.1.2.2. 3'-5'-экзонуклеазная активность hAPE1.....	39
1.2.1.2.3. 3'-фосфатазная и 3'-фосфодиэстеразная активность hAPE1.....	40
1.2.1.2.4. Инцизионная репарация оснований (NIR).....	41
1.2.1.2.5. Эндорибонуклеазная активность hAPE1.....	42
1.2.1.2.6. Регуляция транскрипции.....	43
1.2.1.3. АР-эндонуклеазы структурного семейства Xth из других видов.....	45
1.2.2. Структурное семейство Nfo.....	46
1.2.2.1. Эндонуклеаза IV <i>E. coli</i>	48
1.2.2.2. Apn1 <i>S. cerevisiae</i>	51
1.3. ДНК-эндонуклеаза EndoQ из <i>Pyrococcus furiosus</i>	52
1.4. Заключение.....	60

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	65
2.1. Буферные растворы.....	65
2.2. Синтез и очистка олигодезоксирибонуклеотидов.....	65
2.3. Подтверждение структуры G-квадруплексов методом кругового дихроизма (CD).....	68
2.4. Клонирование генов AP-эндонуклеаз.....	68
2.5. Выделение и очистка ферментов.....	69
2.6. Определение влияния концентрации одно- и двухвалентных ионов металлов на активность AP-эндонуклеаз.....	71
2.7. Анализ активности ферментов zAPE1, хAPE1 и Rrp1 в стационарных условиях.....	72
2.8. Анализ активности фермента EndoQ в стационарных условиях.....	72
2.9. Анализ активности фермента hAPE1 при расщеплении субстратов с неканонической структурой.....	73
2.10. Флуоресцентные кинетические измерения методом «остановленного потока».....	74
2.11. Математическая обработка кинетических кривых.....	75
2.12. Анализ межмолекулярных взаимодействий с использованием микротермофореза (MST).....	77
2.13. Статистический анализ.....	78
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	79
3.1. Активность апуриновой/апириимидиновой эндонуклеазы человека hAPE1 по отношению к поврежденной ДНК с неканонической структурой.....	79
3.1.1. Разработка модельных ДНК-субстратов, формирующих неканонические структуры.....	79
3.1.2. Анализ накопления продуктов расщепления поврежденных ДНК-субстратов с неканонической структурой методом гель-электрофореза.....	82
3.1.3. Определение константы связывания неканонических ДНК-субстратов ферментом hAPE1.....	86
3.1.4. Влияние концентрации фермента hAPE1 на эффективность расщепления поврежденного G-квадруплекса в стационарных условиях	87
3.1.5. Конформационные изменения G-квадруплексов при взаимодействии с ферментом hAPE1	88
3.1.5.1. Сравнительный анализ конформационных изменений G-квадруплексных ДНК-субстратов, содержащих FRET-пару или aPu.....	90

3.1.6. Предполагаемый механизм распознавания нуклеотидов-мишеней ферментом hAPE1.....	92
3.2. Сравнительный анализ субстратной специфичности AP-эндонуклеаз из семейства Xth.....	95
3.2.1. Выбор AP-эндонуклеаз, обладающих высокой идентичностью С-концевого каталитического домена с hAPE1.....	95
3.2.2. Влияние концентрации одно- и двухвалентных ионов металлов на активность AP-эндонуклеаз	97
3.2.3. Конформационная динамика и кинетика взаимодействия ферментов типа APE1 с поврежденной и неповрежденной ДНК.....	102
3.2.3.1. Конформационные изменения F-содержащего ДНК-субстрата при взаимодействии с ферментами типа APE1.....	105
3.2.3.2. Конформационные изменения неповрежденной ДНК при взаимодействии с ферментами типа APE1.....	108
3.2.4. Взаимодействие ферментов типа APE1 с ДНК-субстратами, содержащими NIR-повреждения.....	112
3.2.4.1. Анализ эффективности расщепления NIR-субстратов	112
3.2.4.2. Конформационные изменения поврежденных ДНК-субстратов при взаимодействии с ферментами типа APE1.....	112
3.2.5. Сравнительный анализ взаимодействия ферментов типа APE1 с ДНК-субстратами, содержащими различные повреждения, и неповрежденной ДНК.....	116
3.3. Апуриновая/апиридиновая эндонуклеаза EndoQ из <i>Pyrococcus furiosus</i>	118
3.3.1. Влияние катионов различных двухвалентных металлов на активность EndoQ	118
3.3.2. Зависимость активности фермента EndoQ от нуклеотида, расположенного напротив поврежденного основания комплементарной цепи	120
3.3.3. Кинетические параметры изменений конформации ДНК-субстратов, содержащих F-сайт, U или Hx, в процессе их взаимодействия с EndoQ.....	130
3.3.4. Взаимодействие фермента EndoQ с ДНК-субстратами, содержащими NIR-повреждения.....	134
3.3.5. Общий механизм взаимодействия между ферментом EndoQ и ДНК-субстратами, содержащими в качестве повреждений F-сайт, Hx или U.....	137
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	142
ВЫВОДЫ.....	146

Список используемых сокращений.....	147
Список литературы.....	151

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Сохранение генетической информации, записанной в виде последовательности нуклеотидов ДНК, чрезвычайно важно для нормального клеточного роста, функционирования клетки, организма и выживания вида в целом [1]. Однако в результате воздействия различных факторов окружающей среды, ионизирующего излучения, а также внутренних метаболических процессов в молекуле ДНК регулярно возникают повреждения [2]. Установлено, что под влиянием данных факторов в каждой клетке в день может возникать до 100000 повреждений ДНК [3]. В связи с регулярным возникновением такого количества различных повреждений в ходе эволюции у всех живых организмов от бактерий до человека сформировались разнообразные системы репарации токсичных и мутагенных оснований в ДНК [3–5]. Большую часть модифицированных азотистых оснований ДНК, которые способны как блокировать процессы репликации и транскрипции, так и приводить к возникновению мутаций, призвана удалять из генома система эксцизионной репарации оснований (BER) [6,7]. Апуриновые/апиримидиновые (AP) эндонуклеазы играют одну из ключевых ролей в эксцизионной репарации оснований ДНК. Основной биологической функцией этих ферментов считается гидролиз фосфодиэфирной связи с 5'-стороны от AP-сайта с образованием на 5'-конце 2'-дезоксирибозофосфатной (dRp) группы и 3'-ОН группы (AP-эндонуклеазная активность) [8,9]. Известно также, что эти ферменты могут узнавать в качестве субстратов не только AP-сайты, но и ряд поврежденных нуклеотидов, таких как 2'-дезоксидигидроуридин (DHU), альфа-аномер 2'-дезоксиаденозина (α A), 2'-дезоксиденозин (ϵ A), 2'-дезоксисуридин (U) и другие (NIR-активность) [10]. Кроме того, в число активностей некоторых AP-эндонуклеаз входят 3'-фосфодиэстеразная, 3'-5'-экзонуклеазная [11–13], 3'-фосфатазная и РНКазная [14–17]. Несмотря на большой интерес к выяснению механизмов распознавания нуклеотидов-мишеней AP-эндонуклеазами и природы контактов, которые определяют специфичность этих ферментов к широкому спектру различных поврежденных и неповрежденных нуклеотидов, вопрос о том, как конкретный нуклеотид распознается активным центром фермента, до сих пор остается неясным. Субстратная специфичность к различным поврежденным нуклеотидам может быть связана с различным характером и степенью искажения структуры ДНК в области расположения модифицированного основания, что влияет на эффективность формирования каталитически компетентного комплекса фермента с ДНК-субстратом. Еще одним фактором, влияющим на субстратную специфичность, может быть различная эффективность процесса выворачивания поврежденного нуклеотида в активный центр фермента, которая, вероятно, зависит как от химической природы основания, так и от стабильности комплементарной пары поврежденного основания с основанием в противоположной цепи [18–20].

Целью данной работы было сравнительное исследование механизмов взаимодействия пяти AP-эндонуклеаз, принадлежащих к структурным семействам Xth и EndoQ, с модельными ДНК-субстратами, содержащими различные типы поврежденных нуклеотидов и обладающими неканонической структурой, методами предстационарной кинетики.

В ходе исследований решались следующие **задачи**:

- исследование кинетики конформационных изменений фермента hAPE1 человека и ДНК-субстратов, формирующих G-квадруплекс, а также содержащих выпетливание поврежденной или неповрежденной цепи, в ходе осуществления ферментативного процесса для установления механизма взаимодействия hAPE1 с поврежденными ДНК-субстратами с неканонической структурой;
- исследование кинетики конформационных изменений ДНК-субстратов, содержащих различные поврежденные нуклеотиды, а также неповрежденной ДНК, в процессе взаимодействия с AP-эндонуклеазами, принадлежащими к структурному семейству Xth: Rrp1 из *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), xAPE1 из *Xenopus laevis* (*X. laevis*) и zAPE1 из *Danio rerio* (*D. rerio*), для определения общих закономерностей процессов узнавания поврежденных нуклеотидов ферментами структурного семейства Xth;
- анализ особенностей проявления субстратной специфичности фермента EndoQ из *Pyrococcus furiosus* (*P. furiosus*) по отношению к таким повреждениям ДНК как остаток 2-гидроксиметил-3-гидрокси-тетрагидрофурана (синтетический аналог AP-сайта, F-сайт), уридин, остаток гипоксантина (Hx), 5,6-дигидроуридин, альфа-аномер аденозина и этеноаденозин; исследование кинетики конформационных изменений ДНК-субстратов, содержащих различные поврежденные нуклеотиды, а также неповрежденной ДНК, в процессе взаимодействия с EndoQ и выявление отличительных особенностей механизма узнавания поврежденных нуклеотидов ферментом EndoQ.

Положения, выносимые на защиту

- 1) AP-эндонуклеаза hAPE1 катализирует гидролиз остатка тетрагидрофурана в петле или в ядре теломерного G-квадруплекса человека.
- 2) hAPE1 проявляет AP-эндонуклеазную активность по отношению к ДНК-субстратам с неканонической структурой, содержащим выпетливание поврежденной или неповрежденной цепи; эффективность расщепления зависит от размера выпетливания поврежденной цепи и положения остатка тетрагидрофурана.
- 3) Механизм целевого распознавания нуклеотидов AP-эндонуклеазами, принадлежащими к семейству Xth, состоит из двух основных этапов: формирования первичного фермент-

субстратного комплекса и его последующего скорость-лимитирующего превращения в каталитически компетентный комплекс.

4) Фермент Rrp1 обладает значительно более низкой скоростью каталитической реакции с ДНК, содержащей остаток тетрагидрофурана, а также более низкой скоростью образования комплексов с ДНК, содержащей альфа-аномер 2'-дезоксиаденозина, 2'-дезоксизеноаденозин, 2'-дезоксигуанидин или 2'-дезоксизидогуанидин, и с неповрежденным ДНК-лигандом, в сравнении с другими ферментами структурного семейства Xth, а именно hAPE1, zAPE1 и xAPE1.

5) Фермент EndoQ расщепляет одноцепочечную ДНК, содержащую остаток гипоксантина или урацила, более эффективно, чем двухцепочечную ДНК, содержащую те же повреждения; процесс взаимодействия EndoQ с ДНК-субстратами, содержащими разные повреждения, имеет индивидуальные отличия, связанные с отдельными этапами последовательных взаимосогласованных конформационных перестроек в фермент-субстратном комплексе.

Ранее был предложен механизм, обеспечивающий субстратную специфичность hAPE1 по отношению к ДНК, содержащей поврежденные азотистые основания [18,19]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что субстратная специфичность hAPE1 контролируется способностью поврежденного нуклеотида выворачиваться из двойной спирали ДНК-дуплекса в ответ на индуцированные ферментом конформационные изменения ДНК. В представленной работе для того чтобы проверить предположение о том, что способность поврежденного нуклеотида выворачиваться из ДНК и располагаться в кармане активного центра фермента может быть ключевым фактором, отвечающим за субстратную специфичность hAPE1, в качестве модельных ДНК-субстратов с неканонической структурой были использованы G-квадруплексы, содержащие четыре повтора TTAGGG теломерной ДНК человека, а также ДНК-дуплексы, содержащие в центральной части выпетливания поврежденной или неповрежденной цепи. В качестве специфически расщепляемого повреждения в неканонических структурах был использован F-сайт. Для регистрации локальных конформационных изменений ДНК-субстратов в области расположения повреждения в ходе взаимодействия с hAPE1 в олигодезоксирибонуклеотиды была введена флуорофорная группа 2-аминопурина (aPu), расположенная с 3'- либо 5'-стороны от поврежденного нуклеотида. Для регистрации «глобальных» конформационных изменений ДНК-субстратов в олигодезоксирибонуклеотиды с мономолекулярной G-квадруплексной структурой вводили FRET-пару FAM/BHQ1, на 5'- и 3'-концах олигодезоксирибонуклеотидов.

Чтобы установить, является ли предложенный механизм общим для всех ферментов типа APE1, на основании высокой идентичности С-концевого каталитического домена с hAPE1 были

подобраны три AP-эндонуклеазы из различных организмов: Rrp1 насекомого *D. melanogaster*, хAPE1 амфибии *X. laevis* и zAPE1 рыбы *D. rerio*. Чтобы охарактеризовать NIR-активность AP-эндонуклеаз, принадлежащих к различным структурным семействам из эволюционно отдаленных организмов, была исследована конформационная динамика ДНК-субстратов, содержащих различные поврежденные нуклеотиды, а также неповрежденной ДНК в процессе взаимодействия с ДНК-эндонуклеазой EndoQ из *P. furiosus*. Для того чтобы проследить за конформационными изменениями ДНК при взаимодействии с ферментами zAPE1, хAPE1, Rrp1 и EndoQ, были использованы ДНК-дуплексы, меченые FAM по 5'-концу поврежденной цепи, и содержащие тушитель BHQ1 на 5'-конце комплементарной цепи. В качестве ДНК-субстрата ферментов, катализирующих AP-эндонуклеазное расщепление, был выбран ДНК-дуплекс, содержащий F-сайт. В качестве NIR-субстратов для ферментов zAPE1, хAPE1 и Rrp1 были использованы ДНК-дуплексы, содержащие такие повреждения как U, DHU, αA и εA. В качестве NIR-субстратов для фермента EndoQ, помимо вышеперечисленных, был также использован ДНК-дуплекс, содержащий остаток Hx. Для изучения неспецифического связывания с ДНК для всех ферментов был использован неповрежденный ДНК-дуплекс.

Поскольку распознавание AP-эндонуклеазами специфического сайта в ДНК-субстрате сопровождается конформационной подстройкой фермента и субстрата для образования специфических контактов в фермент-субстратном комплексе, для осуществления кинетического анализа конформационных изменений исследуемых ферментов и ДНК-субстратов в ходе формирования комплекса был использован метод «остановленного потока», позволяющий смешивать растворы фермента и субстрата за 1,4 мс и наблюдать за их взаимодействием в предстационарных условиях.

Научная новизна работы и практическая значимость работы. В представленной работе впервые было проведено детальное кинетическое исследование взаимодействия AP-эндонуклеазы человека hAPE1 с ДНК-субстратами, обладающими неканонической структурой; AP-эндонуклеаз zAPE1 из *Danio rerio*, хAPE1 из *Xenopus laevis* и Rrp1 из *Drosophila melanogaster*, принадлежащих к семейству Xth, и ДНК-эндонуклеазы EndoQ из *Pyrococcus furiosus*, с ДНК-субстратами, содержащими различные типы повреждений, а также с неповрежденной ДНК. Показано, что ферменты структурного класса Xth схожим образом связывают F-содержащий ДНК-субстрат, в то время как связывание более объемных повреждений, таких как DHU, αA или εA, требующее тонкой конформационной подстройки фермента и субстрата внутри активного центра, происходит с заметными отличиями в эффективности. В то же время характер взаимодействия фермента EndoQ с различными поврежденными ДНК-субстратами значительно отличается от ферментов семейства Xth, несмотря на перекрывающуюся субстратную специфичность. Сопоставление полученных в

работе результатов с имеющимися литературными данными позволило установить механизм взаимодействия hAPE1 с поврежденными ДНК-субстратами, обладающими неканонической структурой, установить общие закономерности и отличительные особенности механизмов узнавания поврежденных нуклеотидов в ДНК ферментами, принадлежащими к структурным семействам Xth и EndoQ, и предложить модель кинетического механизма взаимодействия всех изученных ферментов с поврежденной ДНК.

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

Публикации и апробации работы. По материалам диссертации опубликовано 3 научных статьи, индексируемых в базах Web of Science и Scopus.

Результаты, изложенные в диссертации, были представлены на конференциях: 44^{ом} конгрессе FEBS (Краков, Польша, 2019), IX Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Дагомыс, 2019), конференции BGRS-SB (Новосибирск, 2020), 45^{ом} конгрессе FEBS (онлайн-конференция, 2021), конференции EEMGS (онлайн-конференция, 2021), III Объединенном Научном Форуме Физиологов, Биохимиков и Молекулярных Биологов (Дагомыс, 2021) и конференции BGRS-SB (Новосибирск, 2022).

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на **183** страницах, содержит **48** рисунков, **9** схем и **9** таблиц. Библиография включает **347** литературных источников.

1. Повреждения ДНК: формирование, пути удаления и ферментативные свойства ключевых участников репарации – AP-эндонуклеаз (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Источники и последствия возникновения повреждений ДНК

Различные типы повреждений ДНК играют ключевую роль в развитии мутагенеза, раковых заболеваний и старении. При этом большинство мутаций, возникающих в клетках тканей человека, судя по всему, носят эндогенный характер. Перечень химических реакций, приводящих к повреждению ДНК, включает гидролиз, воздействие активных форм кислорода (АФК) и других химически активных метаболитов. И, хотя эти реакции могут развиваться под влиянием факторов окружающей среды, концентрации и мутагенный потенциал известных канцерогенов, с которыми мы встречаемся в окружающей среде, недостаточны для объяснения высокого уровня возникновения спорадических раковых заболеваний в популяции. Таким образом, мутации, возникающие в результате неизвестных пока эндогенных факторов, а также вследствие роста уровня эндогенных повреждений, модулируемого экзогенными факторами, должно быть, вместе играют важную роль в развитии большинства раковых заболеваний, в дополнение к изменениям в экспрессии определенных генов в связи с условиями внешней среды. Эндогенные повреждения ДНК возникают с гораздо большей частотой по сравнению с экзогенными, и типы повреждений, возникающих в ходе протекания нормальных клеточных процессов, идентичны или сходны с таковыми, которые были вызваны воздействием некоторых агентов из окружающей среды [21].

1.1.1. Гипоксантин

Гидролитическое дезаминирование аденина и гуанина происходит в ДНК в нормальных физиологических условиях, и в результате образуются гипоксантин (Нх) и ксантин (Х) (рисунок 1), соответственно [3,22]. При этом скорость спонтанного превращения аденина в Нх составляет 2% от скорости превращения цитозина в урацил [3]. Гипоксантин является потенциально мутагенным повреждением ДНК, поскольку он способен образовывать пары не только с тиминам, но также и с цитозином, приводя к заменам АТ→ГС [23]. У млекопитающих и *Escherichia coli* (*E. coli*) Нх из ДНК удаляют специфичные ДНК-гликозилазы [24–27]. При этом у *E. coli* функцию гипоксантин-ДНК-гликозилазы выполняет AlkA, также известный как 3-метиладенин-ДНК-гликозилаза. Гомологичные AlkA ферменты человека (3-метиладенин-ДНК-гликозилаза (MPG), крысы (APDG) и дрожжей (MAG) также проявляют активность по

отношению к гипоксантину. Фермент *E. coli* не оказывает предпочтения определенному основанию напротив Нх, в то время как ферменты млекопитающих расщепляют ДНК, содержащую пары Нх/Т и Нх/Г с гораздо более высокой эффективностью. При этом ни один из этих ферментов не расщепляет одноцепочечную (о.ц.) ДНК, содержащую гипоксантин [28]. Исследования стабильности различных пар нуклеотидов с участием гипоксантина показали, что стабильность образуемой пары уменьшается в ряду $\text{Нх/С} > \text{Нх/А} > \text{Нх/Г} \approx \text{Нх/Т}$ [29]. Таким образом, гипоксантин-ДНК-гликозилаза человека, судя по всему, оказывает предпочтение менее стабильным парам. Кроме того у *E. coli* была обнаружена эндонуклеаза Endo V, которая способна расщеплять вторую фосфодиэфирную связь с 3'-стороны от дезаминированных оснований, в том числе Нх и U (рисунок 1) [30–32].

1.1.2. Альфа-аномеры нуклеотидов

Ионизирующее излучение приводит к появлению множества повреждений оснований и сахарофосфатного остова ДНК, а также к разрывам цепи ДНК [33]. Альфа-аномер аденозина (αA , рисунок 1) – основное повреждение аденина, возникающее в результате атаки гидроксильными радикалами, продуцируемыми ионизирующим излучением, причем его формирование предпочтительнее происходит в полинуклеотидах, чем в свободных нуклеозидах или нуклеотидах [34]. *In vitro* было показано, что αA в ДНК может приводить к остановке репликативной вилки, а также к ошибочной вставке напротив него аденина и цитозина, что приводит к заменам $\text{АТ} \rightarrow \text{ГС}$ и $\text{АТ} \rightarrow \text{ТА}$ [35]. Более того, в исследованиях *in vivo* было показано, что о.ц. вектор M13, содержащий αA в определенной позиции, приводит к возникновению однонуклеотидной делеции [36], а последовательность, фланкирующая αA , оказывает влияние на возникновение делеции и эффективность прохождения повреждения. Уникальность повреждения αA заключается в том, что для его возникновения в ДНК в результате воздействия ионизирующего излучения необходимы бескислородные условия [34].

Несмотря на то, что BER является главным путем репарации многих окислительных повреждений оснований в ДНК [7], определенные типы повреждений, в том числе альфа-аномеры 2'-дезоксирибонуклеотидов (αdN), не удаляются ДНК-гликозилазами, и являются субстратами для AP-эндонуклеаз в пути инцизионной репарации нуклеотидов (NIR) [10,37,38]. Было показано, что у *E. coli* αA и αT удаляются из ДНК ферментом Nfo [37], а у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) гомологичным ферментом Apr1 [39]. AP-эндонуклеаза 1 человека (hAPE1) также способна удалять αA и αT из ДНК-дуплексов. Активность

гомологичного фермента из *E. coli* Xth по отношению к α A и α T-содержащей ДНК не была установлена [10,40]. В таком альтернативном пути как NIR AP-эндонуклеаза расщепляет сахарофосфатный остов ДНК с 5'-стороны от поврежденного основания, и в результате образуются 3'-ОН группа и свисающий на 5'-конце поврежденный нуклеотид [40]. Поскольку NIR является консервативным путем репарации, начиная от бактерий и заканчивая человеком, предположительно он может служить в качестве запасного для опосредованного ДНК-гликозилазами BER-пути [39].

1.1.3. 2'-Дезокси-5,6-дигидроуридин

Наряду с α A, 2'-дезокси-5,6-дигидроуридин (DHU, рисунок 1) представляет собой одно из основных повреждений оснований ДНК, формируемых в результате воздействия ионизирующего излучения в анаэробных условиях. DHU представляет собой продукт реакции восстановления связи C₅-C₆ в результате атаки цитозина $\cdot$ ОН радикалом [41]. Это повреждение является потенциально мутагенным, так как оно может приводить к замене C $\rightarrow$ T [10]. DHU, как и многие другие продукты окисления пиримидинов, удаляется из ДНК по пути BER у *E. coli* эндонуклеазой III (Nth) [42,43], а у человека гомологичным ферментом hNTH1 [44]. Кроме того, DHU также является субстратом для AP-эндонуклеаз Nfo из *E. coli*, Apn1 из *S. cerevisiae* [40] и hAPE1 человека [10], и удаляется в данном случае по NIR-пути.

1.1.4. Этенопроизводные азотистых оснований

Аэробное дыхание сопряжено с формированием активных форм кислорода (АФК) в ходе протекания нормальных метаболических процессов клетки. АФК – это класс реактивных ионов и свободных радикалов, возникающих в клетке в ходе окислительных реакций в результате как эндогенных клеточных процессов, так и воздействия экзогенных факторов [45]. Они способны реагировать с белками, липидами и ДНК. Модификации оснований ДНК, AP-сайты, повреждения сахарофосфатного остова, о.ц. и двухцепочечные (д.ц.) разрывы ДНК – все эти повреждения могут быть спровоцированы различными формами окислительного стресса. Полный список окислительных повреждений ДНК млекопитающих насчитывает более 100 различных типов [46]. АФК приводит к перекисному окислению липидов и повреждению полиненасыщенных жирных кислот, которые являются основными компонентами клеточных мембран. Кроме того, липопротеины низкой плотности, транспортирующие липиды по кровотоку, также очень чувствительны к окислению [47,48]. Возникающие в результате этих процессов эпоксиальдегиды, взаимодействуя с ДНК, могут приводить к образованию в ней

экзоциклических аддуктов, таких как 2'-дезоксиз-3,N⁴-этенотидин (εC), 2'-дезоксиз-N²-3-этенотгуанозин (N²-3-εG), 2'-дезоксиз-1,N²-этенотгуанозин (1,N²-εG) и 2'-дезоксиз-1,N⁶-этенотаденозин (εA, рисунок 1). Кольцевая система этено-аддуктов формируется в результате атаки реакционноспособных бифункциональных эпоксидов или альдегидов на атом азота основания ДНК, за которой следуют дегидратация с замыканием цикла [49,50]. Этенот-аддукты пуриновых и пиримидиновых оснований также могут формироваться в результате воздействия таких канцерогенов как винилхлорид и уретан [51]. Экзоциклические ДНК-аддукты, такие как εA и εC, играют важную роль в многостадийном развитии онкологических и ассоциированных с воспалительными процессами заболеваний человека [50].

Этенот-аддукты оснований ДНК обладают мутагенным потенциалом, так как способны приводить к замене основания. В частности, εA считается высоко мутагенным повреждением ДНК и может приводить к заменам АТ→GC, АТ→ТА и АТ→CG [52]. εC в ДНК приводит к заменам CG→АТ и CG→ТА [53], N²-3-εG – к замене GC→АТ [54], а 1,N²-εG – к заменам GC→ТА и GC→CG [55]. Было показано, что мутагенный потенциал εA и εC сравнимы в клетках млекопитающих [52]. В исследованиях *in vitro* было показано, что появление 1,N²-εG в ДНК приводит к блокированию репликации и возникновению делеций [55]. Уровень содержания этено-аддуктов в ДНК коррелирует с увеличением окислительного стресса и ассоциирован с увеличением риска развития рака [51]. Кислород- и азот-содержащие интермедиаты, генерируемые в результате развития воспалительных процессов, также приводят к формированию этено-аддуктов [21].

Большая часть эндогенных поврежденных оснований ДНК удаляется ДНК-гликозилазами BER. В том числе было установлено, что εA и εC распознаются и удаляются моно-функциональными ДНК-гликозилазами человека: 3-метиладенин-ДНК-гликозилазой (MPG) и мисматч-специфичной тимин-ДНК-гликозилазой (TDG), соответственно [56–58]. У *E. coli* εC удаляется мисматч-специфичной урацил-ДНК-гликозилазой (MUG), гомологичной TDG [56]. Также εA и εC могут удаляться из ДНК путем прямой репарации повреждений через окислительное деалкилирование, катализируемое ферментами семейства AlkB. Эти ферменты удаляют алкильные группы поврежденных оснований без расщепления ДНК и синтеза *de novo* [59,60]. Фермент человека ABH2, гомологичный AlkB, также способен удалять εA и εC из ДНК, хотя эффективность ABH2 по отношению к εA была недостаточной для полной компенсации отсутствия MPG [61,62].

Кроме того, ϵ A и ϵ C могут удаляться AP-эндонуклеазой человека hAPE1 по пути NIR, хотя кинетические параметры этого процесса говорят о том, что основная часть этено-аддуктов в ДНК клетки должна удаляться специфичными ДНК-гликозилазами. Интересно, что AP-эндонуклеазы, принадлежащие семейству Nfo, а именно Nfo *E. coli* и Apn1 *S. cerevisiae*, не проявляют активность по отношению к ДНК, содержащей этено-аддукты, хотя они также являются NIR-AP-эндонуклеазами по отношению к другим субстратам [63].

1.1.5. 2'-Дезоксиуридин

Существует несколько путей появления урацила в ДНК, и самыми важными среди них являются дезаминирование цитозина и присоединение к праймеру dUMP вместо dTMP в процессе синтеза ДНК. Цитозин более чувствителен к деградации под влиянием повышенных температур, чем три других основания ДНК, и гидролитическое дезаминирование цитозина и 2'-дезокситидина происходит при нейтральных pH. Спонтанное дезаминирование цитозина приводит к появлению порядка 100-500 остатков урацила на клетку человека в течение дня [3], а для о.ц. участков ДНК, возникающих в связи с процессами репликации и трансляции, скорость дезаминирования цитозина может увеличиться в 200-300 раз [64]. Помимо температуры к дезаминированию цитозина может приводить воздействие некоторых группоспецифичных агентов, таких как бисульфит или азотистая кислота.

ДНК-полимеразы способны вставлять dUMP вместо dTMP в ходе репликации [65]. Несмотря на высокую селективность этих полимераз, размер генома и гораздо более высокая концентрация rNTP по сравнению с dNTP в клетке приводит к включению более чем 13 тысяч рибонуклеотидов в ходе каждого раунда репликации ДНК в почкующихся дрожжах, а в клетке человека – на порядки больше [66]. Одним из способов борьбы с неправильным включением урацила в ДНК является активность dUTPаз, гидролизующих dUTP [67].

Вне зависимости от пути возникновения урацил удаляется из ДНК в результате активности урацил-ДНК-гликозилаз (UDG), что приводит к появлению AP-сайтов. Урацил-ДНК-гликозилазы, возможно, наиболее консервативны среди дрожжей, бактерий и клеток млекопитающих. Впервые UDG была обнаружена Lindahl в *E. coli* [68], она же была первым найденным ферментом репарации, способным к расщеплению N-гликозидной связи в ДНК [69].

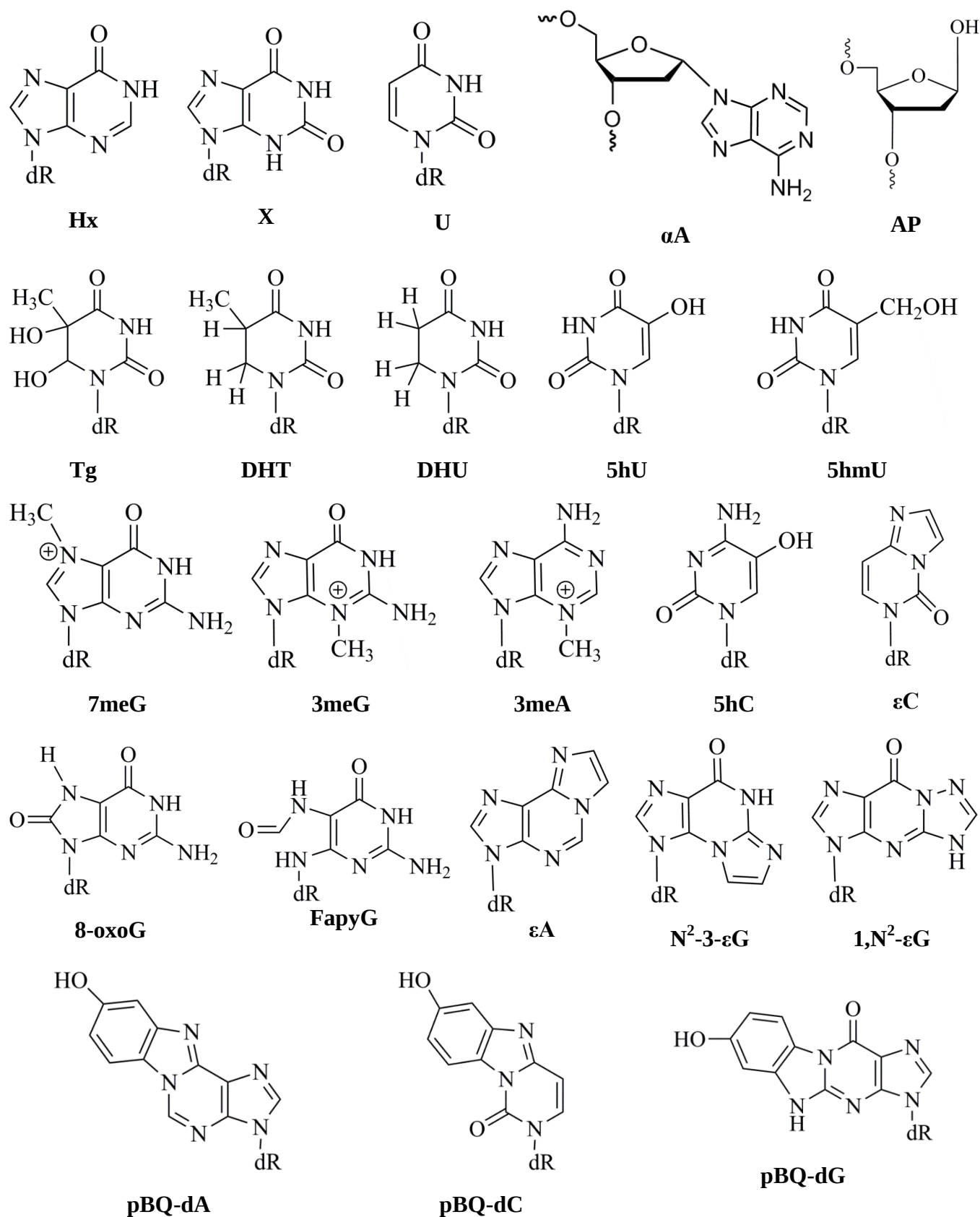


Рисунок 1. Примеры повреждений, возникающих в ДНК под действием эндогенных и экзогенных факторов.

Помимо специфичных ДНК-гликозилаз уридин также может удаляться из ДНК hAPE1 человека в ходе NIR. Было показано, что hAPE1 имеет высокое сродство к ДНК, содержащей пару U/G, однако скорость удаления уридина достаточно низкая, и эффективность работы AP-эндонуклеазы зависит от контекста и основания, расположенного напротив урацила. Интересно, что у некоторых представителей архей не обнаружено ДНК-гликозилаз, специфичных к U, однако обнаружены ферменты, принадлежащие семейству AP-эндонуклеаз Xth. Это может говорить о том, что путь репарации NIR возник параллельно с BER или раньше, чтобы помогать организмам справляться с высоким содержанием урацила в ДНК [70].

1.1.6. Апуриновые/апиримидиновые сайты

AP-сайты в ДНК возникают в результате расщепления *N*-гликозидной связи, соединяющей пуриновое или пиримидиновое основание с 2'-дезоксирибозой. Эту реакцию называют депуринизацией или депиримидинизацией, соответственно, а возникающее в результате повреждение ДНК – AP-сайтом. AP-сайты существуют в растворе в виде аномеров 2'-дезоксид-*D*-рибозы, представляющих собой равновесную смесь (рисунок 2) фуранозной формы с закрытым кольцом (99%) и альдегида с открытым кольцом (1%) [71,72].

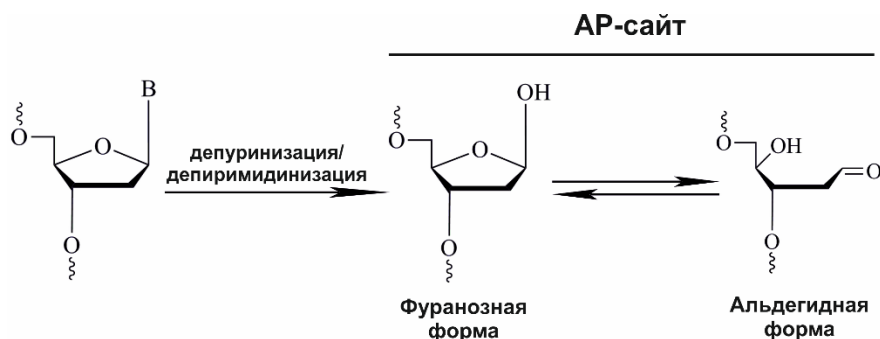


Рисунок 2. Формирование и структура AP-сайтов [71].

1.1.6.1. Формирование AP-сайтов

1.1.6.1.1. Спонтанный гидролиз *N*-гликозидной связи

AP-сайты являются одними из наиболее часто встречающихся повреждений ДНК. Было посчитано, что клетка *E. coli* в физиологических условиях теряет примерно одно основание за два поколения, а для клеток млекопитающих эта цифра составляет около 10000 оснований на клетку в течение дня [73]. Скорость спонтанной депиримидинизации примерно в 20 раз ниже скорости депуринизации, однако у этих событий одинаковый результат – потеря основания

ДНК. Скорость расщепления *N*-гликозидной связи в д.ц. ДНК в четыре раза ниже, чем в о.ц. ДНК, а гидролиз свободных 2'-дезоксирибонуклеозидов, в свою очередь, происходит в 10-50 раз быстрее, чем в о.ц. ДНК [73,74].

Помимо спонтанного гидролиза неповрежденных нуклеотидов, АР-сайты могут возникать в результате повреждения азотистых оснований ДНК, напрямую через дестабилизацию *N*-гликозидной связи, или косвенно в результате работы ДНК-гликозилаз.

Интерес к изучению алкилирования нуклеиновых кислот начался с наблюдения того, что алкилирующие агенты, такие как иприт, обладают мутагенными свойствами. Наиболее активно алкилирующие агенты реагируют с N⁷ гуанина, что дестабилизирует *N*-гликозидную связь 7-алкилгуанина и приводит к ее спонтанному разрыву путем β-элиминирования. Кроме того, N-нитрозоалкилирующие агенты склонны алкилировать атомы кислорода нуклеиновых оснований, в частности O⁶ и O². O⁶-алкилированный гуанин активно удаляется из ДНК в результате действия гликозилаз, а *N*-гликозидная связь O²-алкилированного тимина чрезвычайно лабильна. Таким образом, N-нитрозоалкилирующие агенты представляют собой опасные канцерогены и способны алкилировать все атомы кислорода в нуклеиновых кислотах [75].

Такие АФК как супероксид, пероксид водорода и гидроксильные радикалы, являются побочными продуктами клеточного метаболизма и способны реагировать со всеми четырьмя основаниями ДНК [76]. Ввиду низкого окислительно-восстановительного потенциала остатков гуанина одним из наиболее часто встречающихся продуктов окисления оснований ДНК является 2'-дезоксигуано-8-оксо-7,8-дигидрогуанозин (8-охоG, рисунок 1) [77,78]. Также свободные радикалы склонны атаковать 5,6-двойную связь остатков пиримидинов, что приводит к возникновению разнообразных продуктов окисления оснований [76,78]. Окислительными премутагенными повреждениями являются, например, 2'-дезокситимингликоль (Tg), 2'-дезоксигуано-5-гидроксицитидин (5hC), 2'-дезоксигуано-5-гидроксиуридин (5hU) и уже упомянутый выше DHU (рисунок 1) [77]. Эти окислительные повреждения могут приводить к возникновению АР-сайтов как напрямую, через дестабилизацию *N*-гликозидной связи, так и косвенно, вследствие удаления этих повреждений соответствующими ДНК-гликозилазами [79].

Ионизирующее излучение провоцирует возникновение широкого спектра повреждений в ДНК, и, главным образом, двойные разрывы цепи ДНК, которые могут приводить к ряду серьезных последствий, вплоть до клеточной смерти. В том числе, ионизирующее излучение способно косвенно приводить к появлению АР-сайтов. Насыщение гетероциклических колец

нуклеиновых оснований путем присоединения радикалов представляет собой основной тип реакций в ДНК, провоцируемых ионизирующим излучением. Насыщение 5,6-двойной связи пиримидиновых нуклеозидов существенно снижает стабильность *N*-гликозидной связи. Это повышает вероятность спонтанного гидролиза и, как следствие, приводит к возникновению AP-сайтов [80,81]. Кроме того, AP-сайты являются результатом удаления других электронно-насыщенных продуктов ионизирующего излучения, таких как Tg, специализированными ДНК-гликозилазами [82].

Основными фотопродуктами воздействия на ДНК ультрафиолетового (УФ) излучения являются цитидин-содержащие пиримидиновые димеры (CPD) и дигидроцитидин. Тем не менее, уридин может возникать в качестве вторичного продукта под действием УФ-излучения, в результате быстрого спонтанного дезаминирования и последующей ферментативной мономеризации CPD [67], либо в процессе дезаминирования 2'-дезоксидигидроцитидина с последующим дегидрированием возникшего DHU [83].

1.1.6.1.2. Ферментативный гидролиз *N*-гликозидной связи

Активность ДНК-гликозилаз приводит к появлению AP-сайтов в качестве промежуточного интермедиата в ходе репарации ДНК по пути BER. Эти специализированные ферменты высоко консервативны для всех форм жизни, за редким исключением [84]. ДНК-гликозилазы катализируют гидролиз *N*-гликозидной связи между основанием ДНК и сахарофосфатным остовом с высвобождением основания. Их разделяют на моно- и бифункциональные. Среди 11 известных на данный момент ДНК-гликозилаз человека шесть являются монофункциональными [85]. Монофункциональные гликозилазы оставляют после себя интактный AP-сайт, в то время как бифункциональные обладают также лиазной активностью, которая расщепляет ДНК с 3'-стороны от AP-сайта, в результате чего формируются 3'-ненасыщенный альдегидный и 5'-фосфорилированный концы [77]. Другие бифункциональные ДНК-гликозилазы удаляют AP-сайт с образованием 3'-фосфатной и 5'-гидроксильной концевых групп [86] или оставляют после себя фосфатные группы на обоих концах разрыва цепи ДНК [87].

Некоторые ДНК-гликозилазы специфически удаляют неправильно спаренные основания. Вышеупомянутая TDG и метил-CpG-связывающий домен белок 4 (MBD4) узнают неправильно спаренные пары G/T или G/U и G/T, соответственно [88,89]. Аденин-ДНК-гликозилаза MUTYH

удаляет 2'-дезоксиаденозин из участков, в которых он неправильно спарен с 8-охоG и 2,6-диамино-4-окси-5-формаидопиримидином (fapyG, рисунок 1) [90]. Другие ДНК-гликозилазы специализируются на различных поврежденных основаниях, включая 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазу (OGG1), которая узнает и удаляет 8-охоG и fapyG, и MPG, которая участвует в репарации 2'-дезоксиз-3-метиладенозина (3meA), 2'-дезоксиз-7-метилгуанозина (7meG), и 2'-дезоксиз-3-метилгуанозина (3meG, рисунок 1) [91,92].

Установлено, что нокаут одной из ДНК-гликозилаз, не являются летальным для клеток, что позволяет предположить пересечение субстратной специфичности этих ферментов и существование альтернативных путей удаления некоторых повреждений [77,79]. Действительно, селективная к о.ц. участкам монофункциональная урацил-ДНК-гликозилаза 1 (SMUG1) имеет много субстратов, общих с UDG, в том числе 2'-дезоксиз-5-гидроксиметилуридин (5hmU, рисунок 1) [90,93]. Большая часть бифункциональных гликозилаз, таких как NEIL1, NEIL2, и NEIL3 (гомологи эндонуклеазы VIII) и NTHL1 (гомолог эндонуклеазы III) специализируются на окисленных пиримидинах и пуринах с раскрытым кольцом [94–98].

1.1.6.2. Последствия возникновения AP-сайтов в ДНК

Несмотря на то, что клетки обладают несколькими частично перекрывающимися механизмами репарации AP-сайтов в ДНК, эти механизмы могут быть не всегда эффективны. В частности, плотная упаковка клеточной ДНК эукариот в хромосому может ограничивать доступ ферментов репарации к повреждению. Хотя AP-сайты не приводят к драматическому нарушению классической В-формы ДНК [99], известно, что они эффективно блокируют синтез ДНК, осуществляемый полимеразми α , δ и ϵ [100–102]. Более того, было показано, что реплицируемые участки ДНК наиболее чувствительны к окислительному повреждению, и большое количество AP-сайтов формируется именно в участках репликации ДНК [45]. Однако также было показано в экспериментах *in vitro* [103] и *in vivo* [102], что AP-сайты обладают мутагенным потенциалом. Согласно SOS-гипотезе, определенные типы повреждений, с которыми в нормальных условиях не способны справиться репликативные ДНК-полимеразы, могут быть пройдены специальными полимеразми SOS-систем, склонными к ошибкам. При этом ДНК-полимеразы прокариот склонны вставлять напротив AP-сайта аденозин чаще других азотистых оснований (так называемое «А-правило») [101–104]. В клетках эукариот AP-сайты,

судя по всему, приводят к появлению мутаций еще чаще, чем у прокариот, ввиду особенностей упаковки ДНК и большего количества генетической информации на клетку. Исследования ДНК-полимераз эукариот *in vitro* показали, что они «проходят» AP-сайты с большей частотой [105]. Известно, что за счет AP-сайтов в клетках млекопитающих возникает 1 – 3% мутаций на геном. При этом, в отличие от прокариотических клеток, включение SOS-системы не является обязательным для мутагенеза, вызванного AP-сайтом, и «А-правило» в случае клеток млекопитающих не соблюдается, так как не было обнаружено однозначного предпочтения для включения определенного нуклеотида напротив AP-сайта, по крайней мере между аденозином, тимидином и цитидином [106]. Исследования дрожжей также не показали однозначного соблюдения «А-правила» при прохождении полимеразой AP-сайтов. Pagès и коллеги в своих экспериментах с использованием плазмидной ДНК показали, что в *S. cerevisiae* напротив AP-сайта предпочтительно встраивается dAMP [107]. Однако данные другого исследования на дрожжах говорят о предпочтении к вставке dCMP в ходе синтеза через повреждение [108].

Одним из самых опасных для клетки последствий возникновения AP-сайтов является их способность провоцировать разрывы в цепи ДНК. Альдегидная форма AP-сайта с открытым кольцом обладает высокой реакционной способностью [109]. Свободная альдегидная группа на С1' атоме открытой формы AP-сайта способствует β -элиминированию в присутствии нуклеофильных молекул, таких как тиолы, первичные и вторичные амины, полиамины и белки, содержащие основные группы. В результате протекания этой реакции 3'-фосфодиэфирная связь гидролизуетсся с образованием 3'-концевого ненасыщенного сахара и 5'-фосфата [110].

AP-сайты также способны приводить к возникновению одних из наиболее вредоносных повреждений – межцепочечных сшивок в ДНК. Межцепочечные сшивки обладают высокой цитотоксичностью и могут приводить к блокированию репликации и транскрипции [111,112]. Альдегидная группа раскрытой формы AP-сайта способна реагировать с экзоциклической аминогруппой противоположного основания, особенно гуанина [113,114]. AP-сайты также способны формировать сшивки с различными белками, участвующими в репарации, в том числе с Pol β [115,116] и поли(АДФ-рибоза)-полимеразой 1 (PARP1) [117–119].

1.1.6.3. Пути репарации AP-сайтов

Поскольку потеря основания потенциально несет за собой утрату локального участка генетической информации, во всех живых организмах в ходе эволюции были развиты методы

защиты от регулярно возникающих в геноме AP-сайтов. AP-сайты, возникающие на о.ц. участках ДНК, представляют собой отдельную угрозу для стабильности генома, поскольку их сложнее процессировать ферментам эксцизионной репарации. Принципиально возникновение AP-сайтов в о.ц. ДНК возможно в любой момент, когда ДНК существует в таком состоянии, например, в теломерах, транскрипционных пузырьках или в процессе репликации. hAPE1 действительно способна расщеплять AP-сайты и на о.ц. участках ДНК, хотя ее процессивность примерно в 20 раз ниже на таких участках по сравнению с д.ц. ДНК [120]. Однако, в отсутствие матрицы и с учетом того, что AP-сайт сам по себе не несет никакой генетической информации, такой процесс имеет высокий риск возникновения ошибок [79,120]. Тем не менее, некоторые ДНК-гликозилазы системы BER, в том числе NEIL1 и NEIL2, способны удалять ряд окислительных повреждений из о.ц. участков ДНК, что говорит о возможной значимой роли BER в репарации, сопряженной с транскрипцией и/или репликацией [96].

Помимо систем репарации клетки могут привлекать и другие механизмы защиты, чтобы справиться с AP-сайтами, возникающими на о.ц. участках. Например, некоторые ДНК-полимеразы могут осуществлять синтез через повреждение, как правило, встраивая dAMP напротив AP-сайта. Гомологичная рекомбинация или разворот репликативной вилки в сочетании со сменой шаблонов могут обеспечить безошибочный механизм. При смене шаблона интактная информация сестринской хроматиды используется для формирования ДНК-дуплекса, который затем может вовлекаться в один из механизмов репарации AP-сайта в д.ц. ДНК. Смена шаблона может происходить посредством процесса разворота репликативной вилки, в котором т.н. перекресток Холлидея образуется путем гибридизации двух зарождающихся цепей ДНК, или механизма внедрения цепей, зависящего от белков гомологичной рекомбинации, таких как Rad51 или Rad52 [121]. В обоих случаях синтез ДНК позволяет обойти повреждение без введения мутации [122].

Наконец, недавно были описаны два дополнительных иницирующих механизма для репарации или обхода AP-сайтов в о.ц. ДНК, которые опосредуются паралогами Rad51 [123] или эволюционно консервативным белком 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) binding, ESC-specific HMCES, скрывающим AP-сайты от склонного к ошибкам синтеза через повреждение и от систем репарации [124].

В д.ц. ДНК AP-сайты репарируются с помощью высокоточных систем эксцизионной репарации оснований и эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) [77,125,126], поскольку

интактная матрица комплементарной цепи ДНК содержит кодирующую информацию для репаративного синтеза. Считается, что эти пути осуществляют большую часть репарации AP-сайтов в ДНК [76].

1.1.6.3.1. Эксцизионная репарация оснований (BER)

Эксцизионная репарация оснований (BER) – это эволюционно консервативный и необходимый для выживания клеток путь репарации ДНК. Нарушения компонентов BER приводят к снижению выживаемости клеток, увеличению уровня возникновения мутаций и гиперчувствительности к агентам, повреждающим ДНК [77]. BER исправляет большую часть продуктов спонтанного гидролиза в ДНК, регулярно возникающие окислительные и алкилирующие модификации оснований или сахарофосфатного остова, а также урацил в ДНК [127]. В клетках человека BER инициируется одной из одиннадцати ДНК-гликозилаз (рисунок 3), которые эффективно обнаруживают и удаляют небольшие, не оказывающие значительного влияния на спиральную структуру ДНК, поврежденные основания [86]. Как уже было упомянуто выше, ДНК-гликозилазы делятся на моно- и бифункциональные, и то, какого типа гликозилаза инициирует репарацию, будет определять последующие ферментативные этапы процесса, поскольку это влияет на тип формирующихся на концах о.ц. разрыва промежуточных структур.

Поскольку работа ДНК-гликозилаз не требует затрат энергии, поиск повреждений осуществляется посредством тепловой диффузии. Вероятно, поиск повреждения осуществляется гликозилазами через комбинацию процессов скольжения по цепи ДНК и последовательных актов диссоциации-связывания [90]. В ходе такого сканирования формируется первичный фермент-субстратный комплекс, который трансформируется в каталитический комплекс при обнаружении специфического нуклеотида. Локальное нарушение структуры ДНК в первичном комплексе способствует изгибанию двойной спирали и в конечном итоге выворачиванию поврежденного основания из ДНК-дуплекса в сайт связывания фермента, в результате чего образуется каталитический фермент-субстратный комплекс. Выворачивание азотистого основания, является неотъемлемой стадией, присущей ферментативному процессу всех ДНК-гликозилаз [128], за исключением ферментов, принадлежащий структурному семейству AlkD [129].

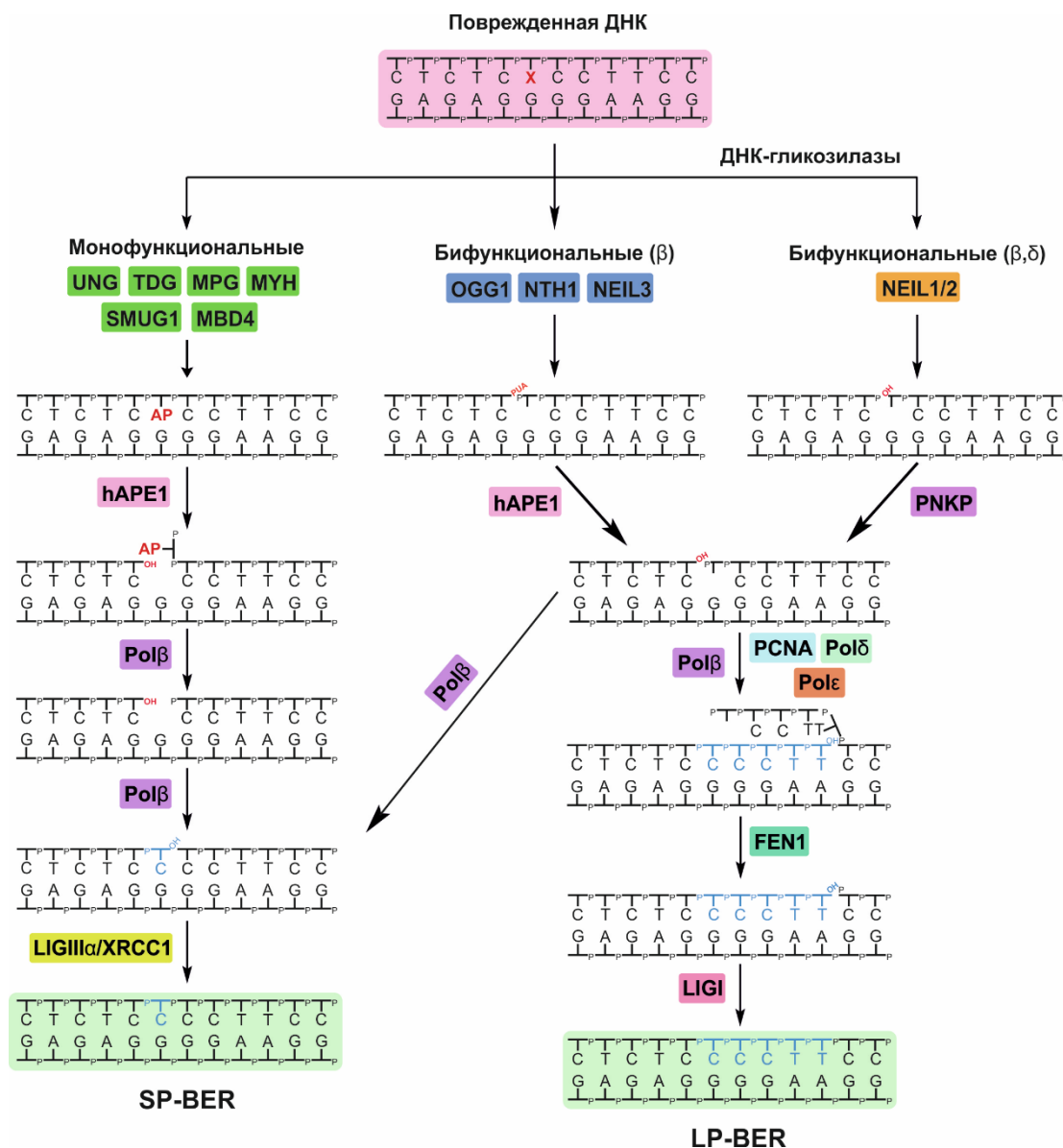


Рисунок 3. «Короткозаплаточный» (short patch, SP-BER) и «длиннозаплаточный» (long patch, LP-BER) пути эксцизионной репарации оснований у человека [128].

Интересно то, что ДНК-гликозилазы, как правило, ингибируются продуктом реакции, тем самым ограничивая скорость реакции и обеспечивая «передачу» интактного или расщепленного AP-сайта следующему ферменту системы BER – AP-эндонуклеазе hAPE1 [130,131]. Если поврежденное основание было удалено монофункциональной ДНК-гликозилазой, hAPE1 расщепляет сахарофосфатный остов ДНК с 5'-стороны от AP-сайта, оставляя после себя 3'-концевой гидроксил и 5'-dRp [132]. Также как и ДНК-гликозилазы, hAPE1 ингибируется продуктом реакции и остается связанным с расщепленным AP-сайтом, судя по всему, защищая таким образом сформировавшийся о.ц. разрыв и, вместе с тем, привлекая Polβ для дальнейшего процессирования повреждения [130,133]. Напротив, если

поврежденное основание было удалено бифункциональной ДНК-гликозилазой, она может также расщепить ДНК с 3'-стороны от AP-сайта, в результате чего образуются 3'-концевой α - β -ненасыщенный альдегид либо 3'-фосфатный конец, в зависимости от того, расщепляет ли бифункциональная гликозилаза AP-сайт через β - или β/δ -элиминирование, соответственно [86]. 3'- α - β -ненасыщенный альдегид и 3'-фосфат, будучи блокирующими 3'-концевыми остатками, удаляются hAPE1 и бифункциональной полинуклеотид-фосфатазой/киназой (PNKP), соответственно, и в результате действия обоих ферментов формируется 3'-концевой гидроксил, необходимый для работы репаративных ДНК-полимераз [134].

BER делится на два основных типа: короткозаплаточный (short patch, SP-BER), в ходе которого репарация осуществляется через замену одного нуклеотида, и длиннозаплаточный (long patch, LP-BER), осуществляемый путем замены нескольких нуклеотидов. Pol β является основной репаративной ДНК-полимеразой пути BER, хотя и многие другие полимеразы могут принимать участие в процессе, в том числе родственный фермент Pol λ [135,136]. Pol β обладает С-концевым полимеразным доменом, который может осуществлять синтез для заполнения пробела в ДНК, и N-концевым лиазным доменом, который удаляет 5'-dRp, возникший в результате работы hAPE1 [137,138].

Pol β является репаративной полимеразой SP-BER, хотя она может принимать участие и в LP-BER. Однако основными участниками LP-BER считаются репликативные ДНК-полимеразы. Дополнительными ферментами, принимающими участие в LP-BER, являются фактор репликации C (RF-C), необходимый для связывания ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) с ДНК, сам PCNA, играющий роль скользящего зажима для Pol β , и флэп-эндонуклеаза 1 (FEN-1), удаляющая свисающий олигодезоксирибонуклеотид. Следующий этап лигирования в случае SP-BER осуществляется комплексом X-ray repair cross complementing 1 белка (XRCC1) и ДНК-лигазы III α (LIGIII α), а в случае LP-BER - ДНК-лигазой I (LIGI) (рисунок 3). На то, по какому пути происходит процесс BER, влияет множество факторов, таких как иницирующая гликозилаза [139], тип эукариотической клетки и фаза клеточного цикла [140–142]. Petermann с коллегами показали, что на выбор между SP и LP-BER влияет также концентрация АТФ [143]. Установлено, что в нормальных условиях преобладает SP-BER. Преобладающий вклад LP-BER в условиях дефицита АТФ авторы [143] объясняют необходимостью его генерации из поли(АДФ)рибозы, синтез которой при этом также стимулируется.

Кроме того, стоит отметить, что возможная передача промежуточных продуктов от одного фермента BER к другому наподобие эстафетной палочки в процессе репарации является важным свойством BER [131,144–150]. Уровень координации в процессе передачи обеспечивается комбинацией белок-белковых взаимодействий и связыванием фермента с продуктом, которые регулируют скорость репарации и защищают промежуточные соединения от несанкционированной атаки другими ферментами, взаимодействующими с ДНК. В недавней работе [151] было высказано предположение, что аспекты этой «молекулярной хореографии» могут регулироваться белковым комплексом, связывающим поврежденную УФ ДНК (UV-damaged DNA binding protein complex, UV-DDB), посредством усиления ингибирования продуктом и увеличением скорости реакции, катализируемой ферментами, такими как OGG1, hAPE1 и Pol β [151,152].

1.1.6.3.2. Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER)

Существует множество свидетельств, что специфичность механизмов репарации BER и NER по отношению к различным повреждениям частично перекрывается, в частности, по отношению к AP-сайтам. У дрожжей *S. cerevisiae* инактивация NER приводит к увеличению чувствительности к монофункциональному алкилирующему агенту метилметансульфонату (MMC) и приводит к дальнейшему нарушению способности клеток к репарации AP-сайтов [153]. *In vitro* также было показано, что белки, участвующие в процессе NER у эукариот, способны репарировать AP-сайты [154].

Процесс репарации NER разделяют на два основных типа: глобальный геномный NER (global genomic NER, GG-NER) и NER, ассоциированный с транскрипцией (transcription-coupled NER, TC-NER). Эти разновидности отличаются только этапом, включающим узнавание повреждения ДНК, а последующие стадии удаления повреждения идентичны [125]. В случае с GG-NER нарушение классической структуры спирали ДНК, вызванное объемным повреждением, непосредственно распознается специализированными белками, которые инициируют дальнейшие этапы репарации [155].

Основную роль в удалении AP-сайтов, судя по всему, играет именно TC-NER. Этот процесс нацелен на удаление повреждений из транскрибируемой цепи ДНК. Сигналом для инициации TC-NER служит «арест» транскрипции. Было показано, что AP-сайты в значительной мере блокируют транскрипцию, осуществляемую T7 РНК-полимеразой (T7

RNAP), и практически полностью останавливают транскрипцию РНК-полимеразы II (RNAPII) млекопитающих [156]. Структура ДНК в области расположения AP-сайта препятствует включению нуклеотидов, и последующий синтез после прохождения AP-сайта протекает медленно [157]. Замедление транскрипции на AP-сайтах приводит к увеличению риска возникновения мутаций [158], при этом RNAPII предпочтительно встраивает AMP напротив AP-сайтов [157].

Транскрибируемая ДНК уязвима для появления в ней различных повреждений, в том числе AP-сайтов. Было показано, что активация транскрипции определенных участков ДНК связана с повышенной нестабильностью генома эукариот, приводящей к увеличению уровня митотической рекомбинации и мутагенеза. Накопление AP-сайтов резко возрастает в активно транскрибируемых генах дрожжей, и большая часть возникающих повреждений является следствием удаления урацила, появление которого связано в большей степени с неправильным встраиванием dUTP вместо dTTP в ходе репликативного или репаративного синтеза ДНК, чем с дезаминированием цитозина [155,159,160]. Это говорит о том, что TC-NER может играть важную роль в репарации AP-сайтов в ДНК.

1.2. AP-эндонуклеазы

AP-эндонуклеазы являются универсальными ферментами репарации, обладающими множеством активностей, включая AP-эндонуклеазную активность, 3'-фосфодиэстеразную активность, эндонуклеазную активность на некоторых поврежденных основаниях, 3'-5'-экзонуклеазную активность и эндорибонуклеазную активность. AP-эндонуклеазы разделяют на два больших семейства на основании степени гомологии аминокислотных последовательностей, при этом члены двух семейств не связаны между собой структурно, что указывает на то, что они эволюционировали независимо друг от друга. Это семейства Xth и Nfo, основоположниками которых является экзонуклеаза III (Xth) и эндонуклеаза IV (Nfo) *E. coli*, соответственно. В то время как члены семейства Xth широко представлены во всех доменах жизни, AP-эндонуклеазы семейства Nfo присущи низшим организмам, но отсутствуют у растений, млекопитающих и других позвоночных [161]. У человека большая часть AP-сайтов процессируется hAPE1, гомологом Xth, в то время как у дрожжей основной AP-эндонуклеазой является Ape1, относящаяся к семейству Nfo [162].

1.2.1. Структурное семейство Xth

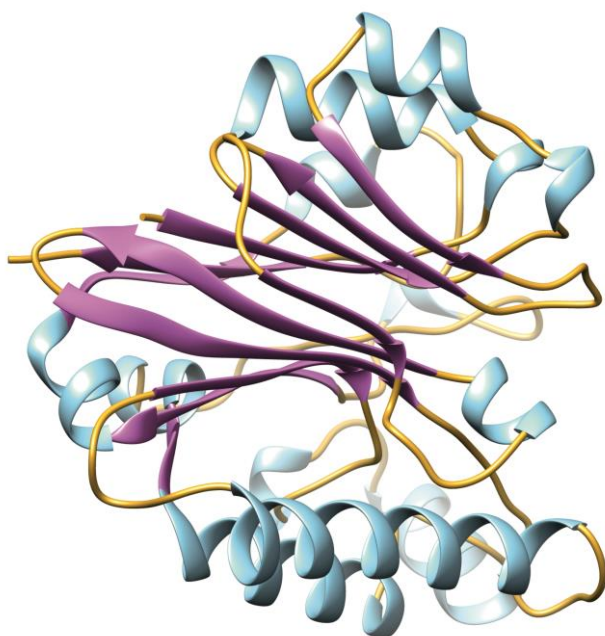
1.2.1.1. AP-эндонуклеаза *E. coli* Xth

Было замечено, что, несмотря на относительную стабильность ДНК, содержащей AP-сайты, инкубация частично депуризированной ДНК с клеточными экстрактами при нейтральном pH приводит к довольно быстрому ферментативному расщеплению [163,164]. В более ранних работах каталитическое расщепление апуриновых сайтов в ДНК приписывали препаратам эндонуклеазы II *E. coli* [165], однако фракция, содержащая фермент, также проявляла другие активности, и первое свидетельство о наличии у *E. coli* эндонуклеазы, специфичной по отношению к AP-сайтам, было получено Verly и коллегами [164,166]. Им удалось продемонстрировать, что выделенный ими фермент не только расщеплял ДНК в местах локализации AP-сайтов, но также не был активен по отношению к неповрежденной или алкилированной ДНК. Экзонуклеаза III (Xth) *E. coli*, отвечающая за большую долю расщепления AP-сайтов в ДНК, впоследствии была очищена до гомогенности и, как было показано, представляет собой мономерный белок с молекулярной массой около 30 – 32 кДа [167]. Оптимальный pH для работы этого фермента составляет 8,0 - 8,5; активность фермента сильно зависит от температуры (время полуинактивации при 45°C составляет всего около двух минут), концентрации Mg^{2+} и ингибируется ЭДТА [161]. Этот относительно небольшой фермент обладает как минимум четырьмя активностями: 3'-5'-экзонуклеазной активностью на д.ц. ДНК, AP-эндонуклеазной, РНКазной и 3'-фосфатазной активностями. ДНК-экзонуклеазная активность непротективна, и фермент часто диссоциирует из комплекса с субстратом в процессе расщепления [67,168]. Также было показано, что Xth проявляет активность по отношению к уридину, расщепляя ДНК с 5'-стороны от повреждения [169]. Нокаутные по гену *xth* клетки *E.coli* обладают высокой чувствительностью к воздействию пероксида водорода [170].

Кристаллическая структура Xth была расшифрована Mol и коллегами, и они показали, что фермент представляет собой компактный глобулярный белок, состоящий из двух β -листов, окруженных четырьмя α -спиралями, вместе формирующими четырехслойный $\alpha\beta$ -сэндвич (рисунок 4А). Активный центр фермента расположен между двумя β -листами и сформирован аминокислотными остатками Gln112, Asn153, Tyr109, Asn7, His259 и Trp212 (рисунок 4Б).

Единственный двухвалентный ион металла в активном центре координирован, предположительно, аминокислотным остатком Glu34 [171].

А



Б

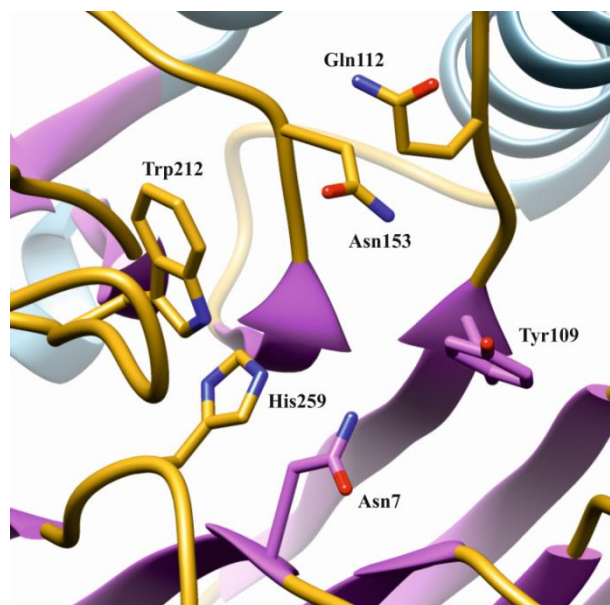


Рисунок 4. (А) Структура фермента Xth *E. coli*. В структуре выделены α -спирали (голубой), β -цепи (сиреневый) и неструктурированные петлевые участки (желтый). (Б) Аминокислотные остатки, формирующие активный центр фермента Xth. (PDB ID: 1AKO)

1.2.1.2. AP-эндонуклеаза человека hAPE1

Фермент hAPE1 человека является гомологом Xth *E. coli* [132,172] и в литературе также известен как HAP1 [9], REF1 [173], и APEX [174]. hAPE1 представляет собой чрезвычайно многофункциональный фермент, обладающий наряду с AP-эндонуклеазной, также 3'-5'-экзонуклеазной, 3'-фосфатазной, 3'-фосфодиэстеразной, NIR и РНКазной активностями [9]. Однако, в отличие от Xth, AP-эндонуклеазная активность hAPE1 гораздо более ярко выражена по сравнению с остальными типами активности [175]. Более 95% AP-эндонуклеазной активности в экстрактах клеток HeLa приписывается именно hAPE1 [176]. Будучи основной клеточной AP-эндонуклеазой, hAPE1 играет ключевую роль не только в репарации многих повреждений ДНК, но и в качестве redox-стимулятора связывающей активности множества транскрипционных факторов, в том числе p53, ядерного фактора каппа-В (nuclear factor-каппа В, NF- κ B), белка реакции раннего роста 1 (early growth response protein-1, Egr-1) и индуцируемого гипоксией фактора (hypoxia-inducible factor, Hif-1 α) [9]. Фермент hAPE1 также

способен сам выполнять функцию транскрипционного фактора и связываться с промоторами, содержащими элементы негативного Ca^{2+} -зависимого ответа [177,178]. Снижение экспрессии гена, кодирующего hAPE1, в нескольких типах клеток человека приводило к остановке пролиферации, накоплению AP-сайтов в ДНК и гибели клеток через апоптоз [179]. Эмбриональная летальность клеток млекопитающих, у которых отсутствует APE1, также подчеркивает чрезвычайное биологическое значение этого фермента [78].

1.2.1.2.1. AP-эндонуклеазная активность hAPE1

Эксперименты с привлечением рентгеноструктурного анализа и сайт-направленного мутагенеза показали, что фермент hAPE1 состоит из высококонсервативной у эукариот и прокариот жесткой глобулярной нуклеазной части, в которую входят два домена (домен 1: 44–136 и 295–318 аминокислотные остатки; домен 2: 137–206 и 282–294 аминокислотные остатки), и характерной для эукариот N-концевой неструктурированной части (1–44 аминокислотные остатки) (рисунок 5) [130,180–183]. N-концевой фрагмент, принимающий участие в redox-активности hAPE1 и опосредующий альтернативные функции этого фермента, не связанные с репарацией, включает первые 127 аминокислотных остатков, в то время как C-концевой домен (61–318 аминокислотные остатки) отвечает за связывание с ДНК и осуществление AP-эндонуклеазной активности. Эндонуклеазный домен hAPE1 принадлежит к фосфоэстеразному суперсемейству ферментов. Ферменты этого суперсемейства состоят из общего для всех структурного ядра, уложенного в четырехслойный α/β сэндвич, и различных петлевых участков, и обладают различными характеристиками активных сайтов для обеспечения субстратной специфичности. ДНК связывается непосредственно нуклеазным доменом, и затем он скользит вдоль связанной цепи в поисках AP-сайта, который осуществляется главным образом через взаимодействие с сахарофосфатным остовом [184,185].

Расшифровка кристаллических структур комплекса hAPE1 с ДНК-продуктом, содержащим тетрагидрофуран (F-сайт, аналог AP-сайта) (рисунок 6), показала, что hAPE1 выворачивает AP-сайт из двойной спирали ДНК и размещает его в кармане активного центра фермента, при этом изгибая ДНК на 35° [181]. Для описания процесса изгибания ДНК ферментом существует термин «скульптурирование ДНК». hAPE1 скульптурирует ДНК для того, чтобы обеспечить правильное размещение поврежденного участка в активном центре фермента для дальнейшего расщепления [186].

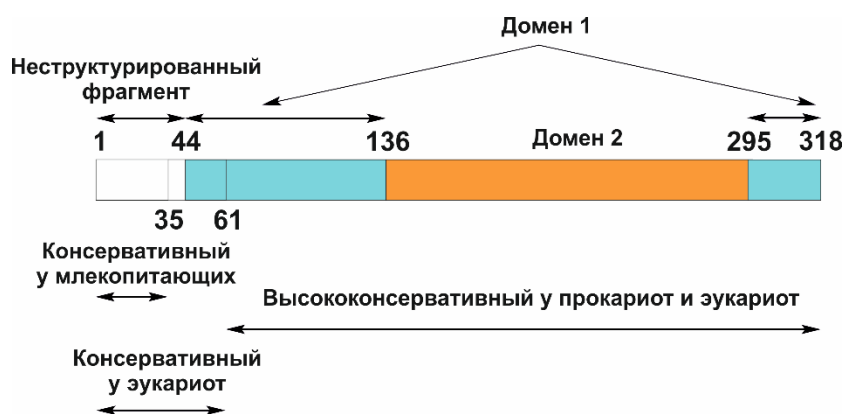


Рисунок 5. Схематичное изображение структурных доменов и консервативных областей фермента hAPE1. Белок состоит из двух структурных доменов; первые 35 аминокислотных остатков, принадлежащих неструктурированному фрагменту высококонсервативны у млекопитающих. Высококонсервативная последовательность 62-318 аминокислотных остатков отвечает в том числе за AP-эндонуклеазную активность фермента [183].

Специфическое связывание hAPE1 с вывернутым AP-сайтом в том числе обеспечивается наличием гидрофобного кармана, сформированного аминокислотными остатками Phe266, Trp280 и Leu282. Тесные контакты, которые они формируют с гидрофобной частью 2'-дезоксирибозы AP-сайта, практически исключают связывание неповрежденного нуклеотида в активном центре фермента. Стабилизация изогнутой структуры ДНК обеспечивается формированием контактов с аминокислотными остатками из четырех петель и α -спирали фермента. В процессе связывания ДНК-субстрата три аминокислотных остатка hAPE1 (Arg73, Ala74 и Lys78) формируют контакты с тремя последовательными фосфатами противоположной цепи с 5'-стороны от AP-сайта, а Tyr128 и Gly127 внедряются в малую бороздку ДНК, расширяя ее. Стабилизацию вывернутой конформации обеспечивают аминокислотные остатки Arg177 и Met270, входящие в петлевые участки α_5 (аминокислотные остатки 176–181) и α_{11} (267–277), которые интегрируются в большую и малую бороздки ДНК, соответственно, чтобы сформировать дополнительные стэкинговые взаимодействия [130,181,182].

Интересно отметить, что, согласно данным недавних исследований, позиционирование и функции интеркалирующей петли α_{11} возможно обеспечиваются не аминокислотным остатком Met270, как считалось до сих пор, но соседним с ним Tyr269 [186]. Кроме того, эксперименты с привлечением методов предстационарной кинетики и сайт-направленного мутагенеза, также не показали критической роли Met270 в связывании и каталитическом расщеплении AP-содержащей ДНК [187].

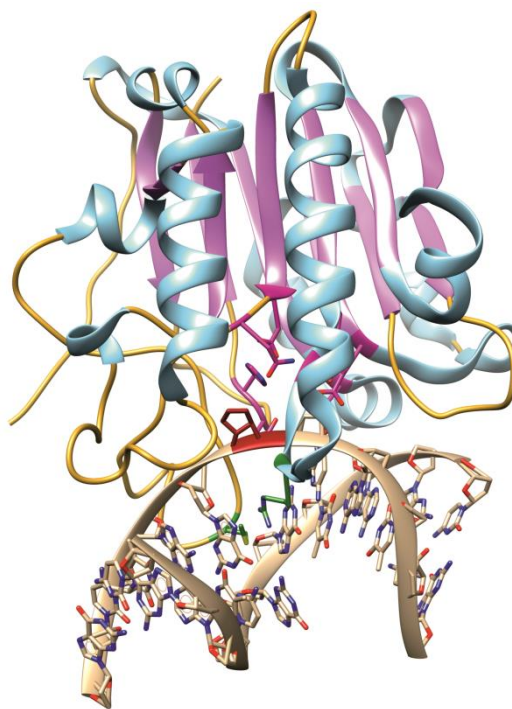


Рисунок 6. Структура фермента hAPE1 человека в комплексе с AP-содержащей ДНК. В структуре выделены α -спирали (фиолетовый), β -цепи (бирюзовый), неструктурированные петлевые участки (желтый) и аминокислотные остатки активного центра фермента (PDB ID: 1DE8).

Два других петлевых участка также взаимодействуют с ДНК с 5'- и 3'-стороны от AP-сайта, обеспечивая образование стабильного комплекса hAPE1 с ДНК. При этом hAPE1 одновременно взаимодействует примерно с 9-10 нуклеотидами ДНК, которые формируют посадочный сайт фермента [188]. Аминокислотные остатки Asn174, Asn212 и His309 координируют фосфат, расположенный с 5'-стороны от AP-сайта, в результате чего формируется каталитически-компетентный комплекс фермента с субстратом [189]. AP-сайт располагается в позиции, оптимальной для расщепления 5'-фосфатной связи, а напротив повреждения возникает неспаренное основание [130]. В организации активного центра фермента участвуют аминокислотные остатки Asp308, His309, Glu96, Asp210, Tyr171, Asn212, и Asn174 [190] (рисунок 7).

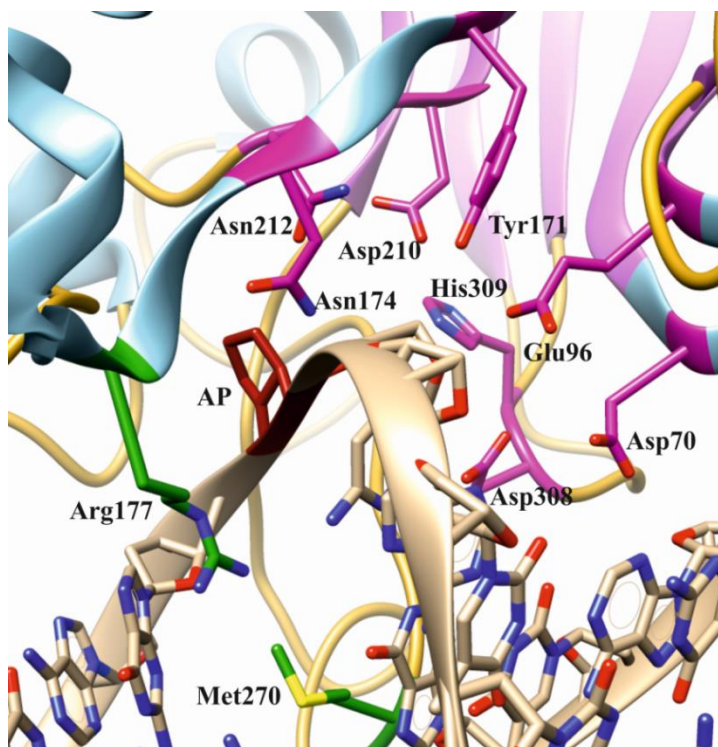
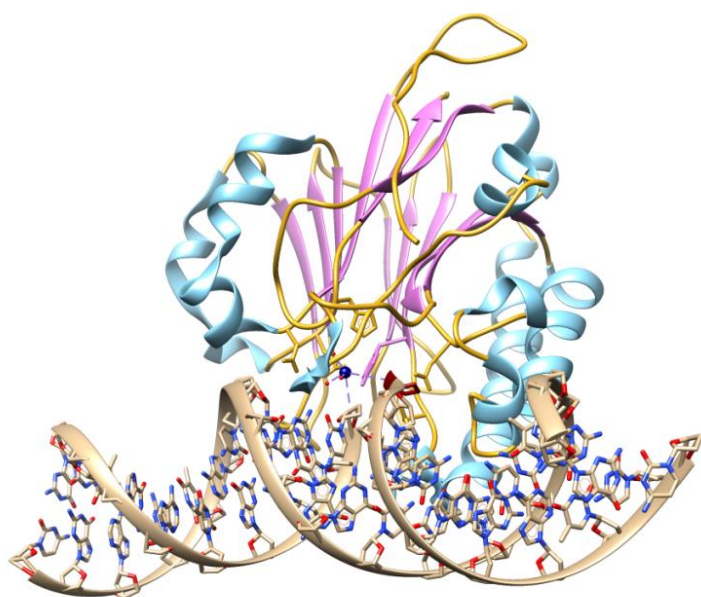


Рисунок 7. Структура фермента hAPE1 человека в комплексе с AP-содержащей ДНК. В структуре выделены AP-сайт (красный), аминокислотные остатки активного центра фермента (пурпурный), а также аминокислотные остатки, стабилизирующие вывернутую конформацию AP-сайта (зеленый) (PDB ID: 1DE8).

Для расщепления ДНК, катализируемого ферментом hAPE1, требуется двухвалентный катион металла [191–194]. Рентгеноструктурный анализ кристаллических комплексов hAPE1 с расщепленной ДНК (рисунок 8А), содержащей F-сайт, а также эксперименты с привлечением сайт-направленного мутагенеза позволили предположить, что двухвалентный катион металла координирован аминокислотными остатками активного центра фермента Asp70 и Glu96, а также молекулой воды, которая формирует контакт с немостиковым кислородом электрофильного фосфата [181,184,192,193,195]. Через эти взаимодействия ион металла способствует правильной ориентации сахарофосфатного остова ДНК и стабилизирует ее в этом положении, а также участвует в поляризации связи Р-О для обеспечения нуклеофильной атаки. Дополнительная молекула воды, координированная аминокислотными остатками Asn212 и Asp210, находится в позиции для прямой нуклеофильной атаки фосфата. Этой атаке способствует нейтрализация заряда, обеспечиваемая двумя водородными связями, формируемыми между аминокислотными остатками Tyr171 и His309 и немостиковыми атомами кислорода фосфата [196]. Возникающий в результате пентаковалентный интермедиат стабилизирован взаимодействием с катионом Me^{2+} и ключевыми аминокислотными остатками

активного центра фермента Tyr171, His309, Asp210 и Asn212. В процессе катализа ион металла смещается, координируя немостиновый кислород фосфата и 3'-гидроксильную уходящую группу [197]. В ходе расщепления, или сразу же после него, нуклеофильная молекула воды отдает протон аминокислотному остатку Asp210 и впоследствии высвобождается из комплекса. В комплексе с продуктом реакции сформированные 5'-dRp и 3'-ОН координированы ионом Mg^{2+} и остатками Asn174, Asp70, Glu96, His309, Tyr171 и Asn212 (рисунок 8Б). В формировании комплекса фермента с продуктом реакции также играет роль аминокислотный остаток Arg181. В более ранних работах было показано, что в комплексе с ДНК и в свободной форме фермента остаток Arg181 находится на расстоянии водородной связи от остатка Glu154 [130,198]. Позднее было показано, что Arg181 значительно меняет свое положение в комплексе фермента с продуктом реакции, чтобы обеспечить дополнительную стабилизацию комплекса после катализа [181]. Описанный механизм каталитического расщепления (рисунок 9) является одной из существующих версий, и на данный момент нет окончательного консенсуса касательно его деталей.

А



Б

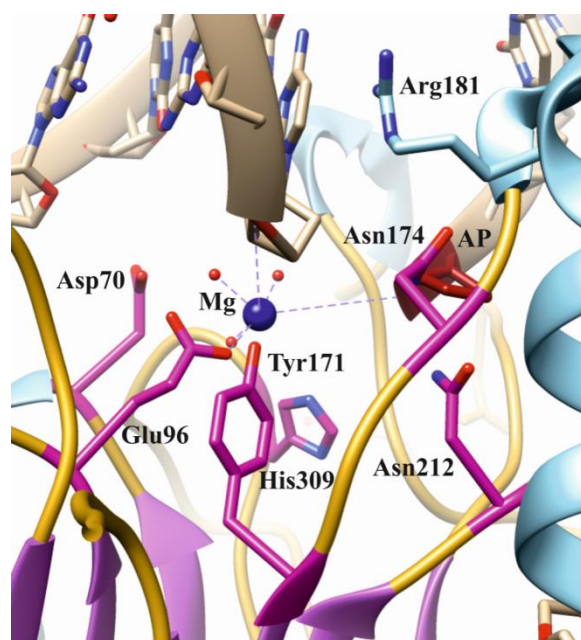


Рисунок 8. Структура мутантной формы Asp148Glu фермента hAPE1 человека с продуктом AP-эндонуклеазной реакции. (А) В структуре выделены α -спирали (голубой), β -цепи (сиреневый) и неструктурированные петлевые участки (желтый), ион Mg^{2+} (синий) и аминокислотные остатки, участвующие в стабилизации комплекса фермент-продукт. (Б) Показаны ион Mg^{2+} (синий) и аминокислотные остатки, участвующие в стабилизации комплекса фермент-продукт. PDB ID: 6W0Q.

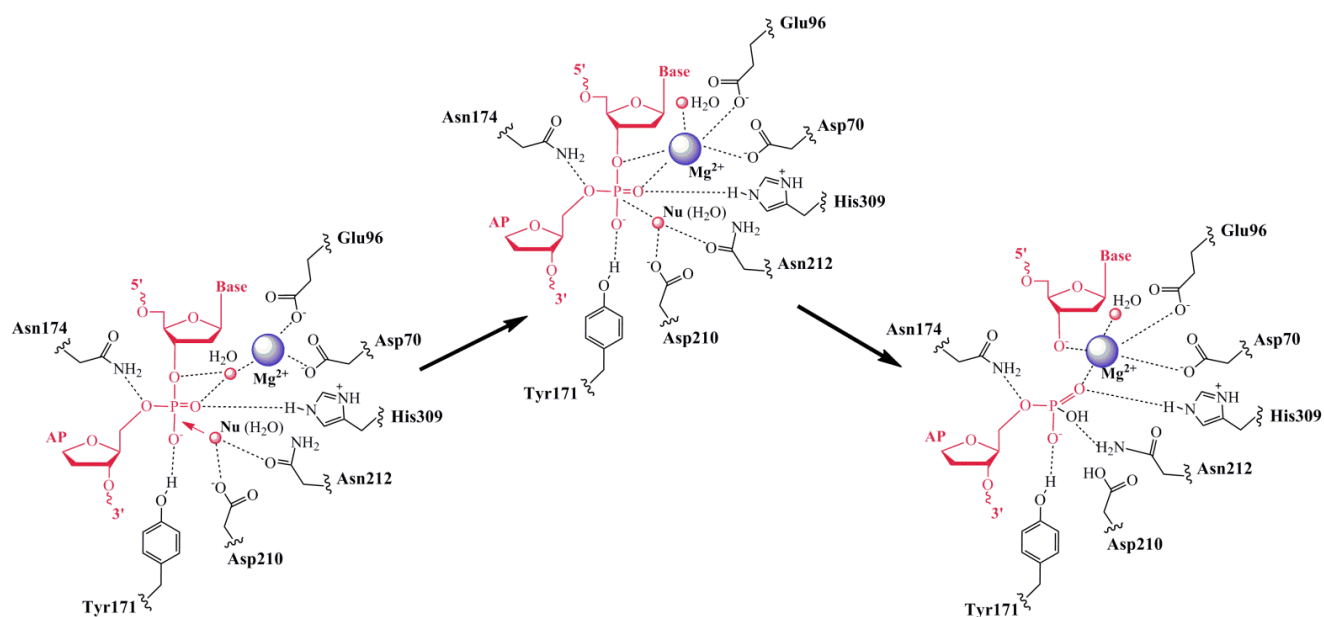


Рисунок 9. Каталитический механизм реакции hAPE1 человека с AP-содержащей ДНК [184].

В качестве двухзарядного катиона металла для обеспечения AP-эндонуклеазной активности hAPE1 наиболее оптимальным считается ион Mg^{2+} . С помощью метода «остановленного потока» было показано, что именно ион Mg^{2+} стабилизирует сформировавшийся фермент-субстратный комплекс и оказывает влияние на каталитическую активность фермента. В присутствии других двухзарядных ионов металлов скорость расщепления ДНК, катализируемая hAPE1, снижалась в порядке $Mg^{2+} > Mn^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+}$. Ионы Cu^{2+} полностью ингибировали активность hAPE1 на AP-содержащей ДНК, что может быть следствием прочного связывания Cu^{2+} с остатками оснований ДНК и сахарофосфатным остовом. В случае с Ca^{2+} каталитическая активность фермента также была нарушена, кроме того, в присутствии этого катиона способность hAPE1 связываться с ДНК также снижалась, возможно, ввиду значительного ионного радиуса. Снижение активности hAPE1 в присутствии Mn^{2+} , Ni^{2+} и Zn^{2+} , по сравнению с Mg^{2+} , также может быть связано с некорректным расположением этих более крупных катионов в активном центре фермента и нарушенной в связи с этим ориентацией расщепляемой цепи ДНК [199]. Более того, эксперименты с использованием кругового дихроизма (CD) показали, что эти ионы металлов действительно индуцируют структурные изменения фермента [200]. Существуют также версии, согласно которым для осуществления AP-эндонуклеазной активности hAPE1 требуется наличие не одного, а двух ионов металла в активном центре фермента [201]. На основании данных

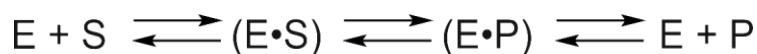
компьютерной молекулярной динамики было сделано предположение о том, что в процессе катализа один ион Mg^{2+} перемещается между двумя сайтами связывания металла [202]. И, несмотря на то, что в дальнейшем было предпринято множество экспериментальных и теоретических исследований, призванных разрешить этот вопрос, точное положение и количество ионов Mg^{2+} , связанных с ферментом, остается предметом споров [189,197,198,203–206].

Исследования с привлечением методов сайт-направленного мутагенеза позволили более подробно охарактеризовать роль аминокислотных остатков во взаимодействии с ДНК в процессе расщепления AP-сайта, в координации Mg^{2+} и субстратной специфичности hAPE1. Замены His309 на другие аминокислотные остатки показали, что этот аминокислотный остаток оказывает влияние и на связывание с ДНК-субстратом, и на скорость расщепления AP-сайта [175]. Кроме того, замена His309Asn приводила к резкому снижению эндонуклеазной и 3'-5'-экзонуклеазной активностей [11]. Точечные замены Asp210 на другие аминокислоты, хотя и приводили к улучшению связывания с субстратом по данным некоторых исследований, однако достоверно снижали скорость процессирования AP-сайта [175,193]. Интересно, что сайт-направленный мутагенез также показал, что замены Asp210 значительно снижают и 3'-5'-экзонуклеазную активность фермента [11]. Мутации Glu96 значительно снижают 3'-5'-экзонуклеазную и эндонуклеазную активности hAPE1. При этом замена на аланин приводила к гораздо более выраженному снижению 3'-5'-экзонуклеазной активности, чем замена на глутамин, что указывает на то, что карбоксильная группа Glu96 может иметь решающее значение для обеих активностей фермента [11]. Замены Asn212, в свою очередь, приводили к значительному снижению эффективности расщепления AP-сайта: в 550 раз при замене на аспарагиновую кислоту и в 70 тыс. раз при замене на аланин. При этом способность мутантных форм фермента связывать AP-содержащую ДНК оставалась на уровне, сопоставимом с ферментом дикого типа. Данный результат подчеркивает важность Asn212 для каталитического расщепления AP-сайта, но также указывает на его некритичное значение для процессов связывания и узнавания субстрата [207]. В более ранних исследованиях также было показано, что замена Asn212 приводит к значительному снижению каталитической активности hAPE1 [208]. Также было показано, что Tyr128 и Tyr269, которые взаимодействуют с ДНК по обе стороны от AP-сайта, вовлечены в процесс распознавания и связывания с AP-содержащей ДНК. Tyr171 непосредственно вовлечен не только в процесс связывания ДНК, но и в катализ. Замены

Tyr171 приводили к значительному (в 5000–50000 раз, по данным разных исследований) снижению каталитической активности hAPE1 [193,209]. Важная роль гидрофобного кармана, сформированного аминокислотными остатками Phe266, Trp280 и Leu282, в AP-эндонуклеазной активности APE1 была также показана с помощью сайт-направленного мутагенеза. Мутанты hAPE1, содержащие замены этих аминокислот, показывали снижение активности по отношению к AP-сайту до 450 тысяч раз, в то время как введение такого гидрофобного кармана в hAPE2, гомолога hAPE1, обладающего гораздо менее выраженной AP-эндонуклеазной активностью [210], приводило к росту этой активности у фермента [211].

Впервые исследования расщепления ДНК, содержащей F-сайт в качестве аналога AP-сайта, осуществляемого hAPE1, с привлечением методов предстационарной кинетики были проведены Maher и Bloom [175]. В данной работе был использован метод «прерывания реакции» (quenched-flow), принцип которого заключается в быстром смешивании фермента и субстрата и последующей быстрой остановке реакции добавлением к раствору останавливающих реакцию веществ («гасителей» реакции). Было показано, что в условиях одного оборота фермента каталитическая стадия ферментативного процесса протекает быстро, и скорость расщепления лимитирована скоростью диффузии фермента к ДНК. При этом стационарная скорость накопления продукта реакции значительно ниже, как минимум на два порядка, и лимитирована медленной диссоциацией комплекса фермента с продуктом [175,199]. Быстрый катализ чрезвычайно важен для геномной стабильности, с учетом большого количества регулярно возникающих AP-сайтов, в то время как медленное каталитическое расщепление могло бы приводить к накоплению цитотоксических интермедиатов BER [78]. Минимальный кинетический механизм, предложенный для описания каталитического расщепления AP-сайта hAPE1, представлен на схеме 1.

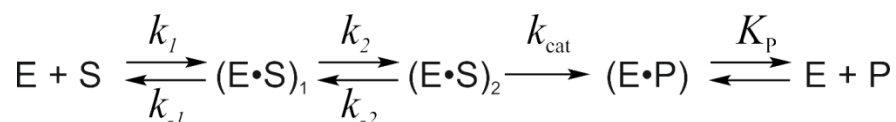
Схема 1. Минимальный кинетический механизм, описывающий реакцию hAPE1 с ДНК, содержащей AP-сайт, предложенный Maher и Bloom [175].



где E – фермент, S – ДНК-субстрат, (E·S) – фермент-субстратный комплекс, (E·P) – комплекс фермента с продуктом реакции, P – продукт реакции.

Однако в работе [175] было высказано предположение, что реальный механизм взаимодействия hAPE1 с ДНК субстратом, содержащим, AP-сайт, содержит как минимум еще одну стадию. Привлечение метода «остановленного потока» в дальнейших работах позволило изучить каталитический механизм с участием hAPE1 более детально. На основании полученных данных был предложен механизм, содержащий четыре стадии (схема 2): две обратимые стадии связывания ДНК-субстрата и узнавания AP-сайта, в результате которых формируется каталитически компетентный комплекс, стадию необратимого каталитического гидролиза фосфодиэфирной связи ДНК с 5'-стороны от AP-сайта и медленную стадию диссоциации комплекса фермента с продуктом [212,213].

Схема 2. Минимальный кинетический механизм, описывающий реакцию hAPE1 с ДНК, содержащей AP-сайт, предложенный Тимофеевой и коллегами [212].



где E – фермент, S – ДНК-субстрат, $(E \cdot S)_i$ – формы фермент-субстратного комплекса, $(E \cdot P)$ – комплекс фермента с продуктом реакции, P – продукт реакции.

Эксперименты с привлечением метода «прерывания реакции» также показали, что существует небольшая разница между скоростью расщепления натурального AP-сайта и F-сайта: тетрагидрофурановый аналог расщепляется примерно в 1,5 раза медленнее. Ключевое различие в структуре между этими повреждениями – отсутствие у F-сайта атома кислорода на C1'. В активном центре фермента hAPE1 образуется обширная сеть водородных связей, которая способствует активации молекулы воды, выступающей в качестве нуклеофила для осуществления каталитического расщепления цепи ДНК [182,214]. А в случае тетрагидрофурана формирование водородной связи с атомом кислорода в положении C1' невозможно. И хотя это различие не принципиально для осуществления ферментом каталитической активности, оно может играть определенную роль в стабилизации и оптимальной ориентации повреждения внутри активного центра фермента [199,215].

1.2.1.2.2. 3'-5'-экзонуклеазная активность hAPE1

hAPE1 человека, как и Xth, обладает 3'-5'-экзонуклеазной активностью [216]. Ферменты способны удалять 3'-концевые нуклеотиды, включающие как природные, так и поврежденные основания ДНК, 3'-концевые терапевтические аналоги нуклеозидов, блокирующие концевые группы и неправильно спаренные основания [11,12,217,218]. Оптимум pH и концентрации солей, в частности, Mg^{2+} , заметно отличаются для AP-эндонуклеазной и 3'-5'-экзонуклеазной активностей hAPE1, именно поэтому до сих пор остается неясным, каким образом осуществляется одновременная реализация этих двух функций в клетке [11]. Было показано, что 3'-5'-экзонуклеазная активность hAPE1 человека является низкопроцессивной и как минимум в 100 раз ниже, чем AP-эндонуклеазная активность этого фермента [11,219–222]. Этот факт часто используется как аргумент к тому, что 3'-5'-экзонуклеазная активность hAPE1 не является биологически релевантной. Однако в литературе на эту тему нет единого мнения. Whitaker и Freudenthal в своем обзоре [184] указывают на то, что эффективность 3'-5'-экзонуклеазной активности стоит сравнивать не с AP-эндонуклеазной активностью фермента, а с активностью других ферментов репарации, процессирующих различные химические группировки на концах ДНК. Так, 3'-5'-экзонуклеазная активность hAPE1 оказалась сравнима по своей скорости с активностями ферментов hAPE2, тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (TDG1), полинуклеотидкиназы (PNK) и т.д. [184].

При воссоздании процесса BER *in vitro* было показано, что восстановление расщепленной ДНК, содержащей неправильно спаренное основание, зависит от присутствия hAPE1. Это говорит о возможной роли этого фермента в точности процесса BER и непосредственно в репарации неправильно спаренных оснований на 3'-конце [217]. В некоторых работах также было показано, что 3'-5'-экзонуклеазная активность hAPE1 по отношению к неправильно спаренным нуклеотидам на 3'-конце значительно выше, чем к нуклеотидам, формирующим классические Уотсон-Криковские пары с основанием в комплементарной цепи [11,211,217]. На основании этих данных и с учетом того, что hAPE1 формирует комплекс с Pol β [133], был предложен механизм, согласно которому 3'-5'-экзонуклеазная активность hAPE1 выступает в качестве корректора для Pol β в ходе BER, повышая точность репаративного синтеза [184]. 3'-5'-Экзонуклеазная активность hAPE1 также участвует в «зачистке» 3'-концов ДНК, удаляя такие группы как 3'-фосфаты, эфиры 3'-

фосфогликолятов и 3'-концевые фрагменты 2'-дезоксирибозы [172,216,223]. 3'-Заместители блокируют репликацию и репарацию ДНК, и поэтому должны быть удалены для последующего синтеза, осуществляемого ДНК-полимеразами. Такие повреждения возникают в результате действия гидроксильных радикалов на сахарофосфатный остов ДНК [224] или в качестве промежуточных продуктов в процессе репарации ДНК [225]. Также было показано, что hAPE1 может удалять 8-охоG с 3'-стороны расщепленных ДНК субстратов *in vitro* [13]. Эксперименты с использованием клеточных экстрактов подтверждают роль hAPE1 в удалении 3'-8-охоG в клетке. Интересно отметить, что в этих экспериментах мутация Asp70Ala приводила к увеличению эффективности удаления 3'-блокирующих концевых фрагментов ферментом hAPE1 [226,227].

Стоит отметить, что hAPE1 также проявляет 3'-5'-экзонуклеазную активность по отношению к таким 3'-концевым аналогам нуклеозидов, как 3'-азидо-3'-дезокситимидин и 2',3'-дидегидро-2'3'-дидезокситимидин, применяемым в антиретровирусной терапии. Эти данные указывают на то, что hAPE1 может оказывать влияние на терапевтический индекс противовирусных соединений этого типа [217].

1.2.1.2.3. 3'-фосфатазная и 3'-фосфодиэстеразная активность hAPE1

В экспериментах с использованием клеточных экстрактов было показано, что именно активность hAPE1 является скоростью-лимитирующей для репарации разрывов цепи ДНК, спровоцированных воздействием пероксида водорода (главным образом, 3'-фосфаты) и блеомицина (3'-фосфогликоляты) [228]. hAPE1 также представляет собой основной фермент для удаления остатков 3'-фосфогликолятов из однонуклеотидных пробелов в ДНК [229]. Биохимические исследования также указывают на важную роль hAPE1 в удалении 3'-блокирующих групп, сформированных в результате удаления AP-сайтов в ходе реакции β-элиминирования, катализируемой некоторыми бифункциональными гликозилазами (например, OGG1 и NTH1). Стоит отметить, что способность hAPE1 удалять 3'-блокирующие группы значительно зависит от вторичной структуры ДНК. Наиболее эффективно hAPE1 удаляет 3'-фосфогликолят из о.ц. разрыва ДНК, то есть в субстратах, с однонуклеотидным пробелом с 3'-стороны от повреждения. Субстраты с «тупыми» концами или со свисающим 5'-концом оказались гораздо менее подходящими для hAPE1. И, наконец, hAPE1 не проявлял 3'-фосфодиэстеразную активность по отношению к ДНК с 3'-свисающим концом [230].

1.2.1.2.4. Инцизионная репарация оснований (NIR)

Помимо вышеперечисленных активностей, фермент hAPE1 также способен гидролизовать д.ц. ДНК с 5'-стороны от некоторых поврежденных нуклеотидов, возникающих, главным образом, в результате воздействия ионизирующего излучения и окислительного стресса, [такие как DHU, 2'-дезоксигидротимидин (DHT), 5hU, α A и α T, рисунок 1], в результате чего формируются 3'-концевая гидроксильная группа и 5'-концевой модифицированный нуклеотид [10]. Поскольку эта активность hAPE1 отличается от AP-эндонуклеазой и 3'-5'-экзонуклеазной реакций, т.к. расщепление цепи ДНК происходит в отсутствие AP-сайта или разрыва в ДНК, этот дополнительный путь репарации, инициируемый hAPE1, был выделен отдельно и назван инцизионной репарацией нуклеотидов. Этот путь репарации, независимый от активности ДНК-гликозилаз, не генерирует токсичных интермедиатов ДНК, возникающих при классической репарации окислительных повреждений ДНК ферментами BER [40]. Литературные данные свидетельствуют, что условия реакции, такие как концентрации солей и pH среды, оказывают значительное влияние на NIR-активность hAPE1, причем оптимальные условия сходны с таковыми для 3'-5'-экзонуклеазной активности. NIR-активность hAPE1 наиболее высока в диапазоне pH от 6,4 до 6,8 и при низких концентрациях Mg^{2+} и K^+ [10]. Замена Lys98 активного центра hAPE1 оказывает влияние не только на AP-эндонуклеазную активность фермента, но и на его NIR-активность, что говорит о вовлеченности единого активного центра фермента в обе эти реакции [231]. Поскольку оптимальные условия реакции сходны для NIR и 3'-5'-экзонуклеазной активности, есть версия, что NIR-активность и 3'-5'-экзонуклеазная активность протекают по сходному механизму [232]. Кроме того, ранее было показано, что hAPE1 отвечает за удаление таких громоздких повреждений ДНК как 3,N⁴-бензэтен-2'-дезоксцитидин (pBQ-dC), 1,N⁶-бензэтен-2'-дезоксиденозин (pBQ-dA) и 1,N²-бензэтен-2'-дезоксигуанозин (pBQ-dG, рисунок 1), которые возникают в результате воздействия п-бензохинона – одного из высокореакционноспособных интермедиатов бензола. Интересно, что молекулярное моделирование дуплекса ДНК, содержащего pBQ-dC, в составе комплекса с hAPE1 показало, что внеспиральный pBQ-dC может быть размещен в активном центре фермента сходным с AP-сайтом образом, посредством специфических структурных изменений ДНК и фермента [233]. Эти данные, в свою очередь, говорят в пользу того, что hAPE1 может осуществлять NIR-активность через механизм,

сходный с AP-эндонуклеазной активностью. Таким образом, на данный момент не существует точной модели того, каким образом hAPE1 связывает и расщепляет ДНК, содержащую поврежденные основания. Кроме того, биологическая роль этой активности не до конца ясна.

1.2.1.2.5. Эндорибонуклеазная активность hAPE1

Также как и Xth, гомологичный ему фермент hAPE1 проявляет активность РНКазы H, хотя и менее выраженную, чем у *E. coli* [16]. Было показано, что hAPE1 способен расщеплять РНК, содержащую AP-сайты, что указывает на возможное участие этого фермента в «контроле качества» РНК, при котором поврежденные РНК-матрицы удаляются для предотвращения ошибочной трансляции [15]. hAPE1 также вовлечен в удаление молекул РНК из ДНК-РНК дуплексов [15] и 3'-фосфатных групп из продуктов распада РНК, обеспечивая их последующее разрушение [184]. Кроме того, существуют данные, согласно которым фермент hAPE1 способен удалять повреждённые рибонуклеотиды, ошибочно встроенные в ДНК. В частности, фермент эффективно удаляет из ДНК рибо-AP-сайт, и проявляет слабую эндорибонуклеазную и 3'-5'-экзонуклеазную активность по отношению к 8-охоG в ДНК [234]. Более того, было показано, что hAPE1 расщепляет *c-myc* мРНК в кодирующей области, что приводит к подавлению экспрессии *c-myc*, напрямую связывая эндорибонуклеазную активность hAPE1 с оборотом мРНК в клетках [16]. В более поздних исследованиях было показано, что расщепление *c-myc* мРНК не является частным случаем, поскольку микро-РНК, CD44 и некоторые компоненты коронавируса SARS также расщепляются hAPE1. При этом расщепление неповрежденных РНК наиболее эффективно осуществляется по фосфодиэфирной связи между динуклеотидами UA, UG и CA в о.ц. участках РНК [235]. Так как последовательности, богатые CA, часто являются сильными энхансерами или сайленсерами сплайсинга [236], hAPE1 может играть роль в сплайсинге некоторых мРНК [178,237].

Любопытно, что для расщепления РНК hAPE1 не требуются ионы двухвалентных металлов, более того, 2 мМ Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , или Co^{2+} ингибируют эндорибонуклеазную активность фермента [235]. Однако для расщепления РНК абсолютно необходима свободная 2'-гидроксильная группа. С помощью сайт-направленного мутагенеза было продемонстрировано, что многие аминокислотные остатки hAPE1, играющие важную роль в осуществлении AP-эндонуклеазной активности, также необходимы и для эффективной эндорибонуклеазной активности фермента. Эти данные также поддерживают модель, согласно которой все

нуклеазные активности hAPE1 реализуются благодаря одному активному центру фермента. Тем не менее, последние данные указывают на то, что при осуществлении эндорибонуклеазной и AP-эндонуклеазной активности hAPE1 использует различные каталитические механизмы. Замены аминокислотных остатков активного центра hAPE1 Asn212, Asp210 и Tyr171 приводят к потере AP-эндонуклеазной и 3'-5'-экзонуклеазной активности, однако эндорибонуклеазная активность у мутантных форм, содержащих эти замены, сохраняется. Также в данной работе было обнаружено, что замены Thr268Asp и Met270Ala приводят к потере специфичности hAPE1 по отношению к контексту расщепляемой РНК, а замены Arg177Phe и Arg181Ala незначительно сказываются на активности фермента. При этом замена Asp308Ala приводит к значительному снижению эндорибонуклеазной активности hAPE1, вследствие потери значимых для катализа контактов с остатком His309 [238].

Ключевой разницей в каталитических механизмах гидролиза фосфодиэфирной связи расщепляемого ДНК- или РНК-субстрата является получаемый в результате продукт: вместо 3'-гидроксильной группы в случае ДНК, при расщеплении РНК hAPE1 оставляет на 3'-конце фосфатную группу [239].

В исследованиях с привлечением в качестве субстратов для hAPE1 РНК-шпилек, содержащих СА или UA динуклеотиды в различных положениях петли или стебля шпильки, и различной длиной петли, было показано, что формирование каталитически компетентного фермент-субстратного комплекса зависит не только от контекста гидролизующей фосфодиэфирной связи, но и от конформационной деформации расщепляемого субстрата. А поскольку одноцепочечный РНК-субстрат расщепляется менее эффективно, чем обладающий шпилечными структурами, д.ц. часть шпильки может оказывать влияние на образование контактов, необходимых для формирования каталитического комплекса между ферментом и субстратом [240].

1.2.1.2.6. Регуляция транскрипции

hAPE1 играет важную роль в регуляции транскрипции посредством стимуляции связывания некоторых транскрипционных факторов через redox-регуляторный механизм [173,241]. Этот фермент принимает участие в регуляции экспрессии некоторых генов человека в условиях окислительного стресса и, по-видимому, задействован в развитии некоторых раковых заболеваний [242]. Интересно, что способность hAPE1 осуществлять одновременно

AP-эндонуклеазную и redox активности, по-видимому, уникальна для млекопитающих. Например, zAPE1 рыбы *Danio rerio* не обладает redox-активностью, хотя в остальном является полноценной AP-эндонуклеазой [243]. Через регуляцию экспрессии ассоциированных с опухолями генов посредством стимуляции ДНК-связывающей активности таких транскрипционных факторов как Egr1, NF-κB, p53, и Hif-1α, hAPE1 может оказывать влияние на начало развития воспалительного и метастатического процессов [241]. Более того, белок hAPE1 оказался вовлечен в химиорезистентность посредством своей способности стимулировать экспрессию гена мультирезистентности MDR1 через взаимодействие с белком, связывающим Y-бокс 1 (Y-box-binding protein 1, YB-1) [244]. В недавно опубликованном исследовании была также предложена роль hAPE1 в эпигенетической регуляции, через redox-модуляцию экспрессии ДНК-метилтрансферазы 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) и последующее подавление экспрессии генов транскрипционных факторов Oct4 и Nanog, регулирующих пролиферацию стволовых клеток и самообновление, через специфическое метилирование промоторов [245]. Кроме того, не так давно была выдвинута гипотеза, согласно которой рибонуклеазная активность hAPE1 играет важную роль в метаболизме РНК в клетке, участвуя в пост-транскрипционном контроле экспрессии генов [242,246–248].

Как уже было упомянуто выше, считается, что за осуществление redox-активности hAPE1 отвечает N-концевой фрагмент фермента, причем 1-61 аминокислотные остатки абсолютно необходимы для стимуляции транскрипционных факторов [146]. Несмотря на то, что hAPE1 можно избирательно лишить redox-регуляторной функции и нуклеазной активности, используя сайт-направленный мутагенез [249,250], точные детали молекулярного механизма, посредством которого осуществляется активация транскрипционных факторов этим ферментом остается неясной [251]. В частности, ни один из остатков цистеина в hAPE1 не входит в мотив C-X-X-C, который является общим для большинства redox-регуляторных факторов, таких как тиоредоксин, клеточный компонент, который, по-видимому, вовлечен в redox-регуляцию hAPE1 через тиол/дисульфидный обмен с ферментом [9,252]. Кроме того, считается, что для реализации redox-активности необходимо формирование дисульфидной связи. И, хотя результаты многих исследований говорят в пользу того, что аминокислотный остаток Cys65 играет основную роль в опосредованной тиолом redox реакции [249,252,253], 3D-локализация остальных шести остатков цистеина hAPE1 не позволяет им сформировать дисульфидную связь с Cys65. По данным Bazlekowa-Karaban с коллегами [146], такая связь возможна между

остатками Cys65 и Cys93, однако, структурные данные указывают на то, что это маловероятно [9]. Также, по некоторым данным, принимать участие в redox функции hAPE1 может остаток Cys99 [254].

Кроме того, существует интересная теория, согласно которой, опосредованная hAPE1 регуляция транскрипционных факторов происходит не за счёт окислительно-восстановительных процессов, но по совершенно иному пути. Недавно группой Сапарбаева было показано, что фермент hAPE1 связывается с ДНК кооперативным способом, формируя структуры, подобные филаментам, что в свою очередь приводит к конформационным изменениям цепи ДНК и увеличению аффинности транскрипционных факторов к определенным участкам ДНК [146].

1.2.1.3. AP-эндонуклеазы структурного семейства Xth из других видов

Гены, кодирующие ферменты APE1 у позвоночных, высококонсервативны, и ген *ape1 D. rerio* (zebrafish, zAPE1) на 67% идентичен гену *hape1* человека [253]. Этот ген кодирует белок с молекулярной массой примерно 35 кДа. Установлено, что zAPE1, также как и hAPE1, обладает AP-эндонуклеазной и слабой 3'-5'-экзонуклеазной активностями [255].

Интересно отметить, что zAPE1, в отличие от фермента человека, не проявляет redox-активности. Это может быть связано с тем, что аминокислотный остаток, соответствующий остатку Cys65 hAPE1, у фермента zAPE1 заменен на остаток Thr58. В пользу этой гипотезы говорит так же тот факт, что мутантная форма zAPE1 с заменой Thr58Cys проявляет эту активность, что, в свою очередь, подтверждает уникальную роль остатка Cys65 hAPE1 в реализации redox-активности данного фермента [253]. В более поздних работах было показано, что zAPE1, тем не менее, принимает активное участие в экспрессии других белков в организме zebrafish через регуляцию работы транскрипционного фактора Creb1. Судя по всему, эта регуляция происходит посредством механизма, ключевую роль в котором играет AP-эндонуклеазная активность zAPE1. Отсутствие этого фермента приводит к Creb1-зависимому снижению экспрессии таких репарационных ферментов как OGG1 и Polβ [256,257]. Также промоторы многих транскрипционных факторов, вовлеченных в развитие мозга, содержат сайты связывания Creb1 [257].

В 1994 Matsumoto и коллегами была изучена активность различных фракций, выделенных из ооцитов *Xenopus laevis*, по отношению к ДНК, содержащей AP-сайт. Одна из

очищенных фракций проявляла AP-эндонуклеазную активность, расщепляя ДНК с 5'-стороны от повреждения и, судя по всему, содержала гомолог hAPE1 [258]. Позднее при секвенировании генома *X. laevis* было показано, что ген, кодирующий гомолог AP-эндонуклеазы 1 человека, действительно есть [259], однако дальнейшие исследования по выделению и изучению данного фермента не проводились.

AP-эндонуклеаза *Drosophila melanogaster* Rrp1 (recombination repair protein 1) также принадлежит к семейству эндонуклеаз Xth [260]. 252 аминокислотных остатка С-концевого фрагмента Rrp1 имеют высокую степень гомологии с Xth и hAPE1, и именно этот домен фермента проявляет AP-эндонуклеазную, 3'-5'-экзонуклеазную, 3'-фосфатазную и 3'-фосфодиэстеразную активности. В то же время N-концевой фрагмент Rrp1, состоящий из 421 аминокислотного остатка, насколько известно, не обладает гомологией ни с каким другим белком и, как было показано в экспериментах *in vitro*, проявляет уникальные характеристики, такие как перенос цепей ДНК и ренатурация одноцепочечной ДНК в гомологичной рекомбинации [261]. Существуют также данные, согласно которым Rrp1 может принимать участие в репарации окислительных повреждений ДНК *in vivo* [262]. Установлено, что 3'-5'-экзонуклеазная активность Rrp1 зависит от контекста и природы удаляемого нуклеотида и более эффективна на участках ДНК, богатых пуринами, чем пиримидинами [263]. Также было показано, что данный фермент оказывает предпочтение неправильно спаренным нуклеотидам на 3'-конце, также как и hAPE1 [264]. Интересно, что на эффективность осуществления 3'-активности Rrp1 сильное влияние оказывает N-концевой домен фермента, в то время как в случае hAPE1 человека такого эффекта не наблюдается [265].

1.2.2. Структурное семейство Nfo

Гомологи эндонуклеазы IV *E. coli* (Nfo) были обнаружены и изучены в нескольких ключевых модельных организмах. У дрожжей *S. cerevisiae* представитель структурного семейства Nfo Apn1 осуществляет большую часть репарации AP-сайтов в клетке, в отличие от клеток человека, в которых ведущую роль играет гомолог Xth hAPE1 [266,267]. APN1 также вносит значительный вклад в AP-эндонуклеазную активность у нематод *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) [268]. У другого вида дрожжей, *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), также присутствует гомолог Nfo, однако он, судя по всему, не является главной AP-эндонуклеазой этого организма, что делает способ репарации AP-сайтов у *S. pombe* сходным скорее с

млекопитающими, нежели с *S. cerevisiae* [269]. Некоторые исследования связывают низкую активность гомолога *Apn1* *S. pombe* с тем, что лабораторный штамм этих дрожжей содержит некодирующую мутацию в гене *apn1* [270]. Представители семейства Nfo также были обнаружены у некоторых рыб (*D. rerio*) и лягушек (*Xenopus tropicalis*), однако на данный момент эти ферменты не были подробно изучены. Гомологи Nfo обнаружены и у некоторых патогенных организмов, таких как *Candida albicans* и *Plasmodium falciparum*, что в перспективе делает этот фермент привлекательной мишенью для антибактериальных, противогрибковых и антималярийных агентов [271]. Интересно, что пока не было обнаружено гомологов Nfo у млекопитающих и насекомых, и репарация AP-сайтов у этих организмов, по-видимому, полностью зависит от членов семейства Xth [161]. Также как и в клетках человека, у *E. coli* основным ферментом, отвечающим за репарацию AP-сайтов, является Xth, однако в условиях стресса бактерии способны привлекать и Nfo [272,273]. На сегодняшний день остается неясным, какое из семейств AP-эндонуклеаз возникло раньше в ходе эволюции, с учетом того, что представителей и Xth и Nfo можно встретить у некоторых видов архей.

Анализ литературных данных показывает, что представители двух семейств имеют совершенно различные, независимо возникшие в ходе эволюции структуры для выполнения одной и той же задачи. В то время как структурное ядро членов семейства Xth представляет собой четырехслойный α/β сэндвич, основу фермента Nfo составляет триозофосфатизомеразная укладка типа «бочонок» (TIM-barrel, triosephosphate isomerase), сформированная восьмью α -спиралями и девятью параллельными β -складками [161]. Тем не менее, ферменты обоих структурных семейств используют увеличенную пластичность двойной спирали в области расположения повреждения, и для обоих характерно внедрение аминокислотных остатков в малую бороздку ДНК. Стоит отметить, что, судя по всему, Nfo, в отличие от hAPE1, претерпевает значительные конформационные изменения в процессе связывания с AP-содержащей ДНК. И hAPE1, и Nfo расщепляют фосфодиэфирную связь ДНК посредством нуклеофильной атаки, но ключевым различием в механизме гидролиза является то, что для катализа ферментам типа Xth требуется ион Mg^{2+} , а ферментам типа Nfo три иона Zn^{2+} [162,199,200,274].

1.2.2.1. Эндонуклеаза IV *E. coli*

Нокаутированные по гену основной клеточной AP-эндонуклеазы варианты *E. coli* тем не менее сохраняют AP-эндонуклеазную активность. Показано, что большая часть этой остаточной активности относится к Nfo. Обнаружены значительные отличия Nfo от Xth. Например, Nfo проявляет высокую стабильность при нагревании и не чувствителен к добавлению в раствор ЭДТА, что свидетельствует о прочном связывании ионов металла в активном центре [275]. Также как hAPE1 и Xth, Nfo является 5'-AP-эндонуклеазой и 3'-репарационной диэстеразой, которая способна удалять 3'-блокирующие повреждения ДНК [276,277]. Nfo вовлечен в путь репарации NIR и способен узнавать в ДНК широкий ряд повреждений, генерируемых в результате окислительного стресса или воздействия ионизирующего излучения, таких как DHU, 5hU, 5hC и α -аномеры 2'-дезоксирибонуклеотидов [38,40,41,278].

Очищенный фермент Nfo обладает также 3'-5'-экзонуклеазной активностью, причем было показано, что эта активность довольно хорошо работает в контексте расщепления AP-сайта и специфична по отношению к «утопленным» 3'-концам [279]. В экспериментах с привлечением сайт-направленного мутагенеза было показано, что NIR-активность и 3'-5'-экзонуклеазная активность Nfo функционально и генетически связаны, и для реализации обоих типов активности фермент использует один и тот же активный центр и механизм катализа [278]. Nfo обладает молекулярной массой 30 – 33 кДа, оптимальный для работы pH лежит в диапазоне 8,0 - 8,5. AP-эндонуклеазная активность не зависит от концентрации ионов Mg^{2+} , однако чувствительна к концентрации NaCl в реакционной смеси [67]. Интересно, что экспрессия Nfo значительно увеличивается в условиях окислительного стресса [273], также как и экспрессия hAPE1 человека [280].

На данный момент Nfo *E. coli* является единственным представителем семейства Endo IV, который был закристиллизован [271,274]. Связывание фермента с ДНК, содержащей AP-сайт, опосредовано пятью петлевыми участками фермента, распознающими ДНК, которые расположены в С-концевом участке фермента. Эти петли формируют поверхность с положительным зарядом, которая хорошо связывается с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом ДНК. Аминокислотные остатки, входящие в состав этих петель, формируют контакты с нуклеотидами на обеих цепях ДНК, непосредственно и через координированные молекулы воды [162]. Рентгеноструктурный анализ показал, что два иона

Zn^{2+} координируют молекулу воды, которая выступает в качестве нуклеофила. Третий ион Zn^{2+} стабилизирует возникающий в результате расщепления 3'-гидроксил (рисунок 10). Замена аминокислотных остатков активного центра, координирующих ион металла, приводит к снижению каталитической активности фермента, что говорит о важной роли всех трех ионов Zn^{2+} в катализе [271].

Как и hAPE1, Nfo выворачивает AP-сайт из двойной спирали ДНК, однако параллельно этот фермент выворачивает и комплементарный нуклеотид (рисунок 11). При этом Nfo изгибает ДНК под гораздо более значительным углом, чем hAPE1 – 90° и 35° соответственно [181,274]. Считается, что повышенная гибкость ДНК в области AP-сайта способствует специфичному узнаванию повреждения и помогает избежать расщепления неповрежденной ДНК [162]. В ходе выворачивания AP-сайта Nfo сам претерпевает конформационные изменения, которые позволяют высококонсервативным аминокислотным остаткам Tyr72 и Arg37 сформировать стэкинг-взаимодействия с соседними основаниями с 5'- и 3'-стороны от AP-сайта, чтобы стабилизировать вывернутую конформацию ДНК [271]. Судя по всему, природа основания, расположенного напротив повреждения, не оказывает влияния на распознавание повреждения, так как фермент не формирует контакты с вывернутым комплементарным основанием. Однако можно предположить, что, вывернутая конформация комплементарного нуклеотида стабилизируется аминокислотным остатком Trp39, атомы азота основной амидной и боковой индольной групп которого формируют контакты с фосфатными группами с двух сторон от основания [162].

Сравнение кристаллических структур фермента Nfo дикого типа с различными мутантными формами в комплексе с ДНК-субстратом или продуктом показало, что координация всех трех ионов металла в активном центре значительно меняется в процессе осуществления каталитической реакции, причем положение третьего иона Zn^{2+} (далее $Zn3$) подвергается наиболее интенсивным изменениям. В структуре фермента, не связанного с ДНК, в координации иона $Zn3$ участвуют два остатка гистидина активного центра фермента His182 и His231, молекула воды и оба атома O карбоксильной группы аминокислотного остатка Asp229 [271]. Моделирование комплекса с субстратом позволило предположить механизм, в ходе которого молекула воды, координированная Glu261, который также координирует второй ион Zn^{2+} в активном центре фермента, будучи между двумя ионами Zn^{2+} , находится в оптимальном положении для инициации каталитической реакции [281].

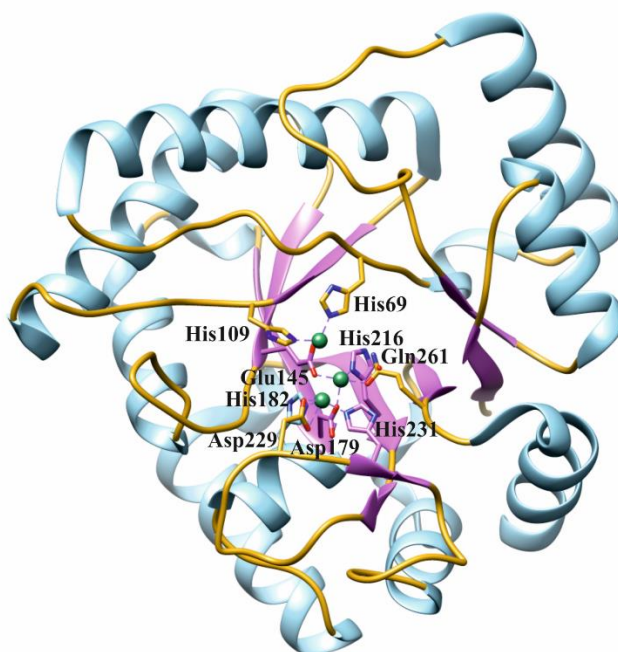


Рисунок 10. Структура мутантной формы Glu261Gln фермента Nfo из *E. coli* (PDB ID: 2NQH). В структуре выделены α -спирали (голубой), β -цепи (сиреневый), неструктурированные участки (желтый), три иона Zn^{2+} (зеленый) и координирующие их аминокислотные остатки His69, His109, Glu145, His182, Asp229, Asp179, His231, His216 и Gln261.

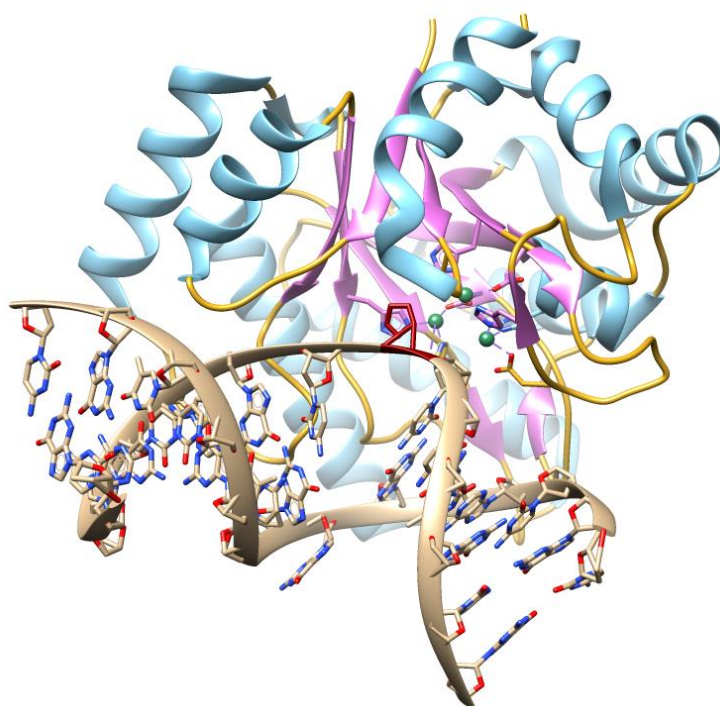


Рисунок 11. Структура мутантной формы Glu261Gln фермента Nfo из *E. coli* в комплексе с поврежденным ДНК-субстратом (PDB ID: 2NQJ). В структуре выделены α -спирали (голубой), β -цепи (сиреневый), неструктурированные участки (желтый), три иона Zn^{2+} (зеленый), аминокислотные остатки, их координирующие и AP-сайт (красный).

Катализ протекает через формирование пентаковалентного переходного комплекса, причем все три иона Zn^{2+} принимают участие в реакции. Расшифровка кристаллических структур показала, что $Zn3$ координирует немостиковый атом кислорода фосфата с 5'-стороны от AP-сайта, а также 3'-О, который превращается в 3'-гидроксильную группу (рисунок 12).

В некоторых исследованиях на основании определенных особенностей позиционирования третьего иона Zn^{2+} в структуре фермента высказывается предположение, что на его месте может быть ион Mn^{2+} . Замена Tyr72 на аланин снижает каталитическую активность фермента, но не мешает связыванию ДНК и выворачиванию AP-сайта. При этом пространство, освобожденное вывернутым повреждением, заполняется четырьмя молекулами воды вместо Tyr72 [271]. Аминокислотный остаток фермента Nfo Glu261, судя по всему, играет важную роль в каталитическом расщеплении ДНК-субстрата, так как замена на глутамин приводит к формированию каталитически неактивной мутантной формы [271].

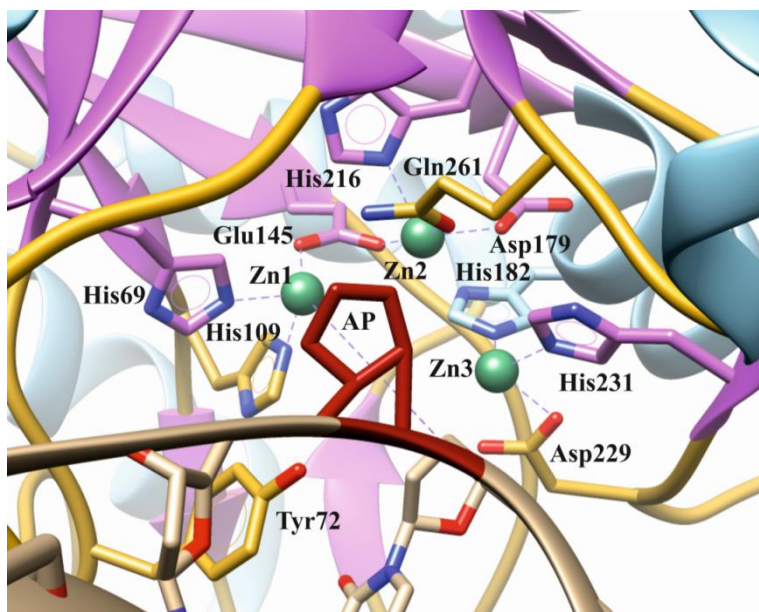


Рисунок 12. Структура мутантной формы Glu261Gln фермента Nfo из *E. coli* в комплексе с поврежденным ДНК-субстратом. Показаны аминокислотные остатки, координирующие ионы Zn^{2+} и принимающие участие в катализе (PDB ID: 2NQJ).

1.2.2.2 Apn1 *S. cerevisiae*

AP-эндонуклеаза дрожжей *S. cerevisiae* Apn1 первоначально была идентифицирована как 3'-фосфодиэстераза [282,283]. Позднее было показано, что фермент Apn1, также как и Nfo, обладает AP-эндонуклеазной активностью, расщепляя ДНК с 5'-стороны от повреждения [161,267], и 3'-диэстеразной активностью, которая направлена на удаление 3'-блокирующих

групп, включая 3'-фосфаты и 3'-фосфогликоляты [282,284]. Кроме того, Arn1 проявляет 3'-5'-экзонуклеазную [285] и NIR-активность по отношению к некоторым окисленным нуклеотидам [10,40]. Члены семейства Nfo имеют несколько высококонсервативных аминокислотных остатков, распределенных по структуре белков [286]. Общий процент гомологии Arn1 *S. cerevisiae* по отношению к Nfo *E. coli* равен 41% [266]. При этом экспрессия Arn1 в клетках *E. coli* с выключенными генами *nfo* и *xth* полностью компенсирует отсутствие собственных AP-эндонуклеаз бактерии [287]. Тем не менее, экспрессия Arn1 в дрожжах не индуцируется в условиях окислительного стресса, в отличие от Nfo [161]. Несмотря на высокий уровень функциональной схожести Arn1 и Nfo, между этими ферментами существуют некоторые уникальные различия, касающиеся роли консервативных аминокислотных остатков активного центра. Так, было показано [288], что замены аминокислотных остатков Glu158 и Asp192 Arn1, соответствующих Glu145 и Asp179 Nfo, входящих в активный центр фермента и координирующих положение трехядерного Zn^{2+} кластера, значительно снижают AP-эндонуклеазную, 3'-фосфодиэстеразную и NIR-активности Arn1. Тем не менее, эти мутантные формы Arn1 не проявляют тех же характеристик, что и соответствующие мутанты *E. coli*. А именно, фермент Arn1, содержащий замену Glu158Gly, все еще способен связывать ДНК, в то время как у мутантной формы Glu145Gly Nfo эта способность утрачена. С другой стороны, мутантная форма Arn1, содержащая замену Asp192Gly, полностью теряет ферментативную активность, однако у соответствующего мутанта Nfo с заменой Asp179Gly активность снижена в 40 раз, но все еще сохраняется [288].

1.3. ДНК-эндонуклеаза EndoQ из *Pyrococcus furiosus*

Среди представителей архей было охарактеризовано несколько членов семейств Xth и Nfo. В *Pyrococcus furiosus* в процессе скрининга генома было найдено два потенциальных гомолога Nfo, однако только один из генов кодировал фермент, способный расщеплять фосфодиэфирную связь в ДНК с 5'-стороны от AP-сайта [289]. В ходе исследований, направленных на изучение роли ДНК-эндонуклеазы Endo V из *P. furiosus*, способной расщеплять фосфодиэфирную связь с 3'-стороны от дезаминированных оснований, таких как Нх и U, был обнаружен новый фермент, расщепляющий фосфодиэфирную связь ДНК с 5'-стороны от Нх. Эта новая эндонуклеаза из *P. furiosus*, которую называли EndoQ, впоследствии была обнаружена еще в нескольких представителях архей, и, судя по всему, не представлена в

большинстве бактерий и эукариотических организмов. Было показано, что кроме активности по отношению к Нх-содержащей ДНК, EndoQ также расщепляет д.ц. и о.ц. ДНК, содержащие U, 5hU, 5hC, DHU, X и AP-сайт [290–292]. При этом эффективность расщепления о.ц. ДНК была заметно ниже, чем д.ц. ДНК; особенно драматическое падение активности на о.ц. участках наблюдалось для AP-сайта [292]. На неповрежденных д.ц. и о.ц. ДНК, а также на ДНК, содержащей мисматч G/T, новый фермент не проявлял никакой активности [290]. Тем не менее, эффективность расщепления поврежденной ДНК увеличивалась в случае, если напротив повреждения находилось неправильно спаренное основание. Также было показано, что EndoQ способна расщеплять ДНК, содержащую рибонуклеотид, в частности, rU [292]. Было показано, что для расщепления Нх-содержащей ДНК ферменту требуется катион двухвалентного металла [290], при этом фермент работал лучше в присутствии ионов Mn^{2+} , чем Mg^{2+} . Оптимальным для активности фермента является pH 9,5, а максимальная эффективность расщепления субстрата достигалась при 75°C [293]. Такая температурная зависимость не удивительна, с учетом того, что *P. furiosus* являются термофильными археями.

Филогенетический анализ показал, что ген, кодирующий гомологи EndoQ, встречается у нескольких представителей архей, а также у небольшого количества бактерий. Судя по всему, этот фермент эволюционировал в домене архей, и то, каким образом он попал в геном некоторых бактерий, пока остается неясным [290]. Тем не менее, гомолог EndoQ, выделенный из бактерий *Bacillus pumilus*, является функционально активным и проявляет сходие с ферментом из *P. furiosus* характеристики [291].

В 2018 году Miyazono с коллегами расшифровали кристаллическую структуру фермента EndoQ из *P. furiosus*, содержащего первые 400 аминокислотных остатков из 424 (рисунок 13). Полноразмерный белок не удалось закристаллизовать, а С-концевой участок с Gly401 по Asn424, как было предположено, неструктурирован. Более того, было показано, что активность полноразмерной и делеционной форм фермента по отношению к Нх- и U-содержащей ДНК практически не отличаются [294].

Недавно также была установлена структура комплексов EndoQ с ДНК, содержащими такие повреждения как U, Нх и AP-сайт [295]. Было показано, что белок EndoQ состоит из N-концевого полимеразного и гистидинол-фосфатазного (Polymerase and Histidinol Phosphatase, РНР) домена (аминокислотные остатки 1-238), содержащего эндонуклеазный активный центр фермента, Zn-связывающего домена (239-303) и С-концевого спирального домена (304-400). В

РНР-домене одиннадцать β -цепей формируют структуру типа «бочонок», окруженную десятью спиралями типа α и η . Zn-связывающий домен состоит из трех β -цепей и трех спиралей (двух α -типа и одной η -типа). С-концевой спиральный домен состоит из кластера спиралей и β -листа [294]. Три структурных домена EndoQ вместе формируют положительно заряженную щель, в которой происходит связывание ДНК (рисунок 14). Каталитический и Zn-связывающий домены образуют множество контактов с расщепляемой цепью ДНК с обеих сторон от повреждения, главным образом со стороны малой бороздки вблизи повреждения, что приводит к ее расширению. В фермент-субстратном комплексе С-концевой домен располагается над большой бороздкой и взаимодействует в основном с отдалённой от повреждения частью нерасщепляемой цепи. Формирование всех контактов между ферментом и ДНК приводит к изгибанию ДНК-дуплекса на 40° . Поврежденный нуклеотид находится на вершине изгиба, при этом он вывернут из двойной спирали и погружен в глубокий карман, сформированный между каталитическим и Zn-связывающим доменами. В области изгиба ДНК стэкинг-взаимодействия между парами оснований, соседними с повреждением, значительно нарушены. Сравнение кристаллических структур EndoQ в свободной форме и в комплексе с ДНК показало, что Zn-связывающий и С-концевой домены согласованно смещаются относительно каталитического домена, поворачиваясь в сторону ДНК и образуя закрытую конформацию [295].

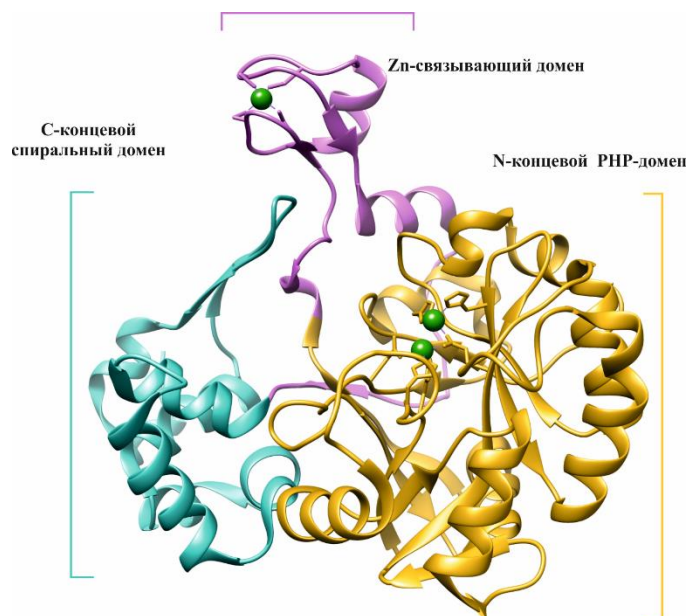


Рисунок 13. Структура EndoQ из *P. furiosus*. В структуре выделены N-концевой РНР-домен (желтый), Zn-связывающий домен (сиреневый) и С-концевой спиральный домен (голубой). Три иона Zn^{2+} показаны как зеленые сферы (PDB ID: 5ZB8).

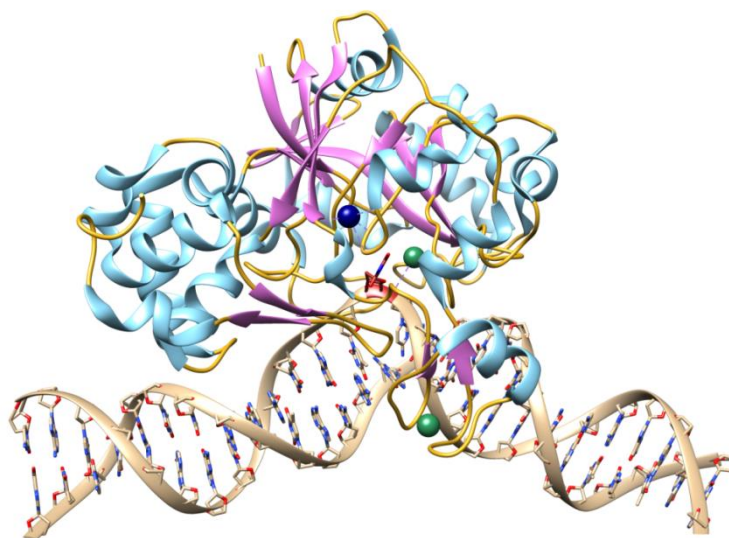
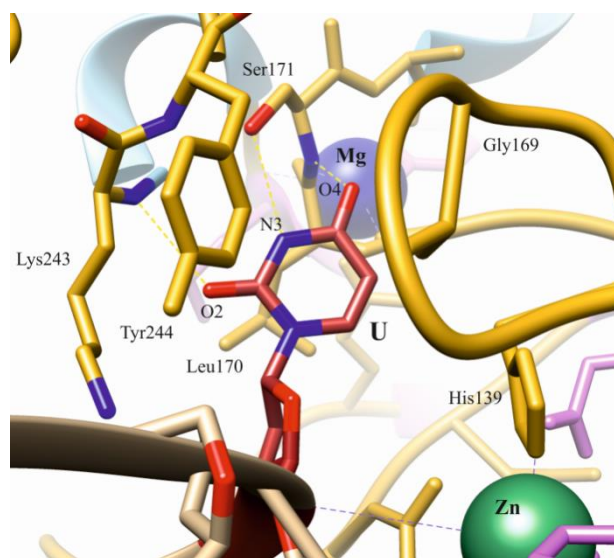


Рисунок 14. Структура EndoQ в комплексе с U-содержащей ДНК. В структуре выделены α -спирали (голубой), β -цепи (сиреневый), неструктурированные петлевые участки (желтый), ион Mg^{2+} (синий) и два иона Zn^{2+} (зеленый). PDB ID: 7K30.

Анализ структурных данных позволяет заключить, что специфическое узнавание U и Hx в активном центре EndoQ проходит через формирование ряда водородных связей в небольшом кармане, который сформирован аминокислотными остатками His139, Thr142, Glu167, Leu170, Asp193, Leu168, Gly169 и Asn191 [294,295]. В случае U образуются специфические контакты между атомом O2 пиримидинового кольца и α -амидной группой Lys243, атомом N3 и гидроксильной группой бокового радикала Ser171 и атомом O4 и α -амидной группой Ser171 (рисунок 15А). Hx также распознается ферментом через формирование трех водородных связей, а именно атом O6 пуринового кольца и атом N1 формируют связи с α -амидной группой и гидроксильной группой бокового радикала Ser171, соответственно, а атом N7 – с α -амидной группой Leu170 (рисунок 15Б). Интересно отметить, что U и Hx по-разному располагаются в кармане фермента. В дополнение к водородным связям, U и Hx окружены аминокислотными остатками His139, Gly169, Leu170, Lys243 и Tyr244, формирующими карман и вступающими в гидрофобные либо Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия с дезаминированными основаниями. Остатки Lys243 и Tyr244 образуют контакты с остовом поврежденной ДНК, и создают одну из «внутренних» поверхностей U/Hx-связывающего кармана [295].

А



Б

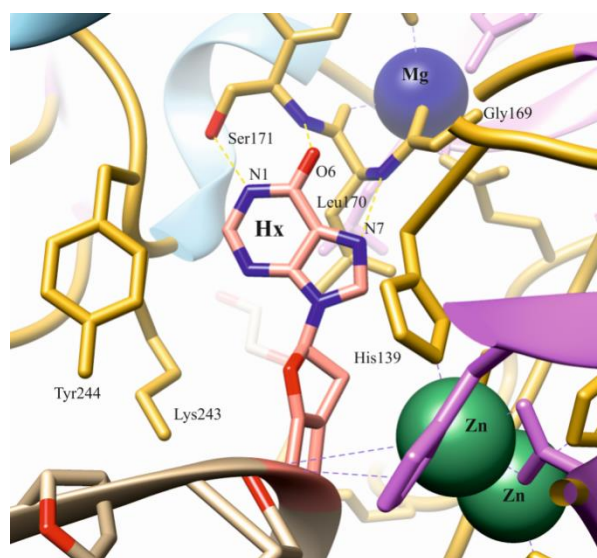


Рисунок 15. Специфическое распознавание дезаминированных оснований ДНК ферментом EndoQ. (А) Аминокислотные остатки, участвующие в формировании кармана и специфическом связывании уридина. Пунктирными линиями показаны водородные связи между аминокислотными остатками Ser171 и Lys243 и U. PDB ID: 7K30. (Б) Аминокислотные остатки, участвующие в формировании кармана и специфическом связывании гипоксантина. Пунктирными линиями показаны водородные связи между аминокислотными остатками Leu170 и Ser171 и Hx. PDB ID: 7K31. Ион Mg^{2+} изображен как синяя сфера, ионы Zn^{2+} - зеленые сферы.

С привлечением методов сайт-направленного мутагенеза было показано, что замены Gly169Ala и Leu170Ala значительно снижали эндонуклеазную активность фермента по отношению к Hx-содержащей ДНК, однако в случае Gly169Ala AP-эндонуклеазная активность фермента оставалась сравнимой с активностью фермента дикого типа, что говорит о возможной роли этого аминокислотного остатка именно в распознавании гипоксантина [294]. Исключительную роль Ser171 в распознавании U и Hx подтверждает то, что замена Ser171Ala приводит к значительному снижению активности EndoQ на ДНК-субстратах, содержащих эти повреждения, но не сказывается так сильно на расщеплении AP-содержащей ДНК [295].

Расщепляемая фосфодиэфирная связь с 5'-стороны от повреждения располагается в активном центре фермента. В комплексе с U-содержащей ДНК единственный катион Zn^{2+} в активном центре координирован аминокислотными остатками Glu76, His84 и His139, а также одним из немостиновых атомов кислорода расщепляемой фосфодиэфирной группы. Другой немостиновый атом кислорода находится в окружении аминокислотных остатков His10, Arg114,

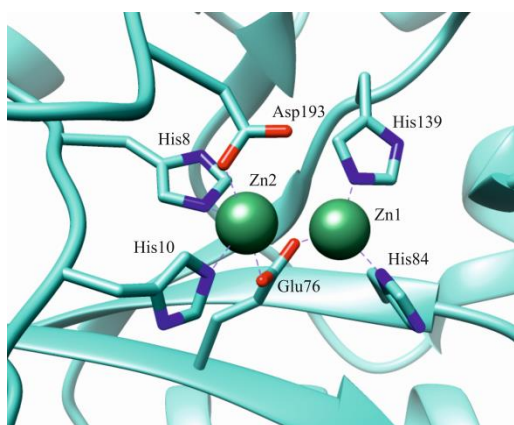
His195 и Asp193 [295]. Интересно, что наличие в структуре активного центра EndoQ второго катиона Zn^{2+} , координированного аминокислотными остатками His8, His10, Glu76 и Asp193, было показано в работе Miyazono с коллегами [294] для свободного фермента (рисунки 16А, Б), однако Shi с коллегами зарегистрировали такой катион только в случае комплекса EndoQ с Hx-содержащей ДНК [295]. В структуре фермента также присутствует третий катион Zn^{2+} (рисунки 16В, Г), связанный аминокислотными остатками Cys249, Cys252, Cys268 и Cys271 Zn-связывающей структуры типа «цинковый палец», сформированной двумя β -цепями белка [294]. Замены аминокислотных остатков His8Ala, His10Ala, Glu76Gln, His84Ala, His139Ala и Asp193Asn приводят к снижению эндонуклеазной активности EndoQ по отношению к Hx-содержащей ДНК, причем мутантные формы Glu76Gln, His84Ala, His139Ala и Asp193Asn практически полностью утрачивают активность. Это говорит о важной роли катионов Zn^{2+} активного центра фермента в катализе [294].

Рядом с U/Hx-распознающим сайтом расположен сайт связывания катиона Mg^{2+} . Координация Mg^{2+} атомами основной цепи аминокислотных остатков Gly169-Ala172 ограничивает возможные конформации для Leu170 и Ser171. Таким образом, Mg^{2+} , судя по всему, играет в том числе структурную роль, обеспечивая правильное расположение аминокислотных остатков, участвующих в распознавании дезаминированных оснований. Кроме того, этот катион также может играть роль в структурных изменениях фермента в процессе катализа [295].

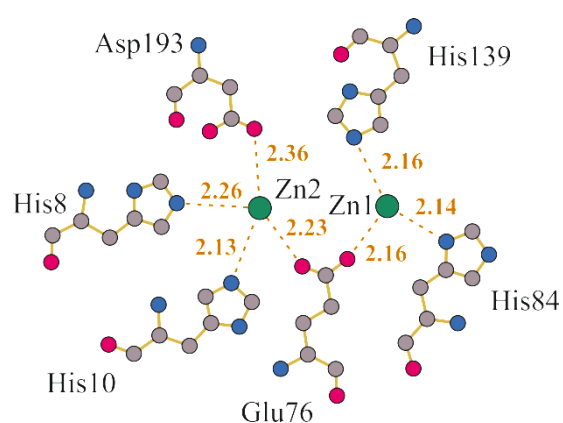
Согласно модели каталитического механизма активности EndoQ, предложенной Shiraishi и Iwai [292], EndoQ выворачивает поврежденное основание из двойной спирали ДНК, после чего оно попадает в активный центр фермента и расположенный рядом распознающий карман, где происходит верификация повреждения на основании образования специфических контактов с аминокислотными остатками активного центра. В данной работе было выдвинуто предположение о том, что в случае оптимального для катализа размещения поврежденного основания, вывернутая конформация стабилизируется внедрением одного из аминокислотных остатков в ДНК на место, освобожденное вывернутым повреждением, по аналогии с механизмами, характерными для AP-эндонуклеаз из структурных семейств Xth и Nfo, а также ряда ДНК-гликозилаз [128,232,274]. На роль такого стабилизирующего аминокислотного остатка в случае EndoQ был предложен Trp144. В пользу этой теории говорит то, что замена Trp144Ala приводит к снижению активности фермента не только по отношению к Hx, но и к

АР-сайту [294]. Однако более поздние структурные исследования не подтвердили это предположение. Судя по всему, в случае EndoQ стабилизация вывернутой конформации происходит не за счет встраивания аминокислотных остатков на место, освобожденное повреждением. Более вероятно, что выворачивание основания и стабилизация этого состояния обеспечиваются широким набором контактов между аминокислотными остатками фермента и остовом ДНК с 5'- и 3'-стороны от повреждения, нарушающим стэкинг соседних пар оснований [295].

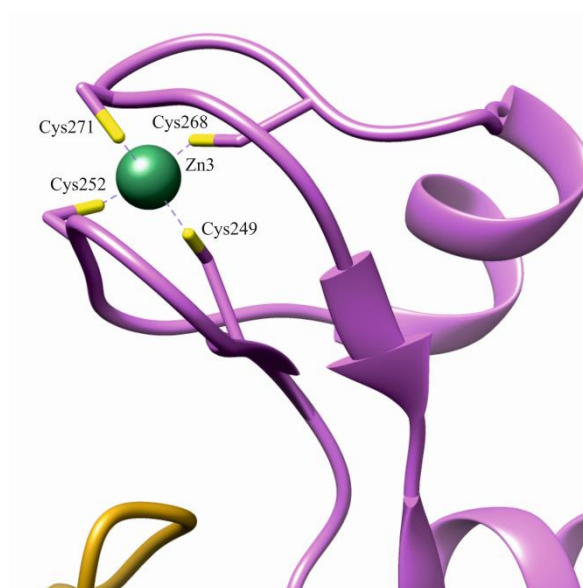
А



Б



В



Г

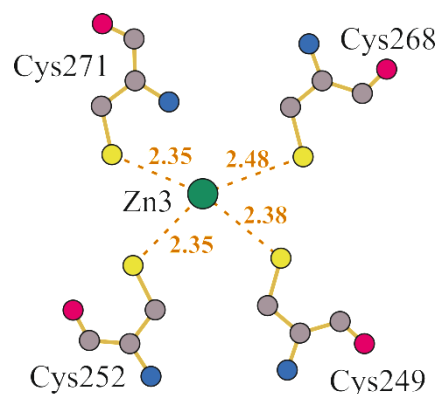


Рисунок 16. Сайты связывания ионов Zn^{2+} в структуре EndoQ. (А) Zn^{2+} -связывающий сайт N-концевого РНР-домена. (Б) Схематическое изображение координации катионов Zn^{2+} аминокислотными остатками РНР-домена. (В) катион Zn^{2+} в Zn^{2+} -связывающем домене. (Г) Схематическое изображение координации катиона Zn^{2+} аминокислотными остатками Zn^{2+} -связывающего домена (PDB ID: 5ZB8).

На основании структурных данных для комплексов EndoQ с поврежденными ДНК-субстратами Shi и коллеги [295] предложили механизм каталитической реакции (рисунок 17). Согласно этому механизму, аминокислотный остаток активного центра фермента Asp193 выступает в роли общего основания в депротонировании молекулы воды для обеспечения нуклеофильной атаки типа S_N2 на расщепляемую фосфодиэфирную связь. Возникающий в результате отрицательно заряженный пятивалентный интермедиат, предположительно, стабилизируется координированным катионом Zn^{2+} и окружающими положительно заряженными аминокислотными остатками, в том числе Arg114 и His195.

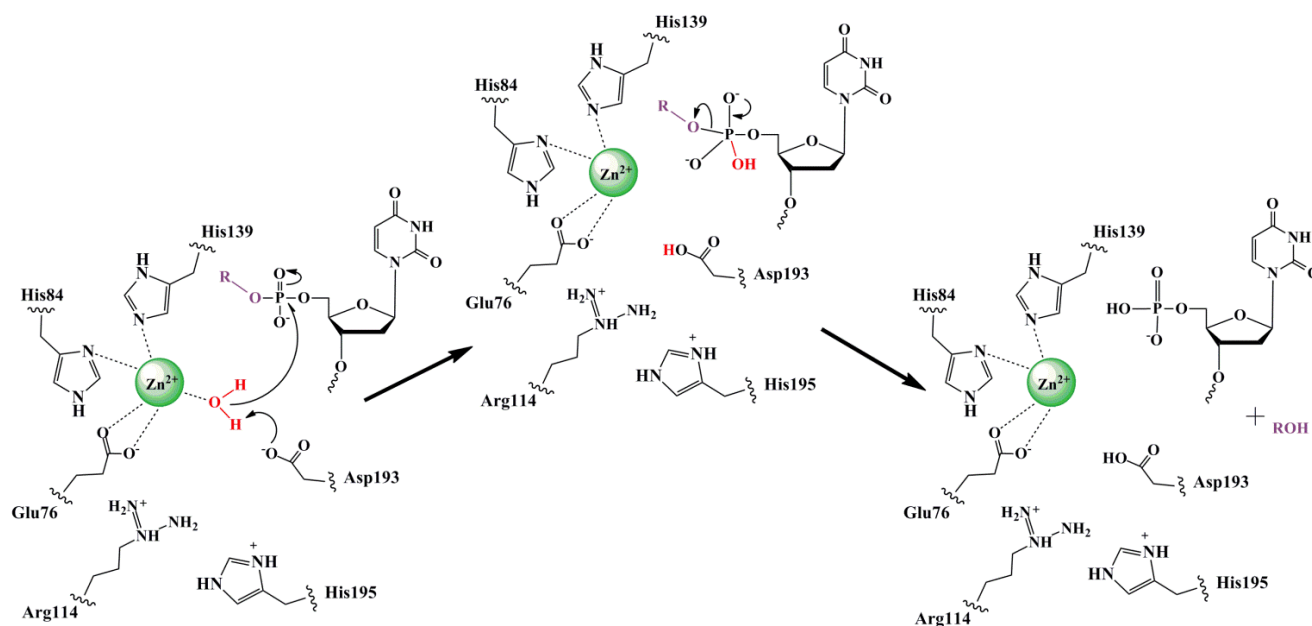


Рисунок 17. Механизм каталитического расщепления ДНК, предложенный для EndoQ. Изображены аминокислотные остатки, необходимые для осуществления каталитической активности фермента [295].

После расщепления поврежденной ДНК, катализируемого ферментом EndoQ, в качестве продуктов формируются 5'-фосфат и 3'-концевая гидроксильная группа. По субстратной специфичности и характеру каталитического расщепления поврежденной ДНК фермент EndoQ во многом схож с AP-эндонуклеазами из структурных семейств Xth и Nfo. Группой ученых, впервые выделивших EndoQ, было высказано предположение о возможной роли этого фермента в процессе NIR [293]. Кроме того, EndoQ, судя по всему, может играть важную роль в удалении U из ДНК некоторых организмов, дополняя функции AP-эндонуклеазы и урацил-ДНК-гликозилазы, а иногда и компенсируя отсутствие одного из этих ферментов [84].

1.4. Заключение

AP-сайты являются одними из наиболее часто возникающих в ДНК повреждений [73]. Их появление в геноме требует немедленного вмешательства со стороны систем репарации, поскольку они способны не только приводить к остановке репликации [100] и появлению мутаций [102,103], но имеют тенденцию вызывать разрывы [110] и межцепочечные сшивки в ДНК [113,114]. Чтобы бороться с такими серьезными последствиями, живые организмы в ходе эволюции выработали быстрые и эффективные системы репарации, направленные в том числе на удаление AP-сайтов в ДНК [76]. Несмотря на то, что основной функцией AP-эндонуклеаз - ферментов, задействованных в системе BER, - является удаление AP-сайтов [132], эти ферменты также способны узнавать в ДНК и с достаточной эффективностью расщеплять ДНК, содержащую различные по своей химической природе и структуре поврежденные нуклеотиды, такие как α A, DHU, DHT, 5hU [10], U [70], ϵ A и ϵ C [63]. Согласно литературным данным, все эти повреждения представляют собой потенциальные мутагены и многие способны приводить к блокированию репликации и возникновению делеций в ДНК клетки. Интересно, что для гомолога hAPE1 из *E. coli* Xth была показана активность только на таком поврежденном основании как U [40,169]. Тем не менее, значимость этой дополнительной активности гомологов Xth у некоторых представителей архей чрезвычайно высока, поскольку у них не было обнаружено специфичных к урацилу ДНК-гликозилаз. Это может указывать на параллельное или даже более раннее возникновение системы NIR, и ее роль в борьбе организмов с повышенными уровнями урацила в ДНК [70].

Помимо того, что AP-эндонуклеазы, принадлежащие структурному семейству Xth, принимают участие во многих критически важных биологических процессах, таких как BER и NIR, они способны расщеплять РНК, процессировать 3'-концы интермедиатов репаративного процесса, проявляют redox функцию и могут участвовать в клеточной пролиферации [10,16,218,223,296,297]. Представители второго хорошо охарактеризованного структурного семейства AP-эндонуклеаз Nfo также являются многофункциональными ферментами, и проявляют NIR-активность, удаляя такие повреждения как 5hU, 5hC, DHU, α A и α T [38,40,41,278]. Биологическая значимость AP-эндонуклеаз подтверждается тем, что мыши с подавленной экспрессией соответствующего гена подвержены эмбриональной летальности. Кроме того, экспрессия неактивных вариантов фермента в клетках приводит к росту их чувствительности к повреждающим ДНК препаратам, а некоторые полиморфные варианты

фермента и нарушение уровней его экспрессии у людей связывают с увеличением риска развития раковых, сердечно-сосудистых и неврологических заболеваний [298–301]. В то же время, некоторые агрессивные типы опухолей обладают повышенной экспрессией hAPE1, что предположительно защищает метаболически активные опухолевые клетки от высокого уровня активных форм кислорода, возникающих в процессе усиленного окислительного фосфорилирования [206]. В связи с этим явлением hAPE1 стали рассматривать в том числе в качестве перспективной мишени для химиотерапевтического лечения рака [297].

Интересно отметить, что список разнообразных повреждений практически полностью пересекается для представителей обоих структурных семейств. При этом представители двух семейств структурно не связаны друг с другом и, судя по всему, эволюционировали независимо друг от друга. Действительно, несмотря на то, что основной функцией и hAPE1 и Nfo является удаление AP-сайтов из ДНК, эти ферменты используют совершенно различные структуры для выполнения одной и той же задачи. В ходе формирования каталитического комплекса с ДНК, фермент hAPE1 выворачивает AP-сайт из двойной спирали и размещает его в активном центре, при этом изгибая ДНК на 35° [181]. Иными словами, AP-эндонуклеаза человека индуцирует значительные конформационные перестройки ДНК, достигая таким образом правильного размещения повреждения в кармане активного центра фермента для осуществления дальнейшего гидролитического расщепления [186]. Фермент Nfo также изгибает ДНК в ходе формирования фермент-субстратного комплекса, однако под гораздо большим углом в 90° . Кроме того, помимо выворачивания повреждения в активный центр фермента, Nfo выворачивает также и комплементарный поврежденному основанию нуклеотид [274]. Можно предположить, что ферменты обоих семейств используют свойство повышенной пластичности двойной спирали ДНК в области расположения повреждения для осуществления специфичного расщепления поврежденных нуклеотидов и AP-сайта. И для hAPE1, и для Nfo характерно внедрение аминокислотных остатков на место вывернутого повреждения. Интересно, что Nfo в процессе взаимодействия с ДНК-субстратом, по-видимому, претерпевает куда более значительные конформационные изменения, чем фермент hAPE1. Оба фермента осуществляют гидролиз фосфодиэфирной связи с 5'-стороны от повреждения посредством нуклеофильной атаки через образование пентаковалентного интермедиата, однако этот интермедиат стабилизируется различными катионами двухвалентных металлов [162]. Для осуществления каталитического гидролиза поврежденной ДНК ферменту hAPE1 требуется как минимум один

двухвалентный катион металла [191–194]. Согласно большинству литературных источников, наиболее оптимальным в качестве такого катиона считается Mg^{2+} . Однако полного консенсуса на тему точного расположения катионов Mg^{2+} в структуре фермента hAPE1, и их количества, до сих пор не было достигнуто. Необходимость в присутствии катиона Mg^{2+} для каталитического расщепления поврежденной ДНК ферментами семейства Xth является еще одним из ключевых отличий от ферментов типа Nfo, так как представителям этого семейства для эффективного катализа требуются три катиона Zn^{2+} [162,199,200,274]. На сегодняшний день нет данных, которые указывали бы на то, какое семейство возникло раньше в ходе эволюции. Тем не менее то, что NIR-активность появилась независимо у представителей настолько разных ферментативных семейств наряду с основной AP-эндонуклеазной активностью, говорит о том, что способность AP-эндонуклеаз удалять из ДНК поврежденные нуклеотиды также является важной биологической функцией.

В ходе недавних исследований у представителя архей *P. furiosus* была обнаружена ДНК-эндонуклеаза EndoQ, структурно неродственная каким бы то ни было известным AP-эндонуклеазам и ДНК-гликозилазам, и тем не менее некоторые ее особенности имеют сходство с представителями AP-эндонуклеаз структурных семейств Xth и Nfo. EndoQ расщепляет ДНК непосредственно с 5'-стороны от таких повреждений как AP-сайт, Нх, U, 5hU, DHU и некоторых других [290–292]. Согласно данным филогенетического анализа этот фермент эволюционировал независимо в домене архей, и его гомологов не было обнаружено в представителях других доменов жизни, за исключением некоторых бактерий. При формировании фермент-субстратного комплекса с EndoQ ДНК изгибается на 40° , а поврежденный нуклеотид выворачивается из двойной спирали и погружается в глубокий связывающий карман [295]. Однако стабилизация вывернутой конформации, судя по всему, происходит не за счет встраивания аминокислотных остатков в формирующуюся полость, а благодаря образованию широкой сети контактов вокруг повреждения, нарушающих стэкинг-взаимодействия соседних пар оснований [295]. Для каталитического расщепления ДНК ферменту EndoQ, также как hAPE1 и Nfo, требуется присутствие катиона двухвалентного металла [290]. Согласно структурным данным, в структуре фермента координированы два или три катиона Zn^{2+} , а также один катион Mg^{2+} . При этом, судя по имеющимся данным, катионы Zn^{2+} играют как структурную роль, так и принимают непосредственное участие в осуществлении каталитической реакции, а катион Mg^{2+} играет важную структурную роль

[294,295]. Все эти данные указывают на то, что фермент EndoQ может играть важную роль в работе системы NIR у представителей архей. Кроме того, у некоторых организмов EndoQ может выступать в роли дополнительного фермента для удаления U из ДНК, а иногда и полностью компенсировать отсутствие других специфичных к урацилу ферментов, таких как AP-эндонуклеаза или урацил-ДНК-гликозилаза [84].

Вопрос о дискриминации широкого набора различных ДНК- и РНК-субстратов единственным активным центром AP-эндонуклеаз продолжает интересовать исследователей на протяжении многих лет. Несмотря на множество данных, полученных с помощью методов рентгеноструктурного анализа (РСА) и сайт-направленного мутагенеза, характеризующих роль отдельных аминокислотных остатков в каталитическом процессе, осуществляемом данными ферментами, а также данных, описывающих их каталитический механизм, ответа на этот вопрос так и не было получено. Поскольку оптимальные для осуществления NIR-активности фермента условия реакции близки к таковым для осуществления 3'-5'-экзонуклеазной активности [10], некоторыми исследователями [232] выдвигается предположение о том, что при удалении поврежденных оснований из ДНК формируется фермент-субстратный комплекс, аналогичный тому, который формируется при удалении нуклеотидов и блокирующих групп с 3'-конца ДНК. Тем не менее, другие данные говорят о том, что даже такие объемные повреждения как, например, pBQ-dC, способны располагаться в активном центре фермента подобно AP-сайту, что говорит в пользу формирования фермент-субстратного комплекса AP-эндонуклеазного типа [233]. Интересно, что для фермента Nfo также существуют данные, указывающие на общность механизмов катализа при осуществлении NIR и 3'-5'-экзонуклеазной активности [278]. Для того чтобы установить природу высокой субстратной специфичности AP-эндонуклеаз и особенности механизмов распознавания структурно и химически разных повреждений, необходимо привлекать не только методы РСА и сайт-направленного мутагенеза, но и исследовать взаимодействие ферментов с различными повреждениями и различными типами структур ДНК, начиная с самых ранних этапов фермент-субстратного взаимодействия. Одним из методов, позволяющих регистрировать процессы конформационной подстройки молекул фермента и субстрата в режиме реального времени, начиная с первых миллисекунд взаимодействия, является метод «остановленного потока». Использование подходов предстационарной кинетики с одновременной регистрацией конформационных изменений фермента и ДНК позволяет получить данные о формировании промежуточных фермент-

субстратных комплексов и установить природу процессов, происходящих на этих стадиях. Более того, именно эти промежуточные состояния позволяют сделать заключение о механизме, обеспечивающем субстратную специфичность фермента, и определить основные принципы реализации обширной субстратной специфичности AP-эндонуклеаз. Кроме того, изучение особенностей каталитического процесса расщепления поврежденной ДНК гомологичными ферментами из различных организмов, а также ферментами, принадлежащими к разным структурным семействам, но обладающими близкими спектрами субстратной специфичности и сходными механизмами каталитической активности, позволят определить ключевые особенности действия ферментов данного класса и выявить принципиальные различия, отвечающие за мультифункциональность и высокую субстратную специфичность AP-эндонуклеаз.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Буферные растворы

Буферные растворы были приготовлены из химически чистых реагентов с использованием бидистиллированной воды. Буфер BER состоял из 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 50 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреитола (DTT), 1 мМ ЭДТА [при приготовлении всех буферных растворов был использован раствор Na₂ЭДТА, оттитрованный до pH 7,8] и 7% глицерина (v/v). Буфер NIR состоял из 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 50 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, 1 мМ ЭДТА и 7% глицерин (v/v). Выбор 1 мМ концентрации катионов Mg²⁺ в присутствии 1 мМ ЭДТА обусловлен тем, что во многих работах было показано, что для реализации NIR-активности AP-эндонуклеазами достаточно наличия катионов Mg²⁺ в реакционной смеси даже в следовых количествах (0,01-0,5 мМ) [10,19,63,212,302,303]. Эндонуклеазные исследования с ДНК-субстратами, содержащими G-квадруплекс, проводились в реакционном буфере Q4, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 5 мМ MgCl₂ и KCl с концентрацией 140 мМ, необходимой для формирования G-квадруплексной структуры. Все эксперименты проводились при 25°C, за исключением экспериментов с ферментом EndoQ, которые проводились при 40°C.

2.2. Синтез и очистка олигодезоксирибонуклеотидов

Используемые в работе олигодезоксирибонуклеотиды (таблица 1) синтезированы в Лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН на ДНК/РНК синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Новосибирск, Россия) с использованием стандартных коммерческих фосфорамидитов и носителей CPG от Glen Research (США). Очистка синтезированных олигодезоксирибонуклеотидов была проведена с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ионообменной колонки [PRP-X500 Hamilton Company (12-30 мкм) 3,9×300 мм] и последующей обращенно-фазовой хроматографией на колонке [Bondapak C18 (15-20 мкм) 3,9×300 мм, Waters, Ирландия]. Гомогенность олигодезоксирибонуклеотидов была подтверждена с помощью гель-электрофореза в 20% (w/v) полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях (7 М мочевины). Концентрации олигодезоксирибонуклеотидов были определены спектрофотометрически на основании оптической плотности их растворов на длине волны 260 нм (A₂₆₀); расчет концентраций производился по закону Бугера-Ламберта-Бера с учетом коэффициентов молярной экстинкции синтезированных олигодезоксирибонуклеотидов [304].

Таблица 1. Последовательности олигодезоксирибонуклеотидов, использованных в работе		
Тип структуры	Сокращение	Последовательность
1	2	3
G-квадруплекс	Q4	5' - TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT - 3'
	F14-Q4	5' - TTAGGGTTAGGGT F AGGGTTAGGGTT - 3'
	F17-Q4	5' - TTAGGGTTAGGGTTAG F GTTAGGGTT - 3'
	FRET-Q4	5' - FAM -TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT- BHQ1 - 3'
	FRET-F14-Q4	5' - FAM -TTAGGGTTAGGGT F AGGGTTAGGGTT- BHQ1 - 3'
	F14-aPu13-Q4	5' - TTAGGGTTAGGG (aPu) F AGGGTTAGGGTT - 3'
	F14-aPu15-Q4	5' - TTAGGGTTAGGGT F (aPu) GGGTTAGGGTT - 3'
	FRET-F17-Q4	5' - FAM -TTAGGGTTAGGGTTAG F GTTAGGGTT- BHQ1 - 3'
	F17-aPu16-Q4	5' - TTAGGGTTAGGGTTA (aPu) F GTTAGGGTT - 3'
	F17-aPu18-Q4	5' - TTAGGGTTAGGGTTAG F (aPu) TTAGGGTT - 3'
Структуры с выпетливаниями	F/-Δ1	5' - FAM -GCGCATACGGCAT F ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 - 3' 3' - CGCGTATGCCGTA-TAGTCCCTTCACCC - 5'
	F/-Δ2(5')	5' - FAM -GCGCATACGGCAT F ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 - 3' 3' - CGCGTATGCCGT--TAGTCCCTTCACCC - 5'
	F/-Δ2(3')	5' - FAM -GCGCATACGGCAT F ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 - 3' 3' - CGCGTATGCCGTA--AGTCCCTTCACCC - 5'
	F/-Δ3	5' - FAM -GCGCATACGGCAT F ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 - 3' 3' - CGCGTATGCCGT---AGTCCCTTCACCC - 5'
	F/-Δ5	5' - FAM -GCGCATACGGCAT F ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 - 3' 3' - CGCGTATGCCG-----GTCCCTTCACCC - 5'
	F/+Δ3	5'- FAM -GCGCATACGGCAT- F -ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 -3' 3'-CGCGTATGCCGTAGGGTAGTCCCTTCACCC-5'
	F/+Δ4	5'- FAM -GCGCATACGGCAT-- F -ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 -3' 3'-CGCGTATGCCGTACGGGTAGTCCCTTCACCC-5'
	F/+Δ5	5' - FAM -GCGCATACGGCAT-- F --ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 - 3' 3' - CGCGTATGCCGTACGGGCTAGTCCCTTCACCC - 5'
	F/+Δ7	5' - FAM -GCGCATACGGCAT--- F ---ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 - 3' 3' - CGCGTATGCCGTACCGGCCTAGTCCCTTCACCC - 5'
Дуплекс	dsF/G28	5' - FAM -GCGCATACGGCAT F ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 - 3' 3' - CGCGTATGCCGTAGTAGTCCCTTCACCC - 5'
	F/G	5' - GCTCA F GTACAGAGCTG - 3' 3' - CGAGTGCATGTCTCGAC - 5'
	F-aPu	5' - GCTCA F (aPu) TACAGAGCTG - 3' 3' - CGAGTG T ATGTCTCGAC - 5'
	FRET-F/N N = A, C, G, T	5' - FAM -GCTCA F GTACAGAGCTG - 3' 3' - CGAGT N CATGTCTCGAC- BHQ1 - 5'
	FRET-Hx/N N = A, C, G, T	5' - FAM -GCTCA Hx GTACAGAGCTG - 3' 3' - CGAGT N CATGTCTCGAC- BHQ1 - 5'
	FRET-U/N N = A, C, G, T	5' - FAM -GCTCA U GTACAGAGCTG - 3' 3' - CGAGT N CATGTCTCGAC- BHQ1 - 5'
	FRET-αA/T	5' - FAM -GCTCA α AGTACAGAGCTG - 3' 3' - CGAGTT CATGTCTCGAC- BHQ1 - 5'
	FRET-εA/T	5' - FAM -GCTCA ε AGTACAGAGCTG - 3' 3' - CGAGTT CATGTCTCGAC- BHQ1 - 5'
	FRET-DHU/G	5' - FAM -GCTCA DH UGTACAGAGCTG - 3' 3' - CGAGT G CATGTCTCGAC- BHQ1 - 5'

1	2	3
Дуплекс	FRET-C/G	5' - FAM -GCTCACGTACAGAGCTG - 3' 3' - CGAGTGCATGTCTCGAC- BHQ1 - 5'
О.ц. ДНК	ssF28	5' - FAM -GCGCATACGGCAT F ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 - 3'
	FAM-F	5' - FAM -GCTCA F GTACAGAGCTG - 3'
	FAM-Hx	5' - FAM -GCTCA Hx GTACAGAGCTG - 3'
	FAM-U	5' - FAM -GCTCA U GTACAGAGCTG - 3'
Экзо-субстрат	Ехо-ДНК	5' - GTGTCACCACTGCTCACGTACAGAGCTG - 3' 3' - CGAGTGCATGTCTCGAC- FAM - 5'

В качестве ДНК-субстратов с неканонической структурой были использованы олигодезоксирибонуклеотиды, формирующие G-квадруплексные структуры, неповрежденные или содержащие в своей последовательности остаток 2-гидроксиметил-3-гидрокситетрагидрофурана в качестве нерасщепляемого ДНК-гликозилазами аналога AP-сайта (F-сайт), а также поврежденные ДНК-дуплексы, содержащие F-сайт и выпетливание поврежденной или неповрежденной цепи. В качестве специфических ДНК-субстратов для ферментов hAPE1, zAPE1, xAPE1 и Rrp1 использовали олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие такие повреждения как F-сайт, U, DHU, αA или εA. В качестве специфических ДНК-субстратов для фермента EndoQ были использованы олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие такие дезаминированные основания ДНК, как Hx, U или DHU, а также олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие в своей последовательности F-сайт, αA или εA. В качестве неспецифических субстратов были использованы неповрежденные ДНК-дуплексы. Для регистрации локальных конформационных изменений ДНК в субстраты, содержащие поврежденный нуклеотид, вводили флуоресцирующий аналог основания aPu непосредственно с 3'- или 5'-стороны от повреждения; для регистрации глобальных конформационных перестроек, происходящих со структурой ДНК-субстратов в процессе взаимодействия с ферментами, использовали FRET пару: остаток 6-карбоксифлуоресцеина (FAM) в качестве флуорофора и остаток black hole quencher 1 (BHQ1) в качестве тушителя. При этом в случае поврежденных и неповрежденных ДНК-субстратов, формирующих G-квадруплексные структуры, FAM вводили на 5'-конец олигодезоксирибонуклеотида, а BHQ1 – на 3'-конец. А в случае ДНК-дуплексов FAM вводили на 5'-конец содержащей повреждение цепи ДНК (или соответствующей ей неповрежденной цепи), а BHQ1 – на 5'-конец комплементарной цепи. Структуры F-сайта и флуорофорных групп, использованных в работе, представлены на рисунке 18. Структуры других поврежденных нуклеотидов, использованных в работе, а именно U, DHU, αA, εA или Hx, представлены на рисунке 1 в разделе 1.1.5 обзора литературы.

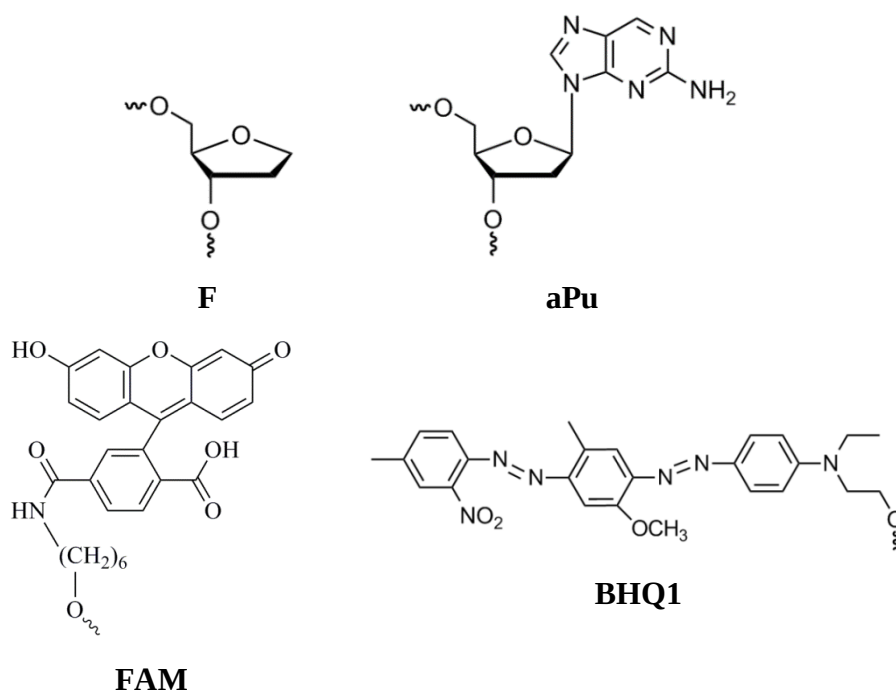


Рисунок 18. Структуры F-сайта и флуорофорных групп, использованных в работе.

2.3. Подтверждение структуры G-квадруплексов методом кругового дихроизма (CD)

Спектры кругового дихроизма были записаны на спектрополяриметре Jasco J-600 (Jasco, Япония), при 25°C в кварцевых кюветах с длиной оптического пути равной 1 см. Концентрация ДНК в кювете составляла 10 мкМ. Эксперименты проводились в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 140 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА и 5 мМ MgCl₂. Спектры были записаны при ширине щели 1,0 нм и разрешении 1,0 нм при скорости записи равной 50 нм/мин.

2.4. Клонирование генов AP-эндонуклеаз

Для создания экспрессионных конструкций для выделения ферментов zAPE1 (*D. rerio*), Rrp1 (*D. melanogaster*) и EndoQ (*P. furiosus*) использованы синтетические гены zAPE1, EndoQ или Rrp1, встроенные в плазмиду pBluescript II SK(+). Плазмиды, содержащие данные гены, были любезно предоставлены Dr. М.К. Сапарбаевым (Институт им. Густава Росси, Вильжюиф, Франция). Плазмиды, содержащие гены ферментов zAPE1, EndoQ и Rrp1 были обработаны ферментами рестрикции BamHI и NdeI [NheI в случае Rrp1]. Гены были выделены из 1,0% агарозного/ТАЕ геля и очищены согласно протоколу QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Хильден, Германия). Очищенные гены были клонированы в вектор pET28с, предварительно обработанный соответствующими рестриктазами. Клетки *E.coli* ElectroMAX™ DH10B (Invitrogen, Уолтем, Массачусетс, США) трансформировали продуктом клонирования путем электропорации. Проверку полученных экспрессионных векторов проводили путем

секвенирования последовательности включенного гена. С помощью полученных конструкций были выделены рекомбинантные белки zAPE1, Rrp1 и EndoQ, меченные His₆ по N-концу.

2.5. Выделение и очистка ферментов

Препарат фермента человека hAPE1 был любезно предоставлен Александрой А. Кузнецовой (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия). Ферменты Rrp1 (*D. melanogaster*), xAPE1 (*X. laevis*) и zAPE1 (*D. rerio*) были выделены из клеток-продуцентов *E. coli* Rosetta2 (DE3), трансформированных плазмидой pET28с, несущей ген, кодирующий соответствующий белок с N-концевой меткой His₆. Для этого 1 л культуры клеток *E. coli*, несущих необходимую векторную конструкцию, растили в среде Лурия-Бертани (LB) в присутствии 50 мкг/мл канамицина при 37°C до тех пор, пока значение оптической плотности при 600 нм (A₆₀₀) не достигло 0,6-0,7. Нарботка ферментов была индуцирована в течение ночи путем добавления изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (IPTG) до концентрации 0,3 мМ. Клетки были собраны путем центрифугирования (5000 × g, 10 мин) и затем ресуспендированы в буфере [20 мМ HEPES-КОН (pH 7,8), 40 мМ NaCl, и 0,1% NP40] с добавлением смеси ингибиторов протеаз (Inhibitor cocktail, Complete, Мангейм, Германия). Ресуспендированные клетки были лизированы с помощью пресса Фрэнча (Thermo Electron Corporation, Нидем, США). Все процедуры по очистке проводились при 4°C. Каждый гомогенат центрифугировали при 40000 × g в течение 40 мин, концентрация NaCl в супернатанте была доведена до 250 мМ (400 мМ в случае Rrp1), после чего супернатант был фракционирован путем ионообменной хроматографии с использованием колонки с 30 мл Q-Sepharose Fast Flow (Cytiva, GE Healthcare Life Sciences, Мальборо, Массачусетс, США), предварительно уравновешенной тем же буфером. Элюирование белка проводили буфером, содержащим 250 мМ (400 мМ в случае Rrp1) NaCl, 20 мМ HEPES-NaOH (pH 7,8). Прошедшие через колонку фракции, содержащие белок, были объединены, к ним был добавлен раствор имидазола до концентрации 20 мМ и раствор NaCl до концентрации 500 мМ. Полученный раствор был нанесен на 1 мл хроматографическую хелатирующую колонку HiTrap-ChelatingTM (Cytiva, GE Healthcare Life Sciences, Мальборо, Массачусетс, США). Белки, связавшиеся со смолой, смывались с нее в линейном градиенте имидазола с концентрацией от 20 до 500 мМ. Регистрация поглощения раствора проводилась при длине волны 280 нм. Гомогенность выделенных белков была подтверждена методом гель-электрофореза в ПААГ, пример такого геля для xAPE1 представлен на рисунке 19А.

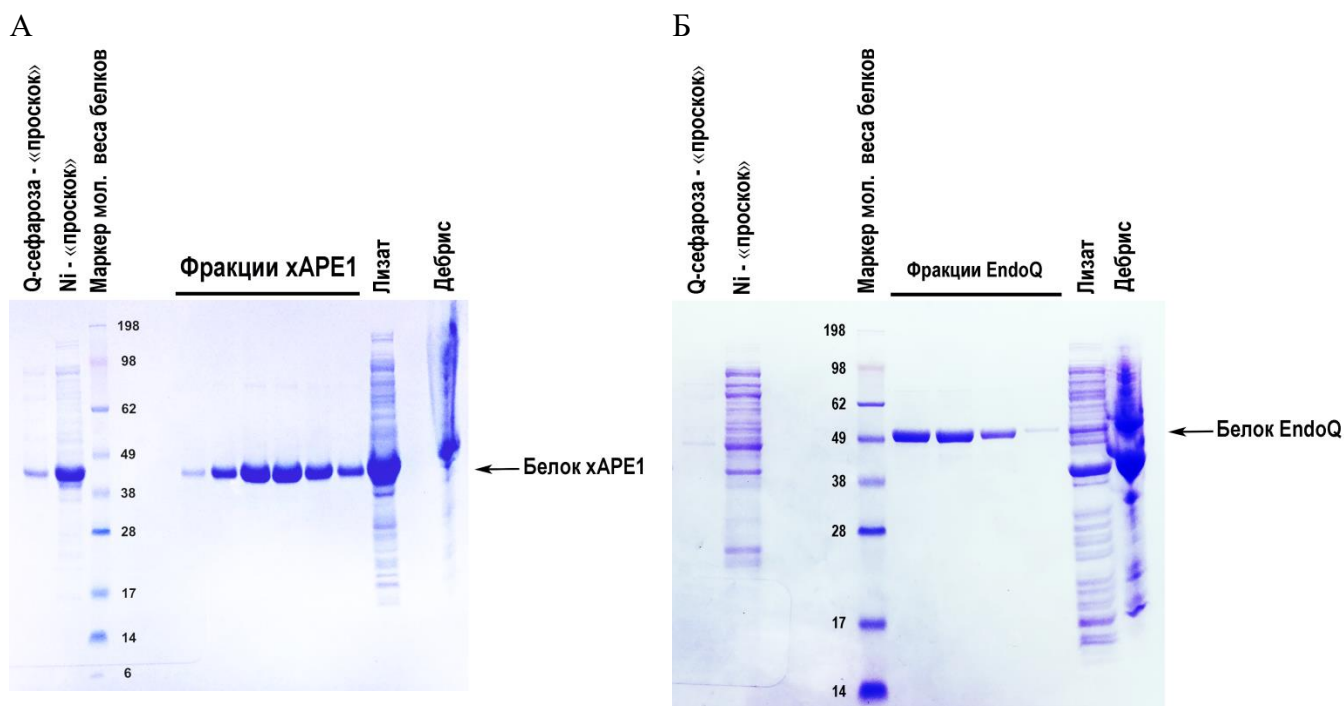


Рисунок 19. Анализ гомогенности выделенных белков xAPE1 (А) и EndoQ (Б) методом гель-электрофореза. Были проанализированы пробы, содержащие гомогенат, полученный с помощью пресса Фрэнча, клеточный дебрис, фракции «проскока» с колонок Q-Sepharose Fast Flow (Q-сефароза) и HiTrap-Chelating (Ni), а также фракции белка, элюированные с Ni-хелатирующей смолы в линейном градиенте имидазола. Для визуализации белков было использовано окрашивание Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sangon Biotech, Шанхай, Китай).

Концентрация белка была измерена по методу Бредфорда [305]. Для этого к 500 мкл водного раствора белка добавляли 500 мкл реагента Бредфорда (100 мг Coomassie G-250, 50 мл этанола, 100 мл ортофосфорной кислоты на один литр воды) и ждали окраски белка в течение 5 мин. Оптическую плотность полученного раствора измеряли спектрофотометрически на длине волны 595 нм. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA) с известной концентрацией.

Выделенные белки, содержащие метку His₆, а именно zAPE1, xAPE1 и Rrp1, были дополнительно очищены с использованием процедуры обмена буфера на фильтрах Amicon® Ultra Centrifugal Filters (EMD Millipore, Берлингтон, Массачусетс, США). Буфер, против которого проводился обмен, содержал 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT и 50% глицерин (v/v). Стоковые растворы белков хранились при -20°C.

Фермент EndoQ из *Pyrococcus furiosus* был выделен из клеток-продуцентов *E. coli* ArcticExpress (DE3), трансформированных плазмидой pET28с, несущей ген, кодирующий соответствующий белок с N-концевой меткой His₆. Для очистки данного фермента в качестве рекомбинантного белка, 2 л культуры клеток *E. coli* [в питательной среде 2×YT], содержащих необходимую векторную конструкцию, растили в присутствии 50 мкг/мл канамицина, 20 мкг/мл гентамицина и 10 мкг/мл тетрациклина при 37°C до тех пор, пока значение

поглощения A_{600} не достигло 0,6–0,7. Нарботку фермента индуцировали добавлением 0,2 мМ IPTG и проводили в течение 24 ч при 16°C. Клетки были собраны путем центрифугирования ($5,000 \times g$, 20 мин), и затем ресуспендированы в лизис-буфере [20 мМ HEPES-KOH (pH 7,8), 40 мМ NaCl] с добавлением смеси ингибиторов протеаз (Inhibitor cocktail, Complete, Мангейм, Германия). Клеточную суспензию лизировали на прессе Фрэнча. Все процедуры по очистке фермента проводились при 4°C. Гомогенат центрифугировали при $40,000 \times g$ в течение 45 мин, после чего концентрация NaCl в супернатанте доводилась до 400 мМ, и супернатант наносили на колонку с 30 мл Q-Sepharose Fast Flow (Cytiva, GE Healthcare Life Sciences, Мальборо, Массачусетс, США). Белок элюировали с колонки буфером, содержащим 400 мМ NaCl и 20 мМ HEPES-NaOH (pH 7,8). Фракции с колонки, содержащие фермент, были собраны вместе, к ним был добавлен раствор имидазола до концентрации 20 мМ и раствор NaCl до концентрации 500 мМ, и затем они были нанесены на 1 мл колонку HiTrap-ChelatingTM (Cytiva, GE Healthcare Life Sciences, Мальборо, Массачусетс, США). Связанный белок выделяли в линейном градиенте имидазола 20→600 мМ. Регистрация поглощения раствора проводилась при длине волны 280 нм. Фракцию, содержащую белок, диализовали против буфера, содержащего 20 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 200 мМ NaCl, 5 мМ DTT и 20% глицерин (v/v) и хранили при -20°C. Гомогенность белка была подтверждена с помощью гель-электрофореза в ПААГ (рисунок 19Б). Концентрация белка была измерена по методу Брэдфорда, как описано ранее.

2.6. Определение влияния концентрации одно- и двухвалентных ионов металлов на активность AP-эндонуклеаз

Олигодезоксирибонуклеотиды, меченые FAM по 5'-концу, были использованы в экспериментах по анализу продуктов ферментативного расщепления с помощью гель-электрофореза. Исследования в условиях одного оборота фермента проводили в различных реакционных буферах, состоящих из 50 мМ Tris-HCl pH 7,5, 0–300 мМ KCl, 0,0–10,0 мМ MgCl₂, 1,0 мМ DTT, 1,0 мМ ЭДТА и 7% глицерина (v/v). Для того чтобы исключить присутствие двухвалентных катионов металлов в растворе белка до добавления реакционного буфера, ферменты инкубировали в присутствии 1,0 мМ ЭДТА в течение 15 минут на льду. Исследования AP-эндонуклеазной активности с каждым субстратом проводили при 25°C в 10 мкл реакционной смеси. Поскольку AP-эндонуклеазная и 3'-5'-экзонуклеазная активности имеют разные характерные времена расщепления субстрата, реакционные смеси инкубировали в течение разного времени и реакцию проводили при разных концентрациях реагентов (таблица 2).

Таблица 2. Условия реакции при сравнении активности ферментов типа APE1

Субстрат	Концентрации фермента и субстрата	Условия реакции
FRET-F/G (AP-эндонуклеазная активность)	(1) [фермент] = 0,1 мкМ, [субстрат] = 1,0 мкМ	(1) [MgCl ₂] = 5,0 мМ, [KCl] = 0–300 мМ, 25°C, 20 с
	(2) [фермент] = 1,0 мкМ, [субстрат] = 1,0 мкМ	(2) [MgCl ₂] = 0–10 мМ, [KCl] = 50 мМ, 25°C, 20 с
Ехо-ДНК (3'-5'-экзонуклеазная активность)	[фермент] = 1,0 мкМ, [субстрат] = 1,0 мкМ	(1) [MgCl ₂] = 5,0 мМ, [KCl] = 50 мМ, 25 °C, 30 мин (2) [MgCl ₂] = 5,0 мМ, [KCl] = 0–300 мМ, 25°C, 30 мин (3) [MgCl ₂] = 0–10 мМ, [KCl] = 50 мМ, 25°C, 30 мин

Реакцию инициировали добавлением 5 мкл фермента к 5 мкл субстрата и останавливали добавлением 10 мкл краски для нанесения на гель, содержащей 7 М мочевины и 25 мМ ЭДТА, с последующим нагреванием при 95°C в течение 3 мин и нанесением на 20% (w/v) ПААГ, содержащий 7 М мочевины. Гель-электрофорез проводили при 55°C и 200-300 V. Визуализация ДНК в геле проводилась с помощью гель-документирующей системы E-Box CX.5 TS (Vilber Lourman, France). Анализ степени расщепления ДНК-субстратов был проведен путем сканирующей денситометрии в программе Gel-Pro Analyzer v.4.0 (Media Cybernetics, США). Значение уровня расщепления определяли как отношение площади пика продукта к сумме площадей пиков, соответствующих продукту и исходному ДНК-субстрату.

2.7. Анализ активности ферментов zAPE1, xAPE1 и Rrp1 в стационарных условиях

Исследования активности ферментов zAPE1, xAPE1 и Rrp1 по отношению к ДНК-субстрату FRET-F/G проводили при 25°C в 10 мкл реакционной смеси, содержащей буфер BER. Исследования с ДНК-субстратами FRET-U/G, FRET-αA/T, FRET-εA/T и FRET-DHU/G проводили в буфере NIR. Реакция была инициирована добавлением 5 мкл фермента в концентрации 2 мкМ к 5 мкл ДНК-субстрата в той же концентрации. После инкубирования в течение определенного времени реакцию останавливали, как описано ранее (раздел 2.6). Отобранные пробы по 15 мкл наносили на денатурирующий ПААГ; электрофорез, визуализация ДНК и количественный анализ были проведены, как описано выше (раздел 2.6).

2.8. Анализ активности фермента EndoQ в стационарных условиях

Для того чтобы изучить влияние различных двухвалентных катионов на эндонуклеазную активность EndoQ по отношению к субстрату FRET-F/G, фермент был предварительно

инкубирован в присутствии 1,0 мМ ЭДТА в течение 15 минут на льду. Затем фермент дополнительно инкубировали еще в течение 10 мин в присутствии MeCl_2 (где $\text{Me} = \text{Mg}, \text{Mn}, \text{Ca}$ или Zn) в определенной концентрации (0; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 или 5,0 мМ). Далее к 5 мкл ДНК-субстрата в концентрации 2 мкМ и буферном растворе, содержащем соответствующий ион Me^{2+} в нужной концентрации, добавляли 5 мкл предварительно обработанного фермента EndoQ в концентрации 2 мкМ. Реакционные смеси инкубировали при 40°C. Аликвоты реакционной смеси отбирали после 3 мин (в случае растворов, содержащих Mg^{2+}) или 30 мин (для остальных двухвалентных ионов) после начала реакции, после чего реакцию останавливали, как описано выше (раздел 2.6).

Исследования активности фермента EndoQ по отношению к ДНК-субстратам FRET-F/N, FRET-Hx/N, FRET-U/N (где N = A, C, G, T), а также субстратам FRET- α A/T, FRET- ε A/T, FRET-DHU/G, FRET-C/G и ехо-субстрату, проводили при 40°C в 10 мкл реакционной смеси, содержащей реакционный буфер, состоящий из 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 50 мМ KCl, 1 мМ MgCl_2 , 1 мМ DTT и 7% глицерина (v/v). Растворы фермента и субстрата до начала реакции были выдержаны в течение 4 мин при 40°C. К 5 мкл ДНК-субстрата в концентрации 2 мкМ добавляли 5 мкл EndoQ в той же концентрации. После инкубирования в течение определенного времени реакцию останавливали, как описано ранее (раздел 2.6). После остановки реакции аликвоты с краской по 15 мкл наносили на денатурирующий ПААГ; электрофорез, визуализация ДНК и количественный анализ были проведены, как описано выше (раздел 2.6).

2.9. Анализ активности фермента hAPE1 при расщеплении субстратов с неканонической структурой

Все эксперименты с ДНК-субстратами, формирующими G-квадруплексные структуры, проводили в реакционном буфере Q4, с концентрацией KCl 140 мМ. В случае ДНК-субстратов с выпетливаниями, концентрация KCl была снижена до 50 мМ. В экспериментах по разделению продуктов расщепления в геле были использованы 5'-FAM-меченые олигодезоксирибонуклеотиды.

Для получения кинетических зависимостей уровня накопления продукта расщепления G-квадруплекса реакцию инициировали добавлением 5 мкл раствора фермента hAPE1 в концентрации 6,0 мкМ (если не указано иное) к 5 мкл раствора ДНК-субстратов FRET-Q4, FRET-F14-Q4 или FRET-F17-Q4 в концентрации 2,0 мкМ. Для получения зависимости уровня накопления продукта расщепления 2,0 мкМ FRET-F17-Q4-субстрата от концентрации hAPE1, концентрацию фермента варьировали от 2,0 мкМ до 40,0 мкМ. Для получения кинетических зависимостей уровня накопления продукта расщепления субстратов с выпетливаниями, а также поврежденного ДНК-дуплекса и о.ц. субстрата, содержащих F-сайт, реакцию инициировали

добавлением 5 мкл раствора фермента hAPE1 в концентрации 20,0 нМ к 5 мкл раствора ДНК-субстратов dsF/G28, F/-Δ1, F/-Δ2(5'), F/-Δ2(3'), F/-Δ3, F/-Δ5, о.ц. ДНК ssF28, F/+Δ3, F/+Δ4, F/+Δ5 или F/+Δ7 в концентрации 2,0 мкМ. Остановку реакции осуществляли как описано ранее (раздел 2.6). После остановки реакции аликвоты с краской по 15 мкл наносили на денатурирующий ПААГ; электрофорез, визуализация ДНК и количественный анализ были проведены, как описано выше (раздел 2.6). Кинетические кривые накопления продукта, полученные в стационарных условиях, были обработаны экспоненциальной кривой в программе Origin 8.1 (OriginLab Corp., США; уравнение 1).

$$\text{Накопление продукта} = A \times [1 - \exp(-k_{\text{obs}} \times t)] \quad (1)$$

где A – амплитуда, k_{obs} (с^{-1}) – наблюдаемая константа скорости, а t – время реакции.

Зависимость наблюдаемой константы скорости k_{obs} от концентрации hAPE1 была обработана уравнением 2:

$$k_{\text{obs}} = K_{\text{bind}} \times [\text{hAPE1}] / (K_{\text{bind}} \times [\text{hAPE1}] + 1) + k_{-2} \quad (2)$$

где K_{bind} – равновесная константа первоначального комплекса hAPE1-субстрат (M^{-1}), а k_2 и k_{-2} – константы скорости (с^{-1}) второго этапа связывания.

В случае ДНК-субстратов, содержащих выпетливания, начальная скорость расщепления была оценена как начальный наклон кинетической кривой, полученной в стационарных условиях.

2.10. Флуоресцентные кинетические измерения методом «остановленного потока»

Предстационарный кинетический анализ проводили с использованием метода «остановленного потока» путем регистрации изменений интенсивности флуоресценции или FRET-сигнала. В работе были использованы спектрометры «остановленного потока» SX.18MV и SX20 (Applied Photophysics Ltd., Великобритания), оснащенные ксеноновой лампой на 150 W и кюветой с длиной оптического пути 2 мм. Мертвое время приборов составляло 1,4 и 1,0 мс, соответственно. Возбуждение флуоресценции триптофана проводили на длине волны $\lambda_{\text{ex}} = 290$ нм, регистрацию проводили при $\lambda_{\text{em}} > 320$ нм с использованием фильтра WG-320 (Schott, Mainz, Германия). В случае, если олигодезоксирибонуклеотид содержал aPc, возбуждение флуоресценции проводили на длине волны $\lambda_{\text{ex}} = 310$ нм, а регистрацию проводили при $\lambda_{\text{em}} > 370$ нм (фильтр Corion LG-370). Флуоресценцию FAM возбуждали при длине волны $\lambda_{\text{ex}} = 494$ нм, а изменения FRET-сигнала регистрировали на $\lambda_{\text{em}} > 530$ нм с использованием фильтра OG-530 (Schott, Mainz, Германия). Детекцию интегральной интенсивности флуоресценции проводили с использованием фотоэлектронного умножителя (ФЭУ). Каждая флуоресцентная

кривая была получена как результат усреднения от трех или более индивидуальных экспериментов. Экспериментальная погрешность не превышала 5%. Эксперименты с ДНК-субстратами, содержащими G-квадруплекс, проводили в реакционном буфере Q4. Флуоресцентные кривые, характеризующие взаимодействие ферментов zAPE1, xAPE1 и Rrp1 с ДНК-субстратами, содержащими αA, εA, DHU и U, были получены в экспериментах, которые проводили в буфере NIR. Эксперименты с участием ферментов hAPE1, zAPE1, xAPE1 и Rrp1 и субстрата FRET-F/G или неповрежденной ДНК проводили в буфере BER. Все эксперименты с участием ферментов hAPE1, zAPE1, xAPE1 и Rrp1 проводили при 25°C. Все эксперименты с участием EndoQ проводили при 40°C в реакционном буфере, содержащем 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM KCl и 1 mM MgCl₂.

Для расчета констант скорости, характеризующих конформационные переходы ДНК при взаимодействии с ферментами, были получены серии кинетических кривых для разных концентраций фермента при фиксированной концентрации ДНК-субстрата. Концентрация ДНК-субстратов составляла 1,0 мкМ, а концентрацию фермента варьировали в пределах от 0,5 до 2,5 мкМ (до 20 мкМ в случае взаимодействия с ДНК-субстратами, формирующими G-квадруплексные структуры). Растворы, содержащие фермент и субстрат, помещали в два отдельных шприца спектрометра «остановленного потока» и инкубировали в течение 3 мин до смешивания при соответствующей температуре. Указанные в пояснении к экспериментам концентрации реагирующих веществ представляют собой конечные концентрации в кювете для смешивания.

В результате длительного облучения флуорофорных групп ультрафиолетовым светом происходит их постепенная деградация, которая сопровождается падением интенсивности флуоресцентного сигнала («бличинг»). В случае, если этот эффект вносил значительный вклад в вид кинетических кривых, вносили поправку на «бличинг», применяя уравнение 3:

$$F = F_{\text{экс}} - F_0 \times \exp(k_{\text{bleach}} \times t) \quad (3)$$

где F – интенсивность флуоресценции с поправкой на «бличинг», $F_{\text{экс}}$ – значение флуоресценции, полученное экспериментально, F_0 – значение фоновой флуоресценции, k_{bleach} – константа, характеризующая процесс «бличинга», t – время.

2.11. Математическая обработка кинетических кривых

Наборы кинетических кривых, характеризующих конформационные изменения ДНК-субстрата FRET-F/G в процессе взаимодействия с ферментами zAPE1, xAPE1 или Rrp1, были обработаны в программе Origin 8.1 (Originlab Corp., США) следующим экспоненциальным

уравнением (4) с амплитудами A_1 и A_2 , и константами скорости первого порядка k_{obs1} и k_{obs2} , соответственно:

$$y = A_1 \exp(-k_{\text{obs1}}t) + A_2 \exp(-k_{\text{obs2}}t) + C \quad (4)$$

Далее были получены зависимости наблюдаемых констант скорости k_{obsi} от концентрации фермента $[E]$, которые были аппроксимированы уравнениями 5 и 6:

$$k_{\text{obs1}} = k_1[E] + k_{-1} \quad (5)$$

где k_1 и k_{-1} – константы скорости прямой и обратной реакции, а $[E]$ – концентрация фермента.

$$k_{\text{obs2}} = k_{\text{cat}}[E] \quad (6)$$

где k_{cat} – константа скорости необратимой каталитической стадии ферментативной реакции, а $[E]$ – концентрация фермента.

Наборы кинетических кривых, полученных для различных концентраций неповрежденной ДНК в процессе взаимодействия с ферментами hAPE1, zAPE1, xAPE1 или Rrp1; ДНК-субстратов FRET-F/G, FRET-Hx/A или FRET-U/A в процессе взаимодействия с EndoQ; ДНК-субстратов F17-aPu16-Q4 или FRET-F17-Q4 в процессе взаимодействия с hAPE1 были проанализированы с использованием программы DynaFit (BioKin, Pullman, WA) [306], как описано ранее [307–310].

Кинетические кривые характеризуют изменения FRET-сигнала в процессе реакции, возникающие в результате последовательного формирования и дальнейших превращений комплекса фермента с ДНК. Интенсивность флуоресценции aPu чувствительна к микроокружению этого остатка и позволяет регистрировать локальные конформационные изменения ДНК-субстрата в области, близкой к месту расположения aPu. Флуоресцентные кривые, полученные методом «остановленного потока», были непосредственно обработаны как интенсивность флуоресценции (F) в любой момент времени реакции (t), равная сумме интенсивностей фоновой флуоресценции и флуоресценции каждого промежуточного комплекса, образованного ферментом с ДНК:

$$F = F_b + \sum_{i=0}^n f_i \times [ES]_i \quad (7)$$

где F_b – фоновая флуоресценция или связанный с оборудованием параметр фотоумножителя («шум»), f_i – молярный коэффициент отклика i -го интермедиата ES_i ($i = 0$ соответствует белку в свободной форме, а $i > 0$ – фермент-субстратным комплексам).

Концентрация каждой формы в механизме описывается набором дифференциальных уравнений, соответствующих кинетической схеме. Программа выполняет численное интегрирование системы обыкновенных дифференциальных уравнений с последующим нелинейным регрессионным анализом методом наименьших квадратов. При осуществлении аппроксимации кривой оптимизируются значения всех соответствующих констант скорости прямой и обратной реакций, как и конкретные молярные «факторы отклика» для всех промежуточных комплексов.

Наборы кинетических кривых, полученные для взаимодействия ДНК-субстратов FRET-F/N, FRET-Hx/N или FRET-U/N (где N = A, C, G или T) с EndoQ были обработаны экспоненциальными уравнениями типа уравнения (8), в котором A_i – амплитуды, а k_{obsi} – наблюдаемые константы скорости первого порядка, при этом число экспоненциальных членов зависело от кривой и составляло от 2 до 4. Для обработки была использована программа Origin 8.1 (Originlab Corp., США):

$$y = \sum_{i=1}^n A_i \exp(-k_{obsi}t) + C \quad (8)$$

2.12. Анализ межмолекулярных взаимодействий с использованием микротермофореза (MST)

Константы связывания ДНК-субстратов FRET-Q4, FRET-F14-Q4 и FRET-F17-Q4 ферментом hAPE1 были определены с помощью метода микротермофореза (MST) на приборе Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies, Германия). Концентрация олигодезоксирибонуклеотидов в экспериментах по титрованию составляла 0,5 мкМ, а концентрацию hAPE1 варьировали от 0,001 до 30,0 мкМ. Реакционные смеси были проинкубированы при 25°C в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 140 мМ KCl и 5,0 мМ MgCl₂ в случае G-квадруплексов, или в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 50 мМ KCl и 5,0 мМ ЭДТА в случае дуплексов с выпетливанием. За время инкубации в используемых буферных условиях не происходило регистрируемого расщепления ДНК-субстратов (рисунок 23).

$$MST - \text{сигнал} = F_{\text{nois}} + F_{\text{amp}} \times [hAPE1]/(1/K_{\text{bind}} + [hAPE1]) \quad (9)$$

где F_{nois} – фоновый сигнал, F_{amp} – амплитуда изменения MST сигнала, а K_{bind} – равновесная константа ассоциации (M⁻¹) фермент-субстратного комплекса.

2.13. Статистический анализ

Для статистической обработки данных, полученных при анализе активности ферментов zAPE1, xAPE1, Rrp1 и EndoQ в стационарных условиях использовали однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным критерием наименьшей значимости Тьюки (Tukey LSD). Значение $p \leq 0.05$ отражало статистически достоверные отличия. Для статистического анализа использовали программу STATISTICA 10.0.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Активность апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы человека hAPE1 по отношению к поврежденной ДНК с неканонической структурой

Анализ конформационных изменений дуплексных ДНК-субстратов, содержащих различные повреждения, в составе комплекса с ферментом hAPE1 методом двойного электрон-электронного резонанса [18] позволил установить особенности фермент-субстратных комплексов при дискриминации различных поврежденных нуклеотидов. В этой же работе авторы провели предстационарный кинетический анализ формирования фермент-субстратных комплексов с данными ДНК-субстратами. Совокупный анализ равновесных данных PELDOR и кинетических данных по FRET позволил сделать вывод о том, что связывание ДНК ферментом hAPE1 приводит к значительному, зависящему от типа повреждения, изгибанию ДНК-дуплекса. Полученные данные позволили предположить, что нарушение структуры ДНК в ответ на образование контактов с аминокислотными остатками ДНК-связывающего центра в первичном фермент-субстратном комплексе является одним из ключевых факторов, обеспечивающих специфичность фермента к конкретному набору поврежденных нуклеотидов. Методом молекулярной динамики было показано [18], что поврежденные нуклеотиды, такие как ϵ A, α A, DHU и F-сайт, расположенные в активном центре hAPE1, не образуют с аминокислотными остатками фермента никаких специфичных контактов. Таким образом, полученные данные позволили заключить, что сама по себе способность поврежденного нуклеотида выворачиваться из двойной цепи ДНК и располагаться в кармане активного центра в ответ на образование контактов между аминокислотными остатками ДНК-связывающего центра и молекулой ДНК может быть ключевым фактором, отвечающим за субстратную специфичность hAPE1 [18,19]. Правдоподобной экстраполяцией этой модели распознавания специфического сайта является предположение о том, что фермент hAPE1 способен расщеплять ДНК в неканонических структурах, облегчающих выворачивание нуклеотидов из ДНК.

3.1.1. Разработка модельных ДНК-субстратов, формирующих неканонические структуры

Для того чтобы проверить адекватность предложенной модели, в качестве модельных ДНК-субстратов с неканонической структурой были разработаны и синтезированы олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие четыре повтора TTAGGG теломерной ДНК человека, а также олигодезоксирибонуклеотиды, формирующие ДНК-дуплексы с выпетливанием поврежденной или неповрежденной цепи (рисунок 20).

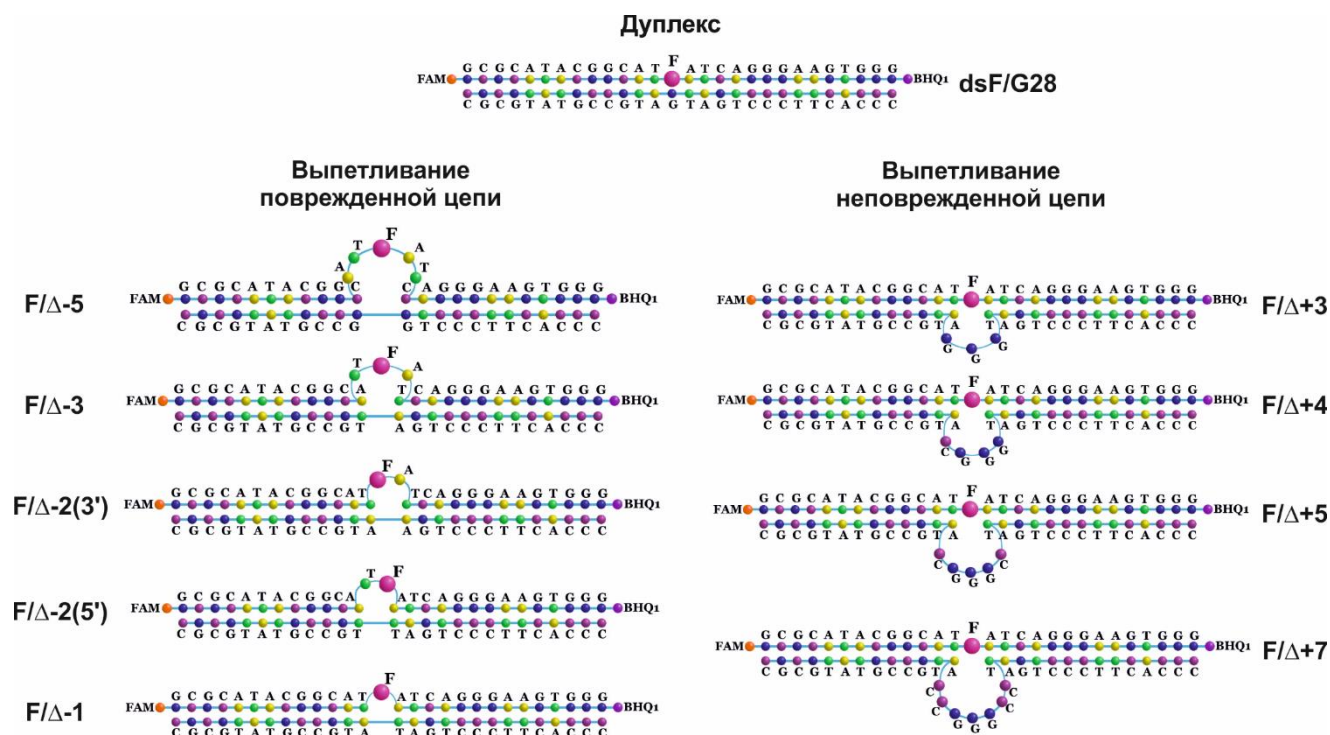


Рисунок 20. Схематические структуры контрольного ДНК дуплекса (содержащего F-сайт) и ДНК дуплексов, содержащих F-сайт с выпетливанием поврежденной (1-5 нуклеотидов) или неповрежденной (3-7 нуклеотидов) цепи. Олигодезоксирибонуклеотиды содержали FRET-пару FAM/BHQ1, на 5'- и 3'-концах цепи, содержащей F-сайт.

Структурные особенности теломерного G-квадруплекса человека, сформированного неповрежденными олигонуклеотидами в растворе, содержащем Na^+ либо K^+ , были описаны ранее [311–315]. Стандартным методом для изучения укладки G-квадруплексов ДНК является спектроскопия кругового дихроизма [316]. Существует три наиболее распространенные топологии, основанные на взаимной ориентации соседних цепей, а именно параллельная (рисунок 21А), антипараллельная (рисунок 21Б) и гибридная (рисунок 21В), и каждая характеризуется своим типом CD-спектра [317,318].

В качестве поврежденного нуклеотида был использован F-сайт, который располагали либо в петлевой либо в коровой части G-квадруплекса (рисунки 21Г-Е). Кроме того, для регистрации конформационных изменений ДНК-субстратов в ходе взаимодействия с hAPE1 в олигодезоксирибонуклеотиды были введены либо флуорофорная группа aPc, расположенная с 3'- либо 5'-стороны от поврежденного нуклеотида, либо FRET-пара FAM/BHQ1, на 5'- и 3'-концах олигодезоксирибонуклеотидов.

Формирование в используемых условиях экспериментов G-квадруплексной структуры последовательностью Q4, содержащей четыре теломерных повтора TTAGGG (таблица 1) было подтверждено посредством CD-спектроскопии (рисунок 22). CD-спектр Q4 квадруплекса, не содержащего флуорофорных меток (рисунок 22Б), имеет максимум сигнала на длине волны

295 нм, что характерно для гибридного типа укладки. В то же время CD-спектр FRET-Q4 G-квадруплекса, меченого FAM с 5'-конца и BHQ1 с 3'-конца, обладал более высокой амплитудой на длине волны 265 нм, что более характерно для параллельной укладки G-квадруплекса (рисунок 21Г). Ожидается, введение F-сайта в область петли G-квадруплекса (FRET-F14-Q4, рисунок 21Д) не приводило к значительным изменениям в CD-спектре. Более того, CD-спектр G-квадруплекса FRET-F17-Q4 (рисунок 21Е), который содержал F-сайт в области G-ядра квадруплекса, также был очень похож на спектр G-квадруплекса FRET-Q4, что подтверждает формирование G-квадруплексных структур поврежденными олигодезоксирибонуклеотидами FRET-F14-Q4 и FRET-F17-Q4.

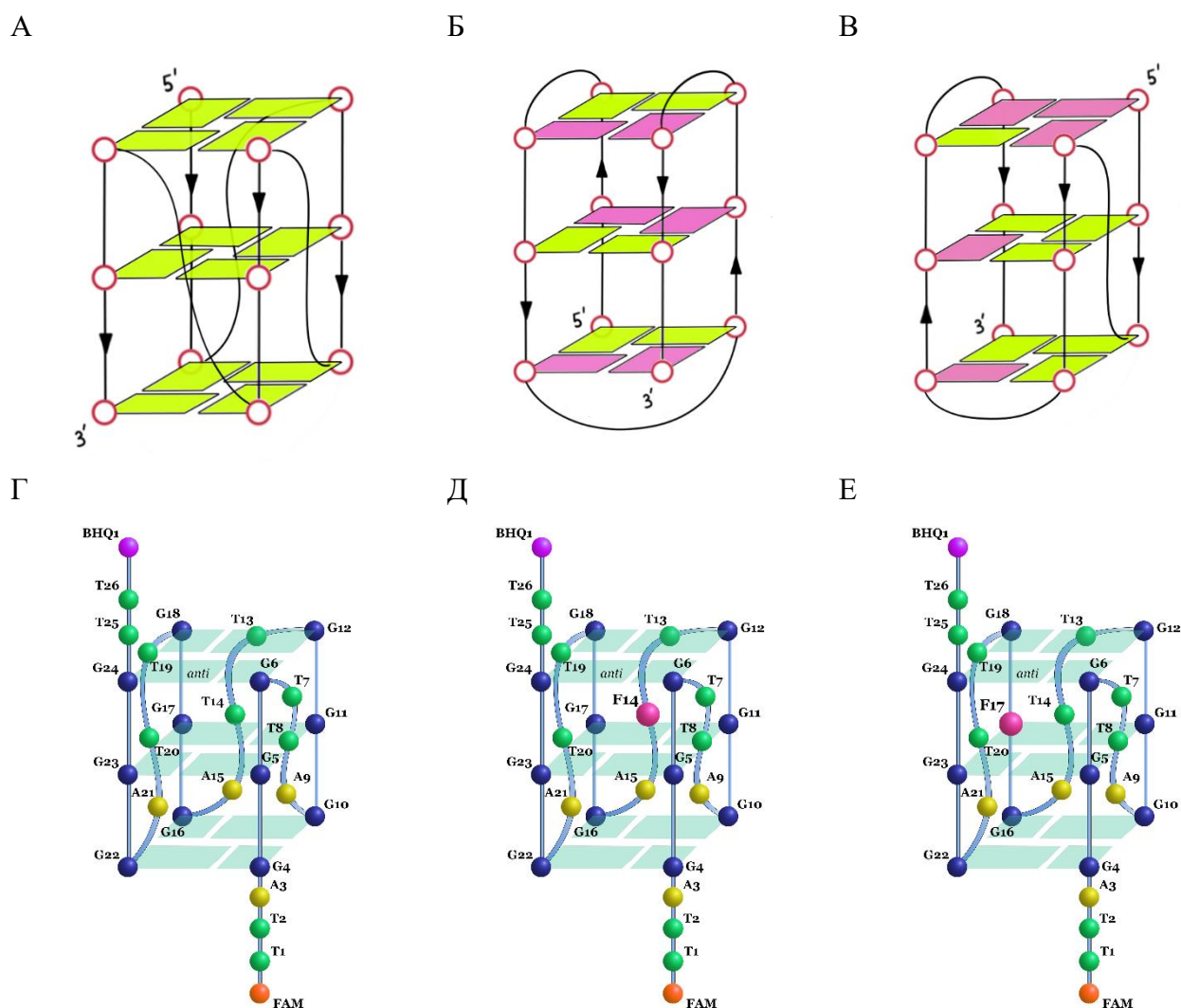


Рисунок 21. Типы топологической укладки мономолекулярных G-квадруплексных структур: параллельная (А), антипараллельная (Б) и гибридная (В). Схематические структуры мономолекулярного теломерного G-квадруплекса человека в параллельной топологии, неповрежденного (Г) или содержащего F-сайт в петлевой части (Д), или коровой части G-квадруплексной структуры (Е).

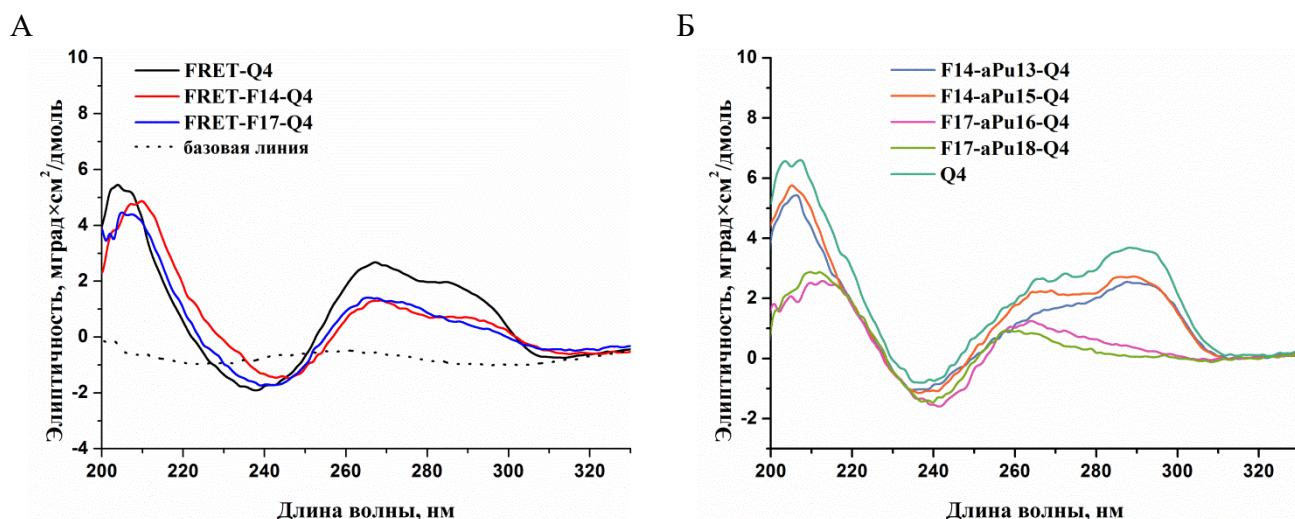


Рисунок 22. CD-спектры поврежденных и неповрежденных G-квадруплексов, использованных в работе. (А) Сравнение FAM-меченых FRET-Q4, FRET-F14-Q4 и FRET-F17-Q4 G-квадруплексов. (Б) Сравнение немеченого Q4 G-квадруплекса и меченых aPu F14-Q4 и F17-Q4 G-квадруплексов. CD-спектры были записаны при 25°C в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5) 140 мМ KCl и 5 мМ MgCl₂.

3.1.2. Анализ накопления продуктов расщепления поврежденных ДНК-субстратов с неканонической структурой методом гель-электрофореза

Для того чтобы установить активность фермента hAPE1 по отношению к поврежденным ДНК-субстратам, формирующим G-квадруплексные структуры, были выполнены эксперименты по регистрации продуктов реакции расщепления 5'-FAM-меченых ДНК-субстратов FRET-Q4, FRET-F17-Q4 и FRET-F14-Q4, катализируемой ферментом hAPE1. Фермент в концентрации 6,0 мкМ добавляли к 2,0 мкМ субстрата, после чего аликвоты реакционной смеси отбирали через определенные промежутки времени, и реакцию в них останавливали, как описано ранее (раздел 2.6 Материалов и методов). Отобранные пробы наносили на денатурирующий ПААГ; электрофорез, визуализация ДНК и количественный анализ были проведены, как описано в разделе 2.6 Материалов и методов. Анализ продуктов, образующихся в процессе взаимодействия hAPE1 с олигодезоксирибонуклеотидами FRET-F17-Q4 и FRET-F14-Q4, показал, что расщепление F-сайта происходило в обоих случаях (рисунки 23А, Б). Эти данные указывают на то, что фермент hAPE1 способен распознавать и процессировать F-сайт и в G-ядре, и в петлевом участке G-квадруплекса с параллельной топологией укладки. При этом расщепление повреждения в G-ядре квадруплекса происходило в пять раз эффективнее, чем в петлевом участке ($k_{\text{obs}} = 0,021 \pm 0,003 \text{ с}^{-1}$ и $0,0044 \pm 0,0004 \text{ с}^{-1}$, соответственно, рисунок 23Г). Кроме того, взаимодействие hAPE1 с двумя поврежденными G-квадруплексами и неповрежденным FRET-Q4 приводило к медленной 3'-5'-экзонуклеазной деградации ДНК. Эта реакция приводила к постепенному накоплению единственного превалирующего продукта (рисунки 23А-В), который представлял собой нерасщепляемый

ввиду своего малого размера конечный продукт медленной 3'-5'-экзонуклеазной деградации субстрата. Эти данные согласуются и дополняют данные, представленные в работе Zhou с коллегами [319], в которой высказывается предположение, что hAPE1 расщепляет F-сайт в сформированном в присутствии Na^+ антипараллельном G-квадруплексе (при этом F-сайт расположен в центре G-ядра), но не расщепляет гибридную топологию теломерного G-квадруплекса, сформированную в присутствии K^+ (F-сайт находится с 5'-стороны в G-ядре). Более того, в недавнем исследовании [314] было продемонстрировано, что размещение F-сайта в различных положениях ядра теломерного G-квадруплекса приводит к значительным изменениям в его гибридной конформации. Было обнаружено, что поврежденный G-квадруплекс с превалирующей параллельной топологией более предпочтителен для ферментативного расщепления [314]. Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что эффективность расщепления F-сайта зависит от топологии укладки G-квадруплекса. Эта топология может быть связана и с расположением F-сайта относительно G-ядра квадруплекса, и с концентрациями Na^+/K^+ . Более того, расщепление F-сайта в петлевой области оказалось менее эффективным, чем в G-ядре.

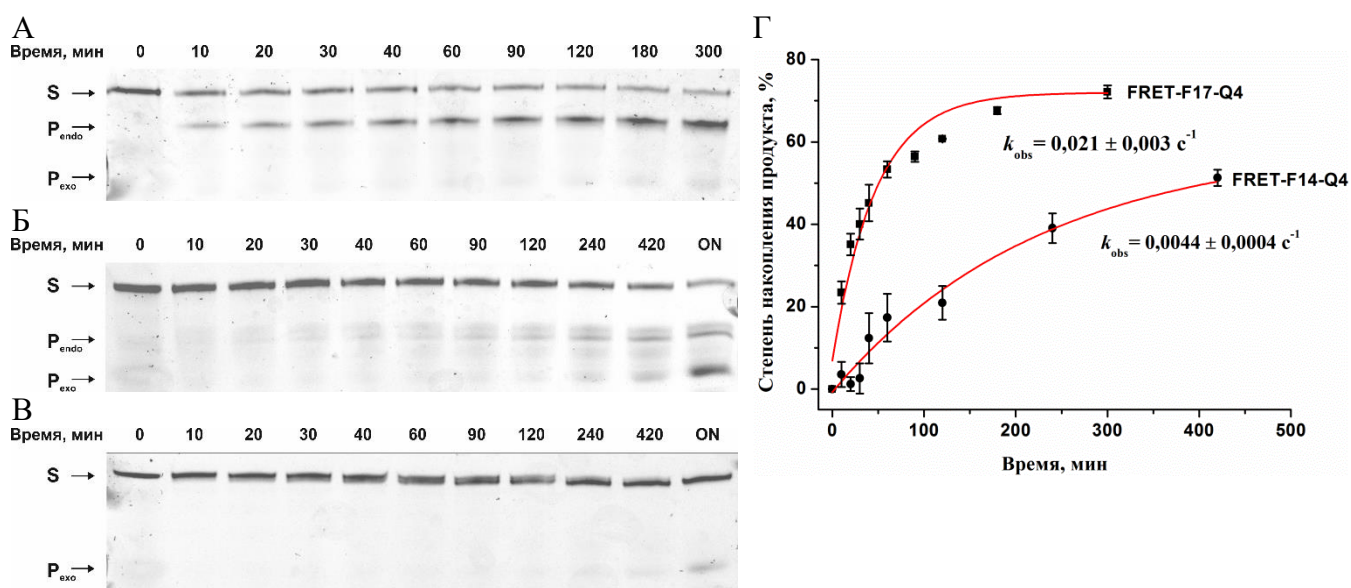


Рисунок 23. Эндонуклеазная активность hAPE1 по отношению к поврежденным ДНК-субстратам с G-квадруплексной структурой. Разделение продуктов расщепления FRET-F17-Q4 (А), FRET-F14-Q4 (Б) или неповрежденного FRET-Q4 (В) G-квадруплекса ферментом hAPE1 с помощью денатурирующего гель-электрофореза. (Г) Накопление продукта во времени. Концентрации ДНК-субстратов и hAPE1 составляют 1,0 и 3,0 мкМ, соответственно. «ON» означает инкубацию в течение ночи. S – 26-нуклеотидный субстрат, формирующий G-квадруплексную структуру, P_{endo} – продукт расщепления FRET-F14-Q4 и FRET-F17-Q4 субстратов длиной 13 или 16 нуклеотидов, соответственно, P_{exo} – короткие продукты 3'-5'-экзонуклеазной деградации субстрата. Кривые накопления продукта были обработаны экспоненциальной кривой (уравнение 1), указанные ошибки являются результатом обработки; значение $r^2 > 0,97$.

Чтобы облегчить протекание второй скорость-лимитирующей стадии связывания субстрата с неканонической структурой и оценить влияние выворачивания целевого нуклеотида в различных структурах, был разработан ряд содержащих F-сайт ДНК-дуплексов с выпетливанием поврежденной (1-5 нуклеотидов) или неповрежденной (3-7 нуклеотидов) цепи (рисунок 20). Для того, чтобы установить активность фермента hAPE1 по отношению к поврежденным ДНК-субстратам с выпетливаниями, были выполнены эксперименты по регистрации накопления продуктов реакции расщепления в геле в ходе взаимодействия hAPE1 с ДНК-субстратами F/-Δ1, F/-Δ2(5'), F/-Δ2(3'), F/-Δ3, F/-Δ5 (рисунок 24А), F/+Δ3, F/+Δ4, F/+Δ5 или F/+Δ7 (рисунок 24Б), а также контрольными ДНК-дуплексом dsF/G28 и о.ц. ДНК ssF28 (рисунки 24А, Б), содержащими FAM на 5'-конце. Фермент hAPE1 в концентрации 20,0 нМ добавляли к 2,0 мкМ субстрату, после чего аликвоты реакционной смеси отбирали через определенные промежутки времени, и реакцию в них останавливали, как описано ранее (раздел 2.6 Материалов и методов). Отобранные пробы наносили на денатурирующий ПААГ; электрофорез, визуализация ДНК и количественный анализ были проведены, как описано выше (раздел 2.6 Материалов и методов). Скорость расщепления ДНК была оценена как первоначальный наклон кинетической кривой (рисунки 24В, Г).

Следует отметить, что выпетливание одного только F-сайта (F/-Δ1) снижает начальную скорость реакции в два раза по сравнению с полностью д.ц. субстратом dsF/G28 (рисунок 24В), что позволяет предположить, что изгиб субстрата, вызванный внеспиральным положением F-сайта, частично нарушает взаимодействия между ДНК-связывающим сайтом hAPE1 и субстратом. Более того, увеличение выпяченного фрагмента до двух (F/-Δ2(5')) или трех (F/-Δ3) нуклеотидов не оказало дополнительного эффекта на ферментативную активность, и она так и осталась на уровне 50% от активности на полностью комплементарном дуплексе (рисунок 24В). Таким образом, исключение F-сайта из двойной спирали ДНК вследствие выпетливания поврежденной цепи не является ключевым шагом в процессе распознавания повреждения. Неожиданно сильное влияние на ферментативную активность (рисунок 24В) оказывает выпетливание двух нуклеотидов [в субстрате F/-Δ2(3'), который содержит F-сайт с 3'-стороны от комплементарной части дуплекса], что подкрепляет заключение о том, что эта позиция поврежденного нуклеотида блокирует формирование каталитически активного комплекса. Анализ литературных данных показал, что ДНК- и РНК-дуплексы, содержащие выпетливание, способны принимать множество различных конформаций в зависимости от размера выпетливания [320–322]. Как следствие, эффективность расщепления поврежденной ДНК, содержащей выпетливания, зависит и от способности конкретной структуры выворачивать поврежденный нуклеотид, и от топологической организации поврежденного нуклеотида в этой структуре.

hAPE1 не гидролизует F-сайт в о.ц. олигодезоксирибонуклеотиде ssF28 (рисунок 24А), что указывает на неспособность фермента формировать контакты с о.ц. субстратом, необходимые для размещения поврежденного нуклеотида в активном центре. Соответственно, потеря активности по отношению к субстрату F/-Δ5 (рисунок 24А) означает, что выпетливание сразу пяти нуклеотидов полностью имитирует одноцепочечный участок цепи, и не позволяет ферменту сформировать подходящие контакты с субстратом. Выпетливание от 3 до 7 нуклеотидов неповрежденной цепи напротив F-сайта (рисунок 24Г) снижает активность фермента до 50% в сравнении с полностью комплементарным дуплексом, независимо от размера выпетливания. Этот эффект, скорее всего, связан с тем, что фермент по большей части формирует контакты именно с поврежденной цепью ДНК.

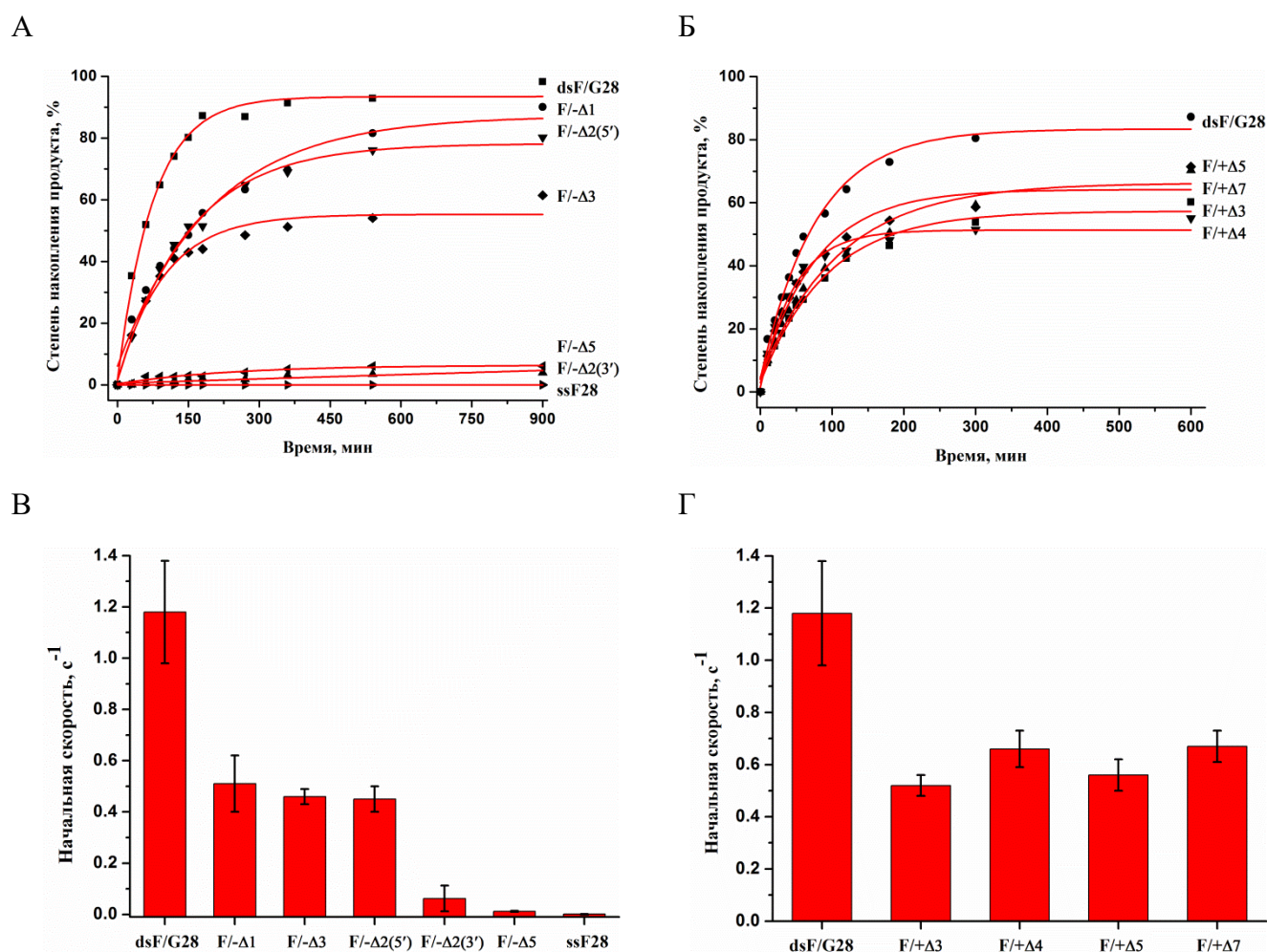


Рисунок 24. Эндонуклеазная активность hAPE1 по отношению к ДНК-субстратам, содержащим выпетливания. Кинетические кривые расщепления ДНК-субстратов, содержащих F-сайт с выпетливанием поврежденной (А) или неповрежденной (Б) цепи, получены с помощью гель-электрофореза. Скорость расщепления ДНК-субстратов была оценена как первоначальный наклон соответствующей кинетической кривой (В, Г). Концентрации ДНК-субстратов и АРЕ1 составляли 1,0 мкМ и 10,0 нМ, соответственно. Остальные условия реакции описаны в разделе 2.9 Материалов и методов.

Таким образом, можно заключить, что выпетливание 5 нуклеотидов в поврежденной цепи является критичным по длине о.ц. участком для распознавания F-сайта в ДНК и для формирования каталитически компетентного комплекса. Напротив, потеря активности в случае субстрата F/- $\Delta 2(3')$ указывает на то, что положение F-сайта в последовательности с выпетливанием двух нуклеотидов TF [F/- $\Delta 2(5')$] или FA [F/- $\Delta 2(3')$] также играет чрезвычайно важную роль в формировании каталитически компетентного комплекса.

3.1.3. Определение константы связывания неканонических ДНК-субстратов ферментом hAPE1

Чтобы исключить возможность того, что низкая активность в расщеплении поврежденных G-квадруплексов связана с неэффективным формированием комплекса между субстратом и ферментом в используемых экспериментальных условиях, был проведен MST анализ для оценки константы связывания между hAPE1 и ДНК-субстратами, формирующими G-квадруплекс (рисунок 25А). Стоит отметить, что определение константы связывания K_{bind} для FRET-F14-Q4-субстрата на основании кривой титрования MST, оказалось невозможным вследствие низкого соотношения уровня сигнал/шум. Тем не менее, исследование с привлечением MST показало, что hAPE1 связывает субстраты FRET-Q4 и FRET-F17-Q4 с очень близким уровнем аффинности ($0,4 \pm 0,2$ и $0,5 \pm 0,2$ мкМ⁻¹, соответственно).

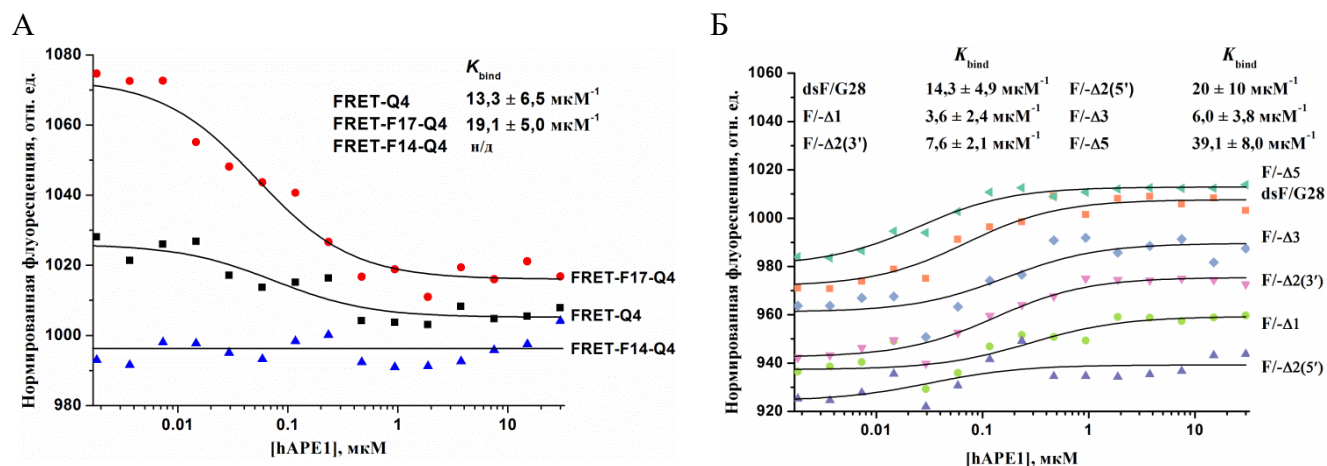


Рисунок 25. Определение констант связывания для фермент-субстратных комплексов с G-квадруплексами (А) и дуплексами, содержащими выпетливание (Б) с использованием MST. Буферные условия описаны в разделе 2.12 Материалов и методов; значения констант связывания были посчитаны согласно уравнению 9. Указанные ошибки являются результатом обработки; значение $r^2 > 0,86$.

Чтобы определить эффективность формирования комплекса между субстратами, содержащими выпетливания, и ферментом в используемых экспериментальных условиях, был проведен MST анализ для оценки константы связывания между hAPE1 и ДНК-субстратами с выпетливанием поврежденной цепи (рисунок 25Б). Выпетливание единственного F-сайта (F/- $\Delta 1$) не только снижает начальную скорость реакции, но также приводит к четырехкратному снижению константы формирования фермент-субстратного комплекса K_{bind} , по сравнению с dsF/G28 (рисунок 25Б). При этом увеличение выпетливания до двух (F/- $\Delta 2(5')$ или F/- $\Delta 2(3')$) или трех (F/- $\Delta 3$) нуклеотидов не приводит к значительному дополнительному снижению эффективности связывания субстрата по сравнению с выпетливанием единственного F-сайта (рисунок 25Б). Несмотря на полную потерю ферментативной активности на структуре F/- $\Delta 5$, K_{bind} для этого субстрата имеет наибольшее значение среди всех исследуемых субстратов (рисунок 25Б).

3.1.4. Влияние концентрации фермента hAPE1 на эффективность расщепления поврежденного G-квадруплекса в стационарных условиях

Для дальнейшей оценки стадий связывания ДНК и каталитических стадий в процессе взаимодействия hAPE1 с FRET-F17-Q4-субстратом была изучена кинетика накопления продуктов реакции при различных концентрациях hAPE1 (рисунок 26А). Полученные кинетические кривые позволили рассчитать наблюдаемые константы скорости, характеризующие расщепление FRET-F17-Q4-субстрата. Зависимость наблюдаемых констант скорости k_{obs} от концентрации hAPE1 имела гиперболический вид (рисунок 26Б), что соответствует двухстадийной кинетической схеме с быстрым первоначальным равновесным связыванием субстрата [323]. Действительно зависимость k_{obs} от концентрации hAPE1 удовлетворяла гиперболическому уравнению 2 и позволила рассчитать константу равновесия первой стадии связывания ДНК и константы скорости второй стадии связывания. Значение равновесной константы K_{bind} , характеризующей формирование первичного фермент-субстратного комплекса, было равно $0,5 \pm 0,1 \text{ мкМ}^{-1}$. Данное значение указывает на эффективное связывание hAPE1 с поврежденным G-квадруплексом на ранней стадии взаимодействия. Константа скорости k_2 , характеризующая вторую стадию взаимодействия, была равна $0,034 \pm 0,002 \text{ с}^{-1}$, в то время как значение константы k_2 было близко к нулю. Это указывало на то, что медленная вторая стадия должна увеличивать общую константу связывания, значение которой, определенное методом MST, равно $19,1 \pm 5,0 \text{ мкМ}^{-1}$.

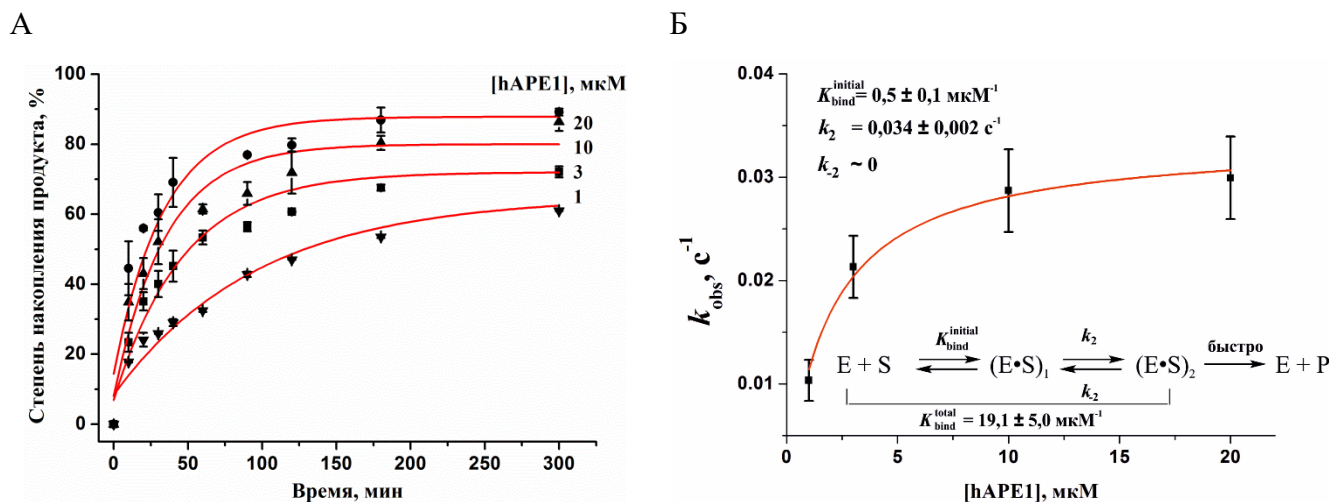


Рисунок 26. Влияние концентрации hAPE1 на расщепление субстрата FRET-F17-Q4 в стационарных условиях. (А) Накопление продукта реакции. $[\text{FRET-F17-Q4}] = 1,0 \text{ мкМ}$, концентрации hAPE1 указаны рядом с кривыми накопления продукта. Остальные условия реакции описаны в разделе 2.9 Материалов и методов. (Б) Зависимость наблюдаемых констант скорости k_{obs} от концентрации hAPE1. Данные были обработаны гиперболическим уравнением (2), указанные ошибки являются результатом обработки; значение $r^2 > 0,96$.

Известно, что процесс расщепления F-сайта в дуплексных субстратах является быстрым, и значения каталитической константы, характеризующей этот процесс, варьируют по разным источникам от $0,3$ до $5,5 \text{ с}^{-1}$ [190,200,213,215,231], от 68 до 97 с^{-1} [212] или даже в пределах 700 – 850 с^{-1} [175,199], в зависимости от последовательности ДНК-дуплекса, буферных условий, и методов регистрации расщепления. Таким образом, значение константы скорости второй стадии k_2 , полученное в данной работе, было как минимум в 10 раз меньше каталитической константы скорости, из чего можно сделать вывод, что формирование каталитически компетентного комплекса в случае G-квадруплексного субстрата является скоростью-лимитирующим этапом расщепления ДНК (рисунок 26Б).

3.1.5. Конформационные изменения G-квадруплексов при взаимодействии с ферментом hAPE1

Поскольку распознавание специфического сайта в субстрате сопровождается конформационной подстройкой hAPE1 и ДНК для оптимизации специфических контактов в фермент-субстратном комплексе, нами был выполнен кинетический анализ конформационных изменений hAPE1 и G-квадруплекса в ходе формирования комплекса в предстационарных условиях методом «остановленного потока». Этот метод применяется для исследований в области предстационарной кинетики различных ферментативных систем с использованием различных типов флуоресценции [18,324–326]. Конформационные перестройки hAPE1 и ДНК в реальном времени в ходе их взаимодействия были визуализированы посредством регистрации собственной флуоресценции остатков триптофана белка hAPE1 или флуоресценции меток,

встроенных в ДНК-субстрат, например aPu и FAM/BHQ1 FRET-пары. Стоит отметить, что фермент hAPE1 содержит семь остатков триптофана (Trp67, Trp75, Trp83, Trp119, Trp188, Trp267 и Trp280). Предполагается, что регистрация конформационных переходов hAPE1 в процессе взаимодействия с субстратами возможна, главным образом, благодаря чувствительности к изменениям микроокружения остатка Trp280, который расположен в активном центре фермента [18,190,200]. Профиль изменений интенсивности флуоресценции остатков триптофана в ходе реакции hAPE1 с контрольным ДНК-дуплексом dsF/G28, содержащим F-сайт, состоял из нескольких характерных фаз (рисунок 27А), которые были описаны ранее как стадии связывания и катализа [212]. Снижение интенсивности флуоресценции на начальной части кинетических кривых соответствует формированию каталитически компетентного комплекса. Каталитическая стадия процесса приводит к формированию продукта и последующей диссоциации комплекса фермент-продукт, что сопровождается ростом интенсивности флуоресценции триптофана на более поздних временах (начиная примерно с 0,1 с, рисунок 27А). Взаимодействие hAPE1 с поврежденным или неповрежденным G-квадруplexами не приводило к какому-либо изменению в интенсивности флуоресценции триптофана, таким образом, подкрепляя данные, полученные в стационарных условиях методом гель-электрофореза (рисунок 26Б), согласно которым формирование каталитически компетентного комплекса происходит значительно медленнее, чем реакция расщепления. Таким образом, регистрация каталитического комплекса посредством регистрации изменений флуоресценции триптофана оказалась невозможна ввиду низкой концентрации этого комплекса в реакционной смеси. С другой стороны, эти данные также могут указывать на то, что характер связывания Q4 структур отличается от такового для ДНК-дуплексов, и тогда связывание G-квадруplexа ферментом не приводит к тушению флуоресценции остатков триптофана.

Чтобы проанализировать процесс связывания субстрата, был разработан ряд поврежденных G-квадруplexов, содержащих остаток aPu с 3' или 5'-стороны от F-сайта в субстратах F14-Q4 и F17-Q4. Анализ CD-спектров показал, что введение aPu в область G-ядра квадруplexа рядом с F17 (F17-aPu16-Q4 и F17-aPu18-Q4, рисунок 22Б) приводит к предпочтительному формированию G-квадруplexа параллельного типа, в то время как G-квадруplexы, содержащие aPu в области повреждения в петлевом участке (F14-aPu13-Q4 и F14-aPu15-Q4), принимали гибридную конформацию. Анализ изменений флуоресценции остатков aPu во всех ДНК-субстратах в процессе взаимодействия с hAPE1 (рисунок 27Б) показал, что только F17-aPu16-Q4 оказался достаточно чувствительным для регистрации формирования фермент-субстратного комплекса. Тем не менее, регистрация FRET-сигнала позволила зафиксировать взаимодействия hAPE1 и с FRET-F14-Q4, и с FRET-F17-Q4 ДНК-

субстратами, несущими F-сайт в петлевой и коровой областях G-квадруплекса, соответственно (рисунок 27В).

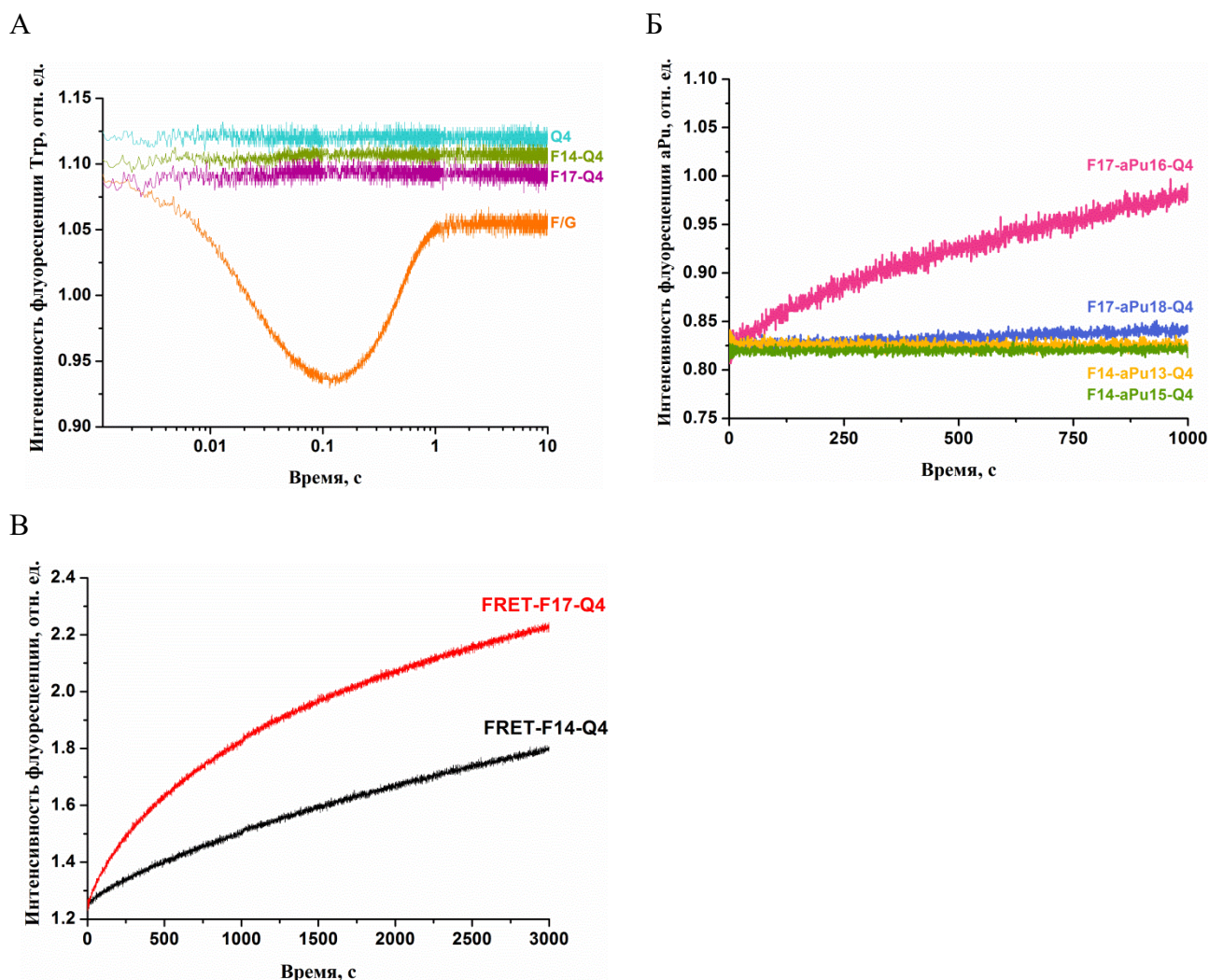


Рисунок 27. Сравнение профилей интенсивности флуоресценции в ходе взаимодействия hAPE1 с G-квадруплексами, содержащими F-сайт, зарегистрированных для Trp (А), aRu (Б) или FAM (В). [ДНК] = 1,0 мМ, [hAPE1] = 2,0 мкМ.

3.1.5.1. Сравнительный анализ конформационных изменений G-квадруплексных ДНК-субстратов, содержащих FRET-пару или aRu

Сравнение профилей изменений интенсивности флуоресценции в ходе взаимодействия hAPE1 с G-квадруплексами, содержащими F-сайт, позволило нам выбрать FAM/BNQ1-меченый FRET-F17-Q4 G-квадруплекс и F17-aPu16-Q4 G-квадруплекс в качестве подходящих моделей для дальнейшего детального анализа реакции с hAPE1 (рисунок 27). Действительно, интенсивность флуоресценции aRu чувствительна к микроокружению этого остатка и позволяет регистрировать локальные конформационные изменения ДНК-субстрата в области, близкой к F-сайту (рисунок 28А). FAM/BNQ1-меченый FRET-F17-Q4-субстрат, в свою очередь, позволил наблюдать «глобальные» конформационные изменения, которые приводят к изменению

расстояния между красителем FAM и тушителем BHQ1 в ходе связывания и расщепления ДНК-субстрата (рисунок 28Б). Концентрацию фермента hAPE1 варьировали от 0,5 до 20,0 мкМ.

Полученные кинетические кривые соответствовали механизму, содержащему одну обратимую стадию связывания субстрата ферментом, и второй скорость-лимитирующий этап превращения фермент-субстратного комплекса в каталитически компетентный, в котором происходит быстрая реакция гидролиза (схема 3). Полученные данные указывали на то, что различные типы регистрации приводят к различным значениям первоначальной константы связывания $K_{\text{bind}}^{\text{initial}}$ (таблица 3), свидетельствуя о том, что первоначальный переходный комплекс (E·S), зарегистрированный различными способами, на самом деле отражает только часть процессов, необходимых для достижения каталитически компетентного состояния и, соответственно, данный комплекс характеризует разную «глубину» процесса распознавания повреждения. При этом, необходимо отметить, что все методы регистрации привели к получению одинакового значения константы скорости k_2 , характеризующей второй медленный этап связывания, приводящий к формированию каталитически компетентного комплекса и последующей быстрой каталитической реакции. Полученные данные указывают на то, что молекулярные процессы, которые протекают в ходе второго этапа формирования каталитического комплекса, являются ключевыми для распознавания поврежденного нуклеотида и, следовательно, облегчение их протекания значительно увеличит эффективность фермента. Более того, на этот этап процесса может оказывать влияние вторичная структура ДНК.

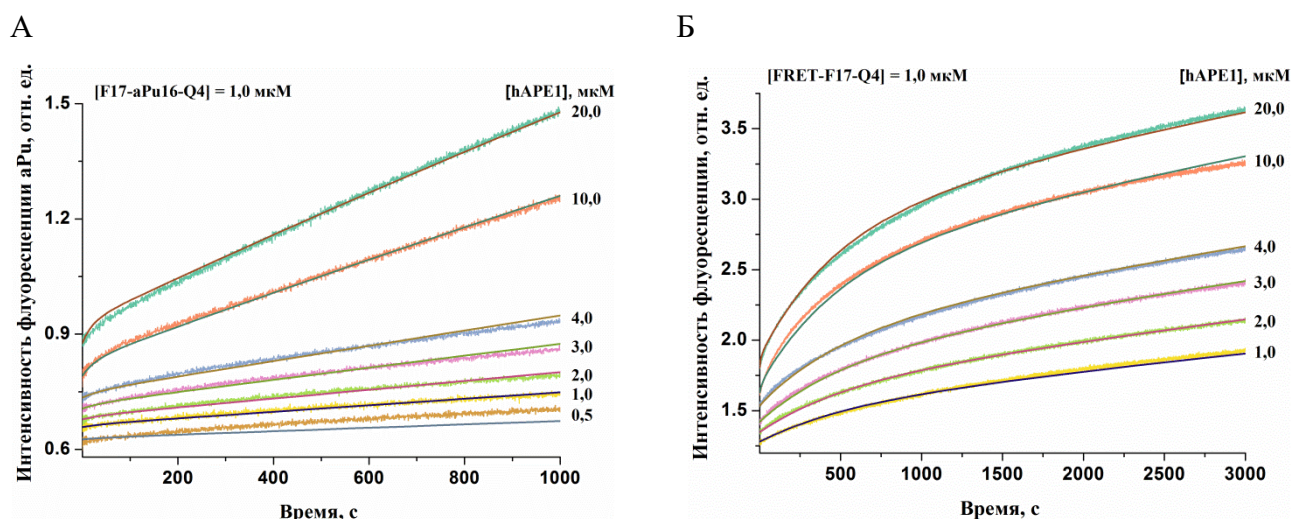


Рисунок 28. Взаимодействие hAPE1 с поврежденным G-квадруплексом, содержащим F-сайт в 17^М положении. Кинетические кривые, зарегистрированные по изменению флуоресценции aRu (А) или FRET-пары (Б). [ДНК] = 1,0 мМ, концентрация hAPE1 указана на панели справа.

Схема 3. Кинетический механизм взаимодействия hAPE1 с поврежденным G-квадруплексом.



где E – фермент hAPE1, S – ДНК-субстрат, (E·S) – фермент-субстратный комплекс, P – продукт реакции.

Таблица 3. Константы скорости и равновесные константы, характеризующие взаимодействие hAPE1 с поврежденным G-квадруплексом			
Константы	Метод		
	«Остановленный поток»		Гель-электрофорез
	FRET	aPu	
$K_{\text{bind}}^{\text{initial}}$, мкМ ⁻¹	0,08±0,02	0,003±0,001	0,5±0,1
k_2 , с ⁻¹	0,03±0,01	0,03±0,01	0,034±0,002

3.1.6. Предполагаемый механизм распознавания нуклеотидов-мишеней ферментом hAPE1

В ходе экспериментов было продемонстрировано, что теломерный G-квадруплекс человека, содержащий F-сайт, расщепляется в процессе каталитической эндонуклеазной реакции с AP-эндонуклеазой hAPE1. Механизм целевого распознавания нуклеотидов состоит из двух основных этапов: первоначальное формирование переходного комплекса и его последующее скорость-лимитирующее превращение в каталитически компетентный.

Данные, полученные в ходе анализа активности hAPE1 в расщеплении ДНК-дуплексов, содержащих выпетливание F-содержащей или неповрежденной цепи, указывают на отсутствие зависимости между эффективностью расщепления ДНК и размером выпетливания неповрежденной цепи. Это подтверждает способность фермента размещать большие нуклеотидные фрагменты за пределами своего активного сайта. Эти данные также подтверждают идею о том, что расщепление F-сайта в G-квадруплексах происходит без значительного нарушения структуры G-квадруплекса, при этом о.ц. участок в области расположения F-сайта составляет не более 5 нуклеотидов, а крупные неповрежденные участки G-квадруплексной структуры размещаются вне активного центра фермента, как было показано на субстратах с размером выпетливания неповрежденной комплементарной цепи от 3 до 7 нуклеотидов.

Широкая субстратная специфичность hAPE1 по отношению к F-сайту, некоторым поврежденным нуклеотидам (NIR-активность), природным 2'-дезоксирибонуклеотидам (3'-5'-экзонуклеазная активность) и рибонуклеотидам (эндорибонуклеазная активность), а также высокая ферментативная активность на ДНК-субстратах с неканонической структурой говорит

в пользу того, что в активном центре hAPE1 не происходит формирования прямых специфических контактов с поврежденными или природными целевыми нуклеотидами. Совокупность литературных данных и данных, полученных в ходе настоящего исследования, позволяет предложить общий механизм распознавания нуклеотидов-мишеней ферментом hAPE1 (рисунок 29). В данной модели узнавания специфического сайта формирование первичного фермент-субстратного комплекса является ключевым фактором, обеспечивающим специфичность фермента к определенным поврежденным или неповрежденным нуклеотидам. Последовательные конформационные изменения субстрата в ответ на индуцированные ферментом взаимодействия чрезвычайно важны для формирования каталитически компетентного комплекса. Комплексное сочетание молекулярных процессов, происходящих в ходе этих перестроек, таких как образование сети неспецифических контактов в субстрат-связывающем центре фермента, изгибание субстрата, локальное плавление, выворачивание целевого нуклеотида из структуры субстрата и его размещение в активном центре фермента, внедрение аминокислотных остатков в структуру субстрата, формирует поэтапную дискриминацию молекулы субстрата на основании способности его структуры перестраиваться в ходе перечисленных процессов. Полученные результаты позволяют предположить, что именно «конформационный ответ» молекулы ДНК или РНК на неспецифические взаимодействия в субстрат-связывающем центре является ключевым фактором механизма дискриминации субстратов.

Необходимо отметить, что неструктурированная часть N-концевого фрагмента hAPE1 играет важную роль в неспецифическом взаимодействии с ДНК и РНК [212,327], а также оказывает влияние на белок-белковые взаимодействия hAPE1 с нуклеофозмином [328] и другими участниками BER [150,183]. Таким образом, можно предположить, что N-концевая часть hAPE1 также может оказывать влияние на способность фермента связывать неканонические структуры и участвовать в распознавании нуклеотида-мишени.

Будет закономерным предположить, что облегчение протекания некоторых молекулярных процессов, происходящих в ходе связывания, например выворачивание целевого нуклеотида или изгибание субстрата, вследствие особенностей первоначальной структуры субстрата, содержащего неканонические участки структуры, может увеличить скорость расщепления такого субстрата. Однако, необходимо отметить, что помимо выворачивания целевого нуклеотида из структуры субстрата, должен быть учтен и процесс его размещения в активном центре фермента. Имеющиеся в настоящее время литературные данные об активности hAPE1 в отношении поврежденных ДНК-дуплексов с канонической В-формой позволяют проводить сравнение эффективности расщепления различных поврежденных ДНК-дуплексов и, таким образом, сравнивать скорости лимитирующей стадии. Распознавание и расщепление F-

сайта в полностью комплементарных дуплексах ДНК происходит в течение 1 с, в то время как длительность процесса распознавания поврежденных нуклеотидов в дуплексах, например ϵ A, α A или DHU [18], составляет более 1000 с. Более того, природные рибонуклеотиды процессируются ферментом в течение нескольких часов [329]. Таким образом, можно заключить, что природа целевого нуклеотида, который размещается в активном центре фермента, также является крайне важным фактором для формирования каталитически компетентного состояния комплекса hAPE1-субстрат.



Рисунок 29. Предполагаемая модель распознавания нуклеотида-мишени ферментом hAPE1. Структура комплекса hAPE1-ДНК [18].

3.2. Сравнительный анализ субстратной специфичности AP-эндонуклеаз из семейства Xth

3.2.1. Выбор AP-эндонуклеаз, обладающих высокой идентичностью С-концевого каталитического домена с hAPE1

AP-эндонуклеаза человека hAPE1 является одной из наиболее подробно изученных AP-эндонуклеаз. Действительно, совокупность структурных данных [162,181,182,189,201,330,331], кинетических исследований [190,200,212,332], исследований с привлечением методов сайт-направленного мутагенеза [17,193], а также результатов, полученных в ходе выполнения данной работы позволили идентифицировать ключевые стадии взаимодействия hAPE1 с поврежденной ДНК, содержащей AP-сайт, а также ряд поврежденных [18,19,333,334] или неповрежденных [13,240] нуклеотидов. Тем не менее, необходимо отметить, что в литературе отсутствуют данные о том, являются ли особенности субстратной специфичности, установленные для AP-эндонуклеазы hAPE1, общими для всех ферментов структурного семейства Xth. Чтобы установить, является ли предложенный механизм, согласно которому контроль субстратной специфичности hAPE1 определяется способностью поврежденного или неповрежденного целевого нуклеотида выворачиваться из ДНК и располагаться в связывающем кармане фермента в ответ на образование сети неспецифических контактов в субстрат-связывающем центре, общим для ряда ферментов типа APE1 в работе дополнительно использовали AP-эндонуклеазы из нескольких организмов, а именно Rrp1 насекомого *D. melanogaster*, xAPE1 амфибии *X. laevis* и zAPE1 рыбы *D. rerio* (рисунок 30).

Необходимо отметить, что N-концевой фрагмент ферментов типа APE1, исследованных в данной работе, значительно отличается по размерам. Среди исследованных ферментов, наиболее крупный домен (состоящий из 417 аминокислотных остатков) принадлежал Rrp1. Более того, количество основных остатков в N-концевом фрагменте и его суммарный заряд при $pH = 7,0$ (z) также значительно больше у белка Rrp1, чем у остальных изучаемых ферментов: двадцать остатков аргинина и семьдесят четыре остатка лизина у Rrp1 [изоэлектрическая точка (pI) = 10,2, $z = 20,1$], два остатка аргинина и одиннадцать остатков лизина у hAPE1 ($pI = 9,6$, $z = 1$), один остаток аргинина и девять остатков лизина у xAPE1 ($pI = 8,9$, $z = 0,9$), и два остатка аргинина и десять остатков лизина у zAPE1 ($pI = 7,3$, $z = 0$). Оценку значений pI и z для N-концевых фрагментов исследуемых белков проводили с использованием калькулятора свойств пептидов Innovagen (URL: <https://pepcalc.com/>).

Анализ укороченных по N-концу вариантов hAPE1 показал, что эта богатая основными аминокислотными остатками область, помимо участия в redox активности фермента, выполняет стабилизирующую роль при неспецифическом связывании с нуклеиновыми кислотами посредством электростатических взаимодействий [327,328]. Потеря N-концевого фрагмента

влияет на стабильность фермент-субстратного комплекса, а также комплекса фермента с продуктом [335,336], но не оказывает влияния на скорость формирования первичного комплекса или на катализ [212] в случае расщепления ДНК, содержащей AP-сайт. Напротив, этот фрагмент влияет и на скорость формирования и на стабильность первичного комплекса в случае NIR и 3'-5'-экзонуклеазной активностей [10,41,212]. Во многих исследованиях также подчеркивается, что N-концевой фрагмент может вступать в функциональное взаимодействие с различными белками, участвующими в репарации ДНК [150,183,337], транскрипции [146,243,253] и метаболизме РНК [247,328,338]. Таким образом, можно заключить, что N-концевой фрагмент необходим для предварительного низко-аффинного процесса связывания между молекулами фермента и субстрата, которое может играть роль в процессе поиска поврежденного нуклеотида в ДНК или сайта расщепления в РНК, а также участвует в белок-белковой координации фермента с другими участниками репарации.

Поскольку специфические взаимодействия между ферментом и субстратом обеспечиваются С-концевым каталитическим доменом в данной работе при сравнении свойств использованных ферментов типа APE1 внимание было сосредоточено на различиях именно в их каталитическом домене. Выравнивание последовательностей С-концевого каталитического домена четырех AP-эндонуклеаз показало, что почти все остатки аминокислот, участвующие в связывании ДНК, идентичны среди исследуемых ферментов, за исключением остатка Arg181 (нумерация аминокислотных остатков соответствует последовательности hAPE1), который заменен на остаток аспарагина в случае Rrp1, и остатка Asn229, который заменен на остаток треонина в xAPE1. Помимо остатка Asn229, располагающегося в кармане фермента, который отвечает за связывание поврежденных оснований, у фермента xAPE1 еще один аминокислотный остаток, принимающий участие в формировании данного кармана (Ala230), заменен на остаток пролина. Интеркалирующие и каталитические остатки исследованных ферментов идентичны, кроме единственной замены остатка Asp70, координирующего ион Mg^{2+} , на остаток аланина в случае Rrp1.

Rrp1	N-terminus	-----ETKTTVTLDKDAFALPADKEFNLKICSWNVAGLRAWLKKDGLQ	LID	477		
hAPE1	N-terminus	-----EGPALYEDPPDQKTSPSGKPATLKICSWNV	DGLRAWIKKGLDWVK	85		
zAPE1	N-terminus	-----EAPILYEDPPEKLTSDKGRAANMKITSWNV	DGLRAWVKKNGLDWVR	109		
xAPE1	N-terminus	-----EPVVLYEDAPDNVTSADGKKYTLKISSWNV	DGIRAWIKKQGLNWVR	84		
		* : : . : ** ** * : ** : ** :				
Rrp1		LEEPDIFCLQETKCANDQLPEEVTRLPGY-HPY	WLCMP--GGYAGVAIYSKIMPIHVEYG	534		
hAPE1		EEAPDILCLQETKCSSENKLPAELQELPGLSHQYWSAPSDKEG	YSGVGLLSRQCPLKVSYG	145		
zAPE1		KEDPDILCLQETKCAEKALPADITGMPEYPHKYWAGSEDK	EGYSGVAMLCCKTEPLNVTYG	169		
xAPE1		EEDPHIMCLQEIKCAEKLLPPDVKDMPEYPHKYWACPD	EKEGYSGVAMLCCKDKPLNVTYG	144		
		* * . : ** ** * : ** : * * * : ** : ** :				
Rrp1		IGNEEFDDVGRMITAEYEKFYLINVYVPNSGRKLVNLEPRMRWEKLFQAYVKKLDALKPV		594		
hAPE1		IGDEEHDQEG	VIVAEFDSFVLVTAYVP	NAGGLVLEYSRQWDEAFRKFLKGLASRKPL	205	
zAPE1		IGKEEHDKEGRVITAEFPDFFLVTAAYVPNASRGLVRLDYRKTWDVDFRAYLCGLDARKPL		229		
xAPE1		IGIEEHDKEGRVITAEFDSFFVIAAYIPNSSRGLVRLDYRQWVDVDFRAYLKGLDSKKPL		204		
		** * . . * : * . * : * : : . : * : * : * : * : * : * :				
Rrp1		VICGDMNVSHMPIDLENPKNNTKNAGFTQEERDKMTELLGL-GFVDTFRHLYPDRKGAYT		653		
hAPE1		VLCG	DLNVAHEEIDLR	NPKGKK	NAGFTPQERQGFGEILLQAVPLADSFRLHYPNTPYAYT	265
zAPE1		VLCGDLNVAHQEIDLNPKGNRKNAGFTPEERE	GFTQLLEA-GFTDSFRELYPDQAYAYT		288	
xAPE1		ILCGDLNVAHQEIDLNPKTNKKT	PGFTPQERQGFGEILLAE-GYLD	SFRELYPDKPSAYT	263	
		: : ** : ** : * * . * * * * : * : * : * : * : * : * :				
Rrp1		FWTYMANARARNVGWRLDYCLVSERFVPKVVEHEIRSQC	LGSDHCPITIFFNI		706	
hAPE1		FW	TYMMNARSKNVG	RLDYFLLSHSLPALCD	SKIRSKALGSDHCPITLYLAL	318
zAPE1		FWTYMMNARSKNVGWRLDYFVLSSALLPGLCD	SKIRNTAMGSDHCPITLFLAV		341	
xAPE1		FWTYMMNARAKNVGWRLDYFVLKALRPALCD	CKIRSKVMGSDHCPITLLMAI		316	
		***** * : : ***** : * : * : : * : : ***** : :				

Рисунок 30. Выравнивание аминокислотных последовательностей С-концевых каталитических доменов hAPE1, xAPE1, zAPE1 и Rrp1. Выделены каталитические аминокислотные остатки - Asp70, Glu96, Tyr171, Asp210, Asn212, Asp308 и His309 (красные, нумерация аминокислотных остатков соответствует последовательности hAPE1); аминокислотные остатки ДНК-связывающего центра - Arg73, Ala74, Lys78, Tyr128, Arg156, Arg181, Asn222, Asn226, Asn229 и Thr268 (голубой); интеркалирующие аминокислотные остатки - Met270 и Arg177 (светло-зелёный); и аминокислотные остатки Asn174, Asn229, Ala230, Phe266 и Trp280, формирующие карман для связывания поврежденных оснований (желтый). Консервативные остатки триптофана выделены темно-зелеными рамками. Звездочками обозначены идентичные остатки, двоеточия указывают на консервативные замены, а точками обозначены замены аминокислотных остатков с сохранением их некоторых физико-химических свойств.

3.2.2. Влияние концентрации одно- и двухвалентных ионов металлов на активность AP-эндонуклеаз

Для проведения анализа особенностей механизма целевого распознавания поврежденных нуклеотидов и их расщепления гомологичными ферментами, было установлено влияние одно- и двухвалентных ионов металлов на экзо- и эндонуклеазную активность четырех эндонуклеаз типа APE1: hAPE1, Rrp1, xAPE1 и zAPE1. Использованные ДНК-субстраты содержали FAM на 5'-конце поврежденной цепи для визуализации продуктов расщепления в геле. Для того чтобы установить неспецифическое электростатическое влияние одновалентных катионов (K^+) на эффективность расщепления ДНК-дуплекса, содержащего F-сайт, ферментами типа APE1, фермент (hAPE1, zAPE1, xAPE1 или Rrp1) в концентрации 0,2 мкМ добавляли к

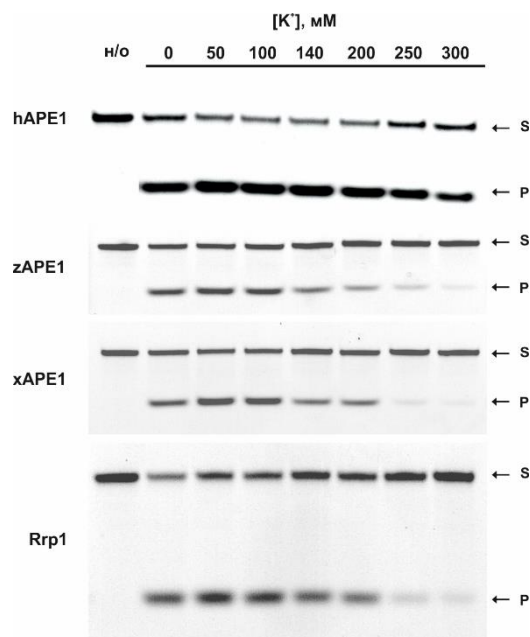
2,0 мкМ FRET-F/G-субстрату, после чего по истечении 20 с реакцию останавливали, и аликвоты реакционной смеси анализировали с помощью гель-электрофореза, как описано в разделе 2.6 Материалов и методов (рисунок 31А).

Полученные данные показали, что АР-эндонуклеазная активность всех четырех исследованных ферментов имела зависимость от концентрации K^+ с широким диапазоном оптимальных концентраций, что хорошо согласуется с ранее опубликованным исследованием связывания ДНК и катализа, осуществляемых ферментом hAPE1 в стационарных условиях [200]. Активность ферментов zAPE1, xAPE1 и Rrp1 была значительно ниже в сравнении с активностью hAPE1. Все ферменты оставались активными даже в отсутствие ионов K^+ . Уровень активности xAPE1 и Rrp1 в присутствии K^+ в концентрации 50–100 мМ был близок, и степень расщепления субстрата достигала ~50%. В том же диапазоне концентраций K^+ zAPE1 расщеплял ~40% субстрата (рисунок 31Б). Последующее увеличение концентрации ионов K^+ вплоть до 200 мМ не приводило к значительному изменению активности по отношению к F-субстрату для фермента hAPE1. При достижении таких концентраций K^+ активность других исследованных ферментов снижалась в порядке $Rrp1 > xAPE1 > zAPE1$. Дальнейшее повышение концентрации K^+ до 300 мМ приводило к тому, что активность этих трех ферментов значительно падала. Фермент hAPE1 проявлял практически неизменный уровень расщепления F-сайта в присутствии K^+ в концентрациях от 50 до 200 мМ, а при последующем повышении концентрации K^+ активность фермента человека постепенно снижалась.

Для того чтобы установить влияние концентрации ионов Mg^{2+} на эффективность расщепления ДНК-дуплекса, содержащего F-сайт, ферментами типа APE1, фермент (hAPE1, zAPE1, xAPE1 или Rrp1) в концентрации 2,0 мкМ добавляли к 2,0 мкМ FRET-F/G-субстрату, после чего по истечении 20 с реакцию останавливали, и аликвоты реакционной смеси анализировали с помощью гель-электрофореза, как описано в разделе 2.6 Материалов и методов (рисунок 32А).

В случае hAPE1 эффективность накопления продукта росла при увеличении концентрации Mg^{2+} вплоть до 1,0 мМ, а затем сохранялась на одном уровне в диапазоне концентраций 1,0–10,0 мМ $MgCl_2$. При последующем увеличении концентрации Mg^{2+} активность Rrp1 падала медленнее, чем в случае ферментов xAPE1 и zAPE1. В присутствии 10 мМ Mg^{2+} степень превращения субстрата в продукт достигала ~60% в случае Rrp1, а в случае xAPE1 и zAPE1 только ~30%. Ингибирование расщепления ДНК высокими концентрациями Mg^{2+} может объясняться связыванием металла в ДНК-связывающем центре, что приводит к нарушению контактов в активном центре фермента. При этом степень влияния этого процесса на эффективность АР-эндонуклеаз оказалась различна.

А



Б

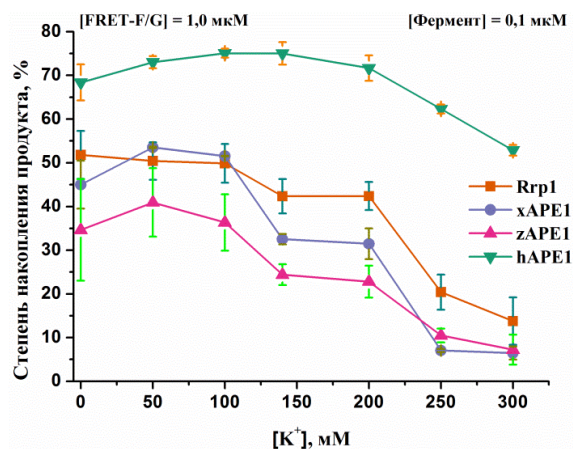
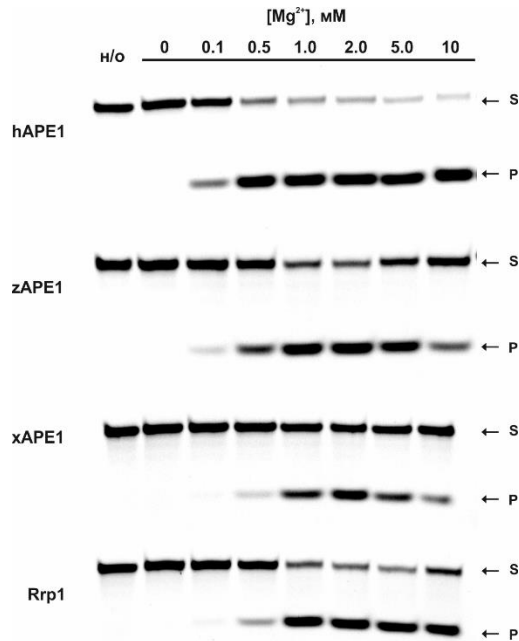


Рисунок 31. Влияние одновалентных катионов (K^+) на АР-эндонуклеазную активность ферментов типа АРЕ1. (А) Визуализация продуктов реакции расщепления FRET-F/G-субстрата ферментами hAPE1, zAPE1, xAPE1 или Rrp1 в присутствии различных концентраций K^+ после их разделения с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях. S – субстрат, P – продукт эндонуклеазного расщепления цепи ДНК, н/о – субстрат, не подвергавшийся обработке ферментом. (Б) Влияние концентрации K^+ на эффективность расщепления FRET-F/G ДНК-субстрата ферментами hAPE1, zAPE1, xAPE1 или Rrp1. [Фермент] = 0,1 мкМ, [FRET-F/G] = 1,0 мкМ. Реакция проводилась в течение 20 с. Подробные условия реакций приведены в разделе 2.6 Материалов и методов.

Неповрежденный ДНК дуплекс, содержащий 5'-свисающий конец, был использован для сравнения 3'-5'-экзонуклеазной активности четырех АР-эндонуклеаз в присутствии ионов металлов в различной концентрации. Несмотря на то, что активность эндонуклеаз типа АРЕ1 по отношению к их основному биологическому субстрату, содержащему F-сайт, была очень сходной, способность гомологичных ферментов к 3'-5'-экзонуклеолитической деградации используемого в данной работе ДНК-субстрата значительно различалась. Как показано на рисунке 33А, среди исследованных ферментов только hAPE1 обладал выраженной 3'-5'-экзонуклеазной активностью в присутствии 1,0 мМ $MgCl_2$. В связи с этим влияние различных концентраций $MgCl_2$ или KCl на экзонуклеазную деградацию ДНК было установлено только для фермента hAPE1 (рисунок 33Б). Для этого фермент hAPE1 в концентрации 2,0 мкМ добавляли к 2,0 мкМ эхо-субстрату, после чего по истечении 30 мин реакцию останавливали, и алиquotы реакционной смеси анализировали с помощью гель-электрофореза, как описано в разделе 2.6 Материалов и методов (рисунок 33Б).

А



Б

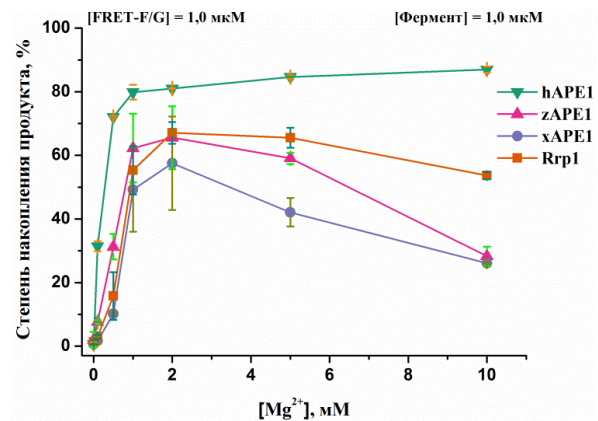


Рисунок 32. Влияние двухвалентных катионов (Mg^{2+}) на АР-эндонуклеазную активность ферментов типа АРЕ1. (А) Визуализация продуктов реакции расщепления FRET-F/G-субстрата ферментами hAPE1, zAPE1, xAPE1 или Rrp1 в присутствии различных концентраций Mg^{2+} после их разделения с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях. S – субстрат, P – продукт эндонуклеазного расщепления цепи ДНК, н/о – субстрат, не подвергавшийся обработке ферментом. (Б) Влияние концентрации Mg^{2+} на эффективность расщепления FRET-F/G ДНК-субстрата ферментами hAPE1, zAPE1, xAPE1 или Rrp1. [Фермент] = 1,0 мкМ, [FRET-F/G] = 1,0 мкМ. Реакция проводилась в течение 20 с. Подробные условия реакций приведены в разделе 2.6 Материалов и методов.

Также как и в случае АР-эндонуклеазной активности (рисунки 31Б, 32Б), 3'-5'-экзонуклеазная активность hAPE1 характеризовалась широким диапазоном оптимальных концентраций K^+ (рисунок 33В), и резко возрастала при достижении концентрации Mg^{2+} 1,0 мМ (рисунок 33Г). Wang Y. и коллеги показали, что zAPE1 обладает очень слабой 3'-5'-экзонуклеазной активностью, которая примерно в 100 раз меньше, чем АР-эндонуклеазная активность этого фермента [255]. Более того, до настоящего времени не проводилось исследований 3'-5'-экзонуклеазной активности фермента xAPE1. В целом, едва заметная 3'-5'-экзонуклеолитическая деградация модельной ДНК этими ферментами согласуется с литературными данными и, скорее всего, не связана с процедурой конструирования плазмид, используемой для получения этих ферментов в системе экспрессии *E. coli*.

С другой стороны, неожиданно было обнаружено, что Rrp1 не обладает значительной 3'-5'-экзонуклеазной активностью, поскольку 30 годами ранее были опубликованы данные, согласно которым этот фермент может осуществлять 3'-5'-экзонуклеолитическую деградацию ДНК [260]. Тем не менее, позже было показано, что 3'-5'-экзонуклеазная активность Rrp1 зависит от контекста ДНК [263]. Также было показано [265] что, в отличие от hAPE1, 3'-5'-

эксонуклеазная активность Rrp1 зависит от присутствия у фермента полноразмерного N-концевого домена. Учитывая, что Rrp1 обладает самым большим N-концевым доменом по сравнению с другими исследованными AP-эндонуклеазами, можно предположить, что данная особенность Rrp1 может влиять на 3'-5'-эксонуклеазную активность фермента.

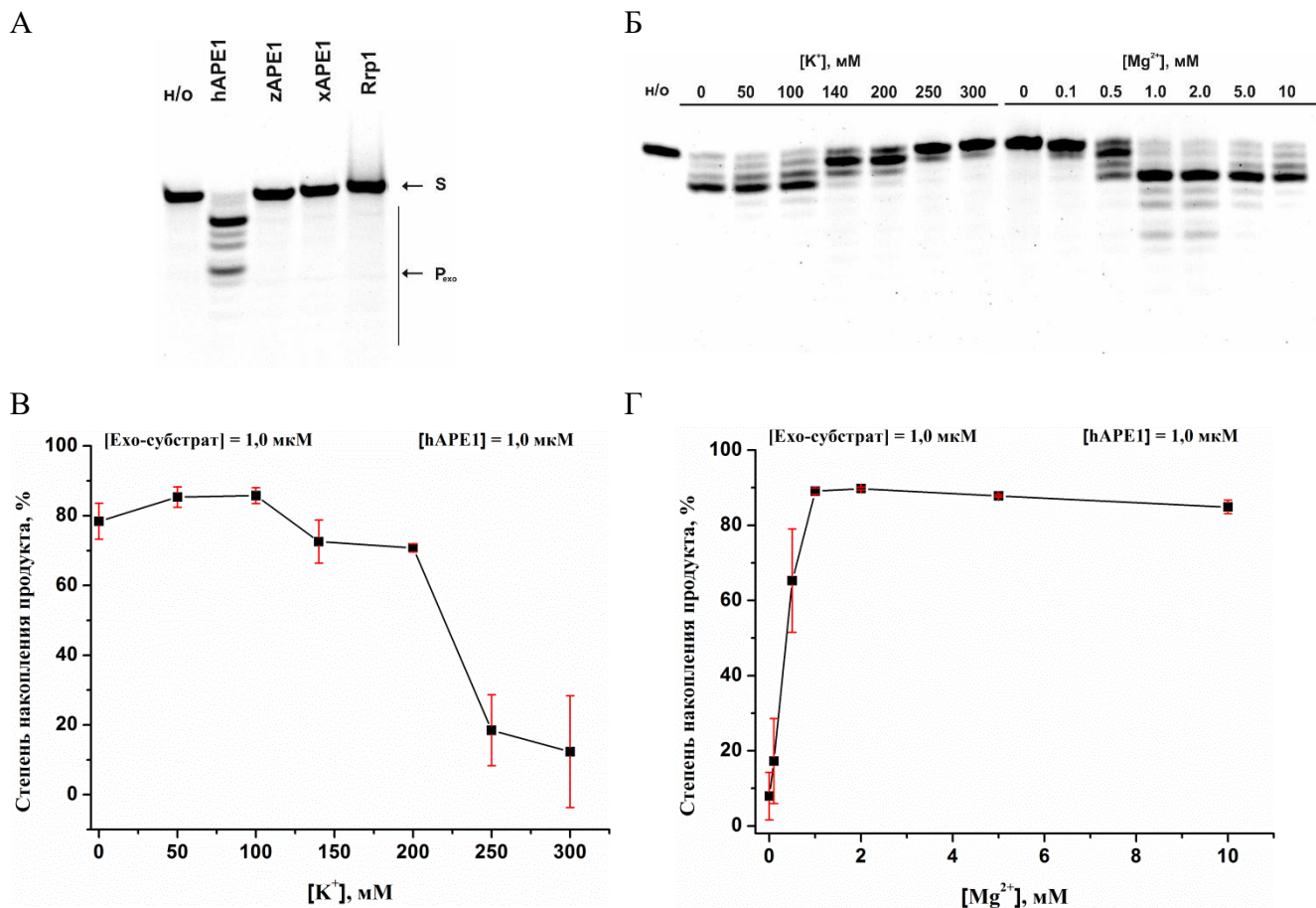


Рисунок 33. Зависимость 3'-5'-эксонуклеазной активности hAPE1 от концентрации ионов металлов. (А) Визуализация продуктов реакции 3'-5'-эксонуклеолитической деградации неповрежденного ДНК дуплекса, содержащего 5'-свисающий конец, в присутствии 1 мМ Mg²⁺ и 50 мМ K⁺ после их разделения с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях. S – субстрат, P_{exo} – продукты эндонуклеазного расщепления цепи ДНК, н/о – субстрат, не подвергавшийся обработке ферментом. (Б) Визуализация продуктов реакции расщепления ехо-субстрата ферментом hAPE1 в присутствии различных концентраций K⁺ или Mg²⁺ после их разделения с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях. Влияние концентрации K⁺ (В) или Mg²⁺ (Г) на эффективность расщепления ехо-субстрата ферментом hAPE1. [Фермент] = 1,0 мкМ, [ехо-ДНК] = 1,0 мкМ. Реакция проводилась в течение 30 мин. Подробные условия реакций приведены в разделе 2.6 Материалов и методов.

Таким образом, полученные данные позволили сравнить влияние одно- и двухвалентных ионов металлов на AP-эндонуклеазную и 3'-5'-эксонуклеазную активности APE1-подобных ферментов. Оказалось, что, несмотря на консервативность каталитических аминокислотных остатков в активном центре и близкие зависимости, полученные для основной AP-эндонуклеазной активности от концентрации катионов Mg²⁺, эти ферменты обладают

существенно различающейся способностью к 3'-5'-экзонуклеазной деградации неповрежденной ДНК. Среди четырех AP-эндонуклеаз, в используемых в данной работе условиях только hAPE1 проявлял 3'-5'-экзонуклеазную активность на модельной неповрежденной ДНК.

3.2.3. Конформационная динамика и кинетика взаимодействия ферментов типа APE1 с поврежденной и неповрежденной ДНК

Для изучения кинетики взаимодействий исследуемых AP-эндонуклеаз с различными ДНК-субстратами, нами был использован метод «остановленного потока». Важно выбрать подходящую систему для отслеживания конформационных изменений ДНК-субстрата или фермента, так как профиль изменений флуоресцентного сигнала в результате взаимодействия фермента с субстратом может быть довольно сложным, и скорее всего, будет отличаться при переходе от одного типа флуоресценции к другому. Соответственно, анализ одного и того же процесса при регистрации изменений нескольких типов флуоресцентных маркеров позволяет получить взаимодополняющую информацию о механизме данного процесса. К настоящему моменту было получено значительное количество данных по кинетике взаимодействия hAPE1 с различными субстратами с регистрацией флуоресценции остатков триптофана белка [18,187,212,333], а также с регистрацией флуоресценции ДНК-субстратов, содержащих aPc в качестве флуоресцентного аналога нуклеотида [13,213,339] или пару красителей излучатель/тушитель для регистрации изменений FRET-сигнала [17,200,332]. Для исследования свойств различных ферментов типа APE1 было бы рационально в качестве контроля использовать данные, ранее полученные для hAPE1 [17,18,200,212,213,333].

Тем не менее, оказалось невозможным зарегистрировать какие-либо значительные изменения во флуоресценции остатков триптофана белков xAPE1, zAPE1 и Rrp1 в ходе реакции с F-содержащим ДНК-субстратом (рисунок 34А). Действительно, амплитуда изменений интенсивности флуоресценции остатков триптофана в ходе взаимодействий исследуемых AP-эндонуклеаз с F-субстратом была чрезвычайно мала или отсутствовала вовсе, по сравнению с hAPE1. При этом семь остатков триптофана фермента hAPE1 являются абсолютно консервативными среди всех исследуемых AP-эндонуклеаз (рисунок 30), кроме фермента Rrp1, у которого отсутствует Trp83. И, хотя остатки триптофана консервативны во всех ферментах, и ранее предполагали, что Trp280 вносит основной вклад в изменения интенсивности собственной флуоресценции белка во время ферментативной реакции с ДНК-субстратом, слабые изменения сигнала, скорее всего, указывают на разницу в конформационной подвижности частей белковых молекул, содержащих остатки триптофана. Также можно предположить, что различия в поведении интенсивности флуоресценции остатков триптофана зависят от особенностей неспецифического связывания ДНК N-концевым фрагментом

ферментов. Роль конформационных перестроек в областях, граничащих с N-концевым фрагментом, в процессах специфичного узнавания повреждения и формирования каталитического комплекса остается неясной.

Для того чтобы проследить за конформационными изменениями ДНК при взаимодействии с исследуемыми ферментами были использованы ДНК-дуплексы, содержащие флуорофорную группу аРи с 3'-стороны от повреждения, либо меченые FAM по 5'-концу поврежденной цепи, и содержащие тушитель BHQ1 на 5'-конце комплементарной цепи. В качестве ДНК-субстрата AP-эндонуклеазного расщепления был выбран ДНК-дуплекс, содержащий F-сайт. В качестве NIR-субстратов были использованы ДНК-дуплексы, содержащие такие повреждения как U, DHU, αA и εA. Для изучения неспецифического связывания с ДНК-субстратом был использован неповрежденный ДНК-дуплекс.

Взаимодействие ферментов типа APE1 с F-аРи-субстратом, содержащим аРи с 3'-стороны от F-сайта, приводило к росту интенсивности флуоресценции аРи на начальном этапе реакции в районе 1 с (рисунок 34Б). Ранее было показано, что в ходе расщепления ДНК ферментом hAPE1 происходит рост интенсивности флуоресценции аРи [213]. Таким образом, флуоресцентные кривые, полученные для xAPE1 и zAPE1, согласуются с быстрым расщеплением F-сайта этими ферментами. В случае Rrp1 из *D. melanogaster* фаза роста была медленнее и закончилась лишь ближе к 300 с, что указывает на гораздо более слабую AP-эндонуклеазную активность этого фермента.

Для того чтобы проследить за конформационными изменениями ДНК посредством регистрации изменений FRET-сигнала, нами был использован ДНК-дуплекс FRET-F/G. Необходимо отметить, что регистрация FRET-сигнала была использована ранее для изучения эффективности расщепления ДНК ферментом hAPE1 [17,332,340]. Как показано на рисунке 34В, на кинетических кривых присутствовал значительный рост FRET-сигнала, который соответствует каталитическому расщеплению F-сайта в случае всех трех исследуемых AP-эндонуклеаз. Как и в случае с аРи, расщепление F-сайта ферментом Rrp1 оказалось значительно медленнее, чем в случае других AP-эндонуклеаз. В целом, сравнительный анализ кинетических кривых, которые отражают (1) конформационные изменения молекулы фермента в процессе взаимодействия с субстратом (2) изменения окружения единственного остатка аРи в субстрате и (3) расстояние между концевыми флуорофорами в д.ц. субстрате, показал различия между ферментами насекомого *D. melanogaster*, амфибии *X. laevis*, рыбы *D. rerio* и хорошо изученного hAPE1. Полученные данные свидетельствуют о том, что Rrp1 обладает сравнительно низкой AP-эндонуклеазной активностью, несмотря на высокий уровень идентичности функционально охарактеризованных аминокислотных остатков среди всех исследованных ферментов. Существует несколько возможных объяснений тому, что активность Rrp1 оказалась медленнее,

чем в случае xAPE1 и zAPE1. Во-первых, анализ аминокислотных остатков в ДНК-связывающем центре показал, что Arg181 (консервативный среди исследованных ферментов типа APE1, рисунок 30) заменен на аспарагин в случае Rrp1. С другой стороны, Rrp1 также содержит замену консервативного Asp70, участвующего в координации иона Mg^{2+} , на аланин. Кроме того, различия в изменении интенсивности флуоресценции остатков триптофана между всеми ферментами с идентично расположенными в пространстве остатками триптофана в каталитическом домене позволяют предположить, что N-концевой фрагмент может оказывать влияние на конформационную подвижность полноразмерного фермента. Действительно, хотя роль N-концевого фрагмента до конца не ясна, стоит отметить, что самый медленный фермент Rrp1 обладает наиболее крупным N-концевым фрагментом среди всех исследованных ферментов.

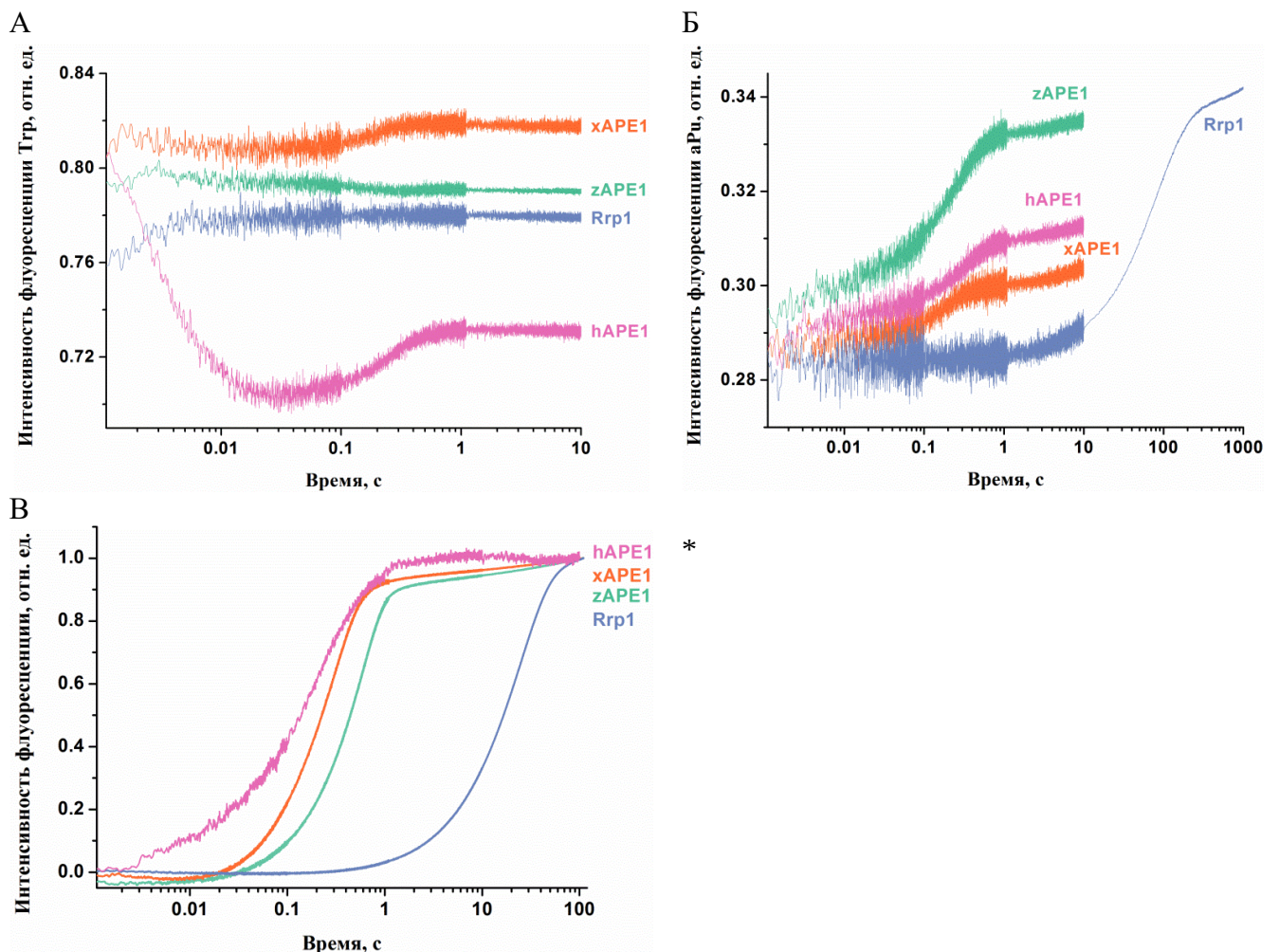


Рисунок 34. Изменения интенсивности флуоресценции остатков триптофана (А), aRu (Б) и FRET-сигнала (В) при взаимодействии ферментов zAPE1, xAPE1 и Rrp1 с F/G (А), F-aRu (Б) или FRET-F/G-субстратом (В). [ДНК-субстрат] = [фермент] = 1,0 мкМ. Эксперименты проводились при 25°C. Кривые для фермента hAPE1 приведены для сравнения. * Приведенная кинетическая кривая, характеризующая взаимодействие hAPE1 с FRET-F/G-субстратом, взята из публикации Алексеевой с коллегами [341].

3.2.3.1. Конформационные изменения F-содержащего ДНК-субстрата при взаимодействии с ферментами типа APE1

Для более детального изучения кинетики взаимодействия между ДНК-субстратом, содержащим F-сайт, и AP-эндонуклеазой (zAPE1, xAPE1 или Rrp1), 2 мкМ FRET-F/G ДНК-субстрат быстро смешивали с различными концентрациями фермента с помощью спектрофотометра «остановленного» потока и затем регистрировали изменения FRET-сигнала (рисунок 35). Концентрацию фермента варьировали от 0,5 до 2,5 мкМ. На кинетических кривых, характеризующих взаимодействие всех изученных ферментов с F-содержащим ДНК-субстратом, можно было наблюдать фазу быстрого и интенсивного роста FRET-сигнала из-за увеличения расстояния между остатками FAM и BHQ1, связанного с протеканием каталитической стадии ферментативного процесса, которой предшествовал короткий начальный участок без изменений сигнала. Далее все флуоресцентные кривые достигали плато.

Необходимо отметить, что кривые, описывающие изменения FRET-сигнала, в случае xAPE1 характеризовались небольшим, но заметным падением сигнала в начальной части кинетических кривых вплоть до 10-20 мс (рисунок 35А). Эта фаза падения, скорее всего, отражает формирование фермент-субстратного комплекса. Тем не менее, высокая амплитуда последующей фазы роста сигнала (отражающей расщепление F-сайта) значительно усложняла регистрацию изменений FRET-сигнала (обладавших гораздо более низкой амплитудой), связанных с процессами образования фермент-субстратного комплекса в случае ферментов zAPE1 и Rrp1 (рисунки 35В, Д). Это наблюдение также указывает на то, что xAPE1 вызывает более сильное изгибание ДНК-субстрата в процессе формирования комплекса, и таким образом сближение остатков FAM и BHQ1 делает падение FRET-сигнала более значительным.

Ферментативное расщепление субстрата FRET-F/G при взаимодействии с ферментами zAPE1 и xAPE1 в целом завершалось к 1 с, а в случае взаимодействия с ферментом Rrp1 продолжалось вплоть до 100 с. Флуоресцентные кривые, полученные для всех трех AP-эндонуклеаз, были обработаны уравнением с двумя экспонентами (4). Полученные в результате обработки наблюдаемые константы скорости k_{obs}^i имели линейную зависимость от концентрации фермента (рисунки 35Б, Г, Е), подтверждающую бимолекулярный характер образования фермент-субстратного комплекса, в котором происходит быстрое протекание каталитической стадии. На основании результатов математической обработки полученных данных была предложена кинетическая модель, отраженная в схеме 4. Эта кинетическая модель содержит одну равновесную стадию связывания субстрата и необратимую каталитическую стадию.

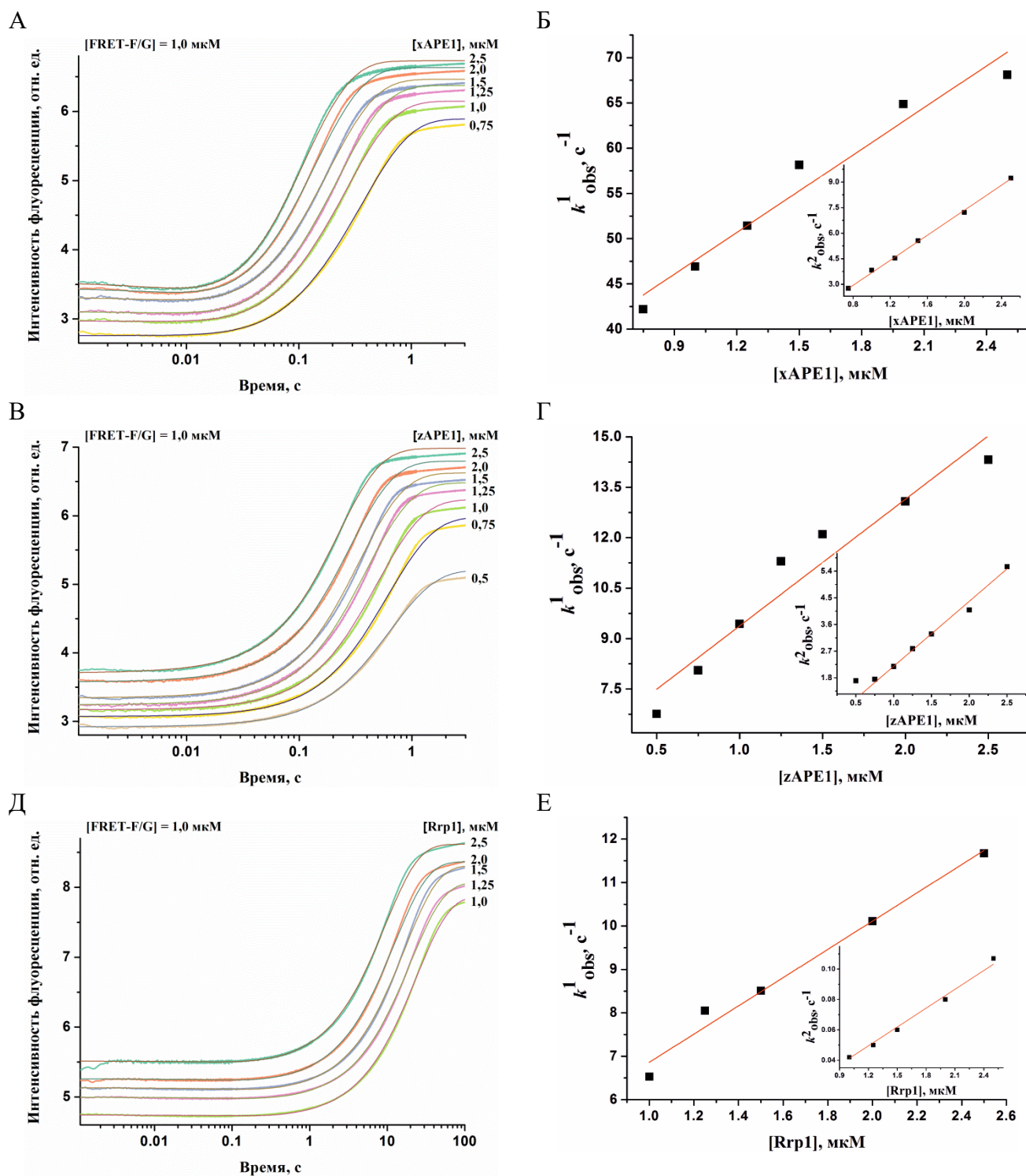


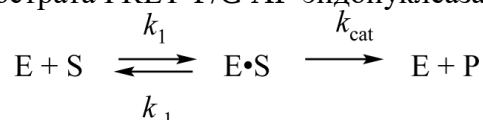
Рисунок 35. Изменения интенсивности FRET-сигнала в ходе взаимодействия ферментов xAPE1 (А, Б), zAPE1 (В, Г) или Rrp1 (Д, Е) с FRET-F/G. [FRET-F/G] = 1,0 μM , концентрации ферментов указаны на графиках. Индивидуальные кривые были обработаны уравнением с двойной экспонентой (4), а зависимость наблюдаемых констант скорости $k_{\text{obs}1}$ и $k_{\text{obs}2}$ от концентрации фермента была обработана линейными уравнениями (5) и (6), соответственно; значение $r^2 > 0,99$ для результатов обработки экспериментальных кривых уравнением (4) и $r^2 > 0,92$ для результатов аппроксимации зависимостей наблюдаемых констант скорости от концентрации фермента.

Все константы скорости и равновесные константы, соответствующие данному механизму, приведены в таблице 4. Хотя константы скорости, характеризующие формирование

фермент-субстратного комплекса, имели близкие для всех трех ферментов значения, между каталитическими константами была обнаружена значительная разница. Наибольшая константа скорости k_{cat} характеризовала активность фермента хАРЕ1 ($3,7 \pm 0,1 \text{ с}^{-1}$), при этом она была лишь немного больше, чем константа, полученная для zАРЕ1 ($2,2 \pm 0,1 \text{ с}^{-1}$). При этом, константа скорости k_{cat} , характеризующая каталитическое расщепление F-содержащего ДНК-субстрата ферментом Rrp1, как и ожидалось, оказалась на два порядка меньше ($0,040 \pm 0,001 \text{ с}^{-1}$). Таким образом, несмотря на то, что полученные данные указывают на схожую эффективность связывания FRET-F/G-субстрата ферментами zАРЕ1, хАРЕ1 и Rrp1, они значительно отличаются между собой по способности катализировать расщепление целевого нуклеотида в ДНК. Возможно, частичная потеря каталитической эффективности фермента Rrp1 связана с отсутствием аминокислотного остатка Asp70, поскольку этот остаток необходим для правильной координации Mg^{2+} в активном центре. Это предположение согласуется с данными сайт-направленного мутагенеза, согласно которым происходит умеренное снижение активности АР-эндонуклеазы hАРЕ1 после введения мутации Asp70Ala [193].

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что различия в N-концевом фрагменте среди исследованных ферментов не оказывают влияния на формирование каталитически компетентного комплекса с ДНК, содержащей F-сайт, что хорошо согласуется с результатами, полученными ранее для фермента hАРЕ1 дикого типа и его усеченной с N-конца формы [212,335,336]. Более того, сходство констант связывания (таблица 4) среди всех изученных ферментов указывает на то, что замена Arg181Asn в ДНК-связывающем центре Rrp1 также не является критичной для формирования каталитического комплекса с ДНК, содержащей F-сайт. Эти данные согласуются с исследованием [181], в котором было показано, что hАРЕ1 дикого типа и мутантная форма, содержащая замену Arg181Ala, связываются с субстратом с близкой аффинностью. Тем не менее, анализ их связывания с ДНК-продуктом показал, что мутантная форма фермента связывается с продуктом примерно в три раза хуже, чем фермент дикого типа, указывая на участие аминокислотного остатка Arg181 в этом процессе.

Схема 4. Распознавание субстрата FRET-F/G АР-эндонуклеазами zАРЕ1, хАРЕ1 и Rrp1.



где E – фермент, S – ДНК-субстрат, (E·S) – фермент-субстратный комплекс, P – продукт реакции.

Таблица 4. Значения констант скорости и равновесных констант, характеризующих взаимодействие AP-эндонуклеаз с ДНК-субстратом FRET-F/G

Константа	zAPE1	xAPE1	Rrp1
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$3,8 \pm 0,4$	15 ± 2	$3,3 \pm 0,2$
k_{-1}, s^{-1}	$5,6 \pm 0,7$	32 ± 3	$3,6 \pm 0,4$
$K_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1*}$	$0,7 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,2$
$k_{\text{cat}}, \text{s}^{-1}$	$2,2 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$	$0,040 \pm 0,001$
Значения кинетических констант получены путем аппроксимации зависимости наблюдаемых констант скорости k_{obs1} и k_{obs2} от концентрации фермента линейными уравнениями (5) и (6), соответственно; приведенная ошибка является результатом обработки; значение $r^2 > 0,92$. * $K_1 = k_1/k_{-1}$			

3.2.3.2. Конформационные изменения неповрежденной ДНК при взаимодействии с ферментами типа APE1

Чтобы исследовать стадию неспецифического связывания ДНК-дуплекса, не содержащего повреждений, были зарегистрированы изменения FRET-сигнала в процессе связывания FRET-C/G-лиганда в тех же условиях, которые использовали для анализа взаимодействия с FRET-F/G-субстратом. В случае ДНК, не содержащей повреждений, изменения FRET-сигнала связаны с изменениями расстояния между флуорофором и тушителем, расположенными на противоположных концах дуплекса. FRET-пара красителей может сближаться в пространстве во время образования комплекса «эндонуклеазного типа» таким же образом, как и с поврежденным дуплексом, что может приводить к изгибу ДНК. Другой возможной причиной изменения FRET-сигнала может быть процесс, приводящий к формированию фермент-субстратного комплекса «3'-5'-экзонуклеазного типа», вызывая смещение красителей, расположенных на концах ДНК-дуплекса. Необходимо отметить, что в диапазоне времени до 10 с (рисунок 36) не наблюдалось 3'-5'-экзонуклеазной деградации ДНК-субстрата, в соответствии с очень низкой скоростью ферментативной деградации дуплекса с тупыми концами по сравнению с «утопленной» ДНК [13,342].

ДНК-лиганд FRET-C/G в концентрации 2,0 мкМ быстро смешивали с ферментом (hAPE1, zAPE1, xAPE1 или Rrp1), концентрацию которого варьировали в диапазоне от 1,0 до 4,0 мкМ, после чего изменения FRET-сигнала регистрировали в течение 10 с. На начальном

этапе наблюдали падение FRET-сигнала, за которым следовал рост в случае zAPE1, hAPE1 и Rrp1, но не xAPE1 (рисунок 36).

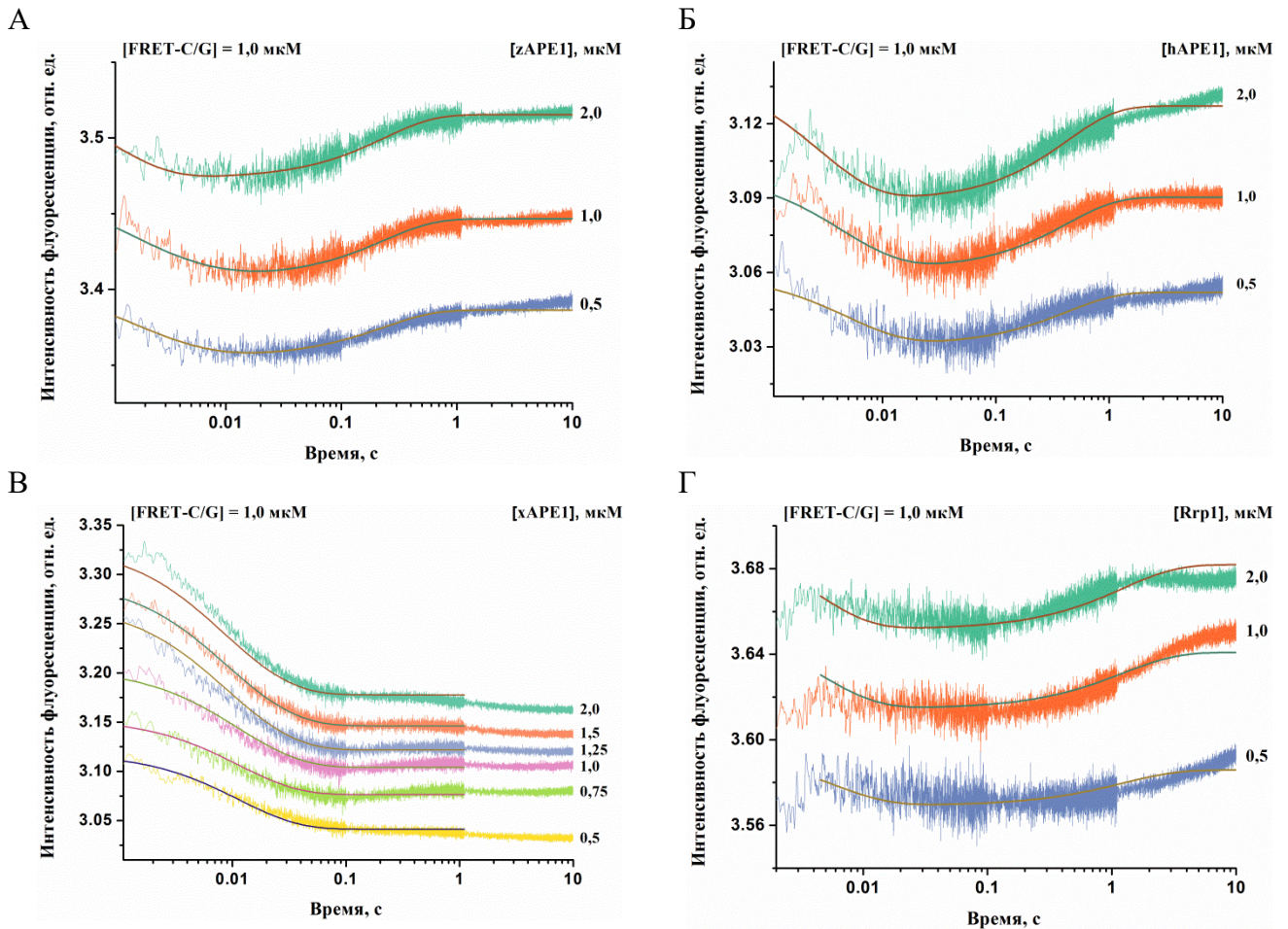


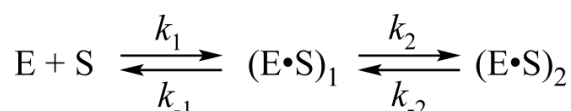
Рисунок 36. Изменения FRET-сигнала в процессе взаимодействия фермента zAPE1 (А), hAPE1 (Б), xAPE1 (В) или Rrp1 (Г) с неповрежденной ДНК. [FRET-C/G] = 1,0 мкМ, концентрации ферментов показаны на графиках справа. Кинетические кривые были обработаны методом нелинейной регрессии.

В экспериментах с xAPE1 оказалось возможным зарегистрировать только первоначальное падение сигнала. При этом флуоресцентные кривые, характеризующие взаимодействие этого фермента с ДНК-лигандом (рисунок 36В), обладали наибольшей амплитудой изменений сигнала среди всех изученных ферментов, что также указывает на то, что связывание ДНК ферментом xAPE1 приводит к более выраженному изгибанию структуры.

Анализ флуоресцентных кривых, полученных для процесса связывания ДНК-лиганда AP-эндонуклеазами zAPE1 (рисунок 36А), xAPE1 (рисунок 36В) и hAPE1 (рисунок 36Б) показал, что неспецифическое связывание, в целом, завершается в течение 1 с. Кривые, характеризующие взаимодействие между ДНК-лигандом и Rrp1 (рисунок 36Г), достигали плато за временной промежуток более 10 с, что означает более медленное протекание процесса связывания ДНК этим ферментом, по сравнению с остальными ферментами типа APE1. Для расчета констант, характеризующих стадии связывания ДНК, полученные серии кинетических

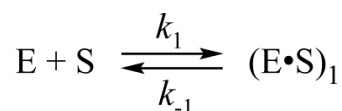
кривых (рисунок 36) были обработаны методом нелинейной регрессии в программе DynaFit. В результате анализа был предложен минимальный кинетический механизм, содержащий две обратимые стадии в случае ферментов hAPE1, zAPE1 и Rrp1 (схема 5), и только одну стадию связывания для фермента xAPE1 (схема 6). Константы скорости прямых и обратных реакций, соответствующих схемам 5 и 6, а также равновесные константы, посчитанные как отношение k_i к k_{-i} ($K_i = k_i/k_{-i}$), и общие константы ассоциации $K_{\text{ass}} = K_1 \times K_2$ (если таковые имеются) представлены в таблице 5.

Схема 5. Связывание неповрежденного ДНК-лиганда AP-эндонуклеазами hAPE1, zAPE1 и Rrp1.



где E – фермент, S – ДНК-субстрат, $(E \cdot S)_i$ – формы фермент-субстратного комплекса.

Схема 6. Распознавание неповрежденного ДНК-лиганда ферментом xAPE1.



где E – фермент, S – ДНК-субстрат, $(E \cdot S)_1$ – фермент-субстратный комплекс.

Таблица 5. Значения констант скорости и равновесных констант, характеризующих взаимодействия AP-эндонуклеаз с неповрежденным ДНК-лигандом FRET-C/G				
Константа	zAPE1	xAPE1	Rrp1	hAPE1
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	790 ± 60	70 ± 5	120 ± 30	180 ± 20
k_{-1}, s^{-1}	$7,0 \pm 0,8$	$5,0 \pm 2,0$	60 ± 20	30 ± 7
$K_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	110 ± 20	14 ± 7	$2,0 \pm 1,0$	$6,0 \pm 2,0$
k_2, s^{-1}	$0,18 \pm 0,03$	-	$0,02 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$
k_{-2}, s^{-1}	$4,1 \pm 0,2$	-	$0,8 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,1$
K_2	$0,04 \pm 0,01$	-	$0,03 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$
$K_{\text{ass}} \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	$5,0 \pm 2,0$	-	$0,06 \pm 0,05$	$0,2 \pm 0,1$
Значения представлены в виде: среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (SD).				
* $K_i = k_i/k_{-i}$, $K_{\text{ass}} = K_1 \times K_2$				

Сравнение полученных констант скорости показывает, что формирование первичного фермент-субстратного комплекса $(E \cdot S)_1$ было наиболее эффективным для фермента zAPE1, поскольку константа прямой реакции k_1 имеет самое большое значение среди исследуемых ферментов ($790 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), а также ввиду того, что значение константы обратной реакции k_{-1}

[характеризующей стабильность комплекса $(E \cdot S)_1$] было относительно низким ($7,0 \text{ с}^{-1}$). Другим ферментом, имеющим низкое значение k_{-1} ($5,0 \text{ с}^{-1}$), был хАРЕ1. Тем не менее, константа прямой реакции k_1 в случае хАРЕ1 ($70 \times 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$) была примерно на один порядок меньше, чем для zАРЕ1, что дало константу ассоциации K_1 со значением $14 \times 10^6 \text{ М}^{-1}$ для хАРЕ1, в то время как K_1 в случае zАРЕ1 была почти в восемь раз выше ($110 \times 10^6 \text{ М}^{-1}$). Значения констант прямой реакции k_1 для Rrp1 и hАРЕ1 оказались довольно близки (120×10^6 и $180 \times 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, соответственно), что привело к самым низким значениям констант первичного связывания ДНК, равным $2,0 \times 10^6$ и $6,0 \times 10^6 \text{ М}^{-1}$, соответственно.

Таким образом, формирование комплекса $(E \cdot S)_1$, образующегося в результате связывания неповрежденного ДНК-лиганда ферментом, оказалось наиболее эффективным в случае zАРЕ1. Более того, комплекс $(E \cdot S)_1$ был наиболее стабильным для zАРЕ1, причем характеризующая его константа ассоциации K_1 была на один порядок выше, чем для всех остальных исследуемых ферментов. Константы ассоциации K_1 в случае ферментов hАРЕ1 и хАРЕ1 имели сходные значения, а K_1 для Rrp1 оказалась самой маленькой. Эти различия констант, характеризующих первичное связывание, хорошо видны на кинетических кривых изменения FRET-сигнала для этих ферментов (рисунок 36). Фаза падения FRET-сигнала закачивалась примерно к 0,02, 0,04 и 0,1 с, соответственно, для zАРЕ1, hАРЕ1 и Rrp1. И хотя фаза снижения уровня интенсивности флуоресценции в случае хАРЕ1 заканчивалась довольно поздно (в сравнении с другими ферментами), это явление связано с отсутствием выраженной фазы последующего роста FRET-сигнала, характеризующего превращение комплекса $(E \cdot S)_1$ в комплекс $(E \cdot S)_2$. Действительно, природа комплекса $(E \cdot S)_2$ требует дополнительного выяснения, поскольку формирование этого комплекса не является универсальной особенностью всех исследованных ферментов типа АРЕ1. Возможно, в ходе взаимодействия с неповрежденной ДНК этот комплекс характеризует эффективность связывания фермента с 3'-концом дуплекса в попытке начать 3'-5'-экзонуклеазную деградацию ДНК.

Стоит заметить, что хотя значения констант скорости прямой и обратной реакций, характеризующих превращение фермент-субстратного комплекса $(E \cdot S)_1$ в комплекс $(E \cdot S)_2$, показали почти девятикратную разницу в случае констант k_2 , итоговое значение константы K_2 было примерно одинаковым среди всех ферментов, за исключением хАРЕ1. В результате различия в значениях общей константы ассоциации K_{ass} с неповрежденной ДНК полностью объясняются различиями в значениях константы K_1 , характеризующей эффективность первичного связывания ДНК. В целом можно заключить, что формирование фермент-субстратного комплекса $(E \cdot S)_2$ в случае Rrp1 было наименее эффективным среди исследуемых ферментов. Это может быть связано с возможным влиянием самого крупного N-концевого фрагмента или с заменой Arg181Asn в ДНК-связывающем центре Rrp1. Таким образом, эти

особенности Rrp1 могут играть некоторую роль в превращениях первичного комплекса в процессе взаимодействия с неповрежденным ДНК-лигандом. Тем не менее, в случае связывания ДНК, содержащей F-сайт (таблица 4), эффективность образования каталитически компетентного комплекса была довольно близкой среди всех ферментов типа APE1, что позволяет предположить, что эффективность образования различных комплексов и их конформационные превращения зависят от природы ДНК, связанной этими ферментами.

3.2.4. Взаимодействие ферментов типа APE1 с ДНК-субстратами, содержащими NIR-повреждения

3.2.4.1. Анализ эффективности расщепления NIR-субстратов

Эффективность расщепления ДНК-субстратов, содержащих α A, ϵ A, DHU или U, тремя AP-эндонуклеазами была проанализирована методом гель-электрофореза (рисунки 37А-Г). Как показано на рисунке 37Д, все ферменты типа APE1 способны расщеплять ДНК-субстраты, содержащие ϵ A, DHU или U. Неожиданно, было обнаружено, что Rrp1 не проявляет активности по отношению к ДНК, содержащей α A, в то время как xAPE1 и zAPE1 способны распознавать это повреждение в качестве субстрата (рисунок 37Б). Что касается активности hAPE1 в отношении различных нуклеотидов-мишеней, было показано [18,19,70], что α A является лучшим субстратом, чем ϵ A или U, однако это повреждение расщепляется значительно менее эффективно, чем DHU [18]. Эти данные указывают на то, что, несмотря на высокую идентичность аминокислотных остатков активного центра среди всех исследованных ферментов типа APE1, они обладают некоторыми индивидуальными особенностями распознавания субстратов.

3.2.4.2. Конформационные изменения поврежденных ДНК-субстратов при взаимодействии с ферментами типа APE1

Чтобы зарегистрировать конформационные изменения поврежденной ДНК в процессе связывания с ферментами zAPE1, xAPE1 или Rrp1, регистрировали изменения интенсивности FRET-сигнала ДНК-субстратов FRET-DHU/G, FRET- ϵ A/T, FRET- α A/T или FRET-U/G (рисунок 38). Очень низкая скорость сайт-специфичного расщепления ДНК с одновременной 3'-5'-экзонуклеазной деградацией ДНК-субстратов в некоторых условиях с большим временем реакции не позволили зарегистрировать полный ферментативный цикл, который включал бы связывание ДНК, расщепление и диссоциацию комплекса с продуктом. Вследствие этого ограничения общая кинетическая схема взаимодействия ферментов с поврежденными ДНК-субстратами не была определена. Все кинетические кривые, полученные в диапазоне времени до 10 с, отражают только процесс связывания ДНК, поскольку, как было продемонстрировано с

помощью гель-электрофореза (рисунок 37), за данный временной интервал не происходило какого-либо значительного расщепления этих ДНК-субстратов.

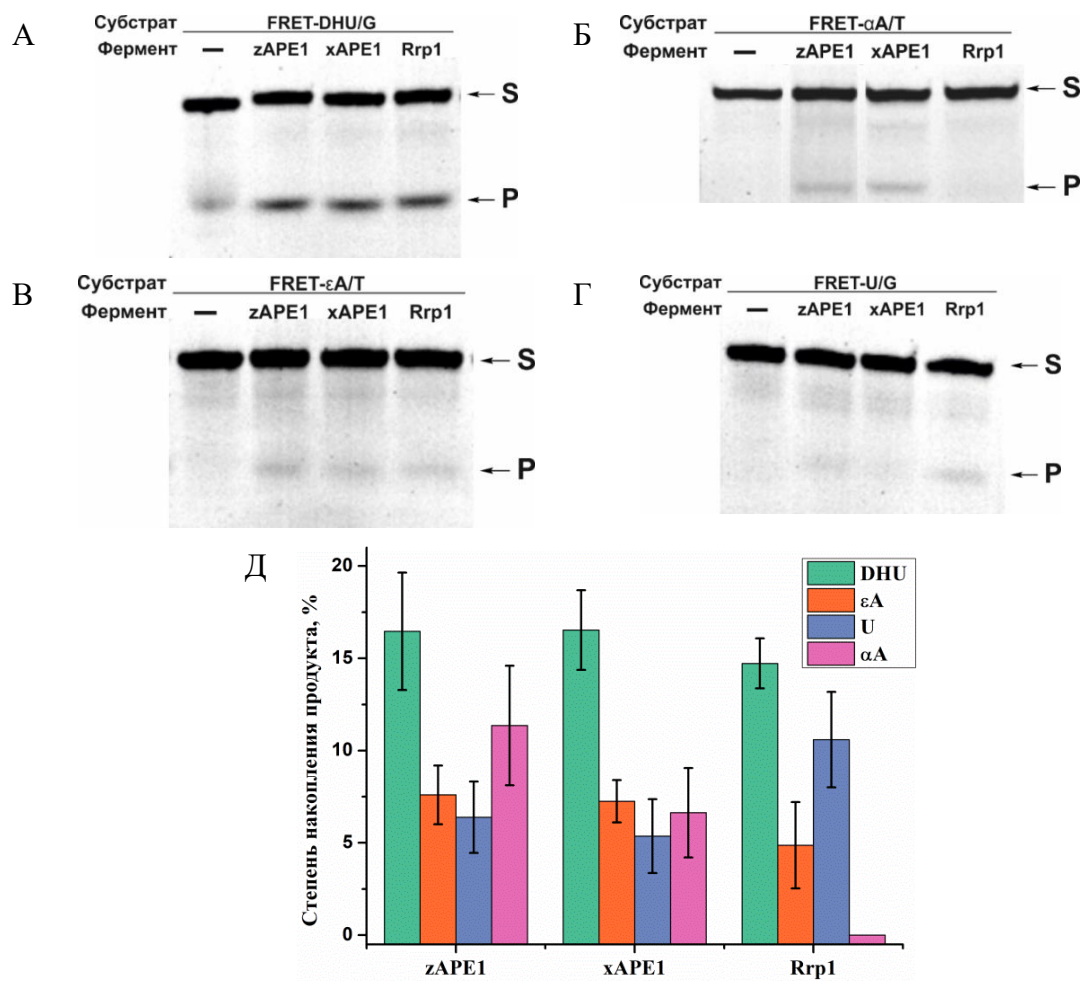


Рисунок 37. Анализ расщепления ДНК-субстратов ферментами типа APE1 в процессе взаимодействия с FRET-DHU/G (А), FRET-αA/T (Б), FRET-εA/T (В) или FRET-U/G (Г) методом гель-электрофореза. Сравнение эффективности расщепления модельных ДНК-субстратов ферментами типа APE1 (Д). [Фермент] = [ДНК-субстрат] = 1,0 мкМ. Т = 25°C, время реакции составляло 2 ч. Подробные условия реакций приведены в разделе 2.7 Материалов и методов. S – субстрат, P – продукт расщепления цепи ДНК. Значения степени накопления продукта представлены как среднее от трех экспериментальных значений ± SD. P-уровень значимости для значений, не пересекающихся в пределах ошибки, составил не более 0,01.

Поэтому все изменения FRET-сигнала, отображенные на рисунке 38, характеризуют исключительно связывание ДНК-субстрата ферментами и последующие конформационные превращения фермент-субстратного комплекса. Сложность полученных кинетических кривых и низкое соотношение сигнала к шуму в некоторых случаях не позволили провести математическую обработку кривых.

Кинетические кривые, зарегистрированные для взаимодействий между AP-эндонуклеазами и FRET-DHU/G-субстратом, содержали начальную стадию падения FRET-сигнала, за которой следовал рост, как и в случае с неповрежденной ДНК (рисунок 38А).

Наиболее выраженными были изменения FRET-сигнала в случае связывания DHU-содержащей ДНК ферментами zAPE1 и xAPE1. Быстрое начальное падение FRET-сигнала, продолжающееся в течение 0,02 с, скорее всего, отражало возникновение первичного фермент-субстратного комплекса. В случае Rrp1 эта стадия оказалась, по крайней мере, в 10 раз медленнее и подходила к завершению только к 0,3 с. Ввиду низкой скорости формирования первичного фермент-субстратного комплекса, вторая стадия роста FRET-сигнала также оказалась значительно медленнее для Rrp1, по сравнению с xAPE1 и zAPE1.

Флуоресцентные кривые, полученные для взаимодействия zAPE1 и xAPE1 с ДНК-субстратом, содержащим ϵ A (рисунок 38Б), содержали фазу падения FRET-сигнала на начальном участке до 0,02 и 0,4 с, соответственно, с последующим ростом сигнала в случае zAPE1 и xAPE1. Взаимодействие Rrp1 с FRET- ϵ A/T субстратом приводило только к падению FRET-сигнала до 10 с. Стадия первоначального связывания для Rrp1, как и ожидалось, была медленнее, чем в случае других ферментов, что согласуется с данными для неповрежденной ДНК. Тем не менее, 20-кратная разница в скорости между zAPE1 и xAPE1 указывает на значительный разброс в скорости узнавания ϵ A, в сравнении с DHU (рисунки 38А, Б). Полученные данные свидетельствуют о том, что основание ϵ A, будучи более объемным, чем DHU, распознается ферментами типа APE1 с совершенно иной эффективностью. Ранее на примере hAPE1 было показано [19], что размещение поврежденного основания в кармане активного центра связано со значительным изменением структуры «петли распознавания повреждения», которая включает в себя остатки Asn229, Thr233 и Glu236. Сравнение аминокислотных последовательностей исследуемых ферментов (рисунок 30) показало, что аминокислотные остатки Thr233 и Glu236 являются полностью консервативными, в то время как остаток Asn229 заменен на треонин у фермента xAPE1. Также стоит отметить, что мутантные формы фермента hAPE1 с заменой остатка Asn229 проявляют значительно более слабую способность связываться с поврежденными ДНК-субстратами [343,344]. Более того, остаток Ala230, участвующий в формировании кармана для связывания поврежденных нуклеотидов, также заменен у фермента xAPE1 на жесткий остаток пролина. Таким образом, крайне схожие в процессе взаимодействия с нуклеотидом, утратившим основание, или даже с DHU, ферменты zAPE1 и xAPE1 значительно отличаются по скорости формирования первичного комплекса с ДНК и его последующих превращений в процессе взаимодействия с объемным основанием ϵ A.

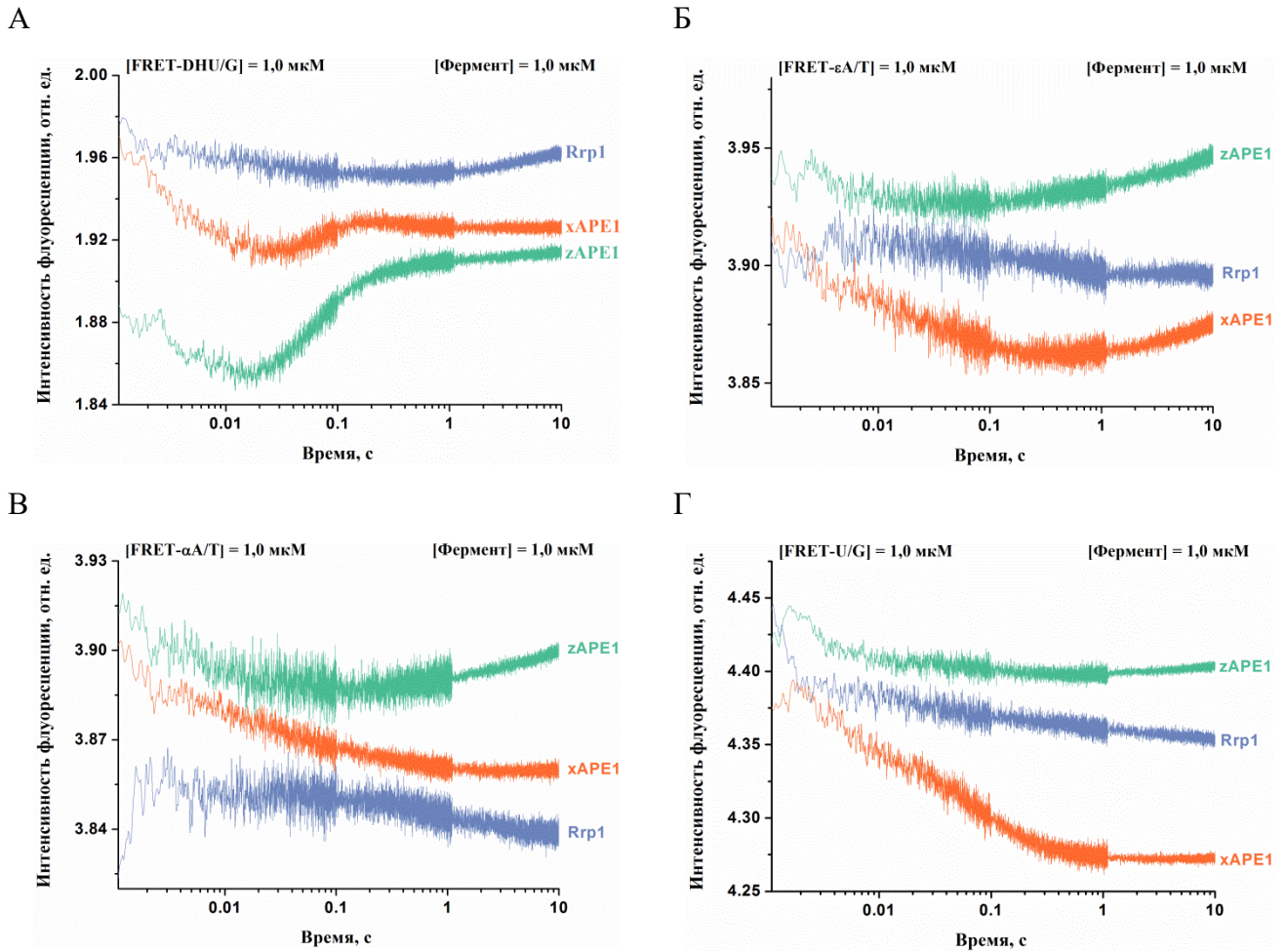


Рисунок 38. Связывание ферментов типа APE1 с FRET-DHU/G (А), FRET-εA/T (Б), FRET-αA/T (В) или FRET-U/G-субстратом (Г). [Фермент] = [ДНК-субстрат] = 1,0 мкМ.

Более того, данные, полученные для ДНК-субстратов, содержащих αA и U (рисунки 38В, Г), показали более медленное формирование первичного комплекса для xAPE1 по сравнению с zAPE1. С одной стороны, данные симуляция молекулярной динамики [19] указывают на то, что в процессе распознавания различных поврежденных нуклеотидов, ДНК-связывающий сайт ферментов типа APE1 должен претерпевать конформационные изменения для того чтобы разместить нуклеотид, содержащий поврежденное основание. С другой стороны, как было показано в той же работе [19], расщепление субстратов, содержащих αA и εA, является в той или иной мере эффективным, поскольку положение этих оснований в связывающем кармане не соответствует оптимальным расстояниям между расщепляемой фосфатной группой и каталитическими аминокислотными остатками. Полученные данные в целом подкрепляют идею, согласно которой NIR-активность AP-эндонуклеаз является общей функцией для этих ферментов.

3.2.5. Сравнительный анализ взаимодействия ферментов типа APE1 с ДНК-субстратами, содержащими различные повреждения, и неповрежденной ДНК

Полученные данные по конформационной динамике меченых FRET-парой ДНК-субстратов, содержащих различные повреждения, а также неповрежденного ДНК-дуплекса, в процессе взаимодействия с ферментами zAPE1, xAPE1 и Rrp1, позволили детализировать модель распознавания субстратов ферментами типа APE1, предложенную для hAPE1. Константы связывания ДНК-субстрата, содержащего F-сайт, оказались близкими по значению для всех исследуемых AP-эндонуклеаз, что позволяет предположить, что распознавание AP-сайта данными ферментами, скорее всего, основывается на трех «китах»: пластичности ДНК, способности F-сайта выворачиваться из дуплекса и отсутствии стерических затруднений на пути выворачивания повреждения в активный центр фермента. Тем не менее, фермент Rrp1 показал значительно более низкую скорость каталитической реакции с ДНК, содержащей F-сайт, по сравнению с zAPE1 и xAPE1. Возможно, этот эффект связан с утратой остатка Asp70, участвующего в координации ко-фактора Mg^{2+} в активном центре фермента. Это предположение согласуется с данными об умеренном снижении AP-эндонуклеазной активности мутантной формы hAPE1, содержащей замену Asp70Ala [193].

Процесс связывания, приводящий к изменениям FRET-сигнала в ходе взаимодействия с неповрежденной ДНК и ДНК-субстратами, содержащими поврежденные основания, оказался наиболее быстрым в случае фермента zAPE1, при этом скорости этих процессов сравнимы с указанными ранее для hAPE1 [18,19]. Необходимо отметить, что замена двух аминокислотных остатков в кармане для связывания поврежденного основания (Asn229Thr и Ala230Pro) в случае xAPE1 в сравнении с другими ферментами типа APE1 (hAPE1, zAPE1 и Rrp1), приводит к значительным различиям в скорости формирования первичного комплекса с ДНК, содержащей αA, εA или U, но не с ДНК, содержащей менее жесткий F-сайт или непланарное основание DHU. В случае с Rrp1, связывание неповрежденной ДНК и ДНК-субстратов, содержащих поврежденные основания, ожидаемо оказалось наиболее медленным. Несмотря на то, что замена остатка Arg181 в ДНК-связывающем центре на остаток аспарагина не оказывает влияния на формирование каталитически компетентного комплекса в случае F-содержащей ДНК, эта мутация могла нарушить процессы неспецифического связывания и распознавания более громоздких нуклеотидов, содержащих поврежденные основания. Другим возможным фактором, способным оказывать влияние на процесс связывания ДНК, является N-концевой фрагмент исследуемых ферментов. И хотя роль N-концевого фрагмента в связывании ДНК и распознавании поврежденных оснований находится вне рамок данного исследования, вполне вероятно, что более низкая аффинность при связывании неповрежденной ДНК и ДНК-

субстратов, содержащих поврежденные основания, связана с различиями в этом фрагменте. Как было предположено для hAPE1, N-концевой фрагмент влияет на скорость формирования фермент-субстратного комплекса при осуществлении NIR и 3'-5'-экзонуклеазной реакций [10,41,212], но не в случае расщепления AP-сайта [335,336].

3.3. Апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза EndoQ из *Pyrococcus furiosus*

Недавно у гипертермофильных архей *Pyrococcus furiosus* была обнаружена новая ДНК-эндонуклеаза EndoQ, обладающая AP-эндонуклеазной активностью, но не принадлежащая ни к одному из двух известных структурных семейств. При этом установлено, что субстратная специфичность и природа каталитического расщепления поврежденной ДНК ферментом EndoQ имеют много общего с AP-эндонуклеазами из семейств Xth и Nfo. Поскольку AP-эндонуклеазы из семейств Xth и Nfo не только являются одними из ключевых ферментов BER, но также играют важную роль в процессе NIR, расщепляя ДНК, содержащую поврежденные нуклеотиды [10,38,40,41,278], группой ученых, впервые выделивших EndoQ, также высказывалось предположение о возможной роли этого фермента в данных процессах репарации [290]. Более того, фермент EndoQ, по-видимому, играет важную роль в удалении U из ДНК некоторых организмов, так как способен восполнить каталитическую активность и урацил-ДНК-гликозилазы и AP-эндонуклеазы [84]. С учетом того, что новый фермент не обладает структурным сходством с какими бы то ни было известными AP-эндонуклеазами [294], семейство ферментов EndoQ, возможно, представляет собой новый класс мультифункциональных AP-эндонуклеаз. В связи с этим в данной работе выполнено исследование механизма взаимодействия фермента EndoQ с модельными поврежденными и неповрежденными ДНК-субстратами и проведено сравнение с данными о механизме действия представителей структурного семейства Xth.

3.3.1. Влияние катионов различных двухвалентных металлов на активность EndoQ

Влияние на активность EndoQ таких условий реакции как pH, концентрация и природа двухзарядных катионов, а также температура реакции, было показано в работе Ishino et al. [293]. Согласно данным, опубликованным в этой работе, активность EndoQ по отношению к ДНК-субстрату, содержащему Hx, была максимальной в присутствии 1,0 мМ Mn^{2+} , и уменьшалась при замене Mn^{2+} на Mg^{2+} и Ca^{2+} , а в присутствии 1,0 мМ Zn^{2+} или ЭДТА в той же концентрации активность отсутствовала вовсе. В связи с этим в рамках данной работы был проведен анализ влияния концентрации различных двухзарядных катионов на активность фермента EndoQ по отношению к поврежденному ДНК-субстрату FRET-F/G. Для этого фермент EndoQ предварительно выдерживали в буфере, содержащем 1 мМ ЭДТА, для удаления любых двухзарядных катионов из раствора. Далее 2,0 мкМ раствор фермента добавляли к 2,0 мкМ FRET-F/G-субстрату в присутствии различных концентраций катионов двухвалентных металлов, после чего по истечении определенного времени реакцию останавливали, и аликвоты реакционной смеси анализировали с помощью гель-электрофореза, как описано в разделе 2.6

Материалов и методов. Реакцию проводили в присутствии Mn^{2+} (рисунок 39А), Ca^{2+} (рисунок 39Б), Zn^{2+} (рисунок 39В) либо Mg^{2+} (рисунок 39Г), при этом концентрацию катионов металлов варьировали от 0 до 5,0 мМ [в присутствии 1,0 мМ ЭДТА].

Согласно данным этих экспериментов, фермент EndoQ обладал крайне низким уровнем активности по отношению к ДНК-субстрату, содержащему F-сайт, в присутствии катионов Mn^{2+} , Ca^{2+} или Zn^{2+} в любой использованной концентрации в течение времени вплоть до 30 мин. Наибольший уровень накопления продукта расщепления FRET-F/G-субстрата ферментом EndoQ наблюдался в присутствии Mg^{2+} при концентрациях от 1,0 мМ и выше [в присутствии 1,0 мМ ЭДТА] (рисунки 39Г, 40). Согласно данным рентгеноструктурного анализа, белок EndoQ содержит три катиона Zn^{2+} , однако для реализации каталитической активности также необходим дополнительный ион Mg^{2+} [294,295]. Полученные нами данные указывают на то, что активность фермента после обработки ЭДТА восстанавливается только катионами Mg^{2+} , и никакими другими. Это может говорить о том, что главную роль в каталитическом процессе, осуществляемом EndoQ, играет именно ион Mg^{2+} , а не ионы Zn^{2+} , которые, по-видимому, выполняют роль в структурной организации доменов фермента, таких как цинковый палец и РНР-домен. Необходимо отметить, что при обработке хелатирующими агентами, возможно, не происходит удаления ионов Zn^{2+} из белковой структуры фермента, как это было показано в случае АР-эндонуклеазы Nfo [276,283].

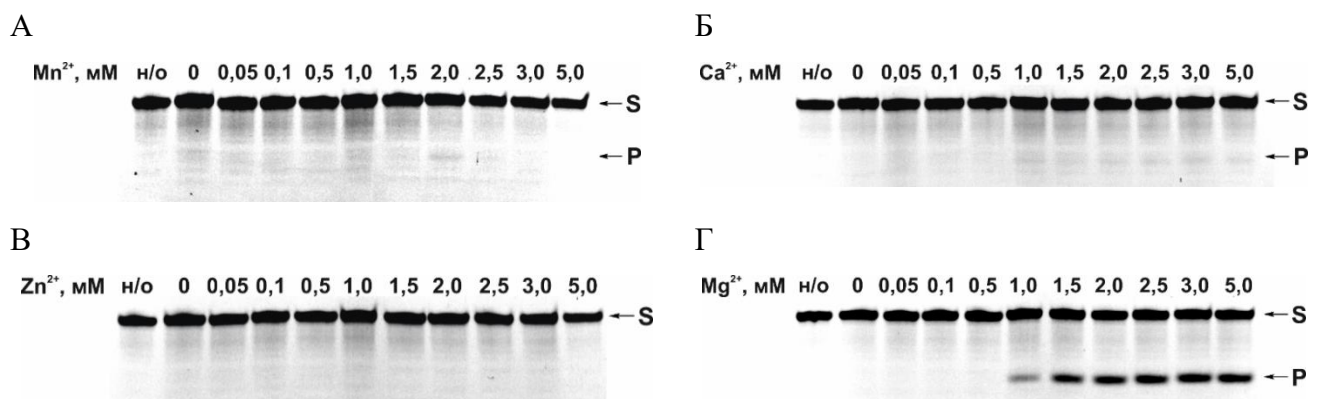


Рисунок 39. Визуализация продуктов реакции расщепления FRET-F/G-субстрата ферментом EndoQ в присутствии различных концентраций Mn^{2+} (А), Ca^{2+} (Б), Zn^{2+} (В) или Mg^{2+} (Г) после их разделения методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях. [EndoQ] = [FRET-F/G] = 1,0 мкМ. Реакция проводилась в течение 30 мин при температуре 40°C. S – субстрат, P – продукт эндонуклеазного расщепления цепи ДНК, н/о – субстрат, не подвергавшийся обработке ферментом.

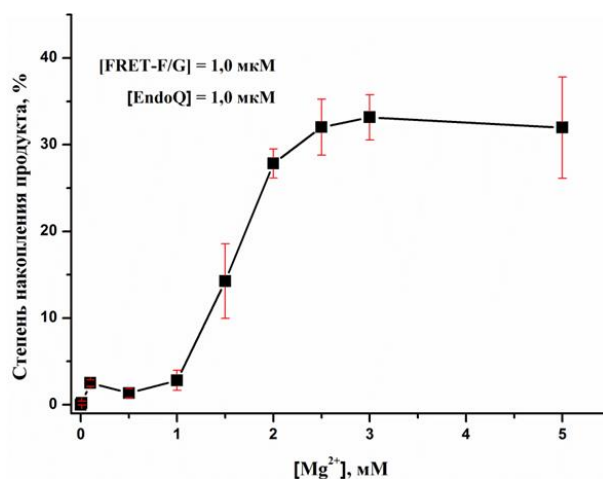


Рисунок 40. Влияние концентрации Mg^{2+} на эффективность расщепления FRET-F/G ДНК-субстрата ферментом EndoQ. $[EndoQ] = [FRET-F/G] = 1,0 \text{ мкМ}$. $T = 40^\circ\text{C}$, время реакции составило 3 мин. Каждое значение степени накопления продукта является результатом усреднения трех экспериментов, ошибка представлена в виде диапазона значений SD.

3.3.2. Зависимость активности фермента EndoQ от нуклеотида, расположенного напротив поврежденного основания комплементарной цепи

Siraishi и Iwai в своей работе [292] показали, что активность EndoQ по отношению к ДНК-субстратам, содержащим такие повреждения как U, 5hU и Hx, зависит от стабильности пары оснований, образуемых поврежденным основанием и основанием в комплементарной цепи. Было показано, что эффективность расщепления субстратов убывает в ряду $U/C > U/T > U/G > U(\text{о.ц.}) > U/A$; $5hU/C > 5hU/T > 5hU/G > 5hU/A > 5hU(\text{о.ц.})$ и $Hx/T > Hx/G > Hx/A > Hx(\text{о.ц.}) > Hx/C$, и имеет негативную корреляцию со стабильностью пары оснований.

Чтобы определить влияние природы основания комплементарной цепи на эффективность расщепления ДНК, содержащей в качестве повреждения F-сайт, Hx или U, ферментом EndoQ, были выполнены эксперименты по регистрации накопления продуктов реакции с использованием 17-звенных ДНК-дуплексов, содержащих одно из перечисленных повреждений напротив A, C, G или T. Для визуализации продуктов методом гель-электрофореза использованные ДНК-субстраты содержали FAM на 5'-конце поврежденной цепи. Согласно данным этих экспериментов, порядок эффективности расщепления субстратов ферментом EndoQ был следующим: $FRET-F/A > FRET-F/T > FRET-F/C > FRET-F/G > FAM-F(\text{о.ц.})$ (рисунок 41А), $FAM-Hx(\text{о.ц.}) > FRET-Hx/G > FRET-Hx/T > FRET-Hx/A > FRET-Hx/C$ (рисунок 41Б) и $FAM-U(\text{о.ц.}) > FRET-U/G \approx FRET-U/C > FRET-U/T > FRET-U/A$ (рисунок 41В). При этом согласно литературным данным был получен ряд $Hx/T > Hx/G > Hx/A > Hx(\text{о.ц.}) > Hx/C$ и $U/C > U/T > U/G > U(\text{о.ц.}) > U/A$ [292]. Неожиданно, ДНК-субстраты, содержащие неспаренные Hx или U, оказались наиболее эффективно расщепляемыми субстратами для EndoQ, по сравнению со всеми четырьмя вариантами в д.ц. ДНК, в то время как о.ц. ДНК,

содержащая F-сайт, оказалась крайне неподходящим субстратом, что согласуется с данными, полученными ранее [290,292]. Возможно, отличие полученных в настоящей работе данных для о.ц. ДНК, содержащей U или Hx, от данных, описанных в литературе [292], обусловлено различными условиями реакции и длиной ДНК-субстратов.

Данные, полученные для FRET-F/N-субстратов, позволяют заключить, что природа основания, расположенное напротив F-сайта, оказывает некоторое влияние на эффективность расщепления ДНК даже в случае отсутствия основания для формирования каких-либо контактов. Это свидетельствует о том, что природа нуклеотида, расположенного напротив повреждения, оказывает влияние на процесс изгибания ДНК-дуплекса, необходимого для выворачивания поврежденного нуклеотида в активный центр фермента. Подобное влияние было показано раньше для расщепления F-содержащей ДНК ферментами hAPE1 и Nfo [15,20,345]. Авторы одной из работ [20] выдвинули предположение, что превалирующий эффект такого влияния может быть связан со стадией связывания ферментов с ДНК-субстратами. В более ранней работе [15] также высказывалось предположение о суммарном эффекте природы нуклеотидов, окружающих повреждение.

Средний уровень накопления продукта расщепления субстрата FRET-Hx/C был наименьшим среди всех остальных вариантов. Согласно литературным данным, эти основания формируют наиболее стабильную пару для данного повреждения [292,346]. Стоит отметить, что общая разница в уровне эффективности расщепления по отношению к одному повреждению в различном контексте оказалась не очень большой с учетом экспериментальных ошибок. Различия между степенью накопления продуктов были наименее статистически достоверными в случае ДНК-субстратов, содержащих в качестве повреждения U ($p > 0,05$). При сравнении разных типов повреждений наибольшая эффективность расщепления была обнаружена для F-сайта, тогда как степень расщепления ДНК, содержащей U и Hx, была меньше. Тем не менее, можно сказать, что U-содержащая ДНК расщеплялась более эффективно, чем Hx. Кроме того, можно предположить, что природа нуклеотида, расположенного напротив повреждения, в случае U и Hx не только оказывает влияние на способность ДНК-дуплекса к изгибанию, как в случае с F-сайтом, но и может стабилизировать поврежденный участок за счет комплементарных взаимодействий с U и Hx, и приводит к наложению данных эффектов на общую эффективность расщепления поврежденной ДНК.

Интересно, что EndoQ оказался более каталитически активным по отношению к о.ц. ДНК-субстратам, содержащим U или Hx, но не проявил практически никакой активности по отношению к F-сайту в контексте о.ц. ДНК. На основании структурных данных было высказано предположение, что большую часть контактов EndoQ формирует с поврежденной цепью ДНК, с 3' и 5'-стороны от повреждения [295].

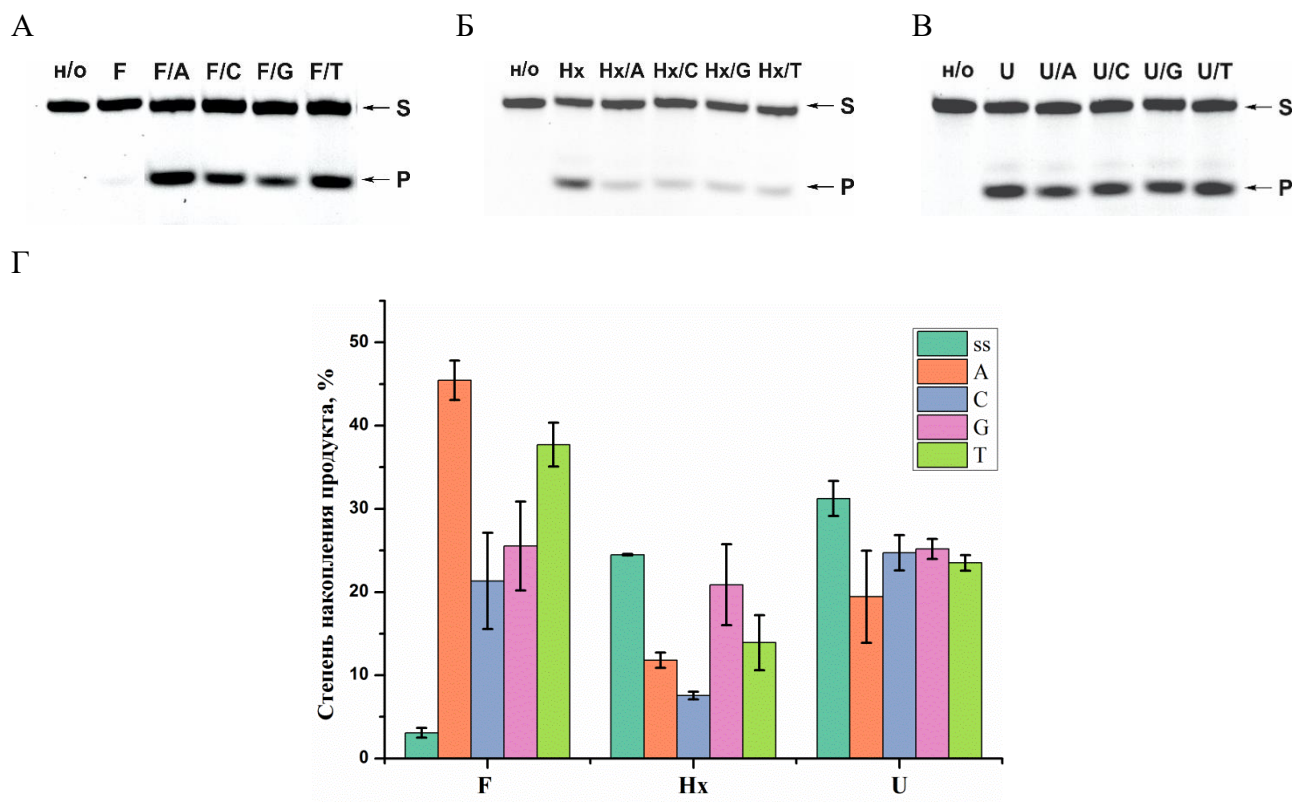


Рисунок 41. Регистрация продуктов расщепления ДНК-субстратов, содержащих F-сайт (А), Hx (Б) или U (В) ферментом EndoQ методом гель-электрофореза. Напротив поврежденного основания располагался А, С, G или Т в д.ц. ДНК, или же поврежденное входило в состав о.ц. ДНК. (Г) Сравнение зависимости эффективности расщепления модельных ДНК-субстратов ферментом EndoQ от типа нуклеотида, расположенного напротив повреждения, или его отсутствия. [Фермент] = [ДНК-субстрат] = 1,0 мкМ. Т = 40°C, время реакции составляло 3 мин. Подробные условия реакций приведены в разделе 2.8 Материалов и методов. S – субстрат, P – продукт расщепления цепи ДНК, а н/о – образец, необработанный ферментом. Значения степени накопления продукта представлены как среднее от трех экспериментальных значений $\pm$ SD. Р-уровень значимости для значений, не пересекающихся в пределах ошибки, составил не более 0,05.

Эффективное расщепление о.ц. ДНК-субстрата, содержащего U и Hx подтверждает эту теорию, однако низкий уровень расщепления таких повреждений как F-сайт, DHU и 5hU в контексте о.ц. ДНК [292] приводит к заключению, что существует принципиальное отличие между этими двумя группами субстратов, которое оказывает наибольший эффект в отсутствие комплементарной цепи. Согласно структурным данным, в активном центре фермента EndoQ располагается карман распознавания повреждений, в котором формируется сеть водородных связей с U или Hx [294,295]. Предполагается, что этот карман обеспечивает положительную селекцию поврежденных азотистых оснований U или Hx за счет образования специфических контактов с аминокислотными остатками Leu170, Ser171 и Lys243. Кроме того, посредством стерических затруднений с другими поврежденными азотистыми основаниями может формироваться негативная селекция повреждений, что в конечном итоге обеспечивает строгую

субстратную специфичность EndoQ по отношению к Нх и U и их химическим аналогам [292,295]. При этом отсутствие основания в случае F-сайта, наряду с общим дестабилизирующим эффектом этого повреждения [347], делает F-сайт даже более предпочтительным субстратом, чем Нх или U. Тем не менее, существует возможность, что водородные связи, формируемые между аминокислотными остатками распознающего кармана и основаниями U/Нх, вносят определенный вклад в стабильность комплекса фермента EndoQ с ДНК, содержащей эти повреждения. Эта стабилизация, по-видимому, не способна полностью компенсировать энергетические затраты на выворачивание поврежденного основания и его правильное размещение в активном центре фермента, однако ее вклад становится чрезвычайно важным в случае, если фермент связывается с о.ц. ДНК.

Чтобы оценить влияние природы нуклеотида, расположенного напротив повреждения, на кинетику взаимодействия EndoQ с поврежденными ДНК-субстратами, 2,0 мкМ ДНК-субстрата, содержащего F-сайт, Нх или U напротив А, С, G или Т, быстро смешивали с ферментом EndoQ в концентрации 2,0 мкМ методом «остановленного потока», и проводили регистрацию изменений FRET-сигнала. Для различных повреждений профиль кинетических кривых имел значительные отличия, в то же время характер изменений флуоресценции во времени был похожим для одного и того же повреждения, расположенного напротив разных нуклеотидов (рисунки 41, 43, 44).

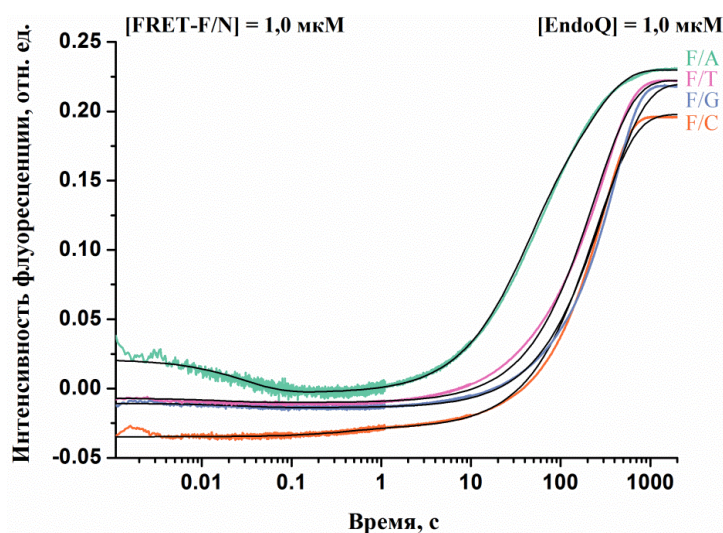


Рисунок 42. Изменения интенсивности FRET-сигнала в процессе взаимодействия фермента EndoQ с FRET-F/N-субстратами, содержащими F-сайт напротив А, С, G или Т. $[EndoQ] = [FRET-F/N] = 1,0$ мкМ, температура составляла 40°C. Подробные условия реакций приведены в разделе 2.10 Материалов и методов. Индивидуальные кривые были обработаны уравнением (8), в котором, в зависимости от кривой, было 2 или 3 экспоненты.

Кинетические кривые, описывающие взаимодействие фермента EndoQ с ДНК-субстратами FRET-F/A, FRET-F/G и FRET-F/T, характеризовались небольшим начальным падением флуоресценции, причем наибольшая амплитуда падения наблюдалась у FRET-F/A, обладающего максимальной эффективностью расщепления среди всех F/N-субстратов (рисунок 42). Наиболее вероятно, что это падение отражает сближение флуорофора FAM и его тушителя BNQ1 в пространстве, происходящее в результате изгибания ДНК-субстрата при формировании комплекса с EndoQ [295]. Амплитуда начальной фазы FRET-сигнала была значительно меньше для FRET-F/G и FRET-F/T-субстратов. Тогда как в случае субстрата FRET-F/C, обладающего наихудшей эффективностью расщепления, взаимодействие с EndoQ приводило к инверсии в сторону роста изменения FRET-сигнала на начальном отрезке времени наблюдения. Данная фаза малоамплитудного роста FRET-сигнала, обнаруженная для FRET-F/C-субстрата, отсутствовала на остальных кривых, характеризующих конформационные изменения F-субстрата (рисунок 42). Маленькие амплитуды стадии первоначального падения/роста, скорее всего, объясняются тем, что последующая фаза роста сигнала, отвечающая процессу расщепления субстрата ферментом EndoQ, обладала значительно большей амплитудой. Предположение о соответствии этой фазы роста каталитическому расщеплению субстрата подтверждается результатами, полученными ранее для других ферментов, расщепляющих ДНК, содержащую F-сайт, а также тем фактом, что F-субстрат действительно подвергался расщеплению на тех временных промежутках, в течение которых происходит фаза роста FRET-сигнала (рисунок 41A). Интересно, что все кинетические кривые, характеризующие взаимодействие фермента EndoQ со всеми четырьмя F-содержащими субстратами, достигали плато в течение 1300 с, при этом скорость выхода на плато уменьшалась в ряду $\text{FRET-F/A} > \text{FRET-F/T} > \text{FRET-F/G} \geq \text{FRET-F/C}$, который соответствует ряду уменьшения расщепления данных ДНК-субстратов.

Кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения ДНК-субстратов FRET-F/C, FRET-F/G и FRET-F/T в ходе взаимодействия с ферментом EndoQ, были обработаны уравнением с двумя экспонентами. Наблюдаемые константы скорости, полученные в результате математической обработки, представлены в таблице 6. Кинетическая кривая, характеризующая конформационные изменения субстрата FRET-F/A, неудовлетворительно описывалась уравнением с двумя экспонентами (данные не представлены), поэтому в случае этого субстрата математическая обработка кривой была проведена с использованием уравнения с тремя экспонентами. Первая наблюдаемая константа скорости k_1 в случае субстратов FRET-F/A, FRET-F/G и FRET-F/T соответствует первоначальному падению флуоресценции. Ее значение было наибольшим для FRET-F/T-субстрата ($53 \pm 4 \text{ с}^{-1}$), значения этой константы для FRET-F/A и FRET-F/G были близки между собой ($33,1 \pm 0,3 \text{ с}^{-1}$ и $34 \pm 4 \text{ с}^{-1}$, соответственно). Константа

скорости k_1 может характеризовать одну из стадий формирования первичного фермент-субстратного комплекса. В результате экспоненциальной обработки кинетической кривой, характеризующей конформационные изменения FRET-F/C-субстрата, была получена наблюдаемая константа скорости k_2 ($2,15 \pm 0,06 \text{ с}^{-1}$), соответствующая характерной только для этой кривой медленной фазе роста FRET-сигнала в интервале времени от 0,1 с до 10 с. Интересно, что математическая обработка кинетической кривой, соответствующей FRET-F/A-субстрату, выявила двухэкспоненциальную зависимость фазы роста FRET-сигнала. В итоге, в данном случае кинетическая кривая характеризуется двухстадийным ростом FRET-сигнала с наблюдаемыми константами скорости k_3 ($0,030 \pm 0,001 \text{ с}^{-1}$) и k_4 ($0,0052 \pm 0,0001 \text{ с}^{-1}$), что указывает на возможную сложность процессов, происходящих во время этой фазы. По-видимому, фаза роста FRET-сигнала отражает не только процесс каталитического расщепления субстрата, но также и процесс дополнительной конформационной подстройки ДНК-субстрата в активном центре фермента. Интересно отметить, что наблюдаемая константа скорости k_4 , отражающая, по-видимому, каталитическую реакцию, отличается между разными ДНК-субстратами не более чем в 1,7 раза. Константа k_4 , наиболее вероятно, соответствует наблюдаемой константе скорости каталитического расщепления k_{cat} . Однако, значение константы k_4 , полученное нами для FRET-F/A-субстрата, примерно в пять раз ниже, чем полученное ранее Shiraishi [292] для расщепления ДНК-субстрата, содержащего A напротив F-сайта, ферментом EndoQ. Скорее всего, это отличие связано с тем, что температура проведения реакции (40°C), выбранная нами в связи с техническими ограничениями применения метода «остановленного потока», на 20°C ниже используемой в экспериментах Shiraishi, в то время как температурный оптимум работы фермента EndoQ находится в области 75°C [293]. Кроме того, на эффективность работы фермента может также оказывать влияние различие в длине используемых ДНК-субстратов (17-мер в нашей работе и 30-мер в работе Shiraishi) и их контексте. Таким образом, совокупность полученных данных позволяет заключить, что скорость протекания каталитической стадии ферментативного процесса не является ключевым фактором, вызывающим наблюдаемые отличия в эффективности расщепления субстратов, содержащих разные нуклеотиды напротив F-сайта. При этом было обнаружено, что процесс связывания данных субстратов имеет индивидуальные отличия, которые, по-видимому, связаны с отдельными этапами последовательных взаимосогласованных конформационных перестроек в фермент-субстратном комплексе, включающих изгибание ДНК в ответ на образование неспецифических контактов в ДНК-связывающем центре фермента.

Взаимодействие фермента EndoQ с ДНК-субстратами, содержащими Nx (рисунок 43) или U (рисунок 44), характеризовалось кинетическими кривыми, профиль которых значительно отличался от профиля для ДНК-субстрата, содержащего F-сайт (рисунок 38). Наиболее важно

то, что все кинетические кривые содержали фазу финального высокоамплитудного роста флуоресценции, но ни одна из них не достигала плато, вследствие чего определение константы, характеризующей каталитическую стадию реакции между EndoQ и поврежденными ДНК-субстратами, оказалось невозможным. Возможно, это является следствием того, что Hx и U оказались более «медленными» субстратами для EndoQ, по сравнению с F-сайтом.

Таблица 6. Значения наблюдаемых констант скорости взаимодействия фермента EndoQ с ДНК-субстратами, содержащими F-сайт. Повреждение располагалось напротив A, C, G или T

Константа	F/A	F/C	F/G	F/T	Стадия
$k_1, \text{с}^{-1}$	33,1±0,3	-	34±4	53±4	первоначальное падение
$k_2, \text{с}^{-1}$	-	2,15±0,06	-	-	первоначальный медленный рост
$k_3, \text{с}^{-1}$	0,030 ±0,001	-	-	-	фаза роста
$k_4, \text{с}^{-1}$	0,0052 ±0,0002	0,0040 ±0,0001	0,0031 ±0,0001	0,0042 ±0,0001	

Константы получены обработкой индивидуальных кривых экспоненциальным уравнением (8); приведенная ошибка является результатом обработки; значение $r^2 > 0,99$.

Кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения ДНК-субстрата, содержащего в качестве повреждения Hx напротив A, C, G или T, в процессе взаимодействия с ферментом EndoQ, представлены на рисунке 43. Как видно на рисунке, за начальным падением FRET-сигнала следовал рост с небольшой амплитудой изменений сигнала, вслед за которым начинался высокоамплитудный рост флуоресценции, продолжавшийся вплоть до 4000 с (панель справа на рисунке 43) и, по-видимому, характеризующий каталитическую стадию процесса. Начальный участок (до 10 с) кинетических кривых, характеризующих взаимодействие EndoQ с субстратами FRET-Hx/A и FRET-Hx/C, был обработан уравнением (8), содержащим две экспоненты. Кривые, соответствующие ДНК-субстратам FRET-Hx/G и FRET-Hx/T были обработаны уравнением с тремя экспонентами. Математическая обработка кинетических кривых вплоть до 10 с позволила рассчитать значения наблюдаемых констант скорости (таблица 7). Установлено, что во всех случаях фаза падения FRET-сигнала на начальном участке кинетических кривых характеризовалась двумя стадиями. Значение наблюдаемых констант скорости k_1 оказалось того же порядка, что и в случае ДНК-субстратов, содержащих F-сайт, что указывает на то, что в данном случае эта константа отражает те же самые процессы в ходе связывания ДНК в активном центре фермента.

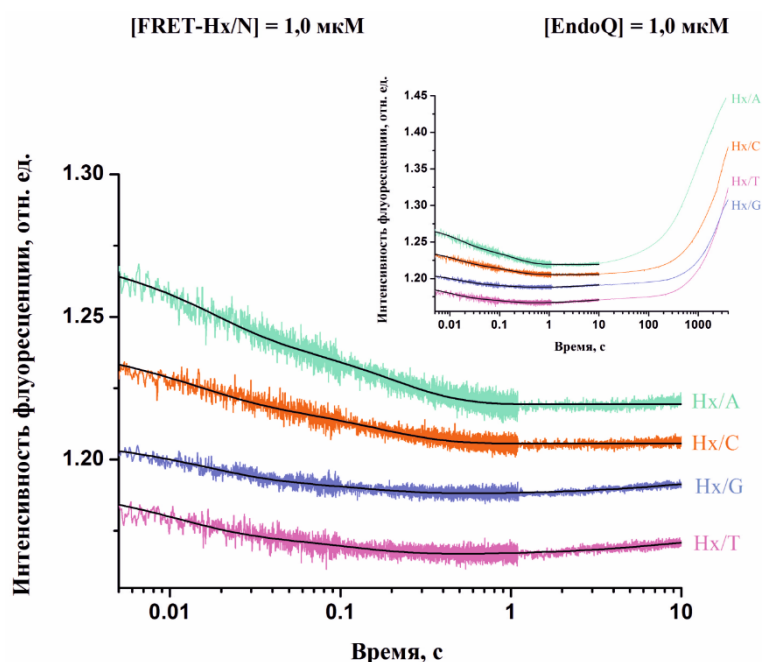


Рисунок 43. Изменения интенсивности FRET-сигнала в процессе взаимодействия фермента EndoQ с FRET-Hx/N-субстратами, содержащими Hx напротив A, C, G или T.

[EndoQ] = [FRET-Hx/N] = 1,0 мкМ, температура составляла 40°C. Подробные условия реакций приведены в разделе 2.10 Материалов и методов. Индивидуальные кривые были обработаны уравнением (8), в котором, в зависимости от кривой, было 2 или 3 экспоненты.

Таблица 7. Значения наблюдаемых констант скорости взаимодействия фермента EndoQ с ДНК-субстратами, содержащими Hx. Повреждение располагалось напротив A, C, G или T					
Константа	Hx/A	Hx/C	Hx/G	Hx/T	Стадия
$k_1, \text{с}^{-1}$	65±1	78±2	69±2	99±3	начальное падение (1 ^{ая} фаза)
$k_2, \text{с}^{-1}$	5,28±0,07	6,4±0,1	8,0±0,4	9,5±0,4	начальное падение (2 ^{ая} фаза)
$k_3, \text{с}^{-1}$	-	-	0,09±0,02	0,11±0,02	медленный рост

Константы получены обработкой индивидуальных кривых экспоненциальным уравнением (8); приведенная ошибка является результатом обработки; значение $r^2 > 0,82$.

Значения k_1 для субстратов FRET-Hx/A и FRET-Hx/G были близки между собой, а наибольшее значение (99 с^{-1}) соответствовало FRET-Hx/T-субстрату. Вторая наблюдаемая константа скорости k_2 , соответствующая второй стадии начального падения FRET-сигнала, была равна $5,28 \text{ с}^{-1}$ в случае FRET-Hx/A-субстрата, а для более эффективно расщепляемых по результатам гель-электрофореза субстратов FRET-Hx/G и FRET-Hx/T ее значение составило 8 с^{-1} и $9,5 \text{ с}^{-1}$, соответственно. Дополнительная фаза роста сигнала, хорошо визуализируемая на кривой, соответствующей FRET-Hx/T-субстрату, дала в результате обработки наблюдаемую константу скорости k_3 . Любопытно, что математическая обработка показала, что это фаза также

присутствует на кривой, характеризующей взаимодействие фермента EndoQ с ДНК-субстратом FRET-Нх/G. К сожалению, медленный процесс каталитического расщепления субстратов не позволил получить наблюдаемую константу скорости для каталитической стадии в случае Нх-содержащей ДНК.

Флуоресцентные кривые, характеризующие конформационные превращения ДНК, содержащей U напротив A, C, G или T, в процессе взаимодействия с ферментом EndoQ, обладали еще более сложным профилем изменений флуоресценции, чем для Нх-содержащей ДНК (рисунок 44). При этом наиболее ярко выраженными были изменения в случае FRET-U/A-субстрата. Первоначальная фаза падения FRET-сигнала сменялась ростом флуоресценции после 1 с. Эта фаза роста обладала меньшей амплитудой и, в свою очередь, сменялась еще одной фазой падения сигнала с низкой интенсивностью изменений флуоресценции. И, в конечном итоге, интенсивность сигнала начинала расти после 100 с, и этот высокоамплитудный рост, отражающий каталитическую стадию реакции, продолжался вплоть до 4000 с (панель справа на рисунке 44). Флуоресцентные кривые, характеризующие конформационные изменения субстратов FRET-U/C, FRET-U/G и FRET-U/T, обладали схожим профилем, но амплитуда всех изменений была ниже, чем в случае FRET-U/A. Более того, кривые, соответствующие субстратам FRET-U/G и FRET-U/T, на первоначальной стадии содержали только одну фазу падения сигнала, завершавшуюся к 0,1 с.

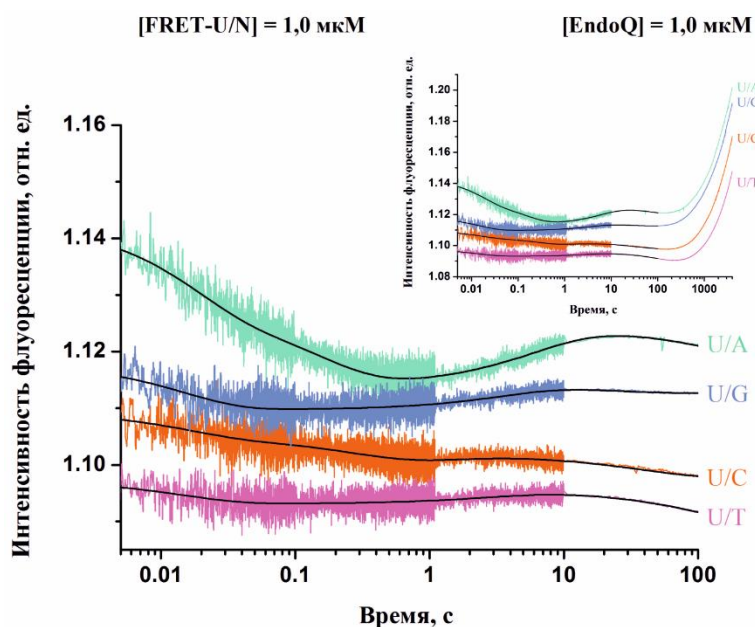


Рисунок 44. Изменения интенсивности FRET-сигнала в процессе взаимодействия фермента EndoQ с FRET-U/N-субстратами, содержащими U напротив A, C, G или T. $[EndoQ] = [FRET-U/N] = 1,0$ мкМ, температура составляла 40°C . Подробные условия реакций приведены в разделе 2.10 Материалов и методов. Индивидуальные кривые были обработаны уравнением (8), в котором, в зависимости от кривой, было 3 или 4 экспоненты.

Кинетические кривые, характеризующие взаимодействия фермента EndoQ с U-содержащей ДНК были обработаны уравнением (8) с тремя экспонентами в случае субстратов FRET-U/G и FRET-U/T, или уравнением с четырьмя экспонентами в случае субстратов FRET-U/A и FRET-U/C. В результате обработки участков кривых вплоть до 100 с были получены наборы наблюдаемых констант скорости (таблица 8).

Таблица 8. Значения наблюдаемых констант скорости взаимодействия фермента EndoQ с ДНК-субстратами, содержащими U. Повреждение располагалось напротив A, C, G или T					
Константы	U/A	U/C	U/G	U/T	Стадия
$k_1, \text{с}^{-1}$	58 ± 2	65 ± 7	67 ± 3	67 ± 6	начальное падение (1 ^{ая} фаза)
$k_2, \text{с}^{-1}$	$6,2 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,2$	-	-	начальное падение (2 ^{ая} фаза)
$k_3, \text{с}^{-1}$	$0,16 \pm 0,01$	$0,8 \pm 0,2$	$0,26 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,04$	фаза роста
$k_4, \text{с}^{-1}$	$0,004 \pm 0,001$	$0,026 \pm 0,006$	$0,06 \pm 0,03$	$0,009 \pm 0,001$	вторая фаза падения
Константы получены обработкой индивидуальных кривых экспоненциальным уравнением (8); приведенная ошибка является результатом обработки; значение $r^2 > 0,5$.					

Отсутствие вплоть до 4000 с финальной стадии с выходом на плато после интенсивного роста FRET-сигнала, отражающего каталитическое расщепление субстрата, не позволило математически обработать кинетические кривые на протяжении всего времени регистрации. Значение первой наблюдаемой константы скорости k_1 было близким для всех U-содержащих ДНК-дуплексов субстратов. Значения этой константы скорости, отражающей, судя по всему, стадию формирования первичного фермент-субстратного комплекса, были одного порядка с соответствующими значениями для F- и Hx-содержащих ДНК-субстратов. Это сходство между тремя различными повреждениями ДНК, расположенными напротив разных нуклеотидов в комплементарной цепи, возможно, говорит о том, что начальные этапы связывания ДНК-субстрата ферментом EndoQ являются общими для этих типов повреждений. Обработка экспоненциальными уравнениями позволила рассчитать значения второй наблюдаемой константы скорости k_2 , соответствующей второй стадии начального падения FRET-сигнала, только в случае кривых, характеризующих конформационные изменения субстратов FRET-U/A и FRET-U/C. Эти значения составили $3,5 \text{ с}^{-1}$ и $2,0 \text{ с}^{-1}$, соответственно. Эти значения меньше, чем в случае ДНК-субстратов, содержащих Hx ($5,28\text{--}9,5 \text{ с}^{-1}$, таблица 7), но все еще лежат в пределах одного порядка. Интересно, что эта стадия оказалась различима для всех Hx-содержащих ДНК-субстратов, но в случае с U она была зарегистрирована только для субстратов FRET-U/A и FRET-U/C. Следующая за начальным падением сигнала фаза роста флуоресценции характеризовалась видимой константой скорости k_3 . Значение k_3 было наибольшим для FRET-

U/C-субстрата ($0,8 \text{ с}^{-1}$) и наименьшим для FRET-U/A-субстрата ($0,16 \text{ с}^{-1}$), а для субстратов FRET-U/G и FRET-U/T значение константы k_3 оказалось близки в пределах ошибки ($0,26 \text{ с}^{-1}$ и $0,32 \text{ с}^{-1}$, соответственно). Значение наблюдаемой константы скорости k_4 , соответствующей следующей стадии падения FRET-сигнала с небольшой амплитудой было наименьшим для FRET-U/A-субстрата, и наибольшим для FRET-U/G-субстрата ($0,004 \text{ с}^{-1}$ и $0,06 \text{ с}^{-1}$, соответственно). Интересно отметить, что для наихудшего по эффективности расщепления FRET-U/A-субстрата наблюдаемые (рисунок 41) константы скорости k_3 и k_4 были наименьшими среди всех субстратов.

3.3.3. Кинетические параметры изменений конформации ДНК-субстратов, содержащих F-сайт, U или Hx, в процессе их взаимодействия с EndoQ

Для того чтобы установить кинетический механизм взаимодействия между ферментом EndoQ и F-, Hx- или U-содержащей ДНК, методом «остановленного потока» регистрировали конформационную динамику $1,0 \text{ мкМ}$ ДНК-субстрата (FRET-F/G, FRET-Hx/A или FRET-U/A) при взаимодействии с EndoQ в различных концентрациях (от $0,75$ до $2,5 \text{ мкМ}$). Субстрат FRET-F/G был отобран для данной серии экспериментов, поскольку кинетическая кривая, характеризующая взаимодействие фермента с этим субстратом в соотношении 1:1, достигала плато в течение времени регистрации, что являлось необходимым условием для расчета параметров, характеризующих каталитическую стадию взаимодействия. Субстраты FRET-Hx/A и FRET-U/A были отобраны вследствие того, что флуоресцентные кривые, характеризующие взаимодействие фермента EndoQ с этими субстратами, обладали наиболее ярко выраженными изменениями FRET-сигнала. Все три исследуемых ДНК-субстрата характеризовались набором кинетических кривых, профиль которых практически полностью совпадал с кривыми, полученными в экспериментах по установлению влияния природы нуклеотида, расположенного напротив повреждения (рисунок 45). Тем не менее, стоит отметить, что взаимодействие FRET-F/G-субстрата с ферментом в концентрации $1,5 \text{ мкМ}$ и выше характеризовалось появлением дополнительной фазы роста сигнала, сходной с той, которая наблюдалась для FRET-F/A-субстрата (рисунки 42, 45A). Эта особенность может указывать на то, что процесс, которому соответствует эта фаза на кривой, может быть в той или иной мере характерен для всех исследуемых в данной работе ДНК-субстратов, содержащих F-сайт.

Кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения меченого красителями ДНК-субстрата FRET-F/G в процессе взаимодействия с ферментом EndoQ, соответствуют трехстадийному механизму реакции (схема 7), который характеризуется константами скорости и равновесными константами, значения которых представлены в таблице 9. Первая и вторая стадии минимального кинетического механизма, скорее всего,

соответствуют процессам связывания ДНК-субстрата и формирования каталитически активного фермент-субстратного комплекса $(E \cdot S)_2$. Последующая необратимая стадия отражает комбинацию процесса каталитического расщепления субстрата и диссоциации комплекса фермента с продуктом. Стоит отметить, что значение константы скорости k_{cat} , полученное для FRET-F/G-субстрата в данной серии экспериментов, имеет близкое значение с наблюдаемой константой скорости, полученной для этого же субстрата путем экспоненциальной обработки ($0,008 \text{ с}^{-1}$ и $0,0031 \text{ с}^{-1}$, соответственно).

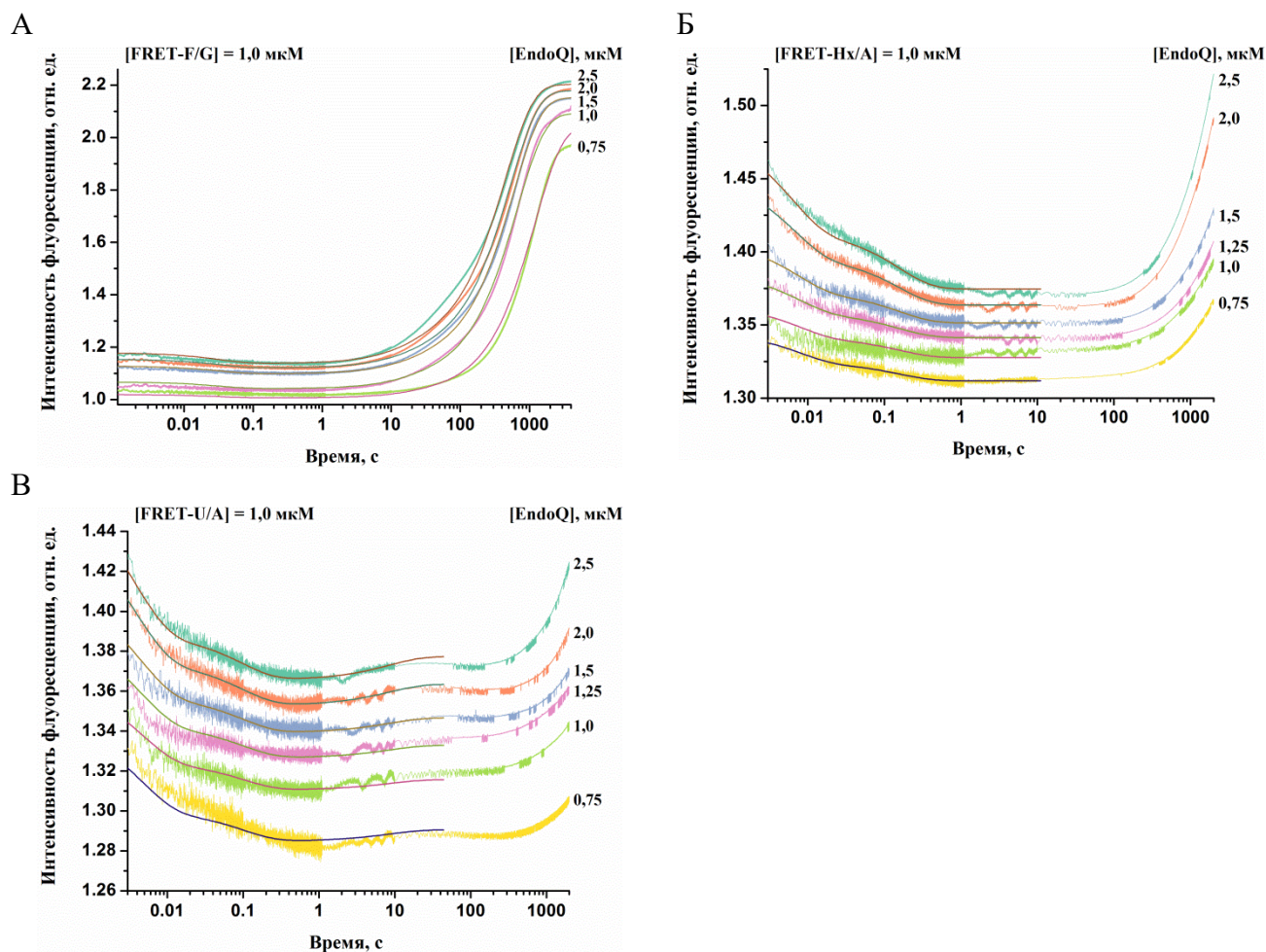
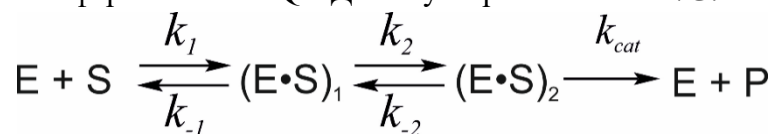


Рисунок 45. Изменения FRET-сигнала в ходе взаимодействия фермента EndoQ с ДНК-субстратами FRET-F/G (А), FRET-Hx/A (Б) или FRET-U/A (В). [ДНК-субстрат] = 1,0 мкМ, концентрации фермента указаны на панели справа. Подробные условия реакций приведены в разделе 2.10 Материалов и методов. Кинетические кривые были обработаны методом нелинейной регрессии.

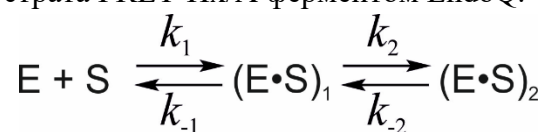
Схема 7. Взаимодействие фермента EndoQ с ДНК-субстратом FRET-F/G.



где E – фермент, S – ДНК-субстрат, $(E \cdot S)_i$ – формы фермент-субстратного комплекса, P – продукт реакции.

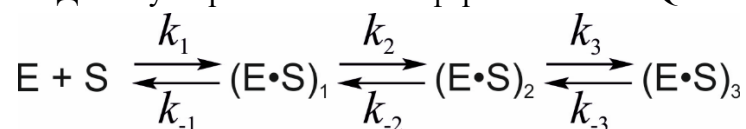
Минимальный кинетический механизм, соответствующий конформационным изменениям ДНК-субстрата FRET-Нх/А при взаимодействии с EndoQ, содержал две обратимые стадии (схема 8). При этом конформационным изменениям FRET-U/А-субстрата соответствовал трехстадийный механизм (схема 9). Прямые и обратные константы скорости, соответствующие схемам 8 и 9, представлены в таблице 9. Первая стадия этих механизмов отражает формирование первичного фермент-субстратного комплекса $(E \cdot S)_1$ и характеризуется прямой и обратной константами скорости k_1 и k_{-1} , и равновесной константой K_1 , вычисленной как отношение k_1 к k_{-1} ($K_1 = k_1 / k_{-1}$). Константы прямой и обратной реакции k_2 и k_{-2} , а также равновесная константа K_2 характеризуют последующее превращение фермент-субстратного комплекса $(E \cdot S)_1$ в комплекс $(E \cdot S)_2$, который может представлять собой каталитически компетентную форму фермент-субстратного комплекса, или одну из предшествующих ей форм. Первые две стадии присутствуют в обоих кинетических механизмах, соответствующих конформационной динамике и FRET-Нх/А, и FRET-U/А, и, наиболее вероятно, отражают одни и те же процессы, происходящие с ДНК в ходе ее связывания ферментом EndoQ. Эти стадии характеризуются падением FRET-сигнала, отражающим сближение флуорофора FAM с тушителем BHQ1 в ходе изгибания ДНК в комплексе с EndoQ. Кинетический механизм, характеризующий взаимодействия EndoQ с FRET-F/G-субстратом также содержит две стадии, соответствующие формированию первичного фермент-субстратного комплекса и его последующей трансформации, однако, вследствие различий профилей флуоресцентных кривых, нельзя с полной уверенностью утверждать, что природа этих процессов общая для всех трех субстратов FRET-F/G, FRET-Нх/А и FRET-U/А.

Схема 8. Связывание субстрата FRET-Нх/А ферментом EndoQ.



где E – фермент, S – ДНК-субстрат, $(E \cdot S)_i$ – формы фермент-субстратного комплекса.

Схема 9. Связывание ДНК-субстрата FRET-U/А ферментом EndoQ.



где E – фермент, S – ДНК-субстрат, $(E \cdot S)_i$ – формы фермент-субстратного комплекса.

Кроме того, в отличие от всех остальных ДНК-субстратов, взаимодействие EndoQ с FRET-U/А-субстратом характеризовалось наличием третьей стадии роста FRET-сигнала, протекающей в период с 1 с по 40 с, и соответствовавшей формированию фермент-

субстратного комплекса $(E \cdot S)_3$. Маловероятно, что данная стадия связана с каталитическим процессом, с учетом временного интервала и низкой интенсивности изменений флуоресценции. Поэтому она, скорее всего, отражает какие-то другие процессы, происходящие со связанной в комплексе с ферментом ДНК. Исходя из полученных данных можно утверждать, что формирование первичного фермент-субстратного комплекса $(E \cdot S)_1$ было менее эффективным для субстрата FRET-Hx/A, по сравнению с FRET-U/A, с учетом того, что константа скорости прямой реакции k_1 была относительно медленной ($17 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Это привело к снижению значения равновесной константы K_1 , характеризующей стабильность комплекса $(E \cdot S)_1$. Стоит также отметить, что значения константы K_1 были меньше единицы для всех трех исследуемых повреждений, что указывает на возможную нестабильность сформированного первичного фермент-субстратного комплекса.

Формирование второго комплекса $(E \cdot S)_2$ происходило примерно в пять раз быстрее для FRET-U/A-субстрата, по сравнению с FRET-Hx/A, хотя общая стабильность этого комплекса была довольно низкой для обоих субстратов. При этом стабильность комплекса $(E \cdot S)_2$ в случае FRET-F/G-субстрата оказалась существенно выше, и значение равновесной константы K_2 составило 5. Однако природа комплекса $(E \cdot S)_2$ для субстратов FRET-F/G, и FRET-Hx/A и FRET-U/A, скорее всего, различна, что делает сравнение кинетических параметров, характеризующих этот комплекс, нерелевантным.

В конечном итоге данные конформационной динамики ДНК-субстратов FRET-Hx/A и FRET-U/A в процессе взаимодействия с EndoQ указывают на формирование не менее двух фермент-субстратных комплексов в процессе образования каталитически-компетентного состояния. При этом данные, полученные методом гель-электрофореза, говорят о довольно эффективном протекании каталитического процесса. Полученные данные являются начальным этапом исследования механизма, обеспечивающего субстратную специфичность EndoQ, и должны быть дополнены новыми данными для создания детальной модели фермент-субстратного взаимодействия.

Таблица 9. Константы скорости прямых и обратных реакций, а также равновесные константы, характеризующие взаимодействие фермента EndoQ с ДНК-субстратами FRET-F/G, FRET-Hx/A или FRET-U/A, полученные в результате обработки соответствующих кинетических кривых методом (рисунок 45) нелинейной регрессии

Константы	F/G	Hx/A	U/A
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$1,4 \pm 0,5$	17 ± 3	74 ± 7
k_{-1}, s^{-1}	26 ± 7	99 ± 7	100 ± 20
$K_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	$0,05 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,04$	$0,8 \pm 0,2$
k_2, s^{-1}	$0,17 \pm 0,04$	$0,8 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,5$
k_{-2}, s^{-1}	$0,032 \pm 0,005$	$6,2 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,3$
K_2	5 ± 2	$0,13 \pm 0,04$	$0,50 \pm 0,08$
k_3, s^{-1}	-	-	$0,10 \pm 0,02$
k_{-3}, s^{-1}	-	-	$0,096 \pm 0,004$
K_3	-	-	$1,0 \pm 0,3$
$k_{\text{cat}}, \text{s}^{-1}$	$0,008 \pm 0,001$	-	-
Значения представлены в виде: среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (SD). * $K_i = k_i/k_{-i}$			

3.3.4. Взаимодействие фермента EndoQ с ДНК-субстратами, содержащими NIR-повреждения

В более ранних работах было показано, что в дополнение к Hx и U, считавшихся основными субстратами для EndoQ, этот фермент также способен расщеплять ДНК, содержащую AP-сайт [290] и некоторые другие повреждения, химически близкие к Hx и U, а именно DHU, 5hU и 5hC [292]. Авторы данной работы предположили, что любое другое повреждение, которое значительно отличалось бы по своей природе или размеру от упомянутых ранее, не сможет расположиться в активном центре фермента необходимым для осуществления катализа образом.

Чтобы исследовать субстратную специфичность фермента EndoQ по отношению к классическим NIR-субстратам, содержащим αA , εA и DHU, в первую очередь были проведены эксперименты по анализу накопления продуктов расщепления ДНК-субстратов FRET- $\alpha\text{A}/\text{T}$, FRET- $\varepsilon\text{A}/\text{T}$, FRET-DHU/G, а также ехо-субстрата и неповрежденной ДНК методом геле-

электрофореза (рисунок 46). Среди всего набора использованных ДНК-субстратов, фермент EndoQ оказался способен расщеплять лишь ДНК-субстрат, содержащий DHU. При этом уровень накопления продукта реакции составил около 20% за 30 мин. Ранее было обнаружено, что EndoQ способен узнавать в ДНК и катализировать эндонуклеазное расщепление некоторых пиримидиновых повреждений, таких как 5hU и 5hC [40,41,292], которые можно отнести к NIR-субстратам. Однако наши данные показывают, что фермент не способен узнавать другой тип NIR-субстратов, а именно алкилированные производные пуринов, такие как α A и ϵ A. Кроме того, фермент EndoQ не проявлял 3'-5'-экзонуклеазную активность в используемых условиях.

Чтобы установить, происходит ли связывание исследуемых ДНК-субстратов ферментом EndoQ, методом «остановленного потока» были зарегистрированы конформационные изменения ДНК, содержащей α A, ϵ A или DHU в качестве NIR-повреждения, а также с неповрежденной ДНК (FRET-C/G) в процессе взаимодействия с ферментом (рисунок 47). Все кинетические кривые были зарегистрированы во временном интервале до 4000 с. Изменения FRET-сигнала при взаимодействии EndoQ с субстратами FRET- α A/T, FRET- ϵ A/T и FRET-C/G отражают только процессы связывания субстрата с ферментом и последующие превращения различных фермент-субстратных комплексов, поскольку методом гель-электрофореза было показано, что за время регистрации сигнала никакого значительного расщепления этих субстратов не происходит. Тем не менее, в случае FRET-DHU/G-субстрата его эндонуклеазное расщепление ферментом EndoQ происходило в данный промежуток времени (до 4000 с), хотя его скорость и была значительно ниже, чем скорость ферментативного расщепления ДНК, содержащей F-сайт, Hx или U.

Флуоресцентная кривая, характеризующая конформационные изменения ДНК-субстрата FRET-DHU/G в ходе взаимодействия с ферментом EndoQ, содержала стадию первоначального двухфазного падения FRET-сигнала вплоть до 1 с, за которой следовала стадия медленного малоамплитудного роста сигнала (рисунок 47A). Эта стадия сменялась ростом флуоресценции с высокой интенсивностью, который начинал свой выход на плато только в районе 4000 с. Характер изменений FRET-сигнала был очень похож в случае FRET-DHU/G- субстрата и субстратов FRET-Hx/A и FRET-U/G. Интересно, что стадия высокоамплитудного роста сигнала раньше всего начиналась для FRET-Hx/A-субстрата (~100 с), следующим по времени являлся FRET-DHU/G (~300 с), и только потом это происходило в случае FRET-U/G (~400 с). При этом необходимо отметить, что если бы эта стадия роста сигнала соответствовала исключительно процессу каталитического расщепления ДНК-субстрата, то согласно результатам экспериментов с использованием гель-электрофореза порядок должен был бы быть следующим: FRET-U/G, FRET-Hx/A и затем FRET-DHU/G.

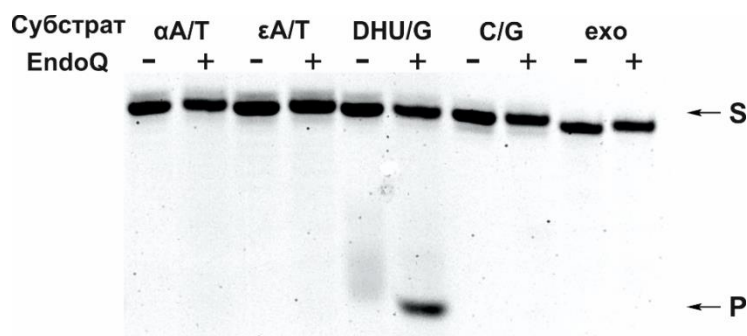
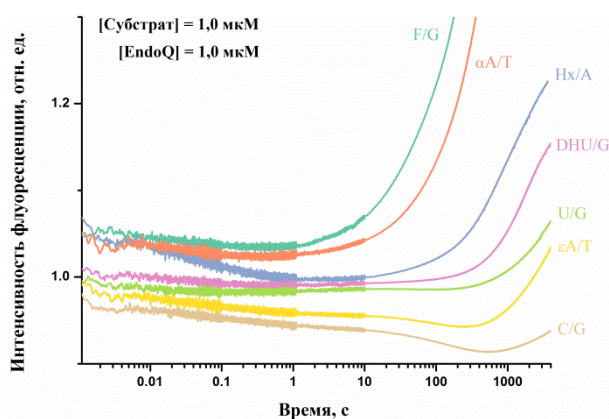


Рисунок 46. Анализ активности фермента EndoQ по отношению к ДНК-субстратам FRET- α A/T, FRET- ϵ A/T, FRET-DHU/G, эхо-субстрату и неповрежденной ДНК методом геле-электрофореза. [Фермент] = [ДНК-субстрат] = 1,0 мкМ. T = 40°C, время реакции составило 30 мин. Подробные условия реакций приведены в разделе 2.8 Материалов и методов. S – субстрат, P – продукт расщепления цепи ДНК.

А



Б

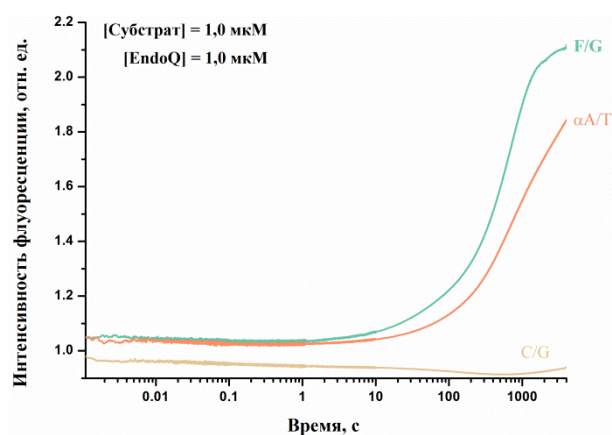


Рисунок 47. Связывание фермента EndoQ с ДНК-субстратами FRET-F/G, FRET- α A/T, FRET-Hx/A, FRET-DHU/G, FRET-U/G, FRET- ϵ A/T и неповрежденным ДНК-лигандом (FRET-C/G) (А). Сравнение кинетических кривых, характеризующих взаимодействие фермента с субстратами FRET-F/G, FRET- α A/T или неповрежденным FRET-C/G-лигандом (Б). [Фермент] = [ДНК] = 1,0 мкМ. Подробные условия реакций приведены в разделе 2.10 Материалов и методов. Флуоресцентные кривые, характеризующие конформационные перестройки субстратов FRET-F/G, FRET-Hx/A и FRET-U/G в процессе взаимодействия с EndoQ представлены на графиках для сравнения.

Другим примером, указывающим на то, что стадия интенсивного роста FRET-сигнала включает в себя несколько процессов, включая процесс эндонуклеазного расщепления, является флуоресцентная кривая, характеризующая процесс взаимодействия EndoQ с ДНК-субстратом, содержащим α A. Эта кривая содержала стадию первоначального падения FRET-сигнала с малой амплитудой, за которой следовала стадия роста сигнала, начинавшаяся даже раньше, чем в случае субстратов FRET-Hx/A или FRET-DHU/G. Эта стадия не может отражать каталитическое расщепление субстрата, поскольку эксперименты по регистрации продуктов расщепления показали, что в рамках временного интервала, на котором происходила

регистрация флуоресценции, сколько-нибудь значимого расщепления α A-содержащей ДНК не происходило.

В случае взаимодействия фермента EndoQ и ϵ A-содержащего ДНК-субстрата или неповрежденного ДНК-лиганда профиль кинетических кривых, характеризующих данные процессы, был схож между двумя ДНК, в то же время, отличаясь от всех остальных. Они содержали дополнительную стадию падения флуоресценции, следующую за первоначальным падением, которое, по-видимому, является общей характеристикой всех исследованных субстратов. Любопытно, что за данной фазой следовала стадия роста FRET-сигнала, начиная с ~ 400 с в случае FRET- ϵ A/T и с ~ 600 с для FRET-C/G. Амплитуда этого роста была значительно ниже, чем в случае субстратов FRET-F/G и FRET- α A/T, однако сравнима с FRET-U/G-субстратом.

Можно предположить, что одним из процессов, необходимых для узнавания целевого нуклеотида в ДНК является раскручивание спирали ДНК, облегчающее последующий изгиб ДНК-дуплекса в месте, содержащем поврежденный нуклеотид. Такой процесс раскручивания ДНК-дуплекса может приводить к отдалению флуорофора и тушителя, присоединенных к его концам и, соответственно, приводить к изменению расстояния между красителями, которое будет сопровождаться ростом FRET-сигнала. Однако данное предположение требует дальнейших исследований и экспериментальной проверки.

3.3.5. Общий механизм взаимодействия между ферментом EndoQ и ДНК-субстратами, содержащими в качестве повреждений F-сайт, Nx или U

Механизм субстратной специфичности фермента EndoQ, предложенный на основе рентгеноструктурных данных, подразумевает выворачивание поврежденного основания в распознающий карман фермента и последующую его верификацию путем формирования сети специфических контактов с аминокислотными остатками Lys243, Ser171 и Leu170, формирующими карман, связывающий повреждение. Было выдвинуто предположение [294], что, в случае оптимального расположения основания внутри активного центра фермента, вывернутая конформация нуклеотида стабилизируется встраиванием аминокислотного остатка Trp144 в ДНК-дуплекс, и это событие может инициировать каталитическое расщепление субстрата. Однако это предположение не нашло своего подтверждения в последующих структурных исследованиях EndoQ [292,295]. Подобно многим другим ферментам, принимающим участие в репарации ДНК, EndoQ действительно осуществляет свою эндонуклеазную активность посредством выворачивания поврежденного нуклеотида из двойной спирали ДНК [295]. Тем не менее, в отличие от AP-эндонуклеаз из структурных семейств Xth и Nfo и ДНК-гликозилаз [128,232,274], в ходе каталитической реакции,

осуществляемой ферментом EndoQ, внедрения аминокислотных остатков в ДНК в освобожденное нуклеотидом пространство для стабилизации вывернутой конформации, по-видимому, не происходит. Выворачивание основания, скорее всего, обеспечивается за счет обширной сети контактов между аминокислотными остатками фермента и сахарофосфатным остовом ДНК, формирование которой нарушает стэкинг-взаимодействия оснований, окружающих поврежденный нуклеотид [295]. К настоящему моменту в литературе не было описано последовательного кинетического механизма реакции между EndoQ и ДНК-субстратами. Наиболее вероятно, что формирование контактов с ДНК, главным образом со стороны поврежденной цепи, предшествует стадии выворачивания основания или происходит одновременно с этим процессом. После этого формируются водородные связи внутри Нх/U-распознающего кармана, и фермент-субстратный комплекс становится каталитически активным.

Проведенный нами анализ флуоресцентных кривых, характеризующих конформационные изменения меченых красителем ДНК-субстратов в ходе их взаимодействия с EndoQ, дал результаты, подтверждающие предположение о том, что ДНК в значительной мере изгибается в процессе связывания с ферментом. Первоначальное падение FRET-сигнала присутствует в кинетических кривых, характеризующих конформационные изменения всех типов поврежденных ДНК-субстратов, использованных в данной работе. Это падение сигнала происходит в результате сближения FAM и BNQ1 в дуплексе, изогнутом ферментом EndoQ. Этот процесс начинается на ранних этапах регистрации изменений флуоресценции, что говорит о его возможном соответствии процессу формирования первичного неспецифического фермент-субстратного комплекса. Это утверждение согласуется с тем, что подобная фаза падения FRET-сигнала наблюдалась даже в случае таких нерасщепляемых субстратов, как неповрежденная ДНК и ϵ A-содержащий ДНК-субстрат.

Любопытно, что в случае определенных вариантов U-содержащей ДНК (а именно FRET-U/A) флуоресцентные кривые содержали дополнительную, очень хорошо обозначенную стадию, характеризующуюся последовательными фазами роста и падения FRET-сигнала. Это указывает на то, что ДНК-дуплекс, содержащий пару оснований U/A, претерпевает дополнительные конформационные изменения, приводящие к циклическим изменениям расстояния между FAM и BNQ1, связанным с последовательными процессами компактизации и релаксации ДНК в составе фермент-субстратного комплекса в процессе формирования каталитически-компетентного состояния. Возможно, подобные процессы происходят и в случае с другими субстратами, и их регистрации не происходит ввиду того, что эти изменения менее выражены. То, что данный процесс приводит к возникновению профиля кинетической кривой с

наиболее ярко выраженными изменениями в случае ДНК-субстрата FRET-U/A, может быть связано со стабильностью этой пары оснований.

Различия профилей флуоресцентных кривых, характеризующих процессы связывания и расщепления ДНК-субстратов FRET-Hx/A, FRET-U/A и FRET-F/G ферментом EndoQ, указывают на то, что процесс взаимодействия фермента с этими тремя субстратами протекает с определёнными различиями в характере конформационных изменений, происходящих с поврежденной ДНК. Результаты, полученные в экспериментах с использованием метода «остановленного потока» и методом гель-электрофореза, указывают на то, что фермент EndoQ расщепляет ДНК, содержащую U, более эффективно, чем содержащую Hx, а это, в свою очередь, может быть результатом того, что комплекс фермента с U-содержащей ДНК формируется более эффективно. Эти данные согласуются с результатами, полученными ранее, и такое различие может быть следствием различий в кинетике выворачивания из дуплекса основания U или Hx [294].

На основании сравнения полученных в работе данных с данными, представленными на сегодняшний момент в литературе, был предложен постадийный каталитический механизм реакции между ферментом EndoQ и F-, Hx- или U-содержащей ДНК, показанный на рисунке 48. Во время первой стадии механизма, соответствующей первоначальному связыванию ДНК-субстрата ферментом и формированию комплекса **III**, происходит изгибание ДНК-дуплекса. Такая деформация приводит к падению FRET-сигнала, так как в результате флуорофорная группа FAM сближается с расположенным на противоположном конце тушителем флуоресценции BHQ1. Судя по полученным нами данным, эта стадия является характерной для взаимодействия фермента с ДНК, содержащей любое из трех повреждений. Более того, она, по-видимому, является универсальной для всех изученных субстратов, включая те, по отношению к которым EndoQ не проявил никакой каталитической активности. Поэтому мы связываем эту стадию с неспецифическим связыванием ДНК-субстрата и попытками фермента обеспечить выворачивание целевого нуклеотида в активный центр. Любопытно, что данная стадия оказалась двухфазной в случае ДНК, содержащей F-сайт, что позволило зарегистрировать «промежуточный» фермент-субстратный комплекс **II** и, в свою очередь, свидетельствует о последовательном формировании множественных контактов на этапе образования комплекса **III**.

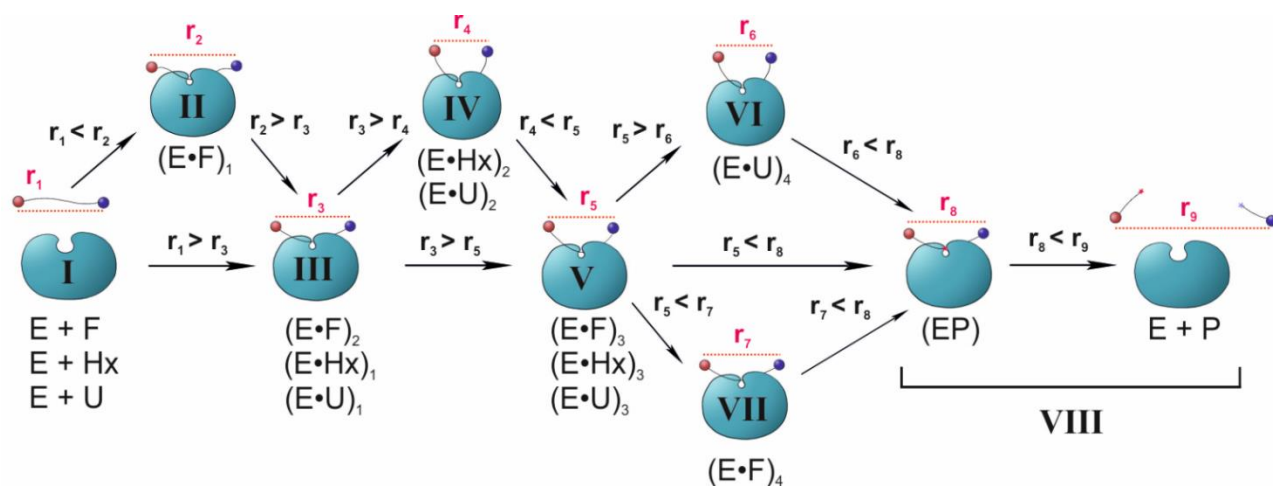


Рисунок 48. Общая схема взаимодействия фермента EndoQ с ДНК-субстратами, содержащими в качестве повреждения F-сайт, U или Hx.

E - фермент; F, Hx и U – ДНК-субстраты, содержащие F-сайт, Hx или U, соответственно; $(E \cdot F)_i$, $(E \cdot Hx)_i$, $(E \cdot U)_i$ – формы фермент-субстратных комплексов EndoQ с F-, Hx- или U-содержащей ДНК; $(E \cdot P)$ – комплекс фермента с продуктом эндонуклеазного расщепления; P – продукт каталитического расщепления ДНК; r_i – условное обозначение расстояния между флуорофором FAM и тушителем BNQ1.

Следующая стадия предложенного механизма отражает превращение комплекса **III** в комплекс **IV** и характеризуется еще большим изгибанием ДНК-субстрата. Эта стадия оказалась уникальной характеристикой взаимодействия EndoQ с Hx- и U-содержащей ДНК. В случае же F-содержащей ДНК формирование комплекса **IV** методом «остановленного потока» зарегистрировать не удалось. Это наблюдение позволяет предположить, что данная стадия соответствует процессу размещения поврежденных оснований Hx или U в специфическом распознающем кармане, и образованию водородных связей между аминокислотными остатками, формирующими карман, и поврежденными основаниями. Третья стадия кинетического механизма, включающая превращение комплекса **IV** в комплекс **V**, характеризуется небольшим ростом FRET-сигнала. Этот рост может быть следствием двух возможных процессов. Изогнутая конформация ДНК в комплексе с ферментом может принимать форму с более релаксированным углом изгиба в процессе последующей конформационной подстройки в активном центре, приводя к увеличению расстояния между FAM и BNQ1. Другим возможным вариантом является то, что в ходе формирования комплекса **V** происходит частичное раскручивание цепей ДНК-дуплекса, сопровождающееся отдалением красителей, расположенных на концах модельных ДНК-субстратов, или перемещение частей фермента относительно ДНК, которое приводит к частичному экранированию FAM и BNQ1. Следующая стадия механизма, описывающая превращение фермент-субстратного комплекса **V** в комплекс **VI**, была зарегистрирована только в случае конформационных превращений U-содержащей ДНК. Формирование этого комплекса, сопровождающееся дальнейшим

изгибанием ДНК, возможно, является отличительной чертой процесса размещения основания U в активном центре фермента EndoQ. Напротив, в случае ДНК-субстрата, содержащего F-сайт, была зарегистрирована еще одна стадия релаксации изогнутой конформации ДНК, либо раскручивания цепей ДНК-дуплекса или разворачивания фермента относительно ДНК с экранированием флуорофора и тушителя (переход комплекса V в комплекс VII). Рост FRET-сигнала, характеризующийся сравнительно высокой амплитудой, сопровождающий эту стадию, в той или иной мере определяется и для кинетических кривых, характеризующих взаимодействие фермента EndoQ с нерасщепляемыми ДНК-субстратами. Следовательно, этот рост может соответствовать процессу взаимодействий фермента с ДНК, происходящих на более поздних временах. И, в конечном итоге, стадия каталитического расщепления ДНК-субстрата и последующей диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции (состояние VIII), была зарегистрирована методом «остановленного потока» только в случае F-содержащей ДНК. Возможно, то, что для U- и Hx-содержащей ДНК эту стадию зарегистрировать не удалось, связано не только с тем, что расщепление ДНК, содержащей данные повреждения, происходит медленнее, но и с тем, что, согласно литературным данным, продукт каталитического расщепления этих субстратов остается в комплексе с ферментом [293].

Таким образом, в результате проведенного исследования удалось предложить кинетическую модель распознавания различных ДНК-субстратов ферментом EndoQ из термофильных архей *P. furiosus*. Полученные результаты вносят вклад в понимание процесса формирования фермент-субстратного комплекса с ДНК, содержащей в качестве повреждения Hx, U или F-сайт.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на большой интерес исследователей к тому, каким образом единственный активный центр многофункциональных AP-эндонуклеаз структурных семейств Xth и Nfo может распознавать широкий набор различных ДНК- и РНК-субстратов, множество проведенных в этой области исследований с привлечением разнообразных методов не дали ответа на этот вопрос. Для выяснения природы высокой субстратной специфичности AP-эндонуклеаз и особенностей механизмов распознавания структурно и химически различных повреждений необходимо привлечение методов РСА и сайт-направленного мутагенеза, однако эти подходы не являются исчерпывающими. Исследование взаимодействия ферментов с различными повреждениями и различными типами структур ДНК, начиная с самых ранних этапов фермент-субстратного взаимодействия, позволяет внести существенный вклад в понимание механизма тонкой конформационной подстройки фермента и субстрата в процессе их взаимодействия. Кроме того, сравнение особенностей каталитического процесса расщепления поврежденной ДНК ферментами одного структурного семейства, принадлежащими эволюционно отдаленным организмам, а также ферментами, принадлежащими к разным структурным семействам, но обладающими перекрывающимся спектром субстратной специфичности и схожими механизмами каталитической активности, позволяет установить как ключевые особенности действия ферментов данного класса, так и принципиальные различия отдельных ферментов, отвечающие за их субстратную специфичность.

Поэтому в представленной работе было проведено кинетическое исследование взаимодействия AP-эндонуклеазы человека hAPE1 с ДНК-субстратами, обладающими неканонической структурой; AP-эндонуклеаз zAPE1 из *Danio rerio*, xAPE1 из *Xenopus laevis* и Rrp1 из *Drosophila melanogaster*, принадлежащих к семейству Xth, а также ДНК-эндонуклеазы EndoQ из *Pyrococcus furiosus*, с ДНК-субстратами, содержащими различные типы повреждений, и с неповрежденной ДНК, с привлечением метода «остановленного потока». Данный метод позволяет регистрировать процессы конформационной подстройки молекул фермента и субстрата в режиме реального времени, начиная с первых миллисекунд взаимодействия. Для изучения взаимодействия фермента человека hAPE1 с ДНК-субстратами, обладающими неканонической структурой, в качестве модельных субстратов были использованы G-квадруплексы человека, а также поврежденные ДНК-дуплексы, содержащие выпетливание поврежденной или неповрежденной цепи. В качестве повреждения, специфически расщепляемого ферментами в ходе AP-эндонуклеазной реакции, был использован синтетический аналог AP-сайта (F-сайт). Для регистрации локальных конформационных изменений ДНК-субстратов в области расположения повреждения в ходе взаимодействия с ферментом в олигодезоксирибонуклеотиды была введена флуорофорная группа aPc. Для

регистрации «глобальных» конформационных изменений ДНК-субстратов в олигодезоксирибонуклеотиды вводили FRET-пару FAM/BHQ1. В качестве NIR-субстратов для ферментов типа APE1 были использованы ДНК-дуплексы, содержащие такие повреждения как U, DHU, α A, ϵ A и Нх. Особенности неспецифического связывания были установлены при анализе взаимодействий с неповрежденным ДНК-дуплексом.

Полученные результаты вместе с анализом имеющихся в литературе данных позволяют сделать заключение о том, что эффективность расщепления F-сайта значительно зависит от структуры ДНК в области расположения поврежденного нуклеотида. Так, расщепление ДНК, содержащей повреждение в петлевой области G-квадруплекса, оказалось значительно менее эффективным, чем в случае расположения F-сайта в ядре тетраплексной структуры. Широкая субстратная специфичность hAPE1, как и высокая ферментативная активность на ДНК-субстратах с неканонической структурой, указывают на то, что формирование прямых специфических контактов с поврежденными или природными целевыми нуклеотидами в активном центре hAPE1 не вносит большой вклад в субстратную специфичность данных ферментов. Совокупность литературных данных и данных, полученных в ходе данного исследования, позволяет предложить общий механизм распознавания нуклеотидов-мишеней ферментом hAPE1. «Конформационный ответ» субстрата на индуцированные ферментом взаимодействия является одним из ключевых факторов для формирования каталитически компетентного комплекса и дискриминации субстрата ферментом. Таким образом, облегчение выворачивания целевого нуклеотида или изгибания субстрата вследствие особенностей структуры субстрата, содержащего неканонические участки структуры, может увеличить скорость расщепления такого субстрата.

Необходимо также отметить, что процесс размещения повреждения в активном центре фермента также играет важную роль в его специфическом расщеплении. Значительная разница в скорости расщепления таких поврежденных субстратов, как F-сайт и NIR-повреждения [18], или природных рибонуклеотидов [329] говорит о том, что природа целевого нуклеотида, который размещается в активном центре фермента, также является крайне важным фактором для формирования каталитически компетентного состояния комплекса hAPE1-субстрат. Данные, полученные при исследовании конформационной динамики ДНК-субстратов, содержащих различные повреждения, а также неповрежденного ДНК-дуплекса, в процессе взаимодействия с ферментами zAPE1, xAPE1 и Rrp1, принадлежащими к структурному семейству Xth, позволили детализировать модель распознавания субстратов ферментами типа APE1, предложенную ранее для hAPE1 [18,19]. Схожая эффективность связывания F-содержащего ДНК-дуплекса всеми исследуемыми ферментами позволила предположить, что распознавание AP-повреждения данными ферментами зависит от пластичности ДНК,

способности AP-сайта выворачиваться из дуплекса и отсутствия стерических затруднений на пути выворачивания повреждения в активный центр фермента. При этом можно предположить, что утрата ферментом Rrp1 аминокислотного остатка Asp70, участвующего в координации кофактора Mg^{2+} в активном центре фермента, приводит к значительному, по сравнению с ферментами zARE1, xARE1 и hARE1, снижению каталитической активности в расщеплении F-субстрата. Более низкая скорость образования комплексов этого фермента с ДНК, содержащей αA , εA , U или DHU, и с неповрежденной ДНК, предположительно, говорит о том, что замена остатка Arg181 в ДНК-связывающем центре на остаток аспарагина дополнительно нарушает процессы неспецифического связывания и распознавания более объемных, чем F-сайт нуклеотидов, содержащих модифицированные основания. Другим возможным фактором, который может оказать влияние на процесс неспецифического связывания ДНК в случае Rrp1, является наиболее крупный среди всех исследованных ферментов N-концевой фрагмент, состоящий из 417 аминокислотных остатков. Для фермента xARE1, замена двух аминокислотных остатков в кармане для связывания поврежденного основания (Asn229Thr и Ala230Pro) приводит к значительным различиям в скорости формирования первичного комплекса с ДНК, содержащей αA , εA или U. Однако эти замены не оказывают значительного влияния на связывание с ДНК, содержащей менее жесткий F-сайт или непланарное основание DHU. В целом, на основании полученных результатов по распознаванию различных повреждений ферментами структурного семейства Xth, можно предположить, что эффективность расщепления поврежденной ДНК связана с тонкой конформационной подстройкой внутри активного центра, необходимой для формирования каталитически компетентного состояния.

Для того, чтобы установить биологическую роль процесса NIR, как альтернативного механизма удаления повреждений из ДНК, в работе проведен сравнительный анализ NIR-активности AP-эндонуклеаз, принадлежащих к различным структурным семействам. Для этого была исследована конформационная динамика ДНК-субстратов, содержащих различные модифицированные нуклеотиды, а также неповрежденной ДНК в процессе взаимодействия с ДНК-эндонуклеазой EndoQ из *Pyrococcus furiosus*. Было показано, что фермент EndoQ расщепляет U-содержащую ДНК более эффективно, чем Hx-содержащую ДНК, а это, в свою очередь, может быть результатом того, что комплекс фермента с U-содержащей ДНК формируется более эффективно. Это может быть связано с различиями в кинетике выворачивания основания U или Hx из дуплекса [294]. Анализ совокупности полученных данных с данными, представленными на сегодняшний момент в литературе, позволил предложить постадийный кинетический механизм реакции между ферментом EndoQ и ДНК-дуплексом, содержащим F-сайт, Hx или U. Полученные данные указывают на то, что процесс

взаимодействия фермента EndoQ с этими ДНК-субстратами протекает с определенными различиями в характере конформационных изменений, происходящих с поврежденной ДНК. Первой стадией предложенного механизма является формирование неспецифического фермент-субстратного комплекса фермента с ДНК и попытки фермента обеспечить выворачивание целевого нуклеотида в активный центр. Эта стадия, судя по всему, является универсальной для всех исследованных ДНК-субстратов, в том числе нерасщепляемых. В ходе этой стадии ДНК в значительной мере изгибается в процессе связывания с ферментом. Вторая стадия предложенного механизма характеризует процесс размещения поврежденных оснований Нх или U в специфическом распознающем кармане, и образование водородных связей между аминокислотными остатками, формирующими карман, и поврежденными основаниями. В случае с F-содержащим ДНК-субстратом данная стадия отсутствует. При этом структурные особенности [295] EndoQ и специфика его взаимодействия с ДНК-субстратами, содержащими F-сайт или дезаминированные основания, такие как Нх и U, указывают на то, что, в отличие от AP-эндонуклеаз структурного семейства Xth субстратная специфичность нового класса ферментов является более строгой и во многом зависит от формирования специфических контактов с поврежденным азотистым основанием в кармане, связывающем повреждение.

Таким образом, в результате работы изучена конформационная динамика ДНК-субстратов, обладающих различной структурой и содержащих различные повреждения, в ходе их взаимодействия с AP-эндонуклеазами hAPE1, zAPE1, xAPE1, Rrp1 и EndoQ из разных структурных семейств, предложены кинетические схемы постадийного взаимодействия ферментов с субстратами, а также предложен как общий механизм распознавания поврежденных ДНК-субстратов ферментами типа APE1, так и постадийный каталитический механизм распознавания поврежденных ДНК субстратов ферментом EndoQ.

ВЫВОДЫ

- 1) Показано, что АР-эндонуклеаза hAPE1 расщепляет теломерный G-квадруплекс человека, содержащий синтетический аналог АР-сайта (остаток тетрагидрофурана) в петле или в G-ядре квадруплексной структуры. Расщепление повреждения в петлевой области G-квадруплекса происходит менее эффективно, чем в G-ядре.
- 2) Установлено, что активность hAPE1 по отношению к ДНК-субстратам с неканонической структурой, содержащим выпетливание поврежденной или неповрежденной цепи зависит от размера выпетливания поврежденной цепи и положения остатка тетрагидрофурана. Впервые показано, что выпетливание 5-ти нуклеотидов поврежденной цепи в составе ДНК-дуплекса блокирует формирование каталитически компетентного комплекса, в то время как зависимость эффективности расщепления ДНК от размера выпетливания неповрежденной цепи отсутствует, что подтверждает способность фермента размещать большие нуклеотидные фрагменты за пределами своего активного центра.
- 3) Предложен и верифицирован механизм целевого распознавания нуклеотидов АР-эндонуклеазами, принадлежащими к семейству Xth, который состоит из двух основных этапов: формирования первичного фермент-субстратного комплекса и его последующего скорость-лимитирующего превращения в каталитически компетентный комплекс. При сравнительном анализе четырех гомологичных ферментов структурного семейства Xth установлено, что Rrp1 обладает значительно более низкой скоростью каталитической реакции с ДНК, содержащей остаток тетрагидрофурана, а также более низкой скоростью образования комплексов с ДНК, содержащей альфа-аномер 2'-дезоксиаденозина, 2'-дезоксизеноаденозин, 2'-дезоксигуанидин или 2'-дезоксизидоуридин, и с неповрежденным ДНК-лигандом, в сравнении с hAPE1, zAPE1 и xAPE1.
- 4) Впервые для фермента EndoQ, структурно отличающегося от ферментов типа APE1, предложена кинетическая модель взаимодействия с ДНК-субстратом, характеризующая стадии распознавания поврежденных нуклеотидов. Показано, что взаимодействие EndoQ с ДНК-субстратами, содержащими остаток тетрагидрофурана, урацила или гипоксантина, протекает со значительными различиями в характере конформационных изменений модельных ДНК-субстратов в зависимости от типа повреждения. Установлено, что EndoQ расщепляет одноцепочечную ДНК, содержащую остаток гипоксантина или урацила, более эффективно, чем двухцепочечную ДНК, содержащую те же повреждения. В то же время EndoQ практически не проявляет каталитической активности по отношению к одноцепочечной ДНК, содержащей остаток тетрагидрофурана.

Список используемых сокращений

1,N²-εG – 2'-дезоксид-1,N²-этенотуанозин

3meA – 2'-дезоксид-3-метиладенозин

3meG – 2'-дезоксид-3-метилгуанозин

5hC – 2'-дезоксид-5-гидроксицитидин

5hmU – 2'-дезоксид-5-гидрокси метилуридин

5hU – 2'-дезоксид-5-гидроксиуридин

7meG – 2'-дезоксид-7-метилгуанозин

8-oxoG – 2'-дезоксид-8-оксо-7,8-дигидрогуанозин

αA – альфа-аномер 2'-дезоксидаденозина

εA – 2'-дезоксид-1,N⁶-этенотаденозин

εC – 2'-дезоксид-3,N⁴-этенотцитидин

AlkA – 3-метиладенин-ДНК-гликозилаза, гипоксантин-ДНК-гликозилаза

ANPG/Aag/MPG – алкил-N-пуридин-ДНК-гликозилаза

APε1 – апуриновое/апиридиновое эндонуклеаза человека 1

AP-сайт – апуриновое/апиридиновое сайт

BER – эксцизионная репарация оснований (base excision repair)

BHQ1 – black hole quencher 1

CD – круговой дихроизм

CPD – цитидин-содержащие пиримидиновые димеры

DHT – 2'-дезоксид-5,6-дигидротимидин

DHU – 2'-дезоксид-5,6-дигидроуридин

DNMT1 – ДНК-метилтрансфераза 1

dRp – 2'-дезоксидрибозофосфат

DTT – дитиотреитол

Egr-1 – белок реакции раннего роста 1 (early growth response protein-1)

F – 2-гидроксиметил-3-гидрокси-тетрагидрофуран

FAM – 6-карбоксифлуоресцеин

FapyG – 2,6-диамино-4-окси-5-формаидопиримидин

FEN-1 – флэп-эндонуклеаза 1

FRET – резонансный перенос энергии флуоресценции

GG-NER – глобальный геномный NER (global genomic NER)

Hif-1 α – индуцируемый гипоксией фактор (hypoxia-inducible factor)

HMCES – 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) binding, ESC-specific

hTDG – мисматч-специфичная тимин-ДНК-гликозилаза человека

IPTG – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

Hx – гипоксантин

LB-среда – среда Лурия-Бертани

LIGI – ДНК-лигаза I

LIGIII α – ДНК-лигаза III α

LP-BER – путь длинных заплаток или длиннозаплаточный BER (long patch BER)

MBD4 – метил-СрG-связывающий домен белок 4

MMC – метилметансульфонат

MST – микротермофорез

MUG – мисматч-специфичная урацил-ДНК-гликозилаза *E. coli*

MUTYH – аденин-ДНК-гликозилаза

N²-3- ϵ G – 2'-дезоксид-N²-3-этенотуанозин

Nei – эндонуклеаза VIII *E. coli*

NER – эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair)

NF- κ B – ядерный фактор каппа-B (nuclear factor-kappaB)

Nfo – эндонуклеаза IV *E. coli*

NIR – инцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide incision repair)

Nth – эндонуклеаза III *E. coli*

OGG1 – 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза

PARP-1 – поли(АДФ-рибоза)-полимераза (poly(ADP-ribose) polymerase-1)

pBQ-dA – 1,N⁶-бензэтен-2'-дезоксиаденозин

pBQ-dC – 3,N⁴-бензэтен-2'-дезоксцитидин

pBQ-dG – 1,N²-бензэтен-2'-дезоксигуанозин

PCNA – ядерный антиген пролиферирующих клеток

PDB ID – идентификационный номер в банке данных кристаллических структур

PELDOR – спектроскопия пульсирующего электрон-электронного двойного резонанса

PHP – полимеразный и гистидинол-фосфатазный домен (Polymerase and Histidinol Phosphatase)

PNK – полинуклеотидкиназа

PNKP – бифункциональная полинуклеотид фосфатаза/киназа человека

Redox – окислительно-восстановительный

RF-C – фактор репликации C

RNAP II – РНК полимеразы II

SMUG1 – селективная к о.ц. участкам монофункциональная урацил-ДНК-гликозилаза 1 (single-strand-selective monofunctional uracil glycosylase 1)

SP-BER – путь коротких заплаток или короткозаплаточный BER (short patch BER)

T7 RNAP – T7 РНК полимеразы

TC-NER – NER, ассоциированный с транскрипцией (transcription-coupled NER)

TDG – тимин-ДНК-гликозилаза

TDG1 – тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1

TIM barrel – триозофосфатизомеразная укладка типа «бочонок»

Tg – 2'-дезокс-тимингилколь

U – 2'-дезокс-уридин

UDG – урацил-ДНК-гликозилаза

UV-DDB – белковый комплекс, связывающий поврежденную УФ ДНК (UV-damaged DNA binding protein complex)

X – ксантин

XRCC1 – X-ray repair cross complementing 1

Xth – экзонуклеаза III *E. coli*

YB-1 – белок, связывающий Y-бокс 1 (Y-box-binding protein 1)

АФК – активные формы кислорода

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

Д.ц. ДНК – двухцепочечная ДНК

О.ц. ДНК – одноцепочечная ДНК

ПААГ – полиакриламидный гель

РСА – рентгеноструктурный анализ

УФ-излучение – ультрафиолетовое излучение

ФЭУ – фотоэлектронный умножитель

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

Список литературы

1. Travers A., Muskhelishvili G. DNA structure and function // The FEBS journal. – 2015. – Vol. 282. – № 12. – P. 2279–2295.
2. Tubbs A., Nussenzweig A. Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer // Cell. – 2017. – Vol. 168. – № 4. – P. 644–656.
3. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // Nature. – 1993. – Vol. 362. – № 6422. – P. 709–715.
4. Lindahl T. DNA repair enzymes // Annual review of biochemistry. – 1982. – Vol. 51. – P. 61–87.
5. Chatterjee N., Walker G.C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis // Environmental and molecular mutagenesis. – 2017. – Vol. 58. – № 5. – P. 235–263.
6. Gros L., Sapparbaev M.K., Laval J. Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage // Oncogene. – 2002. – Vol. 21. – № 58 REV. ISS. 8. – P. 8905–8925.
7. Fromme J.C., Banerjee A., Verdine G.L. DNA glycosylase recognition and catalysis // Current Opinion in Structural Biology. – 2004. – Vol. 14. – № 1. – P. 43–49.
8. Demple B., Sung J.-S. Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair // DNA Repair. – 2005. – Vol. 4. – № 12. – P. 1442–1449.
9. Li M., Wilson D.M. 3rd. Human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 // Antioxidants & Redox Signaling. – 2014. – Vol. 20. – № 4. – P. 678–707.
10. Gros L. The major human AP endonuclease (APE1) is involved in the nucleotide incision repair pathway // Nucleic Acids Research. – 2004. – Vol. 32. – № 1. – P. 73–81.
11. Chou K.M., Cheng Y.C. The exonuclease activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1). Biochemical properties and inhibition by the natural dinucleotide Gp4G // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Vol. 278. – № 20. – P. 18289–18296.
12. Wong D., DeMott M.S., Demple B. Modulation of the 3'→5'-exonuclease activity of human apurinic endonuclease (APE1) by its 5'-incised abasic DNA product // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Vol. 278. – № 38. – P. 36242–36249.
13. Kuznetsova A.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Kinetic features of 3'-5' exonuclease activity of human AP-endonuclease APE1 // Molecules. – 2018. – Vol. 23. – № 9. – P. 2101.
14. Barzilay G., Hickson I.D. Structure and function of apurinic/apyrimidinic endonucleases // BioEssays. – 1995. – Vol. 17. – № 8. – P. 713–719.

15. Berquist B.R., McNeill D.R., Wilson D.M. 3rd. Characterization of abasic endonuclease activity of human APE1 on alternative substrates, as well as effects of ATP and sequence context on AP site incision. // *Journal of molecular biology*. – 2008. – Vol. 379. – № 1. – P. 17–27.
16. Barnes T., Kim W.-C., Mantha A.K., Kim S.-E., Izumi T., Mitra S., Lee C.H. Identification of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) as the endoribonuclease that cleaves c-myc mRNA // *Nucleic Acids Research*. – 2009. – Vol. 37. – № 12. – P. 3946–3958.
17. Alekseeva I.V., Kuznetsova A.A., Bakman A.S., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. The role of active-site amino acid residues in the cleavage of DNA and RNA substrates by human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 2020. – Vol. 1864. – № 12. – P. 129718.
18. Kuznetsova A.A., Matveeva A.G., Milov A.D., Vorobjev Y.N., Dzuba S.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Substrate specificity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 in the nucleotide incision repair pathway // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – Vol. 46. – № 21. – P. 11454–11465.
19. Bulygin A.A., Kuznetsova A.A., Vorobjev Y.N., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. The role of active-site plasticity in damaged-nucleotide recognition by human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 17. – P. 3940.
20. Kuznetsova A.A., Senchurova S.I., Ishchenko A.A., Saparbaev M., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Common kinetic mechanism of abasic site recognition by structurally different apurinic/apyrimidinic endonucleases // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 16. – P. 8874.
21. De Bont R. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data // *Mutagenesis*. – 2004. – Vol. 19. – № 3. – P. 169–185.
22. Karran P., Lindahl T. Hypoxanthine in deoxyribonucleic acid: generation by heat-induced hydrolysis of adenine residues and release in free form by a deoxyribonucleic acid glycosylase from calf thymus // *Biochemistry*. – 1980. – Vol. 19. – № 26. – P. 6005–6011.
23. Hill-Perkins M., Jones M.D., Karran P. Site-specific mutagenesis in vivo by single methylated or deaminated purine bases // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 1986. – Vol. 162. – № 2. – P. 153–163.
24. Myrnes B., Guddal P.H., Krokan H. Metabolism of dITP in HeLa cell extracts, incorporation into DNA by isolated nuclei and release of hypoxanthine from DNA by a hypoxanthine-DNA glycosylase activity // *Nucleic Acids Research*. – 1982. – Vol. 10. – № 12. – P. 3693–3701.

25. Dehazya P., Sirove M.A. Regulation of hypoxanthine DNA glycosylase in normal human and Bloom's syndrome fibroblasts // *Cancer Research*. – 1986. – Vol. 46. – № 8. – P. 3756–3761.
26. Dianov G., Lindahl T. Preferential recognition of I·T base-pairs in the initiation of excision-repair by hypoxanthine-DNA glycosylase // *Nucleic Acids Research*. – 1991. – Vol. 19. – № 14. – P. 3829–3833.
27. Karran P., Lindahl T. Enzymatic excision of free hypoxanthine from polydeoxynucleotides and DNA containing deoxyinosine monophosphate residues // *Journal of Biological Chemistry*. – 1978. – Vol. 253. – № 17. – P. 5877–5879.
28. Saparbaev M., Laval J. Excision of hypoxanthine from DNA containing dIMP residues by the *Escherichia coli*, yeast, rat, and human alkylpurine DNA glycosylases // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1994. – Vol. 91. – № 13. – P. 5873–5877.
29. Martin F.H., Castro M.M., Aboul-Ela F., Tinoco I. Base pairing involving deoxyinosine: Implications for probe design // *Nucleic Acids Research*. – 1985. – Vol. 13. – № 24. – P. 8927–8938.
30. Demple B., Linn S. On the recognition and cleavage mechanism of *Escherichia coli* endodeoxyribonuclease V, a possible DNA repair enzyme // *Journal of Biological Chemistry*. – 1982. – Vol. 257. – № 6. – P. 2848–2855.
31. Gates F.T., Lin S. Endonuclease V of *Escherichia coli* // *Journal of Biological Chemistry*. – 1977. – Vol. 252. – № 5. – P. 1647–1653.
32. Schouten K.A., Weiss B. Endonuclease V protects *Escherichia coli* against specific mutations caused by nitrous acid // *Mutation Research - DNA Repair*. – 1999. – Vol. 435. – № 3. – P. 245–254.
33. Goodhead D.T. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: Clustered damage in DNA // *International Journal of Radiation Biology*. – 1994. – Vol. 65. – № 1. – P. 7–17.
34. Lesiak K.B., Wheeler K.T. Formation of alpha-deoxyadenosine in polydeoxynucleotides exposed to ionizing radiation under anoxic conditions. // *Radiation research*. – 1990. – Vol. 121. – № 3. – P. 328–337.
35. Ide H., Yamaoka T., Kimura Y. Replication of DNA templates containing the α -anomer of deoxyadenosine, a major adenine lesion produced by hydroxyl radicals // *Biochemistry*. – 1994. – Vol. 33. – № 23. – P. 7127–7133.

36. Shimizu H., Yagi R., Kimura Y., Makino K., Terato H., Ohyama Y., Ide H. Replication bypass and mutagenic effect of α -deoxyadenosine site-specifically incorporated into single-stranded vectors // *Nucleic Acids Research*. – 1997. – Vol. 25. – № 3. – P. 597–603.
37. Ide H., Tedzuka K., Shimzu H., Kimura Y., Purmal A.A., Wallace S.S., Kow Y.W. α -Deoxyadenosine, a major anoxic radiolysis product of adenine in DNA, is a substrate for *Escherichia coli* endonuclease IV // *Biochemistry*. – 1994. – Vol. 33. – № 25. – P. 7842–7847.
38. Ishchenko A.A., Ide H., Ramotar D., Nevinsky G., Saparbaev M. Alpha-anomeric deoxynucleotides, anoxic products of ionizing radiation, are substrates for the endonuclease IV-type AP endonucleases. // *Biochemistry*. – 2004. – Vol. 43. – № 48. – P. 15210–15216.
39. Ishchenko A.A., Ide H., Ramotar D., Nevinsky G., Saparbaev M. α -Anomeric deoxynucleotides, anoxic products of ionizing radiation, are substrates for the endonuclease IV-type AP endonucleases // *Biochemistry*. – 2004. – Vol. 43. – № 48. – P. 15210–15216.
40. Ischenko A.A., Saparbaev M.K. Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage // *Nature*. – 2002. – Vol. 415. – № 6868. – P. 183–187.
41. Daviet S., Couvé-Privat S., Gros L., Shinozuka K., Ide H., Saparbaev M., Ishchenko A.A. Major oxidative products of cytosine are substrates for the nucleotide incision repair pathway // *DNA Repair*. – 2007. – Vol. 6. – № 1. – P. 8–18.
42. Dizdaroglu M., Laval J., Boiteux S. Substrate specificity of the *Escherichia coli* endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals // *Biochemistry*. – 1993. – Vol. 32. – № 45. – P. 12105–12111.
43. Krokan H.E., Standal R., Slupphaug G. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA // *Biochemical Journal*. – 1997. – Vol. 325. – № 1. – P. 1–16.
44. Ikeda S., Biswas T., Roy R., Izumi T., Boldogh I., Kurosky A., Sarker A.H., Seki S., Mitra S. Purification and characterization of human NTH1, a homolog of *Escherichia coli* endonuclease III // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273. – № 34. – P. 21585–21593.
45. Ii P.D.C., Nakamura J., Rao S., Chu H., Ibrahim J.G., Swenberg J.A., Kaufman D.G. Abasic sites preferentially form at regions undergoing DNA replication // *The FASEB Journal*. – 2010. – Vol. 24. – № 10. – P. 3674–3680.
46. Croteau D.L., Bohr V.A. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells // *Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272. – № 41. – P. 25409–25412.

47. Marnett L.J. Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde // *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 1999. – Vol. 424. – № 1–2. – P. 83–95.
48. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance // *Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272. – № 34. – P. 20963–20966.
49. Guengerich F.P. Cytochrome P450 oxidations in the generation of reactive electrophiles: Epoxidation and related reactions // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2003. – Vol. 409. – № 1. – P. 59–71.
50. Gros L. Enzymology of repair of etheno-adducts // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 2003. – Vol. 531. – № 1–2. – P. 219–229.
51. Bartsch H., Nair J. Ultrasensitive and specific detection methods for exocyclic DNA adducts: Markers for lipid peroxidation and oxidative stress // *Toxicology*. – 2000. – Vol. 153. – № 1–3. – P. 105–114.
52. Pandya G.A., Moriya M. 1,N⁶-ethenodeoxyadenosine, a DNA adduct highly mutagenic in mammalian cells // *Biochemistry*. – 1996. – Vol. 35. – № 35. – P. 11487–11492.
53. Moriya M., Zhang W., Johnson F., Grollman A.P. Mutagenic potency of exocyclic DNA adducts: Marked differences between *Escherichia coli* and simian kidney cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1994. – Vol. 91. – № 25. – P. 11899–11903.
54. Cheng K.C., Preston B.D., Cahill D.S., Dosanjh M.K., Singer B., Loeb L.A. The vinyl chloride DNA derivative N²,3-ethenoguanine produces G → A transitions in *Escherichia coli* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1991. – Vol. 88. – № 22. – P. 9974–9978.
55. Langouët S., Müller M., Guengerich F.P. Misincorporation of dNTPs opposite 1,N²-ethenoguanine and 5,6,7,9-tetrahydro-7-hydroxy-9-oxoimidazo[1,2-a]purine in oligonucleotides by *Escherichia coli* polymerases I exo- and II exo-, T7 polymerase exo-, human immunodeficiency virus-1 reverse transcript // *Biochemistry*. – 1997. – Vol. 36. – № 20. – P. 6069–6079.
56. Saparbaev M., Laval J. 3,N⁴-ethenocytosine, a highly mutagenic adduct, is a primary substrate for *Escherichia coli* double-stranded uracil-DNA glycosylase and human mismatch-specific thymine-DNA glycosylase // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1998. – Vol. 95. – № 15. – P. 8508–8513.

57. Hang B., Medina M., Fraenkel-Conrat H., Singer B. A 55-kDa protein isolated from human cells shows DNA glycosylase activity toward 3,N⁴-ethenocytosine and the G/T mismatch // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1998. – Vol. 95. – № 23. – P. 13561–13566.
58. Singer B., Antoccia A., Basu A.K., Dosanjh M.K., Fraenkel-Conrat H., Gallagher P.E., Kusmierik J.T., Qiu Z.H., Rydberg B. Both purified human 1,N⁶-ethenoadenine-binding protein and purified human 3-methyladenine-DNA glycosylase act on 1,N⁶-ethenoadenine and 3-methyladenine // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1992. – Vol. 89. – № 20. – P. 9386–9390.
59. Mishina Y., Yang C.-G., He C. Direct repair of the exocyclic DNA adduct 1,N⁶-ethenoadenine by the DNA repair AlkB proteins // Journal of the American Chemical Society. – 2005. – Vol. 127. – № 42. – P. 14594–14595.
60. Delaney J.C., Smeester L., Wong C., Frick L.E., Taghizadeh K., Wishnok J.S., Drennan C.L., Samson L.D., Essigmann J.M. AlkB reverses etheno DNA lesions caused by lipid oxidation *in vitro* and *in vivo* // Nature Structural & Molecular Biology. – 2005. – Vol. 12. – № 10. – P. 855–860.
61. Ringvoll J., Moen M.N., Nordstrand L.M., Meira L.B., Pang B., Bekkelund A., Dedon P.C., Bjelland S., Samson L.D., Falnes P., Klungland A. AlkB homologue 2-mediated repair of ethenoadenine lesions in mammalian DNA // Cancer Research. – 2008. – Vol. 68. – № 11. – P. 4142–4149.
62. Fu D., Samson L.D. Direct repair of 3,N⁴-ethenocytosine by the human ALKBH2 dioxygenase is blocked by the AAG/MPG glycosylase // DNA Repair. – 2012. – Vol. 11. – № 1. – P. 46–52.
63. Prorok P., Saint-Pierre C., Gasparutto D., Fedorova O.S., Ishchenko A.A., Leh H., Buckle M., Tudek B., Saparbaev M. Highly mutagenic exocyclic DNA adducts are substrates for the human nucleotide incision repair pathway // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – № 12. – P. e51776.
64. Yonekura S.I., Nakamura N., Yonei S., Zhang-Akiyama Q.M. Generation, biological consequences and repair mechanisms of cytosine deamination in DNA // Journal of Radiation Research. – 2009. – Vol. 50. – № 1. – P. 19–26.
65. Joyce C.M. Choosing the right sugar: How polymerases select a nucleotide substrate // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1997. – Vol. 94. – № 5. – P. 1619–1622.

66. Williams J.S., Lujan S.A., Kunkel T.A. Processing ribonucleotides incorporated during eukaryotic DNA replication // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2016. – Vol. 17. – № 6. – P. 350–363.
67. Lindahl T. DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base excision-repair // *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. – 1979. – Vol. 22. – № C. – P. 135–192.
68. Lindahl T. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1974. – Vol. 71. – № 9. – P. 3649–3653.
69. Tomilin N.V., Aprelikova O.N. Uracil-DNA glycosylases and DNA uracil repair // *International review of cytology*. – 1989. – Vol. 114. – P. 125–179.
70. Prorok P., Alili D., Saint-Pierre C., Gasparutto D., Zharkov D.O., Ishchenko A.A., Tudek B., Saparbaev M.K. Uracil in duplex DNA is a substrate for the nucleotide incision repair pathway in human cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – Vol. 110. – № 39. – P. E3695–E3703.
71. Loeb L.A., Preston B.D. Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites // *Annual Review of Genetics*. – 1986. – Vol. 20. – № 1. – P. 201–230.
72. 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 // *Journal of the American Chemical Society*. – 1989. – Vol. 111. – № 5. – P. 1894–1896.
73. Lindahl T., Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid // *Biochemistry*. – 1972. – Vol. 11. – № 19. – P. 3610–3618.
74. Lindahl T., Karlström O. Heat-induced depyrimidination of deoxyribonucleic acid in neutral solution // *Biochemistry*. – 1973. – Vol. 12. – № 25. – P. 5151–5154.
75. Singer B. All oxygens in nucleic acids react with carcinogenic ethylating agents // *Nature*. – 1976. – Vol. 264. – № 5584. – P. 333–339.
76. Cadet J., Wagner J.R. DNA Base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2013. – Vol. 5. – № 2. – P. a012559–a012559.
77. Krokan H.E., Bjoras M. Base excision repair // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2013. – Vol. 5. – № 4. – P. a012583–a012583.

78. Freudenthal B.D. Base excision repair of oxidative DNA damage from mechanism to disease // *Frontiers in Bioscience*. – 2017. – Vol. 22. – № 9. – P. 4555.
79. Thompson P.S., Cortez D. New insights into abasic site repair and tolerance. // *DNA repair*. – 2020. – Vol. 90. – P. 102866.
80. Téoule R. Radiation-induced DNA damage and its repair // *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*. – 1987. – Vol. 51. – № 4. – P. 573–589.
81. Dunlap B., Cerutti P. Apyrimidinic sites in gamma-irradiated DNA // *FEBS Letters*. – 1975. – Vol. 51. – № 1–2. – P. 188–190.
82. Melamede R.J., Hatahet Z., Kow Y.W., Ide H., Wallace S.S. Isolation and characterization of endonuclease VIII from *Escherichia coli* // *Biochemistry*. – 1994. – Vol. 33. – № 5. – P. 1255–1264.
83. Boorstein R.J., Hilbert T.P., Cunningham R.P., Teebor G.W. Formation and stability of repairable pyrimidine photohydrates in DNA // *Biochemistry*. – 1990. – Vol. 29. – № 46. – P. 10455–10460.
84. Shiraishi M., Ishino S., Heffernan M., Cann I., Ishino Y. The mesophilic archaeon *Methanosarcina acetivorans* counteracts uracil in DNA with multiple enzymes: EndoQ, ExoIII, and UDG // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 15791.
85. Svilar D., Goellner E.M., Almeida K.H., Sobol R.W. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2011. – Vol. 14. – № 12. – P. 2491–2507.
86. Jacobs A.L., Schär P. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond // *Chromosoma*. – 2012. – Vol. 121. – № 1. – P. 1–20.
87. McCullough A.K., Dodson M.L., Lloyd R.S. Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures // *Annu Rev Biochem*. – 1999. – Vol. 68. – P. 255–285.
88. Abu M., Waters T.R. The main role of human thymine-DNA glycosylase is removal of thymine produced by deamination of 5-methylcytosine and not removal of ethenocytosine // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 10. – P. 8739–8744.
89. Hendrich B., Hardeland U., Ng H.-H., Jiricny J., Bird A. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites // *Nature*. – 1999. – Vol. 401. – № 6750. – P. 301–304.

90. Wallace S.S. Base excision repair: A critical player in many games // DNA Repair. – 2014. – Vol. 19. – P. 14–26.
91. Lee C.-Y.I., Delaney J.C., Kartalou M., Lingaraju G.M., Maor-Shoshani A., Essigmann J.M., Samson L.D. Recognition and processing of a new repertoire of DNA substrates by human 3-methyladenine DNA glycosylase (AAG) // Biochemistry. – 2009. – Vol. 48. – № 9. – P. 1850–1861.
92. O' Connor T.R. Purification and characterization of human 3-methyladenine-DNA glycosylase // Nucleic Acids Research. – 1993. – Vol. 21. – № 24. – P. 5561–5569.
93. Haushalter K.A., Todd Stukenberg P., Kirschner M.W., Verdine G.L. Identification of a new uracil-DNA glycosylase family by expression cloning using synthetic inhibitors // Current Biology. – 1999. – Vol. 9. – № 4. – P. 174–185.
94. Rosenquist T. The novel DNA glycosylase, NEIL1, protects mammalian cells from radiation-mediated cell death // DNA Repair. – 2003. – Vol. 2. – № 5. – P. 581–591.
95. Morland I. Human DNA glycosylases of the bacterial Fpg/MutM superfamily: an alternative pathway for the repair of 8-oxoguanine and other oxidation products in DNA // Nucleic Acids Research. – 2002. – Vol. 30. – № 22. – P. 4926–4936.
96. Dou H., Mitra S., Hazra T.K. Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2 // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Vol. 278. – № 50. – P. 49679–49684.
97. 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 // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. – Vol. 99. – № 6. – P. 3523–3528.
98. Dizdaroglu M., Karahalil B., Sentürker S., Buckley T.J., Roldán-Arjona T. Excision of products of oxidative DNA base damage by human NTH1 protein // Biochemistry. – 1999. – Vol. 38. – № 1. – P. 243–246.
99. Cuniasse P., Sowers L.C., Eritja R., Kaplan B., Goodman M.F., Cognet J.A.H., LeBret M., Guschlbauer W., Fazakerley G.V. An abasic site in DNA. Solution conformation determined by proton NMR and molecular mechanics calculations // Nucleic Acids Research. – 1987. – Vol. 15. – № 19. – P. 8003–8022.

100. Lockhart M.L., Deutsch J.F., Yamaura I., Cavalieri L.F., Rosenberg B.H. Termination of DNA synthesis in vitro at apurinic sites but not at ethyl adducts on the template // *Chemico-Biological Interactions*. – 1982. – Vol. 42. – № 1. – P. 85–95.
101. Sagher D., Strauss B. Insertion of nucleotides opposite apurinic apyrimidinic sites in deoxyribonucleic acid during in vitro synthesis: uniqueness of adenine nucleotides // *Biochemistry*. – 1983. – Vol. 22. – № 19. – P. 4518–4526.
102. Schaaper R.M., Kunkel T.A., Loeb L.A. Infidelity of DNA synthesis associated with bypass of apurinic sites. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1983. – Vol. 80. – № 2. – P. 487–491.
103. Shearman C.W., Loeb L.A. Depurination decreases fidelity of DNA synthesis in vitro // *Nature*. – 1977. – Vol. 270. – № 5637. – P. 537–538.
104. Strauss B.S. The “A” rule revisited: polymerases as determinants of mutational specificity // *DNA Repair*. – 2002. – Vol. 1. – № 2. – P. 125–135.
105. Kunkel T.A., Schaaper R.M., Loeb L.A. Depurination-induced infidelity of DNA synthesis with purified DNA replication proteins in vitro // *Biochemistry*. – 1983. – Vol. 22. – № 10. – P. 2378–2384.
106. Gentil A., Cabral-Neto J.B., Mariage-Samson R., Margot A., Imbach J.L., Rayner B., Sarasin A. Mutagenicity of a unique apurinic/apyrimidinic site in mammalian cells // *Journal of Molecular Biology*. – 1992. – Vol. 227. – № 4. – P. 981–984.
107. Pages V., Johnson R.E., Prakash L., Prakash S. Mutational specificity and genetic control of replicative bypass of an abasic site in yeast // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105. – № 4. – P. 1170–1175.
108. Otsuka C. Difference between deoxyribose- and tetrahydrofuran-type abasic sites in the in vivo mutagenic responses in yeast // *Nucleic Acids Research*. – 2002. – Vol. 30. – № 23. – P. 5129–5135.
109. Lhomme J., Constant J.-F., Demeunynck M. Abasic DNA structure, reactivity, and recognition // *Biopolymers*. – 1999. – Vol. 52. – № 2. – P. 65–83.
110. Talpaert-Borlè M. Formation, detection and repair of AP sites // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 1987. – Vol. 181. – № 1. – P. 45–56.
111. Noll D.M., Mason T.M., Miller P.S. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA // *Chemical Reviews*. – 2006. – Vol. 106. – № 2. – P. 277–301.

112. Szczepanski J.T., Jacobs A.C., Greenberg M.M. Self-promoted DNA interstrand cross-link formation by an abasic site // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – Vol. 130. – № 30. – P. 9646–9647.
113. Dutta S., Chowdhury G., Gates K.S. Interstrand cross-links generated by abasic sites in duplex DNA // *Journal of the American Chemical Society*. – 2007. – Vol. 129. – № 7. – P. 1852–1853.
114. Price N.E., Johnson K.M., Wang J., Fekry M.I., Wang Y., Gates K.S. Interstrand DNA–DNA cross-link formation between adenine residues and abasic sites in duplex DNA // *Journal of the American Chemical Society*. – 2014. – Vol. 136. – № 9. – P. 3483–3490.
115. DeMott M.S., Beyret E., Wong D., Bales B.C., Hwang J.-T., Greenberg M.M., Demple B. Covalent trapping of human DNA polymerase β by the oxidative DNA lesion 2-deoxyribonolactone // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – № 10. – P. 7637–7640.
116. Quiñones J.L., Thapar U., Yu K., Fang Q., Sobol R.W., Demple B. Enzyme mechanism-based, oxidative DNA–protein cross-links formed with DNA polymerase β in vivo // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – Vol. 112. – № 28. – P. 8602–8607.
117. Khodyreva S.N., Prasad R., Ilina E.S., Sukhanova M. V., Kutuzov M.M., Liu Y., Hou E.W., Wilson S.H., Lavrik O.I. Apurinic/apyrimidinic (AP) site recognition by the 5'-dRP/AP lyase in poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107. – № 51. – P. 22090–22095.
118. Prasad R., Horton J.K., Chastain P.D., Gassman N.R., Freudenthal B.D., Hou E.W., Wilson S.H. Suicidal cross-linking of PARP-1 to AP site intermediates in cells undergoing base excision repair // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Vol. 42. – № 10. – P. 6337–6351.
119. Quiñones J.L., Thapar U., Wilson S.H., Ramsden D.A., Demple B. Oxidative DNA-protein crosslinks formed in mammalian cells by abasic site lyases involved in DNA repair // *DNA Repair*. – 2020. – Vol. 87. – P. 102773.
120. Marenstein D.R., Wilson D.M. 3rd, Teebor G.W. Human AP endonuclease (APE1) demonstrates endonucleolytic activity against AP sites in single-stranded DNA // *DNA Repair*. – 2004. – Vol. 3. – № 5. – P. 527–533.
121. Cortez D. Replication-coupled DNA repair // *Molecular Cell*. – 2019. – Vol. 74. – № 5. – P. 866–876.
122. Bhat K.P., Cortez D. RPA and Rad51: fork reversal, fork protection, and genome stability // *Nat Struct Mol Biol*. – 2018. – Vol. 25. – № 6. – P. 446–453.

123. Rosenbaum J.C. et al. The Rad51 paralogs facilitate a novel DNA strand specific damage tolerance pathway // *Nature Communications*. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 3515.
124. Mohni K.N., Wessel S.R., Zhao R., Wojciechowski A.C., Luzwick J.W., Layden H., Eichman B.F., Thompson P.S., Mehta K.P.M., Cortez D. HMCES maintains genome integrity by shielding abasic sites in single-strand DNA // *Cell*. – 2019. – Vol. 176. – № 1–2. – P. 144–153.e13.
125. Shuck S.C., Short E.A., Turchi J.J. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology // *Cell Research*. – 2008. – Vol. 18. – № 1. – P. 64–72.
126. Spivak G. Nucleotide excision repair in humans // *DNA Repair*. – 2015. – Vol. 36. – P. 13–18.
127. David S.S., O'Shea V.L., Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage // *Nature*. – 2007. – Vol. 447. – № 7147. – P. 941–950.
128. Kim Y.-J., Wilson D.M. 3rd. Overview of base excision repair biochemistry // *Current Molecular Pharmacology*. – 2012. – Vol. 5. – № 1. – P. 3–13.
129. 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. – Vol. 381. – № 1. – P. 13–23.
130. Mol C.D., Izumi T., Mitra S., Tainer J.A., Talner J.A. DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 and DNA repair coordination [corrected] // *Nature*. – 2000. – Vol. 403. – № 6768. – P. 451–456.
131. Wilson S.H., Kunkel T.A. Passing the baton in base excision repair. // *Nature structural biology*. – 2000. – Vol. 7. – № 3. – P. 176–178.
132. Demple B., Herman T., Chen D.S. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1991. – Vol. 88. – № 24. – P. 11450–11454.
133. Bennett R.A.O., Wilson D.M. 3rd, Wong D., Demple B. Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase in the base excision repair pathway // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1997. – Vol. 94. – № 14. – P. 7166–7169.
134. Wiederhold L., Leppard J.B., Kedar P., Karimi-Busheri F., Rasouli-Nia A., Weinfeld M., Tomkinson A.E., Izumi T., Prasad R., Wilson S.H., Mitra S., Hazra T.K. AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells // *Molecular Cell*. – 2004. – Vol. 15. – № 2. – P. 209–220.

135. Sobol R.W., Horton J.K., Kühn R., Gu H., Singhal R.K., Prasad R., Rajewsky K., Wilson S.H. Requirement of mammalian DNA polymerase β in base excision repair // *Nature*. – 1996. – Vol. 379. – № 6561. – P. 183–186.
136. Braithwaite E.K., Prasad R., Shock D.D., Hou E.W., Beard W.A., Wilson S.H. DNA polymerase λ mediates a back-up base excision repair activity in extracts of mouse embryonic fibroblasts // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280. – № 18. – P. 18469–18475.
137. Beard W.A., Wilson S.H. Structure and mechanism of DNA polymerase β // *Chemical Reviews*. – 2006. – Vol. 106. – № 2. – P. 361–382.
138. Matsumoto Y., Kim K. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase β during DNA repair // *Science*. – 1995. – Vol. 269. – № 5224. – P. 699–702.
139. Fortini P., Parlanti E., Sidorkina O.M., Laval J., Dogliotti E. The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells // *J Biol Chem*. – 1999. – Vol. 274. – № 21. – P. 15230–15236.
140. Taylor R.M., Moore D.J., Whitehouse J., Johnson P., Caldecott K.W. A cell cycle-specific requirement for the XRCC1 BRCT II domain during mammalian DNA strand break repair // *Mol Cell Biol*. – 2000. – Vol. 20. – № 2. – P. 735–740.
141. Otterlei M., Warbrick E., Nagelhus T.A., Haug T., Slupphaug G., Akbari M., Aas P.A., Steinsbekk K., Bakke O., Krokan H.E. Post-replicative base excision repair in replication foci // *EMBO J*. – 1999. – Vol. 18. – № 13. – P. 3834–3844.
142. Fortini P., Dogliotti E. Base damage and single-strand break repair: Mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways // *DNA Repair*. – 2007. – Vol. 6. – № 4. – P. 398–409.
143. Petermann E. ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair // *DNA Repair*. – 2003. – Vol. 2. – № 10. – P. 1101–1114.
144. Prasad R., Shock D.D., Beard W.A., Wilson S.H. Substrate channeling in mammalian base excision repair pathways: passing the baton // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Vol. 285. – № 52. – P. 40479–40488.
145. Endutkin A.V., Yudkina A.V., Sidorenko V.S., Zharkov D.O. Transient protein-protein complexes in base excision repair // *J Biomol Struct Dyn*. – 2019. – Vol. 37. – № 17. – P. 4407–4418.

146. Bazlekowa-Karaban M. et al. Mechanism of stimulation of DNA binding of the transcription factors by human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1, APE1 // *DNA Repair*. – 2019. – Vol. 82. – P. 102698.
147. Sukhanova M.V., Khodyreva S.N., Lebedeva N.A., Prasad R., Wilson S.H., Lavrik O.I. Human base excision repair enzymes apurinic/apyrimidinic endonuclease1 (APE1), DNA polymerase beta and poly(ADP-ribose) polymerase 1: interplay between strand-displacement DNA synthesis and proofreading exonuclease activity // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – Vol. 33. – № 4. – P. 1222–1229.
148. Nazarkina Z.K., Khodyreva S.N., Marsin S., Radicella J.P., Lavrik O.I. Study of interaction of XRCC1 with DNA and proteins of base excision repair by photoaffinity labeling technique // *Biochemistry (Mosc)*. – 2007. – Vol. 72. – № 8. – P. 878–886.
149. Moor N.A., Vasil'eva I.A., Anarbaev R.O., Antson A.A., Lavrik O.I. Quantitative characterization of protein-protein complexes involved in base excision DNA repair // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – Vol. 43. – № 12. – P. 6009–6022.
150. Kladova O.A., Bazlekowa-Karaban M., Baconnais S., Piétrement O., Ishchenko A.A., Matkarimov B.T., Iakovlev D.A., Vasenko A., Fedorova O.S., Le Cam E., Tudek B., Kuznetsov N.A., Saparbaev M. The role of the N-terminal domain of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1, APE1, in DNA glycosylase stimulation // *DNA Repair*. – 2018. – Vol. 64. – P. 10–25.
151. Jang S. et al. Damage sensor role of UV-DDB during base excision repair // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2019. – Vol. 26. – № 8. – P. 695–703.
152. Caldecott K.W. Mammalian DNA base excision repair: Dancing in the moonlight // *DNA Repair*. – 2020. – Vol. 93. – P. 102921.
153. Torres-Ramos C.A., Johnson R.E., Prakash L., Prakash S. Evidence for the involvement of nucleotide excision repair in the removal of abasic sites in yeast // *Molecular and Cellular Biology*. – 2000. – Vol. 20. – № 10. – P. 3522–3528.
154. Swanson R.L., Morey N.J., Doetsch P.W., Jinks-Robertson S. Overlapping specificities of base excision repair, nucleotide excision repair, recombination, and translesion synthesis pathways for DNA base damage in *Saccharomyces cerevisiae* // *Molecular and Cellular Biology*. – 1999. – Vol. 19. – № 4. – P. 2929–2935.

155. Kim N., Jinks-Robertson S. Abasic sites in the transcribed strand of yeast DNA are removed by transcription-coupled nucleotide excision repair // *Molecular and Cellular Biology*. – 2010. – Vol. 30. – № 13. – P. 3206–3215.
156. Tornaletti S., Maeda L.S., Hanawalt P.C. Transcription arrest at an abasic site in the transcribed strand of template DNA // *Chemical Research in Toxicology*. – 2006. – Vol. 19. – № 9. – P. 1215–1220.
157. Wang W., Walmacq C., Chong J., Kashlev M., Wang D. Structural basis of transcriptional stalling and bypass of abasic DNA lesion by RNA polymerase II // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2018. – Vol. 115. – № 11. – P. E2538–E2545.
158. Yu S.-L., Lee S.-K., Johnson R.E., Prakash L., Prakash S. The stalling of transcription at abasic sites is highly mutagenic // *Molecular and Cellular Biology*. – 2003. – Vol. 23. – № 1. – P. 382–388.
159. Kim N., Jinks-Robertson S. dUTP incorporation into genomic DNA is linked to transcription in yeast // *Nature*. – 2009. – Vol. 459. – № 7250. – P. 1150–1153.
160. Clauson C.L., Oestreich K.J., Austin J.W., Doetsch P.W. Abasic sites and strand breaks in DNA cause transcriptional mutagenesis in *Escherichia coli* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107. – № 8. – P. 3657–3662.
161. Daley J.M., Zakaria C., Ramotar D. The endonuclease IV family of apurinic/apyrimidinic endonucleases // *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. – 2010. – Vol. 705. – № 3. – P. 217–227.
162. Mol C.D., Hosfield D.J., Tainer J.A. Abasic site recognition by two apurinic/apyrimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: The 3' ends justify the means // *Mutation Research - DNA Repair*. – 2000. – Vol. 460. – № 3–4. – P. 211–229.
163. Lindahl T., Andersson A. Rate of chain breakage at apurinic sites double-stranded deoxyribonucleic acid // *Biochemistry*. – 1972. – Vol. 11. – № 19. – P. 3618–3623.
164. Verly W.G., Paquette Y. An endonuclease for depurinated DNA in *Escherichia coli* B. // *Canadian journal of biochemistry*. – 1972. – Vol. 50. – № 2. – P. 217–224.
165. Hadi S.M., Goldthwait D.A. Endonuclease II of *Escherichia coli*. Degradation of partially depurinated deoxyribonucleic acid // *Biochemistry*. – 1971. – Vol. 10. – № 26. – P. 4986–4994.
166. Verly W.G., Paquette Y., Thibodeau L. Nuclease for DNA apurinic sites may be involved in the maintenance of DNA in normal cells // *Nature New Biology*. – 1973. – Vol. 244. – № 133. – P. 67–69.

167. Verly W.G., Rassart E. Purification of *Escherichia coli* endonuclease specific for apurinic sites in DNA // Journal of Biological Chemistry. – 1975. – Vol. 250. – № 20. – P. 8214–8219.
168. Thomas K.R., Olivera B.M. Processivity of DNA exonucleases // Journal of Biological Chemistry. – 1978. – Vol. 253. – № 2. – P. 424–429.
169. Kow Y.W., Wallace S.S. Exonuclease III recognizes urea residues in oxidized DNA. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1985. – Vol. 82. – № 24. – P. 8354–8358.
170. Demple B., Halbrook J., Linn S. *Escherichia coli* xth mutants are hypersensitive to hydrogen peroxide // Journal of Bacteriology. – 1983. – Vol. 153. – № 2. – P. 1079–1082.
171. Mol C.D., Kuo C.-F., Thayer M.M., Cunningham R.P., Tainer J.A. Structure and function of the multifunctional DNA-repair enzyme exonuclease III // Nature. – 1995. – Vol. 374. – № 6520. – P. 381–386.
172. Robson C.N., Hickson I.D. Isolation of cDNA clones encoding a human apurini/aprimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in *E.coli* xth (exonuclease III) mutants // Nucleic Acids Research. – 1991. – Vol. 19. – № 20. – P. 5519–5523.
173. Xanthoudakis S., Curran T. Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. // The EMBO Journal. – 1992. – Vol. 11. – № 2. – P. 653–665.
174. Seki S., Ikeda S., Watanabe S., Hatsushika M., Tsutsui K., Akiyama K., Zhang B. A mouse DNA repair enzyme (APEX nuclease) having exonuclease and apurinic/aprimidinic endonuclease activities: purification and characterization // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology. – 1991. – Vol. 1079. – № 1. – P. 57–64.
175. Maher R.L., Bloom L.B. Pre-steady-state kinetic characterization of the AP endonuclease activity of human AP endonuclease 1 // Journal of Biological Chemistry. – 2007. – Vol. 282. – № 42. – P. 30577–30585.
176. Wilson D.M. 3rd, Barsky D. The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA // Mutation Research/DNA Repair. – 2001. – Vol. 485. – № 4. – P. 283–307.
177. Bhakat K.K. Role of acetylated human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in regulation of the parathyroid hormone gene // The EMBO Journal. – 2003. – Vol. 22. – № 23. – P. 6299–6309.
178. Kuninger D.T., Izumi T., Papaconstantinou J., Mitra S. Human AP-endonuclease 1 and hnRNP-L interact with a nCaRE-like repressor element in the AP-endonuclease 1 promoter // Nucleic Acids Research. – 2002. – Vol. 30. – № 3. – P. 823–829.

179. Fung H., Demple B. A vital role for APE1/Ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells // *Molecular Cell*. – 2005. – Vol. 17. – № 3. – P. 463–470.
180. Fritz G. Human APE/Ref-1 protein // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2000. – Vol. 32. – № 9. – P. 925–929.
181. Freudenthal B.D., Beard W.A., Cuneo M.J., Dyrkheeva N.S., Wilson S.H. Capturing snapshots of APE1 processing DNA damage // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2015. – Vol. 22. – № 11. – P. 924–931.
182. Gorman M.A., Morera S., Rothwell D.G., De La Fortelle E., Mol C.D., Tainer J.A., Hickson I.D., Freemont P.S. The crystal structure of the human DNA repair endonuclease HAP1 suggests the recognition of extra-helical deoxyribose at DNA abasic sites // *EMBO Journal*. – 1997. – Vol. 16. – № 21. – P. 6548–6558.
183. Moor N., Vasil'eva I., Lavrik O. Functional role of N-terminal extension of human AP endonuclease 1 in coordination of base excision DNA repair via protein–protein interactions // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 9. – P. 3122.
184. Whitaker A.M., Freudenthal B.D. APE1: A skilled nucleic acid surgeon // *DNA Repair*. – 2018. – Vol. 71. – P. 93–100.
185. Strauss P.R., Beard W.A., Patterson T.A., Wilson S.H. Substrate binding by human apurinic/apyrimidinic endonuclease indicates a Briggs-Haldane mechanism // *Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272. – № 2. – P. 1302–1307.
186. Hoitsma N.M., Whitaker A.M., Beckwitt E.C., Jang S., Agarwal P.K., Van Houten B., Freudenthal B.D. AP-endonuclease 1 sculpts DNA through an anchoring tyrosine residue on the DNA intercalating loop // *Nucleic Acids Research*. – 2020.
187. Alekseeva I.V., Davletgildeeva A.T., Arkova O.V., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. The impact of single-nucleotide polymorphisms of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 on specific DNA binding and catalysis // *Biochimie*. – 2019. – Vol. 163. – P. 73–83.
188. Beloglazova N.G. Thermodynamic, kinetic and structural basis for recognition and repair of abasic sites in DNA by apurinic/apyrimidinic endonuclease from human placenta // *Nucleic Acids Research*. – 2004. – Vol. 32. – № 17. – P. 5134–5146.
189. Tsutakawa S.E. et al. Conserved structural chemistry for incision activity in structurally non-homologous apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 and endonuclease IV DNA repair enzymes // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288. – № 12. – P. 8445–8455.

190. Miroshnikova A.D., Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. Thermodynamics of damaged DNA binding and catalysis by human AP endonuclease 1 // *Acta Naturae*. – 2016. – Vol. 8. – № 1. – P. 103–110.
191. Kane C.M., Linn S. Purification and characterization of an apurinic/apyrimidinic endonuclease from HeLa cells. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1981.
192. Barzilay G., Mol C.D., Robson C.N., Walker L.J., Cunningham R.P., Tainer J.A., Hickson I.D. Identification of critical active-site residues in the multifunctional human DNA repair enzyme HAP1 // *Nature Structural Biology*. – 1995. – Vol. 2. – № 7. – P. 561–568.
193. Erzberger J.P., Wilson D.M. 3rd. The role of Mg^{2+} and specific amino acid residues in the catalytic reaction of the major human abasic endonuclease: New insights from EDTA-resistant incision of acyclic abasic site analogs and site-directed mutagenesis // *Journal of Molecular Biology*. – 1999. – Vol. 290. – № 2. – P. 447–457.
194. Masuda Y., Bennett R.A.O., Demple B. Rapid dissociation of human apurinic endonuclease (APE1) from incised DNA induced by magnesium // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273. – № 46. – P. 30360–30365.
195. Nguyen L.H., Barsky D., Erzberger J.P., Wilson D.M. 3rd. Mapping the protein-DNA interface and the metal-binding site of the major human apurinic/apyrimidinic endonuclease // *Journal of Molecular Biology*. – 2000. – Vol. 298. – № 3. – P. 447–459.
196. Lowry D.F., Hoyt D.W., Khazi F.A., Bagu J., Lindsey A.G., Wilson D.M. 3rd. Investigation of the role of the histidine–aspartate pair in the human exonuclease III-like abasic endonuclease, APE1 // *Journal of Molecular Biology*. – 2003. – Vol. 329. – № 2. – P. 311–322.
197. Batebi H., Dragelj J., Imhof P. Role of AP-endonuclease (APE1) active site residues in stabilization of the reactant enzyme-DNA complex // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2018. – Vol. 86. – № 4. – P. 439–453.
198. He H., Chen Q., Georgiadis M.M. High-resolution crystal structures reveal plasticity in the metal binding site of apurinic/apyrimidinic endonuclease I // *Biochemistry*. – 2014. – Vol. 53. – № 41. – P. 6520–6529.
199. Schermerhorn K.M., Delaney S. Transient-State Kinetics of apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease 1 acting on an authentic AP site and commonly used substrate analogs: the effect of diverse metal ions and base mismatches // *Biochemistry*. – 2013. – Vol. 52. – № 43. – P. 7669–7677.

200. Miroshnikova A.D., Kuznetsova A.A., Vorobjev Y.N., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. Effects of mono- and divalent metal ions on DNA binding and catalysis of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 // *Molecular BioSystems*. – 2016. – Vol. 12. – № 5. – P. 1527–1539.
201. Beernink P.T., Segelke B.W., Hadi M.Z., Erzberger J.P., Wilson D.M. 3rd, Rupp B. Two divalent metal ions in the active site of a new crystal form of human apurinic/aprimidinic endonuclease, APE1: Implications for the catalytic mechanism // *Journal of Molecular Biology*. – 2001. – Vol. 307. – № 4. – P. 1023–1034.
202. Oezguen N., Schein C.H., Peddi S.R., Power T.D., Izumi T., Braun W. A “moving metal mechanism” for substrate cleavage by the DNA repair endonuclease APE1 // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2007. – Vol. 68. – № 1. – P. 313–323.
203. McNeill D.R., Wilson D.M. 3rd. A Dominant-negative form of the major human abasic endonuclease enhances cellular sensitivity to laboratory and clinical DNA-damaging agents // *Molecular Cancer Research*. – 2007. – Vol. 5. – № 1. – P. 61–70.
204. Mundle S.T., Delaney J.C., Essigmann J.M., Strauss P.R. Enzymatic mechanism of human apurinic/aprimidinic endonuclease against a THF AP site model substrate // *Biochemistry*. – 2009. – Vol. 48. – № 1. – P. 19–26.
205. Lipton A.S., Heck R.W., Primak S., McNeill D.R., Wilson D.M. 3rd, Ellis P.D. Characterization of Mg^{2+} binding to the DNA repair protein apurinic/aprimidinic endonuclease 1 via solid-state ^{25}Mg NMR spectroscopy // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – Vol. 130. – № 29. – P. 9332–9341.
206. Abbotts R., Madhusudan S. Human AP endonuclease 1 (APE1): From mechanistic insights to druggable target in cancer // *Cancer Treatment Reviews*. – 2010. – Vol. 36. – № 5. – P. 425–435.
207. Kanazhevskaya L.Y., Koval V.V., Lomzov A.A., Fedorova O.S. The role of Asn-212 in the catalytic mechanism of human endonuclease APE1: Stopped-flow kinetic study of incision activity on a natural AP site and a tetrahydrofuran analogue // *DNA Repair*. – 2014. – Vol. 21. – P. 43–54.
208. Rothwell D. Asparagine 212 is essential for abasic site recognition by the human DNA repair endonuclease HAP1 // *Nucleic Acids Research*. – 1996. – Vol. 24. – № 21. – P. 4217–4221.
209. Mundle S.T., Fattal M.H., Melo L.F., Coriolan J.D., O'Regan N.E., Strauss P.R. Novel role of tyrosine in catalysis by human AP endonuclease 1 // *DNA Repair*. – 2004. – Vol. 3. – № 11. – P. 1447–1455.

210. Hadi M.Z., Wilson D.M. 3rd. Second human protein with homology to the *Escherichia coli* abasic endonuclease exonuclease III // Environmental and Molecular Mutagenesis. – 2000. – Vol. 36. – № 4. – P. 312–324.
211. Hadi M.Z., Ginalski K., Nguyen L.H., Wilson D.M. 3rd. Determinants in nuclease specificity of APE1 and APE2, human homologues of *Escherichia coli* exonuclease III // Journal of Molecular Biology. – 2002. – Vol. 316. – № 3. – P. 853–866.
212. Timofeyeva N.A., Koval V.V., Knorre D.G., Zharkov D.O., Saparbaev M.K., Ishchenko A.A., Fedorova O.S. Conformational dynamics of human AP endonuclease in base excision and nucleotide incision repair pathways // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. – 2009. – Vol. 26. – № 5. – P. 637–652.
213. Kanazhevskaya L.Y., Koval V.V., Vorobjev Y.N., Fedorova O.S. Conformational dynamics of abasic DNA upon interactions with AP endonuclease 1 revealed by stopped-flow fluorescence analysis // Biochemistry. – 2012. – Vol. 51. – № 6. – P. 1306–1321.
214. Rothwell D.G. Substitution of Asp-210 in HAP1 (APE/Ref-1) eliminates endonuclease activity but stabilises substrate binding // Nucleic Acids Research. – 2000. – Vol. 28. – № 11. – P. 2207–2213.
215. Kanazhevskaya L.Y., Koval V.V., Zharkov D.O., Strauss P.R., Fedorova O.S. Conformational transitions in human AP endonuclease 1 and its active site mutant during abasic site repair // Biochemistry. – 2010. – Vol. 49. – № 30. – P. 6451–6461.
216. Seki S., Hatsushika M., Watanabe S., Akiyama K., Nagao K., Tsutsui K. cDNA cloning, sequencing, expression and possible domain structure of human APEX nuclease homologous to *Escherichia coli* exonuclease III // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression. – 1992. – Vol. 1131. – № 3. – P. 287–299.
217. Chou K.-M., Cheng Y.-C. An exonucleolytic activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease on 3' mispaired DNA // Nature. – 2002. – Vol. 415. – № 6872. – P. 655–659.
218. Andres S.N., Schellenberg M.J., Wallace B.D., Tumbale P., Williams R.S. Recognition and repair of chemically heterogeneous structures at DNA ends // Environmental and Molecular Mutagenesis. – 2015. – Vol. 56. – № 1. – P. 1–21.
219. Wilson D.M. 3rd, Takeshita M., Grollman A.P., Demple B. Incision activity of human apurinic endonuclease (APE) at abasic site analogs in DNA // Journal of Biological Chemistry. – 1995. – Vol. 270. – № 27. – P. 16002–16007.

220. Wilson D.M. 3rd. Properties of and substrate determinants for the exonuclease activity of human apurinic endonuclease APE1 // *Journal of Molecular Biology*. – 2003. – Vol. 330. – № 5. – P. 1027–1037.
221. Dyrkheeva N.S., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Efficiency of exonucleolytic action of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 towards matched and mismatched dNMP at the 3' terminus of different oligomeric DNA structures correlates with thermal stability of DNA duplexes // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. – 2006. – Vol. 1764. – № 4. – P. 699–706.
222. Lebedeva N.A., Khodyreva S.N., Favre A., Lavrik O.I. AP endonuclease 1 has no biologically significant 3'→5'-exonuclease activity // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2003. – Vol. 300. – № 1. – P. 182–187.
223. Chen D.S., Herman T., Demple B. Two distinct human DNA diesterases that hydrolyze 3'-blocking deoxyribose fragments from oxidized DNA // *Nucleic Acids Research*. – 1991. – Vol. 19. – № 21. – P. 5907–5914.
224. Demple B., Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology // *Annu. Rev. Biochem.* – 1994. – Vol. 63. – P. 915–948.
225. Nash H.M., Bruner S.D., Schärer O.D., Kawate T., Addona T.A., Spooner E., Lane W.S., Verdine G.L. Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily // *Current Biology*. – 1996. – Vol. 6. – № 8. – P. 968–980.
226. Parsons J.L. APE1-dependent repair of DNA single-strand breaks containing 3'-end 8-oxoguanine // *Nucleic Acids Research*. – 2005. – Vol. 33. – № 7. – P. 2204–2209.
227. Castillo-Acosta V.M., Ruiz-Perez L.M., Yang W., Gonzalez-Pacanowska D., Vidal A.E. Identification of a residue critical for the excision of 3'-blocking ends in apurinic/apyrimidinic endonucleases of the Xth family // *Nucleic Acids Research*. – 2009. – Vol. 37. – № 6. – P. 1829–1842.
228. Izumi T., Hazra T.K., Boldogh I., Tomkinson A.E., Park M.S., Ikeda S., Mitra S. Requirement for human AP endonuclease 1 for repair of 3'-blocking damage at DNA single-strand breaks induced by reactive oxygen species // *Carcinogenesis*. – 2000. – Vol. 21. – № 7. – P. 1329–1334.
229. Parsons J.L. APE1 is the major 3'-phosphoglycolate activity in human cell extracts // *Nucleic Acids Research*. – 2004. – Vol. 32. – № 12. – P. 3531–3536.

230. Suh D., Wilson D.M. 3rd, Povirk L.F. 3'-Phosphodiesterase activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease at DNA double-strand break ends // *Nucleic Acids Research*. – 1997. – Vol. 25. – № 12. – P. 2495–2500.
231. Timofeyeva N.A., Koval V.V., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S. Lys98 substitution in human AP endonuclease 1 affects the kinetic mechanism of enzyme action in base excision and nucleotide incision repair pathways // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6. – № 9. – P. e24063.
232. Whitaker A.M., Flynn T.S., Freudenthal B.D. Molecular snapshots of APE1 proofreading mismatches and removing DNA damage // *Nature Communications*. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 399.
233. Guliaev A.B. Structural insights by molecular dynamics simulations into specificity of the major human AP endonuclease toward the benzene-derived DNA adduct, pBQ-C // *Nucleic Acids Research*. – 2004. – Vol. 32. – № 9. – P. 2844–2852.
234. Malfatti M.C., Balachander S., Antoniali G., Koh K.D., Saint-Pierre C., Gasparutto D., Chon H., Crouch R.J., Storici F., Tell G. Abasic and oxidized ribonucleotides embedded in DNA are processed by human APE1 and not by RNase H2 // *Nucleic Acids Research*. – 2017. – Vol. 45. – № 19. – P. 11193–11212.
235. Kim W.-C., King D., Lee C.H. RNA-cleaving properties of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1). // *International journal of biochemistry and molecular biology*. – 2010. – Vol. 1. – № 1. – P. 12–25.
236. Black D.L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing // *Annual Review of Biochemistry*. – 2003. – Vol. 72. – № 1. – P. 291–336.
237. Rossbach O., Hung L.-H., Schreiner S., Grishina I., Heiner M., Hui J., Bindereif A. Auto- and cross-regulation of the hnRNP 1 proteins by alternative splicing // *Molecular and Cellular Biology*. – 2009. – Vol. 29. – № 6. – P. 1442–1451.
238. Kuznetsova A.A., Gavrilova A.A., Novopashina D.S., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Mutational and kinetic analysis of APE1 endoribonuclease activity // *Molecular Biology*. – 2021. – Vol. 55. – № 2. – P. 211–224.
239. Kim W.-C., Berquist B.R., Chohan M., Uy C., Wilson D.M. 3rd, Lee C.H. Characterization of the endoribonuclease active site of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 // *Journal of Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 411. – № 5. – P. 960–971.

240. Kuznetsova A.A., Novopashina D.S., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Effect of the substrate structure and metal ions on the hydrolysis of undamaged RNA by human AP endonuclease APE1 // *Acta Naturae*. – 2020. – Vol. 12. – № 2. – P. 74–85.
241. Tell G., Fantini D., Quadrifoglio F. Understanding different functions of mammalian AP endonuclease (APE1) as a promising tool for cancer treatment // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2010. – Vol. 67. – № 21. – P. 3589–3608.
242. Antoniali G., Malfatti M.C., Tell G. Unveiling the non-repair face of the base excision repair pathway in RNA processing: A missing link between DNA repair and gene expression? // *DNA Repair*. – 2017. – Vol. 56. – P. 65–74.
243. R. Kelley M., M. Georgiadis M., L. Fishel M. APE1/Ref-1 role in redox signaling: translational applications of targeting the redox function of the DNA repair/redox protein APE1/Ref-1 // *Current Molecular Pharmacology*. – 2012. – Vol. 5. – № 1. – P. 36–53.
244. Sengupta S., Mantha A.K., Mitra S., Bhakat K.K. Human AP endonuclease (APE1/Ref-1) and its acetylation regulate YB-1-p300 recruitment and RNA polymerase II loading in the drug-induced activation of multidrug resistance gene MDR1 // *Oncogene*. – 2011. – Vol. 30. – № 4. – P. 482–493.
245. Chen G., Chen J., Yan Z., Li Z., Yu M., Guo W., Tian W. Maternal diabetes modulates dental epithelial stem cells proliferation and self-renewal in offspring through apurinic/apyrimidinic endonuclease 1-mediated DNA methylation // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 40762.
246. Antoniali G., Lirussi L., Poletto M., Tell G. Emerging roles of the nucleolus in regulating the DNA damage response: the noncanonical DNA repair enzyme APE1/Ref-1 as a paradigmatical example // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2014. – Vol. 20. – № 4. – P. 621–639.
247. Tell G., Wilson D.M. 3rd, Lee C.H. Intrusion of a DNA repair protein in the RNome world: Is this the beginning of a new era? // *Molecular and Cellular Biology*. – 2010. – Vol. 30. – № 2. – P. 366–371.
248. Vohhodina J., Harkin D.P., Savage K.I. Dual roles of DNA repair enzymes in RNA biology/post-transcriptional control // *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. – 2016. – Vol. 7. – № 5. – P. 604–619.
249. Walker L.J., Robson C.N., Black E., Gillespie D., Hickson I.D. Identification of residues in the human DNA repair enzyme HAP1 (Ref-1) that are essential for redox regulation of Jun DNA binding. // *Molecular and Cellular Biology*. – 1993. – Vol. 13. – № 9. – P. 5370–5376.

250. Xanthoudakis S., Miao G.G., Curran T. The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1994. – Vol. 91. – № 1. – P. 23–27.
251. Kelley M.R., Parsons S.H. Redox regulation of the DNA repair function of the human AP endonuclease Ape1/Ref-1 // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2001. – Vol. 3. – № 4. – P. 671–683.
252. Caston R.A., Gampala S., Armstrong L., Messmann R.A., Fishel M.L., Kelley M.R. The multifunctional APE1 DNA repair–redox signaling protein as a drug target in human disease // *Drug Discovery Today*. – 2021. – Vol. 26. – № 1. – P. 218–228.
253. Georgiadis M.M., Luo M., Gaur R.K., Delaplane S., Li X., Kelley M.R. Evolution of the redox function in mammalian apurinic/apyrimidinic endonuclease // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 2008. – Vol. 643. – № 1–2. – P. 54–63.
254. Luo M., Zhang J., He H., Su D., Chen Q., Gross M.L., Kelley M.R., Georgiadis M.M. Characterization of the redox activity and disulfide bond formation in apurinic/apyrimidinic endonuclease // *Biochemistry*. – 2012. – Vol. 51. – № 2. – P. 695–705.
255. Wang Y., Shupenko C.C., Melo L.F., Strauss P.R. DNA repair protein involved in heart and blood development // *Molecular and Cellular Biology*. – 2006. – Vol. 26. – № 23. – P. 9083–9093.
256. Pei D.-S., Yang X.-J., Liu W., Guikema J.E.J., Schrader C.E., Strauss P.R. A novel regulatory circuit in base excision repair involving AP endonuclease 1, Creb1 and DNA polymerase β // *Nucleic Acids Research*. – 2011. – Vol. 39. – № 8. – P. 3156–3165.
257. Pei D.-S., Jia P.-P., Luo J.-J., Liu W., Strauss P.R. AP endonuclease 1 (Apex1) influences brain development linking oxidative stress and DNA repair // *Cell Death & Disease*. – 2019. – Vol. 10. – № 5. – P. 348.
258. Matsumoto Y., Kim K., Bogenhagen D.F. Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. // *Molecular and Cellular Biology*. – 1994. – Vol. 14. – № 9. – P. 6187–6197.
259. Session A.M. et al. Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis* // *Nature*. – 2016. – Vol. 538. – № 7625. – P. 336–343.
260. Sander M., Lowenhaupt K., Rich A. Drosophila Rrp1 protein: an apurinic endonuclease with homologous recombination activities. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1991. – Vol. 88. – № 15. – P. 6780–6784.

261. Sander M., Huang S.-M. Characterization of the nuclease activity of drosophila Rrp1 on phosphoglycolate- and phosphate-modified DNA 3'-termini // *Biochemistry*. – 1995. – Vol. 34. – № 4. – P. 1267–1274.
262. Szakmary A., Huang S.M., Chang D.T., Beachy P.A., Sander M. Overexpression of a Rrp1 transgene reduces the somatic mutation and recombination frequency induced by oxidative DNA damage in *Drosophila melanogaster* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – Vol. 93. – № 4. – P. 1607–1612.
263. Sander M. Drosophila Rrp1 3'-exonuclease: demonstration of DNA sequence dependence and DNA strand specificity // *Nucleic Acids Research*. – 1996. – Vol. 24. – № 20. – P. 3926–3933.
264. Takeuchi R., Ruike T., Nakamura R., Shimanouchi K., Kanai Y., Abe Y., Ihara A., Sakaguchi K. Drosophila DNA polymerase ζ interacts with recombination repair protein 1, the drosophila homologue of human abasic endonuclease 1 // *Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – Vol. 281. – № 17. – P. 11577–11585.
265. Reardon B.J., Lombardo C.R., Sander M. Drosophila Rrp1 domain structure as defined by limited proteolysis and biophysical analyses // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273. – № 51. – P. 33991–33999.
266. Popoff S.C., Spira A.I., Johnson A.W., Demple B. Yeast structural gene (APN1) for the major apurinic endonuclease: homology to *Escherichia coli* endonuclease IV. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1990. – Vol. 87. – № 11. – P. 4193–4197.
267. Ramotar D., Popoff S.C., Gralla E.B., Demple B. Cellular role of yeast Apn1 apurinic endonuclease/3'-diesterase: repair of oxidative and alkylation DNA damage and control of spontaneous mutation. // *Molecular and Cellular Biology*. – 1991. – Vol. 11. – № 9. – P. 4537–4544.
268. Zakaria C., Kassahun H., Yang X., Labbé J.-C., Nilsen H., Ramotar D. *Caenorhabditis elegans* APN-1 plays a vital role in maintaining genome stability // *DNA Repair*. – 2010. – Vol. 9. – № 2. – P. 169–176.
269. Ribar B. The major role of human AP-endonuclease homolog Apn2 in repair of abasic sites in *Schizosaccharomyces pombe* // *Nucleic Acids Research*. – 2004. – Vol. 32. – № 1. – P. 115–126.
270. Laerdahl J.K., Korvald H., Nilsen L., Dahl-Michelsen K., Rognes T., Bjørås M., Alseth I. *Schizosaccharomyces pombe* encodes a mutated AP endonuclease 1 // *DNA Repair*. – 2011. – Vol. 10. – № 3. – P. 296–305.

271. Garcin E.D., Hosfield D.J., Desai S.A., Haas B.J., Björas M., Cunningham R.P., Tainer J.A. DNA apurinic-apyrimidinic site binding and excision by endonuclease IV // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2008. – Vol. 15. – № 5. – P. 515–522.
272. Weiss B. Endonuclease II of *Escherichia coli* is exonuclease III // *Journal of Biological Chemistry*. – 1976. – Vol. 251. – № 7. – P. 1896–1901.
273. Chan E., Weiss B. Endonuclease IV of *Escherichia coli* is induced by paraquat // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1987. – Vol. 84. – № 10. – P. 3189–3193.
274. Hosfield D.J., Guan Y., Haas B.J., Cunningham R.P., Tainer J.A. Structure of the DNA repair enzyme endonuclease IV and its DNA complex // *Cell*. – 1999. – Vol. 98. – № 3. – P. 397–408.
275. Ljungquist S., Lindahl T., Howard Flanders P. Methyl methane sulfonate sensitive mutant of *Escherichia coli* deficient in an endonuclease specific for apurinic sites in deoxyribonucleic acid // *Journal of Bacteriology*. – 1976. – Vol. 126. – № 2. – P. 646–653.
276. Ljungquist S. A new endonuclease from *Escherichia coli* acting at apurinic sites in DNA // *The Journal of biological chemistry*. – 1977. – Vol. 252. – № 9. – P. 2808–2814.
277. Warner H.R., Demple B.F., Deutsch W.A., Kane C.M., Linn S. Apurinic/apyrimidinic endonucleases in repair of pyrimidine dimers and other lesions in DNA // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1980. – Vol. 77. – № 8. – P. 4602–4606.
278. Golan G., Ishchenko A.A., Khassenov B., Shoham G., Saparbaev M.K. Coupling of the nucleotide incision and 3'→5' exonuclease activities in *Escherichia coli* endonuclease IV: Structural and genetic evidences // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 2010. – Vol. 685. – № 1–2. – P. 70–79.
279. Kerins S.M., Collins R., McCarthy T.V. Characterization of an endonuclease IV 3'-5' exonuclease activity // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 5. – P. 3048–3054.
280. Ramana C.V., Boldogh I., Izumi T., Mitra S. Activation of apurinic/apyrimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – Vol. 95. – № 9. – P. 5061–5066.
281. Ivanov I., Tainer J.A., McCammon J.A. Unraveling the three-metal-ion catalytic mechanism of the DNA repair enzyme endonuclease IV // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – Vol. 104. – № 5. – P. 1465–1470.

282. Johnson A.W., Demple B. Yeast DNA diesterase for 3'-fragments of deoxyribose: purification and physical properties of a repair enzyme for oxidative DNA damage. // Journal of Biological Chemistry. – 1988. – Vol. 263. – № 34. – P. 18009–18016.
283. Levin J.D., Shapiro R., Demple B. Metalloenzymes in DNA repair. *Escherichia coli* endonuclease IV and *Saccharomyces cerevisiae* Apn1. // Journal of Biological Chemistry. – 1991. – Vol. 266. – № 34. – P. 22893–22898.
284. Johnson A.W., Demple B. Yeast DNA 3'-repair diesterase is the major cellular apurinic/apyrimidinic endonuclease: substrate specificity and kinetics. // Journal of Biological Chemistry. – 1988. – Vol. 263. – № 34. – P. 18017–18022.
285. Ishchenko A.A., Yang X., Ramotar D., Saparbaev M. The 3'→5' exonuclease of Apn1 provides an alternative pathway to repair 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine in *Saccharomyces cerevisiae* // Molecular and Cellular Biology. – 2005. – Vol. 25. – № 15. – P. 6380–6390.
286. Yang X., Fan J., Ishchenko A.A., Patel D., Saparbaev M.K., Ramotar D. Functional characterization of the *Caenorhabditis elegans* DNA repair enzyme APN-1 // DNA Repair. – 2012. – Vol. 11. – № 10. – P. 811–822.
287. Ramotar D., Popoff S.C., Demple B. Complementation of DNA repair-deficient *Escherichia coli* by the yeast Apn1 apurinic/apyrimidinic endonuclease gene // Mol Microbiol. – 1991. – Vol. 5. – № 1. – P. 149–155.
288. Jilani A., Vongsamphanh R., Leduc A., Gros L., Saparbaev M., Ramotar D. Characterization of two independent amino acid substitutions that disrupt the DNA repair functions of the yeast Apn1 // Biochemistry. – 2003. – Vol. 42. – № 21. – P. 6436–6445.
289. Kiyonari S., Tahara S., Uchimura M., Shirai T., Ishino S., Ishino Y. Studies on the base excision repair (BER) complex in *Pyrococcus furiosus* // Biochemical Society Transactions. – 2009. – Vol. 37. – № 1. – P. 79–82.
290. Shiraishi M., Ishino S., Yamagami T., Egashira Y., Kiyonari S., Ishino Y. A novel endonuclease that may be responsible for damaged DNA base repair in *Pyrococcus furiosus* // Nucleic Acids Research. – 2015. – Vol. 43. – № 5. – P. 2853–2863.
291. Shiraishi M., Ishino S., Cann I., Ishino Y. A functional endonuclease Q exists in the bacterial domain: identification and characterization of endonuclease Q from *Bacillus pumilus* // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2017. – Vol. 81. – № 5. – P. 931–937.
292. Shiraishi M., Iwai S. Molecular basis of substrate recognition of endonuclease Q from the euryarchaeon *Pyrococcus furiosus* // Journal of bacteriology. – 2020. – Vol. 202. – № 2.

293. Ishino S., Makita N., Shiraishi M., Yamagami T., Ishino Y. EndoQ and EndoV work individually for damaged DNA base repair in *Pyrococcus furiosus* // *Biochimie*. – 2015. – Vol. 118. – P. 264–269.
294. Miyazono K., Ishino S., Makita N., Ito T., Ishino Y., Tanokura M. Crystal structure of the novel lesion-specific endonuclease PfuEndoQ from *Pyrococcus furiosus* // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – Vol. 46. – № 9. – P. 4807–4818.
295. Shi K., Moeller N.H., Banerjee S., McCann J.L., Carpenter M.A., Yin L., Moorthy R., Orellana K., Harki D.A., Harris R.S., Aihara H. Structural basis for recognition of distinct deaminated DNA lesions by endonuclease Q // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2021. – Vol. 118. – № 10. – P. e2021120118.
296. Chohan M., Mackedenski S., Li W.-M., Lee C.H. Human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) has 3' RNA phosphatase and 3' exoribonuclease activities // *Journal of Molecular Biology*. – 2015. – Vol. 427. – № 2. – P. 298–311.
297. Thakur S., Sarkar B., Cholia R.P., Gautam N., Dhiman M., Mantha A.K. APE1/Ref-1 as an emerging therapeutic target for various human diseases: phytochemical modulation of its functions // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2014. – Vol. 46. – № 7. – P. e106–e106.
298. McNeill D.R., Lam W., DeWeese T.L., Cheng Y.C., Wilson D.M. 3rd. Impairment of APE1 function enhances cellular sensitivity to clinically relevant alkylators and antimetabolites // *Molecular cancer research : MCR*. – 2009. – Vol. 7. – № 6. – P. 897–906.
299. Xanthoudakis S., Smeyne R.J., Wallace J.D., Curran T. The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – Vol. 93. – № 17. – P. 8919–8923.
300. Meira L.B., Devaraj S., Kisby G.E., Burns D.K., Daniel R.L., Hammer R.E., Grundy S., Jialal I., Friedberg E.C. Heterozygosity for the mouse Apex gene results in phenotypes associated with oxidative stress // *Cancer research*. – 2001. – Vol. 61. – № 14. – P. 5552–5557.
301. Illuzzi J.L., Harris N.A., Manvilla B.A., Kim D., Li M., Drohat A.C., Wilson D.M. 3rd. Functional assessment of population and tumor-associated APE1 protein variants // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – № 6. – P. e65922.
302. Gelin A., Redrejo-Rodríguez M., Laval J., Fedorova O.S., Saparbaev M., Ishchenko A.A. Genetic and Biochemical Characterization of Human AP Endonuclease 1 Mutants Deficient in Nucleotide Incision Repair Activity // *PLoS ONE* / ed. Marinus M.G. – 2010. – Vol. 5. – № 8. – P. e12241.

303. Akishev Z., Taipakova S., Joldybayeva B., Zutterling C., Smekenov I., Ishchenko A.A., Zharkov D.O., Bissenbaev A.K., Saparbaev M. The major *Arabidopsis thaliana* apurinic/apyrimidinic endonuclease, ARP is involved in the plant nucleotide incision repair pathway // DNA Repair. – 2016. – Vol. 48. – P. 30–42.
304. CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3rd Edition // ed. Fasman G.D. – 1977. – 6 p.
305. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
306. Kuzmič P. Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: Application to HIV proteinase // Analytical Biochemistry. – 1996. – Vol. 237. – № 2. – P. 260–273.
307. Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., Fedorova O.S. Conformational dynamics of the interaction of *Escherichia coli* endonuclease VIII with DNA substrates // DNA Repair. – 2012. – Vol. 11. – № 11. – P. 884–891.
308. Kuznetsov N.A., Vorobjev Y.N., Krasnoperov L.N., Fedorova O.S. Thermodynamics of the multi-stage DNA lesion recognition and repair by formamidopyrimidine-DNA glycosylase using pyrrolocytosine fluorescence-stopped-flow pre-steady-state kinetics // Nucleic Acids Research. – 2012. – Vol. 40. – № 15. – P. 7384–7392.
309. Kuznetsov N.A., Kuznetsova A.A., Vorobjev Y.N., Krasnoperov L.N., Fedorova O.S. Thermodynamics of the DNA damage repair steps of human 8-oxoguanine DNA glycosylase // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9. – № 6. – P. e98495.
310. Kladova O., Krasnoperov L., Kuznetsov N., Fedorova O. Kinetics and thermodynamics of DNA processing by wild type DNA-glycosylase Endo III and its catalytically inactive mutant forms // Genes. – 2018. – Vol. 9. – № 4. – P. 190.
311. Parkinson G.N., Lee M.P.H., Neidle S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA // Nature. – 2002. – Vol. 417. – № 6891. – P. 876–880.
312. Ambrus A., Chen D., Dai J., Bialis T., Jones R.A., Yang D. Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution // Nucleic Acids Research. – 2006. – Vol. 34. – № 9. – P. 2723–2735.
313. Phan A.T., Kuryavyi V., Luu K.N., Patel D.J. Structure of two intramolecular G-quadruplexes formed by natural human telomere sequences in K^+ solution // Nucleic Acids Research. – 2007. – Vol. 35. – № 19. – P. 6517–6525.

314. Burra S., Marasco D., Malfatti M.C., Antoniali G., Virgilio A., Esposito V., Demple B., Galeone A., Tell G. Human AP-endonuclease (APE1) activity on telomeric G4 structures is modulated by acetyltable lysine residues in the N-terminal sequence // *DNA Repair*. – 2019. – Vol. 73. – P. 129–143.
315. Marzano M., Falanga A.P., Marasco D., Borbone N., D’Errico S., Piccialli G., Roviello G.N., Oliviero G. Evaluation of an analogue of the marine ϵ -PLL peptide as a ligand of G-quadruplex DNA structures // *Marine Drugs*. – 2020. – Vol. 18. – № 1. – P. 49.
316. Karsisiotis A.I., Hessari N.M., Novellino E., Spada G.P., Randazzo A., Webba da Silva M. Topological characterization of nucleic acid G-quadruplexes by UV absorption and circular dichroism // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2011. – Vol. 50. – № 45. – P. 10645–10648.
317. Dai J., Carver M., Punchihewa C., Jones R.A., Yang D. Structure of the hybrid-2 type intramolecular human telomeric G-quadruplex in K^+ solution: Insights into structure polymorphism of the human telomeric sequence // *Nucleic Acids Research*. – 2007. – Vol. 35. – № 15. – P. 4927–4940.
318. Bugaut A., Alberti P. Understanding the stability of DNA G-quadruplex units in long human telomeric strands // *Biochimie*. – 2015. – Vol. 113. – P. 125–133.
319. 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 Research*. – 2015. – Vol. 43. – № 8. – P. 4039–4054.
320. Gohlke C., Murchie A.I.H., Lilley D.M.J., Clegg R.M. Kinking of DNA and RNA helices by bulged nucleotides observed by fluorescence resonance energy transfer // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1994. – Vol. 91. – № 24. – P. 11660–11664.
321. Schreck J.S., Ouldrige T.E., Romano F., Louis A.A., Doye J.P. Characterizing the bending and flexibility induced by bulges in DNA duplexes // *The Journal of chemical physics*. – 2015. – Vol. 142. – № 16.
322. Strom S., Shiskova E., Hahm Y., Grover N. Thermodynamic examination of 1- to 5-nt purine bulge loops in RNA and DNA constructs // *RNA (New York, N.Y.)*. – 2015. – Vol. 21. – № 7. – P. 1313–1322.
323. Johnson K.A. Kinetic analysis for the new enzymology: Using computer simulation to learn kinetics and solve mechanisms. – 2019. – 480 p.

324. Fischer C.J., Maluf N.K., Lohman T.M. Mechanism of ATP-dependent translocation of *E. coli* UvrD monomers along single-stranded DNA // *Journal of Molecular Biology*. – 2004. – Vol. 344. – № 5. – P. 1287–1309.
325. Toseland C.P., Webb M.R. ATPase Mechanism of the 5'-3' DNA helicase, RecD2 // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288. – № 35. – P. 25183–25193.
326. Kladova O.A., Grin I.R., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A., Zharkov D.O. Conformational dynamics of damage processing by human DNA glycosylase NEIL1 // *Journal of Molecular Biology*. – 2019. – Vol. 431. – № 6. – P. 1098–1112.
327. Fantini D., Vascotto C., Marasco D., D'Ambrosio C., Romanello M., Vitagliano L., Pedone C., Poletto M., Cesaratto L., Quadrioglio F., Scaloni A., Radicella J.P., Tell G. Critical lysine residues within the overlooked N-terminal domain of human APE1 regulate its biological functions // *Nucleic Acids Research*. – 2010. – Vol. 38. – № 22. – P. 8239–8256.
328. Poletto M., Vascotto C., Scognamiglio P.L., Lirussi L., Marasco D., Tell G. Role of the unstructured N-terminal domain of the hAPE1 (human apurinic/aprimidinic endonuclease 1) in the modulation of its interaction with nucleic acids and NPM1 (nucleophosmin) // *Biochemical Journal*. – 2013. – Vol. 452. – № 3. – P. 545–557.
329. Davletgildeeva A.T., Kuznetsova A.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Activity of Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease APE1 toward damaged DNA and native RNA with non-canonical structures // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 590848.
330. Mol C.D., Izumi T., Mitra S., Talner J.A. DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 DNA repair and coordination // *Nature*. – 2000. – Vol. 403. – № 6768. – P. 451–456.
331. Manvilla B.A., Pozharski E., Toth E.A., Drohat A.C. Structure of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 with the essential Mg^{2+} cofactor // *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. – 2013. – Vol. 69. – № 12. – P. 2555–2562.
332. Alekseeva I.V., Bakman A.S., Vorobjev Y.N., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Role of ionizing amino acid residues in the process of DNA binding by human AP endonuclease 1 and in its catalysis // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2019. – Vol. 123. – № 45. – P. 9546–9556.
333. Timofeyeva N.A., Koval V.V., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S. Kinetic mechanism of human apurinic/aprimidinic endonuclease action in nucleotide incision repair // *Biochemistry (Moscow)*. – 2011. – Vol. 76. – № 2. – P. 273–281.

334. Timofeyeva N.A., Fedorova O.S. A kinetic mechanism of repair of DNA containing α -anomeric deoxyadenosine by human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 // *Molecular BioSystems*. – 2016. – Vol. 12. – № 11. – P. 3435–3446.
335. Izumi T., Mitra S. Deletion analysis of human AP-endonuclease: Minimum sequence required for the endonuclease activity // *Carcinogenesis*. – 1998. – Vol. 19. – № 3. – P. 525–527.
336. Chattopadhyay R., Wiederhold L., Szczesny B., Boldogh I., Hazra T.K., Izumi T., Mitra S. Identification and characterization of mitochondrial abasic (AP)-endonuclease in mammalian cells // *Nucleic Acids Research*. – 2006. – Vol. 34. – № 7. – P. 2067–2076.
337. Popov A. V., Grin I.R., Dvornikova A.P., Matkarimov B.T., Groisman R., Saparbaev M., Zharkov D.O. Reading targeted DNA damage in the active demethylation pathway: Role of accessory domains of eukaryotic AP endonucleases and thymine-DNA glycosylases // *Journal of Molecular Biology*. – 2020. – Vol. 432. – № 6. – P. 1747–1768.
338. Vascotto C., Fantini D., Romanello M., Cesaratto L., Deganuto M., Leonardi A., Radicella J.P., Kelley M.R., D'Ambrosio C., Scaloni A., Quadrioglio F., Tell G. APE1/Ref-1 interacts with NPM1 within nucleoli and plays a role in the rRNA quality control process // *Molecular and Cellular Biology*. – 2009. – Vol. 29. – № 7. – P. 1834–1854.
339. Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S. Pre-steady-state fluorescence analysis of damaged DNA transfer from human DNA glycosylases to AP endonuclease APE1 // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 2014. – Vol. 1840. – № 10. – P. 3042–3051.
340. Kladova O.A., Iakovlev D.A., Groisman R., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. An assay for the activity of base excision repair enzymes in cellular extracts using fluorescent DNA probes // *Biochemistry (Moscow)*. – 2020. – Vol. 85. – № 4. – P. 480–489.
341. Alekseeva I.V., Kuznetsova A.A., Bakman A.S., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. The role of active-site amino acid residues in the cleavage of DNA and RNA substrates by human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 2020. – Vol. 1864. – № 12. – P. 129718.
342. Liu T.-C., Lin C.-T., Chang K.-C., Guo K.-W., Wang S., Chu J.-W., Hsiao Y.-Y. APE1 distinguishes DNA substrates in exonucleolytic cleavage by induced space-filling // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 601.

343. Shen J.-C., Loeb L.A. Mutations in the $\alpha 8$ loop of human APE1 alter binding and cleavage of DNA containing an abasic site // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 47. – P. 46994–47001.
344. Izumi T., Schein C.H., Oezgüen N., Feng Y., Braun W. Effects of backbone contacts 3' to the abasic site on the cleavage and the product binding by human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1) // *Biochemistry*. – 2004. – Vol. 43. – № 3. – P. 684–689.
345. Moor N.A., Vasil'eva I.A., Kuznetsov N.A., Lavrik O.I. Human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 is modified in vitro by poly(ADP-ribose) polymerase 1 under control of the structure of damaged DNA // *Biochimie*. – 2020. – Vol. 168. – P. 144–155.
346. Case-Green S.C., Southern E.M. Studies on the base pairing properties of deoxyinosine by solid phase hybridisation to oligonucleotides // *Nucleic Acids Research*. – 1994. – Vol. 22. – № 2. – P. 131–136.
347. Lukin M., de Los Santos C. NMR structures of damaged DNA // *Chemical Reviews*. – 2006. – Vol. 106. – № 2. – P. 607–686.