

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

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

*на правах рукописи*

**Дятлова Евгения Алексеевна**

**МЕХАНИЗМЫ ПОИСКА ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗАМИ  
СУПЕРСЕМЕЙСТВ «СПИРАЛЬ — ДВА ПОВОРОТА — СПИРАЛЬ» И « $\alpha/\beta$ -УКЛАДКА»**

**1.5.4 — Биохимия**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

**на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:**

**доктор биологических наук, чл.-корр. РАН Жарков Д. О.**

**Новосибирск — 2023**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ .....	4
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
2.1. Репарация ДНК .....	8
2.2. Распространенные повреждения, узнаваемые ДНК-гликозилазами .....	10
2.2.1. Урацил и другие продукты дезаминирования оснований ДНК .....	11
2.2.2. Апурин-апиримидиновые сайты .....	12
2.2.3. Окислительные повреждения .....	12
2.3. ДНК-гликозилазы .....	15
2.3.1. Суперсемейство «спираль — два поворота — спираль» (H2TH).....	16
2.3.2. Суперсемейство урацил-ДНК-гликозилазы .....	25
2.4. Урацил-ДНК-гликозилазы вирусов .....	29
2.4.1. Урацил-ДНК-гликозилазы поксвирусов .....	30
2.5. Механизмы процессивности ДНК-зависимых белков.....	39
2.5.1. Методы исследования процессивности .....	42
2.5.2. Механизмы поиска мишеней ДНК-гликозилазами .....	46
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	51
3.1. Общие материалы.....	51
3.1.1. Стандартные буферы и смеси .....	51
3.1.2. Ферменты .....	51
3.1.3. Плазмиды и бактериальные штаммы .....	52
3.1.4. Олигодезоксирибонуклеотиды .....	52
3.2. Методы .....	55
3.2.1. Выделение <i>Nei</i> <i>E. coli</i> .....	55
3.2.2. Определение кинетических параметров реакции <i>Nei</i> , <i>NEIL1</i> и <i>NEIL2</i> .....	55
3.2.3. Получение олигонуклеотидных субстратов для изучения коррелированного расщепления.....	56
3.2.4. Изучение коррелированного расщепления субстратов ферментами <i>Nei</i> , <i>NEIL1</i> и <i>NEIL2</i> .....	58
3.2.5. Компьютерный анализ и анализ поверхностного заряда белков <i>Nei</i> <i>E. coli</i> и <i>NEIL1</i> человека.....	59
3.2.6. Клонирование гена <i>D4R</i> в экспрессионный вектор и выделение <i>vvUNG</i> .....	59
3.2.7. Определение кинетических параметров реакции <i>vvUNG</i> .....	60
3.2.8. Определение сродства <i>vvUNG</i> к ДНК методом микромасштабного термофореза..	61
3.2.9. Изучение влияния на коррелированное расщепление <i>vvUNG</i> концентрации катионов, брешей разной длины, расстояния между сайтами.....	61

3.2.10.	Определение вероятности удаления поврежденного основания $P_E$ методом остановленной струи .....	61
3.2.11.	Моделирование одномерного блуждания $vvUNG$ по ДНК .....	62
3.2.12.	Изучение влияния ингибиторов на активность $vvUNG$ .....	63
3.2.13.	Изучение влияния ингибиторов на процессивность $vvUNG$ .....	63
3.2.14.	Изучение коррелированного расщепления <i>Ung E. coli</i> в присутствии ковалентного аддукта и нековалентных лигандов малой и большой бороздок ДНК .....	63
4.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	65
4.1.	Механизмы поиска повреждений ферментами суперсемейства H2TH .....	65
4.1.1.	Стационарная кинетика <i>Nei</i> , <i>NEIL1</i> и <i>NEIL2</i> на субстратах с одиночным повреждением .....	66
4.1.2.	Коррелированное расщепление субстратов в присутствии катионов .....	66
4.1.3.	Зависимость $P_{cc}$ от расстояния между повреждениями .....	68
4.1.4.	Процессивность <i>NEIL2</i> на ДНК-субстратах разной структуры .....	69
4.1.5.	Структурно-функциональная интерпретация наблюдаемых различий в механизмах поиска белками H2TH .....	70
4.2.	Процессивный поиск мишеней в присутствии объемных аддуктов и ДНК-связывающих лигандов <i>Ung E. coli</i> .....	74
4.2.1.	Влияние ковалентного аддукта на коррелированный поиск <i>Ung</i> .....	74
4.2.2.	Влияние нековалентных лигандов на коррелированный поиск <i>Ung</i> .....	76
4.3.	Процессивность <i>UNG</i> вируса осповакцины .....	79
4.3.1.	Механизм поиска мишеней $vvUNG$ .....	80
4.3.2.	Связывание $vvUNG$ с поврежденной и неповрежденной ДНК .....	82
4.3.3.	Зависимость $P_{cc}$ от расстояния между повреждениями .....	83
4.3.4.	Определение вероятности выщепления $P_E$ для $vvUNG$ .....	84
4.3.5.	Моделирование одномерного блуждания .....	85
4.3.6.	Оценка вклада процессивности $vvUNG$ в процессивность репликативного комплекса осповакцины .....	87
4.3.7.	$vvUNG$ как мишень для противовирусной терапии .....	89
5.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	96
6.	ВЫВОДЫ .....	98
7.	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	99
8.	СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	101
9.	ПРИЛОЖЕНИЯ .....	123

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Вопрос о механизмах поиска мишеней белками, специфичными к определенным последовательностям или структурным элементам ДНК впервые был поставлен более 50 лет назад, однако по сей день остается открытым. В классической серии работ Берга, Винтера и фон Гиппеля 1981 г. было предложено различать две группы таких механизмов, не требующих затрат энергии: процессивный поиск, при котором белок связывается с ДНК в произвольном месте и ищет мишень в режиме одномерной диффузии по контуру ДНК, и дистрибутивный поиск, который происходит в трех измерениях без движения по ДНК. Максимальная скорость поиска достигается при оптимальном сочетании вклада процессивных и дистрибутивных механизмов. На относительную эффективность этих механизмов оказывают влияние многие факторы окружения белка: ионная сила, связывание с ДНК низкомолекулярных соединений и других белков, краудинг-эффект и т. п.

Модель одномерной диффузии, первоначально разработанная для факторов транскрипции и других белков, специфичных к последовательности ДНК, была вскоре адаптирована для ферментов репарации ДНК, узнающих поврежденные нуклеотиды. За прошедшие годы механизмы поиска были изучены для ряда ферментов систем эксцизионной репарации оснований, эксцизионной репарации нуклеотидов, мисматч-репарации, рекомбинационной репарации и фотореактивации. В последнее время прогрессу таких работ способствует развитие одномолекулярных методов исследования, в частности, флуоресцентной микроскопии единичных молекул и атомно-силовой микроскопии. Параллельно с этим появляются новые методы в рамках традиционной ферментативной кинетики и теоретические модели, позволяющие изучать разные механизмы поиска мишеней.

К числу основных ферментов системы эксцизионной репарации оснований принадлежат ДНК-гликозилазы — ферменты, узнающие поврежденные основания и гидролизующие *N*-гликозидную связь между основанием и остатком дезоксирибозы. В геномах всех живых организмов, в том числе некоторых вирусов, закодировано несколько ДНК-гликозилаз. Эти ферменты отличаются специфичностью к определенным типам повреждений: некоторые из них узнают окисленные пуриновые основания, другие — окисленные пиримидины, либо дезаминированные основания, либо алкилированные основания и т. п. Для некоторых ДНК-гликозилаз механизмы поиска повреждений изучены достаточно хорошо, в то время как другие остаются в этом отношении малоисследованными. Так, из числа ДНК-гликозилаз, принадлежащих к структурному суперсемейству «спираль — два поворота — спираль» (H2TH), основная часть работ по механизмам поиска выполнена на формамидопиримидин-ДНК-гликозилазе (Fpg) *Escherichia coli* и *Geobacillus stearothermophilus*, однако другие ферменты из этой группы, заметно отличающиеся от Fpg по своей специфичности — эндонуклеаза VIII (Nei)

бактерий и ее эукариотические гомологи NEIL1 и NEIL2 — практически не исследовались. Даже для более тщательно изученных ДНК-гликозилаз — например, урацил-ДНК-гликозилазы *E. coli* (Ung), принадлежащей к структурному суперсемейству  $\alpha/\beta$ -укладка — остаются открытыми многие вопросы, связанные с характером их передвижения по ДНК и взаимодействия с другими молекулами. В особенности это касается белков из тех видов, которые важны с практической точки зрения (патогенные или биотехнологически ценные), но не входят в узкий круг модельных организмов. Например, считается, что урацил-ДНК-гликозилаза вируса осповакцины (vvUNG), помимо участия в репарации, играет роль процессивной субъединицы вирусного репликативного комплекса, что дает уникальный пример фактора процессивности, отличного от белков-«зажимов» DnaN/PCNA, однако собственная процессивность этого фермента никогда не изучалась.

**Цель** настоящей работы заключается в изучении механизмов поиска мишеней некоторыми ферментами эксцизионной репарации оснований: эндонуклеазами VIII *E. coli*, NEIL1 и NEIL2 мыши, урацил-ДНК-гликозилазами *E. coli* и вируса осповакцины. Эта цель подразумевает решение нескольких **задач**:

1. Изучить эффективность процессивного поиска повреждений ферментами суперсемейства H2TH — Nei *E. coli*, NEIL1 и NEIL2 мыши: оценить влияние моно- и дивалентных ионов металлов, расстояния между повреждениями и структуры субстрата на процессивные свойства ферментов.
2. Изучить влияние ковалентных аддуктов ДНК, а также нековалентных лигандов малой и большой бороздки на процессивность фермента Ung *E. coli*.
3. Изучить собственную процессивность фермента vvUNG, выполняющего роль субъединицы фактора процессивности репликативного комплекса вируса: оценить эффективность коррелированного расщепления в присутствии моно- и дивалентных ионов металлов, препятствий в виде разрывов, брешей и аддуктов в ДНК, определить зависимость эффективности транслокации от расстояния между повреждениями, и на основе этого с использованием модели случайных блужданий получить микроскопические параметры поиска повреждений.
4. Провести поиск соединений, способных ингибировать активность vvUNG и подавлять ее процессивность.

#### **Научная новизна работы**

Соискателем впервые показано, что даже для гомологичных белков, принадлежащих к одному суперсемейству ДНК-гликозилаз H2TH, механизмы поиска повреждений могут значительно отличаться, что, скорее всего, связано с отличиями в клеточных функциях этих ферментов. Также впервые для фермента Ung *E. coli* изучено влияние на процессивный поиск

ковалентных аддуктов в ДНК и связанных с ДНК нековалентных лигандов. Охарактеризована собственная процессивность  $\nu\nu$ UNG — ключевого компонента вирусного репликативного комплекса, найдены низкомолекулярные соединения, способные подавлять активность и процессивность этого фермента.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Результаты работы имеют фундаментальное значение для понимания механизмов поиска повреждений ДНК-гликозилазами и механизмов эксцизионной репарации оснований ДНК в целом, а также для характеристики свойств репликативного комплекса вирусов семейства *Rovviridae*. Обнаруженные ингибиторы UNG потенциально могут стать основой терапевтических средств против инфекций, вызванных ортопоксвирусами, в частности, таких опасных для человека заболеваний, как натуральная оспа и оспа обезьян.

### **Методология и методы исследования**

В работе применялись методы генной инженерии, продукции и выделения рекомбинантных белков, стандартные методы стационарной ферментативной кинетики и метод остановленной струи, микромасштабного термофореза, также применялись компьютерные методы исследования биополимеров. Для изучения механизмов поиска мишеней ферментами репарации в работе был использован биохимический метод, разработанный в лаборатории, где выполнялось исследование. Метод основан на измерении вероятности коррелированного расщепления (probability of correlated cleavage,  $P_{cc}$ ) олигонуклеотидных субстратов, содержащих два повреждения.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. ДНК-гликозилазы, относящиеся к суперсемейству H2TH, значительно отличаются друг от друга по способности вести процессивный поиск повреждений в ДНК.
2. Эффективность транслокации урацил-ДНК-гликозилаз вдоль двуцепочечной ДНК снижается при наличии ковалентного аддукта в большой бороздке, но эти ферменты могут преодолевать другие препятствия, такие как разрывы, нековалентно связанные лиганды малой и большой бороздки.
3. Фермент UNG вируса осповакцины осуществляет высокоэффективный процессивный поиск мишеней в ДНК, что подтверждает его роль как фактора процессивности репликативного комплекса вируса осповакцины.
4. Соединения класса тетрагидро-2,4,6-триоксопиримидинилиденов способны ингибировать активность и подавлять процессивность  $\nu\nu$ UNG.

### **Личный вклад соискателя**

Все эксперименты и их анализ выполнены лично соискателем. Моделирование одномерного блуждания белка по ДНК выполнено В. Д. Жарковым (Томский государственный

университет) и Н. А. Торгашевой (ИХБФМ СО РАН). Докинг низкомолекулярных соединений с UNG выполнен к. х. н. Г. Г. Чиловым (ИОХ РАН).

**Степень достоверности и апробация результатов.** Основные положения работы представлены на 7 российских и международных конференциях: Всероссийский симпозиум «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015), международная конференция «Химическая биология», посвященная 90-летию академика Д. Г. Кнорре (Новосибирск, 2016), международная конференция «The 6<sup>th</sup> US-EU Conference on Repair of Endogenous DNA Damage» (Удине, Италия, 2017), международная конференция «BGRS\SB'2018: 11<sup>th</sup> International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology» (Новосибирск, 2018), международная конференция «The 43<sup>rd</sup> FEBS Congress» (Прага, Чехия, 2018), международная конференция «EEMS 2019: 47<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society» (Ренн, Франция, 2019), 3-й Российский микробиологический конгресс (Псков, 2021).

По материалам диссертации опубликовано 3 научные статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, приложения и списка цитированной литературы. Работа изложена на 125 страницах, содержит 49 рисунков, 11 таблиц и 1 приложение. Библиография включает 262 литературных источника.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1. *Репарация ДНК*

Генетический материал клетки постоянно подвергается воздействию экзогенных и эндогенных повреждающих факторов. Во всех живых системах существуют механизмы, исправляющие повреждения — системы репарации ДНК. Описано 6 основных путей репарации: реактивация, мисматч-репарация, гомологичная рекомбинация, воссоединение негомологичных концов, эксцизионная репарация нуклеотидов и эксцизионная репарация оснований.

Первым был открыт механизм реактивации, когда фермент исправляет повреждение без расщепления цепи ДНК [1]. В частности, при фотореактивации циклобутановых димеров происходит катализируемое квантом света химическое расщепление ковалентных связей между основаниями димера с восстановлением исходной структуры. Также без расщепления осуществляется прямое деметилирование алкилированных оснований алкилтрансферазами или окислительными деметилазами.

ДНК-полимеразы с разной частотой могут ошибаться, из-за чего образуются неканонические пары оснований, искажающие структуру двойной спирали ДНК. Для таких ошибок в клетках есть система мисматч-репарации. Белки этой системы распознают изменения структуры ДНК и удаляют содержащий повреждение фрагмент длиной до нескольких сотен дезоксинуклеотидов. Благодаря наличию специальных механизмов распознавания материнской и дочерней цепи (в частности, у прокариот материнская цепь метилирована по аденину в GATC-островках, в эукариотических клетках дочерняя цепь содержит разрывы — ники) система мисматч-репарации считается высокоточным инструментом для исправления ошибок ДНК-полимераз [1].

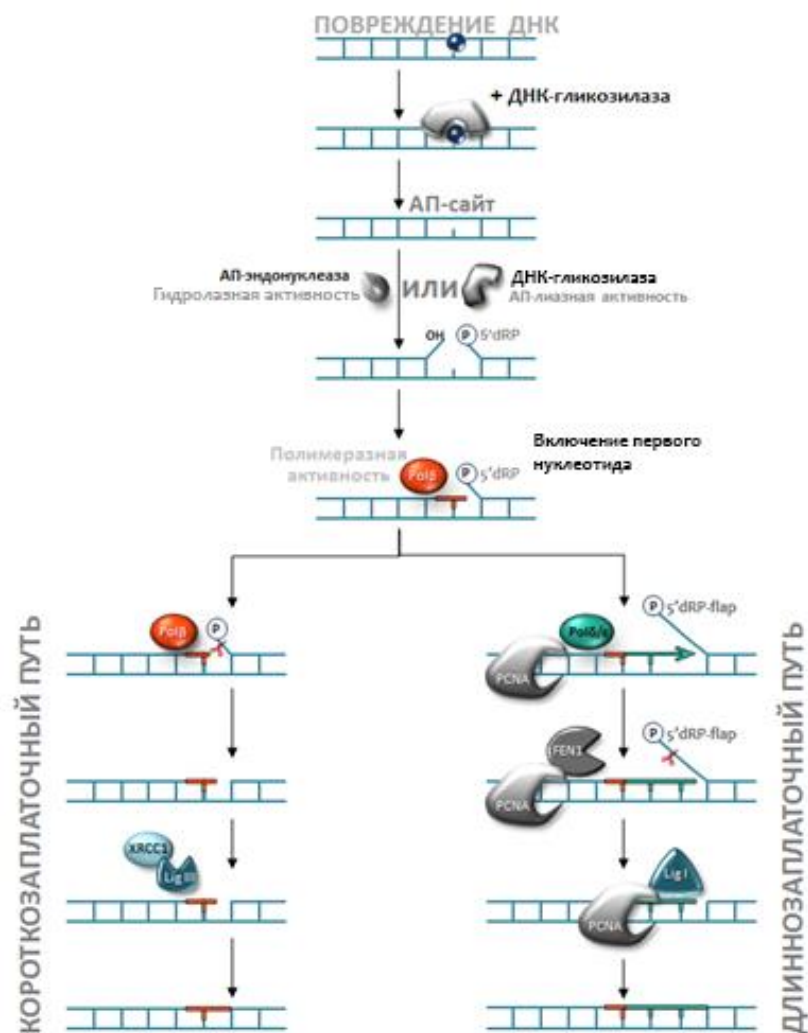
Самые опасные повреждения ДНК — двуцепочечные разрывы — репарируются системами гомологичной рекомбинации и воссоединения негомологичных концов. При этом происходит образование протяженного комплементарного участка (участка гомологии) между разорванной ДНК и ее неповрежденной копией на сестринской хроматиде или на гомологичной хромосоме, затем недостающий участок достраивается, цепи разделяются и происходит лигирование разрывов. Таким образом, генетический материал полностью восстанавливается. Если механизм гомологичной рекомбинации невозможен, негомологичные концы ДНК сшиваются с частичной потерей генетической информации, однако сохраняется жизнеспособность клетки, что крайне важно в случае таких повреждений [1].

Эксцизионная репарация нуклеотидов удаляет модификации, которые очень сильно искажают структуру ДНК, например, объемные аддукты ДНК с ксенобиотиками. В процессе эксцизионной репарации нуклеотидов происходит узнавание искаженной цепи, вырезание



участка, содержащего модификацию, репаративный синтез ДНК и лигирование разрывов. Так как этот механизм основан на узнавании искаженной структуры, а не определенного повреждения, он способен исправлять широкий спектр повреждений [1].

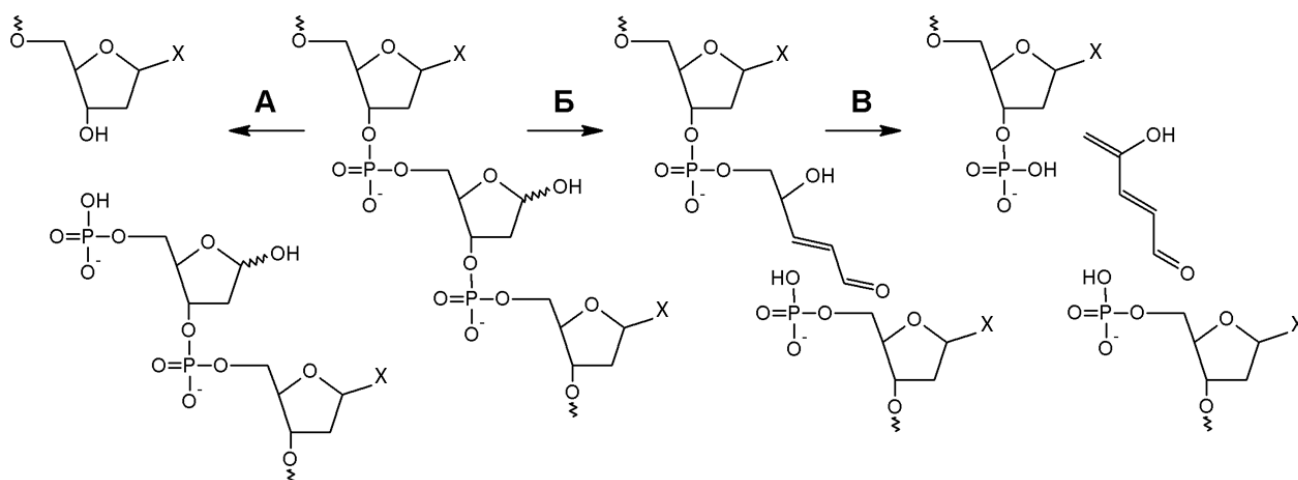
Большая часть повреждений ДНК — субстраты для ферментов системы эксцизионной репарации оснований (ЭРО) (рисунок 1).



**Рисунок 1.** Общая схема процесса эксцизионной репарации оснований у высших эукариот.

В процессе репарации на начальном этапе происходит поиск и узнавание повреждения ферментом класса ДНК-гликозилаз, которые расщепляют *N*-гликозидную связь между азотистым основанием и атомом С1' дезоксирибозы. Процесс удаления азотистого основания характерен только для ЭРО, в других системах поврежденное звено удаляется в составе одного или нескольких дезоксирибонуклеотидов. Дальнейший механизм зависит от природы ДНК-гликозилазы, которая может быть моно- или бифункциональной. Монофункциональные гликозилазы расщепляют только *N*-гликозидную связь с образованием АП-сайта. После этого фермент АП-эндонуклеаза гидролизует фосфодиэфирную связь с 5'-стороны от АП-сайта

(рисунок 2 (А)). Бифункциональные гликозилазы обладают АП-лиазной активностью, то есть сами вносят разрыв с 3'-стороны от АП-сайта по механизму  $\beta$ -элиминирования (рисунок 2 (Б)). Некоторые бифункциональные гликозилазы могут катализировать реакцию  $\delta$ -элиминирования, при этом образуется однонуклеозидная брешь (рисунок 2 (В)). Остаток дезоксирибозы, образовавшийся в результате  $\beta$ -элиминирования, удаляется за счет фосфодиэстеразной активности АП-эндонуклеазы, тогда как 3'-фосфатные группы — результат  $\beta$ ,  $\delta$ -элиминирования — удаляются АП-эндонуклеазой у *E. coli* и полинуклеотидкиназой у человека. Таким образом, на данном этапе появляется одноцепочечный разрыв, содержащий на 3'-конце ОН-группу, а на 5'-конце — 2'-дезоксирibo-5'-фосфат (dRP) или 5'-фосфат [2].



**Рисунок 2.** Расщепление ДНК по АП-сайту АП-эндонуклеазами (А) и бифункциональными гликозилазами в ходе реакции  $\beta$ -элиминирования (Б) и  $\beta$ ,  $\delta$ -элиминирования (В). X — азотистое основание.

Для завершения репарации необходимо включить недостающий dNMP и лигировать одноцепочечный разрыв. 3'-ОН группа служит праймером для ДНК-полимеразы. В случае короткозаплаточной репарации ДНК-полимераза (Pol I у прокариот и POL $\beta$  у эукариот) включает один dNMP, а 5'-dRP удаляет за счет своей dRP-лиазной активности. Затем одноцепочечный разрыв лигируется ДНК-лигазой (LigA у прокариот и LIG III в комплексе с XRCC1 у эукариот). По длиннозаплаточному пути происходит вытеснение или деградация цепи на 2–20 нуклеотидов. У прокариот удаление свисающего одноцепочечного участка и достраивание цепи также осуществляет Pol I, затем LigA лигирует разрыв. У эукариот этот процесс осуществляют ферменты ДНК-полимераза  $\delta$ ,  $\epsilon$  или  $\beta$ , эндонуклеаза FEN1, а также факторы PCNA, RFC и RPA, одноцепочечный разрыв сшивает ДНК-лигаза I [1–3].

## 2.2. Распространенные повреждения, узнаваемые ДНК-гликозилазами

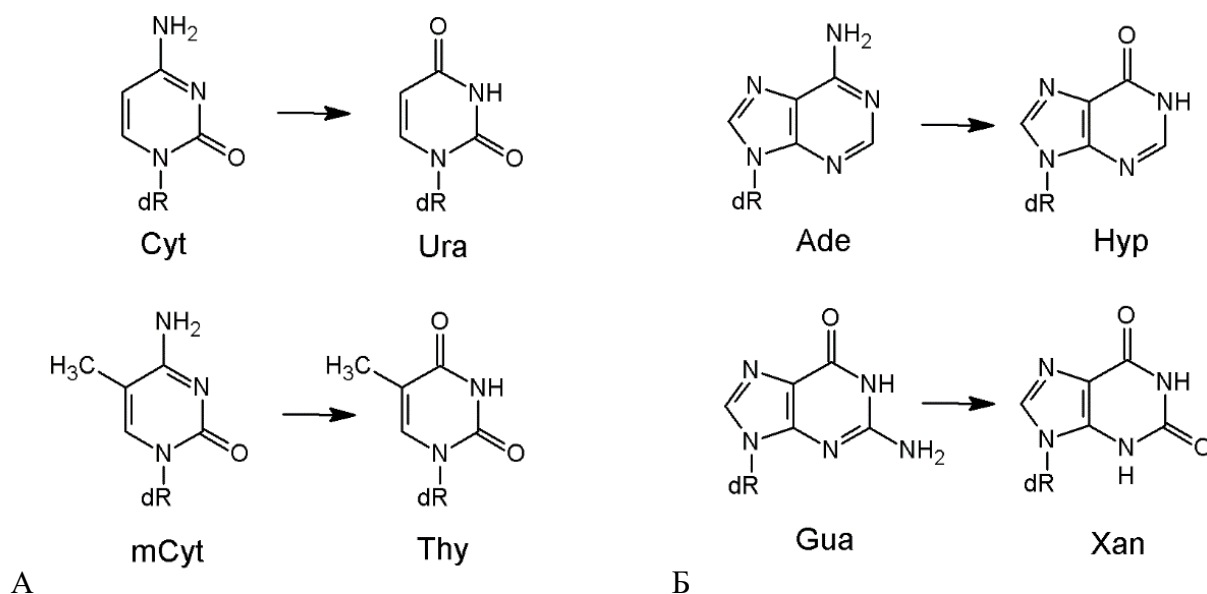
Повреждения, репарируемые системой ЭРО, возникают спонтанно (т. е. образуются под воздействием эндогенных реакционноспособных соединений) или вследствие повреждающего действия факторов окружающей среды (ионизирующее и УФ-излучение, сильные химические

реагенты, ксенобиотики). К основным повреждениям относятся апурин-апириимидиновые сайты (АП-сайты), дезаминированные, окисленные и алкилированные азотистые основания, а также возникающие в процессе репликации неканонические пары.

Последствия от таких повреждений различны: некоторые приводят к закреплению в геноме различных мутаций, а такие, как разрывы цепей ДНК или фотоаддукты, ведут к нарушению важнейших внутриклеточных процессов и гибели клеток.

### 2.2.1. Урацил и другие продукты дезаминирования оснований ДНК

Урацил (Ura) — основание РНК, которое в норме в ДНК не содержится. Однако Ura может возникать в ДНК при дезаминировании цитозина (Cyt) (рисунок 3) [4, 5]. В каждой клетке человека за счет спонтанного дезаминирования ежедневно образуется около 100 оснований Ura [6]. Помимо спонтанного процесса, дезаминирование Cyt может быть вызвано химическим воздействием, например, обработкой ДНК  $\text{HNO}_2$  (в одноцепочечной и в двуцепочечной ДНК) или  $\text{HSO}_3^-$  (в одноцепочечной ДНК). Еще один путь появления Ura в ДНК — включение dUMP при репликации, поскольку некоторое количество dUTP, образующегося в метаболическом пути синтеза тиминовых нуклеотидов, всегда присутствует в клетке. Исследование штаммов *E. coli*, дефицитных по ферментам репарации урацила, показывает, что в среднем на каждые 2–3 тысячи нуклеотидов включается один остаток dUMP [7].



**Рисунок 3.** Продукты дезаминирования пиримидиновых (А) и пуриновых (Б) оснований ДНК. Ura — урацил, mCyt — 5-метилцитозин, Xan — ксантин, Hyp — гипоксантин, dR — остаток дезоксирибозы в сахарофосфатном остове ДНК.

Из-за химического сходства с тимидином, дезоксиуридин вызывает включение полимеразой в дочернюю цепь ДНК dAMP вместо dGMP, в результате чего происходит

транзиция G:C → A:T [8]. Репарация Uга проходит по пути ЭРО с участием урацил-ДНК-гликозилаз.

### 2.2.2. Апурин-апиримидиновые сайты

Апурин-апиримидиновые сайты (АП-сайты) образуются при расщеплении *N*-гликозидной связи дезоксинуклеотидов. Этот процесс происходит в ДНК и реже в РНК, и может проявляться как при повышенной кислотности среды, так и при физиологических значениях рН и температуры [9]. Реакция гидролиза *N*-гликозидной связи начинается с протонирования азотистого основания, причем апуринизация происходит на 1–2 порядка быстрее, чем потеря пиримидиновых оснований. В каждый момент времени в клетках млекопитающих количество АП-сайтов составляет 5–20/10<sup>6</sup> нт [10] и значительно увеличивается при генотоксическом стрессе. Помимо спонтанного гидролиза, АП-сайты образуются как промежуточные продукты ферментативных реакций ДНК-гликозилаз (разд. 2.3), в частности, значительный вклад в образование АП-сайтов вносит урацил-ДНК-гликозилаза.

АП-сайты — крайне нестабильные структуры. Очень быстро под действием повышенной температуры, нуклеофильных и основных реагентов и ионов Mg<sup>2+</sup> на их месте образуются одноцепочечные разрывы. При отсутствии стимулирующих факторов период полуразрушения АП-сайта оценивается в несколько дней [11, 12]. По этой причине АП-сайты не вводят в синтетическую ДНК, для лабораторных исследований используют структуры, химически или ферментативно преобразуемые в АП-сайт. Обычно в олигонуклеотид вводят dUrd с последующей обработкой урацил-ДНК-гликозилазой, а также широко используются стабильные неальдегидные аналоги АП-сайтов, самый распространенный из которых — (3-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)метилфосфат (ТНФ) [13].

АП-сайты в ДНК *in vitro* крайне мутагенны, они блокируют работу большинства репликативных и репаративных ДНК-полимераз, которые либо высвобождают ДНК, либо включают напротив АП-сайта dAMP с образованием наиболее термодинамически стабильной пары АП:dAdo [14]. Транслезионные ДНК-полимеразы способны преодолевать АП-сайты более эффективно, однако этот процесс также приносит большое количество мутаций [15].

### 2.2.3. Окислительные повреждения

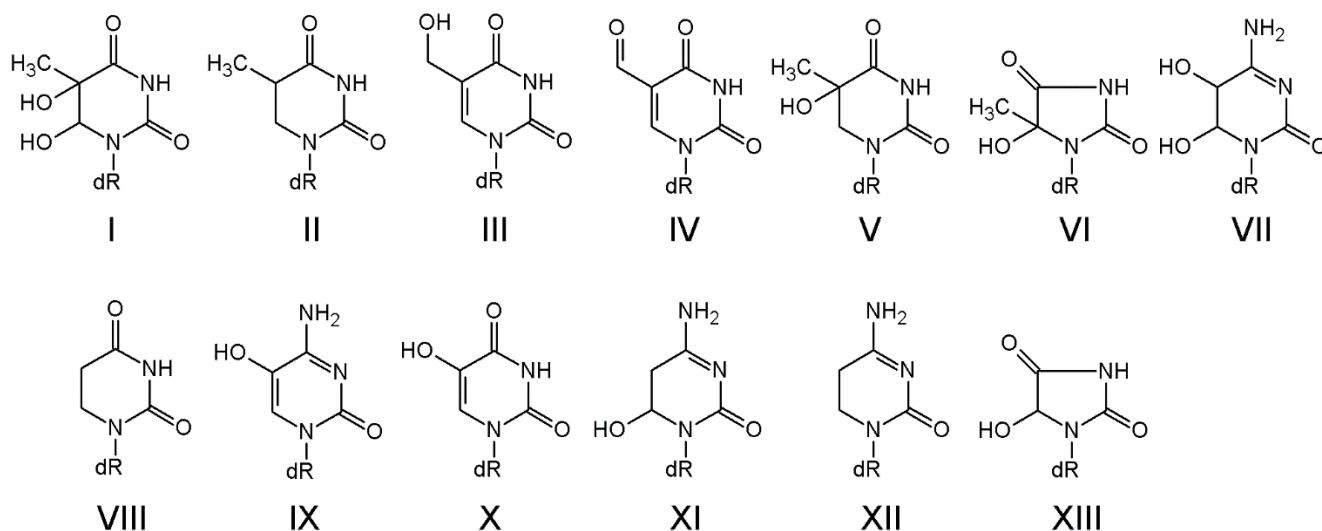
Крайне значимыми повреждениями считаются продукты взаимодействия азотистых оснований с окислительными реагентами — с активными формами кислорода (АФК). К ним относят супероксид-анион-радикал, пероксид водорода и гидроксильный радикал, а также «синглетный кислород» — молекула, в которой атомы кислорода находятся в возбужденном состоянии [16]. В клетках АФК образуются преимущественно в дыхательной цепи митохондрий

и в фотосистеме I растений. Экзогенные источники — ионизирующее излучение, ионы переходных металлов, токсины, фотосенсибилизирующие красители.

Основания могут окисляться не только в составе ДНК, но и еще до репликации в составе моно-, ди- и трифосфатов нуклеозидов [17]. В результате окисления сахарофосфатного остова образуются окисленные АП-сайты [18], напротив которых репликативные полимеразы вставляют dAMP, транслезионные — любой из dNMP. Обе ситуации ведут к образованию мутаций в геноме. Другие окислительные повреждения АП-сайта приводят к разрывам ДНК, образованию ДНК-белковых сшивок, что приводит к серьезным нарушениям внутриклеточных процессов.

### 2.2.3.1 Окислительные повреждения пиримидиновых оснований

К самым распространенным окислительным повреждениям пиримидинов принадлежат продукты окисления тимина — тимингликоль (Tg), 5-гидроксиметилурацил (hmUra), 5-формилурацил, 5-гидрокси-5,6-дигидротимин и 5-гидрокси-5-метилгидантоин, и продукты окисления цитозина — цитозингликоль, 5-гидроксицитозин, 5-гидроксиурацил (5-OH-Ura), 6-гидрокси-5,6-дигидроцитозин, 5,6-дигидроксицитозин и 5-гидроксигидантоин (рисунок 4) [19, 20]. 5,6-дигидроурацил (H<sub>2</sub>Ura), 5,6-дигидротимин и 5,6-дигидроцитозин — восстановленные азотистые основания, их тоже относят к окислительным повреждениям, так как они образуются вследствие радиолиза воды.



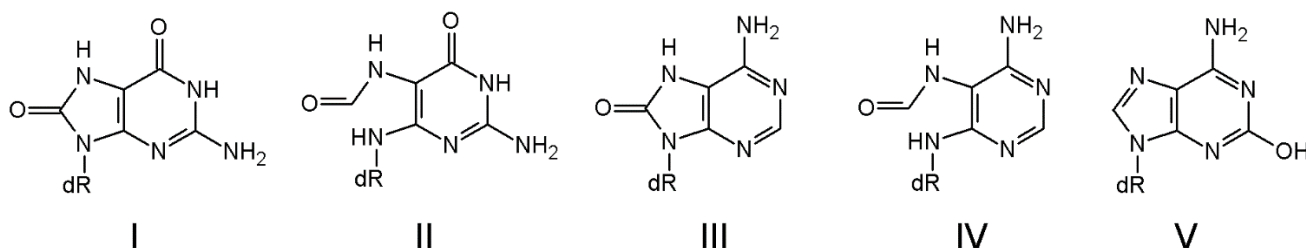
**Рисунок 4.** Окислительные повреждения пиримидиновых оснований: тимингликоль (Tg) (I), 5,6-дигидротимин (H<sub>2</sub>Thy) (II), 5-гидроксиметилурацил (hmUra) (III), 5-формилурацил (IV), 5-гидрокси-6-гидротимин (V), 5-гидрокси-5-метилгидантоин (VI), цитозингликоль (VII), 5,6-дигидроурацил (H<sub>2</sub>Ura) (VIII), 5-гидроксицитозин (IX), 5-гидроксиурацил (5-OH-Ura) (X), 6-гидрокси-5,6-дигидроцитозин (XI), 5,6-дигидроцитозин (XII), 5-гидроксигидантоин (XIII).

В процессе радиолиза наряду с образованием окисляющих радикалов HO• и O• образуются и восстановители (например, атомарный водород H• и сольватированный электрон) [21, 22].

Последствия этих повреждений для клетки довольно разнообразны. Репликативные полимеразы, встречая 5-гидроксипиримидины в матричной цепи, либо блокируются, либо вставляют dNMP в зависимости от окружения (напротив 5-гидроксиурацила могут включаться dAMP и dCMP, а напротив 5-гидроксицитозина — dGMP, dAMP и dCMP) [23]. Транслезионные полимеразы преимущественно вставляют dGMP, что существенно понижает мутагенность этих повреждений. Трифосфаты окисленных пиримидинов могут включаться полимеразой в новосинтезируемую цепь, что в некоторых случаях приводит к появлению мутаций.

### 2.2.3.2 Окислительные повреждения пуриновых оснований

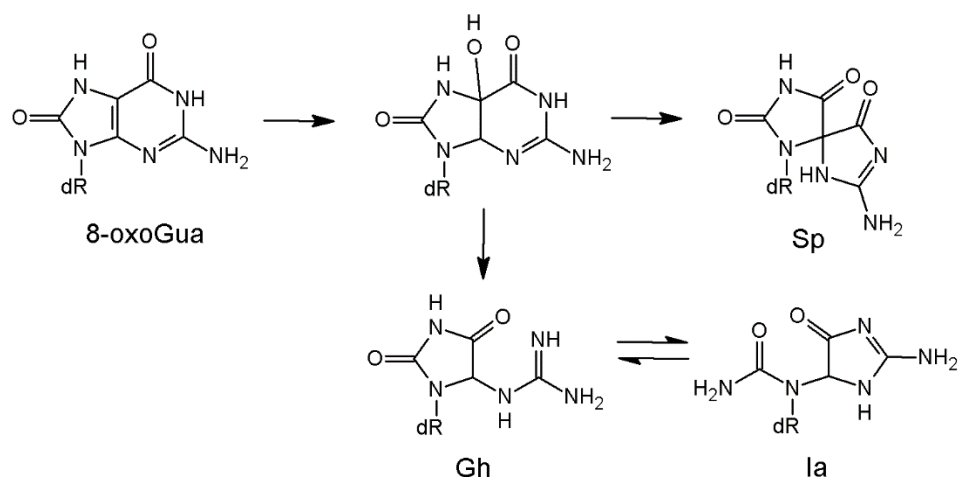
Под действием радикала OH• на гуанин по атому C8 образуется самое распространенное окислительное повреждение в ДНК — 8-оксогуанин (8-охоGua). При восстановлении гидроксильного интермедиата образуется 2,6-диамино-4-оксо-5-формапидопиримидин (FapyGua) (рисунок 5). Аналогичные продукты образуются и при окислении аденина. Также при воздействии ионизирующего излучения и ряда оксидантов в клеточной ДНК выявляется 2-гидроксиаденин.



**Рисунок 5.** Окислительные повреждения пуриновых оснований. 8-оксогуанин (8-охоGua) (I), 2,6-диамино-4-оксо-5-формапидопиримидин (FapyGua) (II), 8-оксоаденин (8-охоA) (III), 4,6-диамино-5-формапидопиримидин (FapyAde) (IV), 2-гидроксиаденин (V).

Часто на окислении основания процесс образования повреждения не завершается. Насыщенный пиримидиновый цикл может подвергаться, например, фрагментации с образованием метилтартронилмочевины, 5-гидроксигидантоина, мочевины, либо преобразоваться в 5-гидрокситимин и 6-гидрокси-5,6-дигидротимин. Кроме того, 8-охоGua может быть подвержен дальнейшему окислению, за счет чего образуются спироиминодигидантоин (Sp), гуанидиногидантоин (Gh) и иминоаллантоин (Ia) [24] (рисунок 6).

При репликации напротив 8-охоGua полимеразы могут включить как dCMP, так и dAMP, что может привести к трансверсии G:C → T:A. FapyGua также достаточно мутагенен, чаще всего напротив него возникает dAMP. Эти повреждения образуют мутации с частотой 25–30% [26].



**Рисунок 6.** Схема образования спироиминодигидантоина (Sp), гуанидинодигидантоина (Gh) и иминоаллантоина (Ia) [25].

### 2.3. ДНК-гликозилазы

В ДНК встречается множество различных поврежденных оснований, которые репарируются ЭРО с участием всего нескольких ДНК-гликозилаз, каждая из которых обладает достаточно широким спектром выщепляемых субстратов. В настоящее время выделяют 3 основных структурных суперсемейства, в которые входят большинство известных ДНК-гликозилаз *E. coli* и человека (таблица 1).

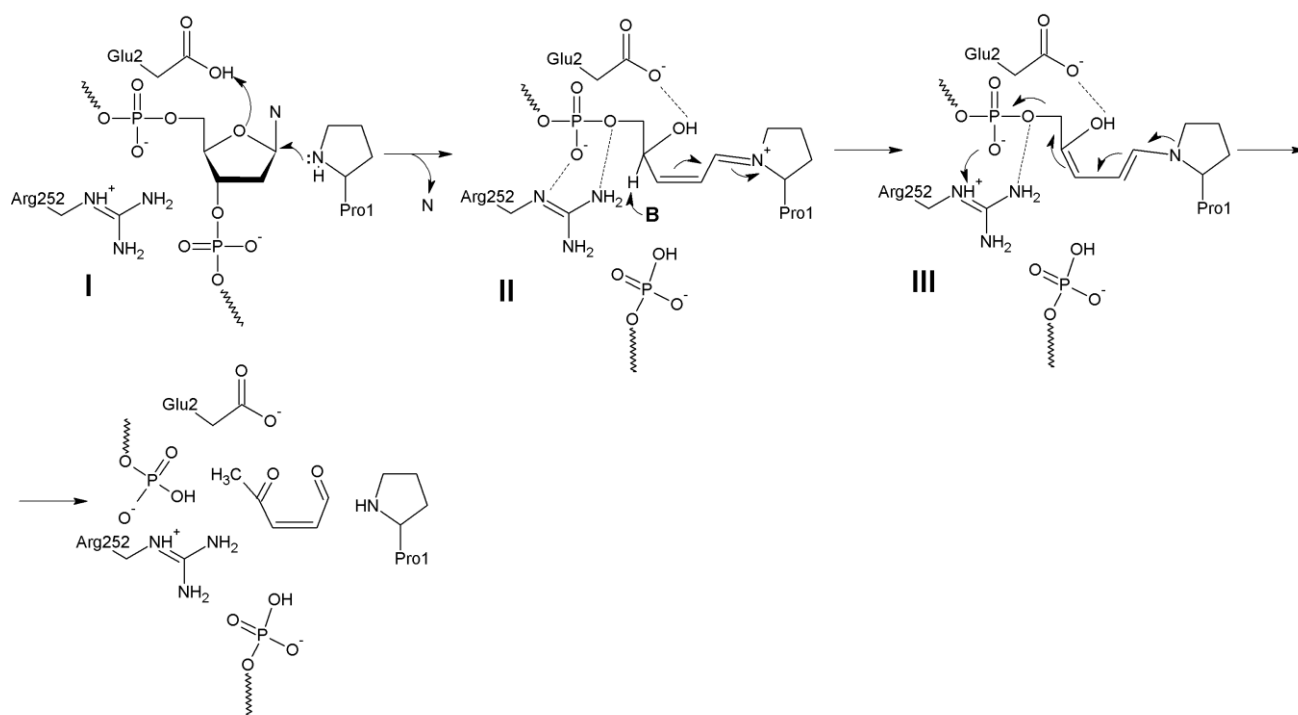
**Таблица 1.** ДНК-гликозилазы *E. coli*, человека и некоторых других видов

Структурное суперсемейство	<i>E. coli</i>	Человек	Другие организмы	Субстратная специфичность
$\alpha/\beta$ -укладка ( $\alpha/\beta$ fold)	Ung	UNG	UNG поксвирусов	Ura в любом контексте
	Mug	TDG		Thy или Ura в паре с Gua, Thy или mCyt, окисленные по 5-метильной группе
		SMUG1		Ura:Gua
Спираль — шпилька — спираль (helix — hairpin — helix)		MBD4		Ura или mCyt, окисленный по 5-метильной группе, в паре с Gua в CpG-динуклеотидах
	Nth	NTHL1		окисленные пиримидины
		OGG1		окисленные пурины
	MutY	MUTYH		Ade в паре с Gua или 8-охоGua; 2-OH-Ade
	AlkA			алкилированные пурины, Нур
			<i>Micrococcus luteus</i> Pdg <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> Mig	Циклобутановые тиминовые димеры Thy или Ura в паре с Gua
Спираль — два поворота — спираль (helix — two turn — helix)	Nei	NEIL1		окисленные пиримидины
		NEIL2		окисленные пиримидины в петлях и глазках
		NEIL3		окисленные пиримидины в оцДНК
	Fpg			окисленные пурины
			ММН растений	окисленные пурины и пиримидины
	Tag			3-метиладенин
			DenV фага T4	Циклобутановые тиминовые димеры
HEAT repeats			<i>Bacillus cereus</i> AlkC, AlkD	Алкилированные пурины, аддукты малой бороздки

### 2.3.1. Суперсемейство «спираль — два поворота — спираль» (H2TH)

В данное структурное суперсемейство включены ферменты, содержащие мотив H2TH («спираль — два поворота — спираль», Helix — 2 Turn — Helix) в С-концевом домене, который связан пептидным линкером с N-концевым доменом [27]. В суперсемейство входят прокариотические белки Fpg (**F**ormamido**P**urimidine-DNA **G**lycosylase; формаидопиримидин-ДНК-гликозилаза) и Nei (**e**Ndonuclease **E**ight; эндонуклеаза VIII), а также эукариотические NEIL1, NEIL2 и NEIL3 (NEI-Like; белки, подобные эндонуклеазе VIII)).

Ферментативная реакция осуществляется каталитическими аминокислотными остатками, расположенными на N-конце, а неспецифическое связывание и узнавание субстрата происходит с помощью С-концевых аминокислотных мотивов. Белки суперсемейства способны выщеплять различные окисленные пуриновые и пиримидиновые азотистые основания в составе ДНК [2]. По каталитическому механизму все ферменты суперсемейства относятся к бифункциональным гликозилазам, которые осуществляют реакцию  $\beta$ ,  $\delta$ -элиминирования (рисунок 7).



**Рисунок 7.** Механизм действия ДНК-гликозилаз суперсемейства H2TH [28]. Нумерация атомов приведена для Nei из *E. coli*.

#### 2.3.1.1 Прокариотические белки Fpg и Nei

В 1979 г. в клетках *E. coli* была обнаружена ДНК-гликозилаза, способная удалять производное N7-метилгуанина с раскрытым имидазольным кольцом (mFaryGua) [29], названная в последствии формаидопиримидин-ДНК-гликозилазой (Fpg). Ген белка Fpg был независимо выявлен дважды: путем скрининга активностей из геномной библиотеки *E. coli* — как *fpg* [30,



31], а также в процессе поиска мутаций, селективно увеличивающих частоту трансверсий G→T — как *mutM* [32].

Fpg — мономерный белок молекулярной массой 30,2 кДа. Фермент катализирует реакцию β, δ-элиминирования, при этом образует в месте повреждения ковалентную связь с ДНК (рисунок 7), а также обладает dRP-азной активностью [33].

Fpg эффективно удаляет повреждения из двуцепочечной ДНК, в то время как одноцепочечную ДНК фермент репарирует на несколько порядков медленнее [34]. Помимо mFaryGua, он узнает FaryGua и FaryAde из высокомолекулярной ДНК, но не 8-охоAde [35]. Fpg выщепляет большой спектр повреждений из олигонуклеотидных субстратов: 8-охоGua и его синтетические аналоги 8-оксогипоксантин и 8-оксопурин, продукты окисления 8-охоGua — спироиминогидантоин (Sp), 5-гуаниногидантоин (Gh), оксазолон и оксалутовую кислоту, окисленные производные 1,N<sup>6</sup>-этенoadенина, а также окисленные пиримидины тимингликоль (Tg), 5,6-дигидротимин (H<sub>2</sub>Thy), 5,6-дигидроурацил (H<sub>2</sub>Ura), урацилгликоль, 5-гидроксиурацил (5-OH-Ura), 5-гидроксицитозин (5-OH-Cyt), 5-гидрокси-5-метилгидантоин, формилурацил, β-уреидоизомасляную кислоту [35]. Однако Fpg не выщепляет окисленные пиримидины из высокомолекулярной ДНК, поэтому биологическая значимость этой активности неизвестна [36].

В 1994 г. в работе [37] впервые из клеток *E. coli*, дефицитных по гену эндонуклеазы III (*nth*), был получен белок, также проявляющий каталитическую активность на обработанной OsO<sub>4</sub> плазмидной ДНК. Этот белок — эндонуклеаза VIII (*Nei*) молекулярной массой 29,7 кДа. Аналогично Fpg, *Nei* обладает, помимо гликозилазной и АП-лиазной, также dRP-азной активностью, необходимой в пути ЭРО [38].

Спектр субстратов *Nei* широк, и довольно сильно перекрывается со спектром субстратов *Nth*. *Nei* способен расщеплять двуцепочечные субстраты, содержащие окисленные пиримидины Tg, H<sub>2</sub>Thy, H<sub>2</sub>Ura, 5-OH-Ura, 5-OH-Cyt, 5-гидрокси-5-метилгидантоин, 5,6-дигидроксицитозин, 5-гидрокси-6-гидротимин, 5-гидрокси-6-гидроурацил, мочевины, β-уреидоизомасляную кислоту, а также с некоторой эффективностью остатки окисленных пуринов 8-охоGua, mFaryGua, FaryAde, ксантина (Xan) и оксанина [37–39]. Однако из высокомолекулярной ДНК *Nei* удаляет только некоторые окисленные пиримидины и FaryAde, но не способен удалять 8-охоGua, FaryGua, 5-гидроксицитозин, аллоксан, 8-охоAde, 2-гидроксиаденин, 5-гидроксиметилурацил [39]. Исследования кинетических параметров *Nei* и *Nth* на один и тех же субстратах и в одинаковых условиях показали довольно большие различия [40].

При воздействии рентгеновским излучением на штаммы *E. coli*, мутантные по гену *nei*, выживаемость и уровень мутагенеза остаются в пределах нормы, но, если подвергать повреждающему воздействию двойные мутанты *nth nei*, выживаемость падает до уровня клеток, лишенных системы ЭРО [38].

Геномная ДНК клеток *E. coli fpg nth*, обработанных  $H_2O_2$ , содержит множество модифицированных оснований, таким образом, Nei самостоятельно не способен справиться с репарацией окислительных повреждений [41].

### 2.3.1.2 Эукариотические белки NEIL

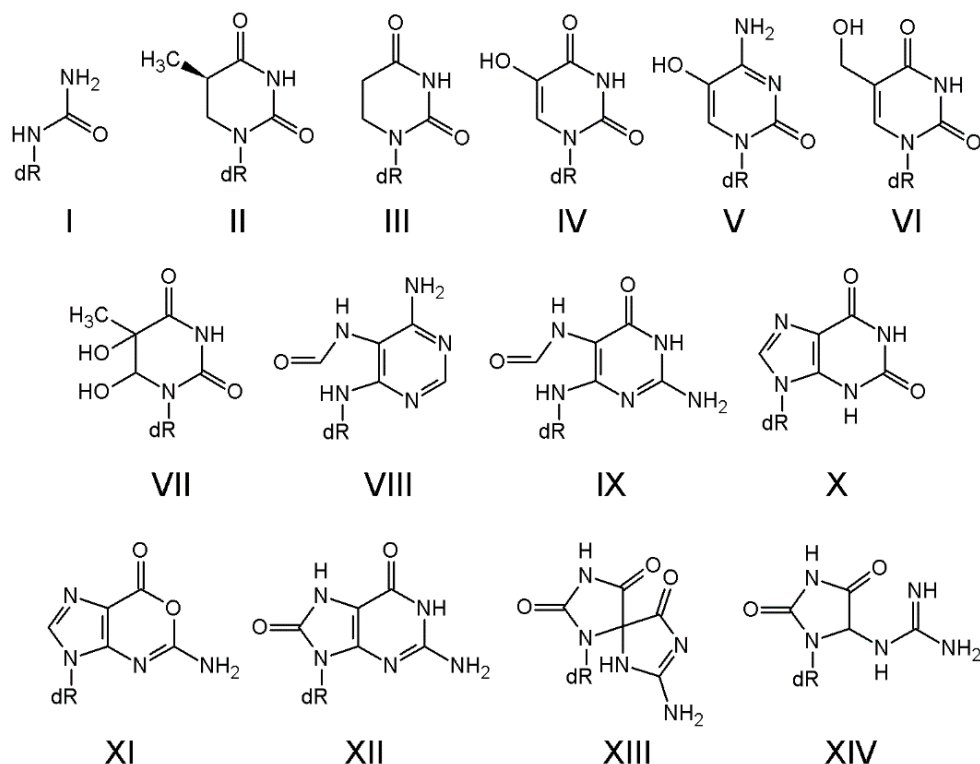
Долгое время считалось, что эукариотические клетки репарируют окислительные повреждения при помощи двух ферментов, принадлежащих к суперсемейству «спираль — шпилька — спираль»: за удаление окисленных пуринов отвечал белок OGG1 (оксогуанин-ДНК-гликозилаза), окисленные пиримидины считались субстратами NTHL1. Однако, в 2002 году, при изучении клеточных экстрактов легких и печени мышей, дефицитных по NTHL1, была выявлена ферментативная активность, выщепляющая остатки тимингликоля и мочевины из ДНК [42]. Поиском этой активности занимались параллельно 5 исследовательских групп [43–48], так были открыты три гена в геномах человека и мыши, которые кодируют очень близкие по структуре к Nei три гликозилазы, названные NEIL1, NEIL2 и NEIL3 (таблица 2). Все три белка содержат характерные для суперсемейства H2TH мотивы и каталитические аминокислотные остатки.

**Таблица 2.** Характеристики генов и белков NEIL человека (основные изоформы; по базе данных «Entrez Gene»)

Ген	Размер гена, п. н.	Число экзонов	Кодирующая область, п. н.	Хромосомное расположение	Размер белка, кДа
<i>NEIL1</i>	10077	10	1173	15q24.2	43,6
<i>NEIL2</i>	17636	5	999	8p23.1	36,7
<i>NEIL3</i>	61395	10	1818	4q34.3	67,7

Впоследствии все три гена белков NEIL были найдены у всех позвоночных, а другие гомологичные представители данного суперсемейства обнаружались также у растений и грибов [44]. Через некоторое время у мимивирусов, паразитирующих на амёбах, были найдены два фермента NEIL: один обладал высокой степенью гомологии с NEIL1, а второй — с N-концевым доменом NEIL3 и C-концевым NEIL2 [49]. В недавнем исследовании, посвященном эволюционному анализу генетических последовательностей белков NEIL позвоночных, было показано, что в целом гены белков NEIL низкоконсервативны по сравнению с генами других гликозилаз, а также, что движущий отбор играет ключевую роль в эволюции этих гликозилаз [50].

NEIL1 — самый близкий по ферментативным функциям эукариотический гомолог фермента Nei. Оптимальные условия ферментативной реакции для него осуществляются при pH 9,5 и 100–150 mM NaCl [44]. Многие субстраты бактериального белка Nei служат мишенями для NEIL1 (рисунок 8).



**Рисунок 8.** Структуры субстратов ДНК-гликозилаз Nei и NEIL: мочевина (I), H<sub>2</sub>Thy (II), H<sub>2</sub>Ura (III), 5-OH-Ura (IV), 5-OH-Cyt (V), 5-hmUra (VI), Tg (VII), FapyAde (VIII), FapyGua (IX), Xan (X), оксанин (XI), 8-охоGua (XII), Sp (XIII), Gh (XIV).

NEIL1 способен выщеплять из олигонуклеотидных субстратов как окисленные пиримидиновые, так и пуриновые основания (кроме 8-охоGua, который удаляется плохо) [44–46, 48, 51, 52], причем одни повреждения могут удаляться со скоростью до двух порядков выше, чем другие. Эффективность работы белка также зависит и от основания, стоящего напротив повреждения, например, NEIL1 способен удалять Ura и Thy в неканонических парах с Cyt [45]. В отличие от других гликозилаз, NEIL1 способен с высокой эффективностью расщеплять повреждения, находящиеся рядом с разрывами ДНК, а также тандемные повреждения, содержащие два соседних остатка H<sub>2</sub>Ura, причем с одинаковой эффективностью [53]. Преимущественно NEIL1 репарирует двуцепочечную ДНК, однако с некоторой эффективностью способен удалять повреждения из субстратов типа «глазка» и одноцепочечной ДНК [54, 55].

Хорошими мишенями для NEIL2 служат Sp, Gh, 5-OH-Cyt, Tg, 5-OH-Ura, H<sub>2</sub>Ura, H<sub>2</sub>Thy, хуже эффективность выщепления 8-охоGua [43, 56]. Предпочтительные субстраты для NEIL2 — это «глазок», «вилка» и одноцепочечная ДНК [54, 57].

Анализ субстратной специфичности NEIL3 долгое время был затруднен из-за сложности экспрессии и очистки активного белка. В работе [58] был разработан протокол очистки активных белков NEIL3 человека и мыши, и было показано, что процессинг N-концевого метионина принципиально важен для активности этих белков. Анализ субстратной специфичности показал,

что фермент NEIL3, подобно своим гомологам, удаляет широкий спектр окислительных повреждений за исключением 8-охоGua [59] (таблица 3). NEIL3 лучше всего репарирует оцДНК.

**Таблица 3.** Субстратная специфичность ферментов NEIL

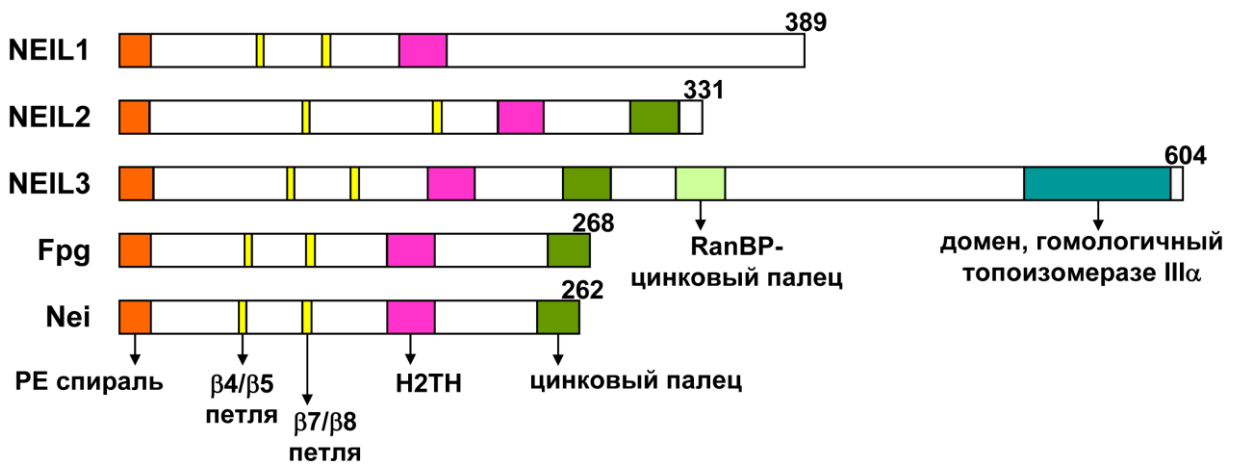
Белок	Узнаваемые повреждения	Предпочтительная структура субстрата
NEIL1	H <sub>2</sub> Ura, H <sub>2</sub> Thy, Tg, 5-OH-Cyt, 8-охоGua, 8-охоA, mFapyGua, Sp, Gh, АП-сайт, FapyGua, FapyAde	дцДНК >> «глазок», «вилка», выпетливания > оцДНК
NEIL2	5-OH-Ura, H <sub>2</sub> Thy, H <sub>2</sub> Ura, Tg, 8-охоGua, Sp, Gh, 5-OH-Cyt, АП-сайт	«глазок», «вилка», оцДНК > дцДНК
NEIL3	H <sub>2</sub> Ura, H <sub>2</sub> Thy, 5-OH-Cyt, 5-OH-Ura, АП-сайт, Sp, Gh, Tg, FapyGua, FapyAde	большой «глазок», оцДНК > маленький глазок, «вилка» >> дцДНК

Все три фермента достаточно хорошо охарактеризованы биохимически, что позволяет увидеть значительные для гомологичных ферментов различия, заключающиеся в основном в узнавании схожих повреждений в контексте ДНК разной структуры. Такие различия указывают на различающиеся роли этих ферментов в разных типах тканей или на разных этапах жизненного цикла клетки. Так, известно, что для клеток печени, где мало NTHL1, ее функции выполняет NEIL1 [60]. Также показано, что NEIL1 взаимодействует с некоторыми белками репликации, активируется в S-фазе и, вероятно, основная функция белка состоит в репарации повреждений в двуцепочечной ДНК во время репликации [43, 55, 61–64]. NEIL2 лучше всего выщепляет поврежденные основания из структуры ДНК типа «глазок» и одноцепочечной ДНК, а также непосредственно взаимодействует с РНК-полимеразой II и регулятором транскрипции HNRNPU (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-U), и, таким образом, репарирует ДНК во время транскрипции [54, 65–67]. NEIL3 специфически активен во время фазы S/G2 клеточного цикла на теломерах, а его нехватка в этот период цикла вызывает коллапс репликативной вилки и дефекты в митозе [68]. В исследованиях [69, 70] было показано, что NEIL3 (а также NEIL1 и бактериальный Nei) способны расщеплять индуцированные псораленом межцепочечные сшивки в трех- и четырехцепочечных структурах ДНК, блокирующие репликацию. При этом Nei и NEIL1 репарируют сшивки с образованием одноцепочечного разрыва, в то время как NEIL3 не образует разрывов, таким образом, с помощью NEIL-гликозилаз сложные повреждения могут удаляться без образования высокотоксичных двуцепочечных разрывов.

### 2.3.1.3 Структурные особенности белков Nei и NEIL

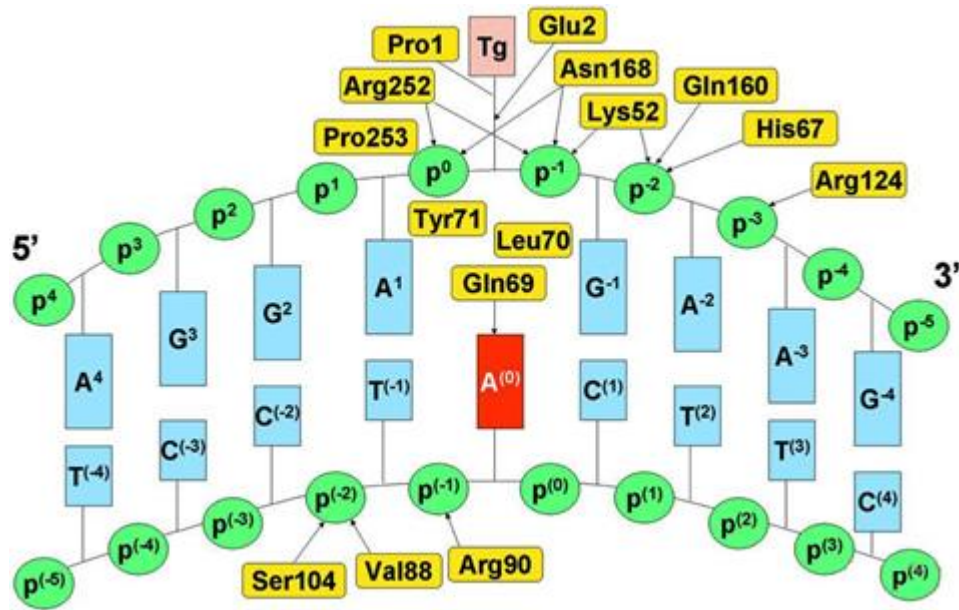
Все члены суперсемейства H2TH содержат пять консервативных элементов вторичной структуры белка (рисунок 9). Первый из них — расположенные на N-конце Pro1 и Glu2, осуществляющие нуклеофильную атаку по атому C1' в ходе гликозилазной и АП-лиазной

реакций. В работе [44] проводили сайт-направленный мутагенез Pro1 и Glu2 ферментов NEIL1 и NEIL2, что инактивировало их и доказывало важность этих остатков для осуществления катализа. У NEIL3 на месте Pro1 находится Val1, осуществляющий ту же функцию. Второй консервативный участок (петля между складками  $\beta 2$  и  $\beta 3$ ) — это остаток Lys. Известно, что в прокариотических белках он участвует в правильном связывании с субстратом [28]. Третий участок расположен в петле  $\beta 4/\beta 5$  (либо функциональные аминокислоты разделены между петлями  $\beta 4/\beta 5$  и  $\beta 7/\beta 8$ ), его аминокислотные остатки интеркалируют между цепями ДНК после выворачивания поврежденного основания. Четвертый участок характерен абсолютно для всех белков суперсемейства — это мотив H2TH, осуществляющий неспецифическое связывание с ДНК. Пятый консервативный элемент — цинковый палец типа Cys<sub>4</sub>, который контактирует с большой бороздкой ДНК. В белке NEIL1 содержится так называемый «бесцинковый палец» [44, 56], а цинковый палец NEIL2 принадлежит к типу Cys<sub>3</sub>His, но в обоих случаях структура этого элемента практически идентична структуре цинкового пальца Fpg и Nei [71].



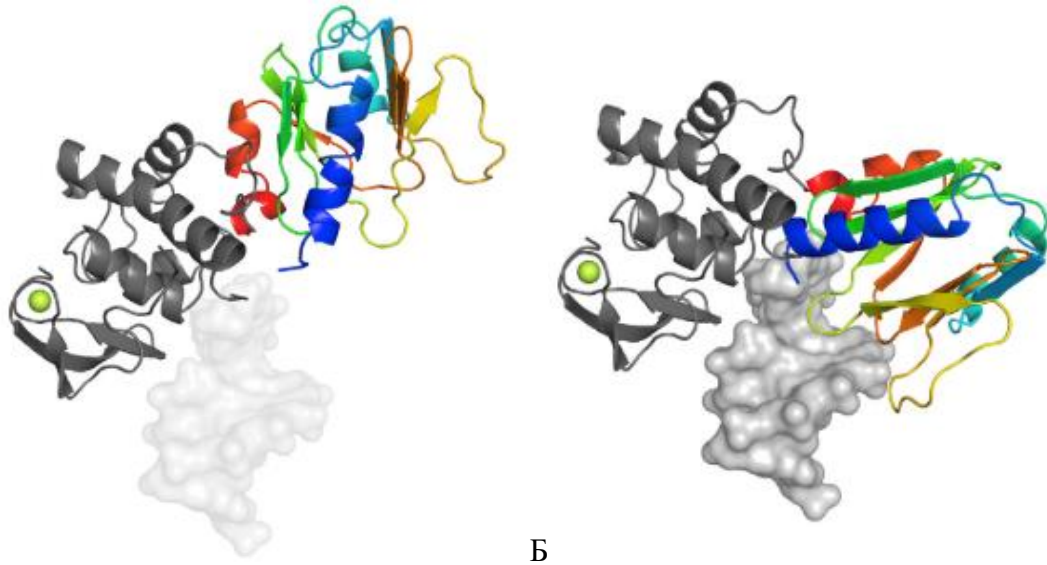
**Рисунок 9.** Схема расположения характерных структурных мотивов в ДНК-гликозилазах суперсемейства H2TH [72].

Вторичная структура Nei и параметры деформации ДНК очень схожи с таковыми для Fpg. Однако в полости, образующейся при выворачивании поврежденного звена, локализованы другие аминокислоты. В частности, остаток Gln69 в Nei образует связи со стоящим напротив повреждения нуклеотидом (рисунок 10) (в Fpg эту роль выполняет Arg108). За счет своей амидной группы он способен образовывать связи со всеми четырьмя основаниями, поэтому фермент Nei обладает низкой специфичностью к основанию, расположенному напротив (исключение составляют пары с Ade, где проявляется меньшая активность) [73].



**Рисунок 10.** Схема взаимодействия *NciI* *E. coli* с Tg в ДНК [74]. Водородные связи показаны стрелками, указывающими на соответствующие им акцепторы. Leu70, Tyr71 и Pro253 образуют ван-дер-ваальсовы контакты с соседними остатками ДНК.

Методом рентгеноструктурного анализа показана высокая подвижность N- и C-концевых доменов друг относительно друга. В свободном состоянии фермент *NciI* находится в «открытой» конформации, где каталитически активные аминокислотные остатки расположены на некотором расстоянии друг от друга (рисунок 11, А). При взаимодействии с ДНК домены поворачиваются на  $50^\circ$  от шарнирной последовательности между доменами, образуется «закрытая» конформация, при этом белок становится более компактным и аминокислоты, образующие активный центр фермента, сближаются в пространстве (рисунок 11, Б) [75].



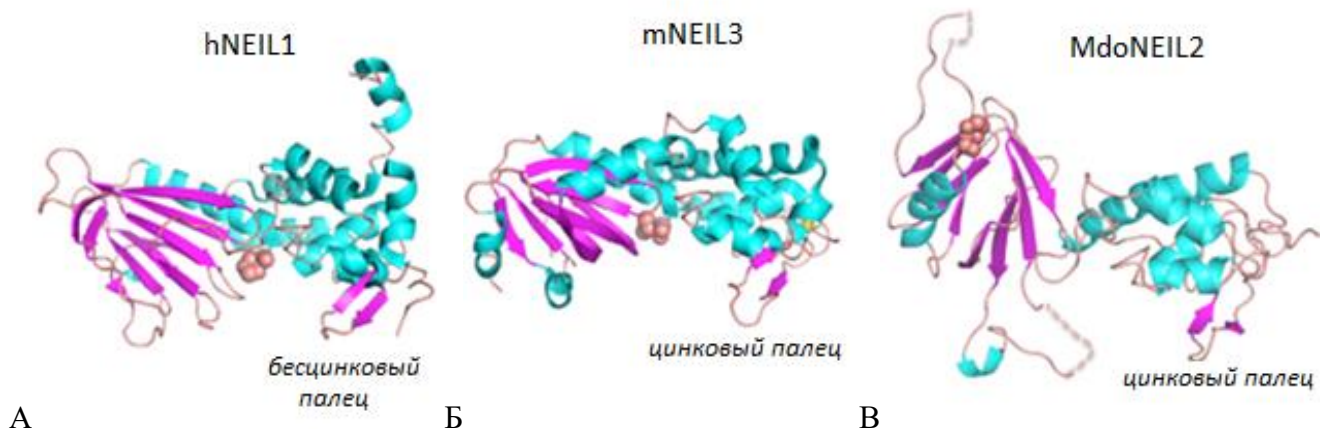
А

Б

**Рисунок 11.** Структуры ДНК-гликозилазы *NciI* *E. coli*. Открытая (А, номер структуры в базе данных PDB 1Q3B [75]) и закрытая (Б, номер в PDB 2EA0) конформации.

Методом сайт-направленного мутагенеза исследовали роль аминокислотных остатков, образующих водородные связи с сахарофосфатным остовом ДНК вблизи повреждения [73, 74, 77–79]. Замены в остатках Glu, Lys, Asp и Arg полностью инактивируют гликозилазную активность как фермента Fpg, так и Nei, но способность катализировать реакцию  $\beta$ -элиминирования в субстратах с АП-сайтом сохраняется, предположительно, из-за малого размера АП-сайта, в связи с чем в активном центре не возникает стерических затруднений [80].

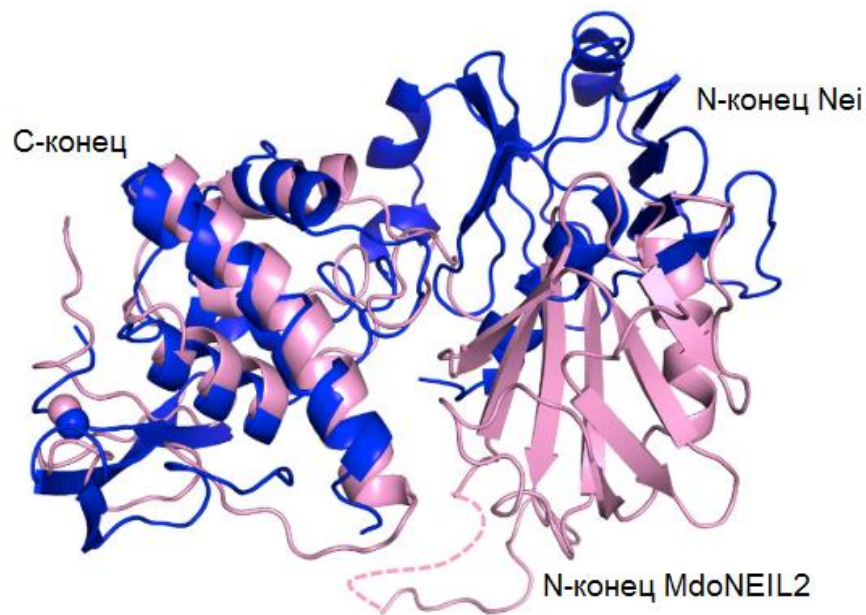
Для NEIL1 с помощью рентгеноструктурного анализа получены пространственные структуры белков человека в свободной форме (рисунок 12, А) и в комплексах с ДНК, содержащей различные повреждения, а также NEIL1 мимивируса в свободном состоянии и в комплексе с ДНК (номера в базе данных PDB 3A42, 3A46 [81]). Эти структуры, с небольшими отклонениями в длинах некоторых  $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -складок и петель, весьма схожи со структурой Nei.



**Рисунок 12.** Сравнение известных кристаллических структур белков NEIL: А — NEIL1 человека (hNEIL1, номер структуры в PDB 1TDH) [82], Б — NEIL3 мыши (mNEIL3, PDB 3W0F) [83], В — NEIL2 *Monodelphis domestica* (MdoNEIL2, PDB 6VJI) [76]. С-концевой домен всех структур расположен в одинаковой ориентации.  $\alpha$ -спирали окрашены голубым,  $\beta$ -листы — ярко-розовым. Атомы углерода остатка N-концевой каталитической аминокислоты показаны светло-розовым. Уникальные для NEIL2 неупорядоченные петли показаны пунктиром.

Для NEIL2 в настоящее время получена только одна кристаллическая структура — это структура NEIL2 домового опоссума (*Monodelphis domestica*) (номер структуры в PDB 6VJI) [76]. В сравнении с другими гликозилазами суперсемейства, структура MdoNEIL2 значительно отличается ориентацией С-концевого домена относительно N-концевого (рисунок 12, В). В то время как NEIL1 принимает только «закрытую» конформацию независимо от того, связан он с ДНК или нет, NEIL2, как и Nei, демонстрирует «открытую» конформацию, которая требует разворота доменов относительно друг друга на  $\sim 80^\circ$  для достижения каталитической компетентности. Сравнение свободных структур MdoNEIL2 и Nei показывает различие в относительной ориентации доменов и в траектории движения для образования «закрытой» каталитической ориентации. В то время как закрытие доменов Nei может происходить

посредством простого шарнирного движения, MdoNEIL2 должен использовать закручивающееся вращение, поскольку N-концевая часть в кристаллической структуре находится на противоположной стороне относительно N-концевых аминокислот Nei (рисунок 13). Кроме того, NEIL2 содержит два довольно протяженных неупорядоченных региона, расположенных в N-концевом домене: первая петля находится между складками  $\beta 3/4$  (65–130 а. о.), вторая, меньшая петля, состоящая из 8–10 остатков (155–165 а. о.), расположена между  $\beta 5$  и  $\beta 6$  и содержит 3 лизина и один аргинин в NEIL2 опоссума (3 лизина и 2 аргинина в последовательности NEIL2 человека). Вероятно, эти петли могут участвовать в формировании уникального для белков NEIL диапазона субстратов.



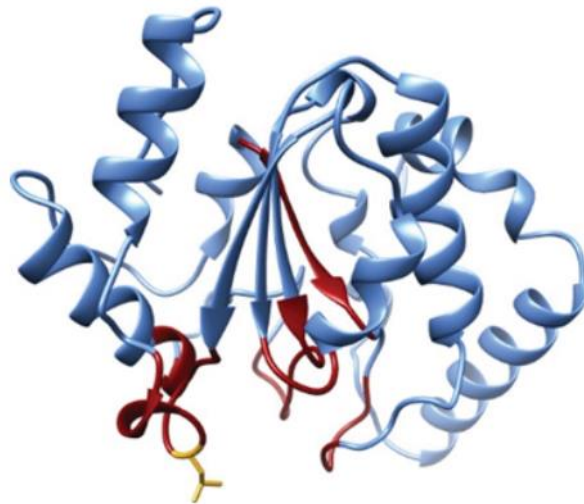
**Рисунок 13.** Сравнение взаимной ориентации N-концевых (справа) и C-концевых (слева) доменов Nei *E. coli* (синий) и MdoNEIL2 (розовый). Ион  $Zn^{2+}$  в составе цинкового пальца обозначен сферой. Номера структур в PDB: Nei — 1Q3B, MdoNEIL2 — 6VJI.

Последовательность NEIL3 значительно длиннее, чем у его гомологов (606 а. о.). Помимо общих для белков H2TH элементов структуры, на С-конце NEIL3 находится участок, гомологичный части ДНК-топоизомеразы III человека, и дополнительный мотив «цинкового пальца» типа RanBP [44, 56]. Петля, которая формирует шарнир между N- и С-концевыми доменами, состоит из аминокислотных остатков Arg165, Glu153, Asp155 и Arg227, которые высококонсервативны в белках NEIL3, но не в других белках семейства. Эти аминокислоты создают дополнительные взаимодействия в виде водородных связей и солевых мостиков, что делает шарнирную область более жесткой, чем у его гомологов, что может обуславливать предпочтения NEIL3 к одноцепочечным субстратам [83].



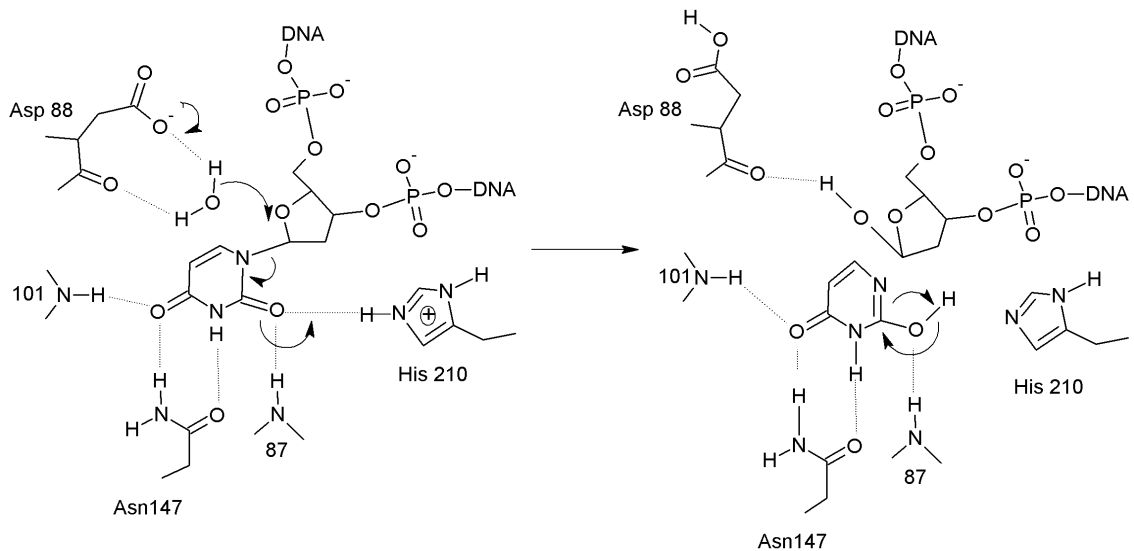
### 2.3.2. Суперсемейство « $\alpha/\beta$ -укладка» (урацил-ДНК-гликозилазы)

Суперсемейство урацил-ДНК-гликозилаз содержит несколько семейств со сходной третичной структурой и каталитическим механизмом. У ферментов суперсемейства можно выделить консервативную структуру:  $\beta$ -лист, зажатый между двумя или более  $\alpha$ -спиралями с каждой стороны ( $\alpha/\beta$ -укладка; рисунок 14). Эти элементы структуры соединены петлями, которые содержат положительно заряженные аминокислоты для неспецифического связывания сахарофосфатного остова ДНК, а также набор аминокислот, узнающих поврежденное основание и образующих активный центр фермента [2].



**Рисунок 14.** Структура UNG человека (1SSP в базе данных PDB [84]). Каталитически важные структурные мотивы показаны красным, интеркалирующий остаток Leu272 — желтым [85].

Основной субстрат ферментов этого суперсемейства — Ura в оц и дцДНК. По механизму урацил-ДНК-гликозилазы относятся к монофункциональным гликозилазам, которые катализируют только гидролиз *N*-гликозидной связи. Ферменты осуществляют кислотно-основной катализ с помощью аминокислотных остатков His и Asp (рисунок 15). Боковой радикал His протонирует атом  $O^2$  Ura, что делает это пиримидиновое основание хорошей уходящей группой. Asp активирует молекулу воды для нуклеофильной атаки атома  $C1'$  дезоксирибозы. После разрыва связи происходит перераспределение протонов, высвобождение Ura и связывание новой молекулы воды [86].



**Рисунок 15.** Механизм действия урацил-ДНК-гликозилаз. Нумерация аминокислотных остатков и атомов полипептидной цепи указана для UNG вируса простого герпеса [86].

Суперсемейство урацил-ДНК-гликозилаз включает 10 семейств, из которых биохимически охарактеризовано 7. Все они обладают общей укладкой и содержат два функционально важных структурных мотива: «мотив А» — каталитическая петля, активирующая молекулу воды, и «мотив В» — интеркалирующая лейциновая петля.

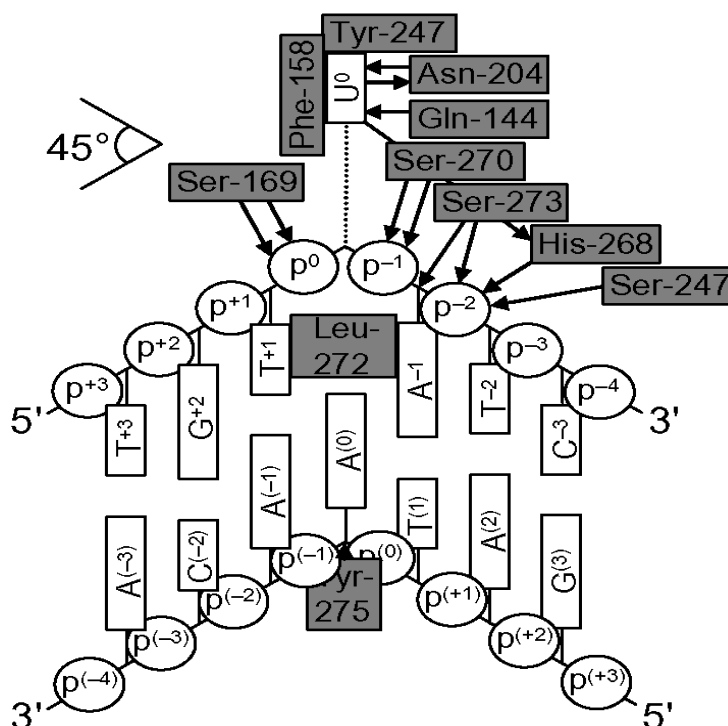
Представители первого семейства (собственно урацил-ДНК-гликозилаз; Ung у бактерий, UNG у высших эукариот) удаляют Ura как из одноцепочечных субстратов, так и из пар с любым основанием в дцДНК. Члены семейства встречаются в клетках бактерий, архей, эукариот и в некоторых вирусах. Второе семейство — это белки, специфически удаляющие Thy или Ura только из пар T:G и U:G, которые возникают в ДНК в результате дезаминирования mCyt или Cyt соответственно. Представитель в эукариотических клетках — белок TDG (Thymine-DNA Glycosylase), а в бактериях — Mug (Mismatched Uracil Glycosylase). Третье семейство представлено ферментом высших эукариот SMUG1 (Single-strand-specific Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase 1), который гидролизует N-гликозидную связь Ura в оцДНК, а в присутствии АП-эндонуклеазы выщепляет Ura и из дцДНК. Фермент также способен удалять 5-формулурацил и 5-гидроксиметилурацил. Четвертое и пятое семейства урацил-ДНК-гликозилаз содержатся в археях и бактериях и в своей структуре несут железосерный (4Fe-4S) кластер. Эти белки удаляют не только Ura из ДНК, но некоторые другие повреждения [2]. Шестое семейство — гипоксантин-ДНК-гликозилазы (HDG), которые не обладают урацил-ДНК-гликозилазной активностью, а удаляют из двуцепочечной ДНК гипоксантин — продукт дезаминирования Ade [87]. Представители седьмого семейства — белки, подобные урацил-ДНК-гликозилазе из *Bradyrhizobium diazoefficiens* (BdiUng-like). Они обладают широкой субстратной специфичностью, предпочтительно выщепляют Ura, 5-hmUra и Xap из оцДНК [88].

### 2.3.2.1 Урацил-ДНК-гликозилаза (семейство I)

В 1974 г. Т. Линдал выделил из *E. coli* фермент «урацилгликозидазу», способную удалять Ura из ДНК с образованием АП-сайта [4]. Впоследствии этот фермент был назван урацил-ДНК-гликозилазой. Консервативные гомологи данного белка обнаружены почти во всех про- и эукариотических организмах и во многих вирусах (поксвирусы, герпесвирусы), что свидетельствует о важности его функции и сходстве каталитического механизма во всех живых системах [89].

Высшие эукариотические организмы обладают двумя изоформами урацил-ДНК-гликозилазы — ядерной (UNG2) и митохондриальной (UNG1). Обе изоформы кодируются одним геном UNG, но транскрибируются с разных промоторов и претерпевают альтернативный сплайсинг. Изоформы содержат разные N-концевые последовательности длиной около 30–40 аминокислотных остатков: полипептид UNG1 на N-конце несет сигнал митохондриальной локализации, а в UNG2 присутствует сигнал ядерной локализации.

У фермента нет отдельных доменов, но при связывании с субстратом конформация UNG незначительно изменяется: три части белка поворачиваются друг относительно друга примерно на  $10^\circ$  в районе гибких областей, которые пространственно сближены и образуют активный центр фермента. Там же находятся аминокислотные остатки, отвечающие за связывание ДНК и узнавание Ura. Более заметные конформационные изменения происходят с поврежденной ДНК. Структура ДНК, содержащей Ura, в свободном состоянии почти не отличается от канонической. При связывании с ферментом ось дцДНК образует излом примерно на  $45^\circ$  в месте повреждения, но остальная ДНК соответствует В-форме. Поврежденное звено теряет стэкинг-взаимодействия с соседними азотистыми основаниями и выворачивается из двойной спирали ДНК, оказываясь в активном центре фермента. Выворачивание сопровождается сжатием сахарофосфатного остова ДНК в области повреждения. В полость, образовавшуюся при выворачивании поврежденного основания, внедряется боковая группа гидрофобного остатка Leu, что частично восстанавливает стэкинг-взаимодействия за счет образования ван-дер-ваальсовых контактов с соседними азотистыми основаниями. Водородные связи между молекулой белка и ДНК преимущественно образуются с поврежденной цепью ДНК (рисунок 16).



**Рисунок 16.** Схема взаимодействия UNG человека с ДНК после выщепления Ura [90]. Водородные связи обозначены стрелками в направлении от донора к акцептору, ван-дер-ваальсовы контакты — соприкосновением соответствующих групп. Некоторые ван-дер-ваальсовы контакты с немодифицированными звеньями не показаны.

Высококонсервативный центр связывания поврежденного основания по форме и электростатическому потенциалу комплементарен Ura, вывернутому из дцДНК, но слишком мал для связывания пуриновых оснований. Наилучшая комплементарность Ura обеспечивается лишь после его выщепления, что вносит вклад в снижение энергии комплекса фермент–продукт относительно комплекса фермент–субстрат.

Фермент UNG способен выщеплять из ДНК 5-фторурацил [91], который используется в медицине как противоопухолевый агент, а также узнает пиримидины (5-гидроксиурацил, изодиауровую кислоту и аллоксан), образующиеся при гамма-облучении аэрированных водных растворов ДНК за счет окислительного повреждения оснований цитозина [92].

UNG ингибируется свободным урацилом, а также его производными 6-аминоурацилом и 5-азаурацилом, слабо ингибируется 5-фторурацилом и не ингибируется 5-бромуррацилом, Thy и многими производными Ura, модифицированными по положениям 1–4 пиримидинового гетероцикла [93]. Эффективность выщепления Ura урацил-ДНК-гликозилазами также может зависеть основания, расположенного непосредственно напротив повреждения в дцДНК. Поскольку дезаминирование цитозина, в отличие от включения dUMP напротив аденина при репликации, ведет к мутации, можно было бы ожидать, что предпочтительным субстратом для UNG будет пара U:G. Однако в литературе сообщается о преимущественном выщеплении Ura ферментом как из пар U:A [94], так и из пар U:G [95].

Из всех известных ДНК-гликозилаз урацил-ДНК-гликозилазы обладают самой высокой активностью — 200–1000 оборотов в минуту для UNG человека [96]. Тем не менее, даже эти ферменты ингибируются продуктом реакции — ДНК, содержащей АП-сайт. Однако в мультикомпонентной системе ЭРО человека активность фермента UNG резко повышается за счет его высвобождения из комплекса АП-эндонуклеазами [84, 96].

#### **2.4. Урацил-ДНК-гликозилазы вирусов**

Все известные на сегодня вирусы, содержащие собственные системы репарации ДНК, принадлежат к числу вирусов с дцДНК геномом. Наиболее полно системы репарации ДНК представлены в геномах гигантских вирусов простейших, таких, как мимивирус, поражающий амеб *Acanthamoeba polyphaga* [97], или CroV — паразит морских жгутиконосцев *Cafeteria roenbergensis* [98]. В большинстве случаев вирусы содержат лишь отдельные гены, имеющие отношение к репарации, причем в основном к системе ЭРО. Чаще всего в геномах вирусов встречаются урацил-ДНК-гликозилазы, которые обнаружены у многих представителей семейств герпесвирусов и поксвирусов [99].

Среди урацил-ДНК-гликозилаз герпесвирусов наиболее изучена на данный момент UNG вируса простого герпеса 1 типа (ВПГ-1). Получены кристаллические структуры свободного фермента и в комплексе с ДНК, урацилом, белковыми ингибиторами урацил-ДНК-гликозилаз UGI (Uracil Glycosylase Inhibitor), p56 и SAUGI (UGI *Staphylococcus aureus*), блокирующими ДНК-связывающую область фермента, а также структуры мутантных форм [86, 100–103]. Требования к наличию функциональной герпесвирусной UNG достаточно мягки: фермент не нужен для выживания вируса в быстро делящейся культуре клеток, но необходим для эффективного заражения нейронов *in vivo* [104]. Вирус ветряной оспы может размножаться даже в клетках, не содержащих собственного белка UNG [105], в то время как эффективность литического цикла вируса Эпштейна–Барр зависит от клеточного, но не от вирусного белка UNG [106].

Некоторые вирусы (лентивирусы, гепаднавирусы) не кодируют ген UNG в собственном геноме, а привлекают фермент клетки-хозяина. Геном вируса гепатита В кодируется вирусной двуцепочечной ДНК, содержащейся в нуклеокапсиде (нк-ДНК). В цитоплазме она превращается в ковалентно замкнутую кольцевую ДНК. Было показано, что антивирусные белки AID/АРОВЕС дезаминируют цитозин с образованием множественных оснований урацила в ДНК вируса, в результате чего происходит гипермутагенез вирусного генома. В ковалентно замкнутой кольцевой ДНК такой гипермутагенез порождает множество стоп-кодона в гене полимеразы. Эти основания урацила удаляются с помощью UNG клетки-хозяина. Подавление активности

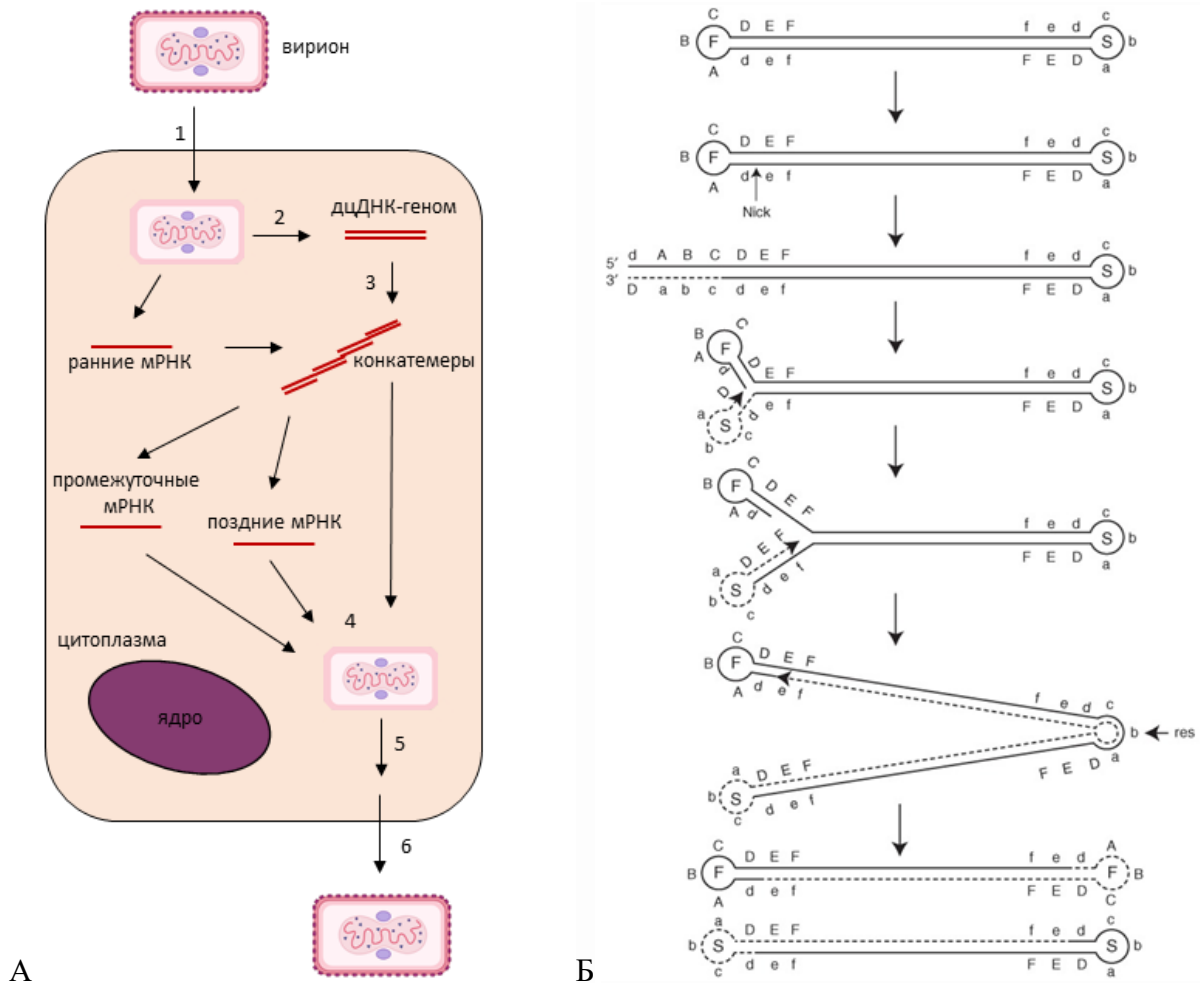
UNG за счет ингибиторного белка UGI повышает АРОВЕС3G-зависимое подавление репликации вируса, в том числе снижает количество нк-ДНК, пре-мРНК и зрелых вирусных частиц [107].

UNG играет важную роль в жизненном цикле вируса иммунодефицита человека 1 (HIV-1). Одноцепочечный РНК-геном этого лентивируса перед интеграцией в ДНК клетки-хозяина переводится в двуцепочечную ДНК-форму при помощи обратной транскриптазы, которая характеризуется невысокой точностью и эффективно включает dUMP из пула dUTP в (-)-цепь ДНК, что ведет к снижению выхода (+)-цепи ДНК и, таким образом, нарушает жизненный цикл вируса [108]. Кроме того, комплементарная ДНК-копия генома HIV-1 служит мишенью клеточных цитидиндезаминаз АРОВЕС3G и АРОВЕС3F, в результате чего в ней возникает множество оснований Uга [109], которые удаляются UNG с образованием АП-сайтов и одноцепочечных разрывов, подавляя размножения вируса [110]. Таким образом, UNG, вероятно, играет двоякую роль в жизненном цикле HIV-1: небольшое количество этого фермента может быть нужным для предотвращения последствий возникновения Uга в геноме, в то время как высокая активность АРОВЕС и UNG способна разрушить ДНК вируса. Функциональный фермент UNG клетки-хозяина связывается с вирусным белком Vpr [111] и включается в зрелые вирионы HIV-1. Помимо UNG, Vpr опосредует включение в вирионы ДНК-гликозилазы SMUG1. Для защиты вирусной ДНК от деградации, инициированной дезаминазами АРОВЕС, Vpr, связывая UNG и SMUG1 в зараженной клетке, активирует протеасомную деградацию этих ДНК-гликозилаз [112].

#### ***2.4.1. Урацил-ДНК-гликозилазы поксвирусов***

Наибольшую зависимость от наличия функциональной урацил-ДНК-гликозилазы проявляют поксвирусы. Поксвирусы — семейство вирусов животных, объединяющее крупные ДНК-содержащие вирусы. Они обладают геном от 130 до 230 т. п. н. виде двуцепочечной ДНК гантелеобразной формы, покрытой двухслойным нуклеокапсидом, между слоями которого находятся боковые тела. Поверх нуклеокапсида расположена двухслойная липопротеидная оболочка с воронкообразными фибрами. Поксвирусы обладают сложным репродуктивным циклом (рисунок 17, А), при этом синтезируется более 100 различных белков, входящих в состав вирионов. Репликация вируса в клетке происходит следующим образом: белки оболочки вируса присоединяются к молекулам гликозаминогликанов клетки-хозяина, вирусная частица посредством эндоцитоза проникает внутрь. Оболочка вируса сливается с плазматической мембраной и ДНК вируса оказывается в цитоплазме. Ранние гены начинают транскрибироваться в цитоплазме вирусной РНК-полимеразой уже через 30 мин после заражения. Промежуточные гены, ответственные за репликацию вирусного генома, экспрессируются через 100 мин. Поздние гены экспрессируются в период 2–48 ч после заражения, они кодируют все структурные белки.

Затем происходит сборка вирионов, образуются незрелые сферические частицы. Эти частицы созревают в кирпичеобразные зрелые вирионы и высвобождаются посредством лизиса клетки-хозяина, или могут приобретать вторую мембрану от аппарата Гольджи.



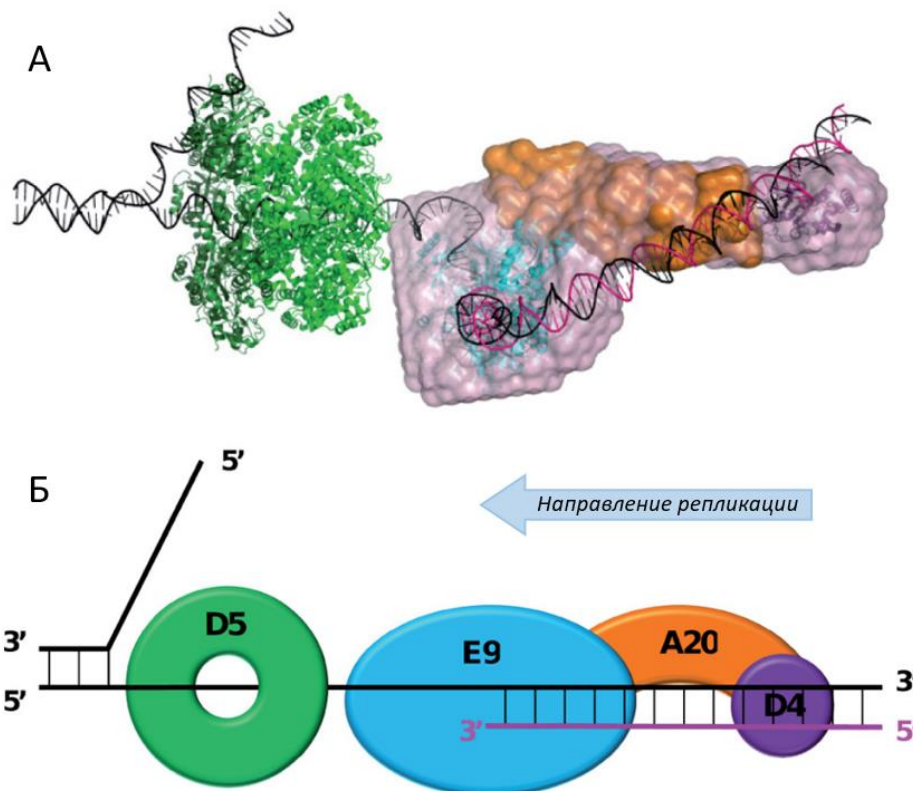
**Рисунок 17.** (А) — схема жизненного цикла поксвируса. 1 — проникновение в клетку вирусной частицы посредством слияния мембран или эндоцитоза, 2 — высвобождение ДНК-генома вириона в цитоплазму; 3 — репликация ДНК; 4 — сборка вириона; 5 — созревание; 6 — выход вирусной частицы из клетки. (Б) — модель репликации поксвируса [113]. Пунктиром обозначена новосинтезированная цепь, комплементарные последовательности обозначены заглавной и строчной буквами; res — точка разрешения конкатемерной ДНК.

Делеции гена *UNG* поксвирусов (*D4R* в геноме вируса осповакцины) приводят к резкому снижению способности вируса к репликации в клетках [114–116]. Существуют противоречивые данные относительно того, зависит ли жизнеспособность поксвирусов от репарационной функции *UNG*: в ряде работ сообщалось о том, что селективная инактивация ДНК-гликозилазной активности методом сайт-направленного мутагенеза приводит к подавлению репликации [116], в других утверждается, что репликация поддерживается мутантными формами фермента, не обладающими ДНК-гликозилазной активностью [117]. Известно, что вирус осповакцины, дефицитный по гену *UNG*, может реплицироваться только в клетках, эктопически экспрессирующих вирусную форму белка, но не клеточную [118, 119]. Вирулентность вируса

осповакцины при интраназальном введении мышам резко снижается при использовании штамма, несущего мутации в активном центре UNG [117]. Среди поксвирусов получены в рекомбинантном виде и охарактеризованы биохимически UNG осповакцины (vvUNG) и UNG вируса оспы обезьян [120, 121].

Вскоре было показано, что UNG поксвирусов обладает уникальной для ДНК-гликозилаз функцией непосредственного участника репликации. Белок D4 интегрирован в фактор процессивности ДНК-полимеразы вируса, и эта функция не зависит от его гликозилазной активности [117, 122, 123]. Таким образом, хотя каталитическая активность D4 в составе репликативного комплекса напрямую связывает репликацию и репарацию ДНК (D4 удаляет из новосинтезированной цепи инкорпорированный вирусной полимеразой dUTP), критическая значимость D4 для вируса связана именно с его ролью в репликативном комплексе [123, 124]. Фактор процессивности поксвируса — гетеродимерный комплекс, содержащий D4 (размером 25 кДа) и белок A20 (49 кДа) [122]. A20 — уникальный поксвирусный белок, он действует как линкер между D4 и ДНК-полимеразой E9, а также обеспечивает взаимодействие полимеразного комплекса с другими участниками репликации (геликазой/праймазой D5 и фактором элонгации поздней транскрипции H5) [125–127]. Интересно, что геном вируса осповакцины кодирует белок G8, гомологичный фактору процессивности PCNA эукариот, но он принимает участие в транскрипции на поздних стадиях инфекции и, по-видимому, не участвует в репликации [128, 129]. Структура репликативного комплекса D4:A20:E9 с низким разрешением была определена с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS) (рисунок 18, А) [127]. Эта структура послужила основой для понимания относительной ориентации A20, D4 и E9 в полимеразном комплексе (рисунок 18, Б).





**Рисунок 18.** Структурная модель (А) репликативной вилки вируса осповакцины; схематическое изображение (Б) комплекса белков А20, Е9 и D4 [127].

Среди белков семейства урацил-ДНК-гликозилаз UNG поксвирусов больше всех отличаются по аминокислотной последовательности (D4 только на 21% совпадает с последовательностью UNG человека). При наложении структур UNG осповакцины и человека можно увидеть, что ориентация ферментов относительно ДНК отличается на 15°, однако конформация ДНК-дуплекса практически идентична (рисунок 19). Два характерных для урацил-ДНК-гликозилаз мотива активного центра, известные как «мотив А» (петля, которая активирует молекулу воды) и «мотив В» (интеркалирующая лейциновая петля), консервативны в UNG человека, *E. coli* и вируса простого герпеса, но довольно сильно отличаются по последовательности у UNG осповакцины (таблица 4). Хотя остатки активного центра, образующие урацил-связывающий карман (в UNG человека — D145, Y147, F158, N204, H268), идентичны во всех UNG, консервативный интеркалирующий остаток Leu272 заменен в D4 на Arg185.

**Таблица 4.** Сравнение аминокислотных остатков двух мотивов активного центра в ферментах UNG

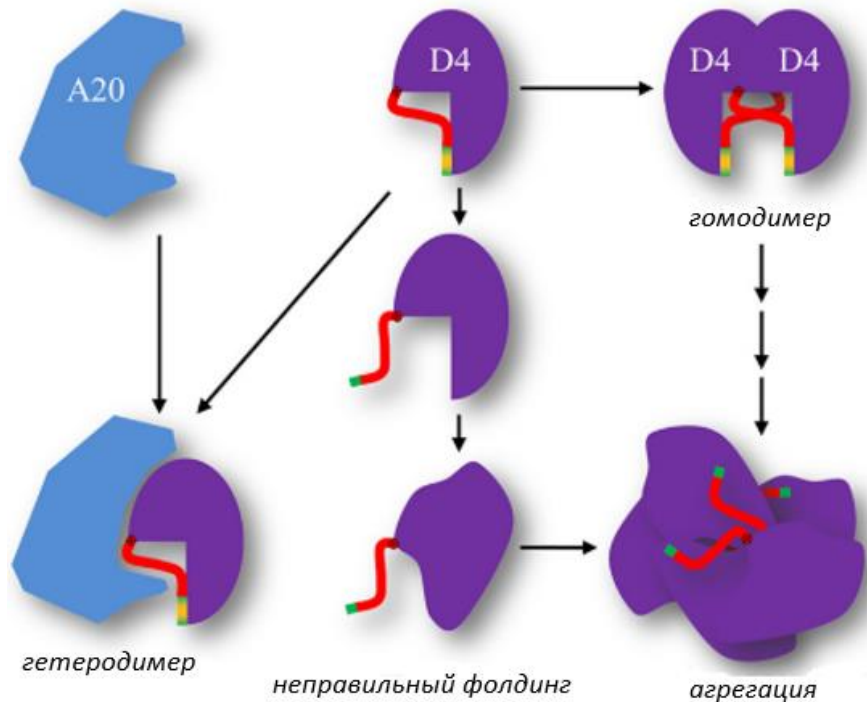
Вид	«мотив А»	«мотив В»	а. о. активного центра
Человек	143-GQDPYH-148	268-HPSP <sup>L</sup> SVYR-276	D145,Y147,F158,N204,H268,L272
ВПГ-1	86-GQDPYH-91	210-HPSP <sup>L</sup> SKV -217	D88,Y90,F101,N147,H210,L214
<i>E. coli</i>	62-GQDPYH-67	187-HPSP <sup>L</sup> SAHR-195	D64,Y66,F77,N123,H187,L191
Вирус осповакцины	66-GIDPYP-71	181-HPAA <sup>R</sup> RDR -187	D68,Y70,F79,N120,H181,R185



**Рисунок 19.** Наложение структур UNG человека (голубой, номер PDB — 1SSP) и D4 осповакцины (розовый, номер PDB — 4YIG) в комплексе со специфической ДНК [130]. Структура D4 повернута на 15° относительно UNG человека.

В работе [124] показано, что контактирующая с ДНК поверхность D4 выглядит более положительно заряженной, чем у UNG человека, что в немалой степени достигается за счет замены Leu на положительно заряженный Arg185. Вследствие этой замены белок D4 приобрел уникальное для урацил-ДНК-гликозилаз свойство — устойчивость к ингибированию белком UGI [116, 120]. Ингибирование UGI других урацил-ДНК-гликозилаз происходит за счет комплементарности заряда и формы ДНК-связывающей бороздки UNG. В комплексе UNG человека/UGI и именно остаток Leu встраивается в гидрофобный карман UGI (номер PDB 1UGH [131]).

Еще одна уникальная особенность структуры D4, обеспечивающая его функцию — наличие гексапептида 213-AQGFIY-218 на С-конце, встречающегося только в последовательностях UNG поксвирусов. Показано, что этот консервативный гексапептидный участок необходим для поддержания целостности белка и его продукции в функциональной растворимой форме. Из кристаллических структур D4 видно, что С-концевой гексапептид вступает в контакт с остатками внутри белковой глобулы. Мутационный анализ показал, что для этого взаимодействия критически важен трипептидный мотив 215-GFI-217 внутри гексапептида [132]. Он «заякоревает» вышележащую неупорядоченную область D4, которая формирует интерфейс взаимодействия D4 с A20 (рисунок 20). В отличие от D4, урацил-ДНК-гликозилазы из других организмов содержат неупорядоченные С-концы, которые не образуют внутримолекулярных контактов.



**Рисунок 20.** Модель, отражающая роль трипептида 215-GFI-217 (обозначен желтым) в составе С-концевого гексапептида (показан зеленым) в поддержании целостности и функции D4 [132]. Трипептид закоревает неупорядоченную область (показана красным), образующую взаимодействия с A20. Отсутствие трипептида приводит к неправильному сворачиванию белка и его агрегации.

Охарактеризовано 19 кристаллических структур D4, включая несколько структур свободного D4 дикого типа, в комплексе с Ura, с неспецифичной ДНК, несколько мутантных форм (таблица 5) [124, 130, 133–139].

**Таблица 5.** Список кристаллических структур vvUNG

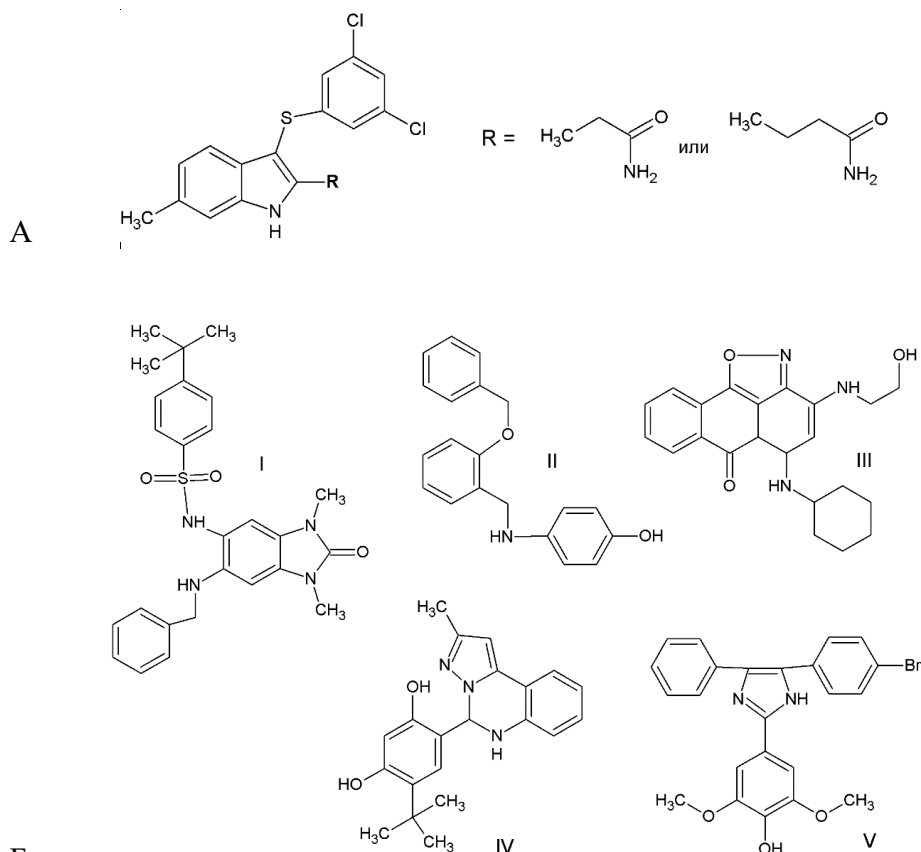
Форма	Код в PDB
Свободный D4, дикий тип	(1) 2OWQ (2) 5JX8 (3) 4DOF (4) 5JX3 (5) 4DOG
D4 в комплексе с Ura	(6) 4LZB
Свободный D4, мутантная форма	(7) 4QC9 (3G171-173) (8) 4QCA (R167A) (9) 4IRB ( $\Delta$ 171-172) (10) 5JX0 (L110F) (11) 3NT7 (K187V)
D4 в комплексе с неповрежденной ДНК	(12) 4QCB
D4 в комплексе с A20 <sub>1-50</sub>	(13) 4OD8 (14) 4ODA
D4 в комплексе с урацилом и A20 <sub>1-50</sub>	(15) 4YGM
D4 в комплексе с A20 <sub>1-50</sub> и ДНК после удаления Ura	(16) 4YIG
D4 в комплексе с мутантным A20 <sub>1-50</sub> (W43A)	(17) 5JKR
Мутантный D4 (R167A) в комплексе с A20 <sub>1-50</sub>	(18) 5JKS
Мутантный D4 (P173G) в комплексе с A20 <sub>1-50</sub>	(19) 5JKT

В свободном виде D4 кристаллизуется в основном в виде димера. Также получены структуры D4 в комплексе с пептидом из аминокислотных остатков 1–50 белка A20 и тройные комплексы D4/A20<sub>(1–50)</sub>/Ura и D4/A20<sub>(1–50)</sub>/ДНК. Интересно, что интерфейс взаимодействия молекул D4 в гомодимере перекрывается с интерфейсом в комплексах A20<sub>(1–50)</sub>/D4.

#### 2.4.2. *Терапевтические агенты против поксвирусов*

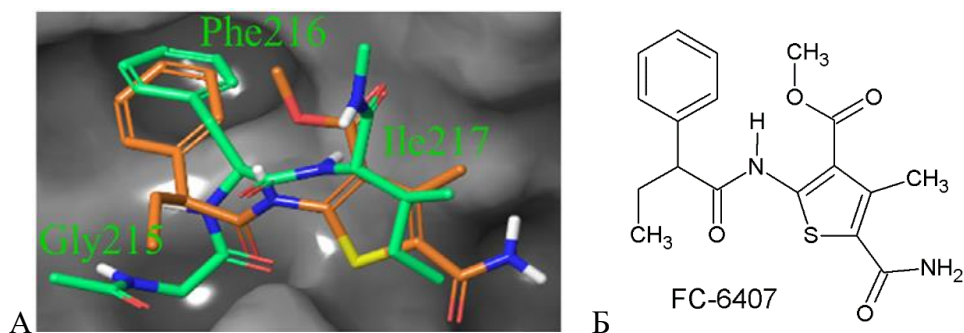
Поскольку связывание D4 и A20 необходимо для эффективной репликации ДНК, интерфейс гетеродимера — перспективная мишень для нацеливания ингибиторов белок-белковых взаимодействий. Описано несколько успешных попыток поиска таких ингибиторов [140–145]. В работе [140] был использован экспресс-тест для скрининга потенциальных ингибиторов в микропланшетах, основанный на количественной оценке включения dU полимеразой E9 или тройным комплексом E9/A20/D4, таким образом, позволяющий дифференцировать ингибирование самой полимеразы от подавления процессивности комплекса. Дальнейшая функциональная валидация этих соединений привела к обнаружению нуклеозидных ингибиторов синтеза ДНК, которые не нацелены на E9 [143, 145, 146]. IC<sub>50</sub> (полуингибирующая концентрация) варьировалась от 26 до 239 мкМ, а значения их цитотоксичности находились в диапазоне от 100 до >200 мкМ [146]. Дальнейшая разработка этих соединений позволила получить более эффективные производные (IC<sub>50</sub> ~ 45 нМ) (рисунок 21, А), сайт связывания которых находится вблизи остатка Arg193 в D4 [145].

В еще одной группе исследований с помощью высокопроизводительного анализа на основе AlphaScreen проводили скрининг библиотеки из 28 000 соединений на наличие ингибиторов взаимодействий D4 и A20 [142]. В результате было выявлено несколько соединений, проявивших противовирусную активность против вируса осповакцины со значениями IC<sub>50</sub> ниже 10 мкМ. Дальнейший анализ обнаружил соединения (рисунок 21, Б), уменьшающие вирусные бляшки с EC<sub>50</sub> = 7,1–21,5 мкМ, а также ингибирующие процессивный синтез ДНК с IC<sub>50</sub> = 5,1–137,6 мкМ, при этом было показано, что эти молекулы нацелены на D4 [143]. С помощью докинга с использованием кристаллической структуры D4 с A20<sub>(1–50)</sub> было предсказано, что по крайней мере некоторые из этих соединений могут мешать стэкинг-взаимодействию остатка Trp43 в A20 и Arg167 и Pro173 D4 за счет замещения Trp43 гидрофобной фенильной группой [136].



**Рисунок 21.** Структуры ингибиторов D4/A20 интерфейса. А — [145], Б — [143].

В последней работе этой группы разрабатывали низкомолекулярное соединение, которое своей структурой сможет имитировать описанный выше критически важный для связывания D4 с A20 трипептид 215-GFI-217 [147]. С помощью виртуального скрининга было обнаружено 20 соединений с высокой степенью сходства по форме, способные взаимодействовать с областью D4 как фармакофоры. Из этих 20 было выбрано соединение тиофенового ряда FC-6407 (рисунок 22), которое эффективно и специфично блокировало процессивный полимеразный синтез в клетках, инфицированных вирусом осповакцины, коровьей оспы и кроличьей оспы с эффективной концентрацией  $EC_{50} = 19,7, 8,4$  и  $18,7$  мкМ соответственно, а также ингибировало процессивный ДНК-синтез *in vitro* с  $IC_{50} = 13,4$  мкМ. Соединение обладает низкой цитотоксичностью.



**Рисунок 22.** Структура трипептида 215-GFI-217 (А) и имитирующего его низкомолекулярного соединения FC-6407 (А, Б), ингибирующего сборку D4–A20 интерфейса [147].

Вирус натуральной оспы на протяжении многих веков был одним из самых опасных патогенов для человеческой популяции, смертность от которого составляла 20–40% [148]. Уже в раннем средневековье упоминается использование «вариоляции» — инокуляции гнойной жидкости из пустулы больного к здоровому, при этом болезнь протекала в основном в легкой форме, со смертностью 1–2%, однако в свою очередь вызывала эпидемии и не предотвращала повторного заражения. В конце XVIII века английский врач Эдвард Дженнер обнаружил, что оспа коров может предотвращать заболевание натуральной оспой, с тех пор вакцинация применялась по всей Европе, но не регулярно, что приводило к новым вспышкам заболеваемости. Во второй половине XX века вакцинация стала применяться массово, и в 1977 году зарегистрирован последний случай заражения. Уже в 1980-х большинство стран прекратило массовую вакцинацию, таким образом, большая часть населения Земли в настоящее время не обладает иммунитетом к вирусам оспы. Особенно уязвимую группу составляют люди с ВИЧ, для которых иммунизация не возможна.

Ввиду опасности использования вируса натуральной оспы в качестве биологического оружия, ВОЗ с 1970–1990-х гг. ограничил распространение штаммов вируса натуральной оспы. Сейчас штаммы хранятся только в двух лабораториях в США (Атланта) и в России (Новосибирск) для сохранения возможности проводить исследования в интересах здравоохранения. Однако, кроме распространения вирулентных штаммов непосредственно из лабораторий, существует риск их синтетического получения, а также разработки мутантных штаммов, резистентных к вакцинации [149]. Кроме того, помимо вируса натуральной оспы, существуют и другие поксвирусы, способные заражать человека, например, вирус контагиозного моллюска, или вирус оспы обезьян, вспышка которого произошла в 2022 по всему миру [150].

В настоящее время существует три препарата, зарегистрированных для лечения поксвирусных заболеваний. Цидофовир (Вистид) — препарат для лечения цитомегаловирусного ретинита у пациентов с ВИЧ, также эффективен против поксвирусов. Цидофовир представляет собой аналог нуклеозида, который селективно ингибирует вирусную ДНК-полимеразу и снижает репликацию вируса натуральной оспы [151]. Цидофовир способен предотвратить смертность при введении до появления сыпи, однако обладает значительной нефротоксичностью. Вторым препаратом — бринцидофовир — модифицированная липидная форма цидофовира. Кроме этого, непосредственно для лечения оспы был разработан препарат ТРОХХ (тековиримат, ST-246) [152, 153]. Препарат нацелен на фосфолипазу вируса (белок F13) и действует как ингибитор выхода вируса на поверхность клетки-хозяина. Таким образом, тековиримат блокирует образование оболочечных форм ортопоксвирусов, тем самым эффективно подавляя распространение вирусных частиц как *in vitro*, так и *in vivo*. Препарат был одобрен для лечения оспы у человека только в 2018 г. Крайне желательны дальнейшие исследования противовирусных соединений,

поскольку невозможно исключить приобретение лекарственной устойчивости к существующим препаратам, так как сообщалось о мутациях, опосредующих устойчивость ортопоксвирусов как к цидофовиру [154], так и к ТРОХХ [155].

Таким образом, поиск и разработка новых терапевтических агентов против поксвирусных инфекций — крайне важная и актуальная задача.

## **2.5. Механизмы процессивности ДНК-зависимых белков**

Проблема быстрого поиска мишеней на фоне огромного избытка неспецифичной ДНК актуальна для транскрипционных факторов, эндонуклеаз рестрикции, ферментов репарации и для любых других белков, специфически связывающихся с сайтами в ДНК.

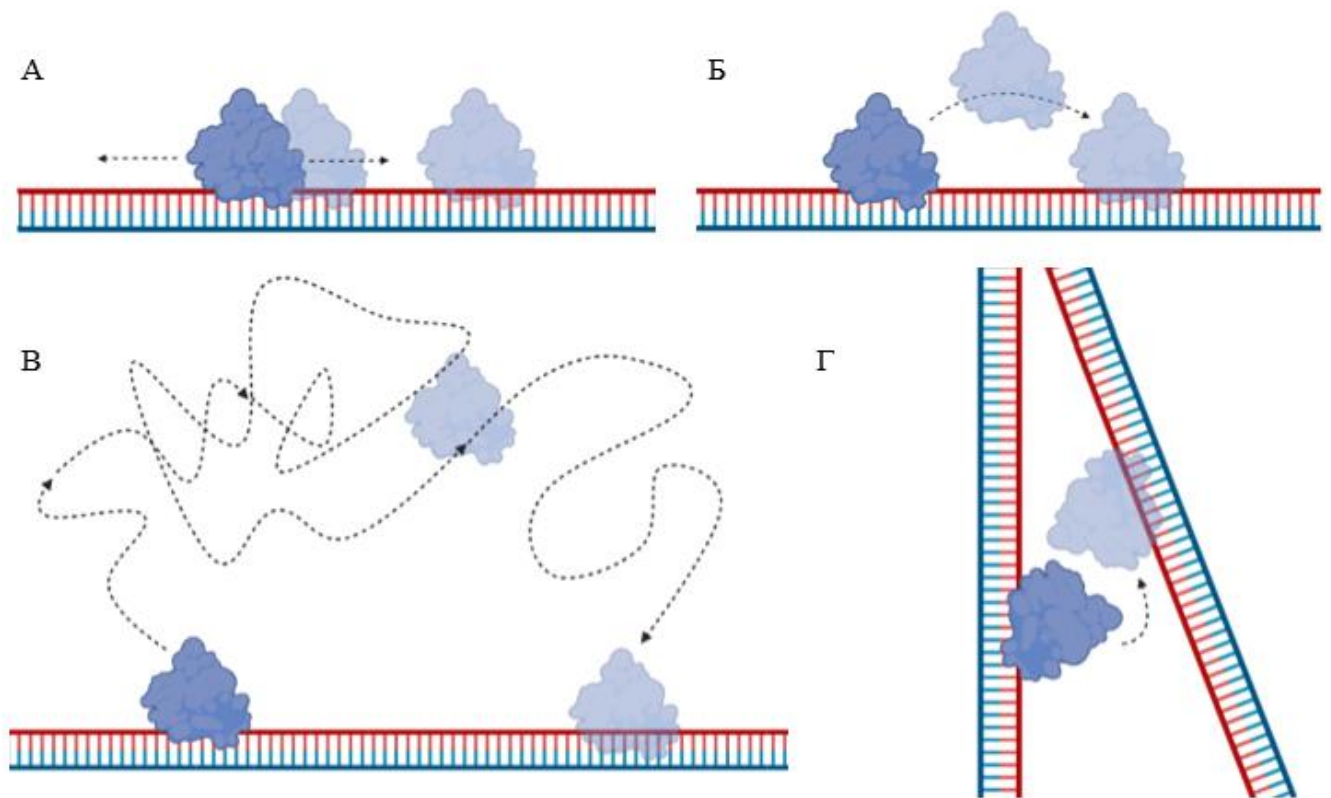
Впервые проблема существования механизмов, ускоряющих процесс поиска специфичных мишеней без дополнительных затрат энергии, была обозначена в 1970 г. А. Риггсом [156], обнаружившим, что константа скорости ассоциации  $\lambda$ с-репрессора с ДНК, содержащей  $\lambda$ с-оператор, превышает теоретический диффузионный предел для диффузии в трех измерениях на 2–3 порядка. Для объяснения этого явления было выдвинуто несколько моделей поиска, где диффузия белка осуществляется вдоль контура ДНК, т. е. в формально одномерном пространстве. В работе [157] предложено четыре возможных механизма такого поиска:

1. «Скольжение» (слайдинг, ассоциативный трансфер) — процесс, при котором поиск осуществляется посредством диффузии белка вдоль цепи ДНК в случайном направлении, при этом не происходит распада ДНК-белкового комплекса (рисунок 23, А). При этом взаимодействие с ДНК может несколько ослабевать, позволяя белку передвигаться, но все же оставаться в ионном облаке ДНК (в радиусе  $\sim 1$  нм).
2. «Перепрыгивание» (хоппинг, диссоциативный трансфер) — микроскопический процесс ассоциации–диссоциации ДНК-белкового комплекса, когда белок «перепрыгивает» между близко расположенными областями цепи ДНК, находясь в непосредственной близости от нее. Во время «прыжка» электростатическое взаимодействие между белком и ДНК ослабевает сильнее, чем в случае «скольжения», и белок отдаляется от ДНК более чем на 1 нм (рисунок 23, Б).

«Скольжение» и «перепрыгивание» объединяют под названием коррелированных механизмов поиска, так как положение белка на контуре ДНК в любой момент времени коррелирует с его положением в предыдущий момент. Для обозначения этих двух механизмов используются также термины процессивный поиск, одномерная диффузия. В таком случае время поиска мишени на ДНК длиной  $L$  будет пропорционально расстоянию до мишени и обратно пропорционально константе одномерной диффузии:  $t_{1D} = L \times l_{trans} / D_1$ .

3. Дистрибутивный механизм (трехмерная диффузия) — макроскопический процесс ассоциации–диссоциации ДНК–белкового комплекса, когда белок связывается с ДНК в произвольной области, и, если там не оказалось мишени, белок высвобождает ДНК и вновь связывается с ней в другом месте (рисунок 23, В). Таким образом, в процессе трехмерного поиска белок перемещается по доступному объему ( $V$ ) до тех пор, пока не встретит специфический сайт радиусом  $r$ . Время поиска мишени в условиях трехмерной диффузии пропорционально объему поиска и обратно пропорционально размеру мишени и константе диффузии:  $t_{3D} = V/D_3 \times r$  [158].

4. Интерсегментный трансфер — перенос молекулы белка между двумя удаленными участками ДНК при их сближении в пространстве (рисунок 23, Г). Такому перемещению способствует образование временного интермедиата, когда молекула белка связана с двумя участками ДНК одновременно, после чего белок остается связанным с новым участком. Такой механизм наиболее эффективен у белков, которые содержат несколько ДНК-связывающих субъединиц, однако мономерные белки только с одним сайтом связывания с ДНК тоже могут осуществлять интерсегментный трансфер, хотя и менее эффективно [159, 160].



**Рисунок 23.** Механизмы поиска специфических мишеней ДНК-зависимыми ферментами. Слайдинг (А), хоппинг (Б), дистрибутивный механизм (В) и интерсегментный трансфер (Г).

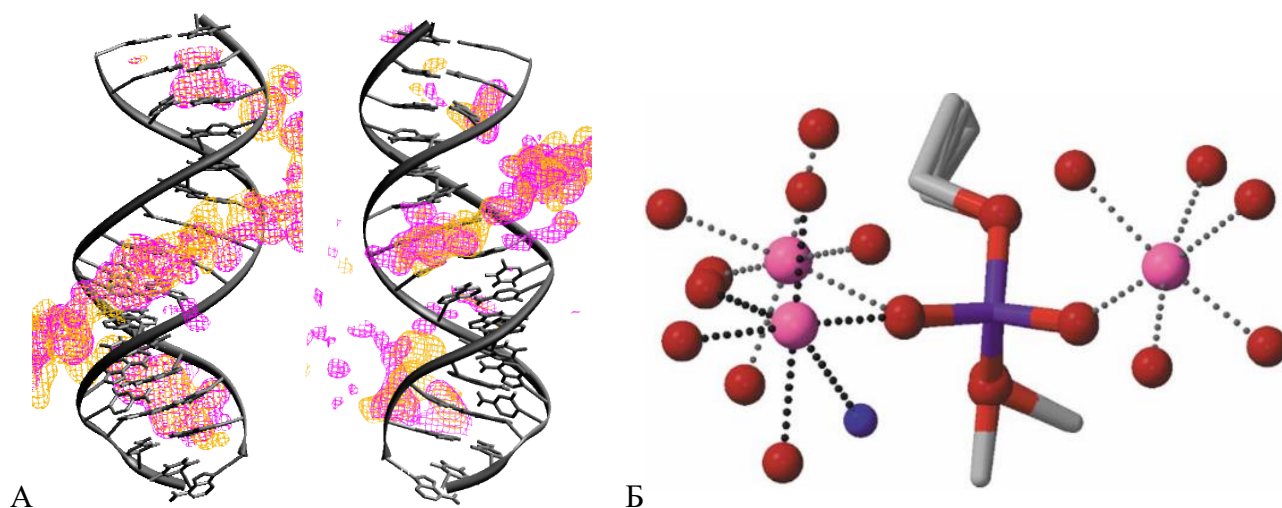
Если белок осуществляет трехмерный поиск, для мишени в виде одной пары оснований ( $r = 0,34$  нм) и фермента диаметром 5 нм с трехмерной константой диффузии с  $D_3 \approx 100$  мкм<sup>2</sup> с<sup>-1</sup> в клеточном ядре объемом  $\sim 100$  мкм<sup>3</sup> расчетное время поиска составит несколько часов. Так как большинство оснований в ДНК неспецифические для фермента, без дополнительного механизма



перемещения по ДНК время поиска поврежденных сайтов неопозволительно увеличится. В то же время, для сканирования геномной ДНК *E. coli* длиной 4 600 тысяч п. н. в режиме одномерной диффузии одна молекула белка с  $D_1 \approx 0,05 \text{ мкм}^2 \text{ с}^{-1}$  затратит около 560 суток. Проблема скорости поиска решается комбинированием одномерных и трехмерных механизмов диффузии.

Важный параметр, влияющий на скорость поиска, — время жизни связывания ДНК-гликозилазы с неповрежденной ДНК. Оно должно быть достаточно продолжительным, чтобы белок успел распознать повреждение при его наличии, и в то же время достаточно коротким, чтобы допускать события диссоциации, которые облегчают перемещение фермента к отдаленным участкам ДНК. На связывание с неспецифичной ДНК влияет как природа взаимодействий фермента с ДНК, так и компоненты ядерной или клеточной среды. Концентрация макромолекул в клетке оценивается в  $\sim 100\text{--}300 \text{ мг/мл}$ , а это значит, что ими может быть заполнено до 40% общего клеточного объема. Влияние заполненного пространства на процессы взаимодействия биологических молекул называют краудинг-эффектом, или эффектом вытесненного объема [161, 162]. Хотя невозможно полностью имитировать клеточную среду в пробирке, для имитации краудинг-эффекта в экспериментах обычно используют инертный полиэтиленгликоль (ПЭГ) 8000.

Связывание неспецифичной ДНК и большинства белков происходит за счет электростатических взаимодействий. ДНК окружена оболочкой из положительно заряженных ионов, при этом моновалентные катионы располагаются в малой бороздке ДНК в большом количестве и равномерно, в то время как в большой бороздке электронная плотность прерывистая, и обнаруживается в основном в изгибах ДНК вблизи переходов от пиримидинового к пуриновому нуклеотиду (рисунок 24, А) [163]. Дивалентные ионы образуют координационные связи в обеих бороздках с фосфатами остова ДНК (рисунок 24, Б), а также в более электроотрицательных А-Т богатых регионах малой бороздки и в G-C богатой большой бороздке, взаимодействуя с атомами N7 и O<sup>6</sup> гуанина [164]. При увеличении ионной силы среды белку становится сложнее вытеснять противоионы из бороздок при одномерной диффузии вдоль ДНК, следовательно, увеличивается вклад дистрибутивного механизма [165]. Таким образом можно оценивать вклад процессивных механизмов в процесс поиска мишеней.



**Рисунок 24.** Расположение моновалентных (А) и дивалентных (Б) катионов в малой (А, Б слева) и большой (А, Б справа) бороздках ДНК (А — [163]; Б — [164]).

Биологическое преимущество «хоппинга» по сравнению со «слайдингом» заключается в том, что можно обходить другие связанные с ДНК белки, а также осуществлять более длинные и быстрые диффузионные шаги вдоль ДНК. Каким образом интерсегментный трансфер осуществляется мономерным белком до конца не ясно, но это может быть связано с микроскопической диссоциацией и реассоциацией с соседней цепью, т. е. осуществлением «перепрыгивания» на другую цепь [160].

### 2.5.1. Методы исследования процессивности

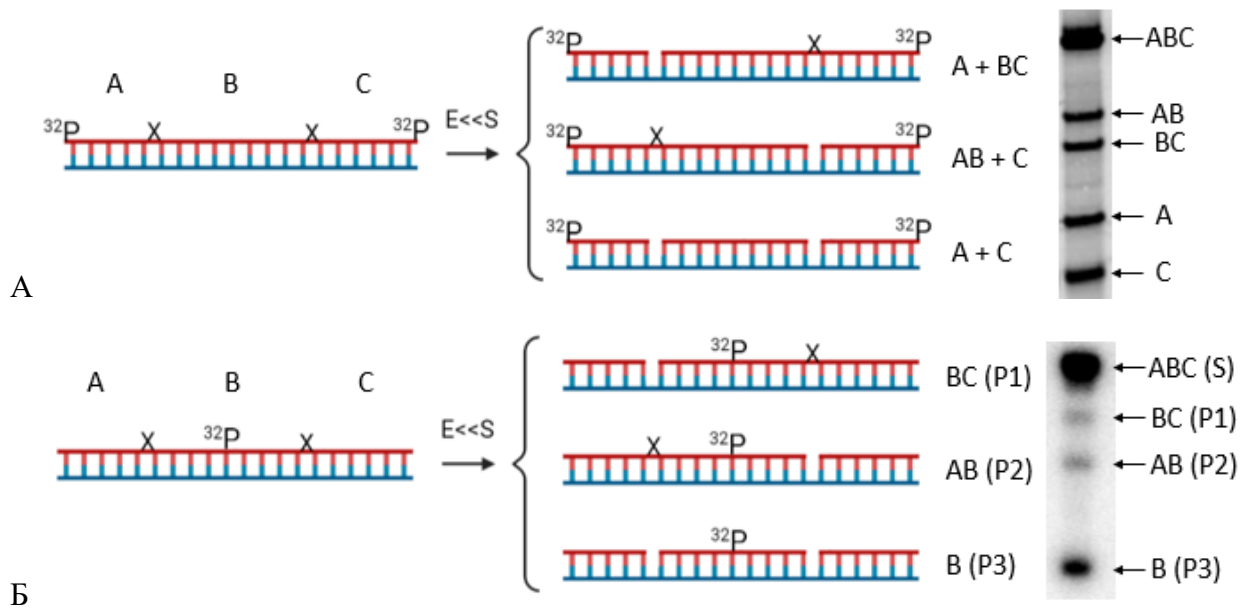
Экспериментальные методы изучения механизмов поиска мишеней в ДНК можно разделить на биохимические (или ансамблевые) методы, одномолекулярные методы, а также методы, основанные на ЯМР-спектроскопии.

Исторически первым подходом к изучению процессивности ферментов репарации был биохимический метод с использованием суперскрученной плазмиды, содержащей случайно распределенные специфичные повреждения [166–168]. При процессивном поиске фермент, двигаясь вдоль ДНК, вносит разрыв в обе цепи с образованием преимущественно линейной формы, а при дистрибутивном поиске образуется в основном релаксированная форма плазмиды. Из соотношения этих форм определяется вклад коррелированного расщепления. У метода много недостатков, в частности невозможность вводить произвольные модифицированные нуклеотиды, контролировать локализацию повреждения. Похожий метод основан на расщеплении конкатемерных субстратов, состоящих из одинаковых мономеров. При процессивном поиске преимущественно накапливаются мономеры, а при дистрибутивном — смесь продуктов разной длины [169, 170].

В настоящее время основной биохимический подход заключается в расщеплении олигонуклеотидного субстрата, содержащего два специфических сайта на определенном

расстоянии, при этом цепь ДНК, содержащая мишени, мечена радиоактивно по 5'- и по 3'-концам (рисунок 25, А) [171, 172]. Проблема такого мечения заключается в необходимости использовать разные реагенты: полинуклеотидкиназу и  $\gamma$ [ $^{32}\text{P}$ ]-АТФ для мечения по 5'-концу, и терминальную дезоксирибонуклеотидилтрансферазу и  $\alpha$ [ $^{32}\text{P}$ ]-ddАТФ для мечения по 3'-концу. Ферменты могут с разной эффективностью фосфорилировать концы ОДН, удельная активность фосфатных групп может различаться, что может вносить дополнительную ошибку в экспериментальные данные. Кроме того, образуется 4 продукта реакции, ни один из которых напрямую не отражает коррелированный поиск, что также увеличивает погрешность. В остальном этот метод соответствует методу, описанному далее.

Подход к изучению процессивности ДНК-гликозилаз, используемый в данной работе, представляет собой типичный ансамблевый метод, основанный на расщеплении ДНК-субстрата, позволяющего точно контролировать расстояние между специфическими сайтами расщепления, а также вводить в субстрат модификации практически любой химической природы (в том числе и разные поврежденные звенья в один субстрат), что делает метод применимым для исследования коррелированного поиска не только ферментами ЭРО, но также и другими белковыми факторами, связывающими и расщепляющими в ДНК специфические последовательности. Субстрат представляет собой одноцепочечный или двуцепочечный олигодезоксирибонуклеотид (ОДН) с двумя сайтами расщепления, разделенными неспецифической ДНК определенной длины, и  $^{32}\text{P}$ -радиоактивную метку в центре субстрата между сайтами. Субстрат конструируется лигированием двух коротких одноцепочечных ОДН, содержащих по одному повреждению в идентичном нуклеотидном контексте, отождествленных на комплементарной цепи. В условиях большого избытка субстрата над ферментом, когда вероятность того, что связавшаяся с субстратом молекула белка после диссоциации свяжется вновь с той же молекулой субстрата, крайне мала, будет формироваться 2 продукта расщепления по одному из сайтов (продукты P1 и P2, разной длины), и продукт расщепления по обоим сайтам (P3), соответствующий коррелированному поиску (рисунок 25, Б). По соотношению начальной скорости накопления P3 ( $v_{P3}$ ) к суммарной скорости расщепления субстрата ( $v_{P1} + v_{P2} + v_{P3}$ ), рассчитывается вероятность коррелированного расщепления ДНК  $P_{cc}$ . Величина  $P_{cc}$  зависит от природы исследуемого фермента и заданного расстояния между сайтами расщепления. Ранее этим методом были охарактеризованы механизмы поиска ДНК-гликозилазами Ung *E. coli* [173] и UNG человека [174], Fpg *E. coli* и OGG1 человека [175], эндонуклеазами Nfo *E. coli* и APEX1 человека [174].

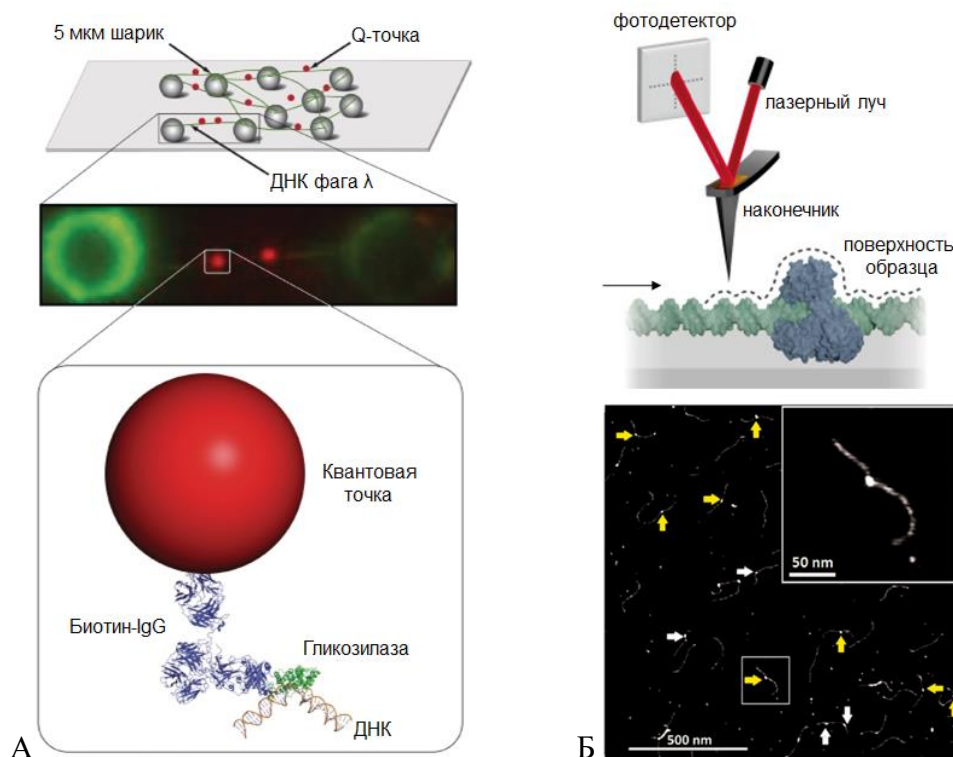


**Рисунок 25.** Биохимический метод изучения коррелированного расщепления. (А) — расщепление ОДН-субстрата, радиоактивно меченого по двум концам, (Б) — использованный в работе метод с радиоактивной меткой в середине ОДН. Сравнение продуктов реакции по одному из сайтов и по обоим сайтам. X — специфический сайт расщепления.

К одномолекулярным методам изучения механизмов транслокации белков по ДНК относятся одномолекулярная флуоресцентная микроскопия и атомно-силовая микроскопия, которые позволяют непосредственно следить за перемещением молекулы белка вдоль на ДНК в реальном времени. В методе одномолекулярной флуоресцентной микроскопии ведется наблюдение за белком, несущим флуоресцентную метку (органический флуорофор или флуоресцентный белок) или квантовую точку (флуоресцентный полупроводниковый нанокристалл) (рисунок 26, А), что позволяет из среднеквадратического смещения и интервала времени рассчитывать коэффициент одномерной диффузии белка. Наблюдение одномерного движения белковой молекулы ведется на ДНК, закрепленной с одного или двух концов на подложке между полимерными или  $\text{SiO}_2$  микробусинами. Возможности этого метода ограничиваются пространственной ( $\sim 60\text{--}200$  нм ( $200\text{--}600$  п. н.)) и временной ( $\sim 20\text{--}70$  мс) разрешающей способностью флуоресцентных микроскопов [176], а размер связанного с белком флуорофора может в несколько раз превышать размер самого белка, что может существенно влиять на динамику исследуемой молекулы. Существует ряд теоретических моделей для корректировки экспериментальных данных с учетом влияния размера метки на основе экспериментально установленных гидродинамических радиусов метки и исследуемого белка, жесткости и длины линкеров, характера одномерной диффузии [177].

Подход атомной силовой микроскопии состоит в сканировании поверхности макромолекул, иммобилизованных на подложке, сверхтонким вибрирующим наконечником (рисунок 26, Б). Изменения вибраций детектируются специальной оптической системой. Для изучения динамики взаимодействия макромолекул в растворе разработаны специальные

проточные камеры [178]. Метод обладает очень высоким пространственным разрешением ( $<1$  нм), но достаточно низким временным разрешением ( $\sim 80$  мс), что считается его основным недостатком [179].



**Рисунок 26.** (А) — одномолекулярная флуоресцентная микроскопия [180]. (Б) — атомная силовая микроскопия [181, 182].

Отличить «скольжение» и «перепрыгивание» экспериментально довольно сложно, поскольку белок остается тесно связанным с ДНК в обоих случаях. Методы визуализации одиночных молекул в таком случае не информативны, так как чтобы разделить два режима переноса недостаточно разрешения метода. В таком случае используют ансамблевые методы, где можно расположить препятствие для скольжения по ДНК [183–185], расположить мишени на противоположных цепях ДНК [171, 172] или оценить зависимость транслокации от концентрации молекулы-ловушки, захватывающей фермент при диссоциации с ДНК [186].

Еще одна группа методов изучения механизмов поиска основана на ЯМР-спектроскопии. Эти методы позволяют получить обширную информацию на атомном уровне о неспецифических взаимодействиях белков с ДНК во время перемещения с одного участка ДНК на другой. С помощью данных ЯМР можно получить структурную информацию о белках, оценить конформационную подвижность конкретных доменов или фрагментов белка, связанных с ДНК. С помощью данных ЯМР-релаксации можно определить динамическое поведение боковых цепей ДНК-белкового интерфейса [187]. С помощью ЯМР можно также получить данные о кинетике

транслокации белка по ДНК в состоянии равновесия. Диапазон кинетических констант скорости, которые можно определить с помощью ЯМР, составляет от 0,1 до 10 000 с<sup>-1</sup> [188].

**Таблица 6.** Сравнение экспериментальных подходов к изучению механизмов поиска мишеней белками в ДНК.<sup>1</sup>

Возможности метода	Биохимические методы	Одномолекулярные методы	ЯМР-спектроскопия
Кинетический анализ связывания белка с мишенью	+++	++	+
Кинетический анализ транслокации белка по ДНК	+++	++	++
Непосредственная визуализация белка на ДНК	–	+++	–
Взаимодействия на атомном уровне	–	–	+++
Анализ поиска мишеней в клетке	+	+++	+

<sup>1</sup> Обозначения: +++, подходящий метод; ++, осуществимый; +, применимый, но недостаточно изученный; –, неприменимый.

Так как каждый из подходов обладает своими ключевыми преимуществами (таблица 6), при этом некоторые подходы дают неоднозначные или противоречивые данные, накопление данных о механизмах транслокации с помощью как можно большего числа методов даст возможность приблизиться к пониманию фундаментальных свойств и процессов в живых системах.

### 2.5.2. Механизмы поиска мишеней ДНК-гликозилазами

К настоящему времени накоплено немало информации о механизмах поиска мишеней в ДНК различными белками. Изучено несколько эндонуклеаз рестрикции (EcoRI, EcoRV, HindIII, BamHI) [158, 171, 189–191], факторов транскрипции (p53, Egr-1) [192–195], но наиболее изученный класс белков, ищущих сайты в ДНК, — это ДНК-гликозилазы.

Несколько работ было выполнено по изучению процессивности UNG человека, лишённого 84 N-концевых неупорядоченных аминокислот (такой укороченный UNG полностью сохраняет каталитическую активность). Биохимическими методами было показано, что  $\Delta_{84}$ UNG осуществляет процессивный поиск, сочетая при этом слайдинг (в среднем на 4–5 п. н.), и хоппинг (в среднем на 10 п. н.).  $P_{\text{trans}}$  (расчетное значение эффективности одномерного поиска на субстрате с заданным расстоянием между сайтами, эквивалентное величинам  $P_{\text{cc}}$  и  $F_p$  в других работах) на субстрате с 5 п. н. между повреждениями составляло 0,75. Если разместить сайты расщепления на противоположных цепях,  $P_{\text{trans}}$  падало до 0,54, а также было более чувствительным к увеличению концентрации катионов, что указывает на механизм перехода к поиску в другой цепи посредством хоппинга. Также для механизма перепрыгивания был рассчитан радиус (1–7 нм) и показана очень высокая константа реассоциации ( $k_{\text{hop}} \sim 20 \times 10^6 \text{ с}^{-1}$ ). Константа одномерной диффузии составляла  $D_1 = 6,0 \times 10^3 \text{ п. н.}^2 \text{ с}^{-1} = 6,9 \times 10^{-4} \text{ мкм}^2 \text{ с}^{-1}$  [186].

Для изучения роли отрицательного заряда фосфодиэфирного остова ДНК на процессивный поиск UNG человека некоторые фосфатные группы были заменены на нейтральные метилфосфонатные. Замены снижали связывание с неспецифической ДНК, однако прерывание отрицательного заряда между сайтами не влияло на скольжение. Была предложена модель поиска, которая предполагает наличие двух конформационных состояний UNG — скользящей (слабые взаимодействия с остовом ДНК) и сканирующей (более сильные взаимодействия) [196].

Также UNG человека способна эффективно искать повреждения в одноцепочечной ДНК, причем средняя длина скольжения больше, чем для дцДНК. Введение в субстрат АП-сайтов между повреждениями также увеличивает длину скольжения (с 4 до 20 п. н.) за счет имитации специфических сайтов связывания и увеличения сродства к такому субстрату. Таким образом, механизм UNG в значительной степени зависит от контекста, в котором находятся повреждения [197].

Краудинг-эффект повышает эффективность одномерного трансфера UNG: добавление в реакционную смесь 20% ПЭГ 8000 увеличивает  $P_{\text{trans}}$  от 0,33 до 0,71 для субстрата с расстоянием 20 п. н. между повреждениями [198]. С помощью компьютерной симуляции было показано, что процессивность UNG также усиливает наличие 84 N-концевых неупорядоченных аминокислот. В этой последовательности располагаются два отдельных положительно заряженных участка, которые осуществляют неспецифические взаимодействия с ДНК, что увеличивает  $D_1$  белка по сравнению с его аналогом без N-концевой части. В присутствии краудинг-молекул наличие N-конца еще сильнее увеличивает эффективность одномерной диффузии [199]. Такие условия наиболее близко имитируют клеточные. В работе [200] была показана значимость N-концевой последовательности UNG для процессивного поиска биохимическим методом.

В работе [201] предприняли попытку измерить процессивность UNG в клетках человека. В клеточную линию HAP1 трансформировали флуоресцентно меченые олигонуклеотидные ДНК-субстраты с двумя сайтами урацила, в основном они локализовались в ядре и были доступны для ядерной изоформы UNG2. При подгонке данных клеточной и *in vitro* транслокации к распределению Гаусса были получены средние расстояния транслокации — 37 п. н. для измерений в клетке, и 22 и 8 п. н. в экспериментах *in vitro* в присутствии и отсутствии ПЭГ 8000 соответственно. В работе также дифференцировали вклад слайдинга и хоппинга на субстрате с 40 п. н. между сайтами урацила путем введения в клетки молекул свободного урацила в качестве ловушки для высвободившегося в процессе хоппинга фермента. При этом значение  $P_{\text{trans}}$  упало с 0,54 до 0,08, что указывает на использование внутриклеточной UNG исключительно механизма хоппинга.

Ung *E. coli* тоже осуществляет поиск урацила в ДНК посредством одномерной диффузии. В диапазоне расстояний между сайтами от 20 до 400 п. н. эффективность транслокации снижается с 0,41 до 0,07. Для расстояний 20 и 56 п. н. эффективность не падает, если повреждения расположены на разных цепях ДНК, таким образом, фермент использует хоппинг для передвижения на  $\geq 20$  п. н., а также для перехода к поиску повреждений в комплементарной цепи. Эффективное расстояние слайдинга оценивается в 10 п. н. [172]. Ung *E. coli* эффективно преодолевает короткие одноцепочечные бреши, а оценка данных транслокации в рамках теоретической модели случайного блуждания Белоцерковского-Зарлинг дала среднее характерное расстояние одномерного поиска  $\sim 100$  п. н. [202, 203].

С помощью атомно-силовой микроскопии для TDG человека визуализировали характер взаимодействия с неспецифической ДНК в процессе поиска. Данные показали наличие равновесия между двумя конформационными состояниями, в одном из которых TDG изгибает ДНК на  $30^\circ$ , а во втором — на  $70^\circ$ . Оба состояния наблюдаются при взаимодействии как с неспецифичной, так и с поврежденной ДНК, и переходят друг в друга в процессе сканирования [182]. Этот механизм согласуется с ранее предложенной моделью двух состояний для связанной с ДНК UNG [204].

Отдельные молекулы фермента OGG1 человека, диффундирующие вдоль ДНК, визуализировали методом флуоресцентной микроскопии. Эффективность транслокации зависит от концентрации соли; при концентрациях соли и рН, близких к физиологическим, время связывания с ДНК составляет доли секунды, а константа диффузии достигает  $5 \times 10^6$  п. н.<sup>2</sup> с<sup>-1</sup>. Такое значение приближается к теоретическому верхнему пределу одномерной диффузии. При такой  $D_1$  OGG1 может смещаться на 1 000 п. н. за 0,1 с, что соответствует 1 000 000 шагам случайного блуждания (1 шаг = 1 п. н.) [205].

По данным, полученным биохимическими методами, в процессе одномерной диффузии OGG1 осуществляет множественные микроскопические акты диссоциации. Из значений  $P_{\text{trans}}$  с помощью моделирования были получены параметры одного акта макроассоциации с ДНК. Среднее событие связывания состоит из четырех ассоциативных переносов (скольжений) и трех диссоциативных (перепрыгиваний), и в среднем длится 3 мс. В течение этого времени молекула OGG1 суммарно передвигается в среднем на 60 п. н., при этом одно движение скольжения составляет 9 п. н., а перепрыгивание — на 20 п. н. [185]. Добавление 20% ПЭГ 8000 увеличивало  $P_{\text{trans}}$  с 0,34 до 0,50 для субстрата с расстоянием 20 п. н. между повреждениями. [198]. При концентрации соли, приближенной к клеточным условиям (150 мМ  $K^+$ ) OGG1 не способен эффективно использовать процессивный поиск, однако эта способность в некоторой степени восстанавливается при добавлении краудинг-молекул [206].



С помощью одномолекулярной флуоресцентной микроскопии было показано, что скольжение сопряжено с вращением для 8 исследованных ДНК-связывающих белков (OGG1, MutY, Fpg, LacI, VamHI, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I, аденовирусный комплекс AVP–pVIc) [207]. Вероятно, такой механизм скольжения универсален.

Fpg и, в особенности, OGG1 демонстрировали более низкую процессивность на субстратах, содержащих специфическую пару 8-охоGua:Cyt, чем на субстратах с парой 8-охоGua:Ade, которую эти ферменты дискриминируют. Введение разрыва в ДНК-субстрат с расстоянием 20 п. н. между повреждениями не уменьшало  $P_{cc}$ , таким образом, поиск, вероятно, включает в себя перепрыгивание между соседними позициями на ДНК. Замены в Fpg интеркалирующего между цепями ДНК во время поиска остатка фенилаланина (F110A и F110W) приводили к снижению процессивности [175]. Одномолекулярной микроскопией с мечением белка квантовой точкой было показано, что механизм поиска Fpg (а также исследованных в этой же работе Nei и Nth) можно охарактеризовать как непрерывное движение с вращением вокруг ДНК, с переходом от медленной диффузии к быстрой в соответствии с моделью двух конформационных состояний, характерных и для других гликозилаз. Константы одномерной диффузии составляли  $0,023 \pm 0,005 \text{ мкм}^2 \text{ с}^{-1}$  для Fpg,  $0,034 \pm 0,010 \text{ мкм}^2 \text{ с}^{-1}$  для Nei и  $0,058 \pm 0,015 \text{ мкм}^2 \text{ с}^{-1}$  для Nth. У мутантной формы Fpg-F111A отсутствовало тесно связанное с ДНК сканирующее состояние, которое, вероятно, осуществляется непосредственно остатком фенилаланина [180]. Замену интеркалирующего остатка сделали также для Nei (Y72A) и Nth (L81A), получив сходный результат [208].

Процессивный поиск наблюдали для MutY *E. coli* с помощью анализа расщепления конкатемерных субстратов, содержащих специфические сайты Gua:Ade на расстоянии 25 п. н. Увеличение концентрации противоионов вызывало переход от процессивного к дистрибутивному поиску. На субстратах, содержащих пары 8-охоGua:Ade, для полноразмерного MutY процессивного поиска не наблюдалось, однако укороченная форма белка (N-концевые 225 аминокислот) ведет себя на субстрате 8-охоGua:Ade в соответствии с процессивным механизмом. Это связано с тем, что С-концевой домен MutY отвечает за связывание с 8-охоGua [209]. Диффузию его эукариотического гомолога MUTYH определяли флуоресцентной микроскопией. Было показано, что фермент быстро сканирует неспецифичную ДНК с константой диффузии  $0,01 \text{ мкм}^2 \text{ с}^{-1}$ , но при встрече с 8-охоGua:Ade возникают паузы — константа сильно снижается (до  $0,0001 \text{ мкм}^2 \text{ с}^{-1}$ ). Таких пауз на специфичных сайтах не возникает для мутантной формы MUTYH Y150C (Tyr165 — интеркалирующий остаток, который встраивается в дуплекс поврежденной ДНК) [210].

Алкиладенин-ДНК-гликозилаза AAG человека способна с высокой эффективностью осуществлять процессивный поиск при физиологических концентрациях солей. Делеция 80 N-

концевых аминокислот не снижает активность белка, но существенно снижает процессивность, таким образом, N-конец активно участвует в неспецифическом взаимодействии с ДНК [211]. Показано, что фермент использует механизм хоппинга чтобы обходить препятствия на ДНК, в частности размещенную между повреждениями димерную молекулу EcoRI AAG преодолевает с 50% эффективностью. Также посредством микродиссоциаций AAG может переходить на повреждение, расположенное в комплементарной цепи [184].

AAG — единственная гликозилаза, для которой изучен механизм интерсегментного трансфера. Хотя это мономерный белок, он тем не менее способен эффективно переходить на соседнюю молекулу ДНК, расположенную в непосредственной близости (в эксперименте две короткие молекулы ДНК, содержащих повреждения, были соединены линкером). Эффективность такого трансфера  $F_p$  достигает 0,6 при 200 мМ соли для полноразмерного белка, а  $F_p$  для  $\Delta_{80}$ AAG составляло 0,4 при 115 мМ NaCl, не изменялось в отсутствие линкера и не зависело от его длины, что свидетельствует о том, что N-конец не участвует в интерсегментном трансфере [160].

Помимо дцДНК, AAG способен удалять повреждения из оцДНК, однако, в отличие от двуцепочечных субстратов, во всех исследованных условиях поиск осуществлялся дистрибутивно. Одноцепочечные разрывы, «глазки» и изогнутая ДНК не мешают процессивному поиску, а в некоторых случаях при высокой концентрации соли даже повышают его. В целом для субстратов разной структуры значения  $F_p$  в присутствии 150–200 мМ NaCl достигают 0,9, но при повышении до 300 мМ падают до  $\leq 0,1$  [212]. Исследовав влияние нескольких аминокислотных замен положительно заряженных остатков на незаряженные на эффективность транслокации AAG, было выявлено две мутации (R182M, R197S), значительно снижающие способность AAG к одномерной диффузии [213]. Также было показано, что интеркаляция остатка тирозина 162 позволяет ферменту уже на ранних этапах поиска исследовать структуру на соответствие мишени и регулировать скорость диффузии [214].

Таким образом, практически все ранее исследованные ДНК-гликозилазы осуществляют поиск повреждений в ДНК с использованием механизмов одномерной диффузии, однако эффективность и характеристики этого процесса могут значительно отличаться у разных гликозилаз.

### 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 3.1. Общие материалы

В работе были использованы бычий сывороточный альбумин («New England Biolabs», США), MgSO<sub>4</sub>, («Sigma-Aldrich», США), HEPES («Helicon», Россия), dNTP («СибЭнзим», Россия),  $\gamma$ [<sup>32</sup>P]-АТФ с удельной активностью 1 МБк/мкл (Лаборатория биотехнологии ИХБФМ СО РАН), агароза, мочеви́на, борная кислота, *N,N'*-метиленбисакриламид, акриламид, персульфат аммония, *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин (TEMED), этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), глицерин, 1,4-дителиотреит (DTT), трис(гидроксиметил)аминометан (Tris), NaHPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KCl, MgCl<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl, изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (IPTG), 2-меркаптоэтанол, фенилметилсульфонил фторид (PMSF), кумасси R-250, краситель ксиленцианол, краситель бромфеноловый синий, формамид, бакто-агар, бакто-триптон, бакто-дрожжевой экстракт — все производства «MP Biomedicals» (США), остальные реактивы квалификации х. ч. и ос. ч. отечественного производства. Для всех экспериментов была использована бидистиллированная или деионизированная вода класса milliQ (18,2 МОм/см).

##### 3.1.1. Стандартные буферы и смеси

LB	10 г/л бакто-триптона, 5 г/л бакто-дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl
SOC	20 г/л бакто-триптона, 5 г/л бакто-дрожжевого экстракта, 20 мМ глюкоза, 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl <sub>2</sub> , 10 мМ MgSO <sub>4</sub>
TAE	40 мМ Tris–ацетат (pH 8,0), 1 мМ EDTA
TBE	90 мМ Tris, 90 мМ борная кислота, 2 мМ EDTA
TE	10 мМ Tris–HCl (pH 8,0), 1 мМ EDTA
FDLB	80%-ный (v/v) формамид, 20 мМ EDTA, 0,1%-ный (w/v) ксиленцианол, 0,1%-ный (w/v) бромфеноловый синий
SLB	2%-ный (w/v) SDS, 10%-ный (v/v) глицерин, 5%-ный (v/v) 2-меркаптоэтанол, 62,5 мМ Tris–HCl (pH 6,8), 0,1%-ный (w/v) бромфеноловый синий

##### 3.1.2. Ферменты

В работе использовали полинуклеотидкиназу бактериофага T4 (10 000 ед. акт./мл) производства «Биосан» (Россия), Ung из *E. coli* (2 000 ед. акт./мл) производства «СибЭнзим» (Россия) и «New England Biolabs» (США), ДНК-лигазу бактериофага T4 (200 000 ед. акт./мл) производства «Thermo Scientific» (США), эндонуклеазы рестрикции FauNDI («СибЭнзим») и

XhoI («Thermo Scientific»). Белки NEIL1 и NEIL2 мыши, выделенные по описанным методикам [48, 215], были предоставлены руководителем работы. Белки Nei *E. coli* и UNG вируса осповакцины были выделены лично соискателем по методикам, описанным в разделе «Методы».

### 3.1.3. Плазмиды и бактериальные штаммы

В работе использовали штаммы *E. coli* DH5 $\alpha$  (F<sup>-</sup> *supE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80 *lacZ*  $\Delta$ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*) и BL21(DE3) (F<sup>-</sup> *ompT* *gal* *dcm* *lon* *hsdS<sub>B</sub>*(*r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-*)  $\lambda$ (DE3 [*lacI* *lacUV5-T7p07* *ind1* *sam7* *nin5*]) [*malB*<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>( $\lambda$ S)) («Stratagene», США) из лабораторной коллекции. Все клетки хранили при –80°C в суспензии в 15%-ном глицерине до использования.

В работе использовали плазмиду pBluescriptII SK(–) со вставкой гена *D4R*, кодирующего UNG осповакцины (предоставлена С. Н. Щелкуновым и И. П. Гилевой, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор») и pET-15b («Thermo Scientific») для суперпродукции белков в клетках *E. coli*. Плазида pET-24b со вставкой последовательности, кодирующей Nei *E. coli*, была предоставлена руководителем работы.

### 3.1.4. Олигодезоксирибонуклеотиды

В работе использовали олигодезоксинуклеотиды (ОДН) следующих последовательностей (Таблица 7), синтезированные в Лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН. Для синтеза ОДН использовались коммерчески доступные фосфорамидиты («Glen Research», США).

Для синтеза ОДН с T-FAM (рисунок 36, Б(I)) использовали коммерчески доступный фосфорамидит («GlenResearch», США). Триплексобразующий олигонуклеотидный лиганд (рисунок 36, Б (II)), синтезированный по методике [216], был предоставлен к. х. н. П. Е. Воробьевым (ИХБФМ СО РАН), малобороздочный лиганд (рисунок 36, Б (III)), синтезированный по методике [217] — к. х. н. В. А. Рябининым (ИХБФМ СО РАН).

Для обозначения двуцепочечных ОДН по тексту указываются коды цепей, разделенные двумя косыми чертами (напр., X1//C1). Продукты лигирования ОДН указываются кодами цепей, разделенными тире (напр., X1–X2; X1–X2//comG). Положение радиоактивного фосфата при необходимости обозначено звездочкой (напр., X1–X2\*).

Таблица 7. ОДН, использованные в работе

Код	Последовательность ОДН, 5'→3'	Длина	Модификация
X1	TCCCTTCXCTCCTTTCCCTTC	20	X = Ura, OHU
X2	GGACTTCXCTCCTTTCCAGA	20	X = Ura, OHU
C1	GAAGGAAAGGAGCGAAGGGA	20	
C2	TCTGGAAAGGAGCGAAGTCC	20	
G1	GAAGGAAAGGAGGGAAGGGA	20	
G2	TCTGGAAAGGAGGGAAGTCC	20	
comG	TCTGGAAAGGAGGGAAGTCCGAAGGAAAGGAGGGAAGGGA	40	
comC	TCTGGAAAGGAGCGAAGTCCGAAGGAAAGGAGCGAAGGGA	40	
X1+1	TCCCTTCXCTCCTTTCCCTTC	21	X = Ura, OHU
comG+1	TCTGGAAAGGAGGGAAGTCCGAAGGAAAGGAGGGAAGGGA	41	
L40	pGGACTTTACTTGCCTTAGAGC	21	
comG40	TCTGGAAAGGAGGGAAGTCCGCTCTAACGCAAGTAAAGTCCGAAGGAAAGGAGGGAAGGGA	61	
L60	pGGACCTTTTCATTTGTGCGATCTTTCCCTCTCGTTCCAGACCTC	41	
comG60 (1)	pGATCGCACAAATGAAAGTCCGAAGGAAAGGAGGGAAGGGA	41	
comG60 (2)	TCTGGAAAGGAGGGAAGTCCGAGGTCTGAACGAGAGGAAA	40	
L80	pGGACCTTTTCATTTGTGCGATGAGTGAATTTCCGGATTCTAGCTTTCCCTCTCGTTCCAGACCTC	61	
comG80 (1)	pAAATTCACTCATCGCACAAATGAAAGTCCGAAGGAAAGGAGGGAAGGGA	50	
comG80 (2)	TCTGGAAAGGAGGGAAGTCCGAGGTCTGAACGAGAGGAAAGCTAAATCCCG	51	
comBub	TCTGGAAAGGAGATGGACTAACGAACCAAGTAGAAGGGA	40	
com30	AAAGGAGCGAAGTCCGAAGGAAAGGAGCGA	30	
g0 (1)	TCTGGAAAGGAGGGAAGTCC	20	
g0 (2)	GAAGGAAAGGAGGGAAGGGA	20	
g2 (1)	TCTGGAAAGGAGGGAAGTCC	19	
g2 (2)	AAGGAAAGGAGGGAAGGGA	19	
g4 (1)	TCTGGAAAGGAGGGAAGT	18	
g4 (2)	AGGAAAGGAGGGAAGGGA	18	
g6 (1)	TCTGGAAAGGAGGGAAG	17	
g6 (2)	GGAAAGGAGGGAAGGGA	17	
Com46	TTTTCTGGAAAGGAGCGAAGTCCGAAGGAAAGGAGCGAAGGGATTT	46	
Proc (T-FAM)	TCCCTTCXCTCCTTTCCCTTCYACTTCXCTCCTTTCCAGA	40	X = Ura, Y = T-FAM
comA	TCTGGAAAGGAGAGAAGTCAGAAGGAAAGGAGAGAAGGGA	40	
13C	Cy3-CCTTCCCTCCTTT		
13T	Cy3-CCTTCTCTCCTTT		
13F	Cy3-CCTTCTCTCCTTT		F
13comG	AAAGGAGGGAAGG		
13comA	AAAGGAGAGAAGG		

Таблица 8. Схематичное изображение субстратов, использованных в работе<sup>1,2</sup>

Тип эксперимента	Олигонуклеотидные субстраты	
Определение кинетических параметров (1) — Nei, mNEIL1 и mNEIL2; (2) — vvUNG		
Коррелированное расщепление субстратов в присутствии ионов K <sup>+</sup> и Mg <sup>2+</sup> , (1) — Nei, NEIL1, NEIL2 и vvUNG; (2) — Ung <i>E. coli</i>		

Коррелированное расщепление субстратов NEIL2	
Зависимость $P_{cc}$ от расстояния между повреждениями ферментами Nei, mNEIL1, vvUNG	
Зависимость $P_{cc}$ vvUNG от размера брешы в противоположной цепи	
Влияние ингибиторов на (1) — активность vvUNG, (2) — процессивность vvUNG	
Коррелированное расщепление Ung в присутствии (1) — ковалентного аддукта и (2) — бороздочных лигандов	

<sup>1</sup> для обозначения ОДН использованы их кодовые названия из таблицы 7.

<sup>2</sup> X — поврежденное основание, \* — <sup>32</sup>P.

## 3.2. Методы

### 3.2.1. Выделение Nei E. coli

Для выделения полноразмерного Nei *E. coli*, плазида pET-24b-Nei [218] была трансформирована в клетки *E. coli* штамма BL21(DE3). Клетки выращивали в 25 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина, при 37°C на качалке при 250 об./мин в течение ночи. Для наработки рекомбинантного белка Nei 20 мл ночной культуры инокулировали в 2 л среды LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина. Культуру выращивали при 37°C до оптической плотности  $A_{595} = 0,6$ . После этого индуцировали синтез рекомбинантного белка добавлением IPTG до концентрации 1 mM и продолжали рост культуры в течение 3 ч. в тех же условиях. Бактериальный осадок собирали центрифугированием при  $6000 \times g$  в течение 10 мин при 4°C и ресуспендировали в 40 мл буфера (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 500 mM NaCl). К суспензии добавляли 1 mM PMSF и разрушали клетки с помощью ультразвука («Qsonica», США) на льду в режиме 12 импульсов по 15 с, интервал между импульсами 45 с. Лизат центрифугировали  $15000 \times g$  в течение 20 мин при 4°C. К супернатанту добавляли кристаллический  $(NH_4)_2SO_4$  до 80% насыщения и инкубировали 2 ч. на льду с последующим центрифугированием в тех же условиях. Белковый осадок растворяли в 200 мл буфера А (25 mM HEPES-NaOH (pH 7,5), 1 mM EDTA; 1 mM DTT). Раствор фильтровали с помощью 0,45 мкм фильтров («Merck Millipore», Burlington, MA) и наносили на колонку с SP-сефарозой (25 мл) («GE», США), предварительно уравновешенную буфером А с использованием хроматографа (AKTA Purifier, «GE»). После нанесения белка колонку промывали 75 мл буфера А. Элюцию вели в градиенте 0–1 M NaCl в буфере А (объем градиента 100 мл). Фракции анализировали электрофорезом в системе Лэммли. Содержащие целевой белок фракции объединяли, разбавляли буфером А до концентрации NaCl ~50 mM, и загружали на колонку с гепарином (5 мл, HiTrap Heparin Sepharose column («GE», США). Колонку промывали 15 мл буфера А, элюировали в градиенте 0–1 M NaCl в буфере А (объем градиента 25 мл). Фракции ожидаемой подвижности, содержавшие гомогенный Nei, объединяли и диализовали в течение ночи против буфера (20 mM Na-фосфат (pH 7,5), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50%-ный глицерин (v/v)). Общую концентрацию белка определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop One («Thermo Scientific»). Белок хранили при –20°C.

### 3.2.2. Определение кинетических параметров реакции Nei, NEIL1 и NEIL2

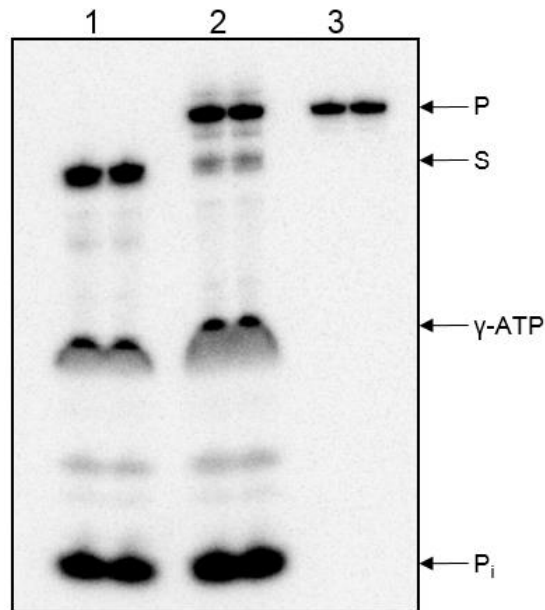
Кинетические параметры ферментов Nei, NEIL1 и NEIL2 определяли на двуцепочечных субстратах X1\*//C1 и X2\*//C2 с АП-сайтами в качестве повреждения. Для образования АП-

сайтов урацил-содержащие ОДН (100 пмоль) обрабатывали 10 ед. акт. Ung *E. coli* в течение 10 мин при 37°C непосредственно перед реакциями. Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 25 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT и двуцепочечный ОДН субстрат, концентрацию которого варьировали в диапазоне 5–500 нМ с использованием изотопного разбавления: каждая реакция содержала 5 нМ радиоактивно меченого субстрата и немеченый субстрат до нужной концентрации. Эндонуклеазы VIII перед добавлением разбавляли в 0,5× реакционном буфере с добавлением 0,5 мг/мл BSA; конечная концентрация фермента в реакционной смеси составляла 5 нМ для Nei и NEIL1, 10 нМ для NEIL2. После добавления фермента реакционную смесь инкубировали в течение 5 мин при 37°C, затем останавливали реакцию добавлением 5 мкл раствора FDLB, прогревали 1 мин при 95°C. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20% ПААГ. Полученные экспериментальные данные описывали уравнением Михаэлиса–Ментен, параметры уравнения определяли из данных 2 независимых экспериментов нелинейной регрессией гиперболической функции в программе SigmaPlot.

### ***3.2.3. Получение олигонуклеотидных субстратов для изучения коррелированного расщепления***

Для приготовления двуцепочечного субстрата длиной 40 п. н. с двумя повреждениями и радиоактивной меткой между ними, 200 пмоль радиоактивно меченого ОДН X2\*, содержащего 5-ОН-Ura или Ura в качестве повреждения, смешивали с 1,5-кратным молярным избытком немеченого X1, также содержащего повреждение, и с таким же избытком комплементарного comG/comC. Отжиг цепей производили прогреванием смеси в течение 2 мин при 95°C, затем термостат выключали и инкубировали до его остывания. После отжига в реакционную смесь добавляли АТР до 2 мМ и 40 ед. акт. лигазы фага T4, и помещали в 4°C на ночь. Затем в лигазную смесь добавляли равный объем формамида, лигированный продукт отделяли электрофорезом в 20%-ном денатурирующем ПААГ с последующей элюцией из геля буфером (100 мМ Tris-HCl (pH 7,5) и 1 мМ EDTA) и хроматографической очисткой на колонке с сорбентом C<sub>18</sub> NenSorб («DuPont», США). Выход определяли в 20%-ном денатурирующем ПААГ, анализируя образцы после фосфорилирования, после лигирования и после элюции из геля (рисунок 27). Схематичное изображение этого и всех последующих субстратов, использованных в работе, приведено в таблице 8.





**Рисунок 27.** Приготовление лигированного очищенного ОДН-субстрата, содержащего два повреждения. Радиоавтограф полиакриламидного геля. Дорожка 1 — радиоактивно меченый ОДН X2\* длиной 20 нт (S), 2 — субстрат X1-X2\*/comG длиной 40 п. н. после лигирования, 3 — субстрат длиной 40 нт после очистки из геля (P). γ-АТР — [<sup>32</sup>P]-АТР, P<sub>i</sub> — не включившийся радиоактивный фосфат.

Одноцепочечный субстрат длиной 40 нт был приготовлен аналогично, но в качестве комплементарной цепи использовали ОДН com30 для достижения полного разделения меченой и комплементарной цепей в геле в процессе очистки. Для получения субстрата структуры «глазка» одноцепочечный ОДН отжигали с комплементом comVub. Для получения субстратов, содержащих нуклеотидные бреши разной длины, лигированный одноцепочечный ОДН отжигали с 1,5-кратным молярным избытком комплементарных цепей: с g0(1) и g0(2) для формирования одноцепочечного разрыва в комплементарной цепи, с g2(1) и g2(2) для получения бреши размером 2 нт, с g4(1) и g4(2) для получения бреши размером 4 нт, с g6(1) и g6(2) для получения бреши в 6 нт

Двухцепочечный субстрат длиной 41 п. н. с расстоянием между повреждениями в 20 п. н. (X1+1)-X2\*/(comG+1) был приготовлен как описано выше, с отжигом [<sup>32</sup>P]-X2, избытка ОДН X1+1 и comG+1. Для субстрата длиной 61 п. н. X1-L40-X2\*/com40 с расстоянием в 40 п. н. между сайтами, X2\* отжигали с X1, 5'-фосфорилированным спейсером L40, формирующим промежуточную последовательность между X1 и X2, и комплементарной цепью com40. Субстраты длиной 41 и 61 п. н. лигировали и очищали из денатурирующего 20 или 12% ПААГ, затем снова добавляли избыток комплемента и повторно отжигали.

Для субстрата длиной 81 п. н. X1-L60-X2\*/comG60(1)-comG60(2) с расстоянием в 60 п. н. между сайтами, X2\* отжигали с X1, 5'-фосфорилированным спейсером L60, и двумя комплементарными цепями: 5'-фосфорилированной comG60(1) и не фосфорилированной comG60(2). Для субстрата длиной 101 п. н. X1-L80-X2\*/comG80(1)-comG80(2) с расстоянием в

80 п. н. между сайтами, X2\* отжигали с X1, 5'-фосфорилированным спейсером L80, и двумя комплементарными цепями: 5'-фосфорилированной comG80(1) и не фосфорилированной comG80(2). Субстраты длиной 81 и 101 п. н. лигировали и очищали электрофорезом в неденатурирующем 8% ПААГ при 4°C и элюцией из геля. После очистки смеси, содержащие по две длинных лигированных цепи, повторно отжигали.

### 3.2.4. *Изучение коррелированного расщепления субстратов ферментами Nei, NEIL1 и NEIL2*

Методика изучения коррелированного расщепления в данной работе была сходной с описанной ранее в работах [175, 202].

Для изучения коррелированного расщепления ферментами Nei, NEIL1 и NEIL2 и определения его зависимости от концентрации KCl и MgCl<sub>2</sub>, реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 50 нМ необходимый субстрат, буфер (25 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ DTT, 1 мМ EDTA) и KCl (0–200 мМ) или MgCl<sub>2</sub> (0–25 мМ). Реакции с NEIL2 на одноцепочечном субстрате и «глазке» не содержали соли. Зависимость коррелированного расщепления от расстояния между повреждениями для Nei и NEIL1 изучалась в присутствии 25 мМ KCl.

Реакцию запускали добавлением оптимальной концентрации ферментов — 5 нМ для Nei и NEIL1, 10 нМ для NEIL2. Буфер для разведения белков содержал 0,5× реакционный буфер и 0,5 мкг/мл BSA. Концентрации ферментов подбирались так, чтобы субстрат в реакционной смеси содержался в большом избытке относительно фермента, и в ходе реакции зависимость накопления продукта от времени была линейной. Реакционные смеси инкубировали при 37°C и отбирали аликвоты по 2,5 мкл через 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 5, 7 и 10 мин в пробирки, содержащие по 2,5 мкл FDLB. Проводили 3–6 повторов для каждого эксперимента. Перед нанесением на гель все смеси прогревали при 95°C в течение 2 мин. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20%-ном денатурирующем ПААГ для субстратов длиной 40 и 41 п. н., субстраты большей длины анализировали в 8% денатурирующем ПААГ. Анализ полученных данных производили с использованием программы SigmaPlot. Начальную скорость накопления продуктов реакции определяли из угла наклона зависимости их концентрации от времени. Вероятность коррелированного расщепления (Probability of correlated cleavage,  $P_{cc}$ ) рассчитывали как  $P_{cc} = v_{p3}/(v_{p1}+v_{p2}+v_{p3})$ , где  $v_{p1}$  и  $v_{p2}$  — начальные скорости накопления продуктов реакции по одному сайту,  $v_{p3}$  — начальная скорость накопления продукта расщепления по обоим сайтам.

### 3.2.5. **Компьютерный анализ и анализ поверхностного заряда белков *Nei E. coli* и *NEIL1* человека**

Выравнивание аминокислотных последовательностей белков суперсемейства H2TH с использованием информации о структурах проводили с помощью Promals3D [219].

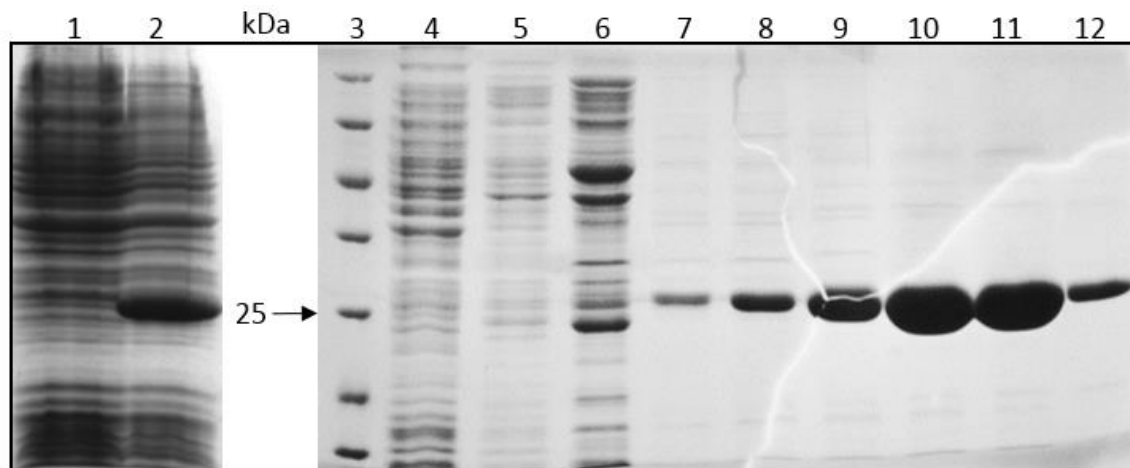
Для расчета электростатического потенциала поверхности белков из файлов pdb-структур NEIL1 человека (Protein Data Bank ID 5ITU [220] и *Nei E. coli* (1K3W [74]) удаляли ДНК, полученные структуры белков сохраняли в формате pdb и использовали их для создания файлов формата pqr, содержащих данные о зарядах атомов аминокислотных остатков на поверхности белка. Файлы pqr создавались при помощи PDB2PQR v3.5.2 (<https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr>) с последующей обработкой Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS v3.4.1) [221] со следующими параметрами: pH 7,5 (с использованием модуля PROPKA), 0,01 М концентрация свободных ионов, радиус 2.0 Å. Для визуализации использовали PyMol v1.2.8 («DeLano Scientific», США).

### 3.2.6. **Клонирование гена *D4R* в экспрессионный вектор и выделение *vvUNG***

Вставка гена *D4R*, кодирующего *vvUNG*, была наработана с плазмиды pBluescript II SK(-)-*D4R* с помощью ПЦР-амплификации и клонирована в вектор pET-15b по сайтам рестрикции *Fau*NDI и *Xho*I. Полученный конструктор кодирует полноразмерный белок с N-концевым пептидом His<sub>6</sub>. Продукт лигирования нарабатывали с помощью набора для выделения плазмидной ДНК Qiagen Plasmid Mini Kit (Германия), секвенировали (ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН) и трансформировали в клетки *E. coli* штамма BL21(DE3).

Клетки выращивали в 20 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, при 37°C на качалке при 250 об./мин в течение ночи. Затем 10 мл ночной культуры инокулировали в 1 л среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Клетки выращивали при 37°C до оптической плотности  $A_{595} = 0,6$ , затем опускали температуру до 25°C. Индуцировали синтез белка добавлением 0,5 мМ IPTG и инкубацией в течение ночи. Клетки бактерий центрифугировали при 6000×g в течение 10 мин при 4°C и ресуспендировали в буфере (10 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 1 мМ EDTA, 500ммМ NaCl), содержащем 1 мМ PMSF. Клетки лизировали на льду с помощью ультразвука (12 импульсов по 15 с, интервал между импульсами 45 с), лизат центрифугировали 15000×g в течение 20 мин при 4°C. Белки супернатанта осаждали 60% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> на льду при перемешивании в течение 2 ч, затем центрифугировали в тех же условиях. Белковый осадок ресуспендировали в 20 мл буфера А (20 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 500 мМ NaCl), фильтровали с помощью 0,45 мкм фильтров и наносили на уравновешенную буфером А колонку, заряженную

ионами  $\text{Ni}^{2+}$  (HiTrap Chelating HP 5 мл). После нанесения промывали колонку 10 мл буфера А и 10 мл буфера А с 50 мМ имидазолом. Элюцию вели в градиенте 50–500 мМ имидазола в буфере А (объем градиента 25 мл). Фракции анализировали электрофорезом в системе Лэммли (рисунок 28). Концентрацию очищенного белка UNG определяли методом Брэдфорда (реагент производства «Sigma-Aldrich») с использованием BSA для построения калибровочной кривой. Очищенный белок разделили на аликвоты по 50 мкл и хранили при  $-80^\circ\text{C}$ .



**Рисунок 28.** Нарботка и очистка белка vvUNG. Дорожка 1 — клеточный экстракт до индукции, 2 — после индукции IPTG, 3 — белковый маркер (#26610, «Thermo Scientific»), 4 — «проскок» при нанесении на 5 мл колонку, заряженную  $\text{Ni}^{2+}$ , 5 — промывка буфером А, 6 — промывка буфером А с 50 мМ имидазолом, 7–12 — фракции.

### 3.2.7. *Определение кинетических параметров реакции vvUNG*

Кинетические параметры vvUNG определяли на одноцепочечных субстратах X1\* и X2\*, содержащих урацил в качестве повреждения. Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 25 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT и субстрат, концентрацию которого варьировали в диапазоне 50–2500 нМ с использованием изотопного разбавления: каждая реакция содержала 50 нМ радиоактивно меченого субстрата и немеченый субстрат до нужной концентрации. Конечная концентрация фермента в реакционной смеси составляла 0,12 нМ. После добавления фермента реакционную смесь инкубировали в течение 5 мин при  $37^\circ\text{C}$ , затем останавливали реакцию добавлением 1 мкл 1 М NaOH. Пробирки прогревали в течение 2 мин при  $95^\circ\text{C}$ , затем нейтрализовали NaOH эквимолярным количеством HCl и добавляли 5 мкл FDLB. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях. Полученные экспериментальные данные описывали уравнением Михаэлиса–Ментен, параметры уравнения определяли из данных 3 независимых экспериментов нелинейной регрессией гиперболической функции в программе SigmaPlot.

### **3.2.8. *Определение сродства vvUNG к ДНК методом микромасштабного термофореза***

Реакционные смеси общим объемом 10 мкл содержали 50 нМ Су-3-меченый олигонуклеотидный лиганд (13С, 13Т, 13F, 13С//13comG, 13Т//13comA, 13F//13comG, 13F//13comA), 0,17–30 мкМ vvUNG, буфер (25 мМ Tris–HCl (pH 7,5), 50 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 5% (v/v) глицерина и 0,05% Tween 20). Измерения проводились с использованием стандартных капилляров в приборе Monolith NT.115 («NanoTemper Technologies», Германия), оснащенный красным/зеленым каналом детектирования и инфракрасным лазером, при 25°C. Полученные экспериментальные данные 3 независимых экспериментов описывали по модели связывания лиганда с одним сайтом связывания в программе SigmaPlot.

### **3.2.9. *Изучение влияния на коррелированное расщепление vvUNG концентрации катионов, брешей разной длины, расстояния между сайтами***

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 50 нМ субстрат нужной структуры (схемы субстратов представлены в таблице 8), буфер (25 мМ Tris–HCl (pH 7,5), 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT) и, если требовалось, 10–200 мМ KCl или 5–20 мМ MgCl<sub>2</sub>. Эксперименты с вариацией длины брешки и расстояния между сайтами проводились в отсутствие соли. Реакцию инициировали добавлением 0,12 нМ vvUNG. Реакционные смеси инкубировали при 37°C и отбирали аликвоты по 2,5 мкл через 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 5, 7 и 10 мин в пробирки, содержащие по 1 мкл 1 М NaOH. Пробирки прогревали в течение 2 мин при 95°C, затем нейтрализовали NaOH эквимольным количеством HCl и добавляли 5 мкл FDLB, прогревали при 95°C в течение 5 мин. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях. Обсчет результатов и расчет  $P_{cc}$  проводили так же, как описано ранее.

### **3.2.10. *Определение вероятности удаления поврежденного основания $P_E$ методом остановленной струи***

Оценку вероятности эксцизии урацила vvUNG проводили, как описано в [172, 186] для UNG *E. coli* и человека. Реакции проводили на трехшприцевом аппарате быстрого химического гашения RQF3 («Kintek», США) при 37°C в реакционном буфере (25 мМ Tris–HCl (pH 7,5), 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT и 0,1 мг/мл BSA). Конечная концентрация фермента составляла 2 мкМ, радиоактивно меченого субстрата X2\*/C2 — 20 нМ. В приборе смешивали равные объемы фермента и субстрата (~14 мкл), и через 2,5 мс реакцию гасили щелочью (200 мМ NaOH) для получения значения базовой линии расщепления  $P_q$  (см. схему эксперимента на рисунке 41), или промывали раствором молекулы-ловушки (3,8 мг/мл гепарин) для связывания всех

высвободивших субстрат молекул фермента. После добавления ловушки реакции останавливали через 5, 10, 15 и 20 с добавлением 200 мМ NaOH, затем все пробирки прогревали в течение 5 мин при 95°C и нейтрализовали эквимолярным количеством HCl. Фракции объемом ~90 мкл упаривали с помощью концентратора SpeedVac («Savant» SVC 100H, США) и смешивали с FDLB. Продукты реакции разделяли с помощью 20% денатурирующего электрофореза и визуализировали с помощью люминофора (Amersham Typhoon 5, «GE Healthcare», США). Все временные точки повторялись 3–5 раз. Эксперимент проводился в Отделении молекулярной и радиационной биофизики НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ.

### 3.2.11. Моделирование одномерного блуждания *uvUNG* по ДНК

На конечной одномерной решетке длиной  $L$  ( $L = 40, 41, 61, 81$  или  $101$ ) с двумя выбранными узлами А (позиция 8) и Б (позиция 28, 29, 49, 69 или 89) было смоделировано случайное блуждание частицы размером в единицу решетки, которое начиналось в точке А или Б. Частица может быть потеряна на каждом шаге из внутренней позиции решетки с вероятностью  $p_{\text{off}}$  и из терминальной позиции с большей вероятностью  $p_{\text{off}}+p_{\text{end}}$  (если  $p_{\text{off}}+p_{\text{end}} > 1$ , тогда суммарная вероятность падения с конца при моделировании принималась за 1). В остальных случаях частица перемещается в любую из двух соседних позиций решетки на каждом шаге с равной вероятностью. На первой итерации была сгенерирована матрица  $6 \times 6$  со значениями  $p_{\text{off}}$  и  $p_{\text{end}}$ , равномерно распределенными между 0 и 1. Для каждой пары  $p_{\text{off}}/p_{\text{end}}$  было сделано 10 000 проходов от А к Б и 10 000 проходов от Б к А до достижения успеха (завершения прохода в выбранной конечной точке) или потери частицы, и подсчитали количество успешных проходов в каждой группе из 100 проходов. Таким образом, были получены 200 смоделированных транслокационных вероятностей  $P_{\text{Tsim}}$ . Пару  $p_{\text{off}}/p_{\text{end}}$ , которая давала наименьшую сумму квадратов отличий  $P_{\text{Tsim}}$  от экспериментальных значений  $P_{\text{T}}$  ( $S = \sum (P_{\text{Tsim}} - P_{\text{T}})^2$ ) по всем симуляциям для пяти решеток, переносили в следующий раунд. При этом  $p_{\text{off}}$  и  $p_{\text{end}}$ , смежные с лучшей парой в матрице, были взяты в качестве границ для создания новой матрицы  $6 \times 6$ . Итерации продолжались до тех пор, пока стандартное отклонение всех значений  $S$  в матрице не стало меньше 0,1 от  $S$  для лучшей пары  $p_{\text{off}}/p_{\text{end}}$ , что заняло 7–8 раундов. Было проведено десять таких симуляций, средние значения  $p_{\text{off}}$  и  $p_{\text{end}}$  были взяты в качестве окончательных. На последнем этапе с этой парой  $p_{\text{off}}/p_{\text{end}}$  было смоделировано 10 000 переходов от А к В и 10 000 переходов от В к А, как описано выше, для получения распределения  $P_{\text{Tsim}}$ . Вся процедура реализована с помощью скрипта на языке Python.

### ***3.2.12. Изучение влияния ингибиторов на активность vvUNG***

Соединения, идентифицированные с помощью молекулярного докинга как потенциальные ингибиторы UNG человека [222], были предоставлены «Vitas-M Laboratory» (КНР). Реакционная смесь общим объемом 10 мкл содержала 25 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ DTT, 1 мМ EDTA, 50 нМ <sup>32</sup>P-меченый одноцепочечный субстрат X2\*, 20 пМ фермент vvUNG и ингибиторы в концентрации 10, 100 или 1000 мкМ. Реакцию проводили при 37°C в течение 10 мин, затем останавливали добавлением 1 мкл 1 М NaOH и прогреванием в течение 2 мин при 95°C. NaOH нейтрализовали эквимолярным количеством HCl и добавляли 5 мкл FDLB, перед нанесением на гель прогревали при 95°C в течение 5 мин. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях.

### ***3.2.13. Изучение влияния ингибиторов на процессивность vvUNG***

Реакционная смесь общим объемом 25 мкл содержала 25 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ DTT, 1 мМ EDTA, 50 нМ двуцепочечный субстрат X1-X2\*//comG, 0,12 нМ vvUNG и ингибиторы в концентрации 10, 100 или 1000 мкМ. Реакционные смеси инкубировали при 37°C и отбирали аликвоты по 2,5 мкл через 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 5, 7 и 10 мин в пробирки, содержащие по 1 мкл 1 М NaOH. Пробирки прогревали в течение 2 мин при 95°C, затем нейтрализовали NaOH эквимолярным количеством HCl и добавляли 5 мкл FDLB, прогревали при 95°C в течение 5 мин. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях.

### ***3.2.14. Изучение коррелированного расщепления Ung E. coli в присутствии ковалентного аддукта и нековалентных лигандов малой и большой бороздок ДНК***

Для изучения влияния ковалентного аддукта T-FAM на коррелированный поиск мишеней ферментом Ung *E. coli* реакционные смеси общим объемом 50 мкл содержали 100 нМ двуцепочечный субстрат Proc(T-FAM)//Comp(A) или одноцепочечный субстрат Proc(T-FAM), буфер (25 мМ фосфат натрия (pH 7,5), 1 мМ DTT, 2 мМ EDTA), 0–200 мМ KCl и 0,04 ед. акт. Ung *E. coli*. Реакционные смеси инкубировали при 37°C и отбирали аликвоты по 5 мкл через 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 5, 7 и 10 мин в пробирки, содержащие по 1 мкл 1 М NaOH. Пробирки прогревали в течение 2 мин при 95°C, затем нейтрализовали NaOH эквимолярным количеством HCl и добавляли 5 мкл формамида, прогревали при 95°C в течение 5 мин. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях. Анализ полученных данных производили с использованием программы SigmaPlot.

Для изучения влияния нековалентных лигандов реакционные смеси содержали 25 мМ Na-фосфатный буфер (pH 7,5), 1 мМ DTT, 1 мМ EDTA, 50 нМ ДНК-субстрат, 0,04 ед. акт./мл Ung и исследуемые лиганды в концентрации 0–50 мкМ (малобороздочный лиганд) или 0–100 мкМ

(триплексообразующий лиганд). Реакцию проводили при 37°C, скорости реакции и значения  $P_{cc}$  определяли после электрофоретического разделения продуктов реакции.



## 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1. Механизмы поиска повреждений ферментами суперсемейства H2TH

Бактериальные ферменты Fpg и эндонуклеаза VIII (Nei), их гомологи из животных NEIL1, NEIL2 и NEIL3 и ДНК-гликозилазы растений MMH образуют структурное суперсемейство «спираль — два поворота — спираль» (H2TH). Белки NEIL узнают и удаляют окисленные основания, но обладают субстратной специфичностью, перекрывающейся с некоторыми другими эукариотическими гликозилазами (OGG1, NTHL1), и не принадлежат к числу критически важных для выживания организма. Несмотря на то, что эти ферменты хорошо охарактеризованы биохимически, открытым остается вопрос об основной роли каждого из них в жизненном цикле клетки. К настоящему времени было показано, что NEIL1 взаимодействует с некоторыми репликативными белками, активируется в S-фазе и, вероятно, удаляет поврежденные основания в двуцепочечной ДНК во время репликации [43, 55, 61–64]. NEIL2 предпочитает одноцепочечную ДНК и структуры типа «глазок», взаимодействует с РНК-полимеразой II и регулятором транскрипции HNRNPU, и его репаративная функция может быть сопряжена с транскрипцией [54, 65–67]. NEIL3 проявляет предпочтение к одноцепочечной ДНК и некоторым типам межцепочечных сшивок, и, возможно, осуществляет какую-то специализированную функцию в репарации [59, 69, 70, 83].

Данные о механизмах поиска мишеней ферментами Nei и NEIL помогли бы дополнить существующее представление о роли этих ферментов для клетки. В настоящее время опубликовано всего три работы, посвященные этому аспекту: для Nei *E. coli* ранее получена константа диффузии методом одномолекулярной микроскопии [180, 208], а процессивность NEIL1 человека была недавно охарактеризована биохимическими методами на плазмидном субстрате [223]. Механизмы поиска для NEIL2 ранее не изучались. В данном разделе работы были исследованы механизмы поиска повреждений ферментами Nei *E. coli*, NEIL1 и NEIL2 мыши.

Для изучения процессивности ферментов Nei и NEIL в работе был использован метод, основанный на измерении вероятности коррелированного расщепления олигонуклеотидного субстрата, содержащего два сайта узнавания ферментом. Если субстрат находится в избытке, событие, когда фермент после одного акта катализа полностью высвободил ДНК и затем снова связался с той же молекулой ДНК, маловероятно. Таким образом, расщепление одной молекулы ДНК по двум сайтам в начальной линейной фазе накопления продукта отражает процессивное движение молекулы фермента по молекуле ДНК (рисунок 25, Б).

#### 4.1.1. Кинетика взаимодействия *Nei*, *NEIL1* и *NEIL2* с субстратами, содержащими одиночное повреждение, в стационарных условиях

Использованный в работе субстрат для изучения коррелированного расщепления длиной 40 п. н. получали путем лигирования двух ОДН длиной 20 нт, в каждом из которых поврежденное звено окружено одинаковыми последовательностями для минимизации влияния нуклеотидного контекста. Чтобы удостовериться, что ферменты узнают оба повреждения с одинаковой эффективностью, были определены стационарные кинетические параметры расщепления двуцепочечных субстратов X1\*\*/C1 и X2\*\*/C2, каждый из которых представляет собой половину 40-звенного субстрата. В качестве повреждения на данном этапе использовали АП-сайт, общий для *Nei*, *NEIL1*, и *NEIL2*. Полученные значения кинетических параметров приведены в таблице 9. Параметры  $K_M$  и  $V_{max}$  ферментов *Nei* и *NEIL2* для обоих коротких субстратов совпадали в пределах погрешности. Для *NEIL1* в тех же условиях насыщения субстратом достигнуть не удалось, поэтому вместо отдельных параметров определяли соотношение  $V_{max}/K_M$ , отражающее каталитическую эффективность фермента. Для обоих субстратов это соотношение было близким. Таким образом, белки *Nei*, *NEIL1*, и *NEIL2* взаимодействуют с обеими частями субстрата с одинаковой эффективностью.

**Таблица 9.** Кинетические параметры реакции расщепления субстратов X1\*\*/C1 и X2\*\*/C2 ферментами *Nei*, *NEIL1* и *NEIL2*

		$K_M$ , нМ	$V_{max}$ , нМ×мин <sup>-1</sup>	$V_{max}/K_M$ , мин <sup>-1</sup>
<b>Nei</b>	X1**/C1	52±13	10±2	0,20±0,02
	X2**/C2	56±17	11±2	0,20±0,02
<b>NEIL1</b>	X1**/C1	н/о	н/о	0,08±0,01
	X2**/C2	н/о	н/о	0,12±0,01
<b>NEIL2</b>	X1**/C1	101±22	17±3	0,17±0,01
	X2**/C2	138±37	17±3	0,15±0,02

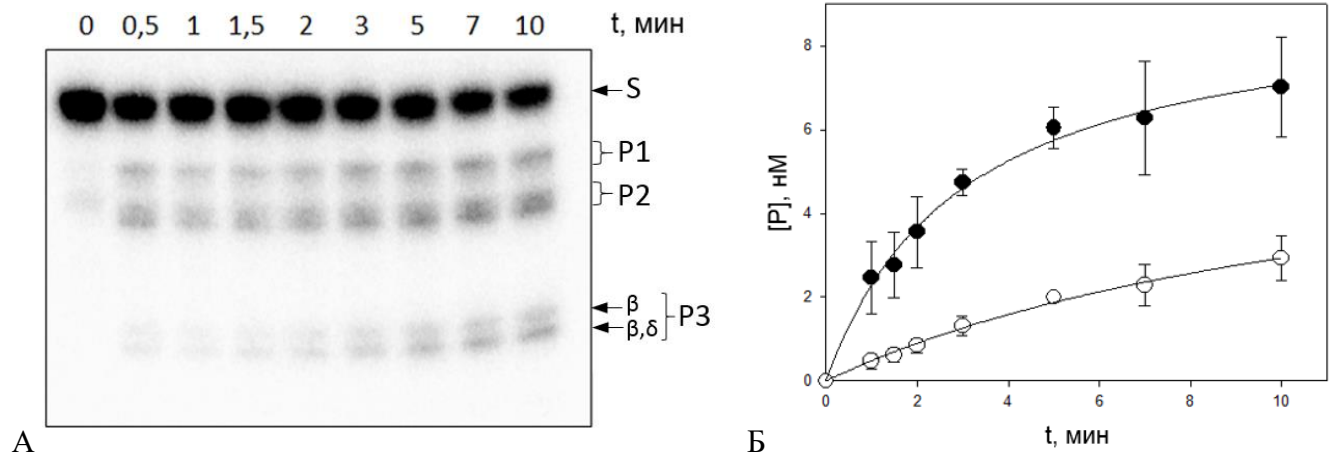
<sup>1</sup> Показано среднее значение и стандартная ошибка по двум независимым экспериментам.

<sup>2</sup> н/о — не определено, -не удается определить в виде отдельного кинетического параметра, поскольку насыщение субстратом не достигается.

#### 4.1.2. Влияние ионов металлов на коррелированное расщепление субстратов

Для оценки процессивности *Nei*, *NEIL1*, и *NEIL2* был использован субстрат с двумя основаниями 5-гидроксиурацила (5-ОН-Ura) в качестве сайта расщепления. Все три фермента удаляют это основание из дцДНК, хотя и с разной эффективностью [44–46, 224]. 5-ОН-Ura в составе ОДН более устойчив в условиях эксперимента, чем быстро разрушающийся АП-сайт [225], что облегчает приготовление субстратов, а также позволяет избежать возможной конкуренции за связывание с ДНК с ферментом *Ung E. coli*, который используется для получения АП-сайтов *in situ*. Субстрат сконструирован так, что дает продукты с разной мобильностью в геле при внесении ферментом одного разрыва по любому из сайтов (P1 и P2), а также хорошо отделяемый от них продукт расщепления по обоим сайтам (P3) (рисунок 29, А). Из соотношения

начальной скорости накопления продукта  $v_{P3}$  (рисунок 29, Б) к общей скорости накопления всех трех продуктов  $v_{(P1+P2)+P3}$  рассчитывается величина вероятности коррелированного расщепления ( $P_{cc}$ ), которая зависит только от природы исследуемого фермента, состава реакционной среды и расстояния между повреждениями [202].

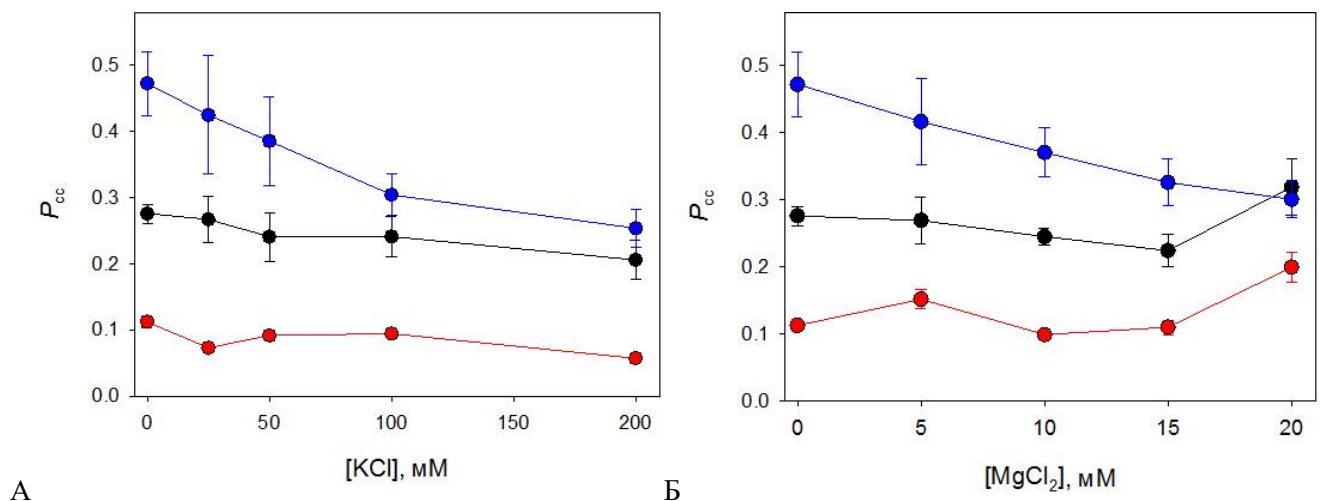


**Рисунок 29.** Расщепление субстрата X1-X2\*/comG ферментом Nei при 0 mM KCl. (А) — радиоавтограф полиакриламидного геля после разделения продуктов реакции. Дорожка 0 — контроль без фермента, дорожки 0,5 – 10 мин отражают время инкубации с ферментом. S — нерасщепленный субстрат, P1, P2 — продукты расщепления по одному из остатков 5-ОН-Uга, P3 — продукт расщепления по обоим остаткам 5-ОН-Uга. Двойные полосы продуктов реакции отражают расщепление по механизмам  $\beta$ - и  $\beta,\delta$ -элиминирования. (Б) — кривые накопления продуктов P1+P2 (●) и P3 (○) от времени.

К факторам, влияющим на эффективность одномерной диффузии, относится, в частности, наличие моно- и дивалентных катионов в растворе [157, 165, 226]. ДНК всегда окружена оболочкой из противоионов, при этом в обеих бороздках присутствуют как моновалентные катионы, которые взаимодействуют с ДНК электростатически, так и дивалентные, зачастую образующие координационные связи (рисунок 24) [163, 164]. При движении молекулы белка вдоль ДНК должно происходить вытеснение ионов белком, что приводит к снижению эффективности одномерной диффузии при увеличении ионной силы раствора. Зависимость транслокации белка от концентрации ионов обычно используют для доказательства того, что поиск мишени осуществляется процессивно, а не путем диффузии в трех измерениях [189, 226]. В частности, снижение одномерной диффузии с возрастанием концентрации ионов было показано для белка Frg из исследуемого суперсемейства H2TH как одномолекулярными, так и ансамблевыми методами [175, 180, 205, 209].

В работе было изучено влияние катионов  $K^+$  и  $Mg^{2+}$  на  $P_{cc}$  Nei, NEIL1 и NEIL2. Концентрацию KCl варьировали в диапазоне 0–200 mM (рисунок 30, А), а  $MgCl_2$  — в диапазоне 0–25 mM (рисунок 30, Б). Из трех ферментов только для NEIL1 характер кривой полностью соответствовал ожидаемой зависимости для процессивного фермента: значение  $P_{cc}$  достигало 0,48 в отсутствие ионов металлов и падало с увеличением концентрации  $K^+$  и  $Mg^{2+}$  (рисунок 30, ●). NEIL2 практически не использовал процессивный поиск; значения  $P_{cc}$  для него

составляли около 0,1 во всем диапазоне концентраций катионов (рисунок 30, ●). График значений  $P_{cc}$  для Nei представлял из себя нечто среднее: наблюдалось очень небольшое (но статистически значимое) снижение  $P_{cc}$  от 0,28 до 0,21 при увеличении концентрации KCl, и от 0,28 до 0,22 при увеличении MgCl<sub>2</sub> до 15 мМ (рисунок 30, ●). При 20 мМ MgCl<sub>2</sub> значения  $P_{cc}$  значимо возросли для Nei и NEIL2, что может быть связано с лучшей стабилизацией фермента ионами Mg<sup>2+</sup>. Вполне вероятно, что такой профиль характеризует некоторые особенности взаимодействия Nei и NEIL2 с ДНК, указывая на возможный вклад неэлектростатических взаимодействий, таких как гидрофобные или ван-дер-ваальсовы взаимодействия. В целом процессивность Nei, NEIL1 и NEIL2 была заметно ниже, чем у структурно близкого Fpg из *E. coli*, для которого на субстрате такой же структуры и в тех же условиях реакции значения  $P_{cc}$  достигали 0,9 [175].

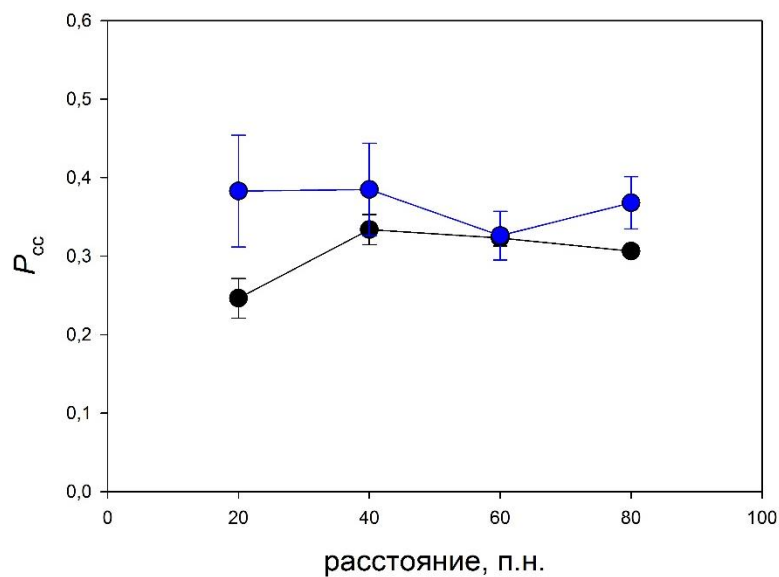


**Рисунок 30.** Влияние ионов K<sup>+</sup> (А) и Mg<sup>2+</sup> (Б) на вероятность коррелированного расщепления двуцепочечного субстрата X1-X2\*/comG ферментами Nei *E. coli* (●), NEIL1 (●) и NEIL2 (●) мыши. Показано среднее значение и стандартная ошибка по 3–4 независимым экспериментам.

#### 4.1.3. Зависимость $P_{cc}$ от расстояния между повреждениями

Процессивный поиск мишеней в ДНК по сути представляет собой случайное блуждание молекулы белка с некоторой конечной вероятностью диссоциации на каждом шаге [203]. Таким образом, вероятность коррелированного расщепления должна снижаться с увеличением расстояния между повреждениями, как это было показано для Ung *E. coli* и человека [172, 186, 202]. Чтобы оценить, как далеко Nei и NEIL1 могут продвигаться в процессивном режиме вдоль ДНК, для этих двух ферментов были получены значения  $P_{cc}$  на субстратах с двумя основаниями 5-ОН-Uга, разделенными 20, 40, 60 и 80 п. н. Для NEIL2 такой эксперимент не проводился из-за его крайне низкой процессивности даже при 20 п. н. между повреждениями (см. раздел 4.1.2). Совершенно неожиданно, в обоих случаях не наблюдалось какого-либо значительного снижения

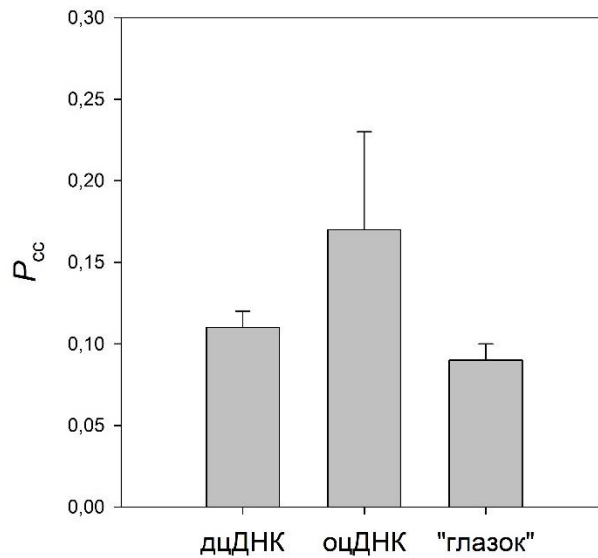
$P_{cc}$  на всем диапазоне расстояний (рисунок 31). В недавнем исследовании, посвященном поиску повреждений ферментом NEIL1 человека на плазмидных субстратах, расчетное среднее расстояние транслокации составило 80 п. н. [223]. Поскольку и по нашим данным, и по данным [223] NEIL1 проявляет типичный профиль зависимости от концентрации соли, вполне возможно, что NEIL1 действительно ведет процессивный поиск, и снижение значений  $P_{cc}$  можно было бы наблюдать на расстояниях  $> 80$  п. н., но такие модельные субстраты сложно получить на основе синтетических олигонуклеотидов. Процессивность Nei тоже не зависела от расстояния между сайтами до 80 п. н., что вместе с данными о слабой зависимости  $P_{cc}$  от соли говорит о низком, хотя и детектируемом использовании этим ферментом процессивного поиска.



**Рисунок 31.** Зависимость величины  $P_{cc}$  от расстояния между повреждениями для Nei (●) и NEIL1 (●) в присутствии 25 мМ KCl. Показаны средние значения и стандартная ошибка по 3 независимым экспериментам.

#### 4.1.4. Процессивность NEIL2 на ДНК-субстратах разной структуры

Так как фермент NEIL2 предпочитает в качестве субстрата не дцДНК, а структуры типа «глазок» и оцДНК [54, 57], было решено проверить, может ли процессивный поиск лучше осуществляться на таких субстратах. В структуре «глазка» основания 5-ОН-U были расположены на стыках двуцепочечной и одноцепочечной частей неспаренной части «глазка» протяженностью 19 нт (известно, что такой субстрат эффективно расщепляется NEIL2 [54]). Как видно на рисунке 32, для одноцепочечного субстрата наблюдалась некоторая тенденция к повышению  $P_{cc}$ , которая, однако не достигала статистической значимости. Между двуцепочечным субстратом и «глазком» не было статистически значимого различия. Эти данные, вместе с отсутствием зависимости  $P_{cc}$  от концентрации  $K^+$  и  $Mg^{2+}$  убедительно свидетельствуют о том, что NEIL2 не использует процессивный механизм поиска мишеней в ДНК.

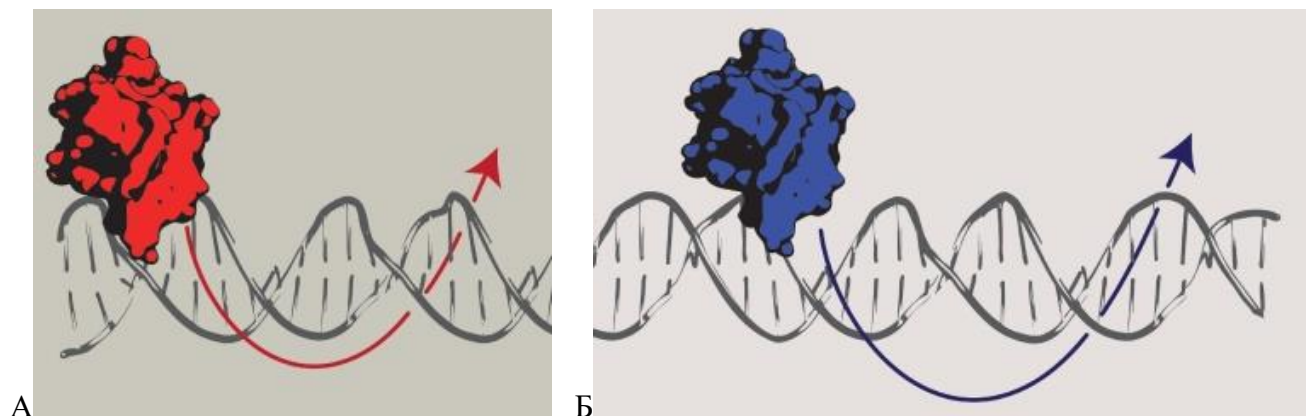


**Рисунок 32.** Коррелированное расщепление субстратов ферментом NEIL2. Значения  $P_{cc}$  для двуцепочечного (дцДНК), одноцепочечного (оцДНК) субстратов и «глазка». Показаны средние значения и стандартная ошибка по 3 независимым экспериментам.

#### 4.1.5. Структурно-функциональная интерпретация наблюдаемых различий в механизмах поиска белками H2TH

В разделах 4.1.2–4.1.4 было показано, что в группе структурно родственных ДНК-гликозилаз, принадлежащих к одному супермейству H2TH, способность ферментов осуществлять процессивный поиск повреждений в ДНК может сильно различаться, и, таким образом, нельзя считать этот механизм поиска универсальным для всех гликозилаз. Вместе с данной работой к настоящему времени механизмы поиска охарактеризованы для четырех ферментов суперсемейства H2TH: Fpg, Nei, NEIL1 и NEIL2 [180, 205, 207, 208, 210, 223, 227]. Fpg *E. coli* и *Geobacillus stearothermophilus* демонстрирует высокую процессивность как в ансамблевых [209, 227], так и в одномолекулярных экспериментах [180, 205, 207, 208]. В одномолекулярных исследованиях показано, что время связывания Fpg с ДНК при низком содержании соли составляет 0,1–3,0 с, а константа диффузии находится в диапазоне  $3,5 \times 10^5$ – $1,3 \times 10^6$  п. н.<sup>2</sup>/с. Поскольку время случайного одномерного блуждания  $t$ , константа диффузии  $D$  и средняя дистанция транслокации  $x$  связаны соотношением  $\langle x^2 \rangle = 2Dt$  [205], это соответствует транслокации на 265–2790 п. н. за одно связывание, что согласуется с очень высокой  $P_{cc}$  (~0,9) в экспериментах по коррелированному расщеплению. Противоположным образом проявляет себя NEIL2, который, как было показано впервые в данной работе, полностью дистрибутивен на дцДНК, оцДНК и субстрате типа «глазок». Такое поведение NEIL2 вполне объяснимо, так как показано, что этот белок непосредственно связан с транскрипционным комплексом РНК-полимеразы II [66, 67, 228], и, следовательно, вместо самостоятельного поиска может использовать как сенсор повреждения остановившуюся полимеразу.

Довольно неожиданным оказалось, что увеличение расстояния между повреждениями до 80 п. н. не повлияло на  $P_{cc}$  *Nei* и *NEIL1*. Это противоречит тому, что наблюдается, например, для *Ung E. coli*, который осуществляет поиск на дистанции ~100 п. н. на одно связывание, и  $P_{cc}$  которого быстро снижается с увеличением расстояния [172, 202]. Тем не менее, *NEIL1* проявлял типичную зависимость  $P_{cc}$  от концентрации соли, ожидаемую для процессивного поиска, со значительной долей коррелированного расщепления даже при 200 мМ  $KCl$  или 20 мМ  $MgCl_2$ , тогда как  $P_{cc}$  *Nei* незначительно уменьшилась от 0 до 200 мМ  $KCl$  и в целом было ниже, чем у *NEIL1*. Такое поведение можно объяснить в рамках модели (рисунок 33), предложенной в работе [180], где исследовалось движение молекул фермента, меченных квантовыми точками, по высокомолекулярной ДНК фага  $\lambda$ , растянутой между микробусинами. Согласно этой модели белковые молекулы, которые ищут мишень, существуют в двух конформационных популяциях: одни молекулы движутся медленно, тесно связаны с ДНК и оценивают локальные параметры ДНК на соответствие ожидаемым параметрам мишени (сканирующая конформация), а другие — быстро диффундируют по ДНК и легко ее высвобождают (скользящая конформация). Если эти популяции медленно переходят друг в друга, значения  $P_{cc}$  в эксперименте с увеличением расстояния будут отражать долю молекул фермента в тесном состоянии с характерным расстоянием поиска  $\gg 80$  п. н., в то время как остальные молекулы быстро высвобождают ДНК. Тогда, согласно модели, ~40% молекул *NEIL1* и 30% молекул *Nei* находятся в тесно связанном сканирующем состоянии (рисунок 31). Не исключено даже, что именно *Ung* — исключение из общего механизма, поскольку он распознает основания *Ura* в спонтанно раскрывающихся парах [229, 230], и, следовательно, не нуждается в специальном сканирующем состоянии, в то время как другие ДНК-гликозилазы, например, *Fpg*, должны принудительно раскрывать оцениваемые пары оснований [231–234].

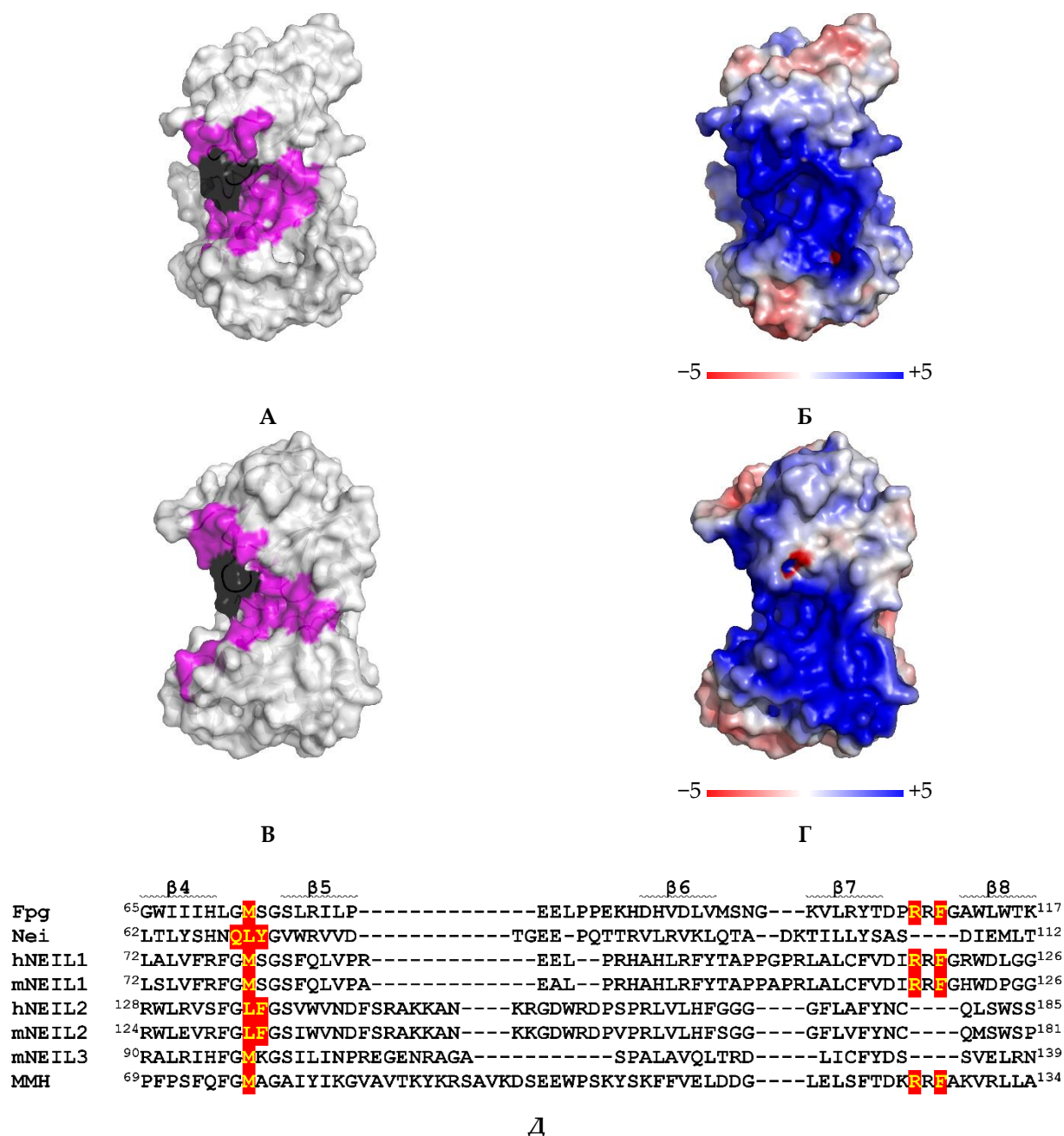


**Рисунок 33.** Модель поиска мишеней ДНК-гликозилазами [180]. А — сканирующая конформация фермента, Б — скользящая конформация.

Структурные данные связанных с ДНК молекул *Fpg*, *Nei*, *NEIL1* и *MMH* показывают, что у всех этих белков взаимодействие с ДНК организовано одинаково [27, 74, 220, 235, 236]. В

структуре белков содержится широкая положительно заряженная ДНК-связывающая бороздка с глубоким карманом, где поврежденное основание связывается после выворачивания из спирали (рисунок 34, А-Г). Мотив H2TH и  $\beta$ -шпильчатый цинковый палец (или, в случае NEIL1 и MMH, эквивалентная ему  $\beta$ -шпилька без  $Zn^{2+}$ ) связывают фосфаты остова ДНК вблизи повреждения и сообщают оси ДНК резкий излом, который облегчает выворачивание основания в активный центр фермента. Хотя структуры NEIL2 или NEIL3 с ДНК еще не установлены, наличие тех же основных элементов в структурах свободного NEIL2 домового опоссума (*Monodelphis domestica*) [76], NEIL3 мыши [237] и NEIL2/NEIL3-подобного белка из мимивируса [238] позволяет предположить, что они связывают ДНК сходным образом. Однако все же существует одно существенное различие между Fpg/NEIL1/MMH с одной стороны и Nei/NEIL2/NEIL3 с другой. Оно заключается в организации триады аминокислот, которые интеркалируют в спираль ДНК для выявления повреждений и иницируют выворачивание (рисунок 34, Д). В Fpg, NEIL1 и MMH эта триада абсолютно консервативна. В нее входят остатки Met (Met80 в NEIL1), который заполняет полость внутри двойной спирали ДНК, оставшуюся после выворачивания основания, Arg (Arg117 в NEIL1), который распознает основание, противоположное повреждению, и Phe (Phe119 в NEIL1), который вклинивается между поврежденной и соседней с ней парами, изгибая ДНК. Остаток Met расположен в петле между складками  $\beta 4$  и  $\beta 5$  в N-концевом  $\beta$ -сэндвич-домене, тогда как остатки Arg и Phe лежат в петле  $\beta 7/\beta 8$  (рисунок 34, А, Д). У Nei все три аминокислотных остатка, функционально эквивалентных остаткам триады (Leu, Gln и Tyr соответственно) происходят из петли  $\beta 4/\beta 5$ , а петля  $\beta 7/\beta 8$  полностью отсутствует (рисунок 34, Б, Д). В белке NEIL2 сохраняется лишь два, а NEIL3 — один остаток триады, петля  $\beta 7/\beta 8$  у них также отсутствует, что, вероятно, отражает их предпочтение ДНК-субстратов, отличных от канонического дуплекса. Nei, однако, предпочитает двуцепочечные субстраты одноцепочечным и «глазкам» [54]. Тем не менее, наличие положительного заряда остатка Arg в Fpg и NEIL1 непосредственно внутри дуплекса ДНК может быть одной из причин их более тесного взаимодействия и более выраженной чувствительности к ионной силе по сравнению с незаряженными интеркалирующими остатками в Nei и NEIL2.





**Рисунок 34.** Структуры NEIL1 (А, Б; 5ITU [220]) и Nei (В, Г; 1K3W [74]). На панелях А и В ДНК-связывающая бороздка (аминокислотные остатки в радиусе 4.0 Å от ДНК) обозначена ярко-розовым, триада интеркалирующих остатков — черным. На панелях Б и Г цветовым градиентом представлен электростатический потенциал поверхности белков (синий — положительный, красный — отрицательный, шкала в единицах  $k_B T/e_c$ ). Д — выравнивание аминокислотных последовательностей между β-складками β4–β8 белков суперсемейства H2TH (Fpg *E. coli*, Nei *E. coli*, NEIL1 человека, NEIL1 мыши, NEIL2 человека, NEIL2 мыши, NEIL3 мыши, MMH *Arabidopsis thaliana*). Интеркалирующая триада выделена красным.

Другая возможная интерпретация полученных в работе данных о более низкой процессивности Nei и NEIL2 может основываться на структурной динамике белка. Каталитическое ядро белков H2TH состоит из N- и C-концевого доменов, соединенных гибким линкером. Длинный гибкий линкер позволяет менять ориентацию этих доменов по отношению друг к другу. Показано, что белки Nei и NEIL2 существуют в двух конформациях — открытой и закрытой [74–76, 239]. Считается, что свободные Nei и NEIL2 находятся в открытой конформации и закрываются при связывании с ДНК. Однако свободный NEIL1 существует в

закрытой конформации [82, 220]. Для Fpg имеющаяся структурная информация неоднозначна: структура свободного Fpg *E. coli* неизвестна, свободный Fpg из *Neisseria meningitides* кристаллизовался в открытой конформации [240], тогда как свободный Fpg из *Thermus thermophilus* — в закрытой [241]. Таким образом, Nei и NEIL2 могут быть по своей природе более склонны к открытию и высвобождению ДНК, чем NEIL1 и Fpg.

## **4.2. Процессивный поиск мишеней в присутствии объемных аддуктов и ДНК-связывающих лигандов Ung *E. coli***

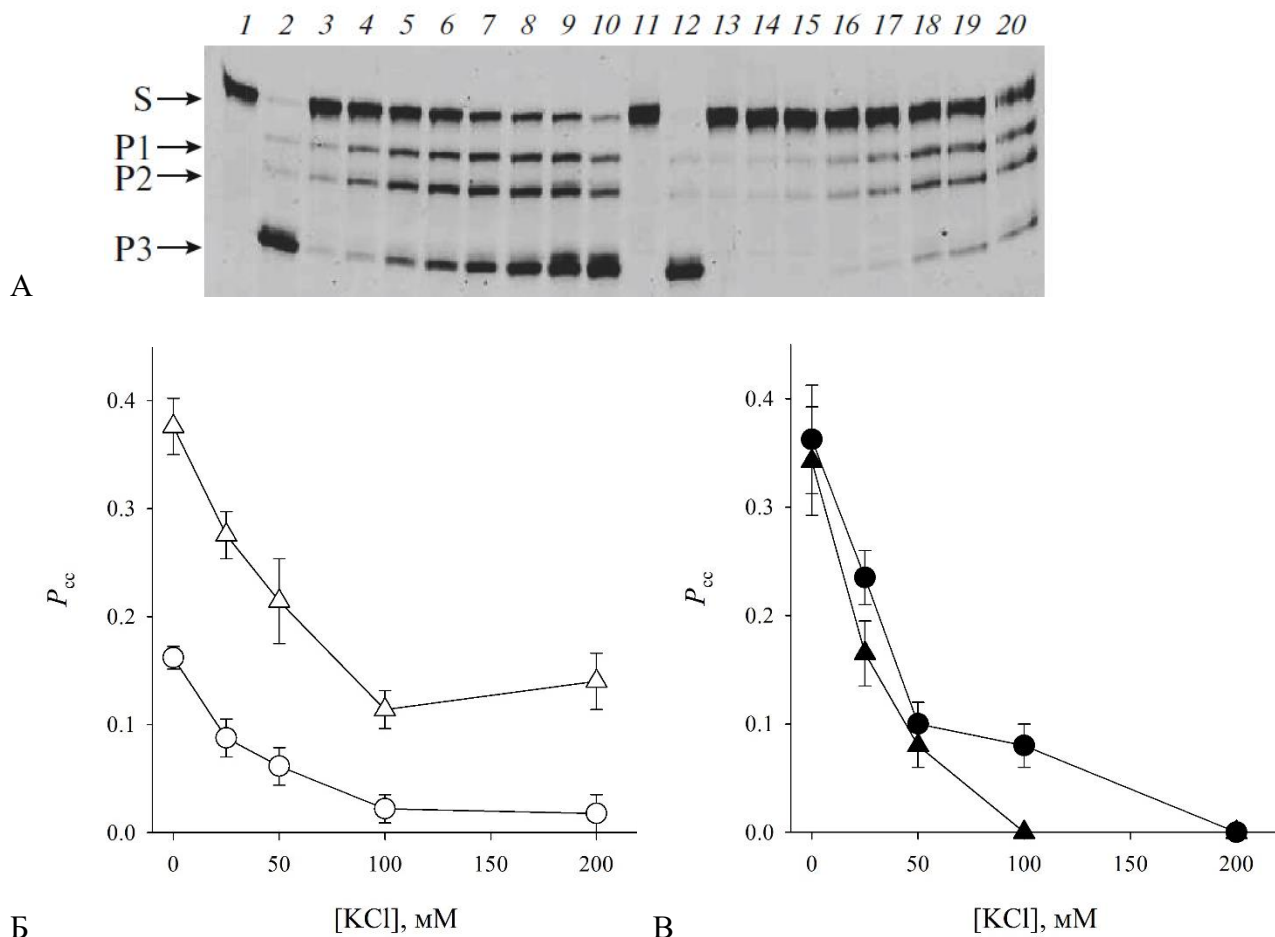
Для многих ДНК-гликозилаз известны их структуры со специфичной ДНК [242], однако в процессе поиска мишеней фермент большую часть времени взаимодействует с ДНК неспецифически. Такие комплексы достаточно нестабильны, поэтому получение структур гликозилаз с неповрежденной ДНК затруднено. Урацил-ДНК-гликозилаза *E. coli* — один из немногих ферментов, для которых такая структура охарактеризована [230], а также показано использование белком одномерной диффузии в процессе поиска [172, 173, 202]. Ung связывает двуцепочечную ДНК в малой бороздке и изгибает ее под углом около 45°. Основания выворачиваются из дуплекса в активный центр, где происходит узнавание, и, если требуется, дальнейший катализ [229, 230]. Ung также эффективно узнает и удаляет урацил из одноцепочечной ДНК, однако структура такого комплекса не известна.

В условиях клетки ДНК окружена множеством молекул, связанных с ней сильными или слабыми взаимодействиями, или даже ковалентно. Ферментам репарации приходится конкурировать с такими молекулами в процессе диффузии по контуру ДНК, и в целом показано, что ферменты способны вести процессивный поиск *in vivo* [213, 243], однако неизвестно, как именно ведет себя молекула фермента при блокировании бороздок другими молекулами. В данной работе был исследован коррелированный поиск мишеней ферментом Ung из *E. coli* при блокировании бороздок ДНК крупным ковалентным аддуктом или лигандами, специфически связывающимися с малой или большой бороздками ДНК.

### **4.2.1. Влияние ковалентного аддукта на коррелированный поиск Ung**

В качестве модели ковалентного аддукта использовали аналог тимина с присоединенным к нему остатком флуоресцеина через аминоксильный линкер (Т-ФАМ, рисунок 36, Б (I)). Этот аддукт, размер которого немного больше одной пары оснований, располагается в большой бороздке ДНК, что может создавать стерические препятствия для изгибания молекулы ДНК в некоторых плоскостях.

Для сравнения значений  $P_{cc}$  использовали одноцепочечные и двуцепочечные субстраты, содержавшие T-FAM, или в той же позиции каноническое основание T и радиоактивную метку. С полученными одно- и двуцепочечными субстратами проводили реакции, варьируя концентрацию KCl в диапазоне 0–200 мМ. Типичный снимок геля представлен на рисунке 35, А.



**Рисунок 35.** Расщепление одноцепочечного и двуцепочечного субстратов, содержащих два основания урацила и остаток T-FAM между ними. (А) — Репрезентативный снимок геля (детекция флуоресценции) после электрофоретического разделения продуктов расщепления одноцепочечного (дорожки 1–10) и двуцепочечного (дорожки 11–20) субстратов при разном времени реакции (мин). Дорожки 3, 13 — 0,5; 4, 14 — 1; 5, 15 — 1,5; 6, 16 — 2; 7, 17 — 3; 8, 18 — 5; 9, 19 — 7; 10, 20 — 10. Дорожки 1, 11 — контроль без фермента, 2, 12 — контроль с избытком фермента. S — нерасщепленный субстрат, P1, P2 — продукты расщепления по одному из остатков урацила, P3 — продукт расщепления по обоим остаткам урацила. (Б) — Зависимость  $P_{cc}$  от концентрации KCl для одноцепочечных (треугольные символы) и двуцепочечных (круглые символы) субстратов, содержащих T-FAM. (В) — зависимость  $P_{cc}$  от концентрации KCl в среде для одноцепочечных (треугольные символы) и двуцепочечных (круглые символы) субстратов, не содержащих T-FAM.

Из рисунка 35, Б видно, что значения  $P_{cc}$  для двуцепочечного субстрата, содержащего T-FAM ( $\circ$ ), значительно ниже, чем для одноцепочечного субстрата с T-FAM ( $\Delta$ ), а также в сравнении с субстратами, не содержащими молекулу флуоресцеина между повреждениями (рисунок 35, В). Значения  $P_{cc}$  для обоих радиоактивно меченых субстратов значительно не отличались друг от друга а также от одноцепочечного субстрата с T-FAM, однако в случае последнего наблюдалось некоторое повышение  $P_{cc}$  при 200 мМ KCl. Возможно, остаток флуоресцеина способствовал

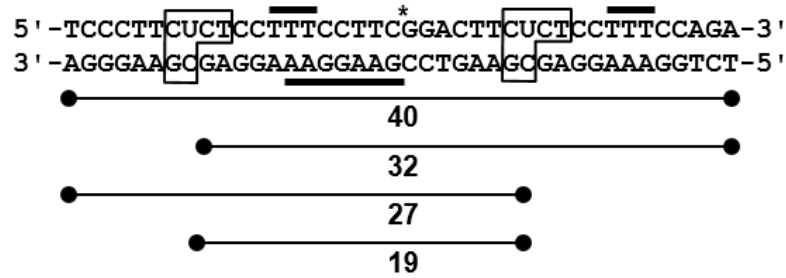
транслокации фермента по ДНК за счет образования дополнительных гидрофобных взаимодействий.

Таким образом, присутствие объемного ковалентного аддукта между сайтами связывания фермента значительно снижает способность фермента Ung к одномерной диффузии по двуцепочечной ДНК, но не влияет на механизм поиска повреждений в одноцепочечной. Непосредственное столкновение молекулы фермента с остатком FAM маловероятно, так как он располагается в большой бороздке, а Ung сканирует ДНК, передвигаясь по малой бороздке. Вероятно, остаток флуоресцеина изменяет пространственную структуру самой ДНК, интеркалирует внутрь дуплекса или значительно влияет на его жесткость, как показано для других аддуктов, находящихся в большой бороздке [244]. Ограничения в изгибании ДНК, а также стерические затруднения для интеркаляции аминокислотных остатков в дуплекс и выворачивания основания в активный центр, должны снижать эффективность скольжения фермента по ДНК. Кроме того, отсутствие влияния FAM на  $P_{ss}$  для оцДНК говорит о значительном отличии между перемещением Ung по одноцепочечной и двуцепочечной ДНК.

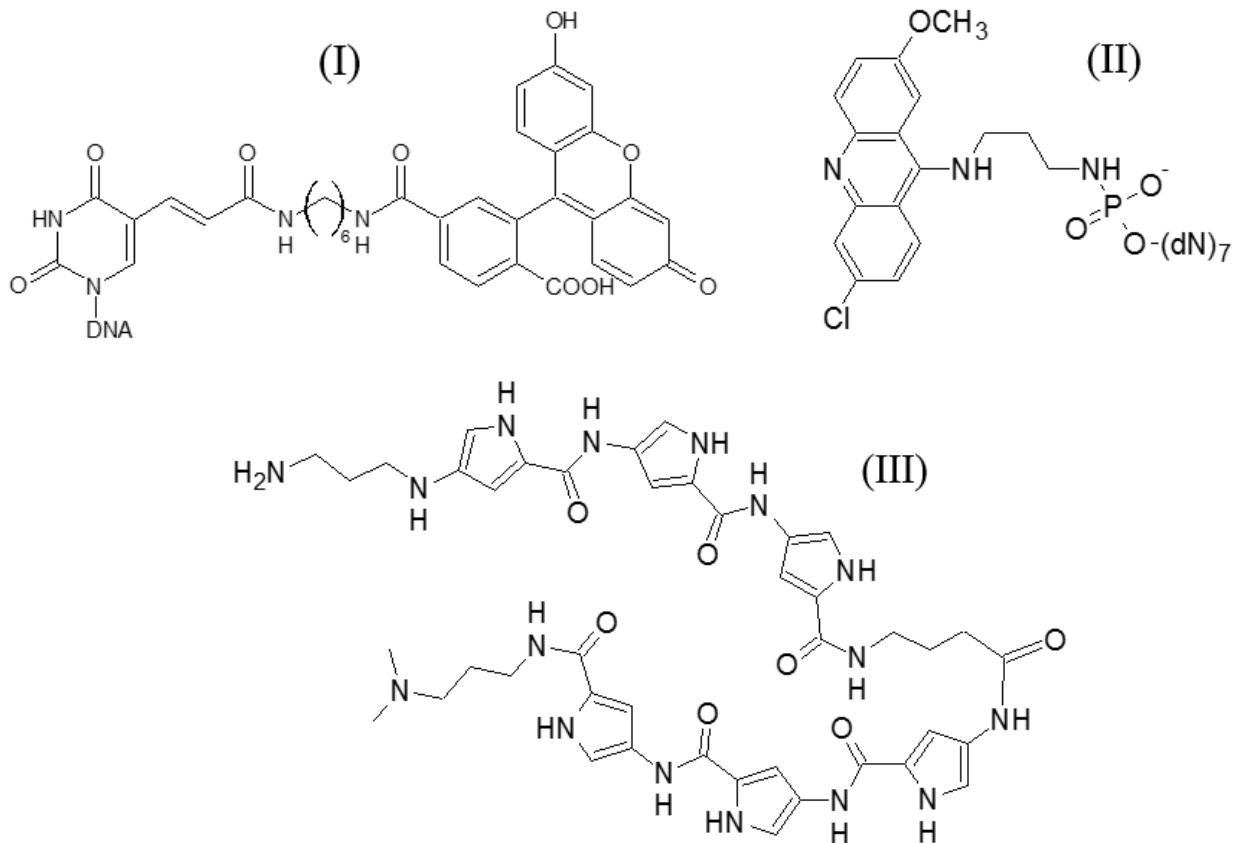
#### **4.2.2. Влияние нековалентных лигандов на коррелированный поиск Ung**

Для изучения влияния нековалентно связанных с ДНК молекул на эффективность сканирования Ung были синтезированы триплексобразующий ОДН, содержащий интеркалирующий остаток (6-хлор-2-метоксиакридин-9-ил)пропан-1,3-диамина (Acg, рисунок 36, Б (II)) в качестве лиганда, блокирующего большую бороздку, и лиганд имидазольного ряда (рисунок 36, Б (III)), блокирующий малую бороздку. На рисунке 36, А показаны предполагаемые места связывания этих лигандов с исследуемым субстратом.

А



Б

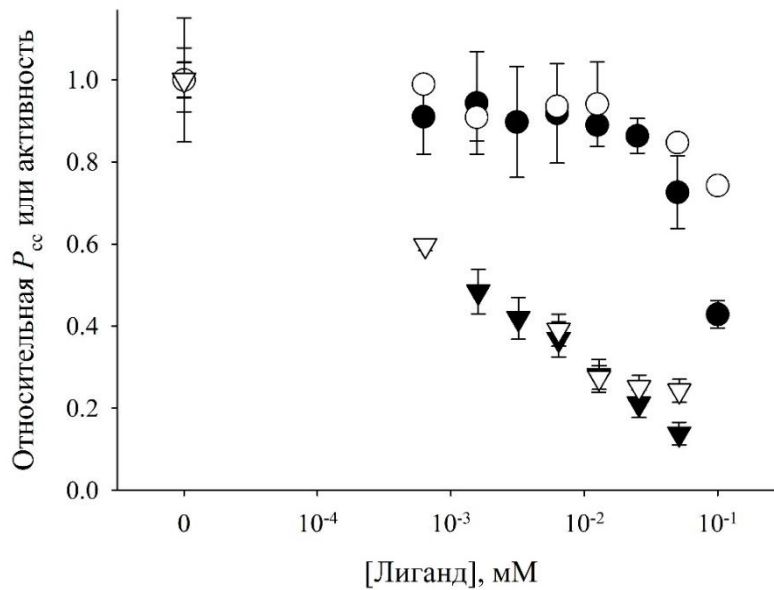


**Рисунок 36.** Структуры субстратов, заместителей и лигандов, использованных в работе. (А) — общая структура ДНК-субстрата для изучения процессивности Ung. Рамкой обведены звенья ДНК, образующие связи с молекулой фермента поданным рентгеноструктурного анализа [84]. Предполагаемые места связывания малобороздочного лиганда и триплексобразующего олигодезоксинуклеотида указаны линиями сверху и снизу от последовательности соответственно. Звездочкой отмечено положение межнуклеозидного  $^{32}\text{P}$ -фосфата. Показаны длины радиоактивно меченных продуктов, образующихся при одиночном и двойном расщеплении молекулы субстрата. (Б) — структура T-FAM (I), триплексобразующего ОДН (II) и малобороздочного лиганда (III).

Поскольку достичь абсолютной специфичности таких лигандов к нуклеотидной последовательности практически невозможно, вместе с определением  $P_{cc}$  параллельно определяли ингибирование активности фермента в присутствии лиганда на субстратах, содержащих только одно повреждение. В таком случае следует учитывать, что расщепление по второму сайту может снижаться за счет двух факторов — снижения вероятности транслокации и эффективности расщепления [202].

Из рисунка 37 видно, что влияние триплексобразующего ОДН как на активность Ung, так и на процессивный поиск, было слабым вплоть до концентраций ~50–100 мкМ. При высоких

концентрациях значительно сильнее подавлялась активность, чем  $P_{cc}$ . Вероятно, это связано с конкурентным ингибированием Ung коротким одноцепочечным ОДН [90]. В случае с малобороздочным лигандом наблюдался значительный спад и активности, и  $P_{cc}$ , уже при концентрации 1 мкМ, что согласуется с литературными значениями сродства имидазольных малобороздочных лигандов к ДНК [245]. Сходный профиль снижения обоих параметров говорит о том, что процессивный поиск в присутствии лиганда возможен, однако связывание лиганда вблизи сайта посадки Ung (рисунок 36, А) либо непосредственно препятствует связыванию молекулы фермента, либо вызывает конформационные изменения в ДНК, снижающие скорость реакции.



**Рисунок 37.** Сравнительное влияние малобороздочного (треугольные символы) и триплексобразующего (круглые символы) лигандов на активность (черные символы) и вероятность коррелированного расщепления (белые символы) субстрата ферментом Ung. По оси ординат отложены значения  $P_{cc}$  и скорости накопления продукта расщепления субстрата, содержащего одно повреждение, нормированные на максимум соответствующей величины при отсутствии лиганда.

Для некоторых других гликозилаз также показана способность преодолевать крупные тесно связанные с ДНК молекулы. Например, алкиладенин-ДНК-гликозилаза человека посредством хоппинга проходит тесно связанный комплекс ДНК с димером EcoRI примерно с 50%-ой эффективностью [184]. Очевидно, этот механизм крайне важен для поиска повреждений в условиях клетки, где с ДНК связано множество различных молекул.

Возможен также и другой механизм — энергия связывания урацил-ДНК-гликозилазы с неспецифичной ДНК достаточно велика ( $\sim -5.9$  ккал/моль [90]), чтобы сталкивать с нее менее прочные комплексы. Ранее в нашей лаборатории было показано, что UNG осповакцины способна вытеснять с ДНК другие гликозилазы (OGG1, NEIL1), но при этом не способна столкнуть такой большой, прочно связанный и долгоживущий комплекс, как Cas9/sgRNA [246].

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что Ung при сканировании ДНК в значительной степени использует механизм хоппинга, который позволяет преодолевать препятствия в виде различных ДНК-связывающих молекул в клетке. Однако ковалентно связанные объемные аддукты сильно снижают эффективность транслокации по двуцепочечной ДНК, что говорит о важности конформационных искажений, которые претерпевает ДНК в процессе поиска мишеней этим ферментом.

### **4.3. Процессивность UNG вируса осповакцины**

ДНК-гликозилазы защищают геном от эндогенных и экзогенных повреждений у всех клеточных организмов, а также у некоторых вирусов. Однако существуют случаи, когда ДНК-гликозилазы, сохранив свою каталитическую функцию, эволюционировали для участия в других клеточных процессах. Наиболее известные примеры такой эволюции — тимин-ДНК-гликозилаза (TDG) у позвоночных и 5-метилцитозин-ДНК-гликозилазы (DME, ROS1, DML2, DML3) у высших растений, которые удаляют эпигенетически модифицированные пиримидиновые основания и, таким образом, участвуют в регуляции активности генов и организации хроматина [247, 248]. 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза OGG1, вероятно, может служить активатором транскрипции и фактором обмена гуанозинфосфатов для некоторых малых регуляторных GTP-аз [249]. Однако роль vvUNG в репликативном комплексе поксвирусов, по-видимому, уникальна среди ДНК-гликозилаз.

Практически у всех живых организмов для обеспечения процессивного синтеза ДНК полимеразы связывается с факторами процессивности в виде димерных или тримерных «зажимов», образующих кольцо вокруг ДНК [250]. Помимо vvUNG, единственным известным фактором процессивности ДНК-полимераз, структурно не принадлежащим к белкам-зажимам, считается тиоредоксин — бактериальный белок, который использует в качестве процессивной субъединицы ДНК-полимеразы бактериофага T7. Однако тиоредоксин не связывается с ДНК напрямую, а стабилизирует длинную петлю полимеразы, которая, в свою очередь, скользит по ДНК [251, 252]. Кроме того, белки, связывающие одноцепочечную ДНК, хотя и не считаются процессивными субъединицами в строгом смысле, также способны усиливать процессивность ДНК-полимераз и используются с этой целью в химерных конструкциях [253, 254]. Присоединение к ДНК-полимеразам неспецифического ДНК-связывающего белка Sso7d [255] или ДНК-связывающих мотивов «спираль-шпилька-спираль» [256, 257] также может улучшать их процессивность.

Почти все изученные ДНК-гликозилазы обладают способностью к процессивному поиску повреждений в ДНК, однако только для vvUNG показано ее участие в обеспечении

репликативной процессивности. В данном разделе работы была изучена собственная процессивность vvUNG для оценки ее роли в составе репликативного комплекса, а также изучено влияние потенциальных ингибиторов урацил-ДНК-гликозилаз на активность и процессивность vvUNG.

#### 4.3.1. Механизм поиска мишеней vvUNG

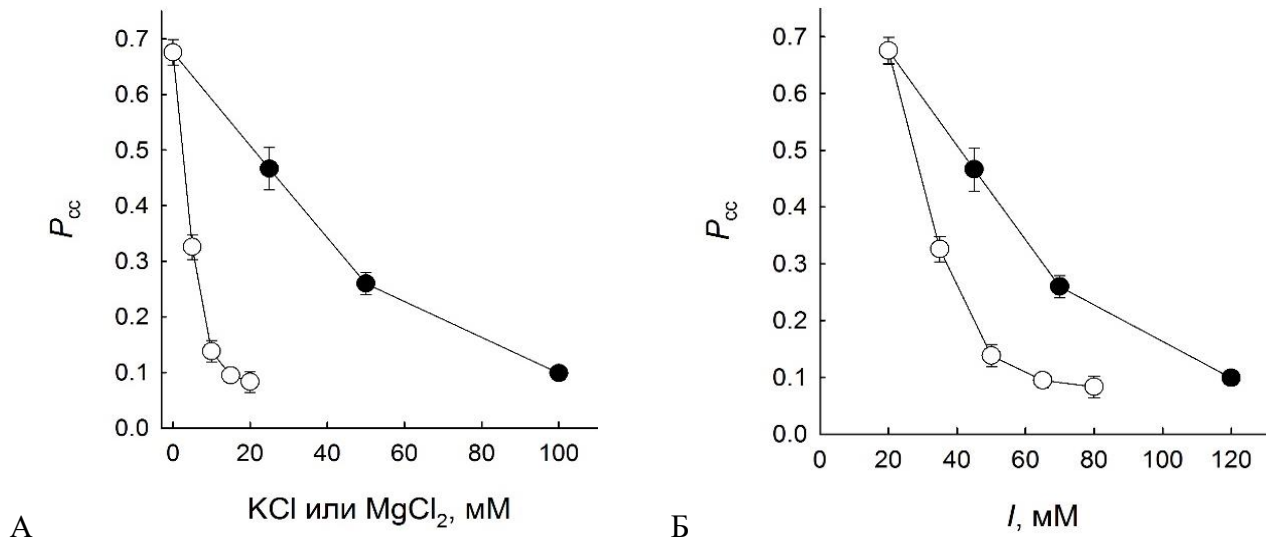
Для изучения способности vvUNG вести процессивный поиск, в работе использовали двуцепочечный субстрат с двумя основаниями Ura, расположенными в идентичном нуклеотидном контексте. Эффективность удаления каждого из них по отдельности оценили в условиях кинетики Михаэлиса–Ментен. Известно, что ферменты UNG, в том числе vvUNG, удаляют основания Ura из одноцепочечной и двуцепочечной ДНК с одинаковой эффективностью [96, 120, 258], поэтому для простоты кинетические параметры получали на ОДН X1 и X2. Значения  $K_M$  и  $k_{cat}$  для обоих субстратов были близки (таблица 10).

**Таблица 10.** Кинетические параметры реакции расщепления субстратов X1\* и X2\* ферментом UNG осповакцины

	Субстрат	$K_M$ , нМ	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>
vvUNG	X1	400 ± 140	5,8 ± 0,8
	X2	330 ± 80	7,3 ± 0,5

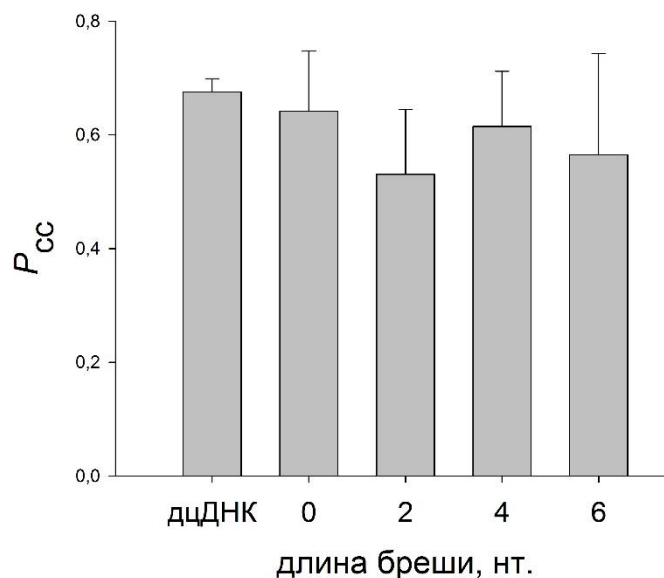
Для определения механизма поиска исследовали влияние на  $P_{cc}$  ионов  $K^+$  и  $Mg^{2+}$ . Когда реакционная смесь содержала только 25 мМ Tris-HCl и низкие концентрации EDTA и DTT,  $P_{cc}$  составляла около 0,7, то есть около 70% событий расщепления в одном сайте сопровождались затем расщеплением во втором (рисунок 38). Постепенное увеличение концентрации KCl до 200 мМ значительно снижало  $P_{cc}$  (рисунок 38, ●), что указывает на активное использование вирусной UNG процессивного поиска, вероятно, с существенным вкладом механизма скольжения по ДНК. Присутствие  $MgCl_2$  оказывало еще более значительный эффект, что объясняется гораздо более прочным координационным взаимодействием ионов  $Mg^{2+}$  с ДНК (рисунок 38, ○) по сравнению с одновалентными катионами. Даже если привести концентрации ионов к общей ионной силе раствора,  $MgCl_2$  все равно значительно сильнее подавляет процессивный поиск vvUNG (рисунок 38, Б).





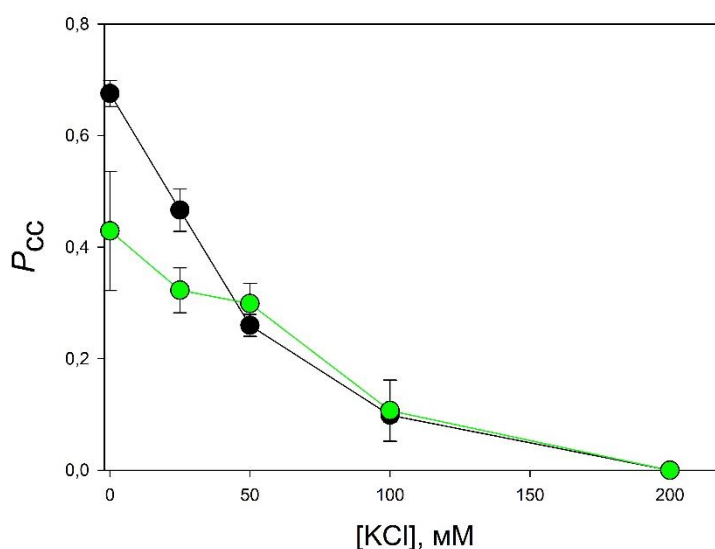
**Рисунок 38.** Влияние ионов  $K^+$  (●) и  $Mg^{2+}$  (○) на процессивность vvUNG. (А) — зависимость  $P_{cc}$  от концентрации KCl и  $MgCl_2$ . (Б) — зависимость  $P_{cc}$  от ионной силы в реакционной смеси. Показаны средние значения и стандартная ошибка по 3 независимым экспериментам.

Как уже было сказано, урацил-ДНК-гликозилазы одинаково эффективно работают и на одно-, и на двуцепочечной ДНК. Более того, показано, что эффективность процессивного поиска ферментом Ung *E. coli* не снижается при наличии между повреждениями одноцепочечных брешей длиной до 6 нт [202]. Из рисунка 39 видно, что UNG осповакцины также может преодолевать разрывы и короткие брешы (2, 4 и 6 нуклеотидов) без высвобождения ДНК. Значения  $P_{cc}$  были одинаковыми во всех случаях. Таким образом, одноцепочечная ДНК не представляет препятствия для перемещения vvUNG.



**Рисунок 39.** Зависимость величины  $P_{cc}$  vvUNG от размера брешы в комплементарной цепи. Длина брешы 0 соответствует отсутствию одного фосфата. Показаны средние значения и стандартная ошибка по 3 независимым экспериментам.

Введение в ДНК-дуплекс между повреждениями объемной флуоресцеиновой группы препятствует способности Ung *E. coli* осуществлять процессивный поиск по механизму слайдинга (см. подробнее в разделе 4.2.1). Замена [<sup>32</sup>P]-метки между повреждениями на флуоресцеин, связанный с Т через аминоксильный линкер (рисунок 36, Б (I)), снижала  $P_{cc}$  при 0 мМ соли с 0,69 до 0,42 (рисунок 40), следовательно, около 40% событий одномерной диффузии на расстояние 20 п. н., которые становятся затруднительны в присутствии Т-FAM, приходится на слайдинг. При этом фермент все же способен преодолевать препятствие с остаточной эффективностью, вероятно, посредством хоппинга. При 50 мМ KCl значения  $P_{cc}$  в присутствии и в отсутствие флуоресцеина примерно равны, что говорит о том, что с увеличением ионной силы способность к процессивному поиску полностью осуществляется за счет хоппинга.



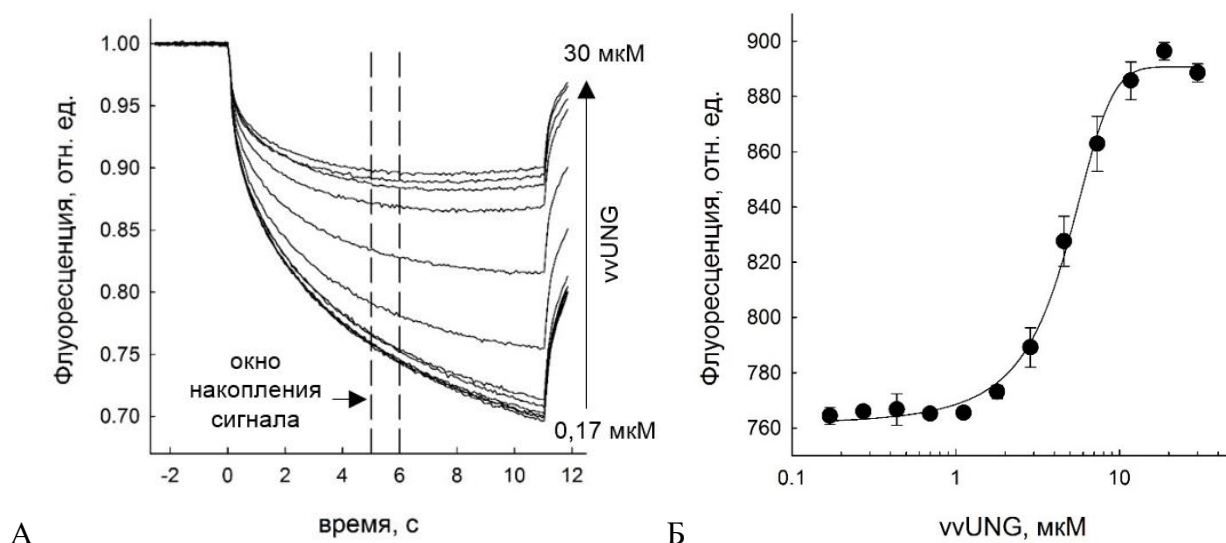
**Рисунок 40.** Зависимость величины  $P_{cc}$  vvUNG от концентрации KCl на субстрате с FAM (●), с <sup>32</sup>P (●). Показаны средние значения и стандартная ошибка по 3 независимым экспериментам.

Для проверки фазового эффекта была определена  $P_{cc}$  на субстратах, содержащих 19 и 20 п. н. между повреждениями. Если молекула белка в процессе одномерной диффузии движется по бороздке ДНК, различия в  $P_{cc}$  будут минимальными, если же она движется вдоль линейной оси, то можно ожидать большей разницы из-за спирального закручивания, которое в В-ДНК смещает соседние нуклеотиды на 36° [207]. Разница между значениями  $P_{cc}$  оказалась незначительной ( $0,67 \pm 0,02$  для расстояния 19 п. н.,  $0,65 \pm 0,05$  для 20 п. н.), что, вероятно, соответствует скольжению белка вдоль бороздки ДНК.

#### 4.3.2. Связывание vvUNG с поврежденной и неповрежденной ДНК

Чтобы прояснить природу эффективной транслокации vvUNG по ДНК, был использован метод микромасштабного термофореза для измерения сродства вирусной UNG к одноцепочечной и двуцепочечной ДНК, как неповрежденной, так и содержащей (3-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)метилфосфат (F) — аналог АП-сайта, имитирующий продукт

ДНК-гликозилазной реакции. Связывание вирусной UNG с флуоресцентно мечеными олигонуклеотидами вызывало четко видимые изменения в термодиффузии комплекса (рисунок 41). Средство vvUNG к одноцепочечной неповрежденной ДНК, двуцепочечной неповрежденной ДНК, F-содержащей одноцепочечной ДНК и двуцепочечной ДНК с парами F:G или F:A было одного порядка, а константа диссоциации варьировала в диапазоне от 4 мкМ до 12 мкМ (таблица 11). F-содержащие ОДН связывались несколько лучше, но предпочтение поврежденной ДНК было не более чем трехкратным. Полученные данные свидетельствуют о том, что вирусная UNG обладает практически одинаковой способностью связываться с любой ДНК.



**Рисунок 41.** Связывание vvUNG с ДНК, наблюдаемое методом микромасштабного термофореза. (А) — репрезентативный набор кривых флуоресценции для двуцепочечного лиганда С:G, (Б) — кривая связывания для лиганда С:G. Показаны средние значения и стандартная ошибка по 3 независимым экспериментам.

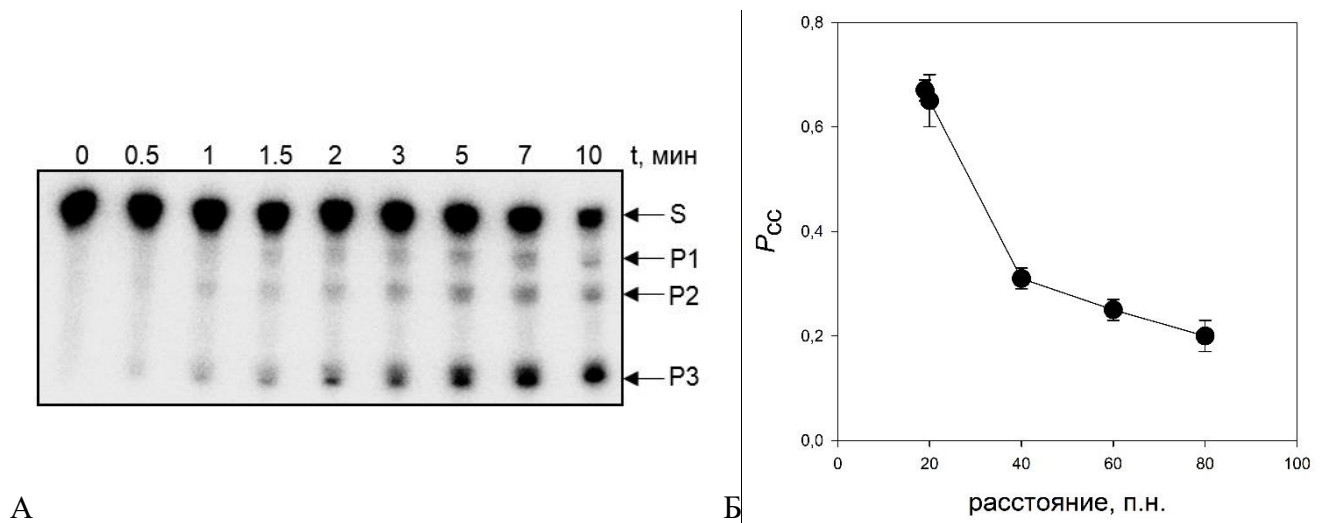
**Таблица 11.** Средство vvUNG к поврежденной и неповрежденной ДНК

Субстрат / Код ОДН	$K_D$ , мкМ
С (13С)	$7,0 \pm 2,0$
Т (13Т)	$12 \pm 7$
F (13F)	$4,0 \pm 2,0$
С:G (13С//13comG)	$7,2 \pm 1,5$
Т:А (13Т//13comА)	$8,7 \pm 1,7$
Ф:G (13F//13comG)	$6,2 \pm 2,3$
Ф:А (13F//13comА)	$6,7 \pm 1,4$

#### 4.3.3. Зависимость $P_{cc}$ от расстояния между повреждениями

Для оценки эффективного расстояния поиска для вирусной UNG была сконструирована серия субстратов, в которых два основания Uга были разделены неповрежденными промежуточными последовательностями разной длины (19, 20, 40, 60 и 80 п. н.). В процессе поиска фермент может высвободить такой субстрат, находясь либо в одной из внутренних

позиций на ОДН, либо на одном из его концов. Доля молекул фермента, достигающая второго сайта (что наблюдается по образованию продукта P3), должна уменьшаться по мере увеличения расстояния, которое нужно пройти [186, 203]. Действительно, эффективность транслокации от одного сайта к другому резко падала с увеличением расстояния от 20 до 40 п. н., а затем продолжала снижаться более плавно (рисунок 42, Б). В целом значения  $P_{cc}$  снижались от  $0,67 \pm 0,02$  для расстояния 19 п. н. до  $0,20 \pm 0,03$  для расстояния 80 п. н. между повреждениями. При этом значения  $P_{cc}$  на всем исследуемом диапазоне расстояний были выше значений Ung *E. coli*, полученных в той же системе субстратов в тех же условиях [202], где  $P_{cc}$  снижалась от 0,39 до 0,12.

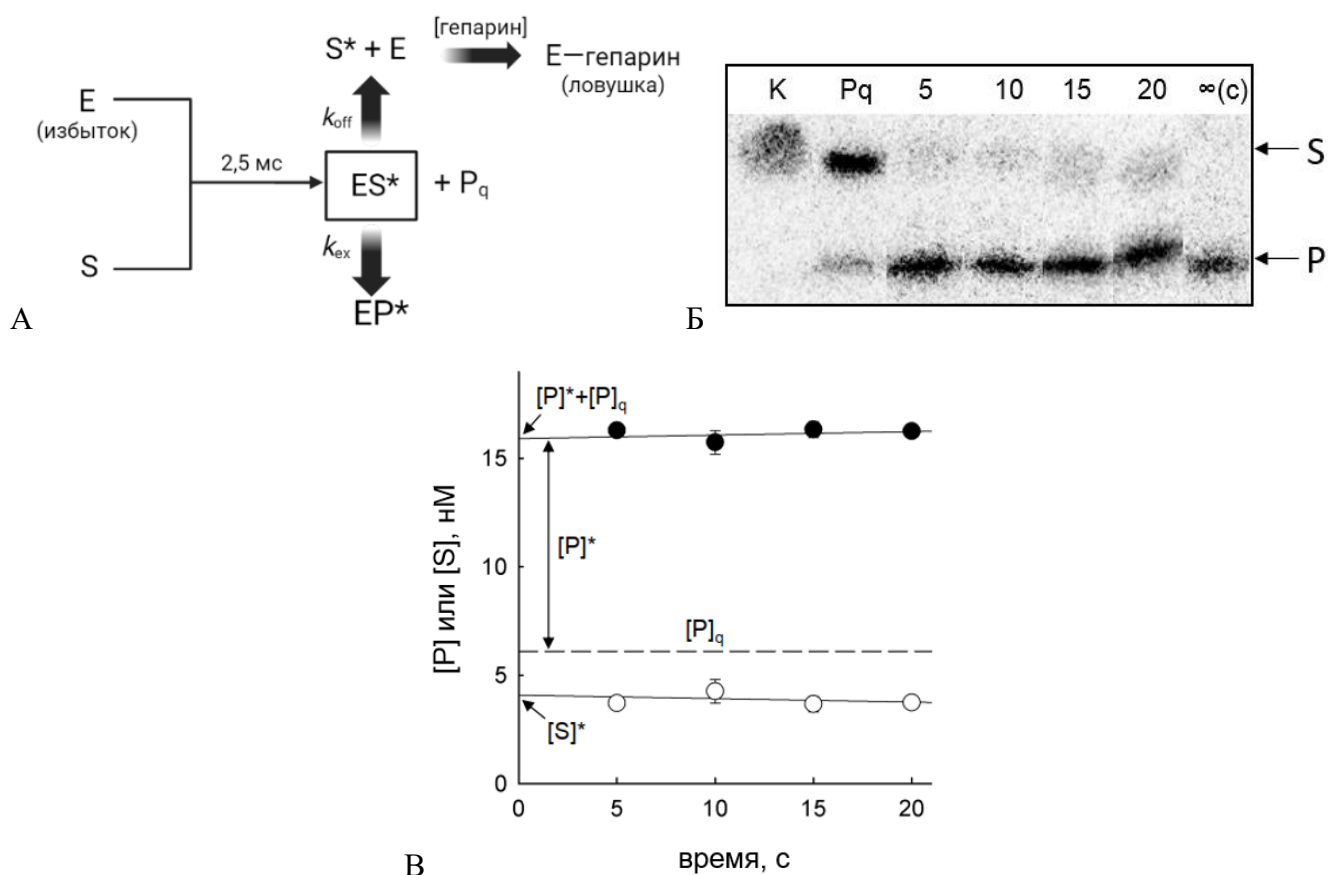


**Рисунок 42.** Коррелированное расщепление субстратов, содержащих два основания Ura, ферментом vUNG. (А) — радиоавтограф полиакриламидного геля после разделения продуктов реакции для субстрата с 20 п. н. между повреждениями. Дорожки обозначены временем (мин) инкубации с ферментом; 0 — контроль без фермента. S — нерасщепленный субстрат, P1, P2 — продукты расщепления по одному из остатков Ura, P3 — продукт расщепления по обоим остаткам Ura. (Б) — зависимость величины  $P_{cc}$  vUNG от расстояния между повреждениями. Показаны средние значения и стандартная ошибка по 3 независимым экспериментам.

#### 4.3.4. Определение вероятности выщепления $P_E$ для vUNG

Вероятность коррелированного расщепления  $P_{cc}$  выражается как произведение двух величин: вероятности транслокации от одного сайта к другому ( $P_T$ ) и вероятности выщепления урацила при его обнаружении ( $P_E$ ) [172]. Последняя величина не равна 1 из-за кинетической конкуренции между одномерной диффузией и верификацией повреждения перед гидролизом *N*-гликозидной связи. Чтобы из  $P_{cc}$  выделить транслокационную компоненту  $P_T$ , было необходимо определить значение  $P_E$  в отдельном кинетическом эксперименте. Схема эксперимента (рисунок 43, А) была практически идентична описанной в [172] для Ung *E. coli* и в [186] для UNG человека, с небольшими изменениями. vUNG (2 мкМ) смешивалась с меченым субстратом (20 нМ) в аппарате быстрого гашения потока, через 2,5 мс либо сразу гасили реакцию щелочью, либо запускали в смесь ловушку (гепарин) и затем гасили щелочью через 5–20 с. Экстраполяция

накопления продукта на нулевое время с поправкой на количество продукта, успевшего образоваться за 2,5 мс (в данном случае  $[P]_q = 6,1 \pm 1,0$  нМ), дает количество продукта, образованного в результате одного акта связывания с повреждением. Отношение количества этого продукта в точке 0 ( $[P]^* = 10,6 \pm 1,1$  нМ) к экстраполированному количеству субстрата в точке 0 ( $[S]^*$ ;  $3,3 \pm 0,3$  нМ) эквивалентно отношению константы скорости разрыва гликозидной связи ( $k_{ex}$ ) к константе скорости непродуктивного распада комплекса ES без разрыва связи ( $k_{off}$ ). Вероятность выщепления  $P_E$  можно рассчитать как  $P_E = k_{ex}/(k_{ex}+k_{off}) = [P]^*/([P]^*+[S]^*)$  (рисунок 43, В). Для vvUNG эта величина составила  $0,76 \pm 0,02$ , что довольно близко к  $P_E = 0,73$  для Ung *E. coli* и  $0,81$  для UNG человека [172, 186]. Полученное значение  $P_E = 0,76$  использовали для расчета  $P_T$  из  $P_{cc}$  в моделировании, описанном в следующем разделе.

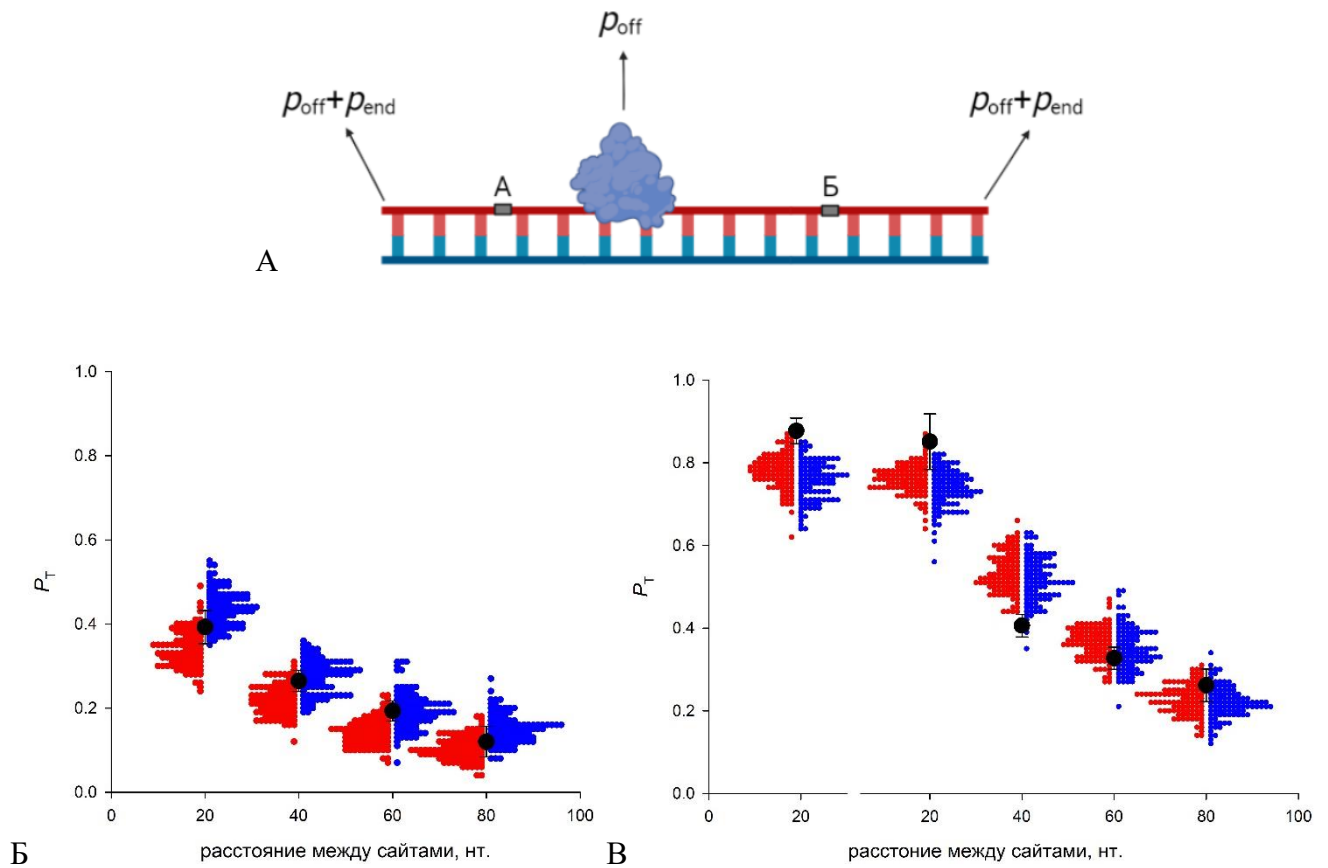


**Рисунок 43.** Определение величины вероятности удаления основания  $P_E$  с помощью метода остановленной струи. (А) — общая схема эксперимента. (Б) — радиоавтограф полиакриламидного геля после разделения продуктов реакции для субстрата X2. Дорожка К — контроль без фермента,  $P_q$  — продукт, образованный за 2,5 мс; дорожки 5; 10; 15; 20 с и  $\infty$  отражают время (с) инкубации субстрата с ферментом в присутствии гепарина. (В) — график накопления продукта и расходования субстрата от времени,  $P^*$  и  $S^*$  — продукт и субстрат, образованные за время инкубации в присутствии гепарина.

#### 4.3.5. Моделирование одномерного блуждания

В исследованиях процессивности для Ung *E. coli* и человека в аналогичных экспериментах с расщеплением субстрата с двумя сайтами оценку параметров одномерной диффузии

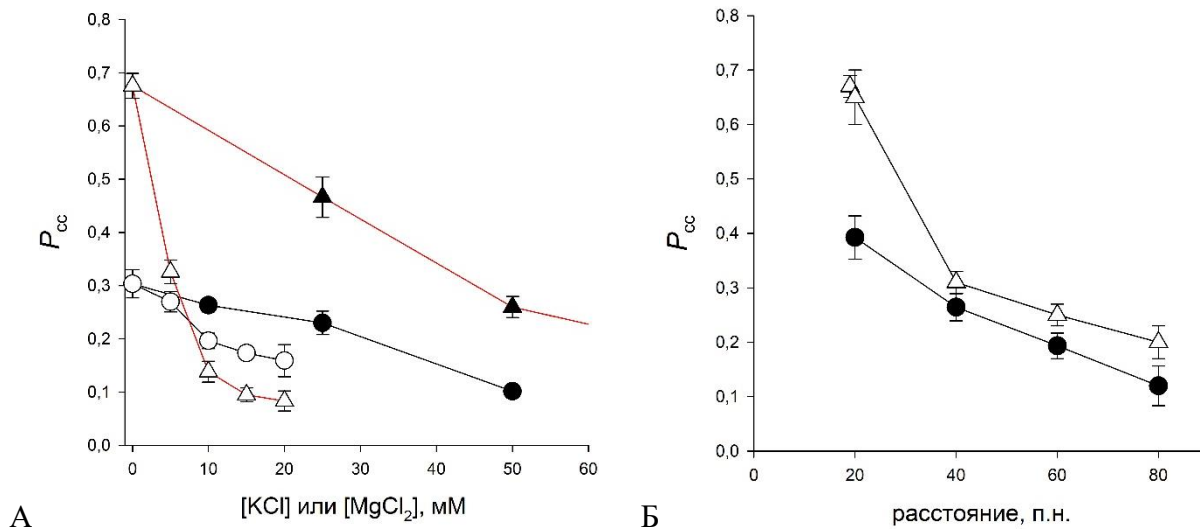
осуществляли с использованием доступных моделей одномерного случайного блуждания [172, 186, 202]. В данной работе для оценки характеристик процессивности vvUNG был использован альтернативный подход — моделирование одномерного случайного блуждания с потерями. Модель представляет собой одномерную конечную решетку, по которой движется частица размером в 1 узел решетки. На каждом шаге частица может необратимо покинуть внутреннюю позицию решетки с вероятностью  $p_{\text{off}}$  или краевую позицию с большей вероятностью  $p_{\text{off}}+p_{\text{end}}$  (рисунок 44, А). Расчет  $p_{\text{off}}$  и  $p_{\text{end}}$  был осуществлен путем подгонки модельных проходов по решеткам различной длины (всего  $\sim 3 \times 10^9$  проходов) к экспериментальным данным зависимости  $P_T$  от расстояния между сайтами (подробное описание см. в разделе 3.2.16 «Материалы и методы»). На первом этапе результаты моделирования сравнивали с экспериментальными данными для Ung *E. coli* и параметрами, полученными аналитическим решением уравнения Белоцерковского–Зарлинга [202, 203]. Моделирование дало значения  $p_{\text{off}} = (4,99 \pm 0,64) \times 10^{-5}$  и  $p_{\text{end}} = 0,179 \pm 0,004$ , что достаточно хорошо согласуется с  $p_{\text{off}} \sim 1 \times 10^{-4}$  и  $p_{\text{end}} = 0,17$ , полученными в работе [202]. Распределение успешных проходов в противоположных направлениях было заметно ассиметричным из-за высокого значения  $p_{\text{end}}$  и разного расстояния от точки начала блуждания до крайнего положения решетки (рисунок 44, Б). Подгонка результатов моделирования к экспериментальным данным для vvUNG неожиданно дала в 5 раз более высокое значение  $p_{\text{off}} = (2,41 \pm 0,07) \times 10^{-4}$  и в  $\sim 30$  раз более низкое  $p_{\text{end}} = (6,06 \pm 0,33) \times 10^{-3}$  по сравнению с Ung *E. coli*. Данные симуляции недостаточно хорошо ложились на экспериментальные точки при коротких расстояниях между сайтами, что, возможно, указывает на облегченную транслокацию vvUNG на дистанциях  $\sim 20$  п. н. (рисунок 44, В). Попытки разработать альтернативные модели блуждания, включающие механизмы хоппинга (с вероятностью перепрыгнуть на  $n$  шагов, уменьшающейся пропорционально  $2^n$  или  $n^2$ ) или скольжения с остановками (с введением параметра вероятности  $p_{\text{stay}} < (1-p_{\text{off}})$ ), не давали лучшего соответствия экспериментальным данным. Таким образом, природа этой облегченной транслокации в настоящее время не установлена.



**Рисунок 44.** Моделирование одномерного случайного блуждания с потерями. (А) — модель одномерного блуждания по одномерной сетке с потерями со стартом и финишем в узлах А и Б. (Б-В) — графики зависимости  $P_T$  (●) от расстояния между сайтами для Ung *E. coli* (Б) (значения  $P_T$  из [202]) и vvUNG (В). Красные и синие точки показывают долю успешных проходов с началом от узла А и узла Б соответственно.

#### 4.3.6. Оценка вклада процессивности vvUNG в процессивность репликативного комплекса осовакцины

Было показано, что в целом vvUNG ведет себя как высокопроцессивная ДНК-гликозилаза. Ее значения  $P_{cc}$  были значительно выше, чем у Ung *E. coli* при тех же концентрациях противоионов и при тех же межсайтовых расстояниях (рисунок 45, А, Б). Как и Ung *E. coli*, vvUNG способна преодолевать одноцепочечные разрывы и бреши, вероятно, за счет близкого сродства к оц и дцДНК.



**Рисунок 45.** Коррелированное расщепление двуцепочечных субстратов, содержащих два урацила, ферментами Ung *E. coli* [174] (круглые символы) и vvUNG (треугольные символы). (А) — зависимость величины  $P_{cc}$  от концентрации KCl (черные символы) и MgCl<sub>2</sub> (белые символы). (Б) — зависимость величины  $P_{cc}$  от расстояния между повреждениями для Ung *E. coli* (●) и vvUNG (△).

Моделирование одномерного блуждания с экспериментально полученными кинетическими параметрами дало значение вероятности потери фермента на каждом шаге  $p_{off} \sim 2,4 \times 10^{-4}$ , что соответствует среднему смещению  $p_{off}^{-1/2} \approx 65$  нт на ассоциацию при полностью случайном блуждании [158]. Число шагов, после которых 50% молекул белка остаются связанными с ДНК ( $n_{1/2}$ ) можно найти из уравнения  $(1 - p_{off})^{n_{1/2}} = 1/2$ , следовательно,  $n_{1/2} = -1/\log_2(1 - p_{off})$ . Среднее смещение белка от исходной точки в этом случае будет равно  $n_{1/2} \approx 2900$  нт на ассоциацию. Репликативный комплекс в процессе синтеза ДНК движется однонаправленно, и поскольку распределение расстояний смещения при однонаправленном движении асимметрично, модальная величина смещения  $\langle D \rangle$  (т. е. смещения *большинства* белковых молекул) не равна  $n_{1/2}$  и может быть найдена из уравнения  $\langle D \rangle = -1/\ln(1 - p_{off})$  [158]. Значение  $\langle D \rangle$  составляет  $\approx 4200$  нт на ассоциацию.

Изолированная ДНК-полимераза вируса осповакцины практически дистрибутивна ( $\leq 10$  нуклеотидов, включенных за одно связывание в 1 mM MgCl<sub>2</sub> или 40 mM NaCl), но в комплексе с субъединицами A20 и vvUNG она за одно событие связывания может реплицировать матрицу 2000–7000 нт [122, 259, 260]. Таким образом, собственная процессивность vvUNG имеет тот же порядок величины, что и процессивность полного репликативного комплекса вируса. Вполне возможно, что полностью собранный комплекс более процессивен, чем его отдельные субъединицы. Если предположить, что полный комплекс распадается, когда субъединицы полимеразы и vvUNG одновременно отсоединяются от ДНК, и для изолированной ДНК-полимеразы оценить  $p_{off}$  в  $\sim 0,2$  (тогда  $(1 - 0,2)^{10} \approx 0,1$ , что соответствует  $\sim 10\%$  молекул полимеразы, которые остаются связанными с ДНК после включения 10 нт, и модальному значению 4–5 встраиваемых нуклеотидов на одно событие связывания), общее значение  $p_{off} =$



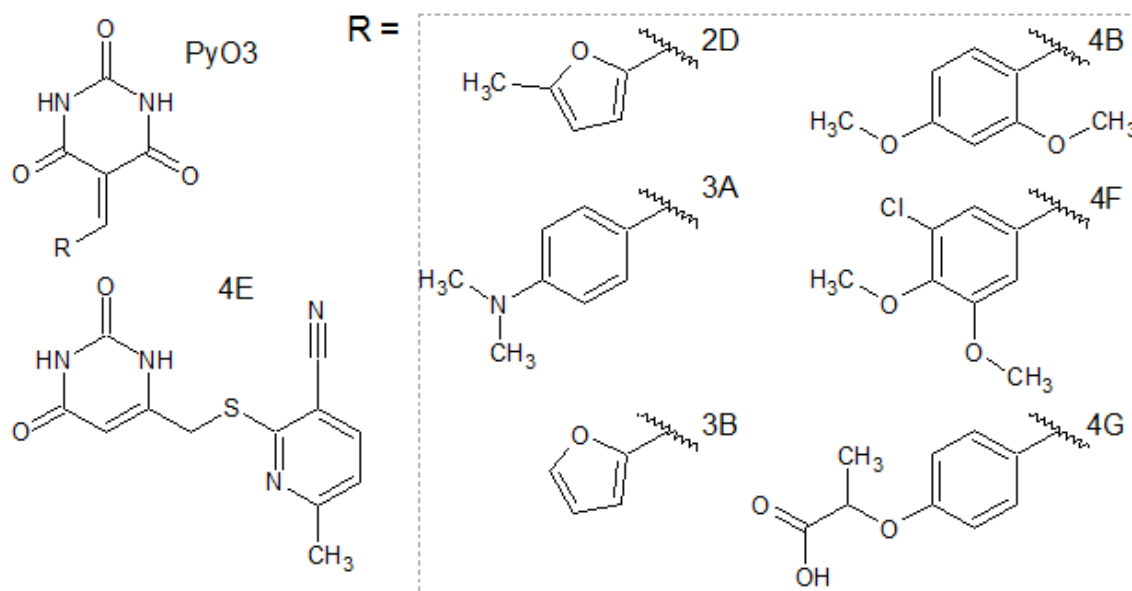
$p_{\text{off}}(\text{vvUNG}) \times p_{\text{off}}(\text{ДНК-полимеразы}) = 4,94 \times 10^{-5}$ . При однонаправленном движении это соответствует среднему смещению  $\sim 14\,000$  нт или  $\sim 21\,000$  модальному количеству встроенных нуклеотидов.

При попытке количественно оценить микроскопические параметры вероятности потери фермента из внутреннего или терминального положения линейных ДНК-субстратов оказалось, что простая модель одномерного случайного блуждания недостаточно хорошо описывает транслокацию vvUNG на коротких ( $\sim 20$  п. н.) расстояниях между повреждениями (рисунок 42, Б). Хотя полученное значение  $p_{\text{off}}$  для vvUNG в несколько раз превышало  $p_{\text{off}}$  для Ung *E. coli*, неожиданно высокие значения  $P_T$  на коротких расстояниях могут указывать на наличие дополнительных процессов помимо одномерного скольжения. Были предприняты попытки усложнить схему блуждания добавлением событий перепрыгивания или остановок на отдельных шагах, однако это не улучшило результат, но значительно увеличило время моделирования. Интересно, что фермент vvUNG оказался гораздо менее подвержен потерям на концах дуплекса, чем Ung *E. coli*. Хотя это может быть недостатком модели случайных блужданий, высокое сродство vvUNG к концам ДНК может быть и биологически значимым, так как вирусный репликативный комплекс должен оставаться связанным или пересобираться на линейном конце ДНК во время повторной инициации репликации в самозатравочной шпильке (рисунок 17, Б) [113].

#### 4.3.7. *vvUNG как мишень для противовирусной терапии*

Процесс репликации — распространенная мишень для терапии бактериальных и вирусных инфекций. В случае ортопоксвирусов, где репликативный комплекс состоит из трех белков, один из которых — урацил-ДНК-гликозилаза — играет ключевую роль фактора процессивности, представляется целесообразным искать терапевтические молекулы, которые будут ингибировать одномерную диффузию этого белка и тем самым подавлять репликацию.

В работе была использована библиотека химических соединений — потенциальных ингибиторов UNG (таблица 1 приложения), отобранных на основе компьютерного моделирования лигандов в активном центре UNG человека [222]. По данным для UNG человека, идентифицированные ингибиторы обладали умеренным сродством к ферменту ( $K_i \geq 140$  мкМ), однако почти все они содержали общий фрагмент, тетрагидро-2,4,6-триоксопиримидинилиден (PuO3) (рисунок 46) — 5-замещенное производное барбитуровой кислоты, который можно рассматривать как новый перспективный фармакофор [222].

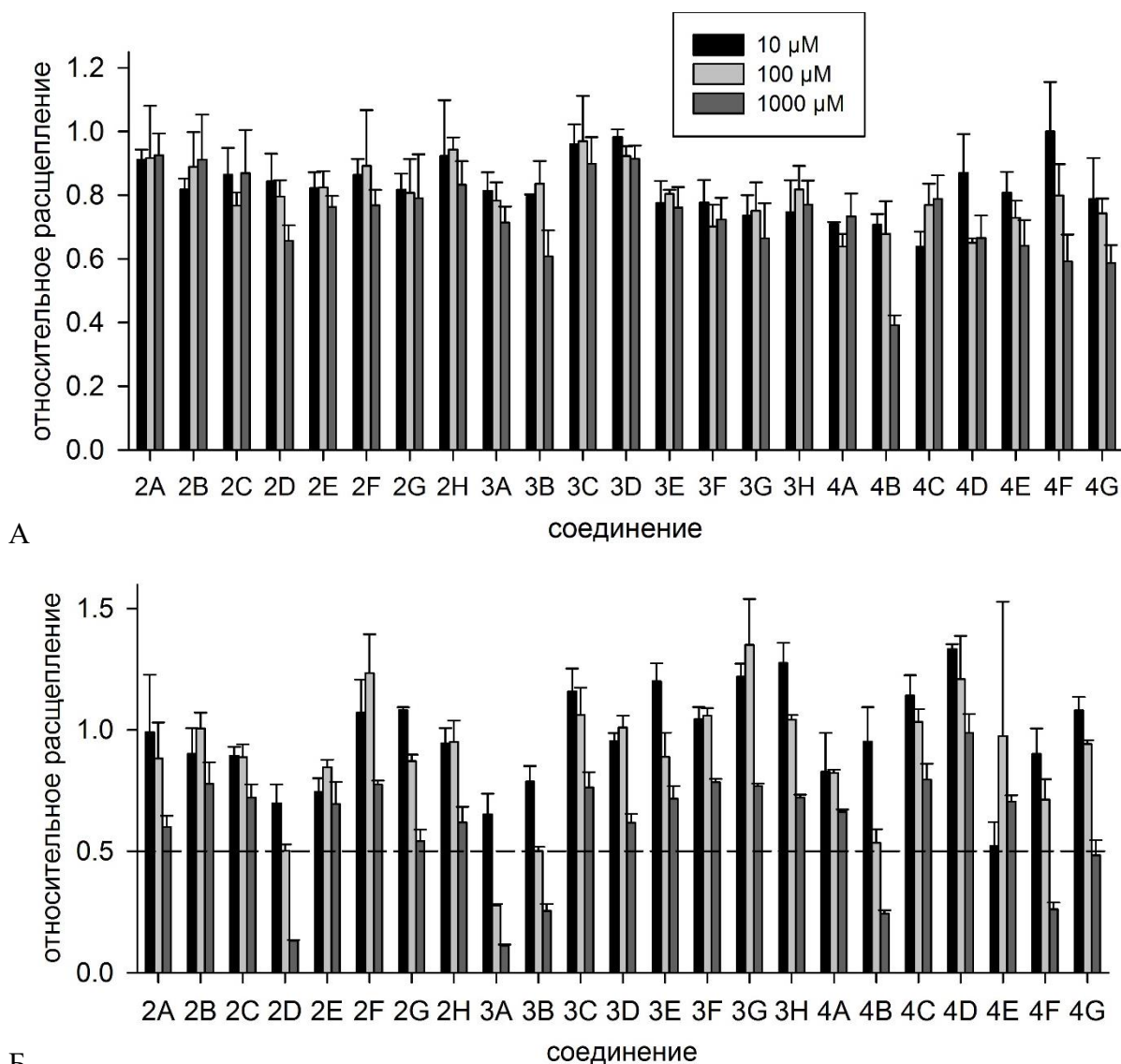


**Рисунок 46.** Структуры ингибиторов UNG человека 2D, 3A, 3B, 4B, 4E, 4F и 4G. Все соединения, кроме 4E, содержат общий фрагмент PyO3.

Поскольку активный центр урацил-ДНК-гликозилаз высоко консервативен у всех организмов, а большинство ингибиторов UNG человека проявляли характер конкурентного ингибирования [222], вероятность найти среди 23 соединений молекулы, ингибирующие также вирусную UNG, представлялась достаточно высокой. Потенциальные ингибиторы были проверены на способность ингибировать как активность фермента vvUNG, так и его процессивность.

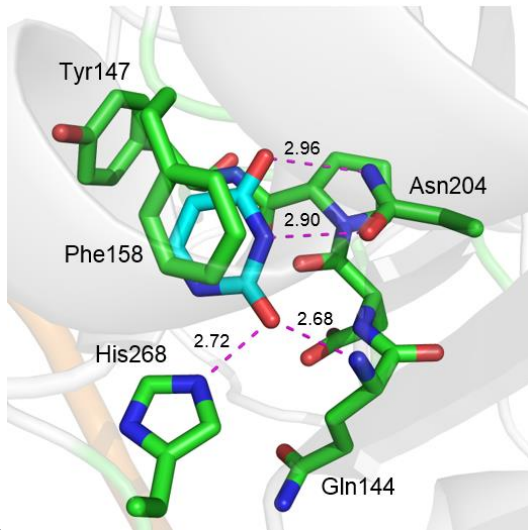
#### 4.3.7.1 Ингибирование активности vvUNG

Для изучения влияния потенциальных ингибиторов на UNG осповакцины на первом этапе были проведены реакции с 23 соединениями в тех же условиях, что ранее были использованы для экспериментов с UNG человека (рисунок 47, А). Каждое соединение проверяли в 3 концентрациях — 10, 100 и 1000 мкМ. Продукты каждой реакции нормировали на расщепление субстрата в тех же условиях в отсутствие ингибитора. Оказалось, что некоторые молекулы ингибировали вирусную UNG значительно сильнее, чем UNG человека: для 13 соединений наблюдался дозозависимый эффект, а 4 из них (2D, 3A, 3B, 4B) подавляли активность вирусной UNG на ~50% и более при 100 мкМ концентрации (рисунок 47, Б). Все наиболее активные ингибиторы, как и в случае с UNG человека, содержали общий фрагмент PyO3.

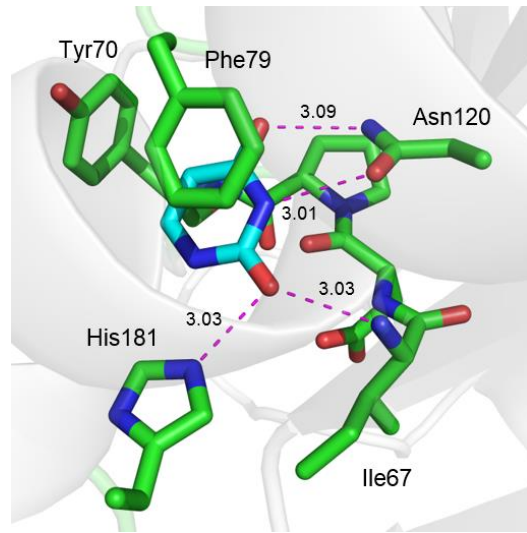


**Рисунок 47.** Влияние соединений на активность (А) UNG человека [222] и (Б) vvUNG. Концентрации ингибиторов: 10 мкМ (черные столбцы), 100 мкМ (светло-серые) и 1000 мкМ (темно-серые). Активность нормирована на эффективность расщепления в отсутствии ингибиторов. Показаны средние значения и стандартная ошибка по 3 независимым экспериментам.

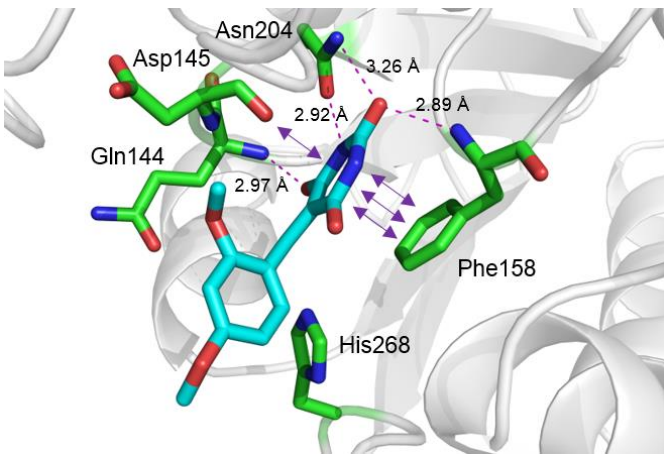
Похожее поведение РuO<sub>3</sub>-содержащих молекул не удивительно, ведь архитектура активных центров этих двух урацил-ДНК-гликозилаз очень схожа (рисунок 48, А, Б). Для наилучших ингибиторов vvUNG (2D, 3A, 3B, 4B и 4F) к. х. н. Чиловым Г. Г. (ИОХ РАН) был проведен их докинг со структурой белка. Во всех случаях молекула ингибитора хорошо встраивалась в урацилсвязывающий карман vvUNG, взаимодействуя с остатками Pe67, Asp68, Phe79 и Asn120 (рисунок 48, В–И).



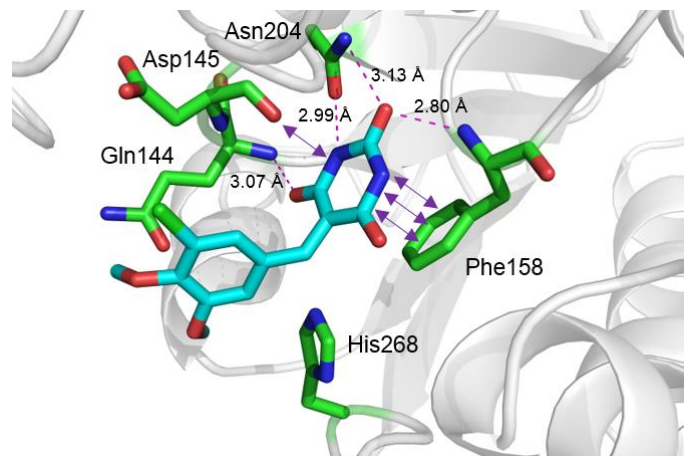
A



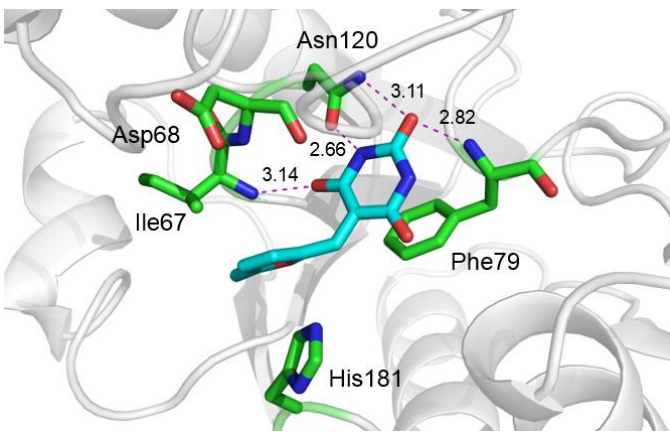
B



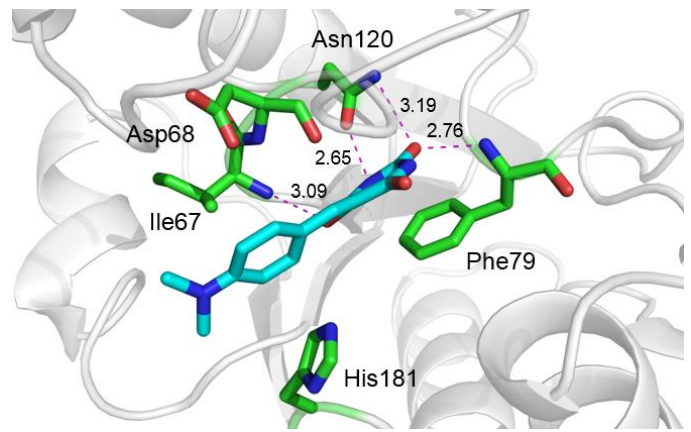
B



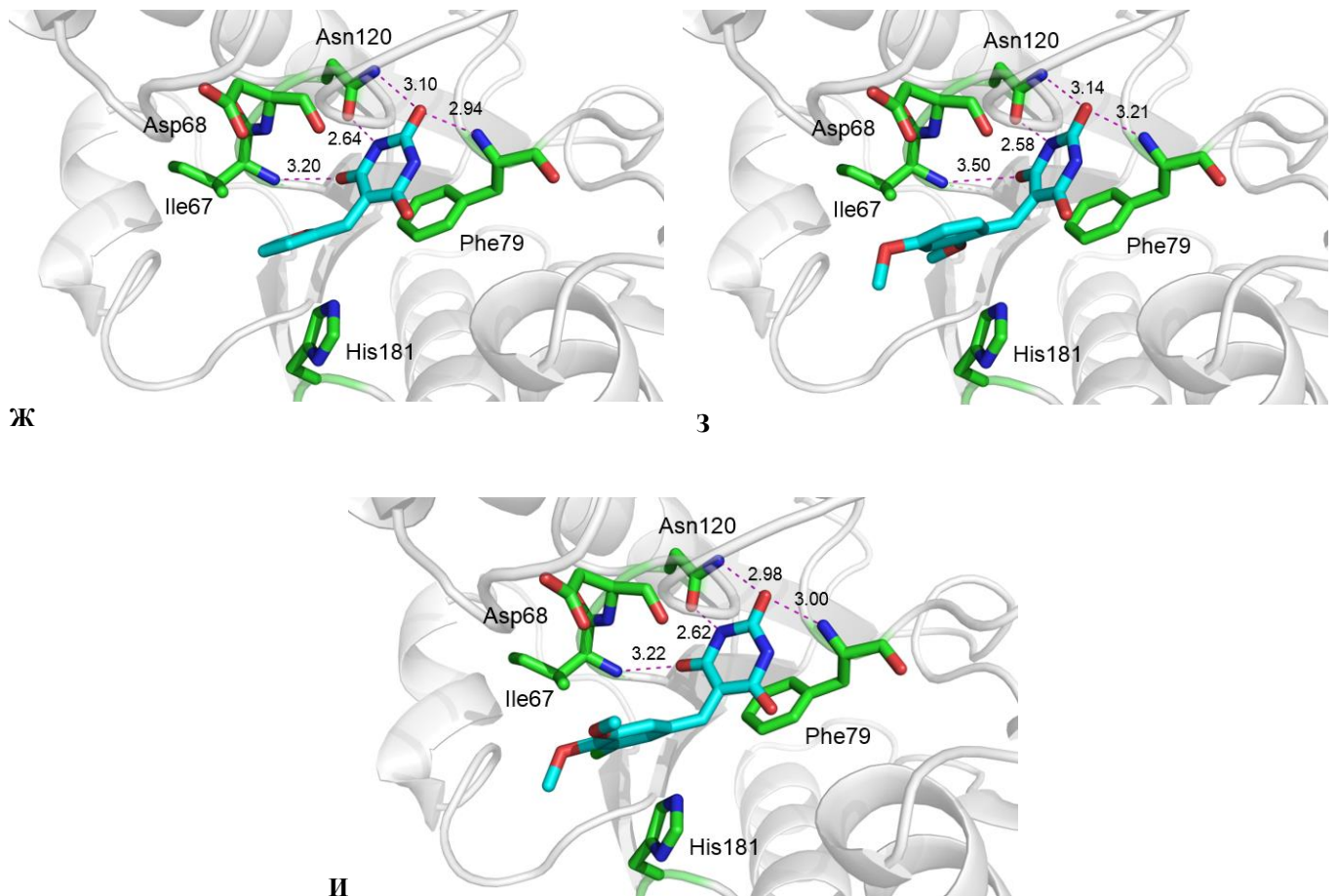
Г



Д



E



**Рисунок 48.** Структура сайта связывания урацила в молекуле (А) UNG человека (номер структуры в базе данных PDB 1SSP [84]) и (Б) vvUNG (номер в PDB 4YIG [124]) со свободным основанием Ura (обе структуры также содержат ДНК с АП-сайтом, не показана). В, Г — докинг структуры активного центра UNG человека (номер в PDB 3FCF) с соединениями 4В и 4F соответственно. Прерывистой линией обозначены длины стабилизирующих водородных связей. Двойными стрелками указаны взаимодействия с  $\pi$ -системой фрагмента  $RuO_3$ . (Д–И) — докинг структуры активного центра vvUNG (номер в PDB 4YIG) с соединениями 2D (Д), 3А (Е), 3В (Ж), 4В (З) и 4F (И). Атомы углерода в основании Ura и в молекулах ингибиторов окрашены голубым, в аминокислотах белка – зеленым.

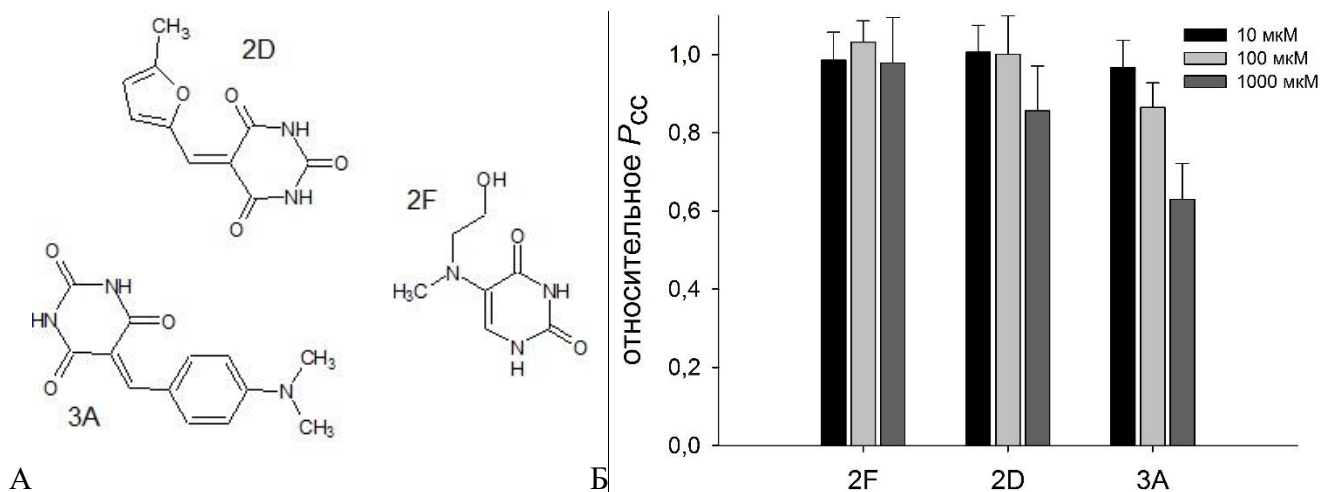
Таким образом, был выявлен новый потенциальный фармакофор,  $RuO_3$ , который способен связываться с урацил-ДНК-гликозилами человека [222] и осповакцины. Цитотоксичность  $RuO_3$ -содержащих молекул, определенная на клеточной линии НЕК293 с помощью МТТ-теста для ингибиторов 4В и 4F, была умеренной ( $EC_{50} \sim 100$  мкМ) [222], а оценочные значения эффективной концентрации ингибирования vvUNG *in vitro*  $IC_{50}$  находились в области  $\sim 10$ –100 мкМ (рисунок 47, Б). Присоединение к  $RuO_3$  дополнительных групп для стабилизации взаимодействий в ДНК-связывающей бороздке могут уменьшить токсичность, а также улучшить афинность и селективность по отношению к UNG из различных организмов.

#### 4.3.7.2 Ингибирование процессивности вирусной UNG

К настоящему времени известны низкомолекулярные лиганды, нацеленные на белок-белковый интерфейс между vvUNG и субъединицей А20 репликативного комплекса вируса осповакцины [142, 143, 145, 147]. Однако этот интерфейс не перекрывается ни с активным центром, ни с ДНК-связывающей бороздкой фермента [124, 127]. Хотя каталитическая

активность vvUNG и не нужна для репликации вируса, она необходима для его вирулентности [116, 117, 261], поэтому ингибирование UNG можно рассматривать как эффективную стратегию разработки противовирусных агентов. Представлял интерес вопрос, влияет ли ингибирование vvUNG производными PuO3 на его способность оставаться процессивной субъединицей. Поскольку  $P_{cc}$  рассчитывается как соотношение начальных скоростей реакции, уменьшение начальной скорости на отдельном сайте Ura не влияет на  $P_{cc}$ , а значит любой наблюдаемый эффект обусловлен изменением эффективности трансфера между сайтами.

Из библиотеки ингибиторов, описанной в предыдущем разделе, было изучено три соединения (рисунок 49, А), из которых 2F не проявляло ингибирующих свойств, тогда как 2D и 3A достаточно эффективно ингибировали активность vvUNG (рисунок 47, Б). В присутствии 2F до концентрации 1000 мкМ никаких изменений в  $P_{cc}$  не наблюдалось (рисунок 49, Б). 2D вызвал снижение  $P_{cc}$  на 15% при самой высокой используемой концентрации (1000 мкМ), однако оно не достигало статистической значимости. Эффект ингибитора 3A был более выраженным:  $P_{cc}$  снижалась на ~15% при 100 мкМ и на 37% при 1000 мкМ концентрации соединения; различия с контролем без ингибитора достигали статистической значимости ( $p < 0,01$ ). Хотя степень подавления процессивности была невелика, эти результаты показывают, что транслокация UNG осповакцины может ингибироваться низкомолекулярными соединениями, которые предположительно конкурируют с ДНК за контакты в месте связывания повреждения или вблизи него.



**Рисунок 49.** Ингибирование процессивного поиска vvUNG производными PuO3. А — структуры соединений 2D, 2F и 3A. Б — зависимость  $P_{cc}$ , нормированная на контроль без ингибиторов, от концентрации ингибитора (10 мкМ (черные столбцы), 100 мкМ (светло-серые) и 1000 мкМ (темно-серые)). Показаны средние значения и стандартная ошибка по 3 независимым экспериментам.

Известны несколько мутантных вариантов vvUNG, у которых снижена способность поддерживать процессивный синтез ДНК, но при этом ДНК-гликозилазная активность сохранена [139]. Во всех этих мутантных формах измененные аминокислоты расположены на ДНК-

связывающей поверхности белка, но на некотором отдалении от активного центра; ожидается, что они будут влиять на неспецифические электростатические взаимодействия белка с ДНК. Аминокислотная замена G179R на интерфейсе vvUNG/A20 также нарушает взаимодействие этих двух компонентов репликативного комплекса и приводит к потере процессивного синтеза ДНК [122]. Вероятно, для процессивности репликации важны как правильное связывание vvUNG с комплексом через адапторную субъединицу A20, так и процессивность vvUNG. Интерфейс между vvUNG и белком A20 — привлекательная мишень для разработки лекарств нового класса, представляющих собой низкомолекулярные соединения, разрушающие белок-белковые взаимодействия.

Случившаяся в 2022 году вспышка оспы обезьян, вызываемая близкородственным вирусу осповакцины поксвирусом, подтверждает высокую значимость и актуальность проблемы разработки терапевтических средств для этого семейства инфекционных агентов. В штаммах, вызвавших последнюю вспышку заболевания, был выявлен ряд мутаций белков репликативного комплекса, которые могут обуславливать изменения фенотипа и вирулентности. Хотя ни одна из этих мутаций не содержится в урацил-ДНК-гликозилазе вируса, две из них локализованы в молекуле ДНК-полимеразы, что отражает высокие риски возникновения лекарственной устойчивости к двум из трех одобренных препаратов (нуклеозидных аналогов) против поксвирусов [262]. Результаты настоящего исследования показывают возможность снижения процессивности vvUNG низкомолекулярными соединениями через блокировку активного центра фермента, и, таким образом, предлагают альтернативный механизм подавления репликации поксвирусов.

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследованы механизмы поиска повреждений пятью ферментами репарации ДНК — эндонуклеазой VIII *E. coli* (Nei), гомологами эндонуклеазы VIII мыши (NEIL1 и NEIL2), урацил-ДНК-гликозилазами *E. coli* (Ung) и вируса осповакцины (vvUNG). Итоги работы в значительной мере расширяют понимание молекулярных основ разнообразных функций этих ферментов в живых системах.

Исследование процессивности ДНК-гликозилаз суперсемейства H2TH было мотивировано необходимостью сравнить хорошо изученный в этом отношении фермент Fpg с белками Nei, NEIL1 и NEIL2, для которых такие данные практически полностью отсутствовали. Было впервые показано, что, несмотря на гомологию и общую пространственную укладку этих ферментов, их способность вести процессивный поиск мишеней варьирует в очень широком диапазоне — от близких к единице значений  $P_{cc}$  для Fpg, отражающих высокоэффективный процессивный поиск, до стремящихся к нулю значений для NEIL2, соответствующих практически полностью дистрибутивному поиску. В клетке Fpg, NEIL1 и Nei, вероятно, ищут повреждения в ДНК самостоятельно, в то время как NEIL2 осуществляет этот процесс в комплексе с РНК-полимеразой II, которая выступает в качестве сенсора повреждения, что может объяснить низкую процессивность этого фермента в изолированном виде. Пример белков H2TH может быть актуален и для других суперсемейств ДНК-гликозилаз, объединяющих ферменты с достаточно широким функциональным разнообразием. В частности, интересно было бы сравнить процессивность ДНК-гликозилаз суперсемейства «спираль — шпилька — спираль», в которое входят ферменты, узнающие окисленные пурины (эукариотическая 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза OGG1), окисленные пиримидины (бактериальная эндонуклеаза III и ее эукариотические гомологи NTHL1), алкилированные основания (бактериальные алкилпурин-ДНК-гликозилазы AlkA и MagIII), продукты дезаминирования (эукариотический белок MBD4) и эпигенетические модификации ДНК (5-метилцитозин-ДНК-гликозилазы растений DML/ROS).

Работа внесла существенный вклад в развитие экспериментального биохимического подхода к определению процессивности ферментов с помощью ДНК-субстратов, содержащих два специфических сайта. В частности, для исследования влияния на процессивный поиск мишеней внутриклеточных молекул, взаимодействующих с ДНК, были впервые предложены соединения небелковой природы, связывающиеся с ДНК нековалентно в малой и большой бороздках. Впервые показано, что Ung *E. coli* способна преодолевать такие нековалентные лиганды в процессивном режиме, однако ковалентные аддукты ДНК значительно снижают процессивность фермента на двуцепочечной ДНК, вероятно, за счет искажения ее структуры и изменения жесткости. При этом изменения, возникающие в одноцепочечной ДНК в присутствии ковалентного аддукта, не оказывают заметного влияния на механизм поиска этим ферментом.



Значительная часть работы была посвящена характеристике процессивности вирусной ДНК-гликозилазы vvUNG. Это свойство vvUNG можно рассматривать с двух сторон. Во-первых, как и любой фермент репарации, vvUNG может использовать процессивный механизм для поиска повреждений в ДНК. Однако непонятно, насколько проблема быстрого поиска повреждений актуальна для сравнительно небольшого по размеру вирусного генома, который на протяжении заметной части жизненного цикла внутри клетки находится в состоянии репликации, вследствие чего более выгодной становится локализация повреждений за счет остановки на них репликативного комплекса. С другой стороны, собственная процессивность vvUNG при поиске повреждений может служить удобным инструментом для анализа свойств этого белка, выступающего в качестве фактора процессивности вирусного репликативного комплекса. Проведенные в работе количественные оценки показывают, что присутствие субъединицы vvUNG способно повысить модальную процессивность вирусной ДНК-полимеразы с  $< 10$  до нескольких тысяч включенных нуклеотидов за один акт ассоциации. Более того, поскольку vvUNG как процессивная субъединица совершенно не похожа по своей структуре на фактор PCNA, обеспечивающий процессивность ДНК-полимераз человека, вирусная ДНК-гликозилаза представляет собой удобную мишень для разработки новых противовирусных средств. Идентифицированные в работе соединения класса тетрагидро-2,4,6-триоксопиримидинилиденов, которые в целом показывали более высокую активность против вирусного фермента по сравнению с человеческим, могут стать прототипами таких соединений. Роль vvUNG в репликативной процессивности позволяет задаться вопросом, могут ли другие ДНК-связывающие белки, способные к поиску мишеней в ДНК по механизму одномерной диффузии, сообщать дополнительную процессивность ДНК-полимеразам хотя бы в виде искусственно созданных химерных конструкций. Подобные примеры известны, однако информация о собственной процессивности вспомогательных белков способствовала бы рациональному дизайну химерных ДНК-полимераз для биотехнологических приложений.

В целом результаты работы подтверждают, что белки, узнающие какие-либо специфичные элементы ДНК, сочетают процессивный и дистрибутивный режимы для достижения наиболее эффективного поиска своих мишеней в ядрах эукариотических клеток, бактериальных нуклеоидах и, возможно, вирусных «репликативных фабриках». Хотя примеров изучения процессивности в живых клетках на сегодня насчитывается очень мало, только разработка методов *in situ* может дать ответ, насколько хорошо механизмы, предложенные на основе экспериментов *in vitro*, согласуются с реальной динамикой поиска повреждений ферментами репарации.

## 6. ВЫВОДЫ

1. Для ферментов эндонуклеазы VIII *E. coli* (Nei) и гомологов эндонуклеазы VIII NEIL1 и NEIL2 мыши наблюдаются значительные различия в механизмах поиска поврежденных оснований в ДНК. Для этих ферментов впервые определены значения вероятности коррелированного расщепления субстрата ( $P_{cc}$ ) — параметра, характеризующего процессивный поиск мишеней. Значения  $P_{cc}$  в условиях низкой ионной силы ( $0,47 \pm 0,05$  для NEIL1,  $0,28 \pm 0,01$  для Nei и  $0,11 \pm 0,01$  для NEIL2), а также характер их зависимости от концентрации одно- и двухвалентных катионов свидетельствуют о том, что NEIL1 использует при поиске процессивный механизм, NEIL2 к нему практически не способен, а для фермента Nei наблюдается промежуточная ситуация. Отсутствие выраженной зависимости от расстояния между повреждениями для NEIL1 и Nei согласуется с гипотезой о существовании двух конформационных популяций с характерной дистанцией поиска более 80 нуклеотидов в сканирующей конформации.
2. Эффективность транслокации урацил-ДНК-гликозилазы *E. coli* (Ung) вдоль двуцепочечной ДНК зависит от типа препятствий.  $P_{cc}$  значительно снижается при наличии ковалентного аддукта в большой бороздке, который может затруднять конформационные изменения ДНК, сопровождающие передвижение фермента по ней. Однако фермент способен преодолевать нековалентно связанные лиганды как в малой, так и в большой бороздке ДНК.
3. Фермент vvUNG вируса осповакцины осуществляет процессивный поиск мишеней в ДНК, более эффективный по своим значениям  $P_{cc}$  ( $0,68 \pm 0,02$  в условиях низкой ионной силы), чем поиск ферментом Ung *E. coli* ( $0,30 \pm 0,03$  в тех же условиях). Зависимость значений  $P_{cc}$  от концентрации катионов указывает на основной вклад электростатических взаимодействий в удержание фермента в комплексе с ДНК в ходе поиска. Высокая процессивность поиска согласуется с ролью vvUNG как фактора процессивности репликативного комплекса вируса осповакцины. Моделирование процесса одномерного блуждания vvUNG позволило рассчитать значение вероятности диссоциации фермента на каждом шаге ( $p_{off} \sim 2,4 \times 10^{-4}$ ), что в однонаправленно движущемся репликативном комплексе соответствует модальному смещению на  $\sim 4200$  нуклеотидов за один акт ассоциации. Найдены соединения класса тетрагидро-2,4,6-триоксопиримидинилиденов, обладающие потенциалом использования в противовирусной терапии за счет ингибирования как активности, так и процессивности vvUNG.

## 7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

5-OH-Cyt	5-гидроксицитозин
5-OH-Ura	5-гидроксиурацил
8-охоGua	8-оксогуанин
BSA	бычий сывороточный альбумин
dRP	2'-дезоксирибо-5'-фосфат
DTT	1,4-дителиотреит
EDTA	этилендиамин- <i>N,N,N',N'</i> -тетрауксусная кислота
FAM	6-карбоксифлуоресцеин
FapyAde	4,6-диаминопиримидин-5-илформаид
FapyGua	2,4-диамино-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-илформаид
Gh	гуанидиногидантоин
H <sub>2</sub> Thy	5,6-дигидротимин
H <sub>2</sub> Ura	5,6-дигидроурацил
HEPES	4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоная кислота
IPTG	изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид
NEIL1/2	эндонуклеазы VIII мыши
Nei	эндонуклеаза VIII <i>E. coli</i>
PDB	база данных кристаллических структур Protein Data Bank
PуO3	тетрагидро-2,4,6-триоксопиримидинилиден
SDS	додецилсульфат натрия
Sp	спироиминодигидантоин
Tg	тимингликоль
THF	(3-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)метилфосфат, F
Tris	2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол

Ung, UNG	урацил-ДНК-гликозилаза
vvUNG	урацил-ДНК-гликозилаза вируса осповакцины
АП	апуриновый-апиримидиновый
дц	двухцепочечный
е.а.	единица активности фермента
кДа	килодальтон
нт	нуклеотидов
ОДН	олигодезоксирибонуклеотид, олигодезоксирибонуклеотидный
оц	одноцепочечный
ПААГ	полиакриламидный гель
п. н.	пар нуклеотидов
ПЭГ	полиэтиленгликоль
ЭРО	эксцизионная репарация оснований

В тексте также использовались одно- и трехбуквенные обозначения аминокислотных остатков и азотистых оснований по номенклатуре IUPAC.

## 8. СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W., Wood R.D., Schultz R.A., Ellenberger T. DNA Repair and Mutagenesis. – Washington, D.C.: ASM Press, 2006. – 1118 pp.
2. Zharkov D.O. Base excision DNA repair // Cell. Mol. Life Sci. – 2008. – V. 65. – № 10. – P. 1544–1565.
3. Fortini P., Dogliotti E. Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways // DNA Repair (Amst). – 2007. – V. 6. – № 4. – P. 398–409.
4. Lindahl T., Nyberg B. Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid // Biochemistry. – 1974. – V. 13. – № 16. – P. 3405–3410.
5. Kavli B., Slupphaug G., Krokan H.E. Genomic uracil in biology, immunity and cancer // DNA Damage, DNA Repair and Disease. – 2021. – V. 1. – P. 220–248.
6. Frederico L.A., Kunkel T.A., Shaw B.R. A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy // Biochemistry. – 1990. – V. 29. – № 10. – P. 2532–2537.
7. Tye B.-K., Chien J., Lehman I.R., Duncan B.K., Warner H.R. Uracil incorporation: A source of pulse-labeled DNA fragments in the replication of the *Escherichia coli* chromosome // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1978. – V. 75. – № 1. – P. 233–237.
8. An Q., Robins P., Lindahl T., Barnes D.E. C → T mutagenesis and  $\gamma$ -radiation sensitivity due to deficiency in the Smug1 and Ung DNA glycosylases // EMBO J. – 2005. – V. 24. – № 12. – P. 2205–2213.
9. Lindahl T., Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid // Biochemistry. – 1972. – V. 11. – № 19. – P. 3610–3618.
10. Atamna H., Cheung I., Ames B.N. A method for detecting abasic sites in living cells: Age-dependent changes in base excision repair // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2000. – V. 97. – № 2. – P. 686–691.
11. Lindahl T., Andersson A. Rate of chain breakage at apurinic sites double-stranded deoxyribonucleic acid // Biochemistry. – 1972. – V. 11. – № 19. – P. 3618–3623.
12. Shishkina I.G., Johnson F. A new method for the postsynthetic generation of abasic sites in oligomeric DNA // Chem. Res. Toxicol. – 2000. – V. 13. – № 9. – P. 907–912.
13. Takeshita M., Chang C.-N., Johnson F., Will S., Grollman A.P. Oligodeoxynucleotides containing synthetic abasic sites. Model substrates for DNA polymerases and apurinic/apyrimidinic endonucleases. // J. Biol. Chem. – 1987. – V. 262. – № 21. – P. 10171–10179.
14. Taylor J.S. New structural and mechanistic insight into the A-rule and the instructional and non-

- instructional behavior of DNA photoproducts and other lesions // *Mutat. Res.* – 2002. – V. 510. – № 1–2. – P. 55–70.
15. Fleck O., Schär P. Translesion DNA synthesis: little fingers teach tolerance // *Curr. Biol.* – 2004. – V. 14. – № 10. – P. R389–R391.
  16. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. – Oxford University Press, 2007. – 704 pp.
  17. Grollman A.P., Moriya M. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within // *Trends Genet.* – 1993. – V. 9. – № 7. – P. 246–249.
  18. Dedon P.C. The chemical toxicology of 2-deoxyribose oxidation in DNA // *Chem. Res. Toxicol.* – 2008. – V. 21. – № 1. – P. 206–219.
  19. Dizdaroglu M., Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA // *Free Radic. Res.* – 2012. – V. 46. – № 4. – P. 382–419.
  20. Cadet J., Davies K.J.A., Medeiros M.H., Di Mascio P., Wagner J.R. Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA // *Free Radic. Biol. Med.* – 2017. – V. 107. – P. 13–34.
  21. Зенков Н., Ланкин В., Меньщикова Е. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты // Москва: МАИК Наука/Интерпериодика, 2001. – 343 с.
  22. von Sonntag C. *Free-radical-induced DNA damage and its repair: a chemical perspective*. Berlin - Heidelberg: Springer, 2006. 523 pp.
  23. Purmal A.A., Kow Y.W., Wallace S.S. Major oxidative products of cytosine, 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil, exhibit sequence context-dependent mispairing *in vitro* // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – V. 22. – № 1. – P. 72–78.
  24. Luo W., Muller J.G., Rachlin E.M., Burrows C.J. Characterization of hydantoin products from one-electron oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine in a nucleoside model // *Chem. Res. Toxicol.* – 2001. – V. 14. – № 7. – P. 927–938.
  25. Fleming A.M., Burrows C.J. Formation and processing of DNA damage substrates for the hNEIL enzymes // *Free Radic. Biol. Med.* – 2017. – V. 107. – P. 35–52.
  26. Kalam M.A. Genetic effects of oxidative DNA damages: comparative mutagenesis of the imidazole ring-opened formamidopyrimidines (Fapy lesions) and 8-oxo-purines in simian kidney cells // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – V. 34. – № 8. – P. 2305–2315.
  27. Gilboa R., Zharkov D.O., Golan G., Fernandes A.S., Gerchman S.E., Matz E., Kycia J.H., Grollman A.P., Shoham G. Structure of formamidopyrimidine-DNA glycosylase covalently complexed to DNA // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – № 22. – P. 19811–19816.
  28. Zharkov D.O., Shoham G., Grollman A.P. Structural characterization of the Fpg family of DNA glycosylases // *DNA Repair (Amst.)* – 2003. – V. 2. – № 8. – P. 839–862.

29. Chetsanga C.J., Lindahl T. Release of 7-methylguanine residues whose imidazole rings have been opened from damaged DNA by a DNA glycosylase from *Escherichia coli* // Nucleic Acids Res. – 1979. – V. 6. – № 11. – P. 3673–3684.
30. Boiteux S., O'Connor T.R., Laval J. Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli*: cloning and sequencing of the fpg structural gene and overproduction of the protein // EMBO J. – 1987. – V. 6. – № 10. – P. 3177–3183.
31. Boiteux S., O'Connor T.R., Lederer F., Gouyette A., Laval J. Homogeneous *Escherichia coli* FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA atapurinic/apyrimidinic sites // J. Biol. Chem. – 1990. – V. 265. – № 7. – P. 3916–3922.
32. Cabrera M., Nghiem Y., Miller J.H. mutM, a second mutator locus in *Escherichia coli* that generates G.C----T.A transversions // J. Bacteriol. – 1988. – V. 170. – № 11. – P. 5405–5407.
33. Bailly V., Verly W.G., O'Connor T., Laval J. Mechanism of DNA strand nicking atapurinic/apyrimidinic sites by *Escherichia coli* [formamidopyrimidine]DNA glycosylase // Biochem. J. – 1989. – V. 262. – № 2. – P. 581–589.
34. Ishchenko A.A., Vasilenko N.L., Sinitsina O.I., Yamkovoy V.I., Fedorova O.S., Douglas K.T., Nevinsky G.A. Thermodynamic, kinetic, and structural basis for recognition and repair of 8-oxoguanine in DNA by Fpg protein from *Escherichia coli* // Biochemistry. – 2002. – V. 41. – № 24. – P. 7540–7548.
35. Endutkin A. V., Zharkov D.O. Substrate specificities of DNA glycosylases *in vitro* and *in vivo* // DNA Damage, DNA Repair and Disease. – 2021. – V. 1. – № 14. – P. 175–203.
36. Dizdaroglu M., Coskun E., Jaruga P. Repair of oxidatively induced DNA damage by DNA glycosylases: Mechanisms of action, substrate specificities and excision kinetics // Mutat. Res. – 2017. – V. 771. – P. 99–127.
37. Melamede R.J., Hatahet Z., Kow Y.W., Ide H., Wallace S.S. Isolation and characterization of Endonuclease VIII from *Escherichia coli* // Biochemistry. – 1994. – V. 33. – № 5. – P. 1255–1264.
38. Jiang D., Hatahet Z., Blaisdell J.O., Melamede R.J., Wallace S.S. *Escherichia coli* endonuclease VIII: cloning, sequencing, and overexpression of the nei structural gene and characterization of nei and nei nth mutants. // J. Bacteriol. – 1997. – V. 179. – № 11. – P. 3773–3782.
39. Dizdaroglu M., Burgess S.M., Jaruga P., Hazra T.K., Rodriguez H., Lloyd R.S. Substrate specificity and excision kinetics of *Escherichia coli* endonuclease VIII (Nei) for modified bases in DNA damaged by free radicals // Biochemistry. – 2001. – V. 40. – № 40. – P. 12150–12156.
40. Miller H. Stereoselective excision of thymine glycol from oxidatively damaged DNA // Nucleic Acids Res. – 2004. – V. 32. – № 1. – P. 338–345.
41. Schalow B.J., Courcelle C.T., Courcelle J. *Escherichia Coli* Fpg glycosylase is nonredundant

- and required for the rapid global repair of oxidized purine and pyrimidine damage *in vivo* // *J. Mol. Biol.* – 2011. – V. 410. – № 2. – P. 183–193.
42. Takao M. Novel nuclear and mitochondrial glycosylases revealed by disruption of the mouse *Nth1* gene encoding an endonuclease III homolog for repair of thymine glycols // *EMBO J.* – 2002. – V. 21. – № 13. – P. 3486–3493.
  43. Hazra T.K., Izumi T., Boldogh I., Imhoff B., Kow Y.W., Jaruga P., Dizdaroglu M., Mitra S. Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2002. – V. 99. – № 6. – P. 3523–3528.
  44. Bandaru V. A novel human DNA glycosylase that removes oxidative DNA damage and is homologous to *Escherichia coli* endonuclease VIII // *DNA Repair (Amst.)*. – 2002. – V. 1. – № 7. – P. 517–529.
  45. Takao M., Kanno S., Kobayashi K., Zhang Q.-M., Yonei S., van der Horst G.T.J., Yasui A. A Back-up glycosylase in *nth1* knock-out mice is a functional Nei (endonuclease VIII) homologue // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – № 44. – P. 42205–42213.
  46. Hazra T.K., Kow Y.W., Hatahet Z., Imhoff B., Boldogh I., Mokkaapati S.K., Mitra S., Izumi T. Identification and characterization of a novel human DNA glycosylase for repair of cytosine-derived lesions // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – № 34. – P. 30417–30420.
  47. 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 Res.* – 2002. – V. 30. – № 22. – P. 4926–4936.
  48. Rosenquist T. The novel DNA glycosylase, NEIL1, protects mammalian cells from radiation-mediated cell death // *DNA Repair (Amst.)*. – 2003. – V. 2. – № 5. – P. 581–591.
  49. Bandaru V., Zhao X., Newton M.R., Burrows C.J., Wallace S.S. Human endonuclease VIII-like (NEIL) proteins in the giant DNA Mimivirus // *DNA Repair (Amst.)*. – 2007. – V. 6. – № 11. – P. 1629–1641.
  50. Ahmad H.I., Afzal G., Sadia S., Haider G., Ahmed S., Saeed S., Chen J. Structural and evolutionary adaptations of Nei-like DNA glycosylases proteins involved in base excision repair of oxidative DNA damage in vertebrates // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2022. – V. 2022. – Article № 1144387.
  51. Jaruga P., Birincioglu M., Rosenquist T.A., Dizdaroglu M. Mouse NEIL1 protein is specific for excision of 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine and 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine from oxidatively damaged DNA // *Biochemistry.* – 2004. – V. 43. – № 50. – P. 15909–15914.
  52. Krishnamurthy N., Zhao X., Burrows C.J., David S.S. Superior removal of hydantoin lesions relative to other oxidized bases by the human DNA glycosylase hNEIL1 // *Biochemistry.* – 2008.



- V. 47. – № 27. – P. 7137–7146.
53. Ali M.M., Hazra T.K., Hong D., Kow Y.W. Action of human endonucleases III and VIII upon DNA-containing tandem dihydrouracil // *DNA Repair (Amst)*. – 2005. – V. 4. – № 6. – P. 679–686.
  54. Makasheva K.A., Endutkin A. V., Zharkov D.O. Requirements for DNA bubble structure for efficient cleavage by helix-two-turn-helix DNA glycosylases // *Mutagenesis*. – 2020. – V. 35. – № 1. – P. 119–128.
  55. Albelazi M.S., Martin P.R., Mohammed S., Mutti L., Parsons J.L., Elder R.H. The biochemical role of the human NEIL1 and NEIL3 DNA glycosylases on model DNA replication forks // *Genes*. – 2019. – V. 10. – № 4. – Article № 315.
  56. Wallace S. The enigma of endonuclease VIII // *DNA Repair (Amst)*. – 2003. – V. 2. – № 5. – P. 441–453.
  57. Dou H., Mitra S., Hazra T.K. Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2 // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – № 50. – P. 49679–49684.
  58. Liu M., Bandaru V., Holmes A., Averill A.M., Cannan W., Wallace S.S. Expression and purification of active mouse and human NEIL3 proteins // *Protein Expr. Purif.* – 2012. – V. 84. – № 1. – P. 130–139.
  59. Liu M., Bandaru V., Bond J.P., Jaruga P., Zhao X., Christov P.P., Burrows C.J., Rizzo C.J., Dizdaroglu M., Wallace S.S. The mouse ortholog of NEIL3 is a functional DNA glycosylase *in vitro* and *in vivo* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2010. – V. 107. – № 11. – P. 4925–4930.
  60. Hu J., de Souza-Pinto N.C., Haraguchi K., Hogue B.A., Jaruga P., Greenberg M.M., Dizdaroglu M., Bohr V.A. Repair of formamidopyrimidines in DNA involves different glycosylases // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280. – № 49. – P. 40544–40551.
  61. Guan X., Bai H., Shi G., Theriot C.A., Hazra T.K., Mitra S., Lu A.L. The human checkpoint sensor Rad9-Rad1-Hus1 interacts with and stimulates NEIL1 glycosylase // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – V. 35. – № 8. – P. 2463–2472.
  62. Dou H., Theriot C.A., Das A., Hegde M.L., Matsumoto Y., Boldogh I., Hazra T.K., Bhakat K.K., Mitra S. Interaction of the human DNA glycosylase NEIL1 with proliferating cell nuclear antigen. The potential for replication-associated repair of oxidized bases in mammalian genomes // *J. Biol. Chem.* – 2008. – V. 283. – № 6. – P. 3130–3140.
  63. Theriot C.A., Hegde M.L., Hazra T.K., Mitra S. RPA physically interacts with the human DNA glycosylase NEIL1 to regulate excision of oxidative DNA base damage in primer-template structures // *DNA Repair (Amst)*. – 2010. – V. 9. – № 6. – P. 643–652.
  64. Yamamoto R., Ohshiro Y., Shimotani T., Yamamoto M., Matsuyama S., Ide H., Kubo K. Hypersensitivity of mouse NEIL1-knockdown cells to hydrogen peroxide during S phase // *J.*

- Radiat. Res. – 2014. – V. 55. – № 4. – P. 707–712.
65. Dou H., Mitra S., Hazra T.K. Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2 // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – № 50. – P. 49679–49684.
  66. Banerjee D., Mandal S.M., Das A., Hegde M.L., Das S., Bhakat K.K., Boldogh I., Sarkar P.S., Mitra S., Hazra T.K. Preferential repair of oxidized base damage in the transcribed genes of mammalian cells // J. Biol. Chem. – 2011. – V. 286. – № 8. – P. 6006–6016.
  67. Chakraborty A., Wakamiya M., Venkova-Canova T., Pandita R.K., Aguilera-Aguirre L., Sarker A.H., Singh D.K., Hosoki K., Wood T.G., Sharma G., Cardenas V., Sarkar P.S., Sur S., Pandita T.K., Boldogh I., Hazra T.K. Neil2-null mice accumulate oxidized DNA bases in the transcriptionally active sequences of the genome and are susceptible to innate inflammation // J. Biol. Chem. – 2015. – V. 290. – № 41. – P. 24636–24648.
  68. Zhou J., Chan J., Lambelé M., Yusufzai T., Stumpff J., Opreko P.L., Thali M., Wallace S.S. NEIL3 repairs telomere damage during S phase to secure chromosome segregation at mitosis // Cell Rep. – 2017. – V. 20. – № 9. – P. 2044–2056.
  69. Martin P.R., Couvé S., Zutterling C., Albelazi M.S., Groisman R., Matkarimov B.T., Parsons J.L., Elder R.H., Saparbaev M.K. The human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL3 excise psoralen-induced DNA-DNA cross-links in a four-stranded DNA structure // Sci. Rep. – 2017. – V. 7. – № 1. – Article № 17438.
  70. Semlow D.R., Zhang J., Budzowska M., Drohat A.C., Walter J.C. Replication-dependent unhooking of DNA interstrand cross-links by the NEIL3 glycosylase // Cell. – 2016. – V. 167. – № 2. – P. 498–511.
  71. Das A., Rajagopalan L., Mathura V.S., Rigby S.J., Mitra S., Hazra T.K. Identification of a zinc finger domain in the human NEIL2 (Nei-like-2) protein // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279. – № 45. – P. 47132–47138.
  72. Грин И., Жарков Д.О. Эукариотические гомологи эндонуклеазы VIII: новые элементы системы эксцизионной репарации оснований ДНК // Биохимия. – 2011. – Т. 76. – № 1. – С. 99–114.
  73. Kropachev K.Y., Zharkov D.O., Grollman A.P. Catalytic mechanism of *Escherichia coli* endonuclease VIII: Roles of the intercalation loop and the zinc finger // Biochemistry. – 2006. – V. 45. – № 39. – P. 12039–12049.
  74. Zharkov D.O., Golan G., Gilboa R., S.Fernandes A., Gerchman S.E., H.Kycia J., A.Rieger R., P.Grollman A., Shoham G. Structural analysis of an *Escherichia coli* endonuclease VIII covalent reaction intermediate // EMBO J. – 2002. – V. 21. – № 4. – P. 789–800.
  75. Golan G., Zharkov D.O., Feinberg H., Fernandes A.S., Zaika E.I., Kycia J.H., Grollman A.P., Shoham G. Structure of the uncomplexed DNA repair enzyme endonuclease VIII indicates

- significant interdomain flexibility // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – V. 33. – № 15. – P. 5006–5016.
76. Eckenroth B.E., Cao V.B., Averill A.M., Dragon J.A., Doublie S. Unique structural features of mammalian NEIL2 DNA glycosylase prime its activity for diverse DNA substrates and environments // *Structure.* – 2021. – V. 29. – № 1. – P. 29–42.e4.
77. Lavrukhin O. V., Lloyd R.S. Involvement of phylogenetically conserved acidic amino acid residues in catalysis by an oxidative DNA damage enzyme formamidopyrimidine glycosylase // *Biochemistry.* – 2000. – V. 39. – № 49. – P. 15266–15271.
78. Burgess S., Jaruga P., Dodson M.L., Dizdaroglu M., Stephen Lloyd R. Determination of active site residues in *Escherichia coli* endonuclease VIII // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – № 4. – P. 2938–2944.
79. Zaika E.I., Perlow R.A., Matz E., Broyde S., Gilboa R., Grollman A.P., Zharkov D.O. Substrate discrimination by formamidopyrimidine-DNA glycosylase. A mutational analysis // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – № 6. – P. 4849–4861.
80. Жарков Д.О. Структура и конформационная динамика гликозилаз эксцизионной репарации оснований ДНК // *Молекулярная биология.* – 2007. – Т. 41. – № 5. – С. 775–786.
81. Imamura K., Wallace S.S., Doublie S. Structural characterization of a viral NEIL1 ortholog unliganded and bound to abasic site-containing DNA // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284. – № 38. – P. 26174–26183.
82. Doublie S., Bandaru V., Bond J.P., Wallace S.S. The crystal structure of human endonuclease VIII-like 1 (NEIL1) reveals a zincless finger motif required for glycosylase activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2004. – V. 101. – № 28. – P. 10284–10289.
83. Liu M., Imamura K., Averill A.M., Wallace S.S., Doublie S. Structural characterization of a mouse ortholog of human NEIL3 with a marked preference for single-stranded DNA // *Structure.* – 2013. – V. 21. – № 2. – P. 247–256.
84. Parikh S.S., Mol C.D., Slupphaug G., Bharati S., Krokan H.E., Tainer J.A. Base excision repair initiation revealed by crystal structures and binding kinetics of human uracil-DNA glycosylase with DNA // *EMBO J.* – 1998. – V. 17. – № 17. – P. 5214–5226.
85. Savva R. Targeting uracil-DNA glycosylases for therapeutic outcomes using insights from virus evolution // *Future Med. Chem.* – 2019. – V. 11. – № 11. – P. 1323–1344.
86. Savva R., Mc Auley-Hecht K., Brown T. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase // *Nature.* – 1995. – V. 373. – № 6514. – P. 487–493.
87. Lee H.W., Dominy B.N., Cao W. New family of deamination repair enzymes in uracil-DNA glycosylase superfamily // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286. – № 36. – P. 31282.
88. Chembazhi U.V., Patil V.V., Sah S., Reeve W., Tiwari R.P., Woo E., Varshney U. Uracil DNA glycosylase (UDG) activities in *Bradyrhizobium diazoefficiens*: characterization of a new class

- of UDG with broad substrate specificity // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45. – № 10. – P. 5863–5876.
89. Aravind L., Koonin E. V. The alpha/beta fold uracil DNA glycosylases: a common origin with diverse fates. // *Genome Biol.* – 2000. – V. 1. – № 4. – Article № 0007.
90. Zharkov D.O., Mechetin G. V., Nevinsky G.A. Uracil-DNA glycosylase: Structural, thermodynamic and kinetic aspects of lesion search and recognition // *Mutat. Res.* – 2010. – V. 685. – № 1–2. – P. 11–20.
91. Warner H.R., Rockstroh P.A. Incorporation and excision of 5-fluorouracil from deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 1980. – V. 141. – № 2. – P. 680–686.
92. Dizdaroglu M., Karakaya A., Jaruga P., Slupphaug G., Krokan H.E. Novel activities of human uracil DNA N-glycosylase for cytosine-derived products of oxidative DNA damage // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – V. 24. – № 3. – P. 418–422.
93. Krokan H., Urs Wittwer C. Uracil DNA-glycosylase from HeLa cells: general properties, substrate specificity and effect of uracil analogs // *Nucleic Acids Res.* – 1981. – V. 9. – № 11. – P. 2599–2614.
94. Eftedal I., Guddal P.H., Slupphaug G., Volden G., Krokan H.E. Consensus sequences for good and poor removal of uracil from double stranded DNA by uracil-DNA glycosylase // *Nucleic Acids Res.* – 1993. – V. 21. – № 9. – P. 2095–2101.
95. Nilsen H., Yazdankhah S.P., Eftedal I., Krokan H.E. Sequence specificity for removal of uracil from U·A pairs and U·G mismatches by uracil-DNA glycosylase from *Escherichia coli*, and correlation with mutational hotspots // *FEBS Lett.* – 1995. – V. 362. – № 2. – P. 205–209.
96. Kavli B., Sundheim O., Akbari M., Otterlei M., Nilsen H., Skorpen F., Aas P.A., Hagen L., Krokan H.E., Slupphaug G. hUNG2 is the major repair enzyme for removal of uracil from U:A matches, U:G mismatches, and U in single-stranded DNA, with hSMUG1 as a broad specificity backup // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – № 42. – P. 39926–39936.
97. Raoult D., Audic S., Robert C., Abergel C., Renesto P., Ogata H., La Scola B., Suzan M., Claverie J.M. The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus // *Science.* – 2004. – V. 306. – № 5700. – P. 1344–1350.
98. Fischer M.G., Allen M.J., Wilson W.H., Suttle C.A. Giant virus with a remarkable complement of genes infects marine zooplankton // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2010. – V. 107. – № 45. – P. 19508–19513.
99. Chen R., Wang H., Mansky L.M. Roles of uracil-DNA glycosylase and dUTPase in virus replication // *J. Gen. Virol.* – 2002. – V. 83. – № 10. – P. 2339–2345.
100. Savva R., Pearl L.H. Nucleotide mimicry in the crystal structure of the uracil-DNA glycosylase-uracil glycosylase inhibitor protein complex // *Nat. Struct. Biol.* – 1995. – V. 2. – № 9. – P. 752–

- 757.
101. Cole A.R., Ofer S., Ryzhenkova K., Baltulionis G., Hornyak P., Savva R. Architecturally diverse proteins converge on an analogous mechanism to inactivate uracil-DNA glycosylase // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – V. 41. – № 18. – P. 8760–8775.
  102. Wang H.C., Ho C.H., Chou C.C., Ko T.P., Huang M.F., Hsu K.C., Wang A.H.J. Using structural-based protein engineering to modulate the differential inhibition effects of SAUGI on human and HSV uracil DNA glycosylase // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44. – № 9. – P. 4440–4449.
  103. Krusong K., Carpenter E.P., Bellamy S.R.W., Savva R., Baldwin G.S. A comparative study of uracil-DNA glycosylases from human and herpes simplex virus type 1 // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V. 281. – № 8. – P. 4983–4992.
  104. Pyles R.B., Thompson R.L. Evidence that the herpes simplex virus type 1 uracil DNA glycosylase is required for efficient viral replication and latency in the murine nervous system. // *J. Virol.* – 1994. – V. 68. – № 8. – P. 4963–4972.
  105. Reddy S.M., Williams M., Cohen J.I. Expression of a uracil DNA glycosylase (UNG) inhibitor in mammalian cells: varicella-zoster virus can replicate *in vitro* in the absence of detectable UNG activity // *Virology.* – 1998. – V. 251. – P. 393–401.
  106. Lu C.-C., Huang H.-T., Wang J.-T., Slupphaug G., Li T.-K., Wu M.-C., Chen Y.-C., Lee C.-P., Chen M.-R. Characterization of the uracil-DNA glycosylase activity of Epstein-Barr virus BKRF3 and its role in lytic viral DNA replication // *J. Virol.* – 2007. – V. 81. – № 3. – P. 1195–1208.
  107. Kitamura K., Wang Z., Chowdhury S., Simadu M., Koura M., Muramatsu M. Uracil DNA glycosylase counteracts APOBEC3G-induced hypermutation of hepatitis B viral genomes: excision repair of covalently closed circular DNA // *PLoS Pathog.* – 2013. – V. 9. – № 5. – P. e1003361.
  108. Klarmann G.J., Chen X., North T.W., Preston B.D. Incorporation of uracil into minus strand DNA affects the specificity of plus strand synthesis initiation during lentiviral reverse transcription // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – № 10. – P. 7902–7909.
  109. Harris R.S., Bishop K.N., Sheehy A.M., Craig H.M., Petersen-Mahrt S.K., Watt I.N., Neuberger M.S., Malim M.H. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection // *Cell.* – 2003. – V. 113. – № 6. – P. 803–809.
  110. Yang B., Chen K., Zhang C., Huang S., Zhang H. Virion-associated uracil DNA glycosylase-2 and apurinic/apyrimidinic endonuclease are involved in the degradation of APOBEC3G-edited nascent HIV-1 DNA // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282. – № 16. – P. 11667–11675.
  111. Bouhamdan M., Benichou S., Rey F., Navarro J.M., Agostini I., Spire B., Camonis J., Slupphaug G., Vigne R., Benarous R., Sire J. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein binds to

- the uracil DNA glycosylase DNA repair enzyme. // *J. Virol.* – 1996. – V. 70. – № 2. – P. 697–704.
112. Schrofelbauer B., Yu Q., Zeitlin S.G., Landau N.R. Human Immunodeficiency Virus type 1 Vpr induces the degradation of the UNG and SMUG uracil-DNA glycosylases // *J. Virol.* – 2005. – V. 79. – № 17. – P. 10978–10987.
113. Moss B. Poxvirus DNA replication // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2013. – V. 5. – Article № a010199.
114. Stuart D.T., Upton C., Higman M.A., Niles E.G., McFadden G. A poxvirus-encoded uracil DNA glycosylase is essential for virus viability. // *J. Virol.* – 1993. – V. 67. – № 5. – P. 2503–2512.
115. Millns A.K., Carpenter M.S., DeLange A.M. The vaccinia virus-encoded uracil DNA glycosylase has an essential role in viral DNA replication // *Virology.* – 1994. – V. 198. – № 2. – P. 504–513.
116. Ellison K.S., Peng W., McFadden G. Mutations in active-site residues of the uracil-DNA glycosylase encoded by vaccinia virus are incompatible with virus viability. // *J. Virol.* – 1996. – V. 70. – № 11. – P. 7965–7973.
117. De Silva F.S., Moss B. Vaccinia virus uracil DNA glycosylase has an essential role in DNA synthesis that is independent of its glycosylase activity: catalytic site mutations reduce virulence but not virus replication in cultured cells // *J. Virol.* – 2003. – V. 77. – № 1. – P. 159–166.
118. Holzer G.W., Falkner F.G. Construction of a vaccinia virus deficient in the essential DNA repair enzyme uracil DNA glycosylase by a complementing cell line. // *J. Virol.* – 1997. – V. 71. – № 7. – P. 4997–5002.
119. Holzer G.W., Gritschenberger W., Mayrhofer J.A., Wieser V., Dorner F., Falkner F.G. Dominant host range selection of vaccinia recombinants by rescue of an essential gene // *Virology.* – 1998. – V. 249. – № 1. – P. 160–166.
120. Scaramozzino N., Sanz G., Crance J.M., Sapparbaev M., Drillien R., Laval J., Kavli B., Garin D. Characterisation of the substrate specificity of homogeneous vaccinia virus uracil-DNA glycosylase // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31. – № 16. – P. 4950–4957.
121. Duraffour S., Ishchenko A.A., Sapparbaev M., Crance J.M., Garin D. Substrate specificity of homogeneous monkeypox virus uracil-DNA glycosylase // *Biochemistry.* – 2007. – V. 46. – № 42. – P. 11874–11881.
122. Stanitsa E.S., Arps L., Traktman P. Vaccinia virus uracil DNA glycosylase interacts with the A20 protein to form a heterodimeric processivity factor for the viral DNA polymerase // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V. 281. – № 6. – P. 3439–3451.
123. Boyle K.A., Stanitsa E.S., Greseth M.D., Lindgren J.K., Traktman P. Evaluation of the role of the vaccinia virus uracil DNA glycosylase and A20 proteins as intrinsic components of the DNA polymerase holoenzyme // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286. – № 28. – P. 24702–24713.

124. Burmeister W.P., Tarbouriech N., Fender P., Celine C.R., Peyrefitte C.N., Iseni F. Crystal structure of the vaccinia virus uracil-DNA glycosylase in complex with DNA // *J. Biol. Chem.* – 2015. – V. 290. – № 29. – P. 17923–17934.
125. McCraith S., Holtzman T., Moss B., Fields S. Genome-wide analysis of vaccinia virus protein-protein interactions // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2000. – V. 97. – № 9. – P. 4879–4884.
126. Ishii K., Moss B. Mapping interaction sites of the A20R protein component of the vaccinia virus DNA replication complex // *Virology.* – 2002. – V. 303. – № 2. – P. 232–239.
127. Sèle C., Gabel F., Gutsche I., Ivanov I., Burmeister W.P., Iseni F., Tarbouriech N. Low-resolution structure of vaccinia virus DNA replication machinery // *J. Virol.* – 2013. – V. 87. – № 3. – P. 1679–1689.
128. Da Silva M., Upton C. Vaccinia virus G8R protein: a structural ortholog of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) // *PLoS One.* – 2009. – V. 4. – № 5. – Article № e5479.
129. Senkevich T.G., Katsafanas G.C., Weisberg A., Olano L.R., Moss B. Identification of vaccinia virus replisome and transcriptome proteins by isolation of proteins on nascent DNA coupled with mass spectrometry // *J. Virol.* – 2017. – V. 91. – № 19. – Article № e01015–17.
130. Schormann N., Zhukovskaya N., Bedwell G., Nuth M., Gillilan R., Prevelige P.E., Ricciardi R.P., Banerjee S., Chattopadhyay D. Poxvirus uracil-DNA glycosylase—An unusual member of the family I uracil-DNA glycosylases // *Protein Sci.* – 2016. – V. 25. – № 12. – P. 2113–2131.
131. Mol C.D., Arvai A.S., Sanderson R.J., Slupphaug G., Kavli B., Krokan H.E., Mosbaugh D.W., Tainer J.A. Crystal structure of human uracil-DNA glycosylase in complex with a protein inhibitor: protein mimicry of DNA // *Cell.* – 1995. – V. 82. – № 5. – P. 701–708.
132. Nuth M., Guan H., Ricciardi R.P. A conserved tripeptide sequence at the C terminus of the poxvirus DNA processivity factor D4 is essential for protein integrity and function // *J. Biol. Chem.* – 2016. – V. 291. – № 53. – P. 27087–27097.
133. Schormann N., Grigorian A., Samal A., Krishnan R., DeLucas L., Chattopadhyay D. Crystal structure of vaccinia virus uracil-DNA glycosylase reveals dimeric assembly // *BMC Struct. Biol.* – 2007. – V. 7. – Article № 45.
134. Schormann N., Banerjee S., Ricciardi R., Chattopadhyay D. Structure of the uracil complex of Vaccinia virus uracil DNA glycosylase // *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* – 2013. – V. 69. – P. 1328–1334.
135. Sartmatova D., Nash T., Schormann N., Nuth M., Ricciardi R., Banerjee S., Chattopadhyay D. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of three recombinant mutants of Vaccinia virus uracil DNA glycosylase // *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* – 2013. – V. 69. – P. 295–301.
136. Contesto-Richefeu C., Tarbouriech N., Brazzolotto X., Betzi S., Morelli X., Burmeister W.P.,

- Iseni F. Crystal structure of the Vaccinia virus DNA polymerase holoenzyme subunit D4 in complex with the A20 N-terminal domain // *PLoS Pathog.* – 2014. – V. 10. – № 3. – Article № e1003978.
137. Schormann N., Banerjee S., Ricciardi R., Chattopadhyay D. Binding of undamaged double stranded DNA to vaccinia virus uracil-DNA Glycosylase // *BMC Struct. Biol.* – 2015. – V. 15. – Article № 10.
138. Contesto-Richefeu C., Tarbouriech N., Brazzolotto X., Burmeister W.P., Peyrefitte C.N., Iseni F. Structural analysis of point mutations at the Vaccinia virus A20/D4 interface // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* – 2016. – V. 72. – № 9. – P. 687–691.
139. Druck Shudofsky A.M., Silverman J.E.Y., Chattopadhyay D., Ricciardi R.P. Vaccinia virus D4 mutants defective in processive DNA synthesis retain binding to A20 and DNA // *J. Virol.* – 2010. – V. 84. – № 23. – P. 12325–12335.
140. Silverman J.E.Y., Ciustea M., Shudofsky A.M.D., Bender F., Shoemaker R.H., Ricciardi R.P. Identification of polymerase and processivity inhibitors of vaccinia DNA synthesis using a stepwise screening approach // *Antiviral Res.* – 2008. – V. 80. – № 2. – P. 114–123.
141. Saccucci L., Crance J.M., Colas P., Bickle M., Garin D., Iseni F. Inhibition of vaccinia virus replication by peptide aptamers // *Antiviral Res.* – 2009. – V. 82. – № 3. – P. 134–140.
142. Schormann N., Sommers C.I., Prichard M.N., Keith K.A., Noah J.W., Nuth M., Ricciardi R.P., Chattopadhyay D. Identification of protein-protein interaction inhibitors targeting vaccinia virus processivity factor for development of antiviral agents // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – V. 55. – № 11. – P. 5054–5062.
143. Nuth M., Huang L., Saw Y.L., Schormann N., Chattopadhyay D., Ricciardi R.P. Identification of inhibitors that block vaccinia virus infection by targeting the DNA synthesis processivity factor D4 // *J. Med. Chem.* – 2011. – V. 54. – № 9. – P. 3260–3267.
144. Flusin O., Saccucci L., Contesto-Richefeu C., Hamdi A., Bardou C., Poyot T., Peinnequin A., Crance J.M., Colas P., Iseni F. A small molecule screen in yeast identifies inhibitors targeting protein-protein interactions within the vaccinia virus replication complex // *Antiviral Res.* – 2012. – V. 96. – № 2. – P. 187–195.
145. Nuth M., Guan H., Zhukovskaya N., Saw Y.L., Ricciardi R.P. Design of potent poxvirus inhibitors of the heterodimeric processivity factor required for viral replication // *J. Med. Chem.* – 2013. – V. 56. – № 8. – P. 3235–3246.
146. Ciustea M., Silverman J.E.Y., Shudofsky A.M.D., Ricciardi R.P. Identification of non-nucleoside DNA synthesis inhibitors of vaccinia virus by high-throughput screening // *J. Med. Chem.* – 2008. – V. 51. – № 20. – P. 6563–6570.
147. Nuth M., Guan H., Xiao Y., Kulp J.L., Parker M.H., Strobel E.D., Isaacs S.N., Scott R.W., Reitz



- A.B., Ricciardi R.P. Mutation and structure guided discovery of an antiviral small molecule that mimics an essential C-Terminal tripeptide of the vaccinia D4 processivity factor // *Antiviral Res.* – 2019. – V. 162. – P. 178–185.
148. Berche P. The threat of smallpox and bioterrorism // *Trends Microbiol.* – 2001. – V. 9. – № 1. – P. 15–18.
149. Meyer H., Ehmann R., Smith G.L. Smallpox in the post-eradication era // *Viruses.* – 2020. – V. 12. – № 138. – P. 1–11.
150. Kumar N., Acharya A., Gendelman H.E., Byrareddy S.N. The 2022 outbreak and the pathobiology of the monkeypox virus // *J. Autoimmun.* – 2022. – V. 131. – Article № 102855.
151. Baker R.O., Bray M., Huggins J.W. Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections // *Antiviral Res.* – 2003. – V. 57. – № 1–2. – P. 13–23.
152. Yang G., Pevear D.C., Davies M.H., Collett M.S., Bailey T., Rippen S., Barone L., Burns C., Rhodes G., Tohan S., Huggins J.W., Baker R.O., Buller R.L.M., Touchette E., Waller K., Schriewer J., Neyts J., DeClercq E., Jones K., et al. An orally bioavailable antipoxvirus compound (ST-246) inhibits extracellular virus formation and protects mice from lethal orthopoxvirus Challenge // *J. Virol.* – 2005. – V. 79. – № 20. – P. 13139–13149.
153. Huggins J., Goff A., Hensley L., Mucker E., Shamblin J., Wlazlowski C., Johnson W., Chapman J., Larsen T., Twenhafel N., Karem K., Damon I.K., Byrd C.M., Bolken T.C., Jordan R., Hruby D. Nonhuman primates are protected from smallpox virus or monkeypox virus challenges by the antiviral drug ST-246 // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2009. – V. 53. – № 6. – P. 2620–2625.
154. Smee D.F., Dagley A., Downs B., Hagloch J., Tarbet E.B. Enhanced efficacy of cidofovir combined with vaccinia immune globulin in treating progressive cutaneous vaccinia virus infections in immunosuppressed hairless mice // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2015. – V. 59. – № 1. – P. 520–526.
155. Duraffour S., Lorenzo M.M., Zöller G., Topalis D., Grosenbach D., Hruby D.E., Andrei G., Blasco R., Meyer H., Snoeck R. ST-246 is a key antiviral to inhibit the viral F13L phospholipase, one of the essential proteins for orthopoxvirus wrapping // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2015. – V. 70. – № 5. – P. 1367–1380.
156. Riggs A.D., Bourgeois S., Cohn M. The lac repressor-operator interaction // *J. Mol. Biol.* – 1970. – V. 53. – № 3. – P. 401–417.
157. Berg O.G., Winter R.B., Von Hippel P.H. Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 1. Models and theory // *Biochemistry.* – 1981. – V. 20. – № 24. – P. 6929–6948.
158. Halford S.E., Marko J.F. How do site-specific DNA-binding proteins find their targets? // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32. – № 10. – P. 3040–3052.
159. Iwahara J., Clore G.M. Direct observation of enhanced translocation of a homeodomain between

- DNA cognate sites by NMR exchange spectroscopy // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – V. 128. – № 2. – P. 404–405.
160. Hedglin M., Zhang Y., O'Brien P.J. Isolating contributions from intersegmental transfer to DNA searching by alkyladenine DNA glycosylase // *J. Biol. Chem.* – 2013. – V. 288. – № 34. – P. 24550–24559.
161. Ellis R.J. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated // *Trends Biochem. Sci.* – 2001. – V. 26. – № 10. – P. 597–604.
162. Zhou H.X., Rivas G., Minton A.P. Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences // *Annu. Rev. Biophys.* – 2008. – V. 37. – P. 375–397.
163. Bonvin A.M.J.J. Localisation and dynamics of sodium counterions around DNA in solution from molecular dynamics simulation // *Eur. Biophys. J.* – 2000. – V. 29. – P. 57–60.
164. Subirana J.A., Soler-López M. Cations as hydrogen bond donors: A view of electrostatic interactions in DNA // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2003. – V. 32. – P. 27–45.
165. Winter R.B., Berg O.G., Von Hippel P.H. Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 3. The *Escherichia coli* lac repressor-operator interaction: kinetic measurements and conclusions // *Biochemistry.* – 1981. – V. 20. – № 24. – P. 6961–6977.
166. Gruskin E.A., Lloyd R.S. The DNA scanning mechanism of T4 endonuclease V. Effect of NaCl concentration on processive nicking activity // *J. Biol. Chem.* . – 1986. – V. 261. – № 21. – P. 9607–9613.
167. Higley M., Stephen Lloyd R. Processivity of uracil DNA glycosylase // *Mutat. Res.* – 1993. – V. 294. – № 2. – P. 109–116.
168. Lloyd R.S., Hanawalt P.C., Dodson M.L. Processive action of T4 endonuclease V on ultraviolet-irradiated DNA. // *Nucleic Acids Res.* – 1980. – V. 8. – P. 5113–5127.
169. Purmal A.A., Lampman G.W., Pourmal E.I., Melamede R.J., Wallace S.S., Kow Y.W. Uracil DNA N-glycosylase distributively interacts with duplex polynucleotides containing repeating units of either TGGCCAAGCU or TGGCCAAGCTTGGCCAAGCU // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – № 35. – P. 22046–22053.
170. Bennett S.E., Sanderson R.J., Mosbaugh D.W. Processivity of *Escherichia coli* and rat liver mitochondrial uracil-DNA glycosylase is affected by NaCl concentration // *Biochemistry.* – 1995. – V. 34. – № 18. – P. 6109–6119.
171. Gowers D.M., Wilson G.G., Halford S.E. Measurement of the contributions of 1D and 3D pathways to the translocation of a protein along DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2005. – V. 102. – № 44. – P. 15883–15888.
172. Porecha R.H., Stivers J.T. Uracil DNA glycosylase uses DNA hopping and short-range sliding to

- trap extrahelical uracils // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2008. – V. 105. – № 31. – P. 10791–10796.
173. Sidorenko V.S., Mechetin G. V., Nevinsky G.A., Zharkov D.O. Correlated cleavage of single- and double-stranded substrates by uracil-DNA glycosylase // FEBS Lett. – 2008. – V. 582. – № 3. – P. 410–414.
174. Mechetin G. V., Zharkov D.O. The mechanism of substrate search by base excision repair enzymes // Dokl. Biochem. Biophys. – 2011. – V. 437. – P. 94–97.
175. Sidorenko V.S., Zharkov D.O. Correlated cleavage of damaged DNA by bacterial and human 8-oxoguanine-DNA glycosylases // Biochemistry. – 2008. – V. 47. – № 34. – P. 8970–8976.
176. Monico C., Capitanio M., Belcastro G., Vanzi F., Pavone F.S. Optical methods to study protein-DNA interactions *in vitro* and in living cells at the single-molecule level // Int. J. Mol. Sci. I – 2013. – V. 14. – № 2. – P. 3961–3992.
177. Bonnet I., Desbiolles P. The diffusion constant of a labeled protein sliding along DNA // Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys. – 2011. – V. 83. – Article № 25.
178. Ritzefeld M., Walhorn V., Anselmetti D., Sewald N. Analysis of DNA interactions using single-molecule force spectroscopy // Amino Acids. – 2013. – V. 44. – № 6. – P. 1457–1475.
179. Shao Z., Yang J., Somlyo A.P. Biological atomic force microscopy: from microns to nanometers and beyond // Annu. Rev. Cell Dev. – 1995. – V. 11. – P. 241–265.
180. Dunn A.R., Kad N.M., Nelson S.R., Warshaw D.M., Wallace S.S. Single Qdot-labeled glycosylase molecules use a wedge amino acid to probe for lesions while scanning along DNA // Nucleic Acids Res. – 2011. – V. 39. – № 17. – P. 7487–7498.
181. Main K.H.S., Provan J.I., Haynes P.J., Wells G., Hartley J.A., Pyne A.L.B. Atomic force microscopy—A tool for structural and translational DNA research // APL Bioeng. – 2021. – V. 5. – Article № 031504.
182. Buechner C.N., Maiti A., Drohat A.C., Tessmer I. Lesion search and recognition by thymine DNA glycosylase revealed by single molecule imaging // Nucleic Acids Res. – 2015. – V. 43. – № 5. – P. 2716–2729.
183. Gorman J., Plys A.J., Visnapuu M.L., Alani E., Greene E.C. Visualizing one-dimensional diffusion of eukaryotic DNA repair factors along a chromatin lattice // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2010. – V. 17. – № 8. – P. 932–938.
184. Hedglin M., O'Brien P.J. Hopping enables a DNA repair glycosylase to search both strands and bypass a bound protein // ACS Chem. Biol. – 2010. – V. 5. – № 4. – P. 427–436.
185. Rowland M.M., Schonhoft J.D., McKibbin P.L., David S.S., Stivers J.T. Microscopic mechanism of DNA damage searching by hOGG1 // Nucleic Acids Res. – 2014. – V. 42. – № 14. – P. 9295–9303.
186. Schonhoft J.D., Stivers J.T. Timing facilitated site transfer of an enzyme on DNA // Nat. Chem.

- Biol. – 2012. – V. 8. – № 2. – P. 205–210.
187. Chen C., Esadze A., Zandarashvili L., Nguyen D., Pettitt B.M., Iwahara J. Dynamic equilibria of short-range electrostatic interactions at molecular interfaces of protein-DNA complexes // *J. Phys. Chem. Lett.* – 2015. – V. 6. – № 14. – P. 2733–2737.
188. Iwahara J., Zandarashvili L., Kemme C.A., Esadze A. NMR-based investigations into target DNA search processes of proteins // *Methods.* – 2018. – V. 148. – P. 57–66.
189. Stanford N.P., Szczelkun M.D., Marko J.F., Halford S.E. One- and three-dimensional pathways for proteins to reach specific DNA sites // *EMBO J.* – 2000. – V. 19. – № 23. – P. 6546–6557.
190. Urig S., Gowher H., Hermann A., Beck C., Fatemi M., Humeny A., Jeltsch A. The *Escherichia coli* dam DNA methyltransferase modifies DNA in a highly processive reaction // *J. Mol. Biol.* – 2002. – V. 319. – № 5. – P. 1085–1096.
191. Surby M.A., Reich N.O. Facilitated diffusion of the EcoRI DNA methyltransferase is described by a novel mechanism // *Biochemistry.* – 1996. – V. 35. – № 7. – P. 2209–2217.
192. Esadze A., Kemme C.A., Kolomeisky A.B., Iwahara J. Positive and negative impacts of nonspecific sites during target location by a sequence-specific DNA-binding protein: origin of the optimal search at physiological ionic strength // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – V. 42. – № 11. – P. 7039–7046.
193. Esadze A., Iwahara J. Stopped-flow fluorescence kinetic study of protein sliding and intersegment transfer in the target DNA search process // *J. Mol. Biol.* – 2014. – V. 426. – P. 230–244.
194. McKinney K., Mattia M., Gottifredi V., Prives C. p53 linear diffusion along DNA requires its C terminus // *Mol. Cell.* – 2004. – V. 16. – № 3. – P. 413–424.
195. Tafvizi A., Huang F., Leith J.S., Fersht A.R., Mirny L.A., Van Oijen A.M. Tumor suppressor p53 slides on DNA with low friction and high stability // *Biophys. J.* – 2008. – V. 95. – № 1. – P. L01–L03.
196. Schonhofs J.D., Kosowicz J.G., Stivers J.T. DNA translocation by human uracil DNA glycosylase: role of DNA phosphate charge // *Biochemistry.* – 2013. – V. 52. – № 15. – P. 2526–2535.
197. Schonhofs J.D., Stivers J.T. DNA translocation by human uracil DNA glycosylase: the case of single-stranded DNA and clustered uracils // *Biochemistry.* – 2013. – V. 52. – № 15. – P. 2536–2544.
198. Cravens S.L., Schonhofs J.D., Rowland M.M., Rodriguez A.A., Anderson B.G., Stivers J.T. Molecular crowding enhances facilitated diffusion of two human DNA glycosylases // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43. – № 8. – P.4087–4097.
199. Dey P., Bhattacharjee A. mechanism of facilitated diffusion of DNA repair proteins in crowded environment: case study with human uracil DNA glycosylase // *J. Phys. Chem. B.* – 2019. – V.

123. – № 49. – P. 10354–10364.
200. Мечетин Г.В., Жарков Д.О. Механизм поиска субстратов ферментами эксцизионной репарации оснований // Доклады Академии Наук. – 2011. – Т. 437. – № 5. – С. 695–698.
201. Esadze A., Rodriguez G., Weiser B.P., Cole P.A., Stivers J.T. Measurement of nanoscale DNA translocation by uracil DNA glycosylase in human cells // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45. – № 21. – P. 12413–12424.
202. Mechetin G. V., Zharkov D.O. Mechanism of translocation of uracil-DNA glycosylase from *Escherichia coli* between distributed lesions // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2011. – V. 414. – № 2. – P. 425–430.
203. Belotserkovskii B.P., Zarling D.A. Analysis of a one-dimensional random walk with irreversible losses at each step: applications for protein movement on DNA // *J. Theor. Biol.* – 2004. – V. 226. – № 2. – P. 195–203.
204. Friedman J.I., Majumdar A., Stivers J.T. Nontarget DNA binding shapes the dynamic landscape for enzymatic recognition of DNA damage // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – V. 37. – № 11. – P. 3493–3500.
205. Blainey P.C., van Oijen A.M., Banerjee A., Verdine G.L., Xie X.S. A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion // *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* – 2006. – V. 103. – № 15. – P. 5752–5757.
206. Cravens S.L., Stivers J.T. Comparative effects of ions, molecular crowding, and bulk DNA on the damage search mechanisms of hOGG1 and hUNG // *Biochemistry.* – 2016. – V. 55. – № 37. – P. 5230–5242.
207. Blainey P.C., Luo G., Kou S.C., Mangel W.F., Verdine G.L., Bagchi B., Xie X.S. Nonspecifically bound proteins spin while diffusing along DNA // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2009. – V. 16. – № 12. – P. 1224–1229.
208. Nelson S.R., Dunn A.R., Kathe S.D., Warshaw D.M., Wallace S.S. Two glycosylase families diffusively scan DNA using a wedge residue to probe for and identify oxidatively damaged bases // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2014. – V. 111. – № 20. – P. E2091–E2099.
209. Francis, A.W.; David S.S. *Escherichia coli* MutY and Fpg utilize a processive mechanism for target location // *Biochemistry.* – 2003. – V. 42. – P. 801–810.
210. Nelson S.R., Kathe S.D., Hilzinger T.S., Averill A.M., Warshaw D.M., Wallace S.S., Lee A.J. Single molecule glycosylase studies with engineered 8-oxoguanine DNA damage sites show functional defects of a MUTYH polyposis variant // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – V. 47. – № 6. – P. 3058–3071.
211. Hedglin M., O'Brien P.J. Human alkyladenine DNA glycosylase employs a processive search for DNA damage // *Biochemistry.* – 2008. – V. 47. – № 44. – P. 11434–11445.

212. Hedglin M., Zhang Y., O'Brien P.J. Probing the DNA structural requirements for facilitated diffusion // *Biochemistry*. – 2015. – V. 54. – № 2. – P. 557–566.
213. Zhang Y., O'Brien P.J. Repair of alkylation damage in eukaryotic chromatin depends on searching ability of alkyladenine DNA glycosylase // *ACS Chem. Biol.* – 2015. – V. 10. – № 11. – P. 2606–2615.
214. Hendershot J.M., O'Brien P.J. Search for DNA damage by human alkyladenine DNA glycosylase involves early intercalation by an aromatic residue // *J. Biol. Chem.* – 2017. – V. 292. – № 39. – P. 16070–16080.
215. Conlon K.A., Miller H., Rosenquist T.A., Zharkov D.O., Berrios M. The murine DNA glycosylase NEIL2 (mNEIL2) and human DNA polymerase  $\beta$  bind microtubules in situ and in vitro // *DNA Repair (Amst)*. – 2005. – V. 4. – № 4. – P. 419–431.
216. Годовикова Т.С., Халимская Л.М., Зарытова В.Ф. Неакционноспособные Фосфамиды Моно- И Динуклеотидов // *Биоорган. Химия*. – 1986. – Т. 12. – № 4. – С. 475–481.
217. Ryabinin V.A., Boutorine A.S., Hélène C., Pyshnyi D. V., Sinyakov A.N. Oligonucleotide-minor groove binder conjugates and their complexes with complementary DNA: Effect of conjugate structural factors on the thermal stability of duplexes // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. – 2004. – V. 23. – № 5. – P. 789–803.
218. Rieger R.A., McTigue M.M., Kycia J.H., Gerchman S.E., Grollman A.P., Iden C.R. Characterization of a cross-linked DNA-Endonuclease VIII repair complex by electrospray ionization mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2000. – V. 11. – № 6. – P. 505–515.
219. Pei J., Kim B.H., Grishin N. V. PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments // *Nucleic Acids Res* – 2008. – V. 36. – № 7. – P. 2295–2300.
220. Zhu C., Lu L., Zhang J., Yue Z., Song J., Zong S., Liu M., Stovicek O., Gao Y.Q., Yi C. Tautomerization-dependent recognition and excision of oxidation damage in base-excision DNA repair // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2016. – V. 113. – № 28. – P. 7792–7797.
221. Jurrus E., Engel D., Star K., Monson K., Brandi J., Felberg L.E., Brookes D.H., Wilson L., Chen J., Liles K., Chun M., Li P., Gohara D.W., Dolinsky T., Konecny R., Koes D.R., Nielsen J.E., Head-Gordon T., Geng W., et al. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite // *Protein Sci.* – 2018. – V. 27. – № 1. – P. 112–128.
222. Grin I.R., Mechetin G. V., Kasymov R.D., Diatlova E.A., Yudkina A. V., Shchelkunov S.N., Gileva I.P., Denisova A.A., Stepanov G.A., Chilov G.G., Zharkov D.O. A new class of uracil–DNA glycosylase inhibitors active against human and vaccinia virus enzyme // *Molecules*. – 2021. – V. 26. – № 21. – Article № 6668.
223. Kolbanovskiy M., Aharonoff A., Sales A.H., Geacintov N.E. Recognition and repair of

- oxidatively generated DNA lesions in plasmid DNA by a facilitated diffusion mechanism. – 2021. – V. 478. – P. 2359–2370.
224. Jiang D., Hatahet Z., Melamed R.J., Kow Y.W., Wallace S.S. Characterization of *Escherichia coli* Endonuclease VIII // J. Biol. Chem. – 1997. – V. 272. – № 51. – P. 32230–32239.
225. Haldar T., Jha J.S., Yang Z., Nel C., Housh K., Cassidy O.J., Gates K.S. Unexpected complexity in the products arising from NaOH-, heat-, amine-, and glycosylase-induced strand cleavage at an abasic site in DNA // Chem. Res. Toxicol. – 2022. – V. 35. – № 2. – P. 218–232.
226. Winter R.B., Von Hippel P.H. Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 2. The *Escherichia coli* lac repressor-operator interaction: equilibrium measurements // Biochemistry. – 1981. – V. 20. – № 24. – P. 6948–6960.
227. Sidorenko V.S., Zharkov D.O. Correlated cleavage of damaged DNA by bacterial and human 8-oxoguanine-DNA glycosylases // Biochemistry. – 2008. – V. 47. – № 34. – P. 8970–8976.
228. Aamann M.D., Hvitby C., Popuri V., Muftuoglu M., Lemminger L., Skeby C.K., Keijzers G., Ahn B., Bjørås M., Bohr V.A., Stevnsner T. Cockayne Syndrome group B protein stimulates NEIL2 DNA glycosylase activity // Mech. Ageing Dev. – 2014. – V. 135. – P. 1–14.
229. Cao C., Jiang Y.L., Stivers J.T., Song F. Dynamic opening of DNA during the enzymatic search for a damaged base // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2004. – V. 11. – № 12. – P. 1230–1236.
230. Parker J.B., Bianchet M.A., Krosky D.J., Friedman J.I., Amzel L.M., Stivers J.T. Enzymatic capture of an extrahelical thymine in the search for uracil in DNA // Nature. – 2007. – V. 449. – № 7161. – P. 433–437.
231. Banerjee A., Santos W.L., Verdine G.L. Structure of a DNA glycosylase searching for lesions // Science. – 2006. – V. 311. – № 5764. – P. 1153–1157.
232. Qi Y., Spong M.C., Nam K., Banerjee A., Jiralerspong S., Karplus M., Verdine G.L. Encounter and extrusion of an intrahelical lesion by a DNA repair enzyme // Nature. – 2009. – V. 462. – № 7274. – P. 762–766.
233. Kuznetsov N.A., Bergonzo C., Campbell A.J., Li H., Mechetin G. V., De Los Santos C., Grollman A.P., Fedorova O.S., Zharkov D.O., Simmerling C. Active destabilization of base pairs by a DNA glycosylase wedge initiates damage recognition // Nucleic Acids Res. – 2015. – V. 43. – № 1. – P. 272–281.
234. Li H., Endutkin A. V., Bergonzo C., Campbell A.J., De Los Santos C., Grollman A., Zharkov D.O., Simmerling C. A dynamic checkpoint in oxidative lesion discrimination by formamidopyrimidine-DNA glycosylase // Nucleic Acids Res. – 2016. – V. 44. – № 2. – P. 683–694.
235. Fromme J.C., Verdine G.L. Structural insights into lesion recognition and repair by the bacterial 8-oxoguanine DNA glycosylase MutM // Nat. Struct. Biol. – 2002. – V. 9. – № 7. – P. 544–552.

236. Duclos S., Aller P., Jaruga P., Dizdaroglu M., Wallace S.S., Doublé S. Structural and biochemical studies of a plant formamidopyrimidine-DNA glycosylase reveal why eukaryotic Fpg glycosylases do not excise 8-oxoguanine // *DNA Repair (Amst)*. – 2012. – V. 11. – № 9. – P. 714–725.
237. Liu M., Imamura K., Averill A.M., Wallace S.S., Doublé S. Structural characterization of a mouse ortholog of human NEIL3 with a marked preference for single-stranded DNA // *Structure*. – 2013. – V. 21. – № 2. – P. 247–256.
238. Prakash A., Eckenroth B.E., Averill A.M., Imamura K., Wallace S.S., Doublé S. Structural investigation of a viral ortholog of human NEIL2/3 DNA glycosylases // *DNA Repair (Amst)*. – 2013. – V. 12. – № 12. – P. 1062–1071.
239. Zhdanova P. V., Ishchenko A.A., Chernonosov A.A., Zharkov D.O., Koval V. V. Dynamics and conformational changes in human NEIL2 DNA glycosylase analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry // *J. Mol. Biol.* – 2022. – V. 434. – № 2. – Article № 167334.
240. Landová B., Šilhán J. Conformational changes of DNA repair glycosylase MutM triggered by DNA binding // *FEBS Lett.* – 2020. – V. 594. – № 18. – P. 3032–3044.
241. Sugahara M., Mikawa T., Kumasaka T., Yamamoto M., Kato R., Fukuyama K., Inoue Y., Kuramitsu S. Crystal structure of a repair enzyme of oxidatively damaged DNA, MutM (Fpg), from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8 // *EMBO J.* – 2000. – V. 19. – № 15. – P. 3857–3869.
242. Hitomi K., Iwai S., Tainer J.A. The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: implications for DNA damage recognition, removal, and repair // *DNA Repair (Amst)*. – 2007. – V. 6. – № 4. – P. 410–428.
243. Hammar P., Leroy P., Mahmutovic A., Marklund E.G., Berg O.G., Elf J. The lac repressor displays facilitated diffusion in living cells // *Science*. – 2012. – V. 336. – № 6088. – P. 1595–1598.
244. Lukin M., de los Santos C. NMR structures of damaged DNA // *Chem. Rev.* – 2006. – V. 106. – № 2. – P. 607–686.
245. Rosu F., Gabelica V., Houssier C., De Pauw E. Determination of affinity, stoichiometry and sequence selectivity of minor groove binder complexes with double-stranded oligodeoxynucleotides by electrospray ionization mass spectrometry // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – V. 30. – № 16. – Article № e82.
246. Yudkina A. V., Endutkin A. V., Diatlova E.A., Moor N.A., Vokhtantsev I.P., Grin I.R., Zharkov D.O. Displacement of slow-turnover DNA glycosylases by molecular traffic on DNA // *Genes*. – 2020. – V. 11. – № 8. – Article № 866.
247. Wu X., Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond //

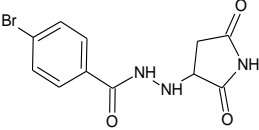
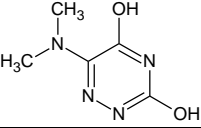
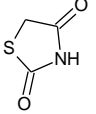
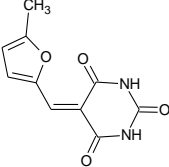
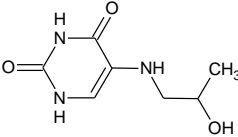
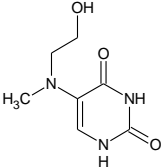
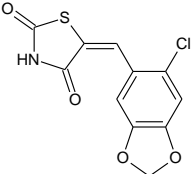
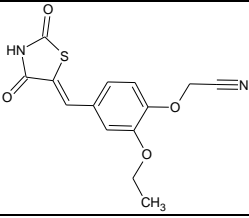
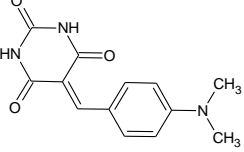
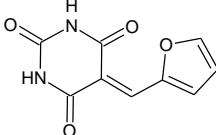


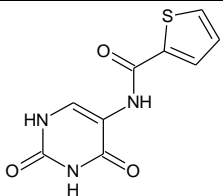
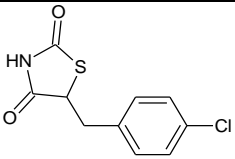
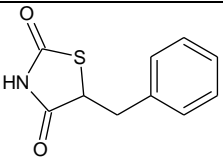
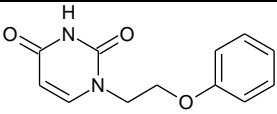
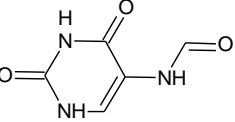
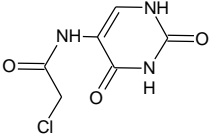
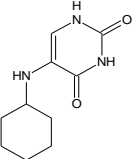
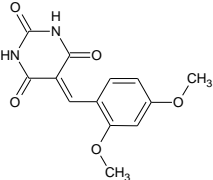
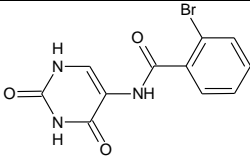
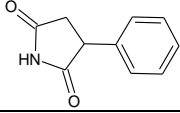
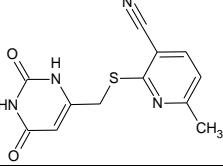
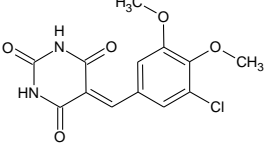
- Nat. Rev. Genet. – 2017. – V. 18. – № 9. – P. 517–534.
248. Parrilla-Doblas J.T., Roldán-Arjona T., Ariza R.R., Córdoba-Cañero D. Active DNA demethylation in plants // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – V. 20. – № 19. – Article № 4683.
249. Wang R., Hao W., Pan L., Boldogh I., Ba X. The roles of base excision repair enzyme OGG1 in gene expression // Cell. Mol. Life Sci. – 2018. – V. 75. – № 20. – P. 3741–3750.
250. Hedglin M., Kumar R., Benkovic S.J. Replication clamps and clamp loaders // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2013. – V. 5. – № 4. – Article № a010165.
251. Gao Y., Cui Y., Fox T., Lin S., Wang H., De Val N., Zhou Z.H., Yang W. Structures and operating principles of the replisome // Science. – 2019. – V. 363. – № 6429. – Article № eaav7003.
252. Foster B.M., Rosenberg D., Salvo H., Stephens K.L., Bintz B.J., Hammel M., Ellenberger T., Gainey M.D., Wallen J.R. Combined solution and crystal methods reveal the electrostatic tethers that provide a flexible platform for replication activities in the bacteriophage T7 replisome // Biochemistry. – 2019. – V. 58. – № 45. – P. 4466–4479.
253. Sun S., Geng L., Shamooy Y. Structure and enzymatic properties of a chimeric bacteriophage RB69 DNA polymerase and single-stranded DNA binding protein with increased processivity // Proteins. – 2006. – V. 65. – № 1. – P. 231–238.
254. Olszewski M., Śpibida M., Bilek M., Krawczyk B. Fusion of *Taq* DNA polymerase with single-stranded DNA binding-like protein of *Nanoarchaeum equitans*—Expression and characterization // PLoS One. – 2017. – V. 12. – № 9. – Article № e0184162.
255. Wang Y., Prosen D.E., Mei L., Sullivan J.C., Finney M., Vander Horn P.B. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro // Nucleic Acids Res. – 2004. – V. 32. – № 3. – P. 1197–1207.
256. De Vega M., Lázaro J.M., Mencía M., Blanco L., Salas M. Improvement of  $\phi$ 29 DNA polymerase amplification performance by fusion of DNA binding motifs // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2010. – V. 107. – № 38. – P. 16506–16511.
257. Pavlov A.R., Pavlova N. V., Kozyavkin S.A., Slesarev A.I. Cooperation between catalytic and DNA binding domains enhances thermostability and supports DNA synthesis at higher temperatures by thermostable DNA polymerases // Biochemistry. – 2012. – V. 51. – № 10. – P. 2032–2043.
258. Slupphaug G., Eftedal I., Kavli B., Bharati S., Hellet N.M., Haug T., Krokan H.E., Levine D.W. Properties of a recombinant human uracil-DNA glycosylase from the UNG gene and evidence that UNG encodes the major uracil-DNA glycosylase // Biochemistry. – 1995. – V. 34. – № 1. – P. 128–138.
259. McDonald W.F., Traktmans P. Vaccinia Virus DNA Polymerase. In vitro analysis of parameters affecting processivity // J. Biol. Chem. – 1994. – V. 269. – № 49. – P. 31190–31197.

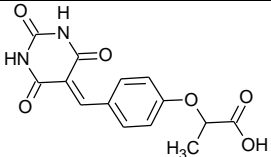
260. McDonald W.F., Klemperer N., Traktman P. Characterization of a processive form of the vaccinia virus DNA polymerase // *Virology*. – 1997. – V. 234. – № 1. – P. 168–175.
261. De Silva F.S., Moss B. Effects of vaccinia virus uracil DNA glycosylase catalytic site and deoxyuridine triphosphatase deletion mutations individually and together on replication in active and quiescent cells and pathogenesis in mice // *Virol. J.* – 2008. – V. 5. – Article № 145.
262. Kannan S.R., Sachdev S., Reddy A.S., Kandasamy S.L., Byrareddy S.N., Lorson C.L., Singh K. Mutations in the monkeypox virus replication complex: Potential contributing factors to the 2022 outbreak // *J. Autoimmun.* – 2022. – V. 133. – Article № 102928.

## 9. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Структуры и коды библиотеки потенциальных ингибиторов UNG

Структура	Код	MW
	2 A	312
	2 B	155
	2 C	117
	2 D	220
	2 E	185
	2 F	185
	2 G	284
	2 H	304
	3 A	259
	3 B	206

	3	C	237
	3	D	242
	3	E	207
	3	F	232
	3	G	155
	3	H	204
	4	A	209
	4	B	276
	4	C	310
	4	D	175
	4	E	274
	4	F	311

 <p>The chemical structure shows a central benzene ring. At the top position of the benzene ring, there is a double bond to a five-membered ring containing two nitrogen atoms and two carbonyl groups (a succinimide-like ring). At the bottom position of the benzene ring, there is an oxygen atom connected to a four-carbon chain. The fourth carbon of this chain is a carboxylic acid group (-COOH), and the third carbon has a methyl group (-CH<sub>3</sub>).</p>	4	G	303
---	---	---	-----