

**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*

**Ендуткин Антон Валентинович**

**РОЛЬ СТРУКТУРЫ ДНК-СУБСТРАТОВ И СТРУКТУРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ БЕЛКА В  
ПРОЦЕССАХ УЗНАВАНИЯ И УДАЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ  
8-ОКСОГУАНИН-ДНК-N-ГЛИКОЗИЛАЗАМИ ЧЕЛОВЕКА И *E. COLI***

**03.01.04 – Биохимия**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

**на соискание ученой степени**

**кандидата химических наук**

**Научный руководитель:**

**доктор биологических наук, профессор РАН Жарков Д. О.**

**Новосибирск – 2018**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ.....	4
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
2.1. Структурные основы конформационной мобильности ДНК.....	8
2.2. 8-Оксогуанин .....	15
2.3. Эксцизионная репарация оснований .....	19
2.4. ДНК-гликозилазы и механизмы их действия .....	23
2.5. 8-оксогуанин-ДНК-N-гликозилаза прокариот (Fpg).....	32
2.6. 8-оксогуанин-ДНК-N-гликозилаза эукариот (OGG1) .....	41
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	47
3.1. Реактивы .....	47
3.2. Хроматографические сорбенты и колонки .....	47
3.3. Олигодезоксирибонуклеотиды .....	47
3.4. Плазмиды .....	51
3.5. Ферменты .....	51
3.6. Введение <sup>32</sup> P метки по 5'- и 3'-концу ОДН.....	52
3.7. Отжиг комплементарных цепей ОДН .....	52
3.8. Определение термодинамических параметров образования олигонуклеотидных дуплексов.....	53
3.9. Определение структурных параметров ДНК-субстратов .....	53
3.10. Электрофоретический анализ белков и ОДН.....	53
3.11. Выделение C-Fpg и N-Fpg .....	54
3.12. Выделение мутантных форм Fpg.....	56
3.13. Определение ферментативной активности мутантных форм Fpg и отдельных структурных доменов .....	57
3.14. Определение кинетических параметров реакции расщепления ДНК-субстратов с различными структурными параметрами белками OGG1 и Fpg.....	58
3.15. Определение кинетических параметров реакции расщепления 8-охоGua-субстрата, катализируемой мутантными формами фермента Fpg .....	58
3.16. Образование конъюгата ДНК-гликозилаз с субстратом, содержащим AP-сайт или 8-охоGua .....	59
3.17. Определение константы диссоциации комплексов белков с поврежденной ДНК.....	59
3.18. Определение каталитической константы реакции, катализируемой C-Fpg.....	59
3.19. Определение оптимальных значений pH и ионной силы для активности C-Fpg.....	60

3.20. Анализ термической стабильности мутантных форм Frg методом кругового дихроизма .....	61
3.21. Козволюционный анализ аминокислотных остатков белка Frg .....	61
3.22. Молекулярная динамика Frg дикого и мутантных форм .....	61
3.23. Определение содержания Zn в диком и мутантных формах белка Frg .....	61
3.24. Расчет траектории выворачивания нуклеотидов белками Frg и OGG1 .....	62
3.25. Исследование влияния фосфоротиоатных замен в ДНК-субстратах на активность OGG1 и Frg .....	62
3.26. Определение кинетических параметров реакции расщепления ДНК-субстратов с одноцепочечными разрывами белком Frg .....	63
3.27. Анализ нормальных мод колебаний комплекса Frg-ДНК .....	63
<b>4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>64</b>
4.1. Влияние структуры ДНК на субстратную специфичность ферментов OGG1 и Frg .....	64
4.2. Анализ термодинамических параметров коаксиального стэкинга 8-охоGua .....	72
4.3. Анализ свойств отдельных доменов белка Frg .....	77
4.4. Определение внутримолекулярных взаимодействий в белке Frg, важных для его функционирования .....	85
4.5. Роль выворачивания поврежденного нуклеотида в узнавании 8-оксогуанина ферментами Frg и OGG1 .....	93
4.6. Влияние целостности сахарофосфатного остова ДНК на механизм Frg .....	102
<b>5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>115</b>
<b>6. ВЫВОДЫ .....</b>	<b>116</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....</b>	<b>117</b>

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Причины повреждения молекул ДНК, главного носителя генетической информации, связаны с химической нестабильностью нуклеиновых кислот, ошибками ДНК-полимераз в ходе репликации, а также с действием множества повреждающих агентов экзогенного и эндогенного происхождения. Окислительные повреждения оснований, очень часто встречающиеся в ДНК, играют значительную роль в онкогенезе, старении и многих патологических процессах. Накоплению этих повреждений препятствует система репарации ДНК, которая служит важнейшим фактором, обеспечивающим целостность генома клетки.

Одно из самых распространенных окисленных оснований ДНК — 8-оксогуанин (8-oxoGua). Репарация этого повреждения идет по пути эксцизионной репарации оснований (ЭРО) с участием 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилаз OGG1 у эукариот или Fpg у прокариот. Эти ферменты репарации обладают высокой специфичностью, обусловленной, во-первых, высоким сродством фермента к субстрату за счет конформационной и электростатической комплементарности между молекулами ДНК и ДНК-гликозилазы и, во-вторых, уникальной структурой активного центра фермента, которая обеспечивает узнавание субстрата и избирательность протекания реакции. Таким образом, субстратная специфичность ДНК-гликозилаз может зависеть не только от структуры и конформационной динамики молекулы фермента, но и от нуклеотидной последовательности и структурных особенностей субстрата. Несмотря на обилие данных о пространственных структурах ферментов репарации в свободном виде и в комплексе с ДНК-субстратами, анализ таких статичных структур не позволяет судить о динамике фермента в ходе реакции. С другой стороны, хотя множество кинетических исследований в целом дало ответ на вопрос о количестве стадий реакции и их временных рамках, до сих пор возникают вопросы, какие именно структурные изменения происходят на каждой кинетически различимой стадии. Мало данных о том, как физико-химические параметры ДНК могут влиять на ее узнавание ДНК-гликозилазами или как нуклеотидный контекст, в котором находится поврежденное основание, влияет на протекание реакции. Поэтому только комплексный анализ термодинамических и кинетических параметров ферментативной реакции, дополненный структурными данными и данными, полученными с использованием сайт-направленного мутагенеза, позволит более детально рассмотреть механизм действия ДНК-гликозилаз.

**Целью** настоящей работы стало изучение влияния структуры ДНК-субстратов, ДНК-белковых и внутримолекулярных взаимодействий в молекуле белка на эффективность

узнавания и расщепления поврежденной ДНК 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилазами человека и *E. coli*. В связи с этим представлялось необходимым решить следующие **задачи**:

- 1) определить параметры стационарной кинетики ферментов OGG1 и Fpg в реакции расщепления ДНК-субстратов, отличающихся конформационными параметрами и нуклеотидным контекстом;
- 2) исследовать влияние нуклеотидного окружения на стэкинг-взаимодействие 8-охоGua в цепочке ДНК;
- 3) установить вклад отдельных структурных доменов белка Fpg в специфическое фермент-субстратное взаимодействие;
- 4) выявить функционально важные внутримолекулярные взаимодействия в белке Fpg, удаленные от активного центра фермента;
- 5) изучить ответственные за узнавание 8-охоGua ДНК-белковые взаимодействия, предсказанные в ходе компьютерного моделирования процесса выворачивания нуклеотидов из ДНК 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазами;
- 6) охарактеризовать влияние целостности сахарофосфатного остова на активность фермента Fpg.

**Научная новизна работы.** В рамках настоящей работы всесторонне исследован процесс удаления поврежденных оснований 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилазами бактерий и человека, и определены факторы, влияющие на узнавание поврежденной ДНК. Впервые получен набор значений энергий коаксиального стэкинга 8-охоGua для всех возможных контекстов с основанием Cyt напротив повреждения. Также впервые систематически исследовано влияние целостности сахарофосфатного остова на активность Fpg. Методом коэволюционного анализа аминокислотных остатков выявлены внутримолекулярные взаимодействия, важные для каталитической активности Fpg, но при этом удаленных от активного центра фермента. Показано существование селективных для поврежденного основания конформационных интермедиатов при выворачивании 8-охоGua белками OGG1 и Fpg. Исследовано влияние ряда ранее не изученных аминокислотных замен на активность белка Fpg.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные данные позволяют рассматривать некоторые ДНК-гликозилазы в качестве скаффолдов для дальнейшего рационального дизайна ферментов, имеющих биоаналитическое или генноинженерное приложение. Полученный в данной работе набор значений энергий стэкинга для 8-охоGua представляет собой основу для дальнейших исследований ферментативных систем процессинга ДНК, позволяющий связать скорость определенных стадий узнавания субстрата с контекстом ДНК. Работа вносит вклад в подтверждение и уточнение механизма многостадийной

верификации субстратов, который может быть общим для ДНК-гликозилаз других структурных семейств.

**Методология и методы исследования.** В работе широко использовались стандартные методы генной инженерии, продукции и выделения рекомбинантных белков, характеристики их биохимических свойств, методы ферментативной кинетики, метод кругового дихроизма, метод термической денатурации с оптическим поглощением. Также применялись компьютерные методы исследования биополимеров.

**Положения, выносимые на защиту.**

1) На кинетические параметры реакции, катализируемой ферментами Fpg и OGG1, оказывают влияние локальные конформационные параметры ДНК-субстрата и состав нуклеотидного окружения 8-охоGua.

2) 8-охоGua в составе ДНК независимо от контекста оказывает дестабилизирующее действие на стэкинг по сравнению с каноническим основанием Gua.

3) Отдельный структурный С-концевой домен белка Fpg обладает остаточной АР-лиазной активностью.

4) В структуре молекулы Fpg присутствуют удаленные от активного центра кластеры аминокислот, важные для способности фермента связывать и расщеплять ДНК-субстрат.

5) В узнавание 8-охоGua как ферментом Fpg, так и ферментом OGG1 большой вклад вносят промежуточные взаимодействия, образуемые поврежденным нуклеотидом при его выворачивании в активный центр этих ДНК-гликозилаз.

6) Для эффективного расщепления ДНК, содержащей 8-охоGua, ферментом Fpg необходима ковалентная непрерывность цепей ДНК-дуплекса вблизи от места повреждения.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Основные положения работы представлены на 13 международных конференциях, из них 5: «Albany 2011: The 17<sup>th</sup> Conversation» (Олбани, США, 2011), «22<sup>nd</sup> IUBMB & 37<sup>th</sup> FEBS Congress» (Севилья, Испания, 2012), «Albany 2013: The 18<sup>th</sup> Conversation» (Олбани, США, 2013), «Albany 2015: The 19<sup>th</sup> Conversation» (Олбани, США, 2015), «42<sup>nd</sup> FEBS Congress» (Иерусалим, Израиль, 2017), материалы которых индексируются в Web of Science и Scopus.

По материалам диссертации опубликовано 5 научных статей, из них 4 в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, и 1 в российском рецензируемом журнале.

**Структура и объём работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка

цитированной литературы. Работа изложена на 140 страницах, содержит 55 рисунков и 16 таблиц. Библиография включает 371 литературных источников.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

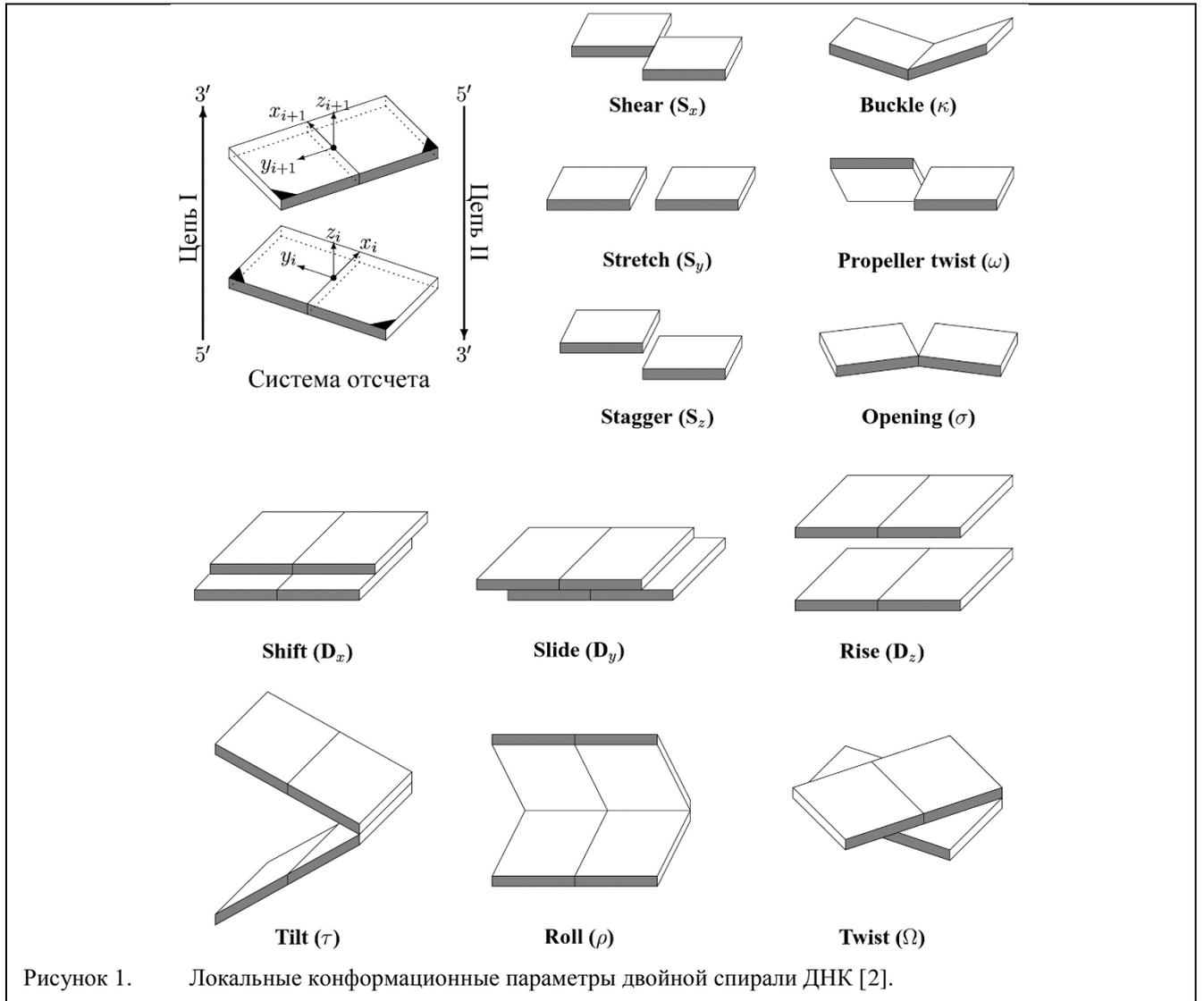
### 2.1. Структурные основы конформационной мобильности ДНК

Функционирование многих ДНК-зависимых белков опирается на внесение ими изменений в конформацию ДНК. Ранее бытовало представление о ДНК, как о статичной жесткой молекуле [1]. Однако, как показано с помощью различных физико-химических методов, в действительности двойная спираль ДНК — это высокодинамичная структура, которая обладает значительной свободой как для изгибания, так и для кручения.

Как для любого биополимера, конформационная подвижность нуклеиновых кислот реализуется благодаря изменению углов вращения вокруг ковалентных связей. В составе двойной спирали эти вращательные движения ограничены достаточно сильными стэкинг-взаимодействиями и комплементарными водородными связями. Разрешенные вращения вокруг различных связей приводят к изменению взаимных ориентаций оснований или пар оснований. Именно набором параметров, описывающим такие относительные ориентации, принято характеризовать конформации двойных спиралей.

В основе номенклатуры конформационных параметров двойных спиралей нуклеиновых кислот, принятой специальным совещанием EMBO (European Molecular Biology Organization), лежит стандартная локальная декартова система координат, которая ставится в соответствие каждой паре оснований: начало координат находится в геометрическом центре пары; плоскость XY совпадает с плоскостью пары, ось Y параллельна линии, соединяющей атомы C1', и направлена на цепь, которая принимается за первую; ось Z направлена на плоскость следующей (в направлении 5'→3' по первой цепи) пары оснований, направление оси X выбирается по правилам образования правой декартовой системы координат (рисунок 1).

Конформационное изменение структуры дцДНК, представляющее собой изгибание, подразумевает локальные изменения траектории оси спирали. Такие изменения зависят от специфической геометрии соответствующих пар оснований. На внешней стороне изогнутой ДНК большая и малая бороздки должны быть шире, чтобы подстроиться под изгиб, в то время как на внутренней они должны быть уже. Локальную конформацию ДНК принято описывать 12 параметрами, 6 из которых (*shear, stretch, stagger, buckle, propeller twist* и *opening*) определяют конформацию пар оснований, а другие 6 (*shift, slide, rise, twist, tilt* и *roll*) — взаимное расположение пар оснований (рисунок 1).



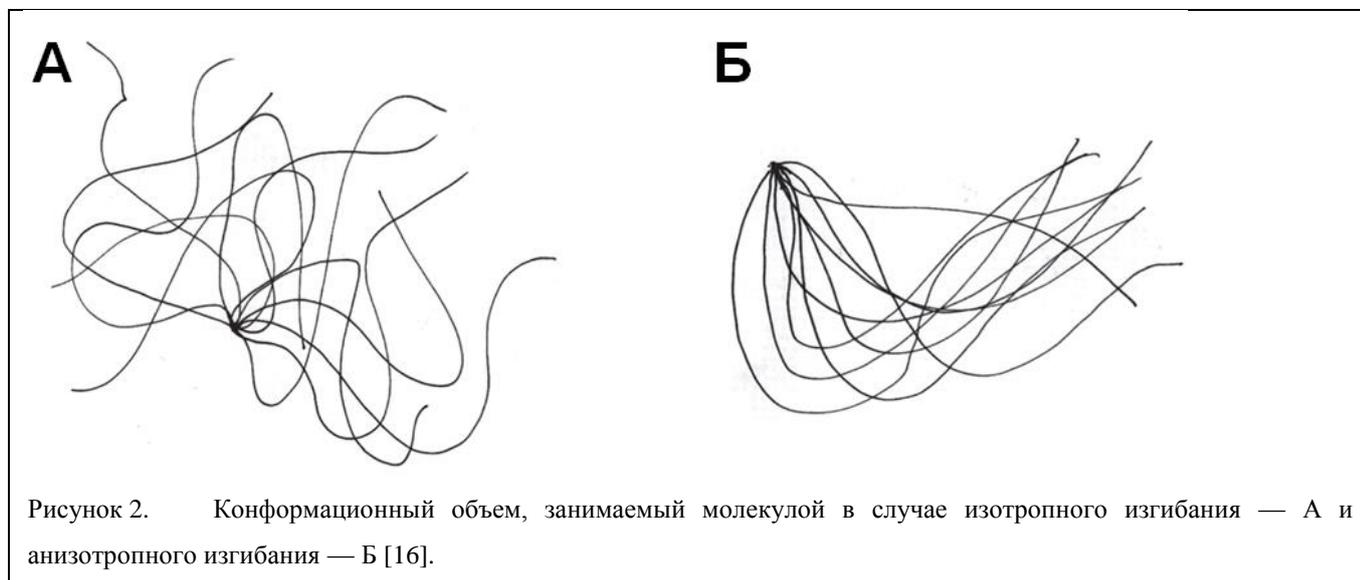
Изменение направления оси спирали может быть вызвано двумя основными типами смещения одной пары оснований относительно другой соседней: *tilt* — изгиб в направлении сахарофосфатного остова, в котором одна пара повернута вокруг своей короткой оси относительно другой пары оснований, и *roll* — изгиб двойной спирали в направлении одной из бороздок, в котором аналогичный поворот осуществляется вокруг длинных осей пар (рисунок 1). Другие важные параметры, *slide* и *shift*, представляют собой смещение одной из соседних пар оснований в плоскости относительно другой вдоль длинной или короткой оси пары, соответственно, при этом плоскости самих оснований остаются параллельными. Параметр *rise* описывает смещение вдоль оси спирали, при котором увеличивается расстояние между плоскостями пар оснований. Наконец, параметр *twist* задает угол между осями параллельных плоскостей пар оснований, который характеризует степень спиральной закрутки (для правой спирали принято использовать положительные значения *twist*).

Гибкость или жесткость ДНК может быть описана главным образом двумя структурными параметрами: торсионной жесткостью, которая характеризуется углом *twist*, и способностью изгибаться главной оси двойной спирали, которая может быть описана углами *tilt* и *roll* как локально, так и в целом, по сравнению с основной траекторией. Для свободной или находящейся в комплексе с белком ДНК преобладающей деформацией при изгибании служит *roll*. Она энергетически выгодней, чем *tilt*, и к тому же увеличивает ширину бороздки в направлении изгиба. Согласно данным рентгеноструктурного анализа параметры *roll*, *slide* и *twist*, а также *tilt* и *shift* часто коррелируют [3]. Так, например, отрицательный *roll* коррелирует с высоким *twist* и положительным *slide* и наоборот (рисунок 1).

В ранних работах гибкость ДНК описывалась в рамках модели тонкого однородного (изотропного) стержня, способного гнуться в любом направлении [4]. Однако биологические последствия физико-химических свойств молекулы ДНК часто сильно зависят от достаточно малых различий в энергии изгиба или расплетания коротких участков последовательности. Поэтому с развитием представлений об упаковке генетического материала и методов ферментативных манипуляций с ДНК *in vivo*, сформировалась усовершенствованная модель для описания гибкости ДНК, где молекула представлялась уже неоднородным (анизотропным) стержнем, имеющим склонность изгибаться в определенном направлении [5-7].

Характеристика гибкости ДНК, как и любого другого полимера, включает такой механический параметр, как персистентная длина (англ. «persistence length»). Физический смысл этой длины определяется как расстояние, на котором среднее отклонение оси полимера, вызванное термальными флуктуациями, составляет один радиан. В ходе многих исследований, включая светорассеяние [8], вращательную диффузию [9], кинетику циклизации ДНК [10, 11], электронную микроскопию [12], криоэлектронную микроскопию [13] и атомно-силовую микроскопию [14], эта длина была оценена в ~50 нм смешанной последовательности В-ДНК, что соответствует ~150 п.н. Важно отметить, что персистентная длина зависит не только от параметров гибкости локальных участков, но и от анизотропии гибкости цепочки ДНК, т. е. от направленности рассматриваемой области [13]. Анизотропия гибкости — это фундаментальное физико-химическое свойство ДНК, которое на структурном уровне позволяет различать одну область ДНК от другой, тем самым создавая дополнительную форму кодирования информации. Для каждой последовательности предпочтительная направленность, то есть изгиб молекулы ДНК, в растворе определяется суммой предпочтительных конформаций смежных пар оснований, называемых шагами оснований (англ. «base steps»), при этом диапазон возможных конформаций строго ограничен [15]. Таким образом, применительно к гибкости ДНК анизотропия означает ограничение свободы изгиба, вследствие чего объем всех

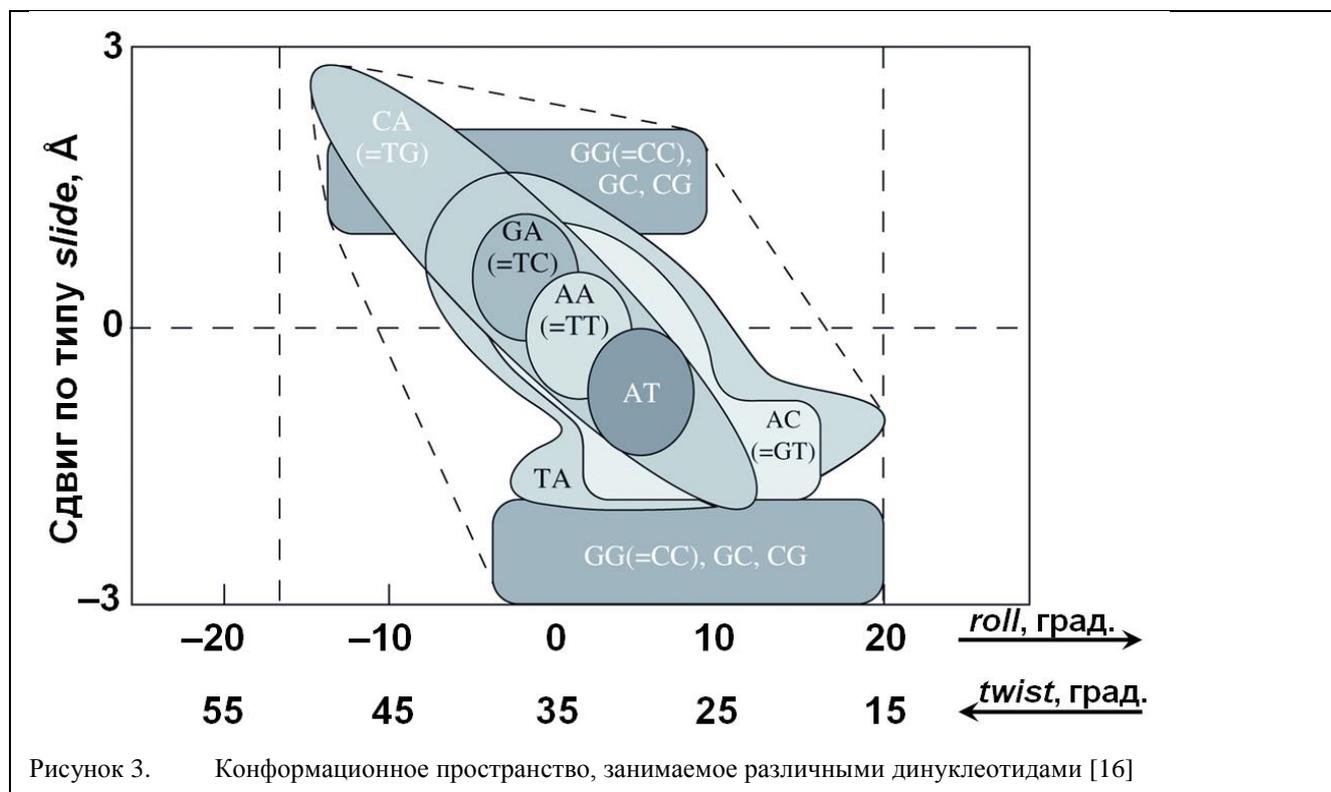
принимаемых молекулой конфигураций в пространстве меньше, чем объем изотропно изгибающейся цепочки (рисунок 2). В этом смысле свойства молекулы ДНК могут быть описаны в терминах больцмановской формулировки энтропии.



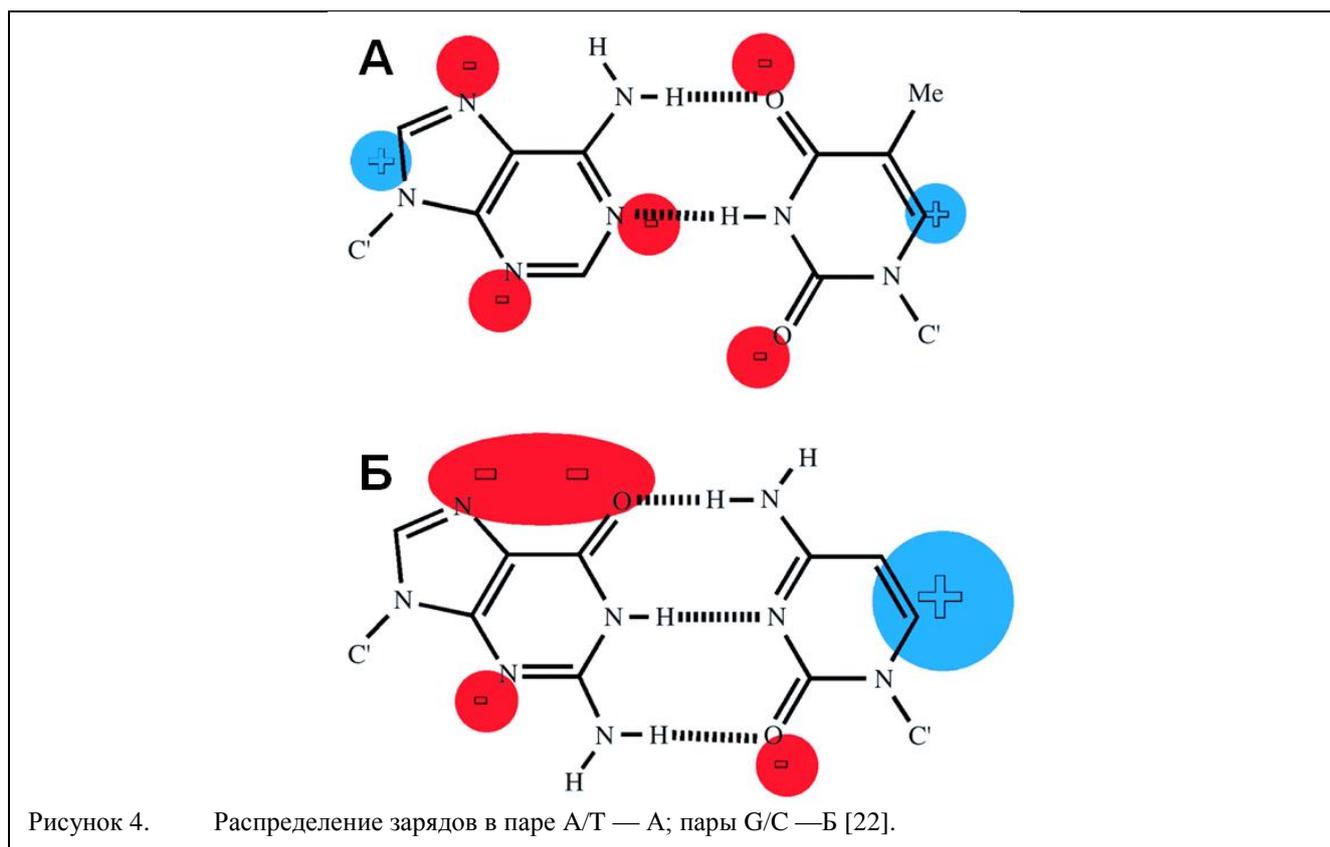
Локальные конформационные параметры ДНК зависят от физико-химических свойств индивидуальных пар оснований и шагов оснований. Поскольку физические характеристики десяти возможных динуклеотидных пар заметно отличаются, то можно сказать, что гибкость ДНК — это свойство, зависящее от нуклеотидной последовательности и меняющееся как локально, в зависимости от присутствия определенных последовательностей, так и более глобально, исходя из полного состава рассматриваемой молекулы. В число главных факторов, отвечающих за способность шага оснований пространственно искажаться, входят электронные конфигурации пар оснований, число водородных связей, образованных между основаниями и с молекулами растворителя, и экзоциклические группы, занимающие большую или малую бороздку. В комплексе эти факторы определяют два основных параметра: конформационное пространство (рисунок 3), которое занимает конкретный шаг оснований, и энергию деформации, необходимую для принятия определенной конформации.

В случае свободной ДНК предпочтительные конформации шагов оснований определяются ван-дер-ваальсовыми и электростатическими взаимодействиями между соседними парами оснований [17-21]. При этом электростатические взаимодействия оказываются решающими для пары dGua:dCyt из-за образующегося диполя, в отличие от пары dAde:dThy, где заряды в большей степени распределены между атомами оснований [19, 22] (рисунок 4). В результате смежные пары оснований dAde:dThy могут образовывать стэкинг-взаимодействие без сдвига относительно друг друга под действием электростатических сил, в

то время как оптимальная конфигурация смежных пар dGua:dCyt подразумевает подстраивание взаимодействующих диполей путем *slide* сдвига и увеличения угла *roll*.



Из упомянутых ранее факторов присутствие экзоциклических заместителей имеет наибольшее влияние на анизотропию гибкости цепочки ДНК и вместе с диполем на соседней паре определяет конформационное пространство, доступное для рассматриваемых шагов оснований (рисунок 3). Чем больше конформаций может принимать шаг оснований, тем в большем диапазоне меняется траектория оси спирали ДНК. В экспериментах по замене dGua на гипоксантин и dAde на 2,6-диаминопурин методом атомно-силовой микроскопии были измерены персистентные длины для ряда олигодезоксирибонуклеотидов (ОДН). Полученные длины находились в строгой зависимости от наличия экзоциклической 2-амино группы в малой бороздке спирали [23]. В результате аналогичных экспериментов было установлено, что персистентная длина также зависит от наличия экзоциклической 5-метильной группы в большой бороздке [24].



Существует множество данных конформационного анализа, основанного преимущественно на кристаллических структурах ДНК в В- и А-формах. Вследствие особенностей кристаллической упаковки конформация одной и той же последовательности может отличаться в кристаллах и в растворе, что определено методом ЯМР [25]. Как показали исследования кристаллических структур В-ДНК, такие шаги оснований, как АА/ТТ, АТ/АТ и GА/ТС, обладавая наименьшим конформационным пространством (рисунок 3), проявляют слабую склонность к деформации по типам *slide* и *twist* [3, 26]. Последовательности АС/ГТ, ТГ/СА и ТА/ТА, напротив, обладают наибольшими конформационными пространствами. Такие шаги считаются самыми гибкими, что, по крайней мере для ТГ/СА и ТА/ТА, подтверждается данными о наименьшей энергии стэкинг-взаимодействия между этими парами нуклеотидов [27]. Несколько отличаются от других шаги оснований, содержащих пары dGua:dCyt. Все три шага GС/GС, СG/СG и GG/СС принимают конформации с сильным или слабым, но не промежуточным, сдвигом по типу *slide*. Для А-формы, напротив, наиболее жесткими оказались шаги АС/ГТ, ТГ/СА, ТА/ТА и АТ/АТ, а более гибкий характер имеют динуклеотиды АА/ТТ и АG/СТ. Существуют данные о том, что некоторые короткие последовательности, находясь в составе спирали ДНК, способны придавать цепочке определенный изгиб, то есть направленность. В этом случае важную роль будет играть не только предпочтительная конформация шага оснований, но и контекст. Например, для отдельного динуклеотида АА (или

ТТ) сколько-нибудь значимого изгиба не наблюдалось, в то время как при исследовании тракта (dAde:dThy)<sub>n</sub> направленность цепочки появлялась уже при  $n = 3$  [28, 29]. Аналогично dGua:dCyt-богатые последовательности, например GGCC, также изгибали спираль ДНК, однако в этом случае оказывалось критичным наличие стабилизирующих дивалентных катионов в большой бороздке, которая подвергалась сжиманию [30].

Еще одним важным фактором, влияющим на гибкость, служит ионное окружение, которое может регулировать отталкивание между фосфодиэфирными связями сахарофосфатного остова через большую и малую бороздку. Так, например, содержание А-формы ДНК в трифторэтаноле в 3 раза выше, чем в нормальном водном окружении, где преобладает В-форма [31]. Тем не менее, в присутствии этанола, который также способствует переходу В-формы в А-форму, ДНК становится более гибкой [32].

Если ДНК находится в комплексе с белком, ее деформация может быть гораздо сильнее, чем в свободном состоянии, когда конформационные изменения возникают в основном благодаря термальным флуктуациям в растворе. Однако даже в этом случае общая деформация ДНК в конечном счете во многом зависит от локальных конформационных свойств шагов оснований. Как уже отмечалось ранее, наличие заместителей в бороздках спирали увеличивало персистентную длину ДНК, вследствие чего снижалось сродство к гистонам [23, 24]. Поэтому для образования нуклеосомного кора главным фактором, определяющим размещение ДНК, служит периодическое расположение коротких dAde:dThy-богатых последовательностей в одной фазе спирали и коротких dGua:dCyt-богатых последовательностей в противоположной фазе. Такое чередование коротких последовательностей, имеющих локальную конформацию с узкой и широкой малыми бороздками соответственно, облегчает «наматывание» ДНК на гистоновый октамер [5, 33, 34].

Таким образом, гибкость, связанная с изгибанием и скручиванием, имеет важные биологические последствия. Так, например, процессы репликации и транскрипции нуждаются в предварительном раскручивании определенных участков спирали перед началом процесса копирования последовательности ДНК. Такие области раскручивания часто характеризуются высокой термолабильностью последовательности [35]. Геномная ДНК эукариот упакована в объеме в тысячи раз меньшем, чем объем, занимаемый статистическим клубком, что достигается за счет присутствия в ней структурных чередований, облегчающих сворачивание молекулы ДНК в ядре [36, 37]. Изогнутая ДНК проявляет отличную от нормальной электрофоретическую мобильность в полиакриламидном геле [38], что позволило определять наличие таких структурных участков. Показано, что изогнутая структура ДНК ассоциирована с промоторными частями генов [38], местами начала репликации (ориджинами репликации) [38,

39], местам контакта хромосом с ядерным матриксом (MAR или SAR) [40-42], сайт-специфической рекомбинацией прокариот и, вероятно, эукариот [38] негомологичной рекомбинацией [43]. Кроме того, изогнутые участки ДНК служат субстратами для ДНК-топоизомеразы II [44] и ферментов, вносящих одноцепочечные разрывы в ДНК [45-48], включая ДНК-топоизомеразу I [49].

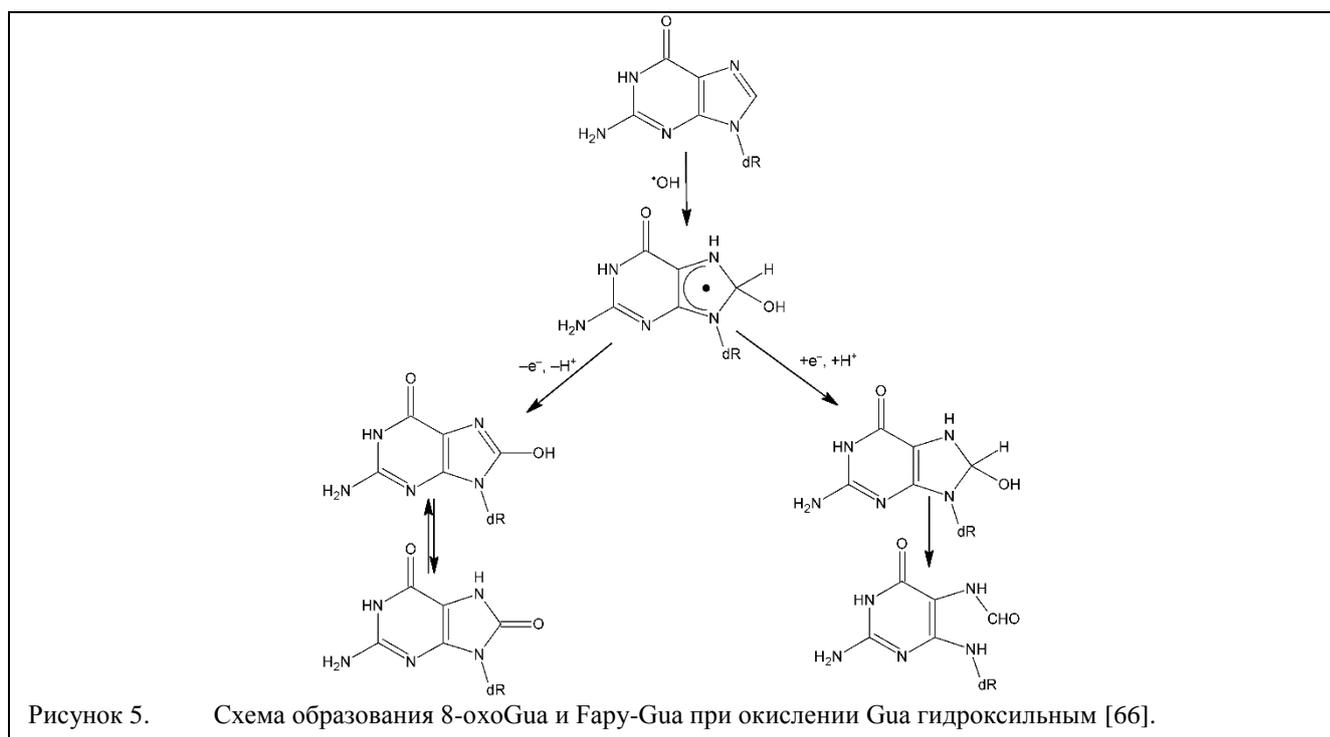
В настоящее время природа оснований и гибкость ДНК рассматриваются в качестве ключевых параметров, которые в повреждающих ДНК условиях определяют масштабы и типы возникающих повреждений. Так, циклобутановые пиримидиновые димеры предпочтительно образуются в оцДНК или гибких концах поли(dAde:dThy) трактах, но не в их жестком центре [50, 51]. Влияние повреждений, находящихся в составе ДНК, на способность спирали изгибаться изучено достаточно плохо. Имеются данные, что наличие 8-оксогуанина (8-охоGua) в ДНК облегчает изгибание молекулы ДНК в месте повреждения [52], но в то же время увеличивает торсионную жесткость цепочки [53]. Наличие одноцепочечных разрывов, вызывает излом ДНК, при этом равновесие между прямой и изломанной формами зависит от стэкинг-взаимодействия в месте разрыва [27]. Влияние разрывов на торсионную жесткость ДНК также пренебрежимо мало [10, 54], что свидетельствует о принципиальной важности стэкинг-взаимодействий для сохранения жесткости дуплекса ДНК.

## 2.2. *8-Оксогуанин*

Биологические макромолекулы в живых организмах постоянно подвергаются модификациям под действием экзогенных факторов среды и окислительного клеточного метаболизма. В условиях, способствующих окислительному повреждению ДНК, одна из наиболее чувствительных и биологически важных мишеней — азотистое основание гуанин. Он обладает самым низким окислительным потенциалом среди канонических оснований ДНК, образуя при одноэлектронном окислении один из самых распространенных окисленных повреждений 8-охоGua, который в настоящее время считается одним из основных биомаркеров окислительного стресса [55]. Показано, что 8-охоGua образуется при действии ионов переходных металлов в присутствии  $O_2$  и восстановителей,  $\gamma$ -облучении, обработке пероксинитритом, агентами, индуцирующими образование синглетного кислорода, активированными метаболитами некоторых канцерогенов, УФ-облучении в присутствии фотосенсибилизаторов или  $H_2O_2$  и т.п. [56].

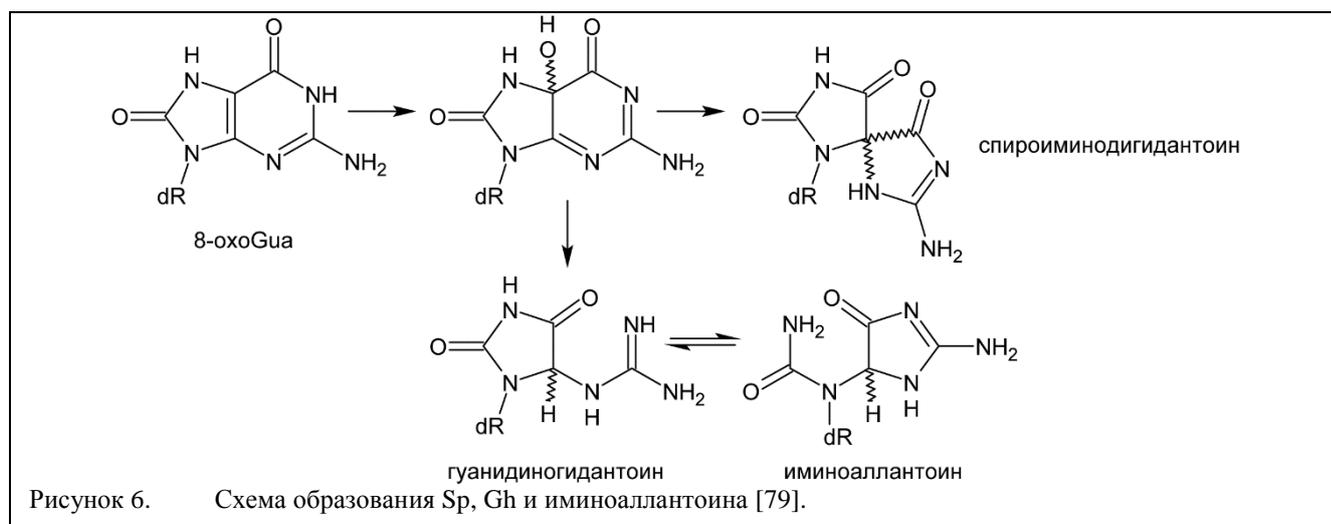
Обладая еще меньшим окислительным потенциалом по сравнению с гуанином, 8-охоGua может подвергаться дальнейшему окислению, например, в гуанидиногидантоин и спироиминогидантоин [57, 58] (рисунок 5). При этом в восстанавливающих условиях 8-охоGua

может образовывать формамидопиримидиновое производное 2,4-диамино-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-илформамида (Fару-Gua) [59, 60] (рисунок 6). Таким образом, 8-охоGua и его производные считаются наиболее многочисленными повреждениями ДНК, образующихся под действием окислительных факторов [58, 61]. В настоящее время фоновый уровень 8-охоGua оценивается от 1 до 2 на  $10^6$  оснований гуанина в ядерной ДНК и примерно от 1 до 3 на  $10^5$  в митохондриальной, и показана возможность его повышения в несколько раз при генотоксичном стрессе [62, 63]. Приведенные значения свидетельствуют о том, что в ДНК одной клетки за сутки может образовываться до  $10^5$  повреждений данного типа [55, 64, 65].



Поврежденное основание 8-охоGua существует в виде двух таутомеров 8-оксо- и 8-гидрокси-форме, однако экспериментально установлено, что доля последнего не превышает 15 % [67-69]. С помощью ЯМР спектроскопии было обнаружено, что вследствие стерического отталкивания между атомом кислорода при C8 и 5'-гидроксильной группой 8-oxodGuo в свободном состоянии находится преимущественно в *син*-конформации [68], в то время как при образовании водородных связей с основанием Cyt он стабилизируется в *анти*-конформации, несмотря на стерический фактор [70, 71]. Тем не менее, в *син*-конформации 8-охоGua способен образовывать пары хугстеновского типа с основанием Ade, и менее стабильные связи с Thy и Gua, а также связи типа «качания» (англ. «wobble») с Thy [68, 72]. В случае пары 8-охоGua:Gua водородные связи отличны от хугстеновского типа за счет сдвига обоих дезоксирибонуклеотидов в направлении большой бороздки [73]. Таким образом, введение оксогруппы при C8 в основании Gua термодинамически несколько дестабилизирует пару

Gua:Cyt, но стабилизирует пары Gua с пуринами [74]. Ранее уже отмечалось, что наличие 8-охоGua в ДНК увеличивает как гибкость молекулы ДНК [52], так и торсионную жесткость ДНК [53] в месте повреждения. Следствиями введения электроотрицательного заместителя в положении С8 становятся потеря катион-связывающего центра из-за превращения атома N7 в амидный N–H [75], и изменение электростатического потенциала ДНК в месте повреждения [76]. При этом также меняется степень гидратации области большой бороздки вблизи пары 8-охоGua:Cyt, оказывая влияние на стабильность ДНК и ее конформационную динамику [75, 77, 78].



Мутагенный потенциал 8-охоGua характеризуется способностью ДНК-полимераз встраивать различные dNMP напротив 8-оходGMP и возможностью использования 8-оходGTP в качестве субстрата для синтеза ДНК этими полимеразми. В соответствии с упомянутыми выше физико-химическими свойствами 8-оходGua ДНК-полимеразы способны встраивать напротив него не только dCMP, но и dAMP. Репликативные ДНК-полимеразы ( $\alpha$  и  $\delta$  эукариот, ДНК-полимераза бактериофага T7 и др.) с трудом преодолевают 8-охоGua и преимущественно включают dAMP, создавая предмутагенное состояние 8-охоGua:Ade, в то время как репаративные ДНК-полимеразы ( $\beta$  эукариот, ДНК-полимераза I *E. coli* и др.) склонны к включению dCMP [80]. Примечательно то, что образовавшиеся пары с поврежденным основанием не корректируются характерной для многих ДНК-полимераз экзонуклеазной активностью [81]. Причиной этому может служить геометрия пар dCyd:8-оходGua и dAdo:8-оходGua, напоминающая канонические уотсон-криковские пары, тем самым не позволяя ферменту воспринимать их как ошибочные [82]. В качестве субстрата 8-оходGTP встраивается ДНК-полимеразми главным образом также напротив Cyt и Ade в матрице [83]. Таким образом, в соответствии со специфичностью включения dNMP или 8-оходGMP ДНК-полимеразми в

большинстве случаев мутации, вызванные этим поврежденным основанием, представляют собой трансверсии G→T.

Помимо ДНК, основание Gua входит в состав других биополимеров и мономеров. РНК в большей степени подвержена окислительному повреждению по сравнению с ДНК в тех же условиях [84, 85]. В основе такой повышенной чувствительности лежит преимущественно одноцепочечное состояние РНК, сравнительно меньшая ассоциация с защитными белками и т.д. В результате по разным оценкам от 2 % до 70 % молекул мРНК, особенно при некоторых патологических состояниях, могут содержать хотя бы один остаток 8-охоGua ввиду химической стабильности этого повреждения и недостатка механизмов его репарации, в отличие от ДНК [84, 86-89]. Как отмечалось ранее, оба основания Gua и 8-охоGua обладают низкими окислительными потенциалами, на основании чего было сделано предположение о том, что в составе РНК они могут выступать в качестве акцепторов реакционноспособных форм кислорода, предотвращая окисление геномной и митохондриальной ДНК [84]. В соответствии с общим количеством РНК, которое по разным данным приблизительно в четыре раза превышает количество ДНК, вполне вероятно, что РНК принимает участие в борьбе клетки с окислительным стрессом в качестве естественного антиоксиданта [84, 90].

Наличие 8-охоGua в ДНК-матрице обычно слабо влияет на ферментативную активность РНК-полимераз, которые подобно ДНК-полимеразам включают напротив него СМР и АМР, что в итоге приводит к аминокислотным заменам в конечном белке [91]. Еще одна возможная причина синтеза полипептидов, аминокислотная последовательность которых не соответствует кодирующей последовательности ДНК — это включение 8-охоGMP в состав полимерной цепи РНК-полимеразой, поскольку 8-охоGTP служит вполне подходящим для нее субстратом [92].

Биологическое действие 8-охоGua не ограничивается его влиянием на процессы матричного биосинтеза. Для ряда рестриктаз показано, что наличие 8-охоGua в последовательности сайта узнавания ингибирует расщепление ДНК [93]. Окисление Gua в последовательности метил-СрG ингибирует связывание метил-СрG-связывающего белка [94], а также ингибирует метилирование основания Cyt ДНК-метилтрансферазой человека в СрG-последовательности [95]. Образование повреждения в промоторной области генов препятствует связыванию некоторых транскрипционных факторов [96]. Образование 8-охоGua в составе теломерных повторов TTAGGG снижает эффективность действия теломеразы и приводит к нарушению квадруплексной структуры теломерной ДНК [97].

За последние тридцать лет довольно хорошо были охарактеризованы физико-химические свойства 8-охоGua, источники и биологические последствия его возникновения. Изучение свойств 8-охоGua существенно облегчилось после создания методов включения его в ОДН при

синтезе [98]. Однако, несмотря на обилие работ, посвященных исследованию свойств 8-охоGua, остается ряд фундаментальных вопросов, не решенных на сегодняшний день. Среди них, например, природа дестабилизации структуры ДНК, содержащей 8-охоGua, и физико-химические параметры повреждения, лежащие в основе его узнавания ферментами.

### 2.3. *Экцизионная репарация оснований*

На живую клетку постоянно действует большое число повреждающих факторов разной природы. Повреждению могут подвергаться биополимеры всех видов, в том числе ДНК. Повреждения могут быть представлены одно- и двухцепочечными разрывами, модифицированными основаниями, апурин-апиридиновыми (AP-) сайтами, объемными аддуктами, меж- и внутрицепочечными сшивками и неправильно спаренными основаниями. Для борьбы с таким разнообразием повреждений генетического материала в живых организмах существует ряд ферментативных систем репарации ДНК.

Система *реактивации* — наиболее простой и эффективный биохимический процесс, в ходе которого происходит непосредственно восстановление нормального основания. При этом процесс обладает очевидными преимуществами по сравнению с другими репарационными путями, поскольку не требует образования мультиферментных комплексов и протекания множества промежуточных процессов в ходе реакции, что представляется более кинетически и энергетически выгодным [99]. Типичным примером реактивации служит фотореактивация, в ходе которой ферменты фотолиазы при облучении видимым светом расщепляют циклобутановые пиримидиновые димеры и пиримидин-пиримидиновые [6→4] фотопродукты, образовавшихся под действием ультрафиолетового излучения [100, 101]. Ряд алкилированных оснований также может перейти в нативное состояние путем реактивации с помощью  $O^6$ -алкилгуаниналкилтрансферазы [102, 103], которая переносит алкильный остаток с  $O^6$  гуанина на собственный остаток цистеина, переводя тем самым белок в неактивное состояние [102].

Двухцепочечные разрывы, межцепочечные сшивки, однонитевые бреши исправляются с помощью *рекомбинационной репарации*. При этом происходит замещение поврежденного участка ДНК на неповрежденный в результате обмена цепями с полноценной копией генетического материала [99]. Двухцепочечные разрывы также могут репарироваться в ходе *воссоединения негомологичных концов*, следствием чего может стать частичная потеря генетического материала. Интересно, что в *E. coli* двухцепочечные разрывы исправляются преимущественно по первому из этих типов репарации [104], в то время как млекопитающие для репарации этого же типа повреждений используют второй [105, 106].

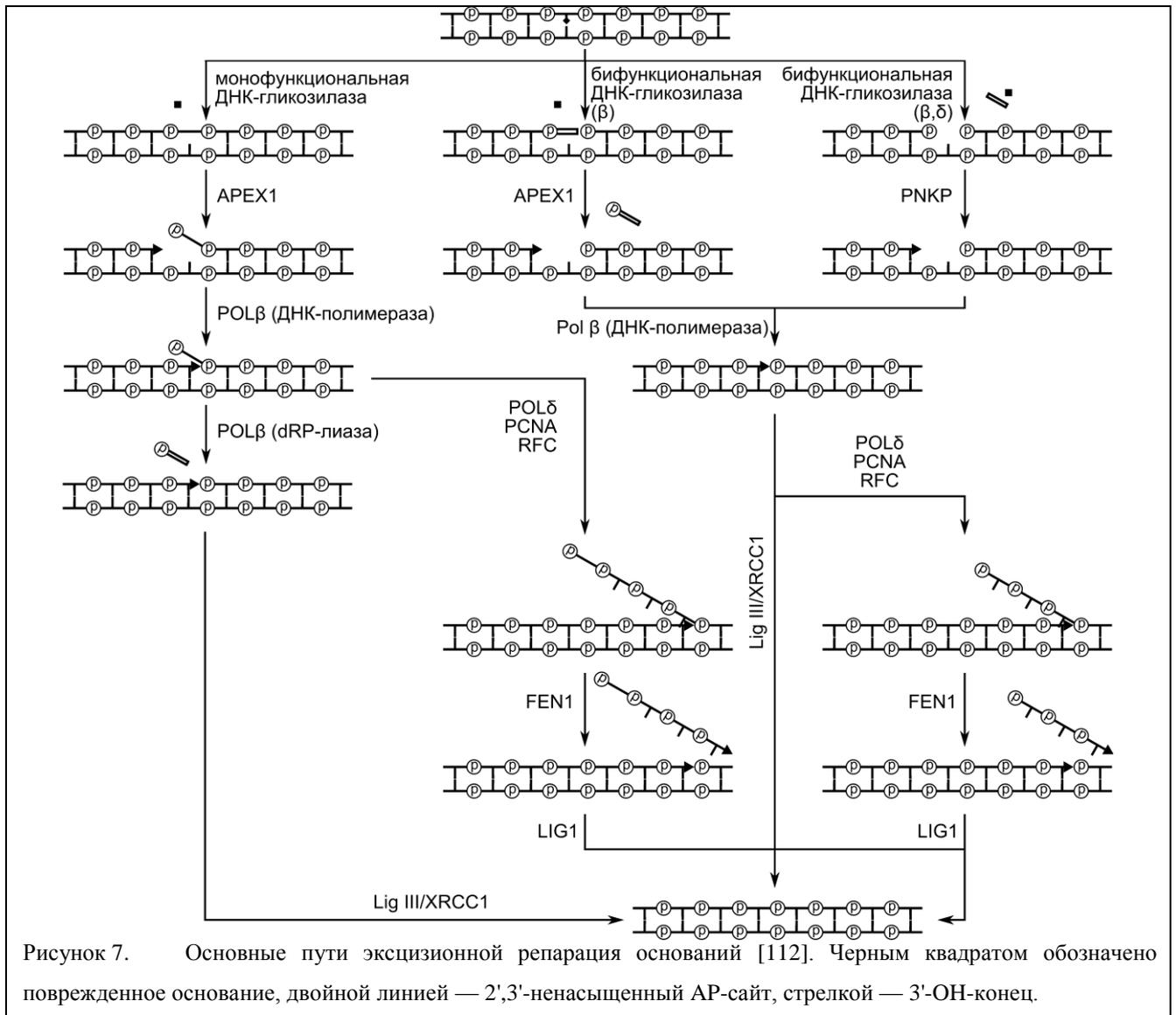
Во многих организмах обнаружена *репарация неканонических пар оснований* (англ. mismatch repair), отвечающая за узнавание и удаление неправильно спаренных оснований в ДНК [107]. Поскольку неканонические пары оснований могут появляться вследствие многих биологических процессов, принято считать, что данный тип репарации имеет различные функции, включая репарацию некоторых типов повреждений, регуляцию рекомбинации, и, возможно наиболее важную, предотвращение мутаций, вызванных ошибками репликации [107].

*Экцизионная репарация нуклеотидов* — наиболее неспецифичной механизм, позволяющий клеткам удалять широкий спектр объемных повреждений ДНК, в частности, циклобутановые пиримидиновые димеры и аддукты со многими канцерогенами [108, 109]. Общая схема этого процесса выглядит следующим образом: узнавание повреждения ДНК; расщепление цепи с 5'- и 3'-сторон от него; удаление олигонуклеотида, содержащего повреждение; синтез ДНК в образовавшейся брешии и лигирование цепи на концах брешии [99].

Наконец, наиболее распространенные типы повреждений ДНК исправляются в ходе *экцизионной репарации оснований* (ЭРО). Это основной механизм устранения многих повреждений ДНК: одноцепочечных разрывов, AP-сайтов и модифицированных оснований [99]. Одними из главных участников данного процесса, обеспечивающие удаление поврежденных оснований из структуры ДНК путем гидролиза *N*-гликозидной связи, служат ДНК-*N*-гликозилазы [99].

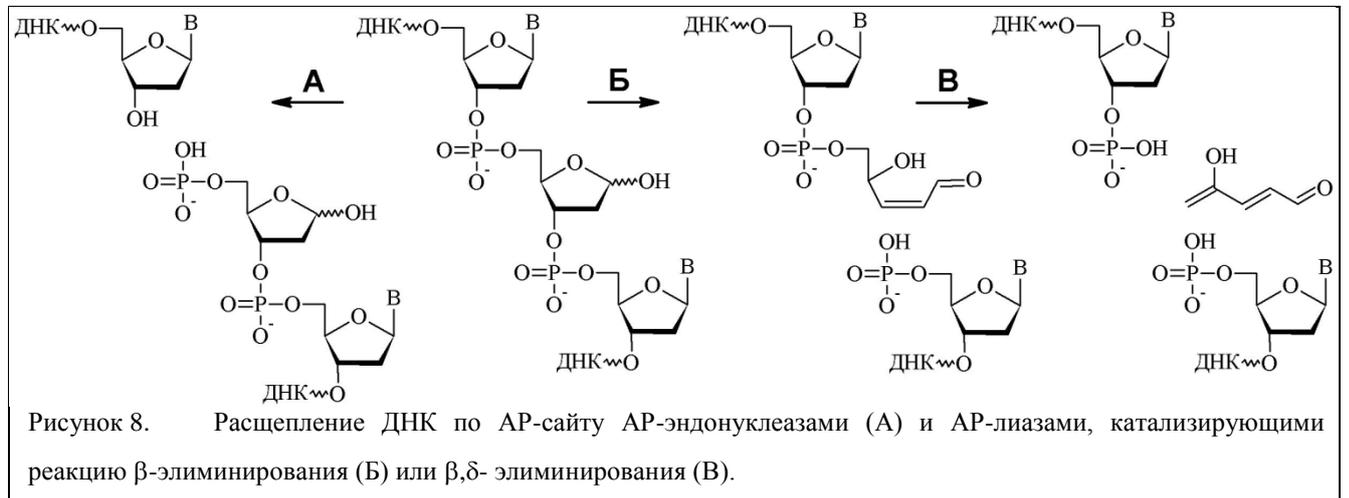
Механизм экцизионной репарации с участием ДНК-*N*-гликозилаз выглядит следующим образом (рисунок 7). Поврежденное основание распознается специфичной к нему ДНК-*N*-гликозилазой, которая гидролизует *N*-гликозидную связь между поврежденным основанием и сахарофосфатным остовом, что приводит к образованию AP-сайта и свободного основания. Если данная гликозилаза относится к группе *бифункциональных* и обладает AP-лиазной активностью, она может непосредственно расщепить ДНК с 3'-стороны AP-сайта. Полученный продукт  $\beta$ -элиминирования не может быть субстратом для последующих шагов ЭРО и должен удалиться из ДНК (рисунок 8). Для некоторых бифункциональных ДНК-гликозилаз характерно последовательное расщепление ДНК-субстрата путем элиминирования межнуклеозидных фосфатов ( $\beta, \delta$ -элиминирование), в результате чего на месте поврежденного звена образуется однонуклеозидная брешь, обрамленная фосфатными группами (рисунок 7), которая тоже не может быть субстратом для последующих участников ЭРО. Продукты  $\beta$ -элиминирования, представляющие собой ненасыщенные альдозные фрагменты, удаляются из ДНК фосфодиэстеразной активностью, обычно ассоциированной с другими ферментами, AP-эндонуклеазами [110]. Возникающие при  $\beta, \delta$ -элиминировании 3'-фосфатные группы

выщепляются из ДНК фосфатазной активностью, которая у *E. coli* принадлежит также AP-эндонуклеазам, а в клетках человека — полинуклеотидкиназе [110, 111].



Если же основание было удалено *моnofункциональной* ДНК-гликозилазой, то AP-эндонуклеаза, расщепляет ДНК с 5'-стороны AP-сайта, внося таким образом одноцепочечный разрыв в ДНК (рисунок 8) [110]. Затем ДНК-полимераза (ДНК-полимераза I у прокариот, ДНК-полимераза  $\beta$  у эукариот) включает корректный остаток dNMP. Чтобы после этого удалить 2'-деоксирибозо-5'-фосфатный остаток (dRP) и создать субстрат для лигирования, необходима еще одна ферментативная активность (фосфодиэстераза или 2'-деоксирибозо-5'-фосфатлиаза, dRP-лиаза), принадлежащая ДНК-полимеразе  $\beta$  у эукариот и белкам RecJ или Fpg у прокариот. В конце процесса ДНК-лигаза (у эукариот — ДНК-лигаза IIIа в комплексе с фактором XRCC1) восстанавливает непрерывную нить ДНК. При отсутствии dRP-лиазной активности в клетках эукариот ДНК-полимераза  $\delta$  и факторы RFC и PCNA осуществляют синтез цепи ДНК с

вытеснением исходной цепи, затем флэп-эндонуклеаза FEN1 удаляет вытесненную цепь, а ДНК-лигаза I восстанавливает ковалентную связь между 5'-фосфатом и 3'-ОН группой (рисунок 7) [113]. У прокариот при отсутствии dRP-лиазной активности вытесненную цепь деградирует 5'→3'-экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы I [99].



Стадия, на которой ДНК-полимераза встраивает либо один dNMP на место поврежденного звена, либо после встраивания первого dNMP репаративный синтез продолжается с заменой от 2 до 20 нт и вытеснением или деградацией впереди лежащей цепи ДНК, служит точкой разделения процесса ЭРО на пути, называемые *короткозаплаточной* и *длиннозаплаточной* ЭРО. Существует множество данных, свидетельствующих о важности природы поврежденного основания при выборе пути ЭРО. Во многом направление последующего пути определяют субстратная специфичность и механизм действия ДНК-гликозилаз, удаляющих поврежденное основание и иницирующих ЭРО [114-117]. Кроме того, в случае, если на 5'-конце после расщепления AP-эндонуклеазой образуется фрагмент, устойчивый к действию dRP-лиазы, происходит выбор пути в пользу длиннозаплаточной ЭРО. Так например, продукт окисления AP-сайта, 2'-дезоксирибонуклеон, может быть удален только в ходе длиннозаплаточной ЭРО поскольку устойчив к элиминированию [118], и при попытке его отщепления ковалентно связывается с dRP-лиазами [119]. Кинетические характеристики ферментов также относятся к числу факторов, ответственных за выбор того или иного пути ЭРО. Достоверно показано, что в *E. coli* общую скорость процесса репарации определяет стадия лигирования, поэтому выбор между короткозаплаточной и длиннозаплаточной ЭРО зависит от концентрации АТФ, необходимого для активности ДНК-лигазы [120]. Другим примером может быть соотношение между количествами самих участников ЭРО: у эукариот избыток AP-эндонуклеазы по отношению к ДНК-полимеразе β

способствует длиннозаплаточной ЭРО, поскольку AP-эндонуклеаза способна стимулировать активность ферментов ДНК-полимеразы  $\beta$ , FEN1 и ДНК-лигазы I [121, 122].

#### **2.4. ДНК-гликозилазы и механизмы их действия**

Главные ферменты, инициирующие процесс ЭРО, ДНК-гликозилазы, несмотря на существенные различия в структурной организации обладают рядом общих черт [99, 123-125]. Они представляют собой относительно небольшие мономерные белки (~15–70 кДа), не требующие коферментов для проявления активности. Тем не менее, некоторые ДНК-гликозилазы содержат ионы  $Me^{2+}$ :  $Fe^{2+}$  в составе железно-серных кластеров или  $Zn^{2+}$  в составе цинковых пальцев. ДНК-гликозилазы различаются по своей субстратной специфичности и по механизмам действия. Большинство из них обладает достаточно широкой субстратной специфичностью (например, ферменты Nth и Nei *E. coli* выщепляют из ДНК более десятка разных окисленных пиримидиновых оснований), но специфичность некоторых ДНК-гликозилаз, напротив, очень узка (например, фермент MBD4 человека выщепляет только основания Ura и Thy из пар с Gua в контексте CG-островков). Субстратами ДНК-гликозилаз служат окисленные, алкилированные и дезаминированные основания, некоторые неканонические пары оснований и в ряде организмов пиримидиновые димеры. Учитывая, что одно поврежденное основание довольно часто может быть субстратом для нескольких ДНК-гликозилаз, использование субстратной специфичности в качестве основы для классификации этих ферментов представляется нецелесообразным. С развитием методов определения первичных и третичных структур белковых молекул гораздо более рациональным оказалось сгруппировать ДНК-гликозилазы в соответствии с особенностями строения [126, 127]. В рамках этой классификации выделяют по меньшей мере три суперсемейства в зависимости от наличия определенных ДНК-связывающих структурных последовательностей: суперсемейство урацил-ДНК-гликозилазы (Ung), суперсемейство эндонуклеазы III (Nth) и суперсемейство ферментов, родственных формамидопиримидин-ДНК-гликозилазе (Fpg) и эндонуклеазе VIII (Nei) [123-125]. Суперсемейства, в свою очередь, содержат по меньшей мере одно центральное семейство, включающее белки — прототипические члены с гомологичными последовательностями. Например, суперсемейство Nth включает центральные семейства собственно Nth, MutY, Pdg2 и гликозилазы, выщепляющей Thy из неканонических пар (MIG). Кроме этого прототипического семейства в состав суперсемейства могут входить белки, в которых гомология с членами центральных семейств ограничена характерным ДНК-связывающим мотивом: например, в случае суперсемейства Nth это семейства 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы эукариот (OGG1), 3-метиладенин-ДНК-гликозилаз I (Tag), II (AlkA) и III (MagIII), архейной 8-оксогуанин-ДНК-

гликозилазы (AGOG) и метил-CpG-специфической эндонуклеазы (MBD4). Только несколько ДНК-гликозилаз не принадлежат ни одному, из перечисленных суперсемейств. Так например, метилпурин-ДНК-гликозилаза человека MPG и гликозилаза пиримидиновых димеров бактериофага T4 DenV принадлежат особым группам. Основные ДНК-гликозилазы *E. coli* и человека перечислены в таблице 1.

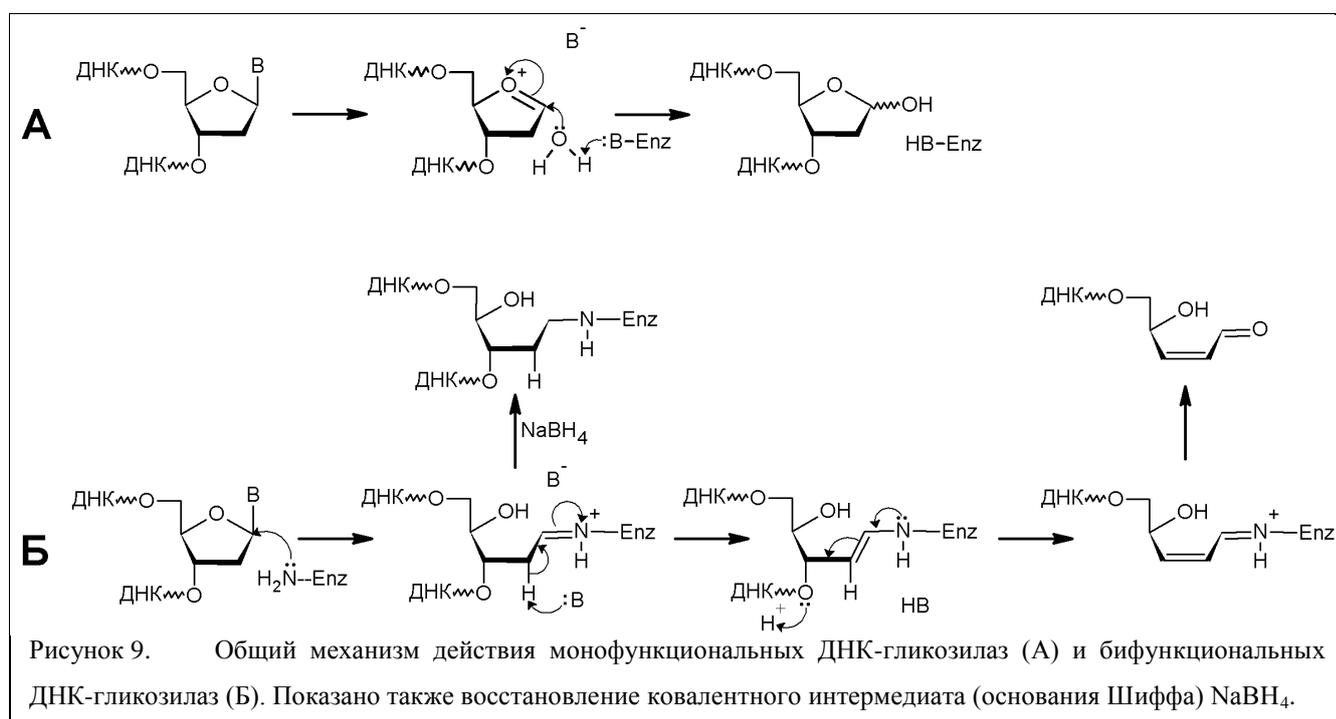
Таблица 1. ДНК-гликозилазы *E. coli* и человека и их субстратная специфичность

<i>E. coli</i>	человек	основная субстратная специфичность	моно- или бифункциональный фермент
Ung	UNG	Ura в любом контексте	монофункциональный
Mug	TDG	C <sup>5</sup> -окисленные производные 5-mCyt и Thy; Thy или Ura в паре с Gua, εCyt	монофункциональный
	SMUG1	Ura в любом контексте	монофункциональный
	MBD4	Ura или Thy в паре с Gua в контексте CpG	монофункциональный
AlkA		алкилированные пурины, εAde, Нур	монофункциональный
Tag		алкилированные пурины	монофункциональный
	MPG	алкилированные пурины, εAde, Нур	монофункциональный
Nth	NTHL1	окисленные пиримидины	бифункциональный
	OGG1	окисленные пурины	бифункциональный
MutY	MUTYH	Ade в паре с Gua или 8-охоG; 2-ОН-Ade	монофункциональный
Fpg		окисленные пурины	бифункциональный
Nei		окисленные пиримидины	бифункциональный
	NEIL1 NEIL2 NEIL3	окисленные пурины и пиримидины	бифункциональный

Механизм действия как моно-, так и бифункциональных ДНК-гликозилаз представляет собой нуклеофильное замещение поврежденного азотистого основания (рисунок 9). Разрыв N-гликозидной связи в случае монофункциональных ДНК-гликозилаз происходит по гидролитическому механизму с образованием AP-сайта в качестве продукта. Поскольку AP-сайт достаточно неустойчив в условиях высокой температуры или щелочной среды и подвергается β-элиминированию, активность монофункциональных ферментов можно изучать, наблюдая за электрофоретическим разделением в ПААГ продуктов реакции после обработки основанием. Некоторые монофункциональные ДНК-гликозилазы, например MutY, с очень малой эффективностью способны осуществлять разрыв цепи ДНК [128]. Однако биологическая значимость такой активности представляется очень малой, поскольку эта реакция протекает на порядки медленнее гликозилазной.

В случае бифункциональных ДНК-гликозилаз, удаление поврежденного основания сопровождается последующим разрывом цепи ДНК со сравнимой эффективностью. Разрыв в цепи происходит по механизму β-элиминирования, а не гидролиза [129-132]. Согласно

стереохимическим исследованиям элиминирование протекает в *син*-ориентации уходящих групп, в ходе процесса отщепляется протон *pro-S* при атоме C2' и образуется *транс*- $\alpha,\beta$ -ненасыщенный альдозный фрагмент [133, 134]. Это принципиально отличает  $\beta$ -элиминирование AP-сайтов, осуществляемое бифункциональными ДНК-гликозилазами, от щелочного, протекающего в *анти*- ориентации [133]. Ряд бифункциональных ДНК-гликозилаз, в частности Fpg и Nei, катализируют две последовательных реакции  $\beta$ -элиминирования (вторую принято называть  $\delta$ -элиминирование), что приводит к образованию в ДНК однонуклеозидной брешы, обрамленной 3'- и 5'-фосфатными группами [129, 135].



Таким образом действия моно- и бифункциональных ДНК-гликозилаз различаются как по продуктам, так и по количеству стадий реакций. Однако более важное различие заключается в природе нуклеофильной группы, определяющей в итоге каталитический механизм ДНК-гликозилаз [136, 137]. Так, нуклеофилом для монофункциональных гликозилаз служит активированная молекула воды, которая, замещая азотистое основание, приводит к образованию AP-сайта (рисунок 9 А). В случае бифункциональных гликозилаз нуклеофилом выступает аминогруппа одного из аминокислотных остатков фермента. В результате образуется ковалентный азометиновый интермедиат (часто именуемый в литературе иминовым интермедиатом или основанием Шиффа) между ферментом и атомом C1' поврежденного dN (рисунок 9 Б). Положительный заряд основания Шиффа увеличивает кислотность протонов при C2'. Один из этих протонов, как предполагается, отрывается удаленным поврежденным основанием, находящимся в анионной форме, что инициирует серию электронных

перегруппировок, приводящих к элиминированию 3'-фосфатной группы ( $\beta$ -элиминирование). Основание Шиффа затем гидролизуется, регенерируя активную форму фермента.

На основании описанных выше различий в каталитических механизмах моно- и бифункциональных ДНК-гликозилаз, в настоящее время сформировалось два основных подхода для доказательства принадлежности фермента к одной из групп. Один из них подразумевает исследование накопления расщепленного ДНК-субстрата до и после щелочной обработки. Ясно, что только в случае монофункциональных гликозилаз, такая обработка необходима для расщепления цепи (рисунок 9). Другой подход основан на восстановлении образующегося в ходе катализа с участием бифункциональных ДНК-гликозилаз основания Шиффа (рисунок 9 Б). Обычно для этих целей используют  $\text{NaBH}_4$  или  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (рисунок 9 Б). В результате образуется негидролизующий конъюгат фермент–ДНК, который, обладая низкой электрофоретической подвижностью, легко обнаруживается при разделении реакционной смеси в ПААГ. Для выявления конкретных аминокислотных остатков, которые участвуют в образовании основания Шиффа, обычно используют подход, состоящий из нескольких этапов: восстановление  $\text{NaBH}_4$  ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) ковалентного интермедиата с последующим протеолизом и идентификацией остаточного пришитого к ДНК пептидного фрагмента секвенированием по Эдману или методами масс-спектрометрии [128, 138-140] (рисунок 10). Метод сайт-направленного мутагенеза, применяемый иногда с этой целью, не может дать точной информации, служит ли данная аминогруппа нуклеофилом в ходе реакции, тем не менее, он позволяет определить аминокислотные остатки, важные для катализа или связывания ДНК.

Показано, что роль каталитического нуклеофила в случае *DenV* выполняет  $\alpha$ -аминогруппа N-концевого остатка Thr [141, 142], а в случае *Fpg* и *Nei* — N-концевого остатка Pro [138, 139], которые образуются после отщепления N-концевого остатка формилметионина. В суперсемействе *Nth* такую роль играет  $\epsilon$ -аминогруппа остатка Lys, например Lys120 в *Nth E. coli* или Lys249 в OGG1 человека [140, 143].



протонирование замещаемого основания может облегчать его уход. Описанный механизм реализуется по крайней мере в случае Ung/UNG [148-151]. Значения кинетического изотопного эффекта по атомам Н и С в положениях 1' и 2' дезоксирибозного цикла согласуются со механизмом  $D_N^*A_N$ , в котором сначала связь C1'-N1 разрывается практически полностью, а затем оксокарбениевый ион атакуется молекулой воды. Несмотря на то, что экспериментально полученные значения изотопного эффекта несколько отличались от расчетных, в пользу механизма  $D_N^*A_N$  также свидетельствовали результаты квантовомеханического компьютерного моделирования [152]. Примечательно, что оксокарбениевое переходное состояние стабилизировалось отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК и анионом урацилата гораздо в большей степени, чем остатками активного центра фермента, как можно было ожидать [148, 152].

На сегодняшний день детальные исследования кинетического изотопного эффекта применительно к ДНК-гликозилазам ограничены рассмотрением Ung/UNG. Поэтому единого мнения относительно того, протекает ли катализ с участием других ДНК-гликозилаз, в особенности бифункциональных, с образованием того же типа переходного состояния, не сложилось. В пользу предположения об использовании того же механизма свидетельствует повышенное сродство многих ДНК-гликозилаз к ДНК, содержащей положительно заряженные аналоги AP-сайта или пирролидиновые гомодезоксирибонуклеозиды, которые могут рассматриваться в качестве имитирующих переходное состояние механизма нуклеофильного замещения  $D_N^*A_N$  [153, 154]. Тем не менее, высокоэффективная реакция  $\beta$ -элиминирования AP-субстратов, характерная для бифункциональных ДНК-гликозилаз, неизбежно протекает по механизму нуклеофильного замещения атома O4' аминогруппой фермента, в ходе которого образуется тетраэдрический интермедиат при C1' [155, 156]. Поскольку ДНК-гликозилазы разных групп имеют существенные различия в пространственном строении, вероятность того, что их активные центры будут одновременно оптимизированы для стабилизации двух переходных состояний разной природы, представляется очень малой.

Удалению поврежденного основания неизбежно предшествует стадия его поиска. В условиях огромного избытка неповрежденных нуклеотидов, ДНК-гликозилазы должны использовать эффективную стратегию поиска немногочисленных повреждений для поддержания целостности генома. Изначально была предложена модель, согласно которой, фермент связывается с ДНК неспецифически и диффундирует по ней в поисках сайта узнавания [157-159]. Такая модель получила название коррелированного поиска. Согласно теоретическому анализу коррелированный поиск может позволить резко увеличить скорость нахождения заданного элемента ДНК [157]. Одномерная диффузия, реализуемая в такой

модели, подразумевает отсутствие затрат энергии, а сдвиг молекулы белка, взаимодействующей с цепью ДНК, происходит в случайном направлении. При этом перемещение фермента может осуществляться как посредством «скольжения», когда не происходит диссоциации ДНК-белкового комплекса, так и «перепрыгивания», то есть частичного или полного разрыва связей белка с ДНК и немедленного связывания в непосредственной близости от предыдущего положения. Исторически первой ДНК-гликозилазой, для которой была показана процессивность расщепления поврежденной ДНК, стала DenV [160, 161]. Позднее коррелированный поиск повреждений был предложен и для других ДНК-гликозилаз [162-164], а также AP-эндонуклеаз [165, 166]. Несмотря на значительное увеличение скорости поиска при одномерной диффузии, этот механизм достаточно быстро становится невыгодным с ростом длины ДНК. Альтернативой может служить некоррелированный поиск, при котором происходит диффузия в трех измерениях, сопряженная с многократными актами связывания фермента с ДНК и последующей диссоциацией [157]. В условиях высокой эффективной концентрации ДНК в клетке, оптимальной стратегией поиска повреждений представляется сочетание трехмерной диффузии и коррелированного одномерного поиска.

Обнаружение поврежденного нуклеотида ДНК-гликозилазой порождает ряд структурных изменений как в ферменте, так и в ДНК-субстрате. В силу различий в аминокислотной последовательности и структурной организации ДНК-гликозилаз физические характеристики этих изменений могут существенно отличаться, даже в случае ферментов с перекрывающимися субстратными специфичностями. Тем не менее, несложно выделить стадии процессинга поврежденной ДНК, которые предшествуют образованию михаэлисовского комплекса, характерные для всех ферментов этого класса. Так, ДНК-гликозилазы для приведения структуры специфичной ДНК в каталитически компетентное состояние вносят излом в молекулу ДНК-субстрата в месте поврежденного звена и выворачивают его, фактически осуществляя локальное плавление дуплекса [124] (таблица 2, рисунок 11). Подобный излом характерен для всех без исключения гликозилаз, структура которых определена в комплексе с ДНК, хотя угол излома может варьировать в зависимости от фермента и природы комплекса [167-180] (таблица 2). В момент деформации остов ДНК жестко фиксирован в активном центре фермента за счет множественных взаимодействий с фосфатными группами вблизи повреждения. Количество и пространственная ориентация связей с остатками фосфорной кислоты могут варьироваться в зависимости от фермента, чаще всего взаимодействия имеют протяженность от 2 до 3 нуклеотидов по обе стороны от повреждения и иногда распространяются на неповрежденную цепь (таблица 2). В каждом случае акцептором водородной связи выступает атом кислорода, не участвующий в образовании фосфодиэфирной

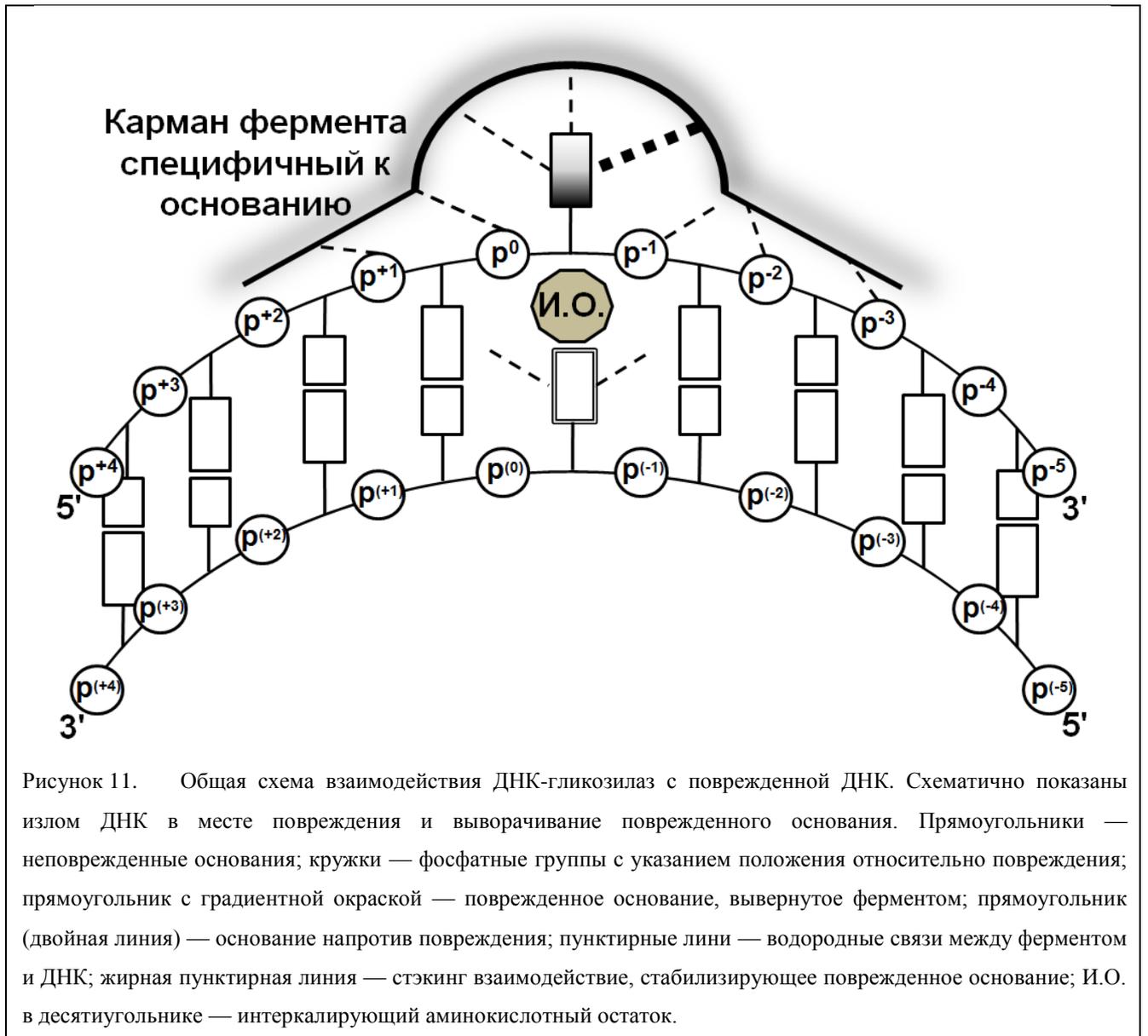
связи цепочки ДНК («немостиковый») [124]. Наиболее вероятная функциональная роль такой сети водородных связей заключается в облегчении излома спирали ДНК, приводящего к дестабилизации комплементарных и стэкинг-взаимодействий, способствуя выворачиванию основания из стопки. В этом смысле ДНК-гликозилаза расходует энергию связывания с субстратом на преобразование конформаций своей структуры и ДНК для дальнейшего катализа. Как уже отмечалось ранее, поврежденные сайты зачастую более гибкие, что, вероятно, снижает кинетический барьер излома ДНК и последующего выворачивания основания. Тем не менее, механизм расходования и перераспределения энергии в системе фермент-ДНК, которую приобретает ДНК-гликозилаза при связывании с субстратом, детально не изучен и остается предметом споров.

Таблица 2. Основные контакты между некоторыми ДНК-гликозилазами и поврежденной ДНК [167, 171, 172, 181, 182]

ДНК-гликозилаза	Контакты с фосфатами поврежденной цепи	Контакты с фосфатами неповрежденной цепи	Контакты с поврежденным нуклеотидом	Контакты с нуклеотидом напротив повреждения	Интеркалирующий остаток	Угол излома ДНК
Ung	0, -1, -2		<u>Ura</u> : F70, N123, H187, остов 63		L191	45°
OGG1	0, -1, -2, -3		<u>8-охоGua</u> : остов 42, C253, P266, D268, Q315, F319	<u>Cyt</u> : N149, R154, Y203, R204	N149	70°
Fpg	0, -1, -2	(0), (+1)		<u>Cyt</u> : R108	R108	75°
AlkA	+1, 0, -1, -2, -3	(0)			L125	60°
AAG	0, -1, -2, -3	(-1), (+2), (+3), (+4),	<u>εAde</u> : Y127, H136, остов 136, Y159, N169		Y162	22°

Каждая ДНК-гликозилаза содержит аминокислотные остатки, ответственные за выворачивание поврежденного звена в специальный карман активного центра, подходящий по форме и позволяющий образовать водородные связи между поврежденным основанием и ферментом (таблица 2, рисунок 11). В некоторых случаях, вывернутое основание может быть дополнительно стабилизировано стэкинг-взаимодействием с ароматическими остатками фермента, например Phe в случае повреждения Ura [183]. Стерическое исключение несоответствующих оснований и прочное связывание в активном центре во многом, но не полностью объясняют субстратную специфичность ДНК-гликозилаз [184-186]. В образовавшуюся при выворачивании поврежденного dN межцепочечную полость, внедряется интеркалирующий аминокислотный остаток (таблица 2, рисунок 11). В зависимости от природы этого остатка интеркаляция может частично восстановить стэкинг-взаимодействия за счет образования обширных ван-дер-ваальсовых контактов с соседними азотистыми

основаниями или дополнительно образовать водородное взаимодействие для стабилизации структуры ДНК. После излома цепочки и выворачивания поврежденного звена внутри дуплекса ДНК остается основание, лишенное комплементарных взаимодействий. Для предотвращения увеличения мобильности этого основания и, как следствие, возможной дестабилизации фермент-субстратного комплекса в ДНК-гликозилазах предусмотрены аминокислотные остатки различной природы, обеспечивающие довольно сильные межплоскостные или водородные взаимодействия (таблица 2, рисунок 11).



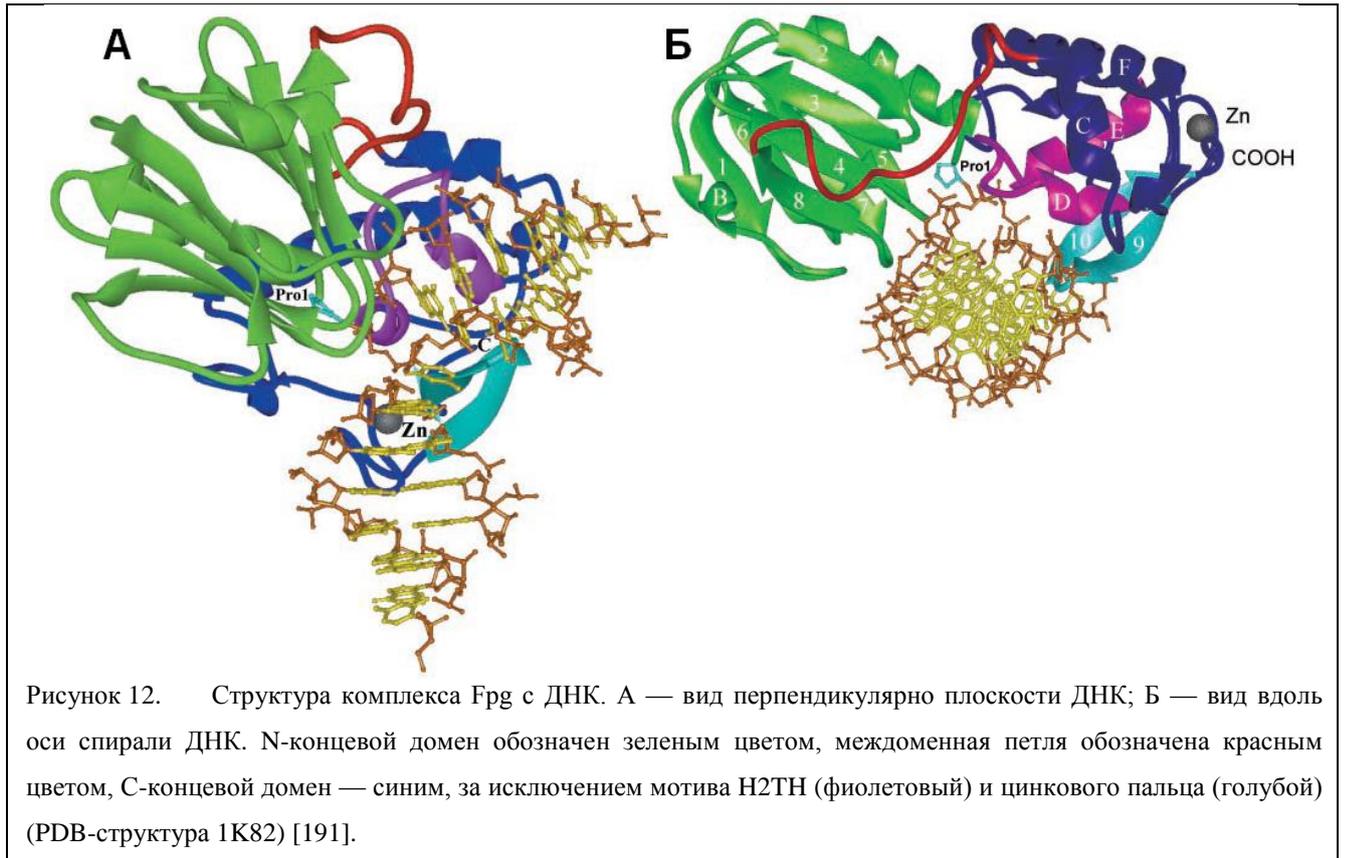
Описание стадий, предшествующих удалению повреждения, неизбежно носит достаточно общий характер, выделяя общие черты механизма, но оставляя многие детали без обсуждения ввиду их индивидуальности для каждой ДНК-гликозилазы. Структурные особенности,

вливающие на узнавание и процессинг поврежденной ДНК, для некоторых 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилаз будут рассмотрены подробнее в следующих разделах.

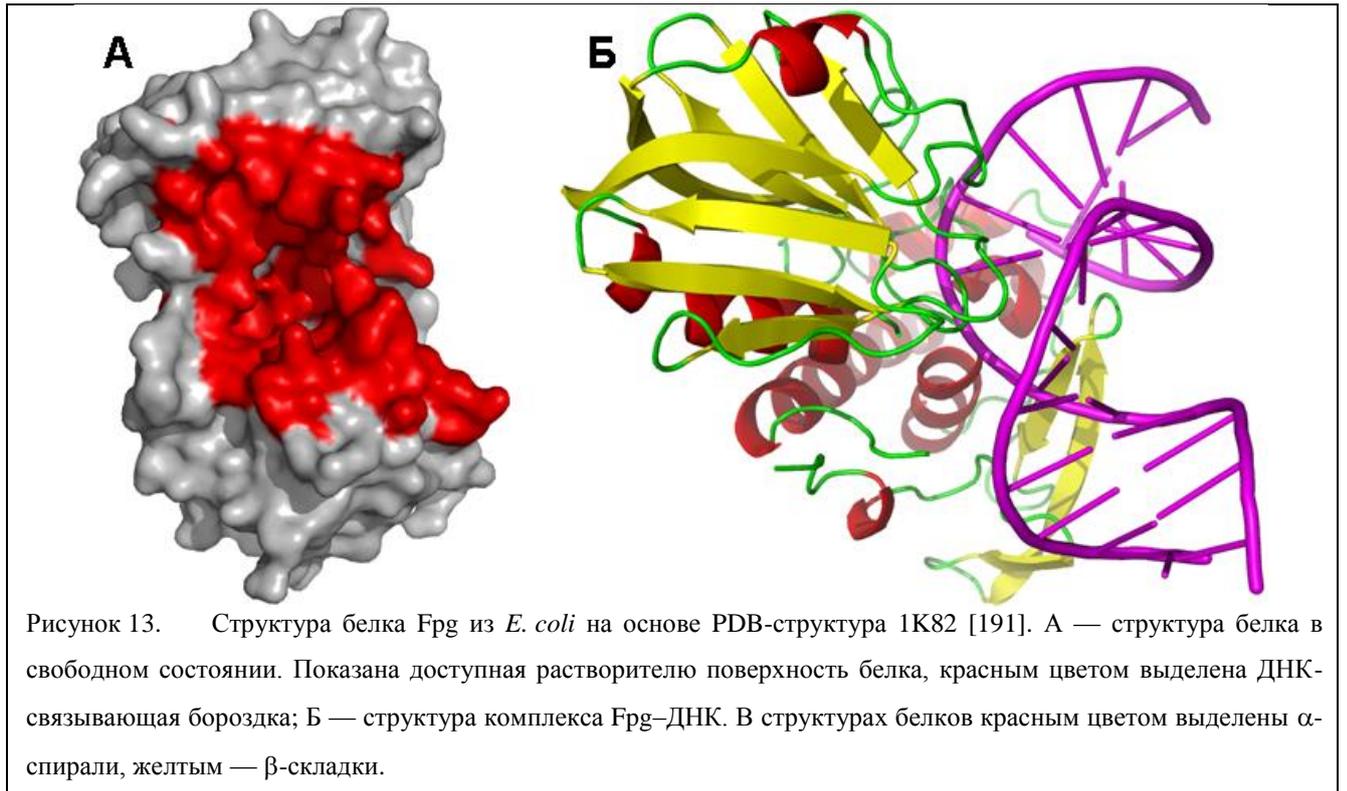
## 2.5. 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилаза прокариот (*Fpg*)

В 1970-х–1980-х гг. при исследовании системы репарации *E. coli* независимыми группами были открыты гены *fpg* и *mutM* [187-189]. В первом случае, как было показано, ген отвечал за синтез ДНК-гликозилазы, выщепляющей из ДНК основание *N*7-метилгуанина с раскрытым имидазольным кольцом [187]. Такая субстратная специфичность определила для фермента название формамидопиримидин-ДНК-*N*-гликозилаза (*Fpg*). Во втором случае ген был определен как отвечающий за селективное снижение частоты трансверсий G→T, а соответствующий фермент был назван *MutM* [189]. Несколько позже, когда было показано, что ДНК-гликозилаза, способная выщеплять повреждения 8-охоGua, соответствует *Fpg* [190], фермент получил еще одно название — 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилаза. Для дальнейшего изложения представляется целесообразным выбрать единое обозначение фермента — *Fpg*, несмотря на то, что наименование *MutM* до сих пор встречается в литературе.

*Fpg E. coli* представляет собой мономерный глобулярный белок длиной 268 аминокислотных остатков и массой 30159 Да [188]. В зрелой форме белка остаток формилметионина отщепляется, образуя активный фермент с остатком Pro на N-конце [188]. По данным рентгеноструктурного анализа в структуре *Fpg* можно выделить два домена, соединенных линкерным шарнирным олигопептидом [191] (рисунок 12). Граница между доменами образует положительно заряженную бороздку, в которой связывается ДНК (рисунок 13). На дне бороздки находится глубокий карман, идеально подходящий для связывания поврежденного основания. N-концевой домен состоит из β-сэндвича, образованного восемью β-складками и двумя α-спиралями, параллельными граням складок. C-концевой домен, соединённый с N-концевым гибким пептидным линкером, представлен четырьмя α-спиралями, две из которых, αD и αE, образуют мотив «спираль–2 поворота–спираль» (H2TH), и двумя β-складками, формирующими цинковый палец типа Cys<sub>4</sub> (Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>16</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys). Мутация по любому из остатков Cys, входящих в состав цинкового пальца, или потеря иона цинка ведут к инактивации фермента из-за утери способности связываться с субстратом [192-194]. Цинковые пальцы характерны для многих ДНК-связывающих белков [195], однако в большинстве случаев этот мотив представлен в белковой молекуле более одного раза.

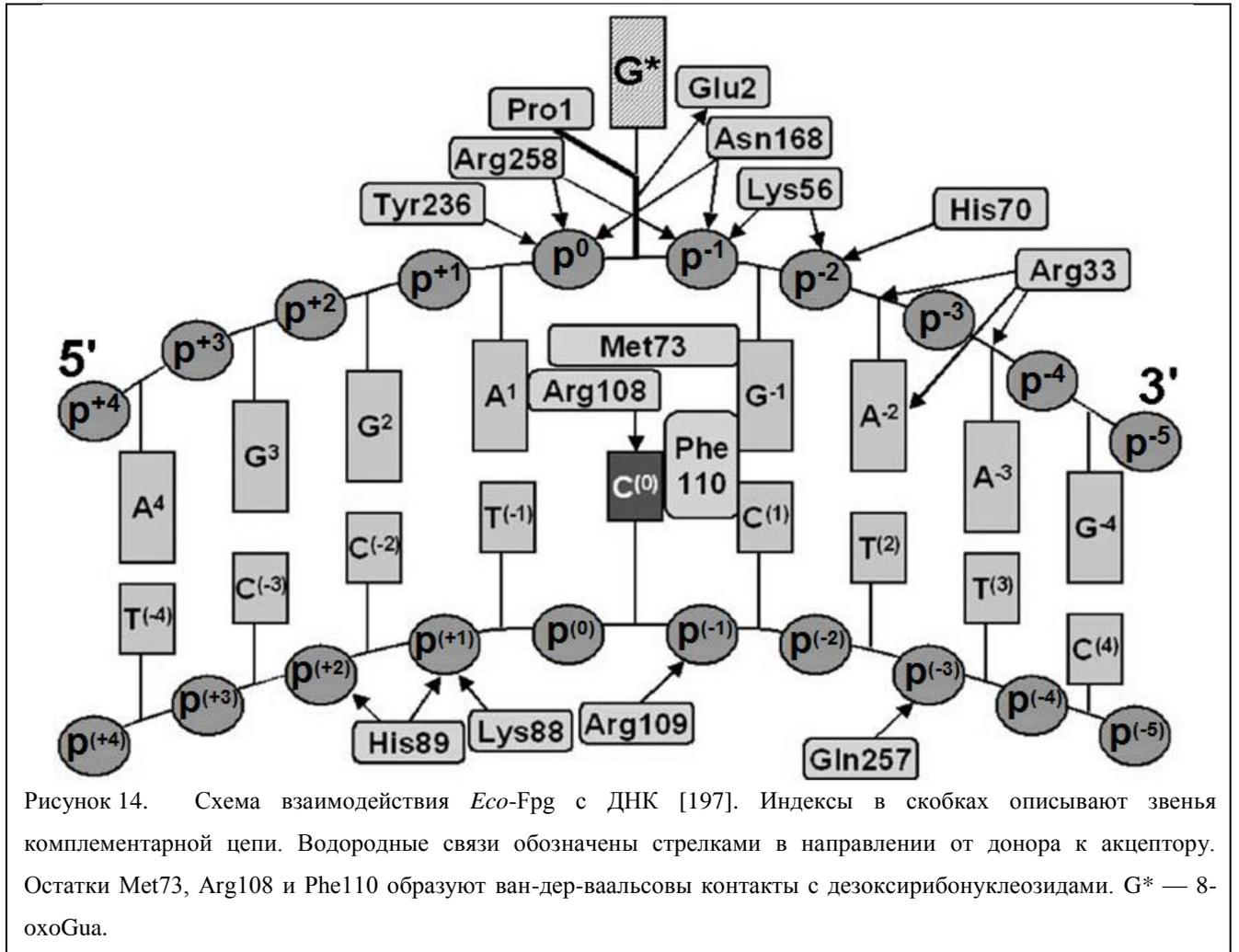


Как и для многих других ДНК-гликозилаз, для Fpg характерен излом цепочки ДНК, способствующий дальнейшему осуществлению катализа. В области повреждения ДНК изломана на  $\sim 60\text{--}75^\circ$ , вследствие чего малая бороздка значительно расширяется (рисунок 12 А). Однако за исключением области, непосредственно примыкающей к месту повреждения, ДНК находится в канонической В-форме. При взаимодействии Fpg с ДНК между ними образуется обширная сеть водородных связей (рисунок 14), в результате чего область контакта достигает площади  $2512 \text{ \AA}^2$ , что существенно больше контактной площади, характерной для большинства других гликозилаз:  $860 \text{ \AA}^2$  для Nei–ДНК [174],  $1034 \text{ \AA}^2$  для MPG–ДНК [169] и  $700 \text{ \AA}^2$  для UNG–ДНК [168]. Примечательно, что, несмотря на существенные структурные различия, сопоставимой контактной площадью обладает комплекс с человеческой 8-оскогуанин-ДНК-гликозилазой OGG1, которая составляет  $2268 \text{ \AA}^2$  [172]. Белок Fpg в основном образует связи с поврежденной цепью ДНК с 3'-стороны относительно повреждения. Аминокислотные остатки Lys56, His70, Asn168, Tyr236, и Arg258 взаимодействуют с фосфатными группами  $p^0$ ,  $p^{-1}$  и  $p^{-2}$  (рисунок 14). Фермент связывается с ДНК в малой бороздке, а поврежденное основание выворачивается из спирали ДНК, вероятно, через большую, после чего удерживается в глубоком гидрофобном кармане. Комплементарная цепь удерживается на месте в основном при помощи уотсон-криковских связей; хотя с ней также взаимодействует ограниченное число аминокислотных остатков белка, но лишь один из них (His89) консервативен.



Остаток Asn168, относящийся к мотиву H2TH, образует связи с участием амидных групп пептидного остова и бокового радикала с фосфатными группами  $p^{-1}$  и  $p^0$  соответственно. Мотив цинкового пальца образует 4 водородных связи с сахарофосфатным остовом ДНК, из которых три приходятся на остаток Arg258 (две связи с  $p^0$ , одна с  $p^{-1}$ ) и одна, с фосфатной группой  $p^{(-3)}$  — на остаток Gln257. Остаток Lys56, расположенный в петле  $\beta 2$ – $\beta 3$ , образует водородные связи с фосфатными группами  $p^{-1}$  и  $p^{-2}$ .

Выворачивание поврежденного звена в случае Frg, вероятно, достигается при помощи жесткой фиксации соседних с ним фосфатных групп связями с остатками Lys56, Asn168 и Arg258 в совокупности с внедрением гидрофобных остатков фермента внутрь двухцепочечной ДНК [149]. Энергия, необходимая для выворачивания одного звена из изогнутой ДНК, оценивается в  $\sim 3$  ккал/моль [196], что может легко компенсироваться за счет энергии нековалентных взаимодействий белка с ДНК. Поскольку контекст повреждения может существенно влиять как на энергию его выворачивания, так и энергию, необходимую для излома цепочки (см. раздел 2.1 и 2.2), эффективность удаления поврежденного основания в зависимости от нуклеотидной последовательности представляет большой интерес.



Выворачивание dN в сочетании с удалением поврежденного основания приводит к образованию полости значительных размеров между комплементарными цепями ДНК. В этой полости располагаются гидрофобные аминокислотные остатки фермента Fpg: Met73, принадлежащий к петле  $\beta 4$ – $\beta 5$ , Arg108 и Phe110, располагающиеся в петле  $\beta 7$ – $\beta 8$  (рисунок 14). Остаток Met73 занимает место вывернутого основания, внедряясь в двойную спираль ДНК со стороны малой бороздки. Бензильная группа остатка Phe110 в свою очередь вклинивается между основаниями Cyt<sup>(1)</sup> и Cyt<sup>(0)</sup> и образует  $\pi$ – $\pi$  взаимодействия [198] с системой пиримидинового кольца Cyt<sup>(1)</sup>. Предполагается, что нарушение стэкинг-взаимодействий между основаниями C<sup>(1)</sup> и C<sup>(0)</sup> вносит существенный вклад в возникновение излома в ДНК. Неповрежденное звено C<sup>(0)</sup> остается в составе спирали, где стабилизируется водородными связями с остатком Arg108. Эти взаимодействия частично объясняют специфичность фермента Fpg по отношению к основанию Cyt напротив поврежденного звена ДНК.

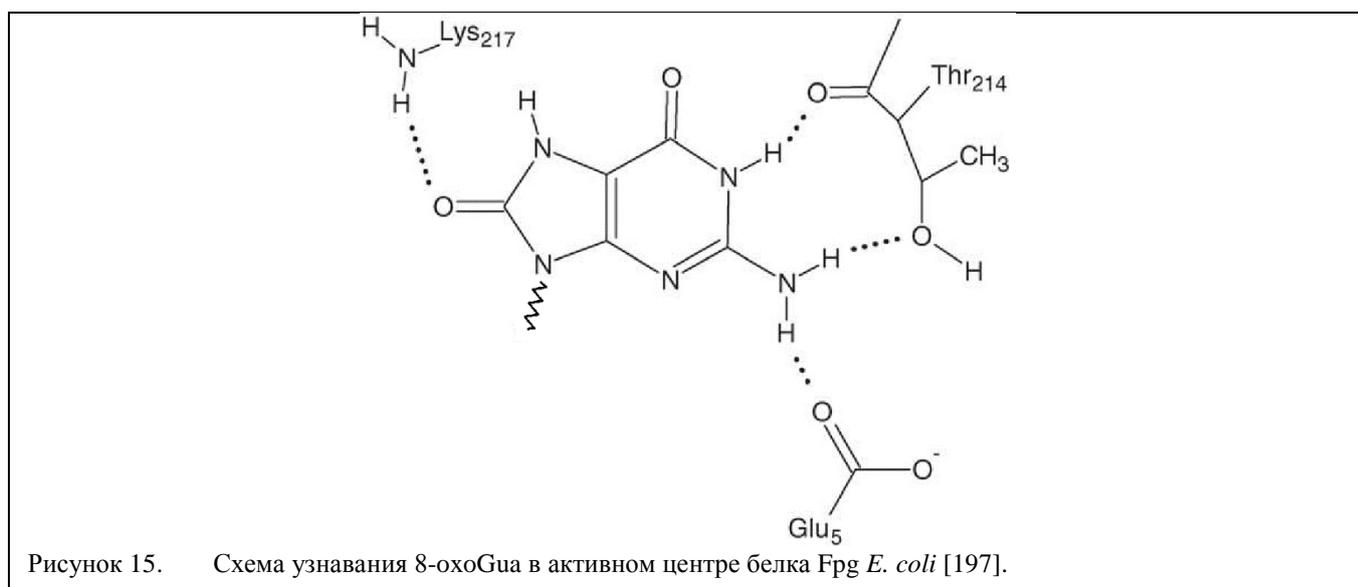
Исследования кристаллических структур комплекса Fpg–ДНК выявили, что С1' рибозного фрагмента, образовавшегося после удаления поврежденного основания и

вывернутого из двойной спирали, ковалентно связан с атомом N $\alpha$  остатка Pro1, свидетельствуя о том, что Pro1 вовлечен в образование основания Шиффа [138, 199]. Конформация остатка рибозы дополнительно стабилизирована взаимодействиями с остатком Glu2, образующим водородную связь с атомом O4' сахара. Остаток Glu2 в свою очередь стабилизирован водородными связями с амидными группами пептидного остова спирали  $\alpha$ E мотива H2TH. Функциональная роль Glu2 заключается в протонировании положения O4' поврежденного звена во время удаления основания [200]. Об это свидетельствует исчезновение гликозилазной активности, но сохранении AP-лиазной, при замене E2Q в ферменте Fpg [201]. Аналогичное поведение Fpg наблюдалось и в случае замен E173Q, E5Q, E131Q [201]. Также разное влияние на ферментативную активность Fpg по отношению к поврежденным основаниям и AP-сайтам оказывают замены остатков Lys56 [202] и Lys155 [203]. Как правило, активность различных мутантных форм Fpg по отношению к 8-охоGua снижается довольно сильно, в то время как к другим субстратам падение активности гораздо меньше.

Белок Fpg специфичен по отношению к повреждениям в двухцепочечной ДНК, при этом одноцепочечные субстраты расщепляются с гораздо меньшей эффективностью [204]. Помимо изначально обнаруженного удаления mFary-Gua, фермент способен удалять из высокомолекулярной ДНК 8-охоGua, Fary-Gua и Fary-Ade [190, 205]. Из ОДН-субстратов Fpg выщепляет достаточно большое количество поврежденных оснований как пуринового, так и пиримидинового ряда. К ним относятся синтетические аналоги 8-охоGua 8-оксогипоксантин и 8-оксопурин [203, 206], продукты дальнейшего окисления 8-охоGua оксазолон и оксалуровую кислоту [207], окисленные производные  $\epsilon$ Ade [208], продукты раскрытия имидазольного кольца Gua [206, 209, 210], ряд окисленных пиримидинов, включая 5-ОН-Cyt [211], Ura(OH)<sub>2</sub> [212], Thy(OH)<sub>2</sub> [212, 213] и др. Стоит отметить, что биологическая значимость таких активностей не ясна, поскольку перечисленные окисленные пиримидиновые основания не выщепляются ферментом из высокомолекулярной ДНК. Таким образом, упомянутые поврежденные основания, за исключением 8-охоGua, Fary-Gua и Fary-Ade, в настоящее время принято считать неспецифичными субстратами, вероятно, не использующимися Fpg *in vivo*.

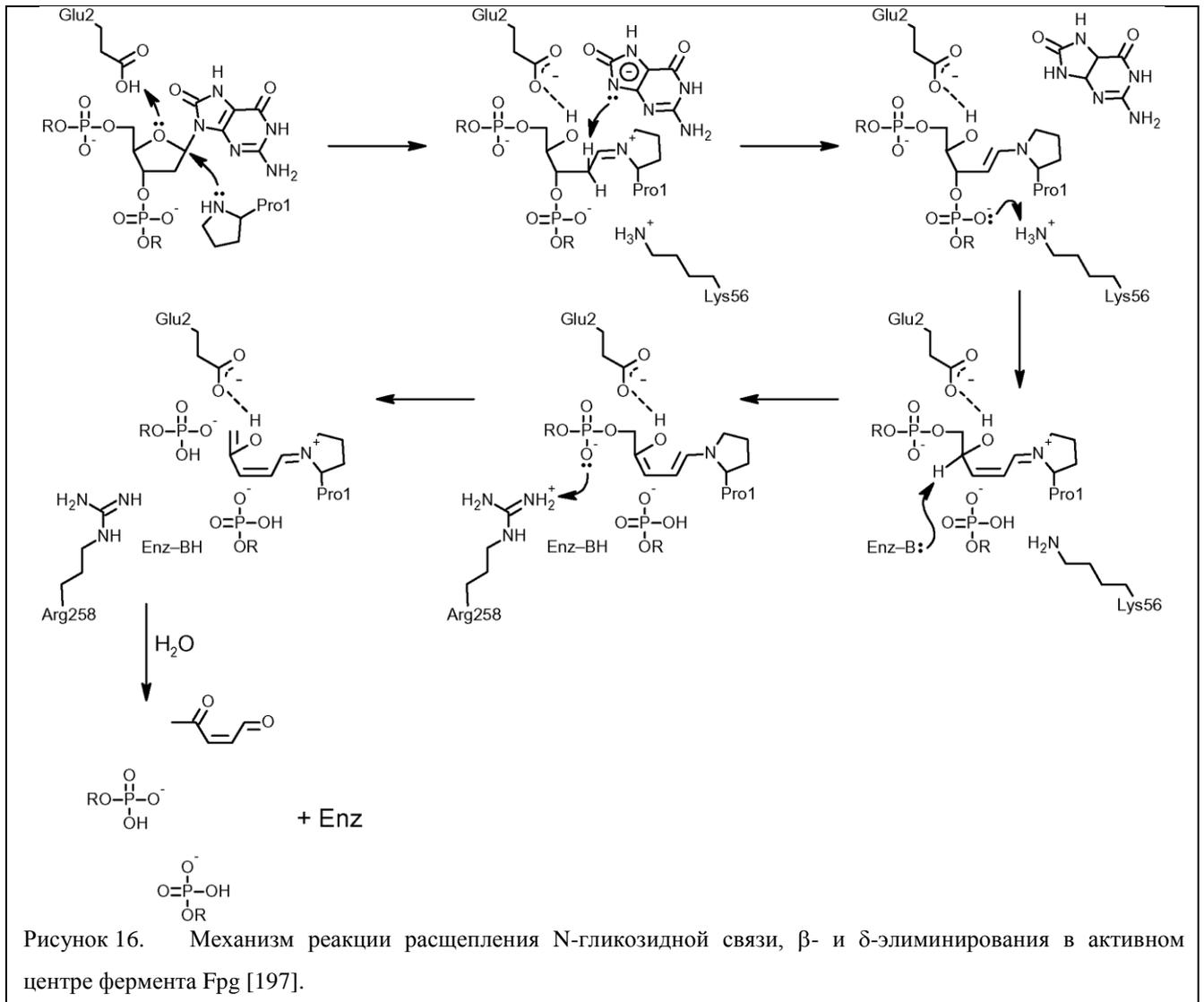
Ввиду особой биологической значимости 8-охоGua (см. разд. 2.2) активность Fpg по отношению к субстратам, содержащим это повреждение, представляет особый интерес. В отсутствие фермента Fpg штаммы *E. coli* не способны удалять такие основания, как 8-охоGua и mFary-Gua из ДНК [214, 215]. На основании кинетических параметров удаления 8-охоGua и его аналогов белком Fpg [206] предполагается, что карбонильная группа при атоме C8 или пиррольный характер атома N7 — необходимые условия для узнавания поврежденного основания, в то время как для проявления ДНК-гликозилазной активности необходимо наличие

карбонильной группы при атоме С6. Однако способность узнавать и катализировать удаление Fapy-Ade и окисленных пиримидиновых оснований достаточно трудно объяснить в рамках данного предположения. В комплексе Fpg–ДНК 8-охоGua связывается в активном центре в *син*-конформации и стабилизируется образовавшимися водородными взаимодействиями (рисунок 15). Установлено, что остатки Pro1, Glu2, Glu5, Ile169, Tyr170, Thr214, Thr215 и Leu216 образуют глубокий карман, по своей пространственной организации подходящий для связывания вывернутого из ДНК поврежденного основания. Боковой радикал остатка Lys217 закрывает карман и изолирует основание 8-охоGua от растворителя. При этом  $\epsilon$ -аминогруппа остатка Lys217 оказывается достаточно близко от атомов N7 и O<sup>8</sup> основания 8-охоGua, способствуя дискриминации поврежденного основания [197]. Аминокислотные остатки Glu5, Ile169 и Tyr170 также входят в структуру предполагаемого кармана связывания 8-охоGua и таким образом могут участвовать в узнавании этого поврежденного основания.



Как упоминалось ранее, Fpg относится к группе бифункциональных ДНК-гликозилаз, а значит, помимо гликозилазной активности, обладает ассоциированной AP-лиазной активностью [216, 217]. Также фермент способен выступать в роли dRP-лиазы [218]. Он эффективно расщепляет поврежденную цепь по механизму как  $\beta$ -, так и  $\delta$ -элиминирования, оставляя однонуклеозидную брешь, содержащую на границах две фосфатные группы [219] (рисунок 16). Предполагается, что последовательные реакции, катализируемые белком Fpg, протекают без распада фермента-субстратного комплекса, об этом свидетельствует отсутствие ферментативной активности по отношению к отдельно добавленным продуктам  $\beta$ -элиминирования [129]. В результате последовательных превращений остаток углеводного

фрагмента поврежденного звена высвобождается в виде *транс*-4-оксопент-2-еняля фермента [130] (рисунок 16).



При обработке  $\text{NaBH}_4$  или  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  комплекса Fpg с субстратом происходит образование стабильного конъюгата [137, 199]. Анализ продуктов трипсинолиза (рисунок 10) данного комплекса позволил установить, что процесс удаления основания ферментом Fpg протекает с образованием основания Шиффа между  $\alpha$ -аминогруппой остатка Pro1 и атомом C1' поврежденного нуклеотида [138]. Замена остатка Pro1 на другие аминокислотные остатки приводит к значительному снижению активности или полной инактивации Fpg в зависимости от типов повреждения и введенного остатка [199, 202]. Среди всех членов семейства Fpg демонстрирует наибольшую активность в реакции δ-элиминирования, возможно, благодаря образуемому основанию Шиффа пирролидиновой природы, несущему постоянный положительный заряд на атоме азота.

Субстратная специфичность белка Fpg в значительной степени определяется основанием напротив поврежденного звена. Так, эффективность удаления поврежденного основания из пары 8-охоGua:Cyt на несколько порядков выше, чем из пары 8-охоGua:Ade [190, 206]. С еще меньшей эффективностью 8-охоGua удаляется из пар с Thy и Gua [206]. Большой интерес представляет эффективность удаления повреждения в зависимости от нуклеотидного контекста. Учитывая, что механизм действия Fpg, включает в себя стадию выворачивания поврежденного основания из спирали ДНК [191], нуклеотидное окружение может влиять на протекание ферментативной реакции, поскольку в зависимости от соседних нуклеотидов может меняться, например, суммарная энергия стэкинга. На сегодняшний день в пользу данного предположения свидетельствует значение константы специфичности для последовательности 5'...CCXCC...-3', которое в 33 раза больше, чем для 5'...TGXAT...-3' (X = 8-охоGua) [220].

При наличии подгрупп ферментов с разной субстратной специфичностью в пределах одного структурного семейства важную роль в определении специфичности обычно играют мотивы или структурные элементы, характерные только для одной из подгрупп. Так, репарация окисленных оснований в ДНК *E. coli* осуществляется двумя ферментами, формамидопиримидин-ДНК-гликозилазой (Fpg) и эндонуклеазой VIII (Nei), принадлежащими к одному структурному семейству Fpg/Nei. У ряда актинобактерий (*Mycobacterium tuberculosis* и др.) в геноме обнаружено несколько гомологов этих ферментов, свойства которых до недавнего времени оставались не охарактеризованными [221, 222]. Во многом это объясняется невозможностью использования непатогенных штаммов *E. coli* для экспрессии многих генов *M. tuberculosis*, поскольку их состав характеризуется высоким содержанием G/C нуклеотидов. При таком составе предпочтительные по составу кодоны сменяются более редкими кодонами для *E. coli*, что может служить одной из причин слабой экспрессии актинобактериальных генов даже в присутствии сильных промоторов [223, 224]. Тем не менее, используя векторную систему pET, широко применяемую для экспрессии генов в штаммах *E. coli*, удалось выделить в рекомбинантном виде один из гомологов белка Nei из *M. tuberculosis* (Mtu-Nei2 или MtuNei1 в работе [225]) и установить, что он проявлял высокую активность по отношению к двухцепочечным ДНК-субстратам, содержащим остатки дигидроурацила и AP-сайты, а также был способен с меньшей эффективностью расщеплять субстраты, содержащие остатки 8-охоGua и Ura [226]. Для выделения в рекомбинантном виде других гомологов Mtu-Nei1 (MtuNei2), Mtu-Fpg1 и Mtu-Fpg2 потребовалось конструирование бицистронного вектора на основе системы pET, позволяющего достигать высокого уровня экспрессии микобактериальных генов в штамме *E. coli* [227]. Активность Mtu-Nei1 (MtuNei2) не установлена *in vitro*, однако экспрессия этого белка, снижает частоту спонтанных мутаций в гене устойчивости к

рифампицину в *E. coli* дикого типа, тройном мутанте *fpg/mutY/nei* и двойном мутанте *nei/nth*, свидетельствуя о функциональной активности *in vivo* в отношении продуктов окисления цитозина и гуанина [225]. Mtu-Fpg1 обладает схожей субстратной специфичностью с Fpg *E. coli*, отличаясь при этом большей чувствительностью к основанию напротив повреждения, в то время как ферментативная и ДНК-связывающая активность Mtu-Fpg2 не обнаружена [225].

Mtu-Nei1	<b>MPE</b> GDVWHTAATLRRHLA <b>GR</b> TLTRCDIR-----VPRFAAVDLTGEVVD <b>EV</b> ISRG 49
Mtu-Nei2	<b>MPE</b> GHTLHRLARLHQ <b>RR</b> FAGAPVSVSS <b>PQ</b> G-----RFADSASALNGRVLRRASAWG 50
Mtu-Fpg1	<b>MPE</b> LPEVEVVRRGLQAHVTG <b>RT</b> ITTEVVRVHHPRAVRRHDAGPADLTARLGRAR <b>ING</b> TDRRG 59
Eco-Fpg	<b>MPE</b> LPEVETSRRGIEPHLVGATILHAVVRN---GRLRWPVSEET <b>Y</b> RLSDQPVL <b>SQ</b> RRRA 55
Mtu-Fpg2	-----
Eco-Nei	<b>MPE</b> GPEIRRAADNLEAAIKG <b>KPL</b> TDVWF <b>AF</b> P-----QLKPYQ <b>SQ</b> LIGQH <b>VTH</b> VE <b>TR</b> G 51
	<b>**+++ (I)</b>
Mtu-Nei1	<b>KHL</b> FIR-TGTAS-----I <b>HS</b> L <b>Q</b> MDG <b>S</b> WRVGN <b>R</b> PV <b>R</b> VDHRARI <b>I</b> LEAN <b>Q</b> Q <b>E</b> AIRV <b>V</b> G 101
Mtu-Nei2	<b>KHL</b> FHHYVGGPV-----V <b>H</b> VHL <b>GL</b> YGT <b>F</b> TEWAR <b>P</b> TDG-----W <b>L</b> PE <b>P</b> AGQ <b>V</b> RM <b>R</b> MG 97
Mtu-Fpg1	<b>KYL</b> WLTLNTAGVHRPTD <b>TAL</b> VVHL <b>GM</b> SG--Q <b>ML</b> L <b>G</b> AV <b>PC</b> AA <b>H</b> VR <b>I</b> S <b>ALL</b> DD <b>GT</b> V <b>LS</b> FAD <b>Q</b> 117
Eco-Fpg	<b>KYL</b> LELE <b>PE</b> G-----W <b>I</b> I <b>HL</b> GM <b>S</b> GLR <b>IL</b> PE <b>EL</b> PE <b>K</b> HD <b>H</b> VD <b>LV</b> MS <b>NG</b> KV <b>LR</b> Y <b>T</b> DP 107
Mtu-Fpg2	-----MAG <b>TP</b> Q <b>P</b> 7
Eco-Nei	<b>KAL</b> L <b>T</b> H <b>F</b> SND <b>L</b> T-----LY <b>SH</b> N <b>Q</b> LY <b>G</b> VRV <b>V</b> DT <b>GE</b> EP <b>Q</b> T <b>TR</b> VL <b>RV</b> K <b>L</b> Q <b>T</b> AD <b>K</b> T <b>IL</b> LY <b>S</b> 104
	<b>*</b> <b>+++ (II)</b>
Mtu-Nei1	<b>V</b> D <b>L</b> G-----L <b>L</b> EV <b>I</b> DR <b>H</b> N--D <b>G</b> AV <b>V</b> A <b>H</b> L <b>G</b> P <b>DL</b> L <b>AD</b> D <b>W</b> P <b>Q</b> RA <b>AN</b> L <b>I</b> V <b>A</b> --P <b>D</b> R <b>P</b> I <b>A</b> E 150
Mtu-Nei2	<b>A</b> E <b>G</b> T <b>D</b> LR <b>G</b> PT <b>V</b> C <b>E</b> S <b>I</b> D <b>D</b> G <b>E</b> --V <b>A</b> D <b>V</b> VAR <b>L</b> G <b>P</b> DL <b>R</b> SD <b>AN</b> PS--S <b>A</b> W <b>S</b> R <b>I</b> T <b>K</b> --S <b>R</b> R <b>P</b> I <b>G</b> A 152
Mtu-Fpg1	<b>R</b> T <b>L</b> G---G <b>W</b> LL <b>AD</b> L <b>V</b> T <b>VD</b> GS <b>V</b> VP <b>V</b> A <b>H</b> L <b>AR</b> D <b>PL</b> D <b>PR</b> F <b>DC</b> D--A <b>V</b> V <b>K</b> V <b>L</b> R <b>R</b> -- <b>K</b> H <b>S</b> E <b>L</b> <b>R</b> 170
Eco-Fpg	<b>R</b> R <b>L</b> G---A <b>W</b> L <b>W</b> T <b>K</b> E <b>L</b> E <b>G</b> H <b>N</b> -----V <b>L</b> T <b>H</b> L <b>G</b> PE <b>PL</b> S <b>DD</b> F <b>NG</b> E--Y <b>L</b> H <b>Q</b> K <b>CA</b> K-- <b>K</b> K <b>T</b> A <b>I</b> <b>K</b> <b>P</b> 155
Mtu-Fpg2	<b>R</b> A <b>L</b> G---A <b>G</b> LL <b>AG</b> --N <b>T</b> G <b>R</b> I <b>K</b> <b>T</b> 35
Eco-Nei	<b>A</b> S <b>D</b> I-----E <b>M</b> L <b>T</b> PE <b>Q</b> L <b>T</b> H <b>P</b> FL <b>Q</b> R <b>V</b> GP <b>D</b> V <b>LD</b> P <b>N</b> L <b>T</b> PE <b>V</b> K <b>E</b> R <b>LL</b> S <b>PR</b> FR <b>N</b> R <b>Q</b> F <b>A</b> G 155
	<b>+ + (II)</b> <b>+ (III)</b>
Mtu-Nei1	<b>A</b> LL <b>D</b> Q <b>R</b> V <b>L</b> AG <b>I</b> GN <b>V</b> Y <b>C</b> N <b>E</b> L <b>C</b> F <b>V</b> SG <b>V</b> L <b>P</b> T <b>A</b> P <b>V</b> S <b>A</b> V <b>A</b> D <b>P</b> -----R <b>R</b> L <b>V</b> T <b>R</b> A <b>R</b> D-- <b>M</b> L 198
Mtu-Nei2	<b>L</b> LD <b>Q</b> T <b>V</b> I <b>A</b> GV <b>G</b> N <b>V</b> Y <b>R</b> N <b>E</b> LL <b>F</b> R <b>H</b> R <b>I</b> D <b>P</b> Q <b>R</b> P <b>G</b> R <b>G</b> I <b>G</b> E <b>P</b> E <b>F</b> DA <b>A</b> W <b>N</b> D <b>L</b> V <b>S</b> L <b>M</b> K <b>V</b> G <b>L</b> R <b>R</b> G-- <b>K</b> I 211
Mtu-Fpg1	<b>Q</b> LL <b>D</b> Q <b>R</b> V <b>V</b> SG <b>I</b> GN <b>I</b> Y <b>A</b> E <b>A</b> L <b>W</b> R <b>A</b> K <b>V</b> NG <b>A</b> H <b>V</b> A <b>A</b> T <b>L</b> R <b>C</b> R <b>R</b> L <b>G</b> A <b>V</b> L <b>H</b> A <b>A</b> A <b>D</b> V <b>M</b> R <b>E</b> A <b>L</b> A <b>K</b> G <b>G</b> T <b>S</b> 230
Eco-Fpg	<b>W</b> LD <b>N</b> K <b>L</b> V <b>V</b> GV <b>G</b> N <b>I</b> Y <b>A</b> S <b>E</b> S <b>L</b> F <b>A</b> AG <b>I</b> H <b>P</b> D <b>R</b> L <b>A</b> S <b>S</b> L <b>S</b> L <b>A</b> E <b>C</b> E <b>L</b> L <b>A</b> R <b>V</b> I <b>K</b> A <b>V</b> L <b>L</b> R <b>S</b> I <b>E</b> Q <b>G</b> G <b>T</b> T 215
Mtu-Fpg2	<b>V</b> I <b>T</b> D <b>Q</b> K <b>V</b> I <b>A</b> G <b>I</b> GN <b>A</b> Y <b>S</b> D <b>E</b> I <b>L</b> H <b>V</b> A <b>K</b> I <b>S</b> P <b>F</b> A <b>T</b> AG <b>K</b> L <b>S</b> G <b>A</b> Q <b>L</b> T <b>C</b> L <b>H</b> E <b>A</b> M <b>A</b> S <b>V</b> L <b>S</b> D <b>A</b> V <b>R</b> R <b>S</b> V <b>G</b> Q 95
Eco-Nei	<b>L</b> LL <b>D</b> Q <b>A</b> FL <b>A</b> GL <b>G</b> N <b>L</b> Y <b>R</b> V <b>E</b> I <b>L</b> W <b>Q</b> V <b>L</b> T <b>G</b> N <b>H</b> K <b>A</b> K <b>D</b> L <b>N</b> A <b>A</b> Q <b>L</b> D <b>A</b> L <b>A</b> H <b>A</b> L <b>L</b> E <b>I</b> P <b>R</b> F <b>S</b> Y <b>A</b> T <b>R</b> G <b>V</b> 215
	<b>*****+ (IV)</b>
Mtu-Nei1	<b>W</b> V <b>N</b> R <b>F</b> R <b>W</b> N <b>R</b> C <b>T</b> T <b>G</b> D <b>T</b> R <b>A</b> G <b>R</b> RL <b>W</b> V <b>Y</b> G <b>R</b> A <b>G</b> Q <b>G</b> <b>C</b> R <b>R</b> <b>C</b> <b>G</b> T <b>L</b> I <b>A</b> Y <b>D</b> T <b>T</b> D <b>E</b> R <b>V</b> R <b>Y</b> W <b>P</b> A <b>C</b> <b>O</b> R---- 254
Mtu-Nei2	<b>I</b> V <b>R</b> PE <b>H</b> D <b>H</b> GL <b>P</b> S <b>Y</b> L <b>P</b> D <b>R</b> P <b>R</b> T <b>Y</b> V <b>Y</b> R <b>R</b> A <b>G</b> E <b>F</b> <b>C</b> R <b>V</b> <b>C</b> G <b>G</b> V <b>I</b> R <b>T</b> A <b>L</b> L <b>E</b> G <b>R</b> N <b>V</b> F <b>W</b> C <b>P</b> V <b>C</b> O <b>T</b> ---- 267
Mtu-Fpg1	<b>F</b> D <b>S</b> L <b>Y</b> V <b>N</b> V <b>NG</b> E <b>S</b> G <b>Y</b> F <b>E</b> R--S <b>L</b> D <b>A</b> Y <b>G</b> R <b>E</b> G <b>E</b> N <b>C</b> R <b>R</b> <b>C</b> G <b>A</b> V <b>I</b> R <b>R</b> E <b>R</b> F <b>M</b> N <b>R</b> S <b>S</b> F <b>Y</b> C <b>P</b> R <b>C</b> O <b>P</b> R <b>P</b> R <b>K</b> 288
Eco-Fpg	<b>L</b> K <b>D</b> FL <b>Q</b> -S <b>D</b> G <b>K</b> P <b>G</b> Y <b>F</b> A <b>Q</b> --E <b>L</b> Q <b>V</b> Y <b>G</b> R <b>K</b> G <b>E</b> F <b>C</b> R <b>V</b> <b>C</b> G <b>T</b> P <b>I</b> V <b>A</b> T <b>K</b> H <b>A</b> Q <b>R</b> A <b>T</b> F <b>Y</b> C <b>R</b> O <b>C</b> O <b>K</b> ---- 268
Mtu-Fpg2	<b>G</b> A <b>M</b> L <b>K</b> G <b>E</b> K <b>R</b> S-----G <b>L</b> R <b>V</b> H <b>A</b> R <b>T</b> G <b>L</b> F <b>C</b> P <b>V</b> <b>C</b> G <b>D</b> T <b>V</b> R <b>E</b> V <b>S</b> F <b>A</b> D <b>K</b> S <b>F</b> Q <b>Y</b> C <b>P</b> T <b>C</b> O <b>T</b> G <b>G</b> K <b>A</b> 146
Eco-Nei	<b>D</b> E <b>N</b> K <b>H</b> H <b>G</b> A <b>L</b> F <b>R</b> -----F <b>K</b> V <b>F</b> H <b>R</b> D <b>G</b> E <b>F</b> <b>C</b> E <b>R</b> <b>C</b> G <b>S</b> I <b>E</b> K <b>T</b> T <b>L</b> S <b>R</b> P <b>F</b> Y <b>W</b> C <b>P</b> G <b>C</b> O <b>H</b> ---- 262
	<b>*****</b>
Mtu-Nei1	-----
Mtu-Nei2	-----
Mtu-Fpg1	-----
Eco-Fpg	-----
Mtu-Fpg2	L <b>A</b> D <b>R</b> R <b>M</b> S <b>R</b> L <b>L</b> K 158
Eco-Nei	-----

Рисунок 17. Выравнивание последовательностей белков групп Fpg и Nei из *E. coli* и их гомологов из *M. Tuberculosis* [226]. Черным цветом и звездочками выделены остатки, высококонсервативные во всех белках Fpg и Nei и принимающие участие в катализе или связывании ДНК. Первый из протяженных блоков гомологии (Leu-157–Tyr-170 по нумерации *Eco*-Fpg) соответствует центральной части мотива «спираль–два поворота–спираль», второй (Cys-243–Gln-267 по нумерации *Eco*-Fpg) — мотиву цинкового пальца. Знаками + выделены остатки специфических элементов Fpg или Nei: I — участок N-концевой спирали, примыкающий к каталитическому дипептиду Pro-Glu, II — интеркалирующие остатки, III и IV — специфические остатки, ответственные за правильную ориентацию цинкового пальца. Остатки, специфические для Fpg, обозначены белыми буквами на темно-сером фоне, а специфические для Nei — черными буквами на светло-сером фоне. При нумерации остатков не учитывается иницирующий остаток Met, который в зрелой форме белка отщепляется.

На основании данных выравнивания последовательностей белков групп Fpg и Nei из *E. coli* и их гомологов из *M. tuberculosis* белок Mtu-Fpg2 с молекулярной массой 16 кДа представляет собой интактный С-концевой домен полноразмерного белка Fpg (рисунок 17). Функциональная значимость такого гомолога не установлена. Однако изучение его роли, возможно, дало бы понимание некоторых процессов, предшествующих образованию комплекса Fpg-ДНК. Например, ничего не известно об очередности образования связей структурными доменами фермента Fpg с ДНК при первичном взаимодействии, то есть о симметрии взаимодействия доменов. В результате появляется необходимость исследования вклада отдельных структурных доменов Fpg в специфическое фермент-субстратное взаимодействие.

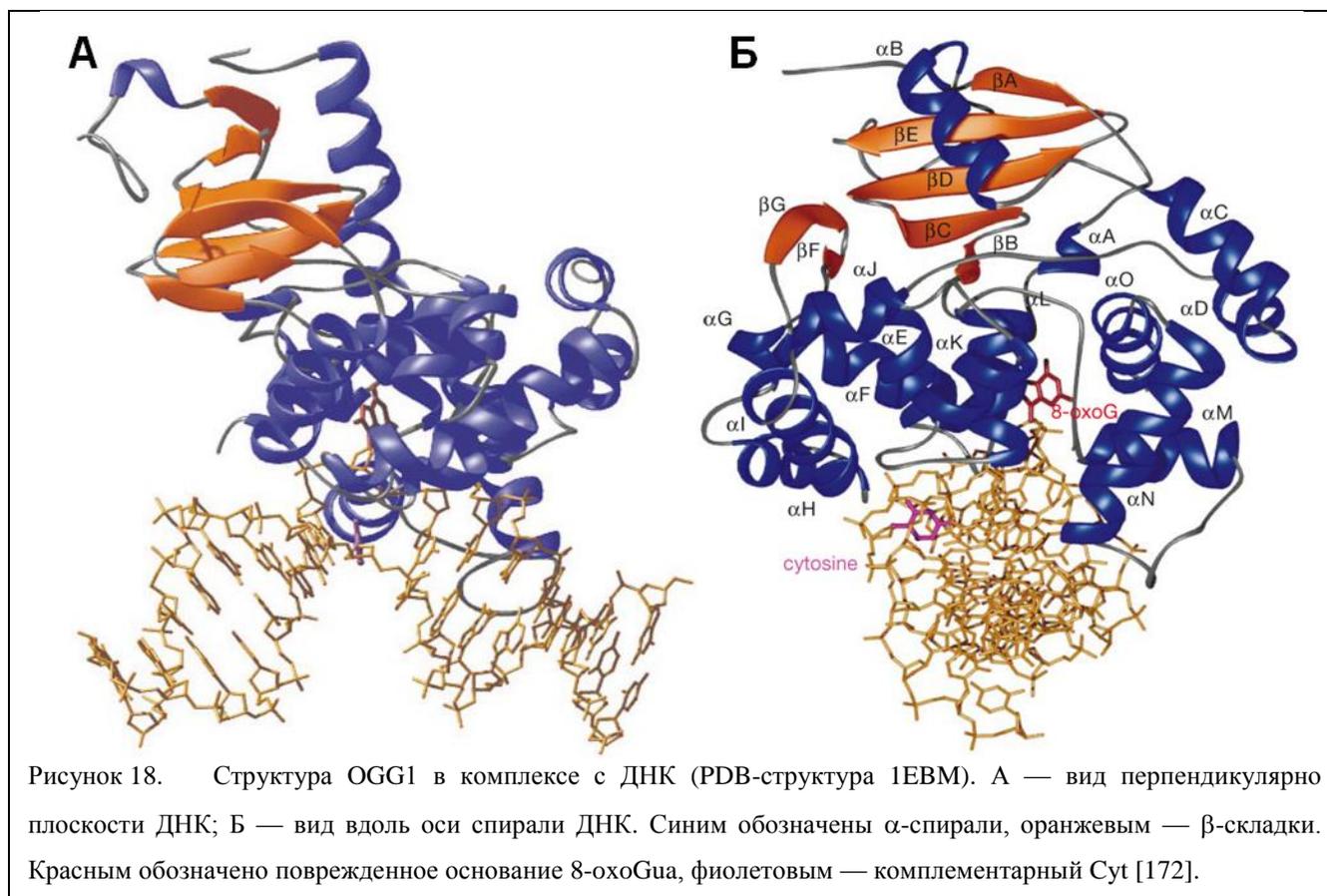
## 2.6. 8-оксогуанин-ДНК-N-гликозилаза эукариот (*OGG1*)

Достаточно долгое время продолжались попытки обнаружить белок, гомологичный 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазе бактерий. Несмотря на то, что активность, аналогичная Fpg, наблюдалась и в случае клеток человека [228], клонирование гена, гомологичного *fpg*, осталось безрезультатным. Позднее в экспериментах по комплементации мутаторного фенотипа штамма *E. coli fpg mutY* был идентифицирован ген *OGG1* из *Saccharomyces cerevisiae* [229]. Кодированный этим геном белок обладал практически полностью совпадающей с Fpg активностью, включающей гидролиз N-гликозидной связи и последующее AP-лиазное расщепление поврежденной цепи. Секвенирование гена выявило полное отсутствие гомологии между дрожжевой и бактериальной гликозилазами [230]. На основании полученной последовательности дрожжевой белок был отнесен к суперсемейству эндонуклеазы III (Nth). Однако из консервативных мотивов он содержал только HhH и GPD-петлю, при этом FeS-кластер, присущий членам суперсемейства Nth, отсутствовал. Установление последовательности дрожжевого белка дало толчок для поиска гомологичных генов у многих высших эукариот, в том числе у мышей [231, 232], крыс [233] и человека [234-237].

Ген *OGG1* человека представлен 8 экзонами, при этом использование в ходе альтернативного сплайсинга экзонов 7 или 8 определяет две главные изоформы белка *OGG1*, идентичные по первым 316 аминокислотным остаткам, но отличающиеся по С-концу [238-240]. По наличию сигналов ядерной локализации и митохондриального импорта изоформы принято разделять на ядерную и митохондриальную [241, 242]. Первая изоформа, полученная с использованием 7 экзона, содержит оба сигнала, для второй, полученной с использованием 8 экзона, характерно наличие сигнала только митохондриального импорта. Несмотря на то, что в митохондриях обнаруживается ДНК-гликозилазная активность по отношению к субстрату, содержащему 8-охоGua [241, 243], присущая им форма белка *OGG1-2a* не обладает

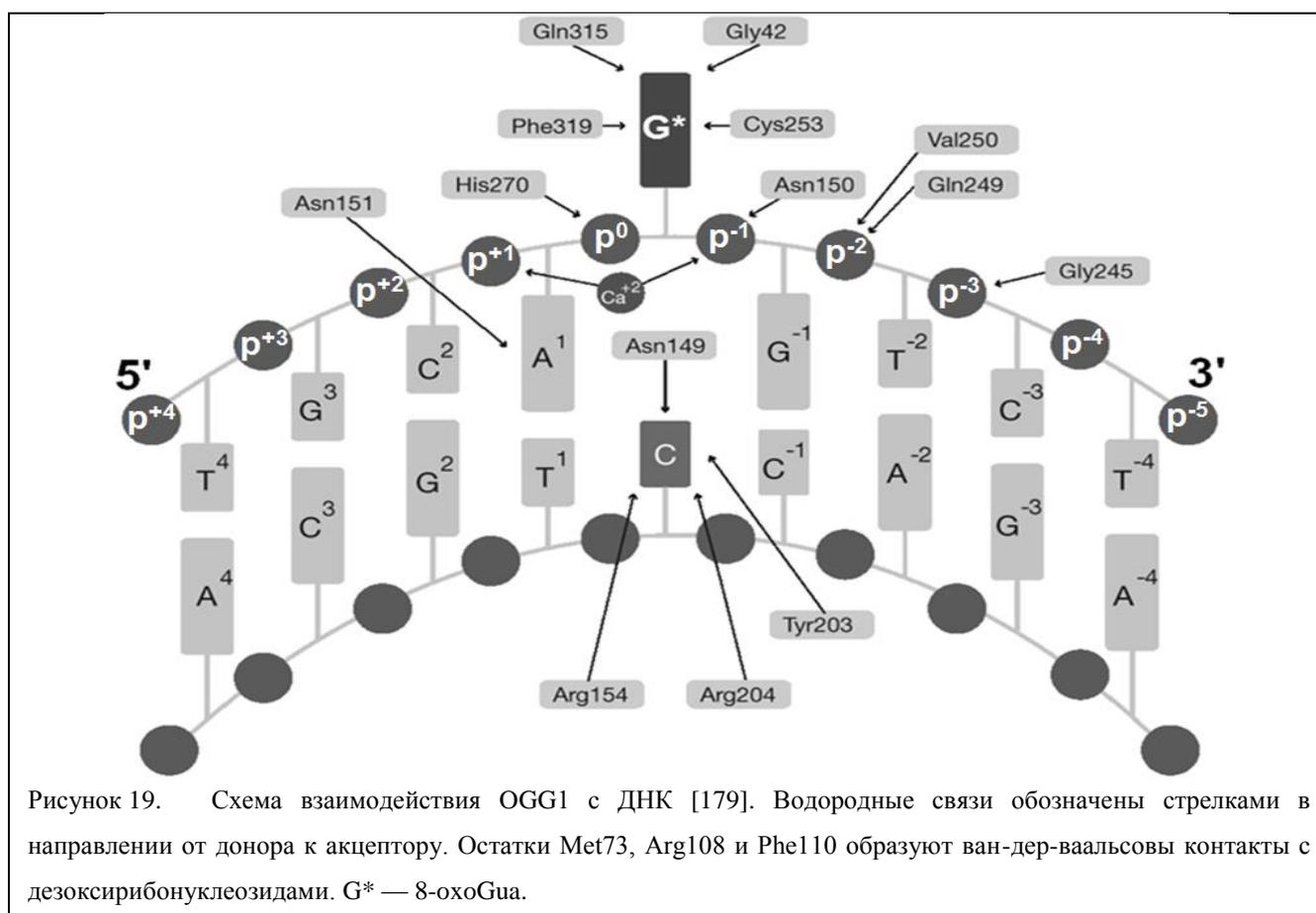
ферментативной активностью *in vitro* [240]. На уровне мРНК в клетках человека обнаружено еще 17 минорных изоформ OGG1 обоих типов локализации, однако в настоящее время не установлено, осуществляется ли трансляция этих мРНК.

Главная ядерная изоформа белка OGG1-1a (далее OGG1) имеет молекулярную массу 38782 Да и состоит из 345 аминокислотных остатков. Структура гликозилазы определена как для комплексов с ДНК, так и для белка в свободном состоянии [172, 173, 179, 180, 244]. Как уже отмечалось, белок содержит мотив HhH, GPD-петлю, два  $\alpha$ -спиральных домена, содержащиеся во всех известных членах суперсемейства, а также третий домен, включающий 7 антипараллельных  $\beta$ -складок, который роднит OGG1 с гликозилазой AlkA *E. coli* [173] (рисунок 18).



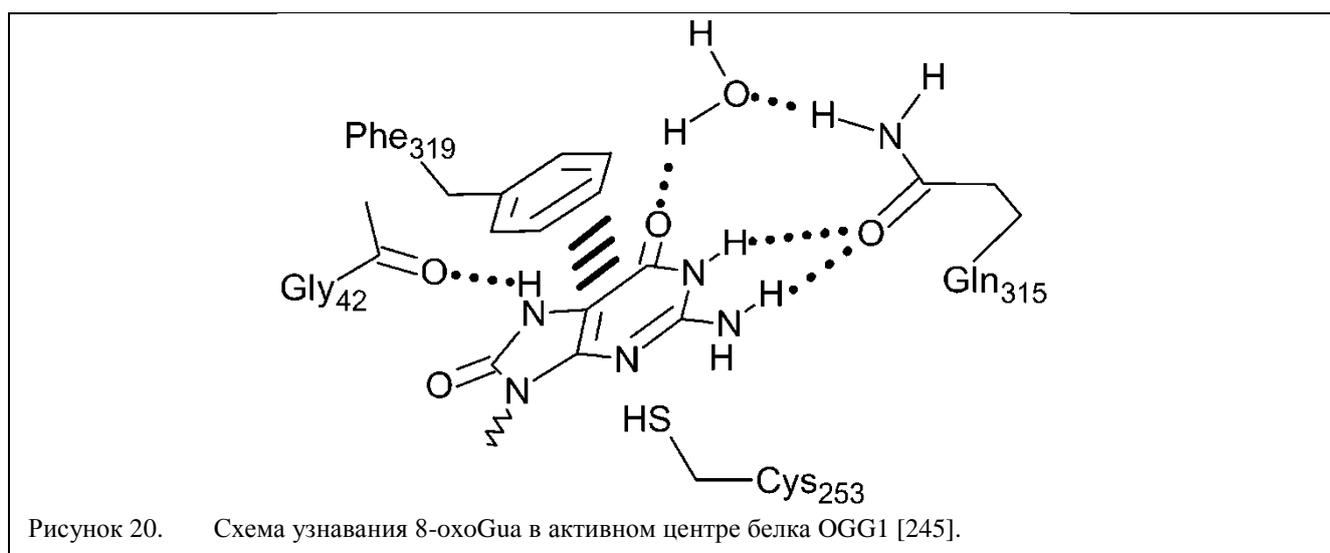
Согласно данным рентгеноструктурного анализа (РСА), OGG1 связывается с ДНК в малой бороздке, внося существенный излом в двойную спираль на  $\sim 70^\circ$ , как и в случае Fpg, и образуя контакты преимущественно с поврежденной цепью (рисунок 19). Анализ кристаллической структуры комплекса OGG1-ДНК выявил наличие иона  $\text{Ca}^{2+}$ , координирующего фосфатные группы  $p^{+1}$  и  $p^{-1}$ , который, вероятно, попадает в центр связывания из кристаллизационного раствора. Однако поскольку фермент не ингибируется ЭДТА, каталитическая важность этого иона маловероятна. Область с 3'-стороны от

поврежденного звена прочно связана аминокислотными остатками мотива HhH, образующего контакты с фосфатными группами  $p^{-2}$  и  $p^{-3}$ . В ходе связывания субстрата происходит поворот петли Cys146–Asn151, сопровождающийся выворачиванием 8-охоGua в активный центр OGG1, а остаток Asn149 заполняет образовавшуюся межцепочечную полость. Комплементарное основание Cyt остается внутри спирали, однако оно практически полностью лишено стэкинг-взаимодействия с соседними основаниями, по причине сильного излома ДНК. В самом активном центре связывание субстрата сопровождается значительными структурными перестройками. В свободном ферменте His270 частично заполняет активный центр, при этом его имидазольное кольцо стабилизировано стэкинг-взаимодействием с ароматическим кольцом Phe319. Связывание ДНК сопровождается перемещением His270 в сторону, освобождая тем самым активный центр и переводя каталитический остаток Asp268 в нужное положение. Остаток Phe319 разворачивается и зажимает поврежденное основание между собой и Cys253, входя при этом в стэкинг-взаимодействие с основанием.



Фермент OGG1 проявляет высокую специфичность к поврежденному основанию 8-охоGua. Примечательно, что такая специфичность в активном центре обусловлена образованием единственной водородной связи между N7-повреждения и атомом кислорода

пептидной связи Gly42 (рисунок 20). Уотсон-криковская грань 8-охоGua также образует несколько водородных связей с остатком Gln315 и двумя структурированными молекулами воды в активном центре. Высокая специфичность фермента к основанию Cyt напротив поврежденного может объясняться множественными контактами с остатками Asn149, Arg154 и Arg204. Остаток Tyr203, по аналогии с остатком Phe110 белка Fpg, интеркалирует между основаниями неповрежденной цепи с 3'-стороны относительно повреждения, вследствие чего, вероятно, инициируется излом молекулы ДНК в комплексе с ферментом.



Исследование OGG1 из разных эукариот выявило большую схожесть ферментативных свойств между всеми видами. Наилучшими субстратами для фермента служат основания 8-охоGua и Fapy-Gua [229-231, 234, 246-248], однако он, в отличие от Fpg, практически не способен расщеплять субстраты, содержащие Fapy-Ade или окисленные пиримидиновые основания [247, 248]. Основание mFapy-Gua заметно хуже, чем 8-охоGua, выщепляется ферментом как из дцОДН, так и из высокомолекулярной ДНК [229, 231]. Для OGG1 *in vitro* показано, что с наибольшей эффективностью происходит реакция с субстратом, содержащим пару 8-охоGua:Cyt. В случае образования пары с другими основаниями эффективность снижается в ряду 8-охоGua:Cyt > 8-охоGua:Thy > 8-охоGua:Gua > 8-охоGua:Ade [249]. Кроме этого OGG1 способен расщеплять дцОДН, содержащие пару 8-охоAde:Cyt, но не пару 8-охоAde:Thy [245, 249, 250]. Повреждение 8-охоAde также не выщепляется ферментом из высокомолекулярной ДНК [247, 248].

Как и в случае Fpg, OGG1 представляет собой бифункциональную ДНК-гликозилазу, при этом гидролиз *N*-гликозидной связи протекает значительно эффективнее последующего расщепления сахарофосфатного остова. Нуклеофильную атаку по С1' дезоксирибозного кольца

осуществляет  $\epsilon$ -аминогруппа остатка Lys (Lys249 в случае OGG1 человека), находящегося в мотиве N<sub>h</sub>H [143, 251].

Белок OGG1 слабым связывает свой конечный продукт после  $\beta$ -элиминирования, но обладает значительным сродством к промежуточному AP-продукту реакции [252]. Показано, что после гидролиза *N*-гликозидной связи фермент остается связанным со своим AP-продуктом, при этом его активность может стимулироваться AP-эндонуклеазой AP<sub>EX</sub>1 [252-254]. Фермент также образует комплекс с белком XRCC1 и стимулируется им за счет облегчения образования ковалентного интермедиата с ДНК [255].

Для многих эукариотических ферментов, участвующих в ЭРО, на сегодняшний день показано наличие посттрансляционных модификаций, в том числе ацетилирования и фосфорилирования [256, 257]. Так, было обнаружено фосфорилирование OGG1 киназами CDK4, c-ABL и PKC. Сайты модификации не установлены, но предполагается, что фосфорилированию подвергаются остатки Ser, индивидуальные для разных киназ [258, 259]. В пользу этого свидетельствует стимуляция активности OGG1 после фосфорилирования киназой CDK4 и отсутствие стимуляции после инкубации с протеинкиназой C. Помимо фосфорилирования, белок OGG1 может подвергаться ацетилированию как *in vivo*, так и *in vitro* при участии гистонацетилазы CBP/p300 преимущественно по остаткам Lys338 и Lys341 [260], что увеличивает активность фермента.

Поскольку фермент OGG1 играет ключевую роль в репарации 8-охоGua, дефекты гена *OGG1* или его полиморфные варианты могут затрагивать функции белка и быть ассоциированы с онкологическими заболеваниями легких, почек, пищевода и шейно-головного отдела, что неизбежно сопровождается повышением уровня 8-охоGua в ДНК клеток опухоли [232, 261-263]. Мыши, дефицитные по гену *ogg1*, отличаются повышенным фоновым уровнем 8-охоGua в митохондриальной и ядерной ДНК [242, 264-266] и уровнем мутагенеза в активно делящихся клетках [267, 268]. Показана предрасположенность к онкологическим заболеваниям легких у мышей *Ogg1*<sup>-/-</sup> с возрастом или при одновременной инактивации гена *Mutyh* [267, 269].

В настоящее время, как ферментативные, так и физико-химические свойства OGG1 изучены менее тщательно, чем для белка Fpg. Вместе с тем существует ряд вопросов, не решенных для обеих гликозилаз. Поскольку для OGG1 также характерны существенный излом ДНК и выворачивание повреждения из стопки оснований, локальные физические параметры цепочки могут определять эффективность суммарной реакции или определенных каталитических стадий. Однако насколько значительным может быть это влияние, в деталях не установлено. При этом существует большое количество факторов, влияющих на упомянутые

физические параметры, среди которых нуклеотидный контекст, наличие неканонических пар вблизи повреждения, разрывов и других повреждений вблизи сайта узнавания и т. д.

### 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 3.1. Реактивы

В работе использованы трис(гидроксиметил)аминометан (Tris), мочеви́на, борная кислота, N,N'-метиленабисакриламид, акриламид, персульфат аммония, трицин, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия, тетраметилэтилендиамин, боргидрид натрия, хлорид магния, хлорид натрия, сульфат никеля, изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG), додецилсульфат натрия, 2-меркаптоэтанол, глицерин, фенилметилсульфонил фторид (PMSF), кумасси R-250, краситель ксиленцианол, краситель бромфеноловый синий, формамид, бакто-агар, бакто-триптон, бакто-дрожжевой экстракт, бычий сывороточный альбумин — все производства MP Biomedicals (США). Остальные реактивы и растворители квалификации х.ч. и ос.ч. использовались отечественного производства. Для 5'-мечения ОДН полинуклеотидкиназой бактериофага T4 использовали  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]АТФ с удельной активностью 1,43 МБк/мкл («Радиоизотоп», Россия или PerkinElmer Life Sciences, США), для 3'-мечения терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой из тимуса теленка использовали  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]-кордицепин (PerkinElmer Life Sciences, США) с той же удельной активностью. Для всех процедур, кроме электрофореза и приготовления питательных сред, использовали деионизованную воду I типа (удельное сопротивление 18,2 Мом/см).

#### 3.2. Хроматографические сорбенты и колонки

Для очистки меченых ОДН после введения радиоактивной метки использовали сорбент C<sub>18</sub> NenSorb (PerkinElmer Life Sciences, США). При выделении белков использовали упакованные хроматографические колонки фабричного производства «HiTrap Chelating», «HiTrap Heparin HP», «HiTrap SP HP», «HiTrap Q HP» и «Superdex 75HR 10/30» (все — «GE Healthcare»).

#### 3.3. Олигодезоксирибонуклеотиды

ОДН, использованные в работе, были синтезированы стандартным твердофазным фосфорамидитным способом в ЛБМХ СО РАН или Университете штата Нью-Йорк в Стоуни-Брук, США. Все ОДН подвергались очистке с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке LiChrosorb RP-18 (Merck, США), и, при необходимости, с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Для синтеза ОДН использовались коммерчески доступные

фосфорамидиты (Glen Research, США). ОДН, содержащие 3'-дидезокси-NTP, были получены из соответствующих укороченных на один нуклеотид праймеров с использованием терминальной трансферазы и требуемого ddNTP (Биосан, Россия).

Таблица 3. ОДН для исследования активности и субстратной специфичности ДНК-гликозилаз

Название	Последовательность ОДН 5'→3'	Модификация <sup>1</sup>
1	TTTTTTTTTTCXCTTTTTTTTTTTT	X = 8-охоGua
2	AAAAAAAAAAGCGAAAAAAAAA	
3	TTTTTTTTTXXTTTTTTTTTTTTTT	X = 8-охоGua
4	AAAAAAAAAACAACAAAAAAAAA	
5	AAAAAAAAACXCAAAAAAAAAA	X = 8-охоGua
6	TTTTTTTTTGTGCGTTTTTTTTTTT	
7	AAAAAAAAACXCGCCCGCCGCG	X = 8-охоGua
8	CGCGGGCGGGCGCGTTTTTTTTTTT	
9	CCGCCCGCGXCAAAAAAAAAA	X = 8-охоGua
10	TTTTTTTTTGTGCGCGGGGCGG	
11	TTTTTTTGGGXGGGTTTTTTTTTTT	X = 8-охоGua
12	AAAAAAAAACCCCCCAAAAAAAAA	
13	GAGCGAGCGXCGCGAGCGAGCG	X = 8-охоGua
14	CGCTCGCTCGCGCGCTCGCTC	
15	AGAGGAAAGGATCAAAGGGAGAG	
16	CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT	X = 8-охоGua
17	CTCTCCCTTCXCTCCTCCTCT	X = 8-охоGua
18	AGAGGAGAGGAGCGAAGGGAGAG	
19	CTCTCCCTTCXCTCCTCCTCT	X = 8-охоGua
20	AGAGGAGAGGAGCGAGGGGAGAG	
21	CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT	X = 8-охоGua
22	AGAGGAAAGGAGCGAGGGGAGAG	
23	CTCTCCTTTCXCTCCTTTCCTCT	X = 8-охоGua
24	AGAGGAAAGGAGCGAAAGGAGAG	
25	CTCTCCCTTCXATCCTTTCCTCT	X = 8-охоGua
23G	CTCTCCCTTCGTCCTTTCCTCT	
23oG	CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT	X = 8-охоGua
23F	CTCTCCCTTCFCTCCTTTCCTCT	F = THF
23C	AGAGGAAAGGAGCGAAGGGAGAG	
23U	CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT	X = Ura
23dhU	CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT	X = 5,6-дигидроурацил
23Hyp	CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT	X = гипоксантин

<sup>1</sup>Структуры модифицированных оснований представлены на рисунке 21.

Таблица 4. ОДН для исследования влияния разрывов в ДНК на активность Fpg

Название	Последовательность ОДН 5'→3'	Модификация <sup>1</sup>
AE01	ACTACGTGGACTCTCCCT	
AE02	ACTACGTGGACTCTCCCT (p)	
AE03	ACTACGTGGACTCTCCCTT	
AE03dd	ACTACGTGGACTCTCCCT (ddT)	
AE04	ACTACGTGGACTCTCCCTT (p)	
AE05	ACTACGTGGACTCTCCCTTC	
AE05dd	ACTACGTGGACTCTCCCTT (ddC)	
AE06	ACTACGTGGACTCTCCCTTC (p)	
AE07	ACTACGTGGACTCTCCCTTCX	X = 8-охоGua
AE08	ACTACGTGGACTCTCCCTTCX (p)	X = 8-охоGua
AE09	ACTACGTGGACTCTCCCTTCXC	X = 8-охоGua
AE09dd	ACTACGTGGACTCTCCCTTCX (ddC)	X = 8-охоGua
AE10	ACTACGTGGACTCTCCCTTCXC (p)	X = 8-охоGua

AE11	ACTACGTGGACTCTCCCTTCXCT	X = 8-oxoGua
AE11dd	ACTACGTGGACTCTCCCTTCXC (ddT)	X = 8-oxoGua
AE12	ACTACGTGGACTCTCCCTTCXCT (p)	X = 8-oxoGua
AE13	TCXCTCCTTTCCCTCTCCTTCGAC	X = 8-oxoGua
AE14	(p) TCXCTCCTTTCCCTCTCCTTCGAC	X = 8-oxoGua
AE15	CXCTCCTTTCCCTCTCCTTCGAC	X = 8-oxoGua
AE16	(p) CXCTCCTTTCCCTCTCCTTCGAC	X = 8-oxoGua
AE17	XCTCCTTTCCCTCTCCTTCGAC	X = 8-oxoGua
AE18	(p) XCTCCTTTCCCTCTCCTTCGAC	X = 8-oxoGua
AE19	CTCCTTTCCCTCTCCTTCGAC	
AE20	(p) CTCCTTTCCCTCTCCTTCGAC	
AE21	TCCTTTCCCTCTCCTTCGAC	
AE22	(p) TCCTTTCCCTCTCCTTCGAC	
AE23	CCTTTCCCTCTCCTTCGAC	
AE24	(p) CCTTTCCCTCTCCTTCGAC	
AE25	ACTACGTGGACTCTCCCTTCXCTCCTTTCCCTCTCCTTCGAC	X = 8-oxoGua
AE26	GTCGAAGGAGAGGAAAGGAGCGAAGGGAGAGTCCACGTAGT	
AE28	GTCGAAGGAGAGGAAAGG	
AE29	GTCGAAGGAGAGGAAAGG (p)	
AE30	GTCGAAGGAGAGGAAAGGA	
AE31	GTCGAAGGAGAGGAAAGGA (p)	
AE32	GTCGAAGGAGAGGAAAGGAG	
AE33	GTCGAAGGAGAGGAAAGGAG (p)	
AE34	GTCGAAGGAGAGGAAAGGAGC	
AE35	GTCGAAGGAGAGGAAAGGAGC (p)	
AE36	GTCGAAGGAGAGGAAAGGAGCG	
AE37	GTCGAAGGAGAGGAAAGGAGCG (p)	
AE38	GTCGAAGGAGAGGAAAGGAGCGA	
AE39	GTCGAAGGAGAGGAAAGGAGCGA (p)	
AE40	AGCGAAGGGAGAGTCCACGTAGT	
AE41	(p) AGCGAAGGGAGAGTCCACGTAGT	
AE42	GCGAAGGGAGAGTCCACGTAGT	
AE43	(p) GCGAAGGGAGAGTCCACGTAGT	
AE44	CGAAGGGAGAGTCCACGTAGT	
AE45	(p) CGAAGGGAGAGTCCACGTAGT	
AE46	GAAGGGAGAGTCCACGTAGT	
AE47	(p) GAAGGGAGAGTCCACGTAGT	
AE48	AAGGGAGAGTCCACGTAGT	
AE49	(p) AAGGGAGAGTCCACGTAGT	
AE50	AGGGAGAGTCCACGTAGT	
AE51	(p) AGGGAGAGTCCACGTAGT	

<sup>1</sup>Структуры модифицированных оснований представлены на рисунке 21.

Таблица 5. ОДН для исследования стэкинг взаимодействий 8-охоGua в различных контекстах ДНК

Название	Последовательность ОДН 5'→3'	Модификация <sup>1</sup>
tACT	CGTGAGACTGTGCAGCTTTTGCTGCACA	
tTCT	CGTGAGTCTGTGCAGCTTTTGCTGCACA	
tGCT	CGTGAGGCTGTGCAGCTTTTGCTGCACA	
tCCT	CGTGAGCCTGTGCAGCTTTTGCTGCACA	
tACA	CGTGAGACAGTGCAGCTTTTGCTGCACT	
tTCA	CGTGAGTCAGTGCAGCTTTTGCTGCACT	
tGCA	CGTGAGGCAGTGCAGCTTTTGCTGCACT	
tCCA	CGTGAGCCAGTGCAGCTTTTGCTGCACT	
tACC	CGTGAGACCGTGCAGCTTTTGCTGCACG	
tTCC	CGTGAGTCCGTGCAGCTTTTGCTGCACG	
tGCC	CGTGAGCCCGTGCAGCTTTTGCTGCACG	
tCCC	CGTGAGCCCGTGCAGCTTTTGCTGCACG	
tACG	CGTGAGACGGTGCAGCTTTTGCTGCACC	

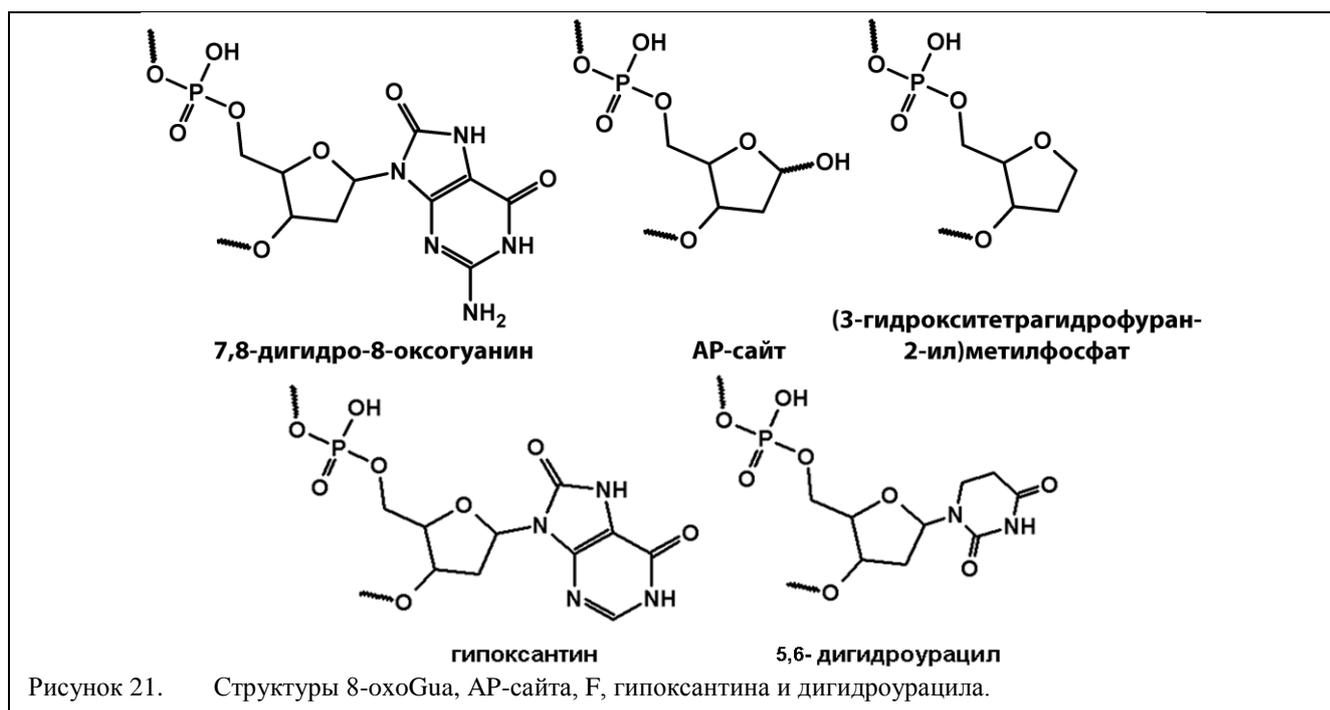
tTCG	CGTGAGTCGGTGCAGCTTTTGCTGCACC	
tGCG	CGTGAGGCGGTGCAGCTTTTGCTGCACC	
tCCG	CGTGAGCCGGTGCAGCTTTTGCTGCACC	
itTCA	AGTGCAGCTTTTGCTGCACTCACTCACG	
itTCT	AGTGCAGCTTTTGCTGCACTCTCTCACG	
itTCG	AGTGCAGCTTTTGCTGCACTCGCTCACG	
itTCC	AGTGCAGCTTTTGCTGCACTCCCTCACG	
itACA	TGTGCAGCTTTTGCTGCACACACTCACG	
itACT	TGTGCAGCTTTTGCTGCACACTCTCACG	
itACG	TGTGCAGCTTTTGCTGCACACGCTCACG	
itACC	TGTGCAGCTTTTGCTGCACACCCTCACG	
itGCA	CGTGCAGCTTTTGCTGCACGCACTCACG	
itGCT	CGTGCAGCTTTTGCTGCACGCTCTCACG	
itGCG	CGTGCAGCTTTTGCTGCACGCGCTCACG	
itGCC	CGTGCAGCTTTTGCTGCACGCCCTCACG	
itCCA	GGTGCAGCTTTTGCTGCACCCACTCACG	
itCCT	GGTGCAGCTTTTGCTGCACCCCTCTCACG	
itCCG	GGTGCAGCTTTTGCTGCACCCCGCTCACG	
itCCC	GGTGCAGCTTTTGCTGCACCCCCTCACG	
soGT	XTCTCACG	X = 8-oxoGua
soGA	XACTCACG	X = 8-oxoGua
soGC	XCCTCACG	X = 8-oxoGua
soGG	XGCTCACG	X = 8-oxoGua
sGT	GTCTCACG	
sGA	GACTCACG	
sGC	GCCTCACG	
sGG	GGCTCACG	
isAC	CGTGAGAC	
isTC	CGTGAGTC	
isGC	CGTGAGGC	
isCC	CGTGAGCC	
isToG	CGTGAGTX	X = 8-oxoGua
isAoG	CGTGAGAX	X = 8-oxoGua
isCoG	CGTGAGCX	X = 8-oxoGua
isGoG	CGTGAGGX	X = 8-oxoGua
isTG	CGTGAGTG	
isAG	CGTGAGAG	
isCG	CGTGAGCG	
isGG	CGTGAGGG	
sCA	CACTCACG	
sCT	CTCTCACG	
sCG	CGCTCACG	
sCC	CCCTCACG	

<sup>1</sup>Структуры модифицированных оснований представлены на рисунке 21.

Таблица 6. ОДН для исследования влияния фосфоротиоатных замен в ДНК-субстратах на активность OGG1 и Fpg

Название	Последовательность ОДН 5'→3'	Модификация
PS1oG	CTCTCCSTTpsCXCTCSTTTTCCSTCT	X = 8-oxoGua, ps = межнуклеотидный фосфоротиоат
PS2oG	CTCTCCSTpsTCXCTCSTTTTCCSTCT	X = 8-oxoGua, ps = межнуклеотидный фосфоротиоат
PS-1oG	CTCTCCSTTCXpsCTCSTTTTCCSTCT	X = 8-oxoGua, ps = межнуклеотидный фосфоротиоат
PS-2oG	CTCTCCSTTCXcpsCTCSTTTTCCSTCT	X = 8-oxoGua, ps = межнуклеотидный фосфоротиоат

<sup>1</sup>Структуры модифицированных оснований представлены на рисунке 21.



### 3.4. Плазмиды

В работе использовались плазмиды для суперпродукции белков на основе векторов pET-24b(+) и pET-28a(+). Плазмиды содержали либо вставки генов мутантных форм Fpg *E. coli*, полученные сайт-направленным мутагенезом с использованием набора QuikChange Lightning kit (Agilent Technologies, США), либо вставки по сайтам *XhoI* и *NdeI* генов отдельных доменов Fpg: N-концевого (N-Fpg) и C-концевого (C-Fpg) (таблица 7).

Таблица 7. Векторы для экспрессии белков

Вектор	Синтезируемый белок
pET-24b(+)	C-Fpg, Q234R, R244E, Q234R/R244E, R54E, E131R, R54E/E131R, Y170F, S208A
pET-28a(+)	N-Fpg, R108K, R108L, R108Q, N168D, N168Q, R258A, R258Q, R258K

### 3.5. Ферменты

В работе использовали полинуклеотидкиназу бактериофага T4 (10 ед. акт./мкл), урацил-ДНК-гликозилазу из *E. coli* (2 000 ед. акт./мл) и терминальную трансферазу из тимуса телёнка (20 ед. акт./мкл) (New England Biolabs). Белки Fpg, OGG1 и APEX1 были предоставлены

руководителем работы (выделение описано в работах [141, 191, 270]). Выделение мутантных форм белка Frg *E. coli* и его структурных доменов описано ниже (см. разд. 3.11 и 3.12).

### 3.6. Введение $^{32}\text{P}$ метки по 5'- и 3'-концу ОДН

Фосфорилирование ОДН по 5'-концу проводили в буфере следующего состава: 70 мМ Tris-HCl (pH 7,6), 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 100 мМ KCl и 1 мМ 2-меркаптоэтанол. На 300 пмоль ОДН в объеме 50 мкл добавляли 20 ед. акт. полинуклеотидкиназы фага T4 и 7 МБк  $\gamma[^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (примерно 3,5 пмоль). Фосфорилирование по 3'-концу проводили в буфере: 20 мМ Tris-ацетат (pH 7,9), 50 мМ  $\text{CH}_3\text{COOK}$ , 10 мМ  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , 0,25 мМ  $\text{CoCl}_2$ . На 300 пмоль ОДН в объеме 30 мкл добавляли 20 ед. акт. терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы и 7 МБк  $\alpha[^{32}\text{P}]\text{-кордицепина}$ . После инкубации в течение 40 мин. при 37°C и остановки реакции прогреванием при 95°C в течение 5 мин. отбирали 1 мкл реакционной смеси для последующего определения выхода продукта, а затем отделяли меченые ОДН от невключившегося  $\gamma[^{32}\text{P}]\text{ATP}$  или  $\alpha[^{32}\text{P}]\text{-кордицепина}$  обращеннофазовой хроматографией на сорбенте  $\text{C}_{18}$  NenSorb. Перед нанесением образца 200 мкл сорбента, упакованного в колонку, смачивали 1 мл метанола, а затем уравнивали 2 мл буфера, содержащего 100 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ ЭДТА. К реакционной смеси добавляли 600 мкл того же буфера. После нанесения образца колонку промывали последовательно 2 мл буфера и 2 мл воды. Меченый ОДН элюировали с колонки 50% метанолом в объеме 600 мкл. Затем очищенный ОДН упаривали досуха под вакуумом и растворяли в 50 мкл буфера, содержащего 1 мМ Tris-HCl (pH 8,0) и 0,1 мМ ЭДТА (0,1×TE). Для определения выхода отбирали 1 мкл очищенного ОДН и анализировали его и аликвоту, отобранную на предыдущем этапе, гель-электрофорезом в денатурирующих условиях (см. разд. 3.10). Выход меченого продукта после очистки составлял обычно от 70 до 90 % при эффективности включения метки ~20%. Радиоактивно меченые ОДН в составе дуплексов далее отмечены звездочкой (напр. \*23oG).

### 3.7. Отжиг комплементарных цепей ОДН

Отжиг вели с двукратным молярным избытком немеченой комплементарной цепи в следующем режиме: 1 мин. при 95°C, 10 мин. при 37°C, 30 мин. при комнатной температуре. Если длина конечного дуплекса превышала 40 п.н. или конечный субстрат состоял из трех отжигаемых ОДН, то режим был следующим: термостат разогревался до 95°C, в него устанавливались пробирки со смесями для отжига, после чего термостат охлаждался до

комнатной температуры в течении 2 часов. Полученные субстраты разбавляли до нужной концентрации и хранили при минус 20°C.

### ***3.8. Определение термодинамических параметров образования олигонуклеотидных дуплексов***

Исследование термодинамических свойств ДНК проводили в сотрудничестве с к. ф.-м. н. А. А. Ломзовым (ЛБМХ ИХБФМ СО РАН). Для определения термодинамических параметров образования ДНК-дуплексов использовали метод термической денатурации с оптической регистрацией сигнала на длинах волн 260, 270 и 300 нм [271] с использованием спектрофотометра Cary 300 BioMelt (Varian, Австралия). Термическую денатурацию смеси ОДН, взятых в стехиометрическом соотношении при суммарной концентрации цепей от  $2,5 \times 10^{-6}$  до  $10^{-4}$  М, проводили в буфере, содержащем 1 М NaCl, 10 мМ фосфат натрия (рН 7.2). Полученные кривые термической денатурации обрабатывали путем вычитания “базовой” линии на длине волны 300 нм и последующей оптимизацией полученных кривых плавления в рамках модели двух состояний с наклонными базовыми линиями [272]. Величины термодинамических параметров на разных длинах волн усредняли. Значения величин  $\Delta H^\circ$  и  $\Delta S^\circ$  образования дуплексов рассчитывали путем минимизации среднеквадратичного отклонения между экспериментально полученной кривой плавления и расчетной с помощью программы “Simplex” (Иванов А.В., ИЛФ СО РАН) путем варьирования 6 параметров [272]. Среднестатистическая экспериментальная ошибка в вычислениях величин  $\Delta H^\circ$  и  $\Delta S^\circ$  не превышала 10 %. Температуру плавления определяли с точностью до 0,5 °С.

### ***3.9. Определение структурных параметров ДНК-субстратов***

Для определения структурных параметров ДНК в сотрудничестве с д. б. н. М. П. Пономаренко (ИЦиГ СО РАН) использовался программный пакет «ACTIVITY», основанный на применении теории нечетких множеств Заде и предназначенный для анализа и предсказания конформационных и физико-химических свойств различных последовательностей ДНК [273]. В ходе работы программный пакет был доработан для предсказания свойств ДНК, содержащей неканонические пары оснований [274].

### ***3.10. Электрофоретический анализ белков и ОДН***

При проведении гель-электрофореза в денатурирующих условиях использовали 20% полиакриламидный гель (ПААГ, соотношение акриламид:бис-акриламид 19:1), содержащий

7,2 М мочевины и 1× буфер TBE, содержащий 90 мМ Tris, 90 мМ борную кислоту, 2 мМ ЭДТА; электрофорез проводили в полиакриламидной пластине толщиной от 0,4 до 0,6 мм и длиной от 20 до 30 см в 1× буфере TBE, содержащем 90 мМ Tris, 90 мМ борную кислоту, 2 мМ ЭДТА, при напряжении от 800 до 1000 В без специального охлаждения.

При проведении гель-электрофореза в неденатурирующих условиях (для гель-ретардации) использовали 8% ПААГ (соотношение акриламид:бис-акриламид 39:1), содержащий 0,5× буфер TBE. Перед нанесением проводили предфорез при напряжении не более 300 В в течение 2 ч. Образцы наносили, не отключая электрический ток. Электрофорез проводили в полиакриламидной пластине толщиной от 0,6 до 0,8 мм и длиной от 20 до 30 см в прямом контакте с 0,5× буфером TBE при 15 °С. После разделения продуктов реакции в геле радиоактивность полос определяли радиолюминесцентным сканированием экрана Image Screen К (Kodak, США) с использованием системы Molecular Imager FX (Bio-Rad, США). При необходимости результаты обсчитывали с использованием программы ImageQuaNT v5.2 (Molecular Dynamics, США).

Клеточные лизаты и фракции при выделении белка анализировали электрофорезом в ПААГ (соотношение акриламид:бис-акриламид 39:1) с глициновым электродным буфером (25 мМ Tris-glycine pH 8.3) (система Лэммли: концентрирующий гель – 4% ПААГ, 125 мМ Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS; разделяющий гель – 12% ПААГ, 375 мМ Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS) или с трициновым буфером (концентрирующий гель – 4% ПААГ, 1 М Tris-HCl pH 8,45, 0,1% SDS; разделяющий гель – 16,5% ПААГ, 1 М Tris-HCl pH 8,45, 0,1% SDS; анодный буфер: 0,2 М Tris-HCl pH 8,9; катодный буфер: 0,1 М Tris, 0,1 М трицин, 0,1% SDS). После электрофореза гель окрашивался не менее 3 ч. в растворе 0,1% Кумасси бриллиантового голубого R250 в 40% метаноле/10% уксусной кислоте.

### **3.11. Выделение C-Fpg и N-Fpg**

Клетки *E. coli* BL21(DE3), трансформированные плазмидой pET-28a(+) со вставкой C-Fpg или плазмидой pET-24b(+) со вставкой N-Fpg, выращивали в 5 мл среды YT×2 (16 г/л бакто-триптон, 10 г/л бакто-дрожжевой экстракт, 5 г/л NaCl), содержащей 25 мкг/мл канамицина, при 37°С на качалке при 250 об./мин. в течение ночи. Аликвоты ночной культуры (250 мкл) инокулировали в 6 300-мл колб, содержащих по 50 мл среды YT×2 и 100 мкг/мл канамицина, после чего растили в тех же условиях до достижения  $A_{600} = 1,0$ . Затем в аликвоты добавляли изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG) до концентрации 1 мМ и продолжали выращивание в течение 3 ч.

Клетки отделяли от среды центрифугированием (10 мин., 12000 g, 4°C). Клеточную массу ресуспендировали в 30 мл буфера для клеточного лизиса, содержащего 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM ЭДТА, и разрушали клетки трехкратной заморозкой при минус 70°C. Затем добавляли фенилметилсульфонилфторид до концентрации 1 mM. Суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин., добавляли 4 M NaCl до концентрации 1 M и инкубировали еще 10 мин. Клетки разрушали ультразвуком на приборе УЗДН-2Т 10 импульсами по 30 с на максимальной мощности при 22 кГц с выдерживанием на льду в течение 1,5 мин. между импульсами. Аликвоты лизата анализировали электрофорезом в ПААГ (система Лэммли или в трициновом буфере). Лизат центрифугировали 30 мин. в условиях, описанных выше. К супернатанту добавляли кристаллический сульфат аммония до 80% насыщения и инкубировали 2 ч. на льду. После центрифугирования в условиях, описанных выше, осадок в случае С-Frg растворяли в 5 мл буфера (pH 8,0), содержащего 50 mM Tris и 500 mM NaCl, в случае N-Frg растворяли в 20 мл буфера (pH 7,5), содержащего 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА и 1 mM ДТТ.

Для выделения белка С-Frg на колонку «HiTrap Chelating» (1 мл) наносили 0,1 M раствор NiSO<sub>4</sub> и промывали ее 5 мл воды, а затем 5 мл буфера (pH 8,0), содержащего 50 mM Tris и 500 mM NaCl. Затем раствор белка наносили на колонку и промывали 5 мл того же буфера. Скорость нанесения и промывки составляла 2 мл/мин. Элюцию проводили порциями по 2 мл буфера, содержащего 50 mM Tris, 500 mM NaCl, а концентрация имидазола была 0 mM, 50 mM, 200 mM и 500 mM. Фракции белка анализировали электрофорезом с окрашиванием кумасси голубым. Фракции, содержащие белковый продукт нужной подвижности, объединяли, разбавляли 7 объемами буфера, содержащего 20 mM фосфат натрия (pH 7,5), 1 mM ЭДТА и 1 mM ДТТ, и наносили на колонку «HiTrap SP HP» (1 мл), уравновешенную этим же буфером, дополнительно содержащим 100 mM NaCl. Элюцию белка проводили порциями по 2 мл буфера, содержащего 20 mM фосфат натрия, 1 mM ЭДТА и 1 mM ДТТ, а концентрация NaCl была 100 mM, 200 mM, 400 mM, 700 mM и 1500 mM, начиная с наименьшей. Фракции белка анализировали электрофорезом с окрашиванием кумасси R-250. Белковые фракции с чистотой не менее 90% объединяли и наносили на колонку «Superdex 75 HR 10/30», уравновешенную буфером, содержащим 50 mM Tris, 1 M NaCl, 1 mM ЭДТА и 1 mM ДТТ. Элюцию вели тем же буфером, за выходом белка следили по поглощению при 280 нм. Фракции анализировали электрофорезом с окрашиванием кумасси R-250. Фракции белка, не содержащие видимых примесей, концентрировали при помощи устройств «Centricon-10» (Millipore, США) до объема 400 мкл, разбавляли 400 мкл охлажденного глицерина и хранили при минус 20°C.

Для выделения белка N-Fpg растворенный белок наносили на колонку «HiTrap Q HP» (5 мл), уравновешенную соответствующим буфером. Элюцию белка проводили порциями по 10 мл буфера, содержащего 50 мМ Tris, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ а концентрация NaCl была 100 мМ, 200 мМ, 400 мМ, 700 мМ и 1500 мМ, начиная с наименьшей. Фракции белка анализировали электрофорезом с окрашиванием кумасси R-250. Те, из которых содержали белковый продукт нужной подвижности, объединяли, разбавляли 10 объемами буфера, содержащего 50 мМ Tris и 500 мМ NaCl, и наносили на колонку «HiTrap Chelating» (1 мл). Элюцию проводили порциями по 2 мл буфера, содержащего 50 мМ Tris, 500 мМ NaCl, а концентрация имидазола была 0 мМ, 50 мМ, 200 мМ и 500 мМ. Белковые фракции с чистотой не менее 95% объединяли, диализовали против буфера, содержащего 50 мМ Tris, 400 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ и 50% глицерина (v/v) и хранили при минус 20°C.

### **3.12. Выделение мутантных форм Fpg**

Клетки *E. coli* BL21(DE3) с плазмидой pET-24b(+) или pET-28a(+) (см. разд. 3.4), несущей вставку одной из мутантных форм белка Fpg, выращивали в 5 мл среды LB (10 г/л бакто-триптон, 5 г/л бакто-дрожжевой экстракт, 10 г/л NaCl), содержащей 100 мкг/мл канамицина, при 37°C и интенсивном перемешивании (250 об./мин) в течение от 16 до 18 ч. Аликвоты ночной культуры (по 1 мл) инокулировали в 400 мл (4×100 мл) среды L×2, содержащей 100 мкг/мл того же антибиотика, после чего растили в тех же условиях до достижения  $A_{600} = 0,8-1,0$ . Затем в аликвоты добавляли изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG) до концентрации 1 мМ и продолжали выращивание в течение 3 ч. Для мутантной формы Fpg (Q234R/R244E) оптимальными условиями экспрессии были выбраны следующие: при достижении  $A_{600} = 0,6$  добавляли IPTG до концентрации 0,2 мМ и продолжали выращивание в течение 5 ч.

Клетки отделяли от среды центрифугированием (10 мин, 10000 g, 4°C). Затем клеточный осадок (от 4 до 6 г) трижды промывали буфером для клеточного лизиса, содержащим 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА, путем ресуспендирования в буфере с последующим центрифугированием. Для выделения фермента в бактериальную суспензию добавляли PMSF (1 мМ) и лизоцим (1 мг/мл) и перемешивали 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляли NaCl до концентрации 1 М и продолжали перемешивание еще 10 мин. Далее клетки разрушали ультразвуком на приборе УЗДН-2Т 8 импульсами по 30 с на максимальной мощности при 22 кГц с выдерживанием на льду в течение 2 мин между импульсами. Клеточный дебрис отделяли центрифугированием (30 мин, 12000 g, 4°C). Белки супернатанта осаждали добавлением сульфата аммония до 60% насыщения и инкубировали 2 ч на льду.

Осадок растворяли в буфере (pH 7,5), содержащем 20 mM Na-фосфат, 1 mM ЭДТА и 200 mM NaCl, после чего наносили на колонку с 25 мл сорбента SP Sepharose (GE Healthcare, США), предварительно уравновешенную тем же буфером. Колонку промывали 50 мл того же буфера и элюировали 50 мл буфера с 800 mM NaCl. Элюат разводился буфером без NaCl до достижения концентрации NaCl 200 mM. Разбавленный элюат в полном объеме наносили на колонку «HiTrap Heparin HP» (1 мл). Элюцию вели градиентом от 200 до 1000 mM NaCl (от 200 до 2000 mM NaCl в случае Q234R/R244E), объем градиента составлял 10 мл. Собирали фракции объемом 1 мл. Фракции белка анализировали электрофорезом в 12% SDS-ПААГ с окрашиванием кумасси R-250. Белковые фракции с чистотой не менее 95% объединяли и при необходимости концентрировали с помощью устройств «Centricon-10» (Millipore, США). Часть финальной фракции использовалась для получения КД спектра, остаток хранился в буфере (pH 7,5), содержащем 20 mM Na-фосфат, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT и 50% (v/v) глицерин, при минус 20°C для дальнейшей работы.

### ***3.13. Определение ферментативной активности мутантных форм Fpg и отдельных структурных доменов***

Для определения активности мутантных форм Fpg реакцию вели в буфере (pH 7,5), содержащем 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ДТТ и 50 нМ дуплекс \*U23/C23 или \*oG23/C23. В случае дуплекса \*U23/C23 для получения AP-субстрата перед реакцией расщепления мутантной или дикой формой Fpg, субстрат обрабатывали Ung, как описано выше. В реакционную смесь добавляли мутантную или дикую форму Fpg до конечной концентрации фермента 0,2 нМ в случае \*U23/C23 и 2 нМ в случае \*oG23/C23 по активной форме, определенной в ходе экспериментов по сшивке соответствующих субстратов, и инкубировали в течение 10 мин при 30°C.

Для определения активности отдельных структурных доменов Fpg реакцию вели в том же буфере с 50 нМ дуплексами \*U23/C23, обработанный Ung для получения AP-субстрата, \*oG23/C23, \*23U/23C для проверки специфичности к Ura-субстрату, \*23dhU/23C или \*23Hур/23C и белком в концентрации 2 мкМ, измеренной по методу Варбурга–Кристиана и дополнительно измеренной на ватмане 3ММ. Реакцию останавливали добавлением раствора FDLB (20 mM ЭДТА, 0,1% ксиленианола, 0,1% бромфенолового синего в формамиде), равного объема и прогреванием смеси при 95°C в течение 1 мин в случае \*U23/C23, обработанного Ung, и 3 мин в остальных случаях. Продукты реакции анализировали электрофорезом в денатурирующем 20% ПААГ. Радиоактивность полос определяли радиолуминесцентным

сканированием экрана Image Screen K с использованием системы Molecular Imager FX (Bio-Rad, США).

### ***3.14. Определение кинетических параметров реакции расщепления ДНК-субстратов с различными структурными параметрами белками OGG1 и Fpg***

Для определения параметров стационарной кинетики для ферментов OGG1 и Fpg реакцию вели в объеме 20 мкл в буфере, содержащем 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ДТТ и радиоактивно меченый ДНК-субстрат, полученный отжигом оцОДН (таблица 3). Фермент перед добавлением разбавляли в 0,5-кратном реакционном буфере с добавлением 0,5 мг/мл БСА; конечная концентрация фермента в реакционной смеси составляла 0,5 нМ для OGG1 и 1 нМ для Fpg. Концентрацию ОДН-субстратов варьировали в зависимости от их последовательности в диапазоне от 2 до 500 нМ для полностью комплементарных дуплексов и от 5 до 1000 нМ для не полностью комплементарных дуплексов. Для полностью комплементарных субстратов после добавления фермента реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 10 мин. в случае OGG1 или 20 мин. в случае Fpg, для не полностью комплементарных субстратов — 30 и 60 мин. соответственно. Реакцию с OGG1 останавливали добавлением 1 мкл 1 М NaOH и прогреванием при 95°C в течение 2 мин., после чего нейтрализовали среду добавлением 1 мкл 1 М HCl. Затем к реакционной смеси добавляли 11 мкл раствора FDLB. В случае Fpg реакцию останавливали просто добавлением FDLB равного объема и прогреванием при 95°C в течение 3 мин. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20% ПААГ, как описано выше. Полученные экспериментальные данные описывали уравнением Михаэлиса–Ментен, параметры уравнения определяли из данных от 3 до 5 независимых экспериментов нелинейной регрессией гиперболической функции в программе SigmaPlot v9.0 (SPSS Inc., США). При невозможности определения отдельных значений  $K_M$  и  $k_{cat}$  из-за недостижимости насыщения фермента субстратом соотношение  $k_{cat}/K_M$  (константа специфичности,  $k_{sp}$ ) рассчитывали из угла наклона зависимости скорости реакции от концентрации субстрата.

### ***3.15. Определение кинетических параметров реакции расщепления 8-охоGua-субстрата, катализируемой мутантными формами фермента Fpg***

Для активных форм Fpg относительно 8-охоGua-субстратов, дополнительно определяли параметры стационарной кинетики расщепления субстрата. Для этого реакцию вели в тех же условиях, за исключением концентрации \*oG23/C23, которую варьировали в диапазоне

от 2 до 100 нМ, и концентрации форм Frg, выбранной 1 нМ. Полученные экспериментальные данные описывали уравнением Михаэлиса–Ментен, параметры уравнения определяли из данных от 3 до 5 независимых экспериментов нелинейной регрессией гиперболической функции в программе SigmaPlot v9.0 (SPSS Inc., США), как описано в разд. 3.14.

### ***3.16. Образование конъюгата ДНК-гликозилаз с субстратом, содержащим AP-сайт или 8-охоGua***

В реакционную смесь, содержащую 500 нМ дуплекс \*U23/C23, 25 мМ Na-фосфат (рН 6,8), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, добавляли 1 ед. акт. урацил-ДНК-гликозилазы (Ung) и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. К полученной смеси одновременно добавляли мутантные формы Frg или C-Frg до концентрации 100 нМ и свежеприготовленный раствор NaBH<sub>4</sub> до концентрации 100 мМ. Реакцию вели в течение 30 мин при 37°C, после чего останавливали добавлением раствора, содержащего 125 мМ Tris-HCl (рН 6.8), 20 % глицерин (v/v), 4 % SDS (w/v), 10 % 2-меркаптоэтанол (v/v) и 25 мкг/мл бромфеноловый синий, равного по объему реакционной смеси. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 12% SDS-ПААГ (система Лэммли) с окрашиванием кумасси R-250. Радиоактивность полос определяли радиолюминесцентным сканированием экрана Image Screen K с использованием системы Molecular Imager FX (Bio-Rad, США). В случае дуплекса \*oG23/C23 инкубирования реакционной смеси с Ung не проводили.

Из эксперимента по сшивке AP-субстрата или oG-субстрата определяли концентрацию активной формы каждого мутантного варианта Frg.

### ***3.17. Определение константы диссоциации комплексов белков с поврежденной ДНК***

Реакцию вели в объеме 20 мкл в буфере, содержащем 25 мМ Tris-HCl (рН 7,5), 50 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА, 0,5 мМ ДТТ и 1 нМ дцОДН \*23F/23C, в составе которого имеется F — нерасщепляемый аналог AP-сайта. Каждая реакционная смесь содержала 2 нМ дуплекс, а концентрация фермента варьировалась от 2,5 нМ до 2,5 мкМ. Электрофорез проводили в неденатурирующих условиях в 8% ПААГ (см. разд. 3.10). После разделения комплекса и свободного дцОДН в геле, радиоактивность полос определяли радиолюминесцентным сканированием экрана Image Screen K с использованием системы Molecular Imager FX. Результаты обсчитывали с использованием программы ImageQuant v5.2. Значение  $K_d$

определяли из данных от 3 до 5 независимых экспериментов нелинейной регрессией гиперболической функции в программе SigmaPlot v9.0.

### **3.18. Определение каталитической константы реакции, катализируемой C-Fpg**

Реакционные смеси объемом 18 мкл, включающие реакционный буфер, содержащий 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 20 нМ дуплекс \*23U/23C и 1 ед. акт. урацил-ДНК-гликозилазы (Ung) инкубировали 30 мин. при 37°C для получения AP-субстрата, затем добавляли в полученные реакционные смеси C-Fpg (конечная концентрация 2 мкМ) и инкубировали каждую смесь при 37°C в течение от 1 до 240 мин. Поскольку AP-сайт недостаточно стабилен при высокой температуре и в присутствии нуклеофильных соединений в растворе, в качестве контролей была поставлена параллельная серия реакций в тех же условиях, но без фермента. Реакцию останавливали добавлением 10 мкл FDLB (раствор 20 мМ ЭДТА, 0,1 % ксиленианол, 0,1 % бромфеноловый синий в формамиде) и прогреванием в течение 1 мин. при 95°C. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20% ПААГ (см. разд. 3.10). Радиоактивность полос определяли радиолюминесцентным сканированием экрана Image Screen K с использованием системы Molecular Imager FX. Результаты обсчитывали с использованием программы ImageQuant v5.2. Значение наблюдаемой  $k_{cat}$  ( $k_{obs}$ ) определяли из данных от 3 до 5 независимых экспериментов нелинейной регрессией функции экспоненциального приближения к максимуму, используя уравнение (1) [275], в программе SigmaPlot v9.0.

$$[P]_t = A_0\{1 - \exp(-k_{obs}t)\} \quad (1)$$

После этого, используя уравнение (2) [275], связывающее  $k_{obs}$  с реальной  $k_{cat}$  ( $k_2$ ), определяли истинное значение константы катализа.

$$k_{obs} = \frac{[E]_0}{K_d - [E]_0} k_2 \quad (2)$$

### **3.19. Определение оптимальных значений pH и ионной силы для активности C-Fpg**

Для оптимизации условий реакции расщепления ДНК-субстрата провели ряд последовательных экспериментов. Реакционные смеси, содержащие 20 нМ дуплекс \*U23/C23, буфер, включающий 1 мМ Tris, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА (для AP-лиазной активности) или 2 мМ MgCl<sub>2</sub> (для эндонуклеазной активности), 1 мМ ДТТ, и 1 ед. акт. урацил-ДНК-гликозилазы (Ung), инкубировали 30 мин. при 37°C. После этого добавляли в каждую смесь

натрийфосфатный буфер (рН от 5,8 до 8,0) и С-Frg до концентрации 2 мкМ. Затем смеси инкубировали 60 мин. при 37°C. Поскольку АР-сайт имеет различную стабильность при разных значениях рН, в качестве контролей использовали серию параллельных экспериментов в тех же условиях, но без добавления фермента. Реакцию останавливали добавлением 10 мкл раствора FDLB равного смеси объема с последующим прогреванием в течение 1 мин. при 95°C, продукты реакции анализировали электрофорезом в 20% ПААГ (см. разд. 3.10). Гель радиоавтографировали, радиоактивность полос определяли радиолюминесцентным сканированием экрана Image Screen К (Kodak, США) с использованием системы Molecular Imager FX (Bio-Rad, США). Степень расщепления субстрата определяли с использованием программы ImageQuant v5.2. Буфер, в котором расщепление субстрата было наибольшим, выбирали в качестве реакционного для последующего эксперимента. Аналогично провели реакцию по определению оптимальной концентрации NaCl в диапазоне от 0 мМ до 200 мМ.

### ***3.20. Анализ термической стабильности мутантных форм Frg методом кругового дихроизма***

Спектры кругового дихроизма (КД) белков в концентрации 1 мкМ регистрировали в диапазоне температур от 20 до 60 °С в термостатированной кварцевой кювете длиной 1 см на спектрополяриметре J-600 (JASCO, Япония). Диапазон длин волн составлял от 200 до 300 нм с шагом 0,1 нм. Данные трех независимых сканирований усреднялись. КД-спектры плавления анализировались согласно модели двух состояний [276]. Полученные значения  $\Delta H^\circ$  и  $\Delta S^\circ$  на каждой длине волны в диапазоне от 205 до 235 нм были усреднены.

### ***3.21. Козволюционный анализ аминокислотных остатков белка Frg***

В сотрудничестве с к.б.н. Д. А. Афонниковым (ИЦиГ СО РАН) был проведен анализ коэволюции аминокислотных остатков в структуре белков Frg и Nei, важных для их функционирования. Поиск коэволюционных пар основывался на коэффициентах корреляции  $r_{ij-g}$  между физико-химическими свойствами  $f$  остатков в положениях белка  $i$  и  $j$ , позволяя оценить взаимосвязь между  $f_i$  и  $f_j$  в отсутствие взаимодействий в контексте множества  $g$  остальных аминокислотных остатков в белке [277, 278]. В качестве физико-химических свойств были выбраны изоэлектрическая точка и гидрофобность [279].

### ***3.22. Молекулярная динамика Frg дикого и мутантных форм***

Анализ молекулярной динамики белка в комплексе с 8-охоGua-содержащей ДНК проводили в сотрудничестве с к. х. н. А. В. Поповым (ИХБФМ СО РАН) с использованием программного пакета BioPASED [280]. В качестве входных данных для моделирования были выбраны PDB-структуры 1R2Y [281] и 1K82 [282].

### **3.23. Определение содержания Zn в диком и мутантных формах белка Fpg**

Содержание ионов Zn в белке Fpg дикого типа и его мутантных формах определялось параллельно атомно-эмиссионной спектроскопией с индуктивно связанной плазмой (iCAP-6500 спектрометр, Thermo Fisher Scientific, USA) и инверсионной вольтамперометрией (комплекс СТА, ИТМ, Россия) в сотрудничестве с к.х.н. А. Р. Цыганковой и к.х.н. Т. В. Скибой (ИНХ СО РАН). Образцы от 2 до 3 независимых приготовлений анализировались каждым из методов при 25°C. Усредненные значения по двум методам принимались за содержание Zn в белке.

### **3.24. Расчет траектории выворачивания нуклеотидов белками Fpg и OGG1**

Расчет основывается на методе «подталкивания упругой ленты» (Nudged Elastic Band) [283], подразумевающий поиск траектории с минимальной энергией между двумя заданными состояниями — предельными состояниями. В рамках данной работы в сотрудничестве с проф. К. Симмерлигом (Университет штата Нью-Йорк в Стоуни-Брук, США) для расчета траектории выворачивания нуклеотидов 8-oxodGuo и dGuo из внутриспирального положения в активный центр фермента применялись частные варианты этого метода [284] с адаптированным протоколом моделирования [285, 286]. Крайними состояниями для выворачивания нуклеотидов белком Fpg из *Geobacillus stearothermophilus* были выбраны структуры PDB-структура 2F5O (внутриспиральное положение основания) [287] и PDB-структура 1R2Y (полностью вывернутое состояние) [281]. Для белка OGG1 человека в качестве предельного состояния с вывернутым из ДНК нуклеотидом была выбрана PDB-структура 1EBM [288]. Поскольку в настоящее время кристаллической структуры OGG1 в комплексе с ДНК с полностью внутриспиральным положением основания не существует, в качестве входных данных для моделирования была выбрана PDB-структура 2I5W [289], представляющая собой предполагаемый ранний интермедиат выворачивания. Предельное состояние с внутриспиральным основанием было получено компьютерным моделированием на основе PDB-структуры 2I5W. Для моделирования выворачивания 8-охоGua белком OGG1 дополнительно использовалась PDB-структура 1YQK [290] с предполагаемым поздним интермедиатом выворачивания. Расчет поверхности свободной энергии  $\Delta G^\circ$  проводили методом потенциала средней силы (potential of mean force) [291].

### **3.25. Исследование влияния фосфоротиоатных замен в ДНК-субстратах на активность OGG1 и Fpg**

Для определения активности ДНК-гликозилаз реакцию вели в буфере (рН 7,5), содержащем 50 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 10 нМ фермент и 100 нМ дуплекс, полученный отжигом радиоактивно меченного ОДН с 8-охоGua и фосфоротиоатной группой в различных положениях (таблица 6) и комплементарного С23, в течение 20 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением раствора FDLB (20 мМ ЭДТА, 0,1% ксиленцианола, 0,1% бромфенолового синего в формамиде), равного объема и прогреванием смеси при 95°C в течение 3 мин. Продукты реакции анализировали электрофорезом в денатурирующем 20% ПААГ. Радиоактивность полос определяли радиолюминесцентным сканированием экрана Image Screen K с использованием системы Molecular Imager FX (Bio-Rad, США).

Для экспериментов в условиях кинетики одного оборота использовали тот же буфер, 100 нМ OGG1 и 5 нМ PS1oG/23C или 23oG/23C. Реакцию вели при 4°C в течение от 0,5 до 60 минут. Остановка реакции и дальнейший анализ аналогичны описанному выше.

### **3.26. Определение кинетических параметров реакции расщепления ДНК-субстратов с одноцепочечными разрывами белком Fpg**

Методика в целом аналогична разделу 3.14. Для определения параметров стационарной кинетики концентрация Fpg в реакционной смеси составляла 4 нМ, концентрацию субстратов, полученных отжигом трех оцОДН, варьировали в диапазоне от 5 до 200 нМ. Реакцию инициировали добавлением фермента и вели 5 мин. при 30°C. Для сравнения доли  $\beta$ - и  $\delta$ -элиминирования использовали 40 нМ субстраты и 4 нМ Fpg в тех же условиях. Остановка реакции и дальнейший анализ аналогичны методике, описанной ранее для Fpg. Эффект разрывов на константы стационарной кинетики описывали как  $\frac{k_{br}-k_{nbr}}{\min(k_{br};k_{nbr})}$ , где  $k_{br}$ ,  $k_{nbr}$  — константа в присутствии и в отсутствие разрыва соответственно.

### **3.27. Анализ нормальных мод колебаний комплекса Fpg-ДНК**

Анализ крупномасштабных колебаний комплекса Fpg-ДНК был основан на методе упругой сети [292, 293] и проводился с использованием веб-ресурса Anisotropic Network Model Web Server v2.1 [294]. В качестве моделей были выбраны PDB-структуры Fpg *E. coli* 1K82 [282] и *G. stearothermophilus* 1R2Y [281] и 3GQ3 [295]. Модели при необходимости дополнительно редактировались для исключения ковалентных ДНК-белковых сшивок, введенных для

кристаллизации. Было рассчитано 20 нормальных мод низших частот с ограничением в 15 Å для взаимодействия между сетевыми узлами. Структурные измерения проводились с использованием программы MDTRA [296].

## 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1. Влияние структуры ДНК на субстратную специфичность ферментов OGG1 и Fpg

Конформационное соответствие между молекулами ДНК и фермента и жесткость молекулы ДНК входят в число главных факторов, определяющих эффективность узнавания субстрата ДНК-зависимыми ферментами. Например, наличие неканонической пары оснований в составе ОДН может существенно влиять на его конформацию, которая будет отличаться от нативной. Таким образом, не исключено, что изгиб ДНК, вызванный присутствием неканонических пар оснований и конформационными особенностями последовательности, будет оказывать влияние на кинетические параметры реакции, катализируемой ДНК-гликозилазами. Для проверки этого предположения были сконструированы двухцепочечные 23-звенные ОДН-субстраты (всего 21), которые содержали поврежденное основание 8-охоGua (таблица 8). В составе некоторых субстратов по соседству с поврежденным звеном с обеих сторон присутствовали 1 или 3 неканонические пары оснований разного состава. Кроме того, субстраты различались последовательностью: с разных сторон от поврежденного звена находились АТ- или GC-богатые гомоолигомерные участки либо участки с чередующейся последовательностью, которые характеризуются разной жесткостью и локальными конформационными параметрами.

На рисунке 22 и рисунке 23 приведены результаты типичных экспериментов по определению кинетических параметров ( $K_M$ ,  $k_{cat}$ ) реакции расщепления ДНК-субстратов ферментом OGG1. Полученные значения констант для всех субстратов приведены в таблице 8.

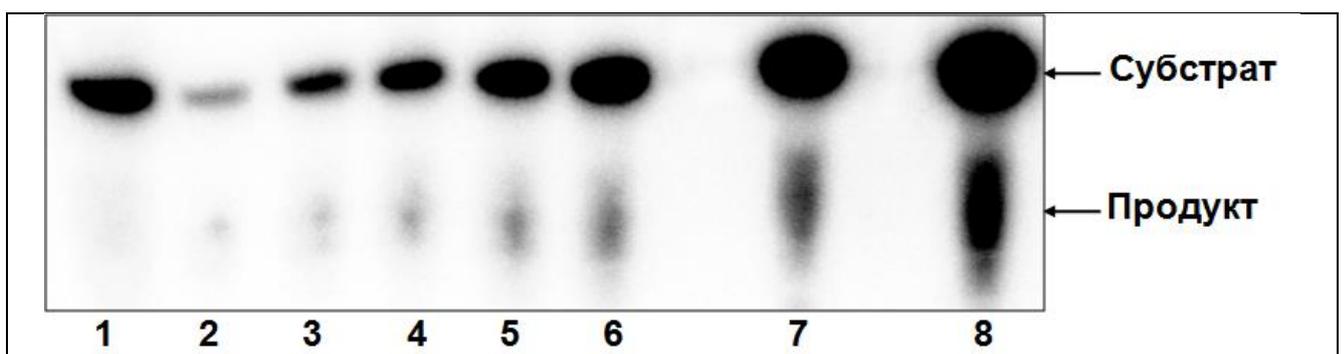


Рисунок 22. Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов реакции расщепления субстрата-дуплекса X (см. таблицу 8) ферментом OGG1. 1 – контроль без фермента; концентрации субстрата на дорожке: 2 – 2 нМ; 3 – 6 нМ; 4 – 12 нМ; 5 – 20 нМ; 6 – 40 нМ; 7 – 100 нМ; 8 – 200 нМ.

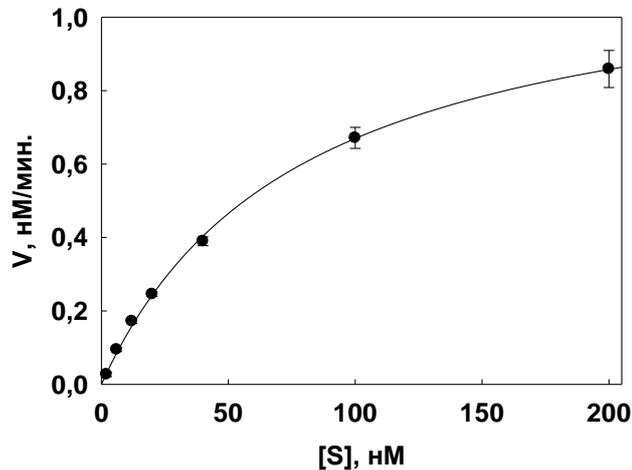


Рисунок 23. Зависимость скорости удаления поврежденного основания ферментом OGG1 от концентрации субстрата-дуплекса X (см. таблицу 8).

Согласно полученным данным, значения  $K_M$  для реакций расщепления полностью комплементарных дцОДН были в большинстве случаев в несколько раз меньше, чем для реакций с участием не полностью комплементарных дуплексов, в то время как значения  $k_{cat}$  варьировали гораздо меньше. Последнее свидетельствует о том, что гибкость и конформация ОДН-субстратов в свободном состоянии слабо влияют на эффективность реакции после образования фермент-субстратного комплекса. С другой стороны, высокие значения  $K_M$  говорят о затрудненном образовании фермент-субстратного комплекса, которое может быть вызвано особенностями структуры дуплексов, содержащих неканонические пары.

Неканоническая пара, находящаяся только с одной стороны от поврежденного звена, практически не оказывала влияния на величину  $K_M$ , значение которой (46 нМ, субстрат XII) находилось в диапазоне значений для полностью комплементарных дуплексов разной последовательности (от 11 до 78 нМ, субстраты I, IV, VII–XI). Таким образом, одна соседняя неканоническая пара практически не препятствует взаимодействию фермента с субстратом. Напротив, две соседние пары, полностью неспособные образовывать комплементарные связи (субстрат II), повышали значение  $K_M$  от 5 до 35 раз по сравнению с расщеплением полностью комплементарных субстратов. Аналогичный результат наблюдался и для дуплексов, содержащих по три неканонические пары с каждой стороны (субстраты III и VI). Примечательно, что в случае субстрата V, в котором поврежденное звено было окружено



<sup>2</sup>Приведено среднее и стандартная ошибка от 3 до 5 независимых экспериментов.

Считается, что при приблизительно равной встречаемости разных dN в последовательности ось ДНК имеет форму, близкую к прямой, однако при повторении одного и того же dN или короткой последовательности dN начинают преобладать характерные для них локальные конформационные параметры, и ось ДНК начинает изгибаться, что может способствовать или, наоборот, препятствовать образованию комплекса с ферментом [297]. К тому же, разные последовательности могут придавать ДНК разную гибкость. Например, последовательность из повторяющихся звеньев Thy сообщает ДНК максимальную жесткость, в то время как за счет звеньев Gua и Cyt ее структура приобретает большую гибкость [298]. Среди полностью комплементарных субстратов можно выделить несколько пар, обладающих сходной структурой, но отличающихся по кинетическим параметрам реакции их расщепления. Так, последовательности субстратов I и IV отличаются только парами, соседними с 8-охоGua (Cyt:Gua для субстрата I, Thy:Ade для субстрата IV). При этом значение  $K_M$  для реакции расщепления субстрата I в 2,6 раза ниже, чем для расщепления субстрата IV, что наталкивает на мысль о влиянии на эту величину нуклеотидного контекста, в котором более гибкое окружение 8-охоGua способствует связыванию фермента OGG1 с ДНК. Кроме того, значение  $k_{cat}$  для субстрата I несколько выше, что согласуется с механизмом действия фермента, который после связывания ДНК изламывает ее и выворачивает поврежденный dN; эти процессы должны облегчаться для более гибкой ДНК. Субстраты VII и VIII практически симметричны относительно пары 8-охоGua:Cyt и имеют разные плечи, одно из которых, dAdo<sub>9-11</sub>:Thd<sub>9-11</sub>, более жесткое и более изогнутое, а другое, состоящее из звеньев dGuo и dCyd, более гибкое и, скорее всего, линейного строения. Значение  $K_M$  для реакции расщепления субстрата VIII повышено в 2,5 раза по сравнению с субстратом VII, однако одновременно в 2,4 раза повышено и значение  $k_{cat}$ . Данные различия в кинетических параметрах могут быть связаны с тем, что белок OGG1 взаимодействует с ДНК по большей части с 3'-стороны от поврежденного звена, поэтому разница в строении этой области ОДН может оказывать влияние как на связывание OGG1 с субстратом, что объясняет изменение значения  $K_M$ , так и на конформацию и динамику фермент-субстратного комплекса, что объясняет изменение значения  $k_{cat}$ .

Помимо величин  $K_M$  и  $k_{cat}$ , при кинетическом анализе ферментативных реакций часто пользуются константой специфичности ( $k_{sp} = k_{cat}/K_M$ ). Чем выше значение  $k_{sp}$ , тем эффективнее данный субстрат превращается данным ферментом. Значения  $k_{sp}$  для полностью комплементарных дуплексов в среднем на порядок превосходили ее значения для дуплексов, содержащих соседние с повреждением неканонические пары. При этом, как и в случае значений  $K_M$ , значения  $k_{sp}$  для субстратов с парами Thy:Gua попадают в диапазон типичных значений для

полностью комплементарных дуплексов. Взаимодействие OGG1 с симметричными относительно пары 8-охоGua:С субстратами VII и VIII, которые имеют разные по жесткости плечи, характеризуется различными значениями  $K_M$ , что говорит о разном сродстве фермента к данным субстратам, однако вместе с увеличением  $K_M$  для субстрата VIII пропорционально увеличивается и  $k_{cat}$ , поэтому специфичность обоих субстратов характеризуется практически одинаковыми значениями  $k_{sp}$ .

Одним из возможных параметров ДНК-субстратов, влияющих на активность гликозилаз, может быть легкость их плавления, поскольку узнавание поврежденных оснований происходит с изломом ДНК в области повреждения с последующим выворачиванием поврежденного нуклеотида. Методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала были определены температуры плавления дуплексов и рассчитаны значения величин  $\Delta S^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  и  $\Delta G^\circ$  (рисунок 24, таблица 9).

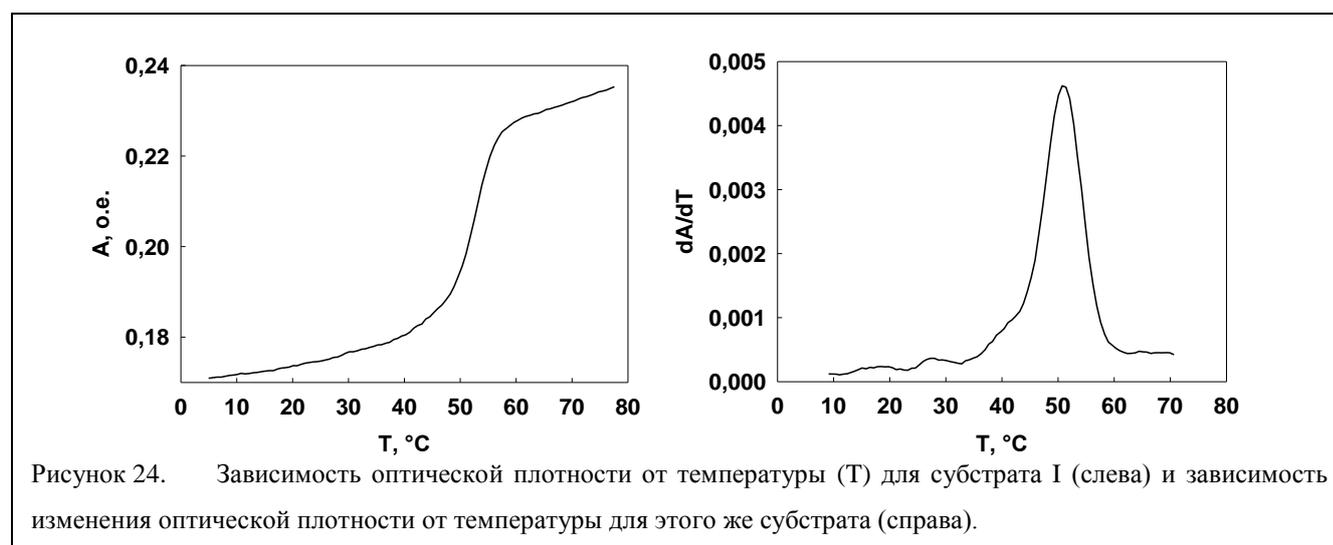


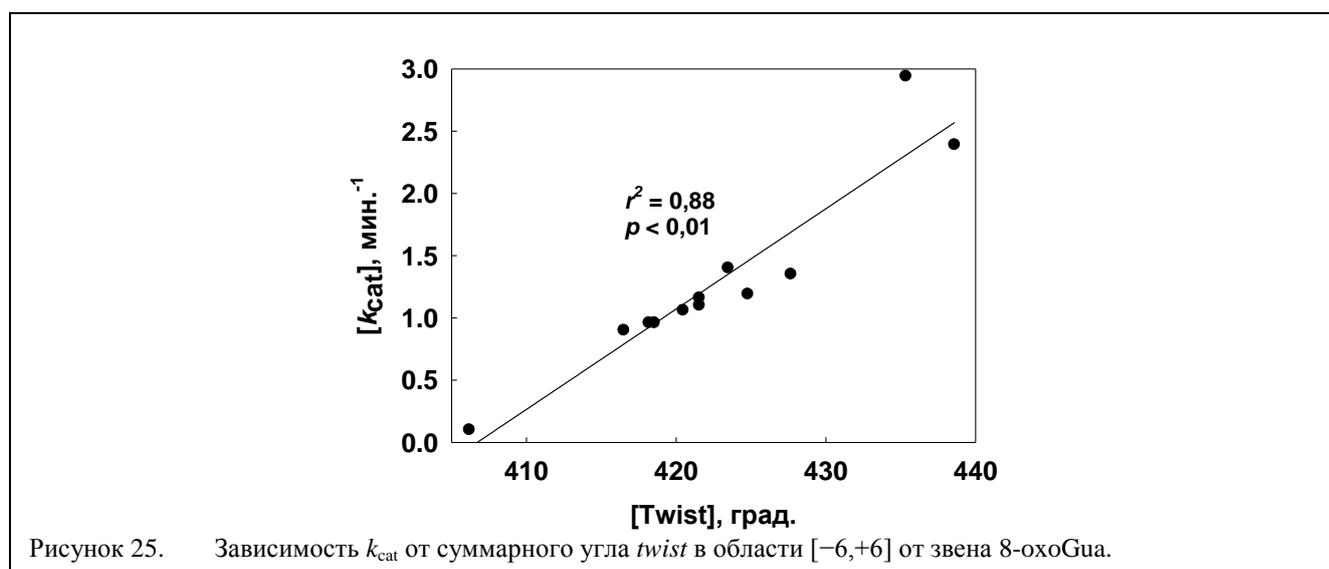
Таблица 9. Термодинамические параметры плавления дуплексов

	Субстрат <sup>1</sup>	$\Delta S$ (кал/моль×К)	$\Delta H^\circ$ (ккал/моль)	$\Delta G^{37}$ (ккал/моль)	$T_{пл}$ , °С
I	5'-TTTTTTTTTTCXCTTTTTTTTTTT-3' 3'-AAAAAAAAAAGCGAAAAAAAAAAAA-5'	426±43	147±15	14,6±1,4	50,5±0,5
II	5'-TTTTTTTTTTCXCTTTTTTTTTTT-3' 3'-AAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAA-5'	320±32	107±11	7,6±0,7	34,2±0,5
III	5'-TTTTTTTTTTCXCTTTTTTTTTTT-3' 3'-AAAAAAACCCCAAAAAAAAAAAAA-5'	320±32	102±10	2,2±0,2	18,9±0,5
IV	5'-TTTTTTTTTTTXXTTTTTTTTTTTT-3' 3'-AAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAA-5'	311±31	108±11	11,6±1,1	46,0±0,5
V	5'-TTTTTTTTTTTXXTTTTTTTTTTTT-3' 3'-AAAAAAAAAAGCGAAAAAAAAAAAA-5'	414±41	137±14	8,7±0,9	37,5±0,5
VI	5'-TTTTTTTTTTTXXTTTTTTTTTTTT-3' 3'-AAAAAAACCCCAAAAAAAAAAAAA-5'	318±31	102±10	3,7±0,4	23,1±0,5
VII	5'-AAAAAAAAAACXCGCCCGCCGCG-3' 3'-TTTTTTTTTTGCGCGGGCGGGCGC-5'	324±32	121±12	20,7±2,1	71,8±0,5

VIII	5' -CCGCCCCGCGC <b>X</b> CAAAAAAAAAA-3' 3' -GGCGGGCGCGCTTTTTTTTTTT-5'	376±38	138±14	21,1±2,1	68,2±0,5
IX	5' -TTTTTTTGGG <b>X</b> GGGTTTTTTTTT-3' 3' -AAAAAAACCCCCCAAAAAAAAAA-5'	387±39	137±14	16,7±1,7	56,7±0,5
X	5' -GAGCGAGCGC <b>X</b> CGCGAGCGAGCG-3' 3' -CTCGCTCGCGCGCTCGCTCGC-5'	231±23	92±9	19,9±2,0	81,3±0,5
XI	5' -CTCTCCCTTC <b>X</b> TCCTTTCCTCT-3' 3' -GAGAGGGAAGCGAGGAAAGGAGA-5'	383±38	138±14	19,6±2,0	64,0±0,5
XII	5' -CTCTCCCTTC <b>X</b> TCCTTTCCTCT-3' 3' -GAGAGGGAAGCGAGGAGAGGAGA-5'	307±31	114±11	18,4±1,8	66,7±0,5
XIII	5' -CTCTCCCTTC <b>X</b> TCCTTTCCTCT-3' 3' -GAGAGGGGAGCGAGGAGAGGAGA-5'	349±35	129±13	20,7±2,1	69,3±0,5
XIV	5' -CTCTCCCTTC <b>X</b> TCCTTTCCTCT-3' 3' -GAGAGGGGAGCGAGGAAAGGAGA-5'	382±38	140±14	21,2±2,1	67,9±0,5
XV	5' -CTCTCCCTTC <b>X</b> TCCTTTCCTCT-3' 3' -GAGAGGAAAGCGAGGAAAGGAGA-5'	388±39	140±14	19,4±1,9	63,1±0,5
XVI	5' -CTCTCCCTTC <b>X</b> ATCCTTTCCTCT-3' 3' -GAGAGGGAAGCTAGGAAAGGAGA-5'	340±34	123±12	17,9±1,8	62,5±0,5
XVII	5' -CTCTCCCTTC <b>X</b> TCCTTTCCTCT-3' 3' -GAGAGGGAAGCGAGGAGAGGAGA-5'	336±34	121±12	16,8±1,7	59,9±0,5
XVIII	5' -CTCTCCCTTC <b>X</b> TCCTTTCCTCT-3' 3' -GAGAGGGGAGCGAGGAGAGGAGA-5'	307±31	110±11	14,6±1,5	55,2±0,5
XIX	5' -CTCTCCCTTC <b>X</b> TCCTTTCCTCT-3' 3' -GAGAGGGGAGCGAGGAAAGGAGA-5'	394±39	141±14	18,6±1,9	61,0±0,5
XX	5' -CTCTCCCTTC <b>X</b> TCCTTTCCTCT-3' 3' -GAGAGGAAAGCGAGGAAAGGAGA-5'	261±26	95±10	13,8±1,4	55,3±0,5
XXI	5' -CTCTCCCTTC <b>X</b> TCCTTTCCTCT-3' 3' -GAGAGGGAAGCTAGGAAAGGAGA-5'	366±37	130±13	16,0±1,6	56,0±0,5

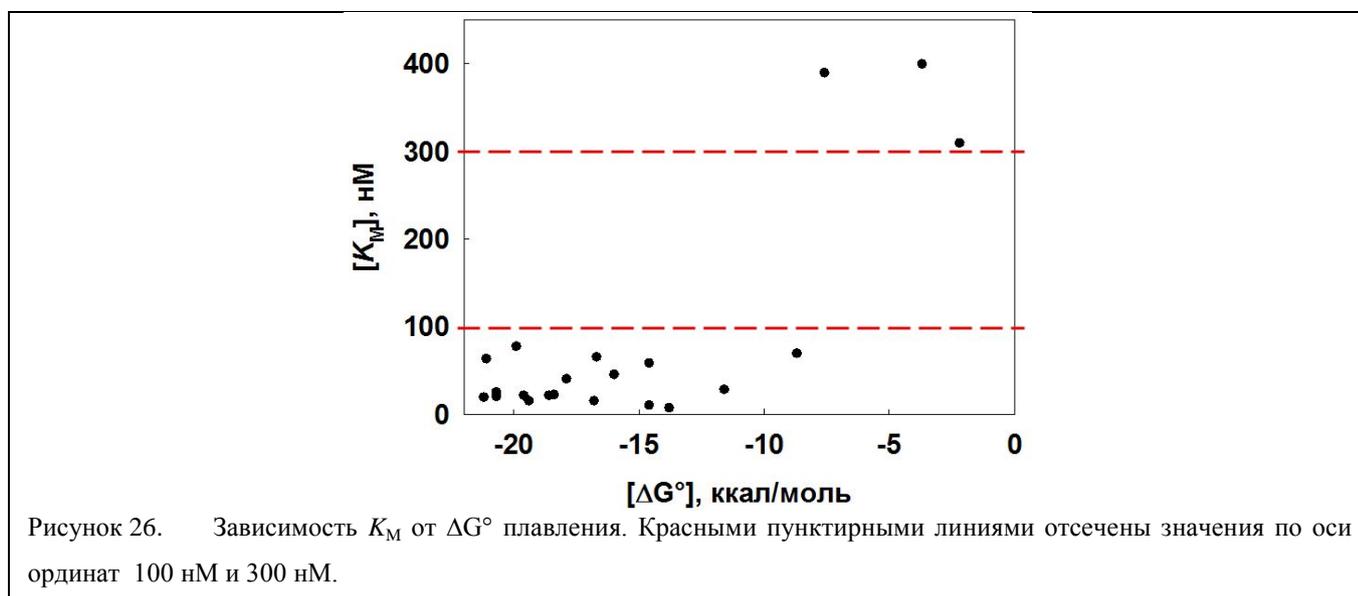
<sup>1</sup>Везде X = 8-охоGua.

Используя данные таблицы 8, был проведен анализ корреляций кинетических констант с расчетными локальными конформационными параметрами (см. разд. 3.9) и термодинамическими параметрами плавления ДНК-субстратов. Была обнаружена корреляция между величинами  $k_{cat}$  и суммарным углом  $twist$  в области  $[-6,+6]$  от 8-охоGua (рисунок 25).



Поскольку ферменту для осуществления катализа необходимо изогнуть дцДНК и вывернуть поврежденный нуклеотид из спирали, то, исходя из данных, представленных на рисунке 25, можно предположить, что в более закрученной цепи процесс выворачивания облегчен за счет существования механического напряжения, облегчающего расплетание дуплекса в области поврежденного основания при взаимодействии с ферментом.

При анализе зависимости  $K_M$  от свободной энергии плавления дуплексов все субстраты разделились на две группы. Большая часть ДНК-субстратов характеризуется значениями  $K_M$  менее 100 нМ и достаточно высокой термической стабильностью, а субстраты с несколькими или двумя соседними с повреждением неканоническим парами ожидаемо попали в группу со значениями  $K_M$  выше 300 нМ и низким абсолютным значением свободной энергии (рисунок 26). Можно предположить, чем больше величина  $\Delta G^\circ$ , вызванная более низкой температурой плавления дуплекса, тем большая часть дцДНК-субстрата существует в частично одноцепочечном состоянии, что ведет к повышению величины  $K_M$ , поскольку белок OGG1 неактивен по отношению к одноцепочечной ДНК [299]. В менее стабильном дуплексе значительная часть молекул может иметь и другие отклонения от канонической В-формы ДНК, что тоже может приводить к нарушению его взаимодействия с OGG1.



Поскольку белок Fpg существенно отличается по структуре от белка OGG1, заметно различаются и контакты, образуемые этими двумя ферментами с ДНК-субстратом в составе комплексов, соответствующих разным стадиям реакции, а также механизмы реакции удаления поврежденного основания. Поэтому сравнение значений конкретных кинетических параметров реакций с участием этих двух белков не имеет смысла. Гораздо более информативен в этом случае анализ закономерностей зависимости кинетических параметров от структуры ДНК-

субстрата для белка Fpg (таблица 10) и последующее сравнение этих закономерностей с уже рассмотренными для белка OGG1.

Как и в случае фермента OGG1, значения  $K_M$  для дуплексов, содержащих соседние неканонические пары (субстраты II, III, V), были значительно выше, чем для полностью комплементарных дуплексов. Эта группа субстратов также характеризуется самыми низкими значениями  $k_{sp}$ . Примечательно то, что для субстрата VI, обладающего наибольшим полученным значением  $K_M$  (400 нМ) для белка OGG1, вовсе не удалось получить в условиях Михаэлиса–Ментен отдельных значений  $K_M$  и  $k_{cat}$ , поэтому неудивительно, что именно этому дуплексу соответствует наименьшее значение  $k_{sp}$  ( $(4,8 \pm 0,2) \times 10^{-5} \text{ нМ}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$ ). Таким образом, можно предположить, что дестабилизация дуплекса, вызванная присутствием соседних с поврежденным основанием пар, не способных к образованию комплементарных связей, заметно препятствует образованию каталитически компетентного фермент–субстратного комплекса.

Таблица 10. Кинетические параметры реакции удаления поврежденного основания ферментом Fpg

	Субстрат <sup>1</sup>	$K_M$ , нМ <sup>2</sup>	$k_{cat}$ , мин. <sup>-1</sup>	$k_{sp}$ , нМ <sup>-1</sup> ×мин. <sup>-1</sup>
I	5' -TTTTTTTTTTC <b>X</b> TTTTTTTTTTT-3' 3' -AAAAAAAAAAGCGAAAAAAAAAA-5'	13±3	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^{-1}$	$(9,2 \pm 2,3) \times 10^{-3}$
II	5' -TTTTTTTTTTC <b>X</b> TTTTTTTTTTT-3' 3' -AAAAAAAAAAACAAAAAAAAAA-5'	270±160	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^{-1}$	$(6,0 \pm 3,7) \times 10^{-4}$
III	5' -TTTTTTTTTTC <b>X</b> TTTTTTTTTTT-3' 3' -AAAAAAACCCCCCAAAAAAAAA-5'	180±100	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-1}$	$(5,5 \pm 3,1) \times 10^{-4}$
IV	5' -TTTTTTTTTTT <b>X</b> TTTTTTTTTTT-3' 3' -AAAAAAAAAAACAAAAAAAAAA-5'	3,0±0,6	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-1}$	$(3,3 \pm 0,7) \times 10^{-2}$
V	5' -TTTTTTTTTTT <b>X</b> TTTTTTTTTTT-3' 3' -AAAAAAAAAAGCGAAAAAAAAAA-5'	270±60	$(4,1 \pm 0,3) \times 10^{-2}$	$(1,5 \pm 0,4) \times 10^{-4}$
VI	5' -TTTTTTTTTTT <b>X</b> TTTTTTTTTTT-3' 3' -AAAAAAACCCCCCAAAAAAAAA-5'	— <sup>3</sup>	— <sup>3</sup>	$(4,8 \pm 0,2) \times 10^{-5}$
VII	5' -AAAAAAAAAC <b>X</b> CGCCCGCCGCG-3' 3' -TTTTTTTTTGCGCGGGCGGGCGC-5'	— <sup>3</sup>	— <sup>3</sup>	$(3,0 \pm 0,1) \times 10^{-3}$
VIII	5' -CCGCCGCGCG <b>X</b> CAAAAAAAAA-3' 3' -GGCGGGCGCGCTTTTTTTTTTT-5'	— <sup>3</sup>	— <sup>3</sup>	$(2,7 \pm 0,1) \times 10^{-3}$
IX	5' -TTTTTTTTGGG <b>X</b> GGGTTTTTTTTTT-3' 3' -AAAAAAACCCCCCAAAAAAAAA-5'	— <sup>3</sup>	— <sup>3</sup>	$(5,7 \pm 0,2) \times 10^{-3}$
X	5' -GAGCGAGCGC <b>X</b> CGCGAGCGAGCG-3' 3' -CTCGCTCGCGCGCTCGCTCGC-5'	230±40	$(8,1 \pm 0,8) \times 10^{-1}$	$(3,5 \pm 0,8) \times 10^{-3}$
XI	5' -CTCTCCCTT <b>X</b> CTCCTTTCTCT-3' 3' -GAGAGGGAAGCGAGGAAAGGAGA-5'	30±9	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-1}$	$(3,3 \pm 1,0) \times 10^{-3}$
XVI	5' -CTCTCCCTT <b>X</b> ATCCTTTCTCT-3' 3' -GAGAGGGAAGCTAGGAAAGGAGA-5'	52±16	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-1}$	$(1,9 \pm 0,6) \times 10^{-3}$
XVII	5' -CTCTCCCTT <b>X</b> CTCCTTTCTCT-3' 3' -GAGAGGGAAGCGAGGAGAGGAGA-5'	3,8±1,3	$(7,0 \pm 0,4) \times 10^{-2}$	$(1,8 \pm 0,6) \times 10^{-2}$

<sup>1</sup>Везде X = 8-охоGua.

<sup>2</sup>Приведено среднее и стандартная ошибка от 3 до 5 независимых экспериментов.

<sup>3</sup>Не удалось определить в качестве отдельного параметра из-за слабого расщепления.

Наличие одной неканонической пары, не соседствующей непосредственно с поврежденным звеном (субстрат XVII), не приводило к значительной дестабилизации дуплекса и не препятствовало взаимодействию фермента с ДНК-субстратом. Эти закономерности были общими для ферментов Fpg и OGG1. Интересно, что график зависимости скорости реакции от концентрации субстрата не достигал насыщения для полностью комплементарных дуплексов VII, VIII и IX, что сделало невозможным определение по отдельности значений  $K_M$  и  $k_{cat}$ . Тем не менее, значения  $k_{sp}$  для этих субстратов соответствуют типичным значениям для полностью комплементарных дуплексов, которые, как и в случае OGG1, в среднем на порядок выше значений  $k_{sp}$  для дуплексов, содержащих соседние с повреждением неканонические пары. Как и в случае фермента OGG1, субстраты VII и VIII существенно не различались по значению  $k_{sp}$  реакции их расщепления ферментом Fpg. Вариация значений  $k_{cat}$  в достаточно узких пределах, как уже отмечалось для OGG1, вероятно, свидетельствует о малом влиянии дестабилизации дуплекса после образования фермент-субстратного комплекса на протекание ферментативной реакции. Таким образом, влияние природы ДНК-субстрата на каталитическую эффективность ферментов во многом совпадает для Fpg и OGG1.

#### ***4.2. Анализ термодинамических параметров коаксиального стэкинга 8-охоGua***

Выворачивание поврежденного нуклеотида в активный центр фермента, сопровождающееся изломом спирали ДНК — общий механизм, используемый ДНК-гликозилазами разных суперсемейств (таблица 2). При этом происходит нарушение взаимодействий как с комплементарным (водородные взаимодействия), так и с соседними основаниями (стэкинг-взаимодействия).

В геномной ДНК основания напротив повреждения могут варьироваться, главным образом, из-за ошибок при репликации. Однако частота включений ДНК-полимеразами различных нуклеотидов напротив повреждения может отличаться на порядки. По этой причине в ДНК напротив 8-охоGua в подавляющем большинстве случаев встречается Cyt или Ade [300]. Другая картина наблюдается с парой оснований, соседних с повреждением. Так, ближайшее нуклеотидное окружение поврежденного нуклеотида может описываться шестнадцатью различными вариантами, без учета модификаций оснований ДНК. Логично предположить, что суммарная энергия стэкинг-взаимодействий повреждения будет варьироваться в зависимости от его нуклеотидного окружения, что в случае ДНК-гликозилаз может отразиться как на эффективности выворачивания такого нуклеотида из спирали ДНК, так и на активности ферментов в целом. Достаточно небольшое число работ, посвященных исследованию влияния

контекста ДНК на активность ДНК-гликозилаз, подтверждают это предположение. Несмотря на малую выборку окружения 8-охоGua в таких исследованиях, эффективность расщепления субстратов в зависимости от контекста может различаться в десятки раз [301, 302]. Подобные результаты лишь подтверждают, что нуклеотидный контекст, в котором находится повреждение, может влиять на протекание ферментативной реакции, однако они не позволяют выявлять закономерности наблюдаемого влияния или достоверно предсказывать его. В то же время наличие полной панели значений энергий коаксиального стэкинга для повреждений в зависимости от окружения представляется чрезвычайно полезным для исследования свойств ферментов как системы репарации, так и других ферментативных систем процессинга ДНК. Хотя создание такого набора данных — достаточно трудоемкий процесс, получение данных только для 8-охоGua позволит расширить исследовательский инструментарий для 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилаз разных организмов и других ДНК-зависимых белков.

С этой целью методом термической денатурации в растворе был определен полный набор термодинамических параметров суммарного (с 5'- и 3'-стороны) стэкинг-взаимодействия 8-охоGua во всех 16 возможных нуклеотидных окружениях. В сотрудничестве с ЛБМХ ИХБФМ СО РАН была разработана система, позволяющая получать термодинамические параметры коаксиального стэкинга в ходе плавления ДНК-комплексов, формируемых октануклеотидом с комплементарным ему одноцепочечным участком 28-звенной ДНК-матрицы (рисунок 27 А). Причем, поскольку 8-охоGua в ДНК обычно контактирует с основаниями с 5'- и 3'-стороны, система разрабатывалась с учетом возможности измерять по отдельности параметры взаимодействий с каждой стороны относительно повреждения (рисунок 27 А). Помимо одноцепочечного участка матрица содержала высокостабильную шпильку с  $T_{пл}$  около 80°C (рисунок 28), что позволяло описывать комплексообразование октануклеотида в приближении модели двух состояний, т. к. шпильчатая структура матрицы сохранялась во всем температурном интервале плавления межмолекулярного комплекса [303]. При гибридизации октануклеотида с одноцепочечным участком матрицы на стыке двух дуплексных участков происходило формирование кооперативного контакта через разрыв 5'-X...GY-3' или 5'-XG...Y-3', где G — 8-охоGua или Gua, многоточие — положение разрыва, X и Y — нуклеотиды с 5'- и 3'-стороны соответственно (рисунок 27 А). В сущности, такая система представляла собой существенную доработку метода, используемого для исследования коаксиального стэкинга при тандемном комплексообразовании ОДН [304].

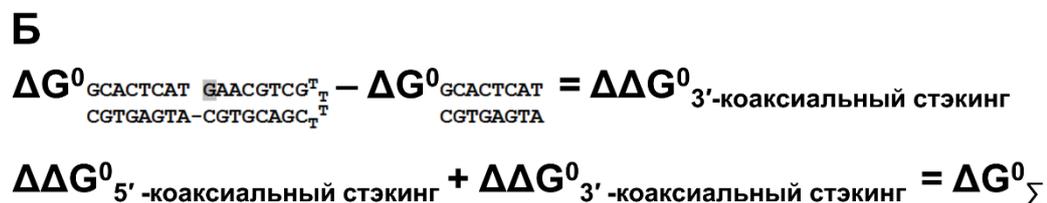
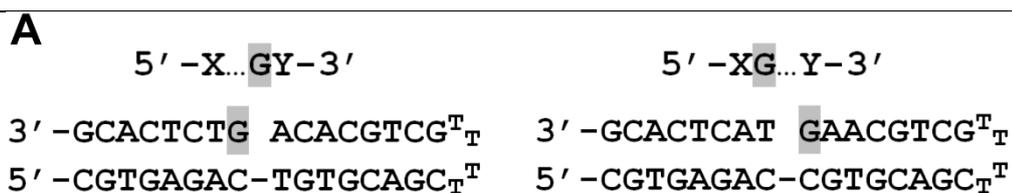


Рисунок 27. Система для исследования коаксиального стэкинга. А — Комплексы для получения термодинамических параметров стэкинга с 5'- и 3'-стороны относительно целевого нуклеотида; Б — расчет суммарной энергии стэкинга; «G» на сером фоне для А и Б — 8-охоGua или Gua.

Варьируя нуклеотидное окружение 8-охоGua в положениях X и Y с учетом их комплементарных взаимодействий для обоих типов системы (с 5'- и 3'-разрывом относительно повреждения), были получены термодинамические параметры образования комплексов как контрольных октамеров, т. е., не содержащих шпилечный фрагмент, так и октамеров при гибридизации встык. Возникающие при этом кооперативные контакты (коаксиальный стэкинг) рассчитаны как разница свободной энергии образования октануклеотидного дуплексного участка в составе тандемного комплекса ( $\Delta G^0_{\text{танд. компл.}}$ ) и свободной энергии образования контрольного короткого дуплекса ( $\Delta G^0_{\text{контр.}}$ ) (рисунок 27 Б). В этом случае полный эффект от стэкинга с двух сторон от повреждения ( $\Delta G^0_{\Sigma}$ ) выражается суммой отдельных взаимодействий ( $\Delta \Delta G^0_{5'}$  и  $\Delta \Delta G^0_{3'}$ ) для определенного нуклеотидного окружения.

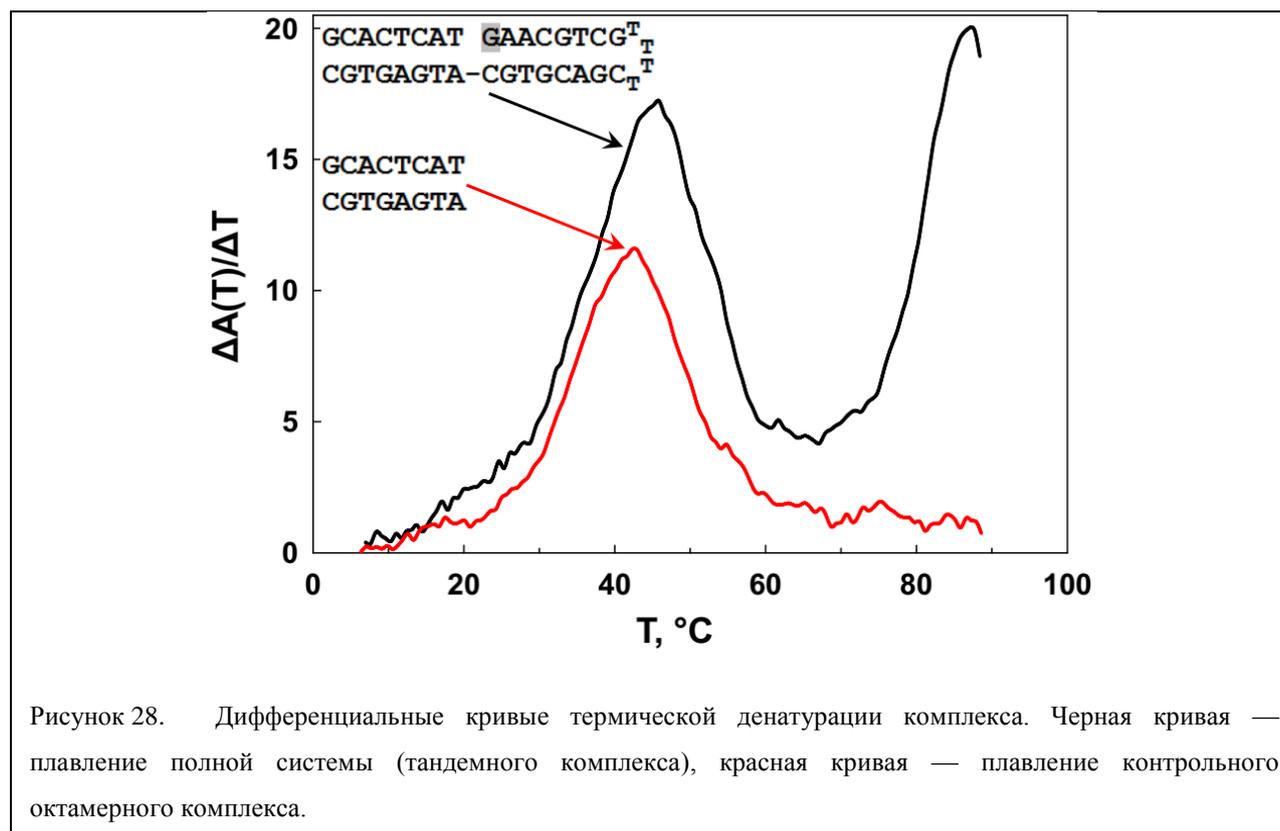


Рисунок 28. Дифференциальные кривые термической денатурации комплекса. Черная кривая — плавление полной системы (тандемного комплекса), красная кривая — плавление контрольного октамерного комплекса.

Из представленных в таблице 11 полученных термодинамических параметров видно, что образование 8-охоGua в составе ДНК независимо от контекста оказывает дестабилизирующее действие. Диапазон различий в параметре  $\Delta G^\circ_\Sigma$  между Gua и 8-охоGua составлял от 0,7 до 4,3 ккал/моль и был сопоставим с суммарной энергией стэкинга для обоих оснований. Это хорошо согласуется с литературными данными, подтверждая, что пары Gua:Cyt и 8-охоGua:Cyt могут существенно различаться по физико-химическим параметрам, например по степени гидратации большой бороздки вблизи пары, оказывая влияние на стабильность ДНК и ее конформационную динамику [75, 77, 78]. Разница в физико-химических свойствах оснований подтверждалась и отсутствием значимой корреляции между энергиями стэкинга ( $r^2 = 0,25$ ) для одинаковых нуклеотидных контекстов. Учитывая, что 8-охоGua не оказывает существенного влияния на структуру ДНК-дуплекса и образует комплементарную пару с Cyt аналогичную канонической паре Gua:Cyt [305-307], природа дестабилизации в ДНК, вероятно, кроется во взаимодействиях, образуемых заместителями при C8 и N7. Это предположение частично было подтверждено в работе, выполненной в сотрудничестве с С. Л. Смирновым (Университет Западного Вашингтона, США). Согласно анализу структур ДНК-дуплексов, полученных методом ЯМР, появление 8-охоGua в составе ДНК приводит к локальному изменению конформации сахарофосфатного остова из VI в VII с 3'-стороны от повреждения [308], что может быть вызвано одновременным взаимодействием O<sup>8</sup> основания с O4' и H2' остатка сахара.

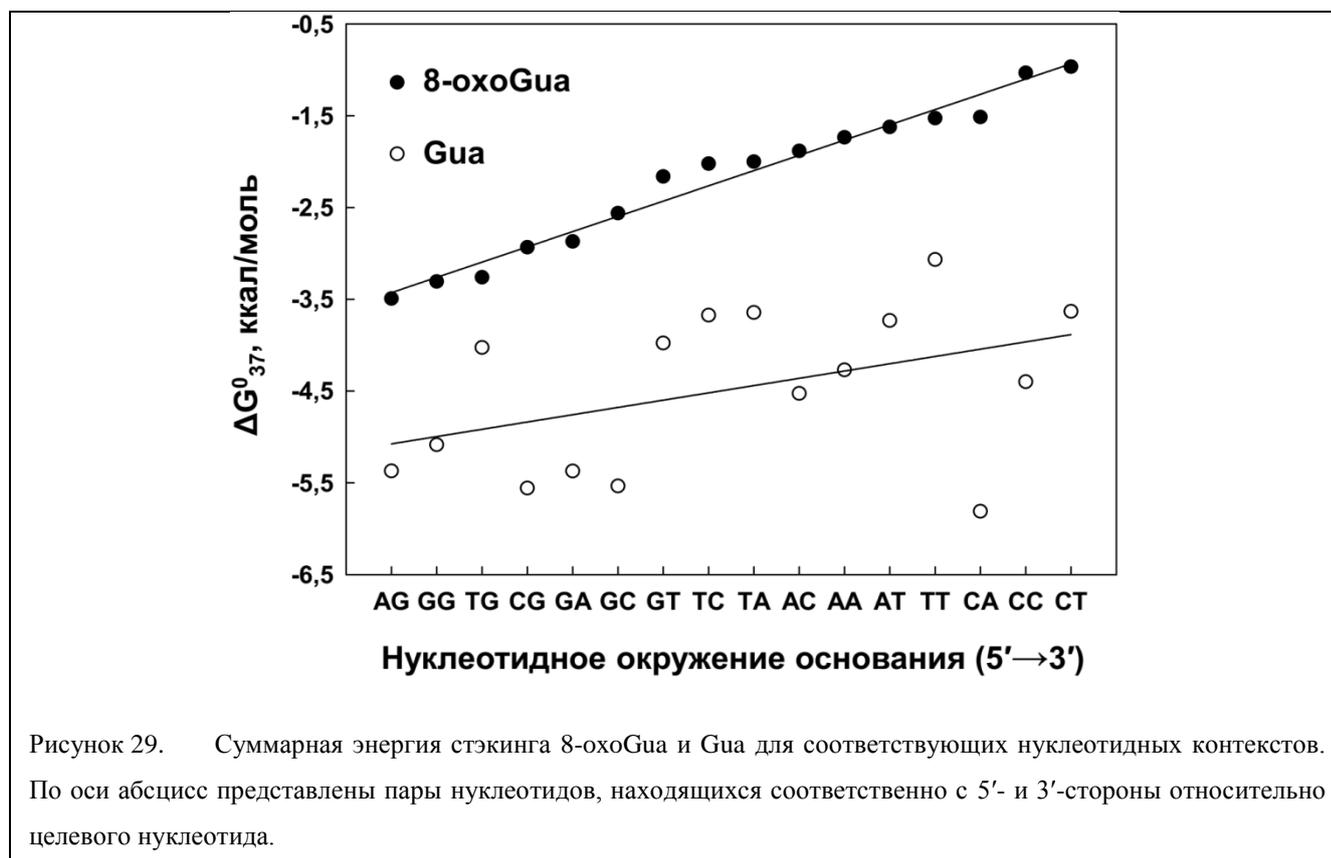
Таблица 11. Значения свободной энергии для разного нуклеотидного окружения Gua и 8-охоGua.  $\Delta G^\circ_\Sigma$  — суммарная энергия, характеризующая стэкинг-взаимодействие 8-охоGua с двумя окружающими основаниями.  $\Delta\Delta G^\circ_{5'}$  и  $\Delta\Delta G^\circ_{3'}$  — энергия взаимодействия с основанием, находящимся с 5'- и 3'-стороны соответственно. В качестве сравнения приведены значения соответствующих энергий для неповрежденного Gua, измеренные в таких же условиях. «G» на сером фоне — 8-охоGua для 1, 2 и 3 столбца или Gua для 4,5 и 6 столбца.

Контекст (5' → 3')	8-охоGua			Gua		
	$\Delta G^\circ_\Sigma$ [ккал/моль]	$\Delta\Delta G^\circ_{5'}$ [ккал/моль]	$\Delta\Delta G^\circ_{3'}$ [ккал/моль]	$\Delta G^\circ_\Sigma$ [ккал/моль]	$\Delta\Delta G^\circ_{5'}$ [ккал/моль]	$\Delta\Delta G^\circ_{3'}$ [ккал/моль]
TGT	-1,5	-0,9	-0,6	-3,1	-0,9	-2,2
GGT	-2,2	-1,7	-0,5	-4,0	-1,4	-2,6
CGT	-1,0	-0,3	-0,6	-3,6	-1,3	-2,4
AGT	-1,6	-0,9	-0,7	-3,7	-1,6	-2,1
TGG	-3,3	-1,6	-1,7	-4,0	-1,8	-2,2
GGG	-3,3	-1,5	-1,8	-5,1	-2,7	-2,4
CGG	-2,9	-1,0	-1,9	-5,6	-2,9	-2,7
AGG	-3,5	-1,7	-1,8	-5,4	-2,5	-2,9
TGC	-2,0	-0,7	-1,3	-3,7	-1,5	-2,2
GGC	-2,6	-1,2	-1,4	-5,5	-3,0	-2,5
CGC	-1,0	-0,1	-0,9	-4,4	-2,9	-1,5
AGC	-1,9	-0,6	-1,3	-4,5	-2,7	-1,8
TGA	-2,0	-0,5	-1,5	-3,6	-1,6	-2,0
GGA	-2,9	-1,3	-1,6	-5,4	-3,0	-2,4
CGA	-1,5	-0,5	-1,0	-5,8	-3,8	-2,0
AGA	-1,7	-0,7	-1,0	-4,3	-2,6	-1,7

Наибольшая энергия стэкинг-взаимодействия повреждения наблюдается в пуриновом окружении. В особенности 8-охоGua сильно стабилизирован соседними основаниями Gua, поскольку все контексты с наибольшими энергиями стэкинга содержат хотя бы одно основание Gua (рисунок 29). Пиримидиновые основания, находящиеся в контакте с повреждением, стабилизируют структуру ДНК значительно слабее. Хуже всего повреждение стабилизировано основанием Cyt в 5'-области, в отличие от неповрежденного Gua, для которого взаимодействие хотя бы с одним Thy характеризуется низкой суммарной энергией стэкинга. Анализ отдельных взаимодействий в 5'- и 3'-области не выявил существенных закономерностей за исключением одной особенности: увеличение суммарной энергии стэкинга для 8-охоGua практически в равной степени зависит от усиления стэкинг-взаимодействий повреждения с обеих сторон, о чем свидетельствуют корреляции общей энергии с энергиями 5'-области ( $r^2 = 0,72$ ) и 3'-области ( $r^2 = 0,68$ ), в то время как для Gua суммарную энергию в большей степени определяют взаимодействия в 5'-области ( $r^2 = 0,82$ ) и слабо влияют 3'-взаимодействия ( $r^2 = 0,11$ ).

Таким образом, анализ термодинамических параметров выявил существенные различия между Gua и его окисленным аналогом. Предполагаемая природа этих различий может крыться

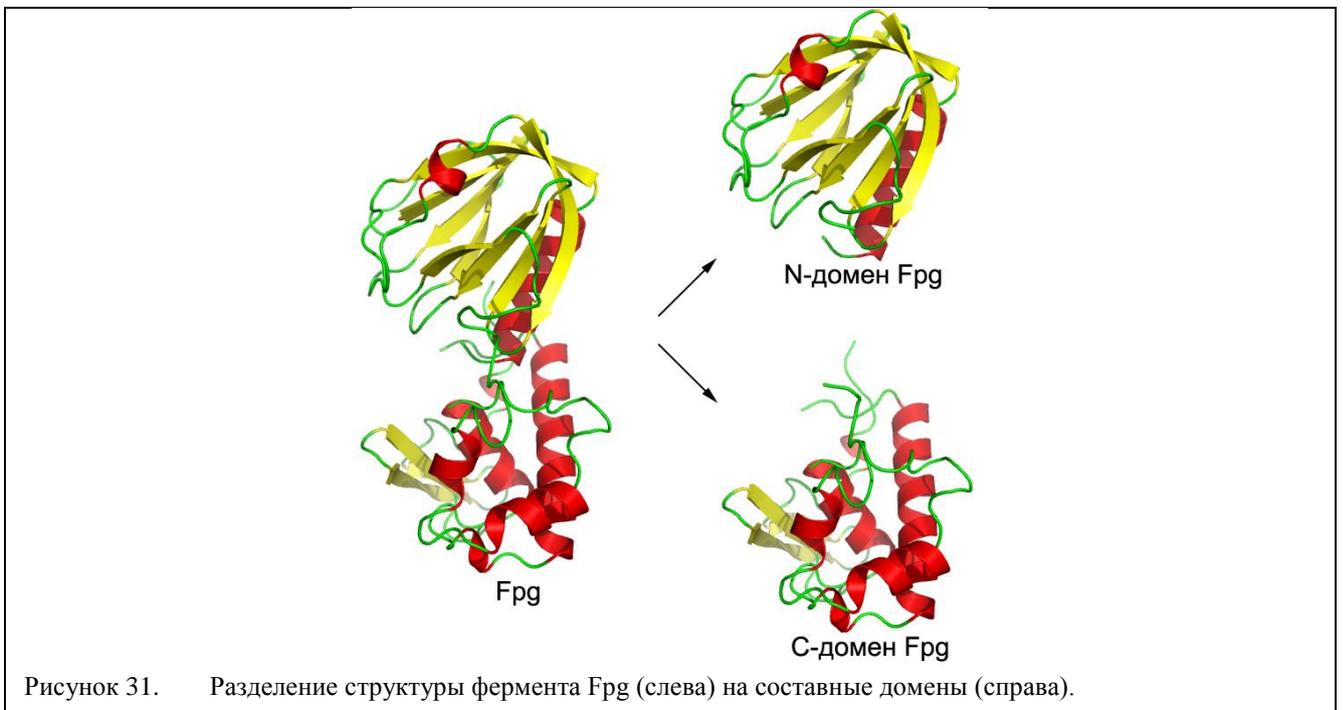
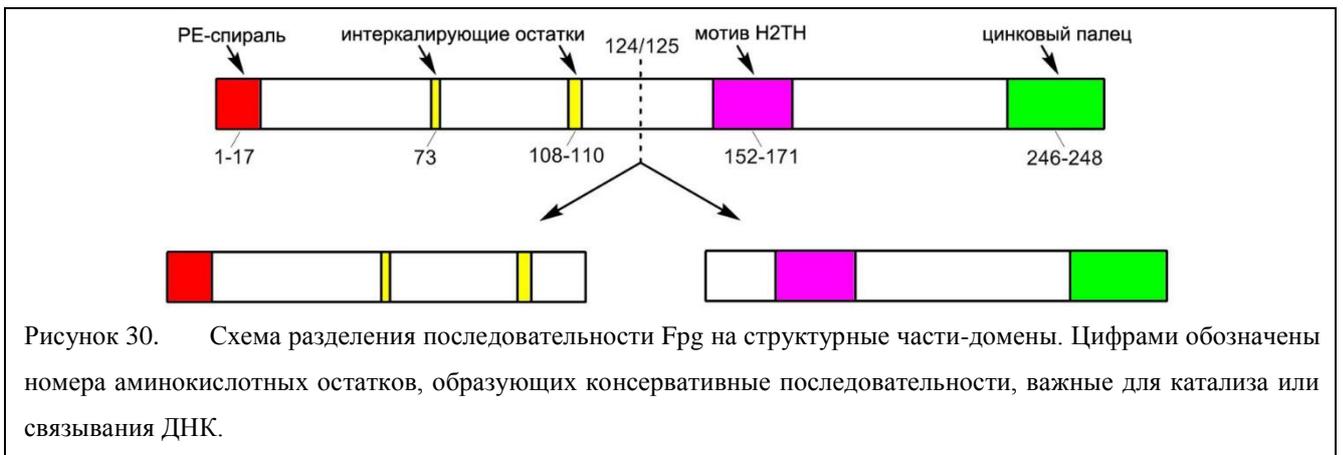
как в электростатических взаимодействиях с растворителем, так и геометрии оснований. Следует отметить, что такие различия могут играть важную роль в биологических процессах. Так, например, дестабилизирующий структуру ДНК 8-охоGua может влиять на ДНК-зависимые белки, в одних случаях ингибируя их активность (ДНК-полимеразы, рестриктазы), в других способствуя узнаванию ими определенных структур ДНК (гликозилазы).



#### 4.3. Анализ свойств отдельных доменов белка Fpg

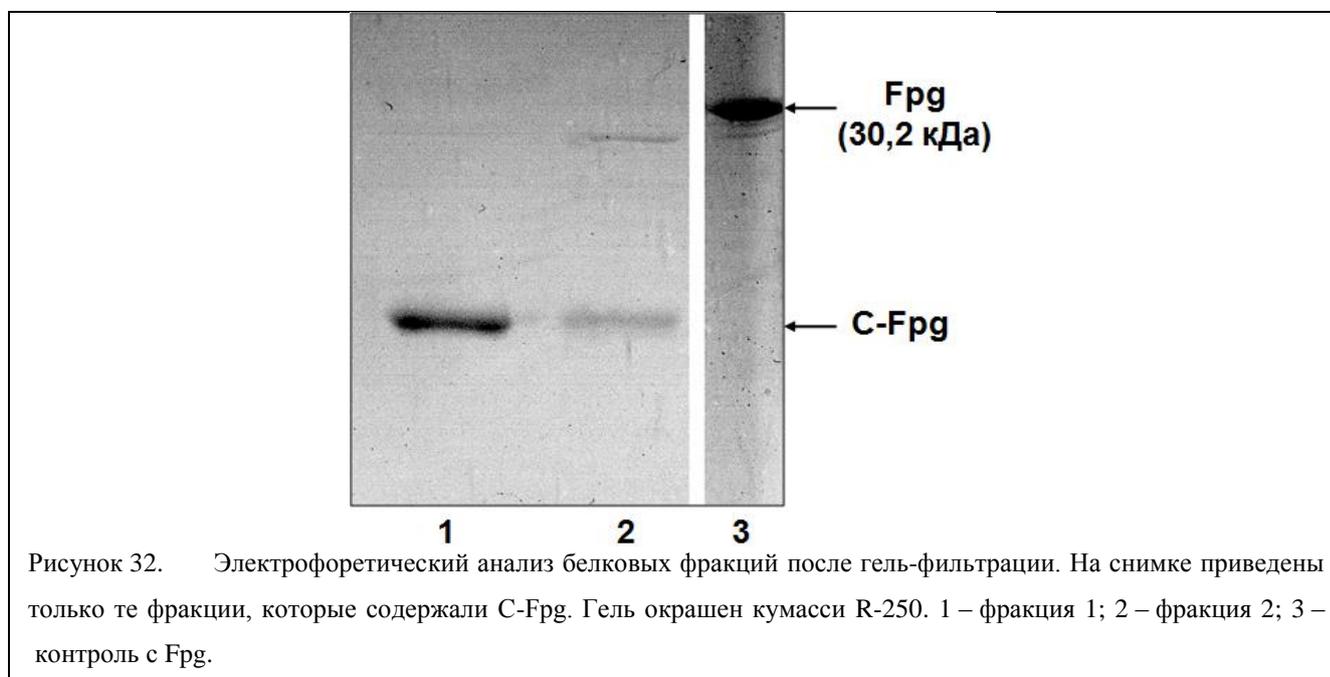
Согласно литературным данным, разные функции белка Fpg локализованы в разных его доменах. N-концевой домен начинается длинной  $\alpha$ -спиралью, на N-конце которой располагается каталитически активный дипептид Pro–Glu. Эти аминокислотные остатки абсолютно консервативны во всех членах семейства Fpg/Nei, их мутация приводит к полной потере каталитической активности ферментов по отношению к 8-охоGua-субстратам [174, 199, 201, 309, 310]. На поворотах между отдельными складками  $\beta$ -сэндвича располагаются некоторые функционально важные аминокислоты: остатки Met73, Arg108 и Phe110 внедряются внутрь спирали ДНК, фиксируя ее искаженную конформацию. В C-концевом домене Fpg расположены мотив «спираль — два поворота — спираль» (H2TH) и цинковый палец типа Cys<sub>4</sub> (рисунок 30). Остаток Asn168 в мотиве H2TH и остаток Arg258 в цинковом пальце вместе с

остатком Lys56 образуют жесткую сеть водородных связей, фиксирующих ДНК вблизи поврежденного нуклеотида (рисунок 14). Таким образом, предполагается, что С-концевой домен играет основную ДНК-связывающую роль. У ряда актинобактерий (*Mycobacterium tuberculosis* и др.), существуют белки с неизвестными функциями, гомологичные исключительно С-концевому домену Fpg (рисунок 17). Поэтому представлялось необходимым изучить вклад отдельных N- и С-концевого доменов белка Fpg в специфическое фермент-субстратное взаимодействие. Для этого нужно было получить домены Fpg в виде отдельных белков (рисунок 30, рисунок 31).

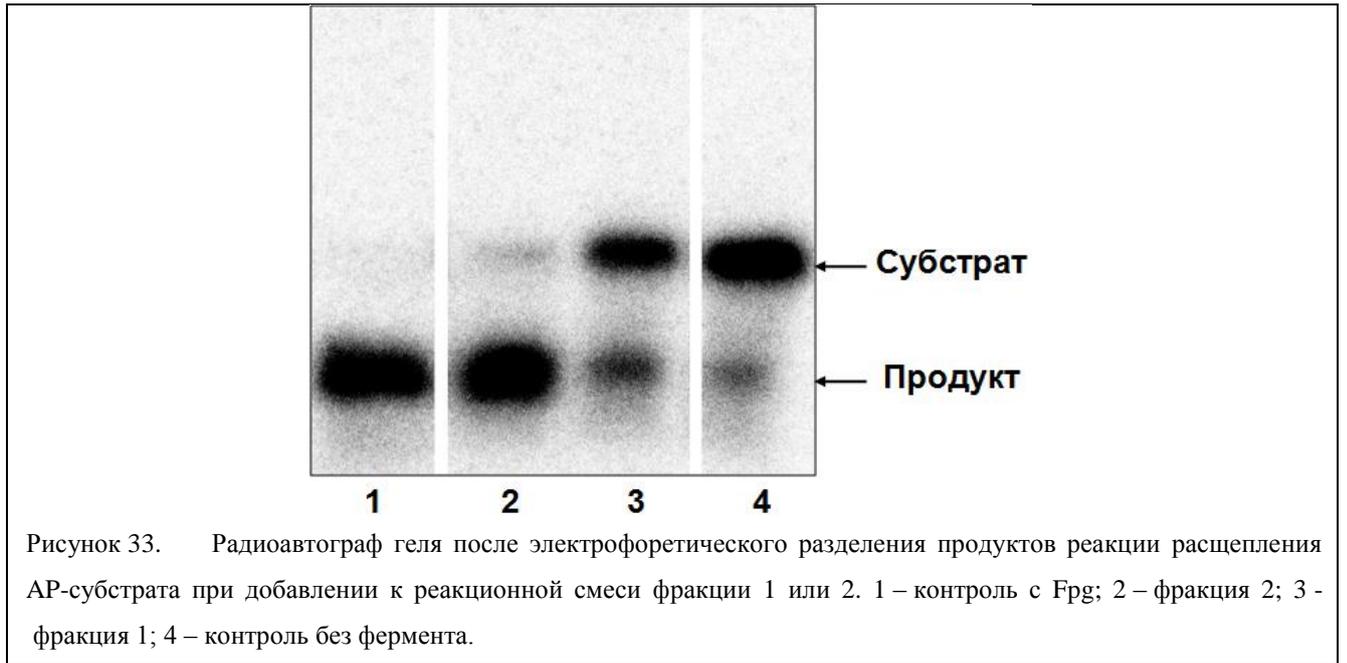


Белки N-Fpg и C-Fpg, соответствующие N- и С-концевым доменам Fpg, получали экспрессией в *E. coli* кодирующих их участков гена *fpg*. Поскольку все известные ДНК-

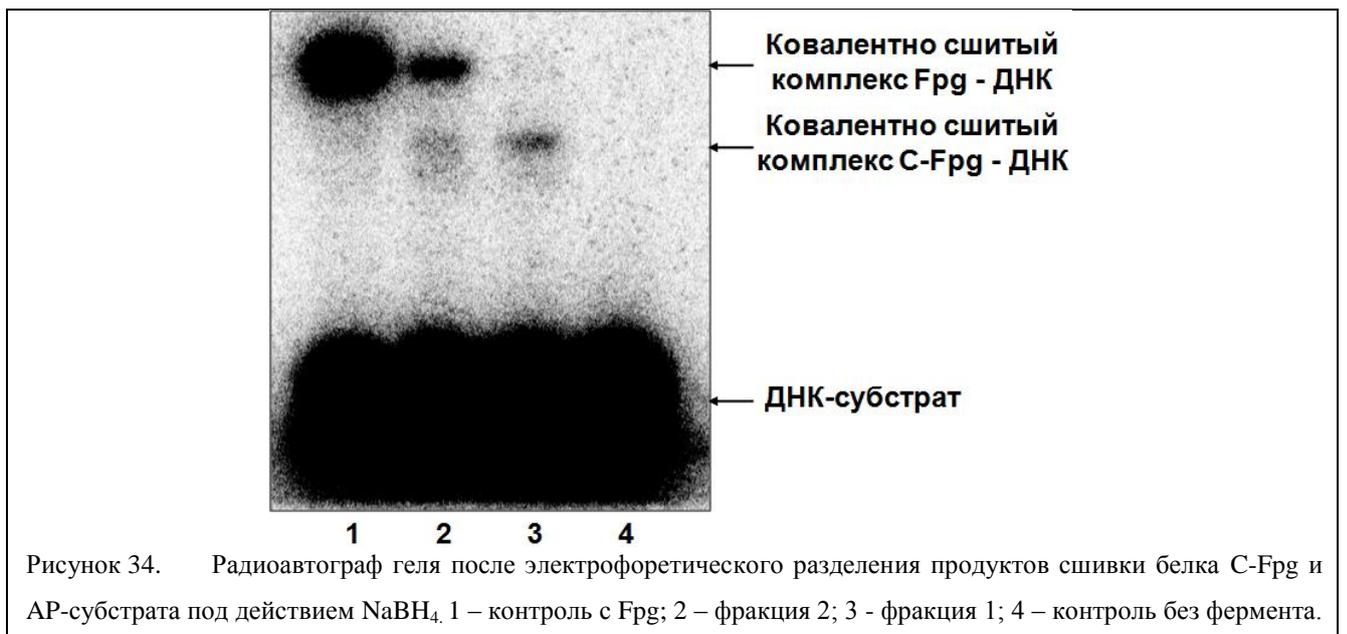
гликозилазы специфически связывают ДНК, содержащую AP-сайты, а все бифункциональные ДНК-гликозилазы расщепляют такую ДНК, была исследована способность рекомбинантных белков N-Fpg и C-Fpg связывать и расщеплять дцОДН, содержащие альдегидный AP-сайт и ряд поврежденных оснований. Предполагалось, что, поскольку C-Fpg содержит большинство ДНК-связывающих мотивов полноразмерного Fpg, он, возможно, будет связывать такие ОДН, но не расщеплять их, в то время как N-Fpg вряд ли вообще сможет проявить какую-либо активность в отсутствие ДНК-связывающего домена. Как и ожидалось, отдельный N-концевой домен не проявлял ни каталитических, ни ДНК-связывающих активностей (данные не приведены). Белок C-Fpg не был способен расщеплять дцОДН-субстраты, содержащие поврежденные основания (8-оксогуанин, урацил, 5,6-дигидроурацил, гипоксантин; данные не приведены), что, скорее всего, связано с невозможностью индуцировать излом ДНК, необходимый для выворачивания поврежденного нуклеотида из двойной спирали ДНК. Однако при анализе активности фракций в ходе выделения C-Fpg выявлялась активность по отношению к субстрату с альдегидным AP-сайтом. После гель-фильтрации только две фракции (1 и 2 на рисунке 32) содержали белок C-Fpg, однако во фракции 2 наблюдались дополнительные примеси, тогда как фракция 1 была гомогенной по данным гель-электрофореза в трициновом буфере с окрашиванием кумасси голубым.



Расщепление AP-субстрата наблюдалось в обеих фракциях (рисунок 33). Поскольку активность во фракции 2 с меньшей концентрацией C-Fpg, была гораздо выше, для анализа возможных примесей других ДНК-гликозилаз использовали ковалентное сшивание белков обеих фракций с ДНК при помощи NaBH<sub>4</sub> (рисунок 34).

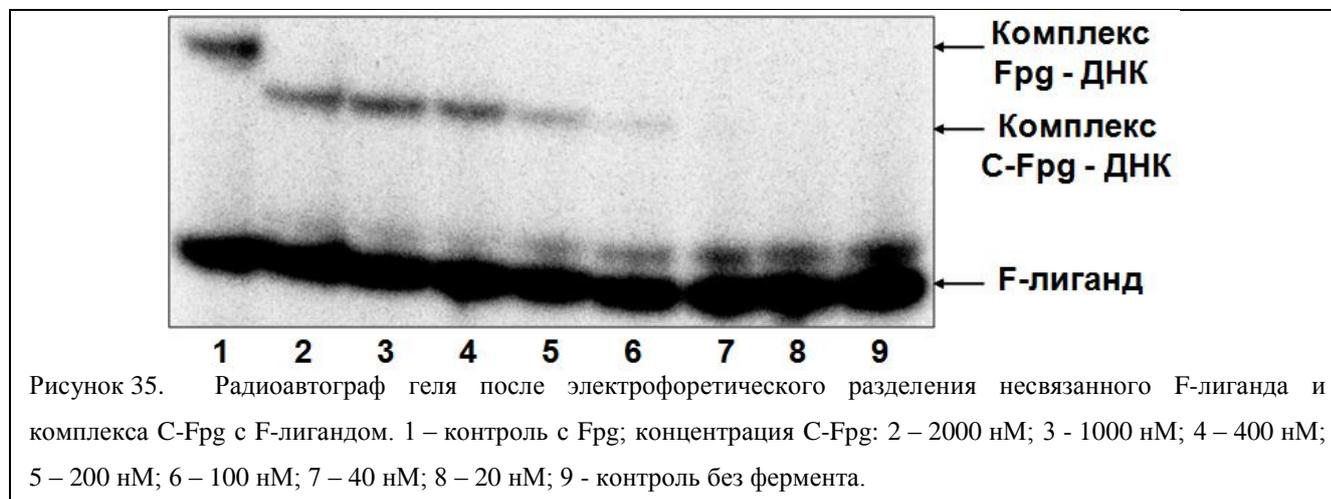


Видно, что в случае фракции 2 кроме пятна, соответствующего фермент–субстратному комплексу C-Frg–ДНК, наблюдается пятно в области, соответствующей по подвижности комплексу Frg–ДНК. Вероятно, во фракции 2 присутствует примесь полноразмерного белка Frg из бактериальных клеток, использованных для выделения C-Frg. Можно предположить, что именно это стало причиной высокой активности образца, поскольку Frg очень активно расщепляет субстрат с AP-сайтом. Поэтому в дальнейших экспериментах использовали только электрофоретически и функционально гомогенную фракцию 1.

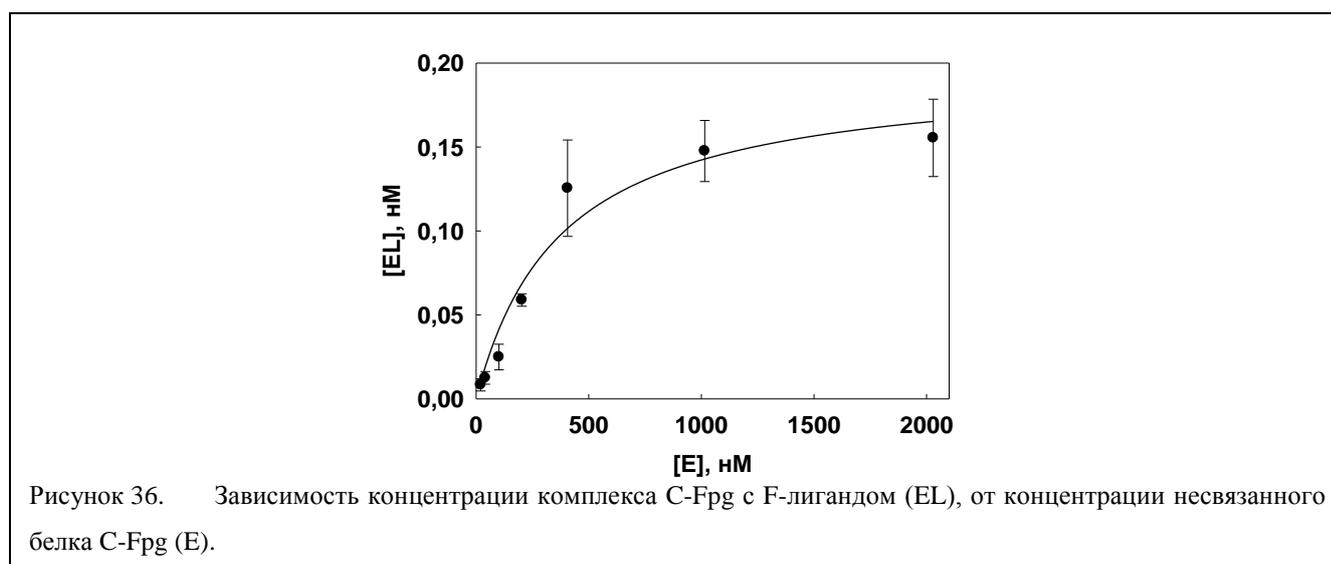


Для количественной характеристики сродства C-Frg к поврежденному ДНК-субстрату с помощью метода гель-ретардации было получено значение константы диссоциации  $K_d$

(рисунок 35, рисунок 36). Во избежание расщепления альдегидного AP-сайта в этих экспериментах использовали ОДН, содержащий звено F — нерасщепляемый аналог AP-сайта, к которому все ДНК-гликозилазы имеют высокое сродство.



На рисунке 35 приведена типичная электрофореграмма гель-ретардации. На основании полученных данных определили значение  $K_d$  для связывания C-Frg с F-лигандом, которое составило  $380 \pm 130$  нМ (таблица 12). Сродство C-Frg к F-лиганду оказалось в  $\sim 25$  раз меньше, чем сродство к нему полноразмерного фермента Frg. Как упоминалась выше, граница между доменами полноразмерного белка Frg образует положительно заряженную бороздку, и такая пространственная организация белка способствует связыванию с ДНК. При наличии одного C-концевого домена такая структурная комплементарность не реализуется, чем, вероятно, вызвано менее эффективное связывание данного фрагмента с ДНК.



Из-за низкого сродства С-Fpg к AP-ДНК не представлялось возможным получить кинетические параметры ( $K_M$ ,  $k_{cat}$ ), работая в условиях Михаэлиса–Ментен, поскольку насыщение фермента субстратом требует очень высоких концентраций ОДН. Однако, используя метод кинетики одного оборота [275], удалось определить значение каталитической константы  $k_{cat}$  (рисунок 37, рисунок 38, таблица 12).

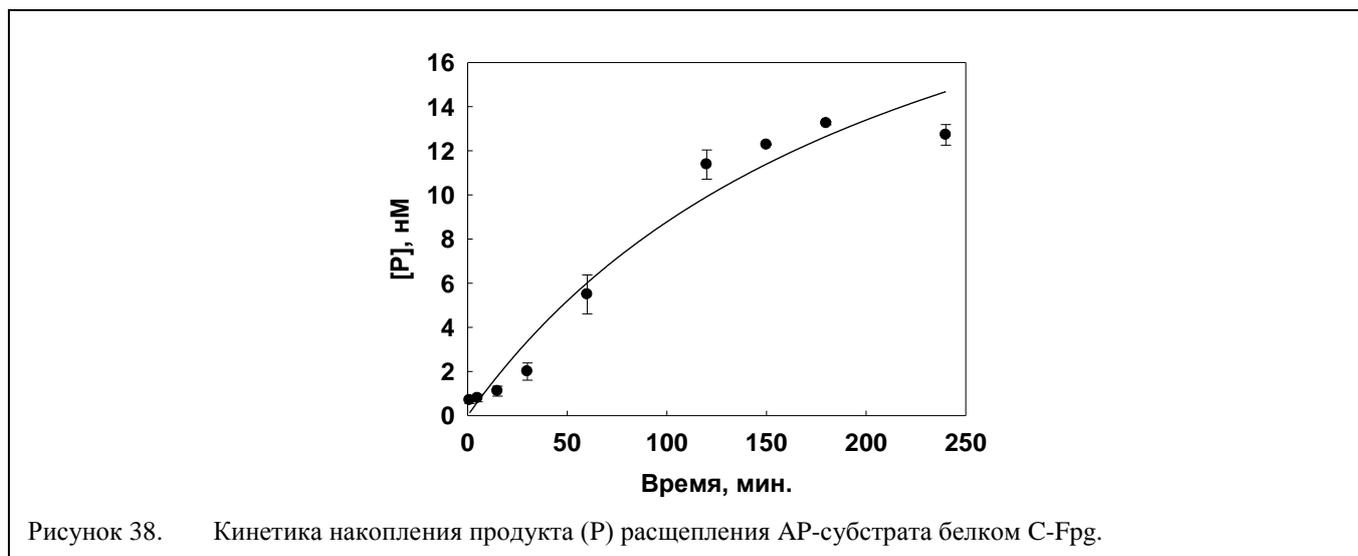
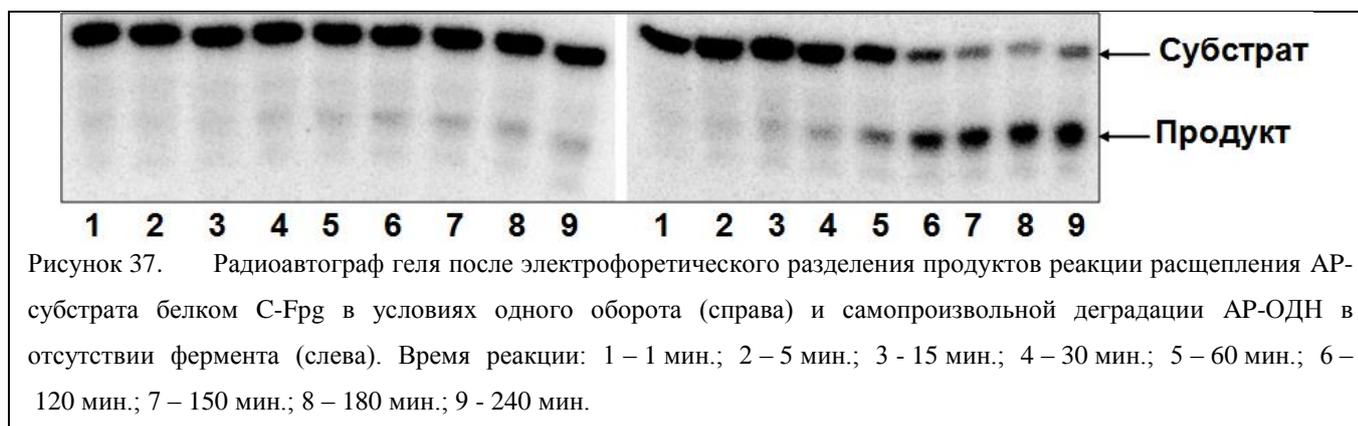


Таблица 12. Параметры связывания и расщепления (AP-лиазная реакция) AP-субстрата белком С-Fpg

	$K_d$ , нМ	$k_{cat}$ , мин <sup>-1</sup>
<b>С-Fpg</b>	380±130	$(8,4±3,4) \times 10^{-3}$
<b>Fpg</b>	15±3	1,7±0,1

Как и ожидалось, значение  $k_{cat}$  для С-Fpg было на несколько порядков ниже соответствующего значения для полноразмерного фермента Fpg. Таким образом, из полученных данных можно заключить, что С-Fpg характеризуется низким сродством к ДНК-

субстрату и малым числом оборотов. В отсутствие второго домена белок потерял способность не только узнавать поврежденные основания, что привело к потере гликозилазной активности, но и эффективно связываться с поврежденной ДНК.

Образование восстанавливаемого  $\text{NaBH}_4$  конъюгата между C-Fpg и AP-субстратом указывает на AP-лиазный механизм реакции, протекающий с элиминированием 3'-фосфата при поврежденном dN. Для подтверждения этого механизма была проанализирована подвижность продуктов расщепления AP-субстрата белком C-Fpg (рисунок 39). В качестве маркеров подвижности использовали продукты расщепления AP-субстрата ферментом Fpg и AP-эндонуклеазой APЕХ1. AP-эндонуклеазы вносят в ДНК разрыв с 5'-стороны от AP-сайта, оставляя на 3'-конце ОН-группу (рисунок 8). Fpg последовательно катализирует удаление поврежденного основания из дцДНК,  $\beta$ -элиминирование и  $\delta$ -элиминирование, в результате чего образуется продукт такой же длины, что и после расщепления APЕХ1, но с фосфатной группой на 3'-конце (рисунок 8).

Как и ожидалось, Fpg очень эффективно расщеплял субстрат, содержащий AP-сайт (дорожка 3), по механизмам  $\beta$ -элиминирования (верхняя полоса продукта) и  $\delta$ -элиминирования (нижняя полоса продукта). Поскольку основание Uга не выщепляется ферментом Fpg, то расщепление субстрата ферментом Fpg может служить критерием полноты превращения Uга-содержащего дцОДН в AP-содержащий дцОДН под действием Ung. APЕХ1 не проявлял каталитических свойств в отсутствие ионов  $\text{Mg}^{2+}$  (дорожка 5), зато эффективно расщеплял субстрат при добавлении 2 мМ  $\text{MgCl}_2$  (дорожка 6). Продукт расщепления ферментом APЕХ1 по подвижности занимает промежуточное место, между продуктами  $\beta$ - и  $\delta$ -элиминирования, поскольку фосфатная группа в продукте  $\delta$ -элиминирования увеличивает заряд ОДН и обеспечивает его большую подвижность.

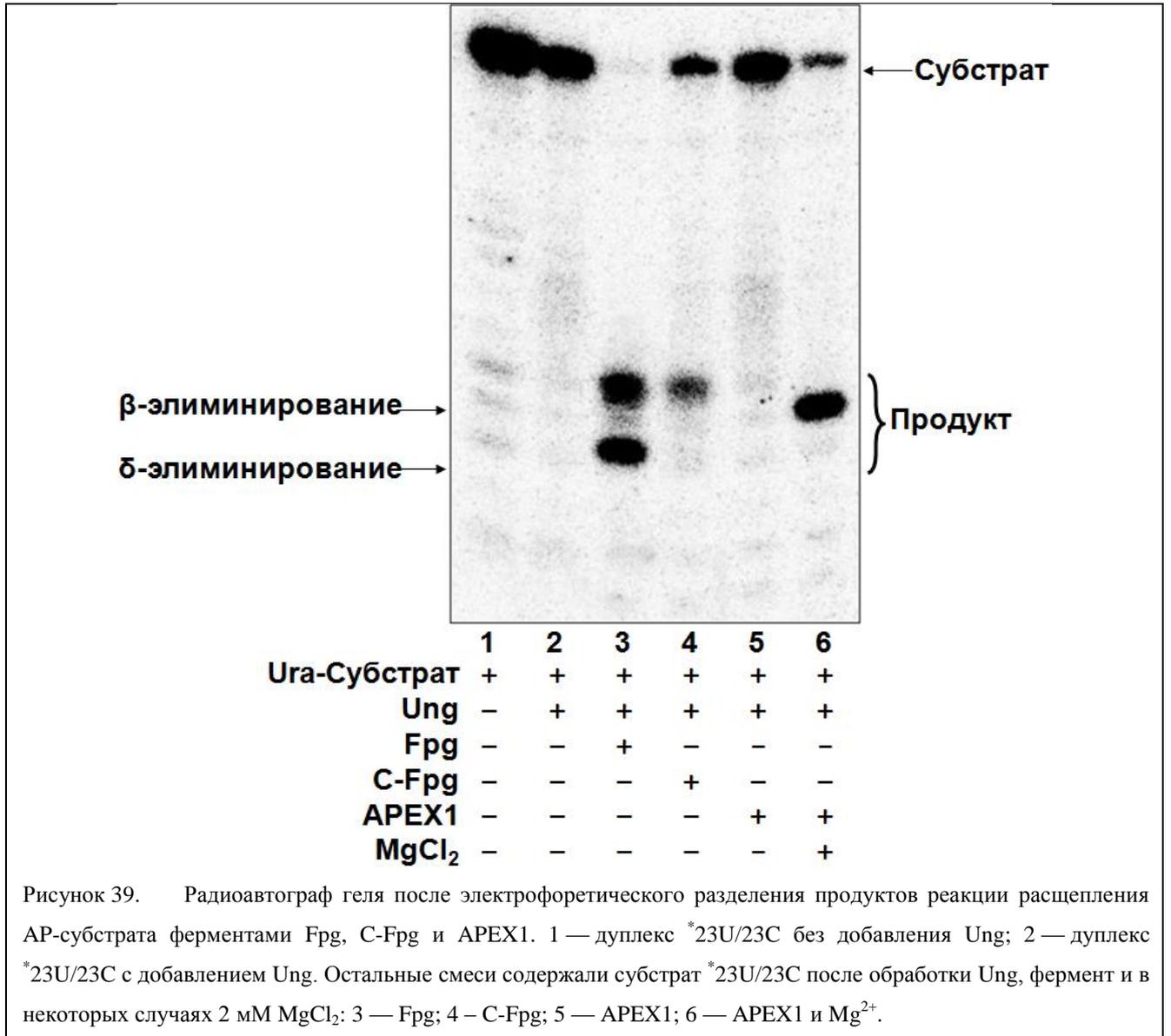
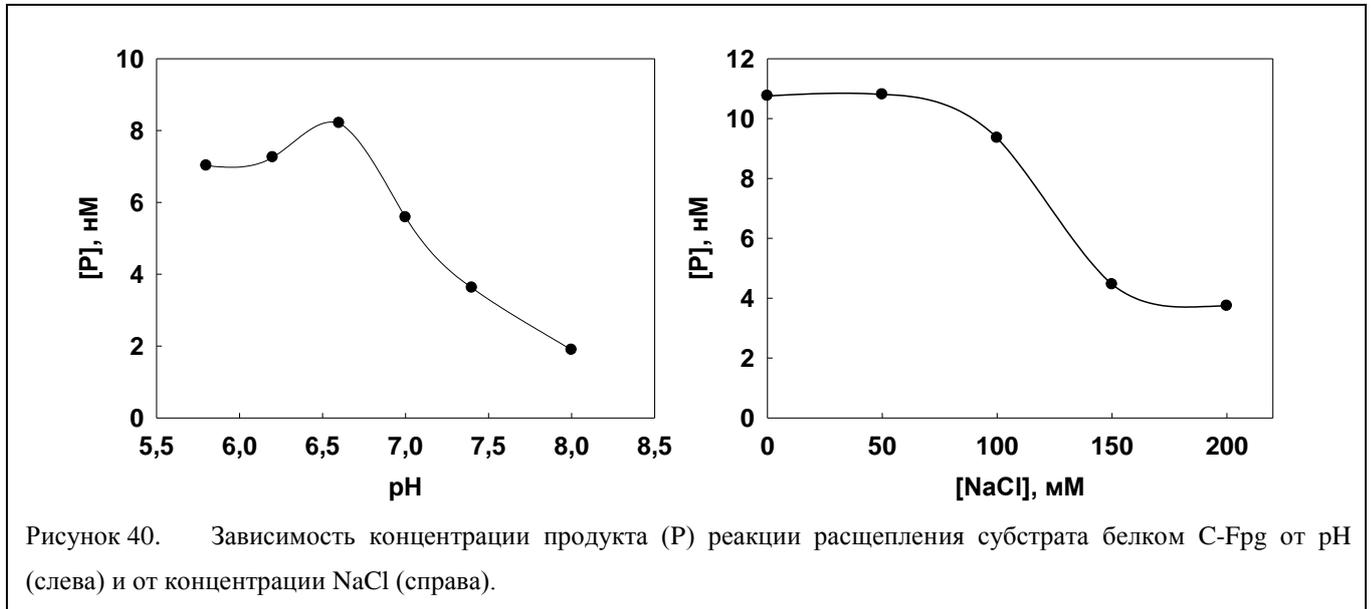


Рисунок 39. Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов реакции расщепления AP-субстрата ферментами Fpg, C-Fpg и APEX1. 1 — дуплекс <sup>32</sup>P/32P без добавления Ung; 2 — дуплекс <sup>32</sup>P/32P с добавлением Ung. Остальные смеси содержали субстрат <sup>32</sup>P/32P после обработки Ung, фермент и в некоторых случаях 2 мМ MgCl<sub>2</sub>: 3 — Fpg; 4 — C-Fpg; 5 — APEX1; 6 — APEX1 и Mg<sup>2+</sup>.

Из данных, представленных на рисунке 39 видно, что продукт расщепления AP-сайта белком C-Fpg демонстрирует такую же подвижность (дорожка 4), что и продукт β-элиминирования, катализируемой полноразмерным ферментом Fpg (дорожка 3). Исходя из этого, в случае C-Fpg, можно говорить о том, что наиболее вероятным механизмом для расщепления цепи, содержащей AP-сайт, будет β-элиминирование.

Таким образом, несмотря на отсутствие каталитических остатков, присущих полноразмерному ферменту Fpg, белок C-Fpg способен с некоторой эффективностью катализировать расщепление AP-ДНК, которое, как и в случае полноразмерного Fpg, протекает по механизму β-элиминирования с образованием основания Шиффа. Нельзя точно сказать, какой именно аминокислотный остаток служит нуклеофилом в реакции: это может быть как N-конец белка, так и один из остатков лизина; для детального понимания этого процесса необходимы дополнительные исследования.

Оптимальные условия реакции расщепления ферментом C-Frg по AP-лиазному механизму были определены в серии экспериментов, представленных на рисунке 40. Было показано, что субстрат наиболее эффективно расщеплялся при pH 6,6 и концентрации NaCl от 0 до 50 мМ.



#### 4.4. *Определение внутримолекулярных взаимодействий в белке Frg, важных для его функционирования*

Начиная с 1990-ых гг., методами рентгеновской кристаллографии установлены структуры для многих ДНК-гликозилаз, что существенно продвинуло понимание механизмов каталитической активности и субстратной специфичности этого класса ферментов. Однако, учитывая множество контактов различной природы внутри белковой глобулы, часто достаточно трудно предсказать по статической кристаллической структуре функционально значимые взаимодействия, которые, к тому же, часто проявляют себя только во временном масштабе всего каталитического процесса. Использование сканирующего сайт-направленного мутагенеза, возможно, могло бы дать достаточно информации о таких взаимодействиях, однако этот подход чрезвычайно трудоемок, и его использование для анализа полной структуры белка сопряжено с большими материальными и временными затратами. Поэтому данные РСА целесообразно дополнять методами молекулярной динамики и коэволюционного анализа с последующей биохимической проверкой их предсказаний. Такое комбинирование методов представляется мощным подходом для поиска функционально важных структурных элементов в ферментах и фермент-субстратных комплексах.

В ферментативном катализе хорошо известны эффекты «дальнего действия», которые могут распространяться через всю белковую глобулу и которые практически невозможно предсказать по данным структурных и кинетических исследований или молекулярного моделирования [311-313]. Функционально важные остатки, удаленные от активного центра фермента, обычно высоко консервативны. Несколько таких остатков, предсказанных для Fpg и других белков семейства Fpg/Nei анализом консервативности, оказались критичными для осуществления катализа и/или субстратной специфичности [314-316]. Кроме того, хорошо известно, что пары остатков, участвующие в функционально важных взаимодействиях внутри белковой глобулы склонны к коэволюции, препятствуя тем самым разрушению этих взаимодействий [317-320]. Поэтому представляло интерес исследовать функционально важные взаимодействия в Fpg, удаленные от активного центра фермента.

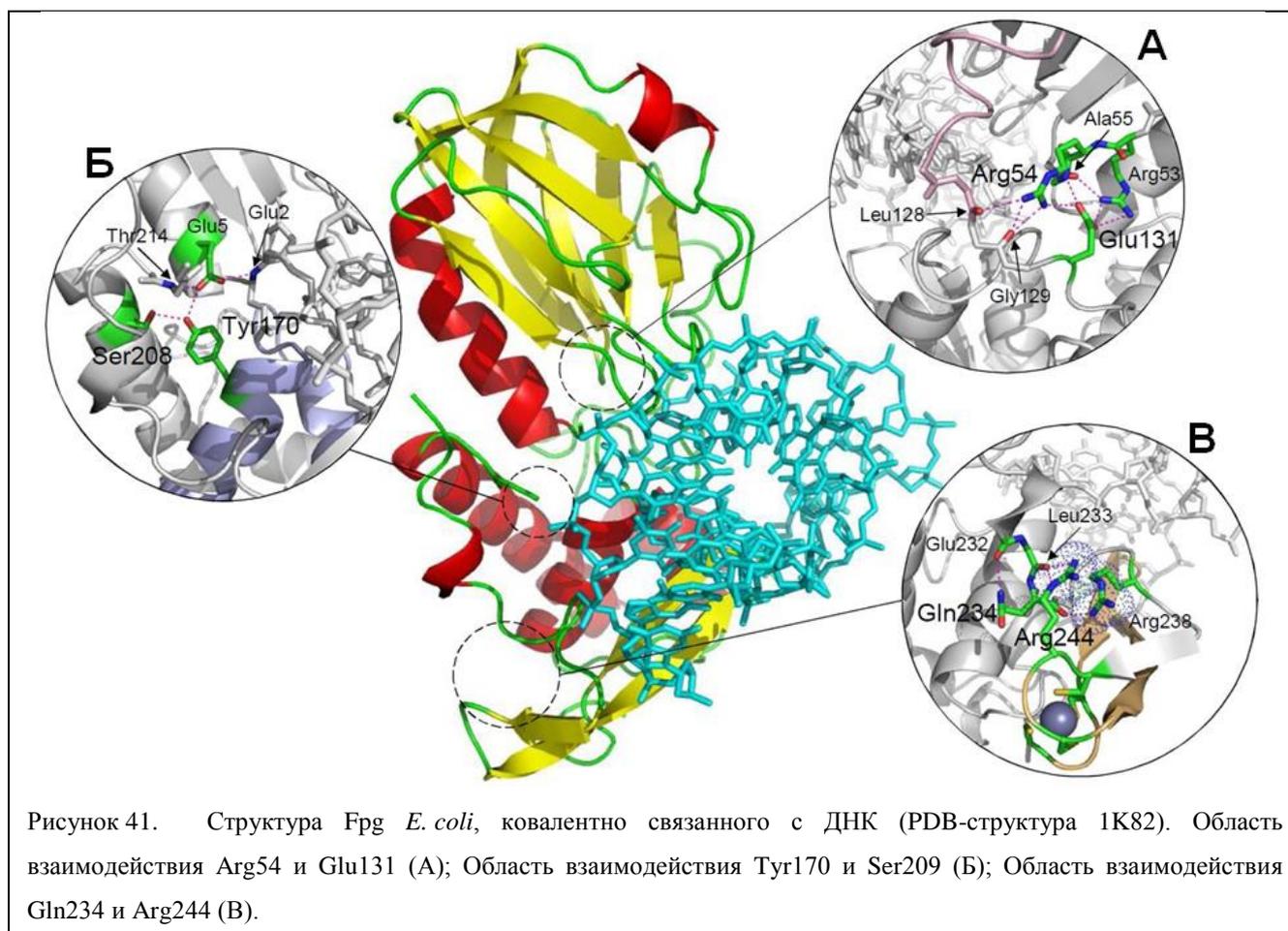
В сотрудничестве с Д. А. Афонниковым (ИЦиГ СО РАН) на основании анализа коэволюции аминокислотных остатков в ферменте Fpg были предсказаны функционально важные внутримолекулярные взаимодействия между Gln234 и Arg244, Arg54 и Glu131, Tyr170 и Ser209 (нумерация Fpg *E. coli*). С одной стороны, в рассматриваемых парах образовывались «мостиковое» взаимодействие, поскольку на основании структурных данных пространственная ориентация этих пар способствовала образованию водородной связи или солевого мостика между остатками, с другой стороны, аминокислотные остатки в парах не ограничивались одним взаимодействием, а, скорее, были частями более протяженных структурных кластеров.

Остатки мостика Arg54–Glu131 — часть структуры, также содержащей Arg53, Ala55, Leu128 и Gly129, которая соединяет N- и C-концевой домены путем множественных взаимодействий в обход междоменного линкера (рисунок 41 А). Остатки могут принимать участие в поддержании правильной пространственной ориентации доменов при связывании субстрата или диссоциации продукта или, возможно, могут фиксировать домены и/или междоменный линкер в определенной конформации, облегчающей катализ.

Остатки Tyr170 и Ser208 взаимодействуют исключительно через водородные связи гидроксильных групп боковых радикалов (рисунок 41 Б). При этом Tyr170 не только выступает в качестве акцептора водородной связи от Ser208, но и донора связи на карбоксил Glu5, одного из ключевых остатков активного центра Fpg. Tyr170 принадлежит ДНК связывающему мотиву H2TH, который также содержит Asn168, координирующий фосфаты по обе стороны 8-охоGua, способствуя его выворачиванию. Таким образом, мостик Y170–S208 может быть важен для поддержания активного центра Fpg в каталитически компетентной конформации.

Пару Gln234–Arg244 можно отнести к кластеру цинкового пальца (Cys243[2]Cys246[16]Cys263[2]Cys266), в состав которого входит Arg244 (рисунок 41 В). Не

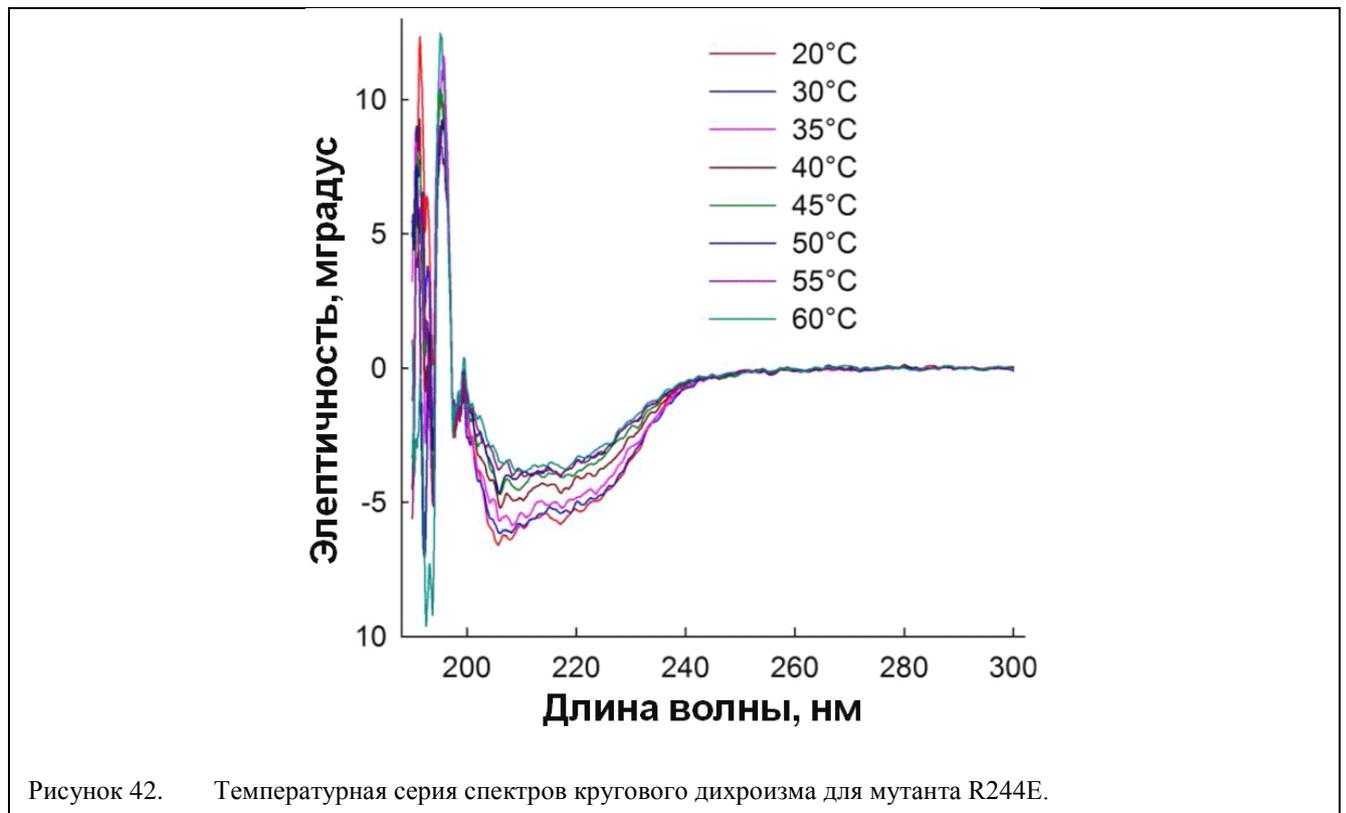
образуя связи непосредственно друг с другом, Gln234 и Arg244, как и в предыдущих случаях, участвуют в образовании плотной сети водородных связей и ионных взаимодействий, закоривающих цинковый палец на остальную часть белка. Мостик Gln234–Arg244, таким образом, важен для ориентации цинкового пальца, концевая часть которого содержит Arg258, входящий в состав активного центра Fpg.



Принимая во внимание принадлежность рассматриваемых остатков к различным структурным мотивам, которые участвуют как в связывании ДНК, так и в катализе, представлялось необходимым проанализировать не только их структурную, но и функциональную значимость. С этой целью для белка Fpg *E. coli* с помощью сайт-направленного мутагенеза каждая аминокислота подвергалась замене, которая, как предполагалось, должна была нарушить мостиковое взаимодействие в рассматриваемых парах. В случае пар Gln234/Arg244 и Arg54/Glu131 дополнительно были получены мутантные формы, содержащие двойные замены Q234R/R244E и R54E/E131R соответственно, для оценки возможности восстановления функции мостикового взаимодействия при изменении природы

аминокислотных остатков. Все мутантные формы были выделены в рекомбинантном виде и биохимически охарактеризованы.

Известно, что мостики стабилизируют третичную структуру белков [321]. Для проверки влияния элиминирования эволюционно консервативных мостиков на термическую стабильность фермента методом кругового дихроизма (КД) были исследованы кривые плавления для Frg дикого типа и его мутантных форм (рисунок 42). Анализ температурных серий КД-спектров выявил, что разрушение мостика могло вести как к стабилизации, так и дестабилизации структуры белка. Температура плавления ( $T_{пл.}$ ) фермента дикого типа составляла 51,2 °С. Нарушение мостика R54–E131 имело слабый эффект на термическую стабильность, соответствующий диапазон для  $T_{пл.}$  составлял от 53,8 °С до 54,0 °С (таблица 13). Обратная картина наблюдалась для пары Gln234–Arg244, мутации в которой очень сильно влияли на стабильность, снижая  $T_{пл.}$  до 39 °С. При этом двойная мутация Q234R/R244E частично восстанавливала стабильность ( $T_{пл.} = 46,5$  °С). Мутации, затрагивающие мостик Y170–S208, имели противоположные последствия: S208A замена умеренно стабилизировала белок ( $T_{пл.} = 58,2$  °С), в то время как замена Y170F дестабилизировала его ( $T_{пл.} = 44,9$  °С).



Примечательно, в случае замены R54E (как в мутантном варианте R54E, так и в R54E–E131R) наблюдался более кооперативный переход, о чем свидетельствует возрастание энтальпии реакции плавления в три раза. Аналогичный эффект, но с меньшей величиной

наблюдался и в случае мутации S208A. Это может свидетельствовать о том, что некоторые интермедиаты плавления могут быть дестабилизированы аминокислотной заменой [322, 323]. Во всех других случаях мутации приводили к снижению абсолютных значений  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta G^\circ$  и  $T_{пл}$  относительно белка дикого типа.

Таблица 13. Термическая стабильность дикого типа и мутантных форм белка Fpg *E. coli*.

Замена в Fpg	$\Delta H^\circ$ , ккал/моль	$\Delta S^\circ$ , кал/(моль×К)	$\Delta G^\circ$ , ккал/моль	$T_{пл}$ , °С
Дикий тип	-104±32	-319±101	-4,5±1,3	51,2±1,7
Q234R	-43±6	-137±18	-0,3±0,3	39,0±2,4
R244E	-48±7	-155±23	-0,3±0,2	39,0±1,6
Q234R/R244E	-41±7	-128±22	-1,2±0,4	46,5±2,8
R54E	-311±43	-949±130	-16,1±3,1	54,0±2,5
E131R	-80±22	-245±67	-4,1±1,2	53,8±0,7
R54E/E131R	-327±19	-1013±130	-16,1±3,1	54,0±2,5
Y170F	-87±17	-274±54	-2,2±0,6	44,9±1,5
S208A	-168±43	-507±131	-10,5±3,1	58,2±0,5

Каталитическая активность форм белка Fpg была исследована при 30 °С для минимизации эффекта денатурации некоторых мутантов. Значения  $K_M$  и  $k_{cat}$  для Fpg дикого типа хорошо согласовывались с литературными данными [324, 325]. Любые мутации в паре R54–E131 делали фермент неактивным (таблица 14). Мутации в мостике Gln234–Arg244, напротив, слабо влияли на активность, снижая  $k_{sp}$  максимум в 2,1 раза, главным образом, из-за влияния на  $k_{cat}$ . Как и в случае с термической стабильностью, нарушения мостикового взаимодействия Y170–S208 имели различные последствия. Так замена S208A практически не имела эффекта, в то время как Y170F снижала активность в 1750 раз.

Таблица 14. Кинетические параметры, параметры связывания и содержание цинка для дикого типа и мутантных форм белка Fpg *E. coli*.

Замена в Fpg	$K_M$ , нМ	$k_{cat}$ , мин <sup>-1</sup>	$k_{sp}$ , нМ <sup>-1</sup> ×мин <sup>-1</sup>	$K_d$ , нМ	моль Zn/моль Fpg
Дикий тип	8,1±2,3	1,7±0,1	0,21±0,03	15±3	1,1±0,1
Q234R	6,0±2,9	0,92±0,10	0,15±0,05	15±4	0,83±0,19
R244E	3,9±1,7	0,39±0,03	0,10±0,03	460±140	0,59±0,12
Q234R/R244E	8,8±2,8	0,89±0,08	0,10±0,03	140±30	0,75±0,13
R54E	— <sup>1</sup>	— <sup>1</sup>	— <sup>1</sup>	— <sup>1</sup>	0,57±0,19
E131R	— <sup>1</sup>	— <sup>1</sup>	— <sup>1</sup>	— <sup>1</sup>	0,30±0,03
R54E/E131R	— <sup>1</sup>	— <sup>1</sup>	— <sup>1</sup>	— <sup>1</sup>	0,82±0,22
Y170F	— <sup>2</sup>	— <sup>2</sup>	(1,2±0,1)×10 <sup>-4</sup>	510±200	1,1±0,1
S208A	4,7±2,0	0,80±0,10	0,17±0,08	32±11	0,86±0,45

<sup>1</sup>Нет расщепления.

<sup>2</sup>Не удалось определить в качестве отдельного параметра из-за слабого расщепления.

В белках суперсемейства Fpg/Nei часто при заменах, важных для катализа и предсказанных на основе структурных данных или компьютерного моделирования, нарушается ДНК-гликозилазная, но не AP-лиазная активность [324, 326, 327]. Обычно это объясняется большей конформационной гибкостью активного центра Fpg при связывании AP-сайта. Однако в случае эволюционно консервативных пар мутации одинаково влияли на способность использовать как AP-субстраты, так и субстраты с поврежденным основанием (рисунок 43 А; рисунок 44 А). Мутантные формы Q234R, R244E, Q234R R244E и S208A расщепляли AP-субстраты, в то время как для форм R54E, E131R, R54E E131R, и Y170F не наблюдалось расщепления больше, чем при неспецифическом гидролизе AP-сайта.

Эксперименты по образованию ковалентно сшитого фермент-субстратного комплекса хорошо согласовывались с предыдущими экспериментами по анализу активности мутантных форм (рисунок 43 Б; рисунок 44 Б). Фермент дикого типа, все мутанты для пары Q234–R244 и S208A эффективно образовывали конъюгаты с 8-охоGua- и AP-субстратами, а мутанты по мостику R54–E131 не проявляли такой способности. Примечательно, что для мутанта Y170F наблюдались следовые количества образования комплекса.

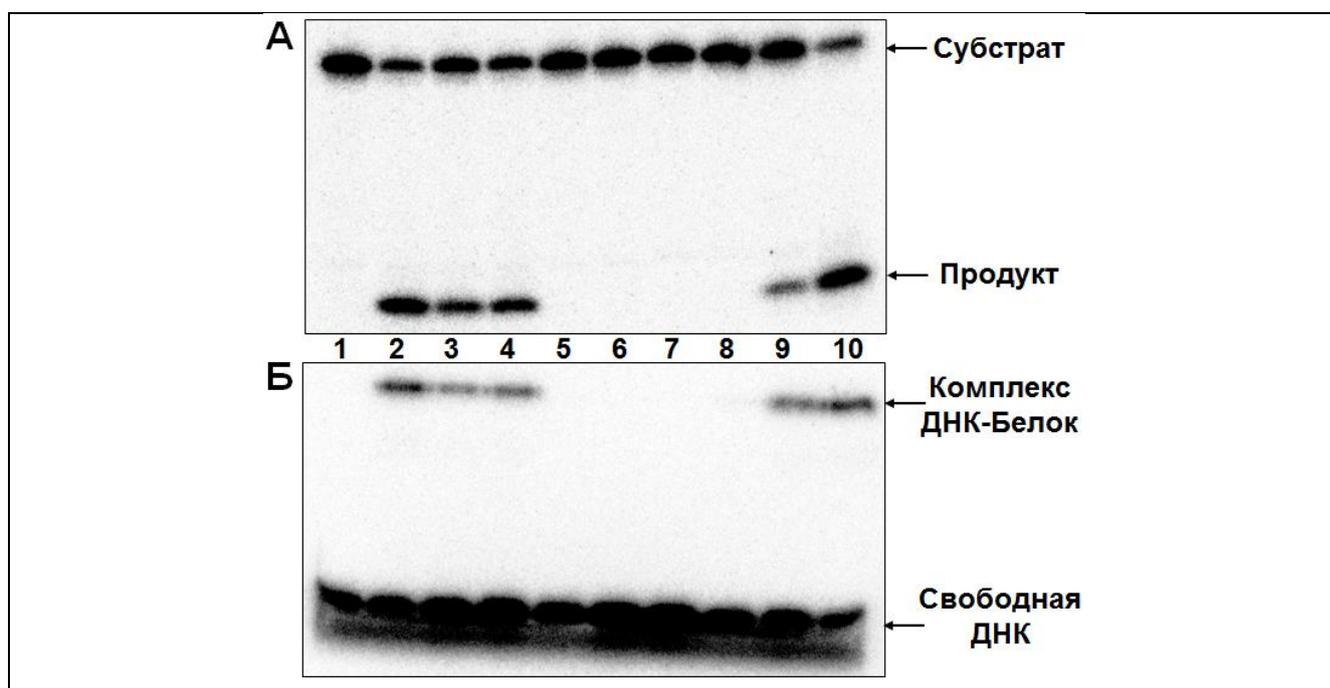
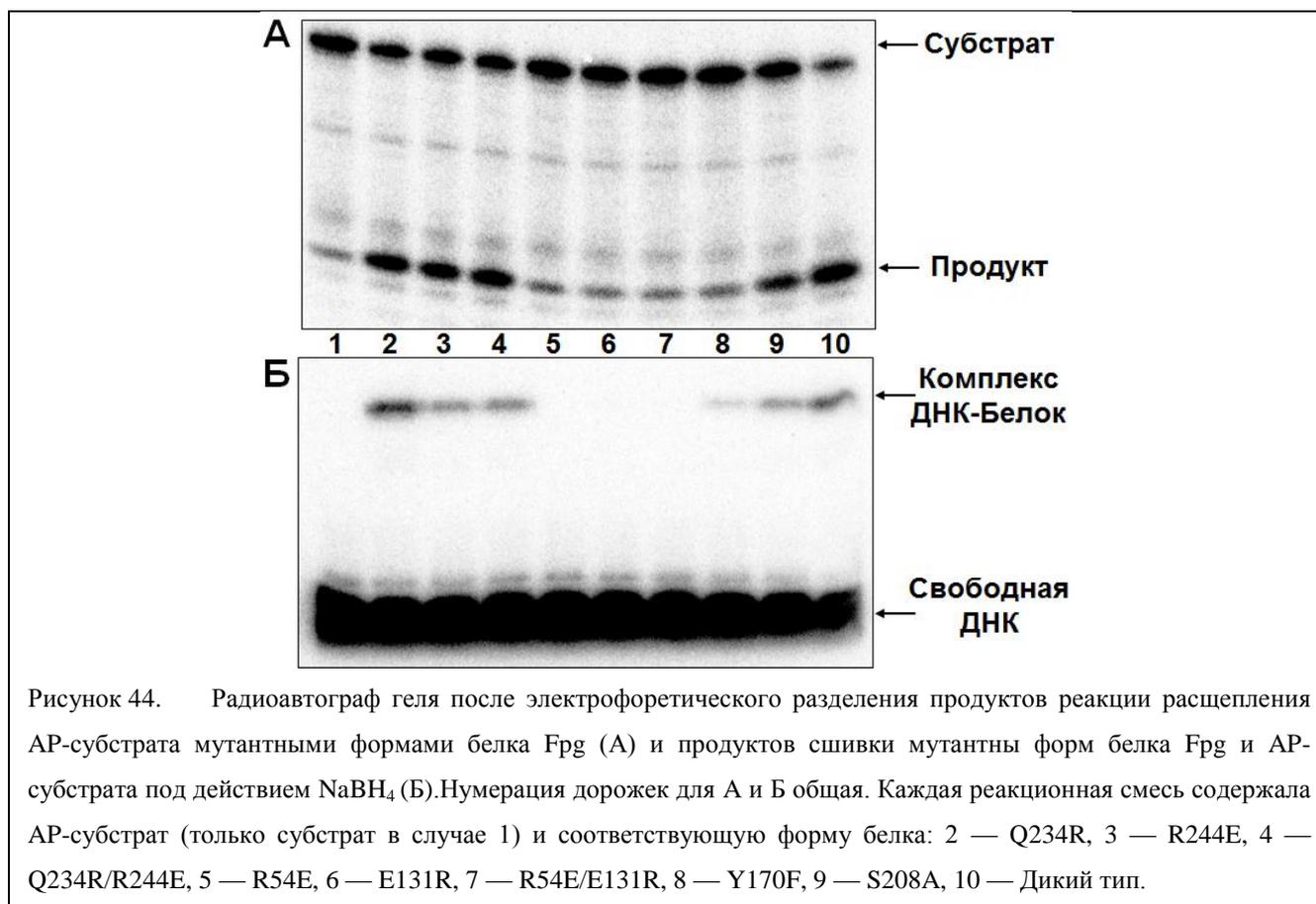


Рисунок 43. Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов реакции расщепления 8-охоGua-субстрата мутантными формами белка Fpg (А) и продуктов сшивки мутантных форм белка Fpg и 8-охоGua-субстрата под действием  $\text{NaBH}_4$  (Б). Нумерация дорожек для А и Б общая. Каждая реакционная смесь содержала 8-охоGua-субстрат (только субстрат в случае 1) и соответствующую форму белка: 2 — Q234R, 3 — R244E, 4 — Q234R/R244E, 5 — R54E, 6 — E131R, 7 — R54E/E131R, 8 — Y170F, 9 — S208A, 10 — Дикий тип.



Анализируя сродство форм Frg к F содержащему субстрату, было установлено, что фермент дикого типа способен связываться с F-субстратом с  $K_d = 15 \pm 3$  нМ, что согласуется с литературными данными (таблица 14). Мутации, затрагивающие мостик R54–E131, делали фермент неспособным связывать ДНК даже в микромолярном диапазоне концентраций, что, вероятно, лежит в основе отсутствия активности данных форм. Остальные мутанты проявляли сродство от одинакового с белком дикого типа до сниженного в 35 раз. Хуже всего связывались мутанты R244E и Y170F, однако при этом последний в 1750 раз менее активен, а первый только в 2 два раза менее активен, чем фермент дикого типа.

Молекула Frg *E. coli* содержит цинковый палец типа  $\text{Cys}_4$ , критически важный для активности фермента [328, 329]. Поскольку некоторые мутации затрагивают позиции, близкие к цинковому пальцу или находящиеся непосредственно в нем, было исследовано молярное соотношение цинка к белку в полученные препараты, чтобы определить, влияют ли эти мутации на связывание Zn. Согласно полученным данным, Frg дикого типа содержал ожидаемое эквимолярное количество Zn. Содержание металла в мутантных формах варьировалось в диапазоне от 0,3 до 1,1 атома Zn на молекулу белка. При этом наименьшее содержание Zn наблюдалось в мутантах пары R54–E131. Достаточно неожиданно мутации мостика Q234–R244, несмотря на близость к цинковому пальцу, слабо влияли на содержание

Zn. В конечном итоге, наблюдаемые различия в уровне содержания Zn между вариантами Fpg, достигали максимум ~3 раза и не объясняли таких больших различий в сродстве к ДНК или активности между формами фермента.

Для объяснения некоторых наблюдаемых эффектов была исследована 20 нс молекулярная динамика комплексов Fpg-ДНК, имеющих соответствующие модификации. Динамика Fpg дикого типа показала, что некоторые водородные взаимодействия, выявленные в статичной структуре, были нестабильны при долгом моделировании и могли, таким образом, быть артефактами кристаллизации или РСА. Так, неожиданно выяснилось, что связь O $\gamma$ [Ser208]...O $\eta$ [Tyr170], имеющая длину  $2,60 \pm 0,03 \text{ \AA}$  и практически идеальную геометрию согласно РСА (рисунок 41 Б), существовала лишь в 2 % траектории Fpg дикого типа и не более 20 % в других моделях. Вместо этого боковой радикал Ser208 быстро переориентировался для образования стабильной водородной связи с кислородом основной цепи Val204. Неподделенная пара электронов O $\eta$ [Tyr170] при этом участвовала в образовании водородной связи с O $\gamma$ [Thr214], в то время как водородное взаимодействие с Glu5 сохранялось. В мутанте S208A связь O $\gamma$ [Thr214]...O $\eta$ [Tyr170] оставалась стабильной на протяжении всей траектории.

В случае мостика R54–E131 все мутанты сохраняли связь N[Arg54]...O[Tyr57]. Эта связь стабилизирует  $\beta 2/\beta 3$  поворот, содержащий остаток Lys56, который непосредственно контактирует с сахарофосфатным остовом. Тем не менее, замена R54E нарушала сеть взаимодействий, образованных между гуанидиновой частью Arg54 и остатками междоменного линкера. В случае мутанта E131R, гуанидиновая группа Arg54 переориентировалась для образования альтернативных связей с остатками линкера. В двойном мутанте связь Arg–Glu и солевой мостик восстанавливались, однако боковые радикалы Glu54 и Arg131 контактировали достаточно слабо.

Образование альтернативных водородных связей наблюдалось и в случае мутаций в мостике Q234–R244. Например, атом N $\eta 2$  Arg244 образовывал две стабильных связи с карбонильными кислородами основной цепи Gln231 и Leu 233, которые теряются при мутации Arg244. В двойном мутанте взаимодействие с O[Gln231] восстанавливалось за счет N $\eta 2$ [Arg234], но только частично. При мутации Q234R атом N $\eta 2$ [Arg234], напротив, образовывал две стабильных связи с кислородами пептидной группы и бокового радикала Glu232, очевидно, заменяя взаимодействие N $\eta 2$ [Gln234]...O[Glu232]. Однако в траекториях не наблюдалось никаких явных признаков пониженной стабильности ни локально, ни в целом.

В результате проведенного анализа функциональной значимости предсказанных коэволюционных пар было установлено, что одно взаимодействие, Tyr170–Ser208, оказалось незначительным и нестабильным в ходе молекулярной динамики. Это подтверждает важность

сопутствующих исследований динамики при функциональной интерпретации взаимодействий, наблюдаемых в статических кристаллических структурах. Сменяющее его альтернативное взаимодействие Tyr170–Thr214, представляется даже более значимым, поскольку мутация Y170F снижает активность фермента более, чем на три порядка, сродство к ДНК — в 34 раза и термическую стабильность на 6 °С. Учитывая, что Thr214 непосредственно расположен в 8-охоGua-связывающей петле, нельзя исключать его важность для правильной конформации активного центра Fpg.

Нарушение мостика R54–E131 в целом не влияло на стабильность белка, однако делало его полностью неспособным связывать и расщеплять ДНК-субстрат. Важность взаимодействий, сосредоточенных вокруг этой пары, подтверждает предположение о том, что правильная динамика и поддержание междоменных связей играют критическую роль в активности Fpg.

Замены в мостике Q234–R244 значительно снижали термическую стабильность и практически не влияли на активность Fpg, что несколько противоречит представлению о функциональной важности цинкового пальца в гликозилазе. Тем не менее, поскольку мутанты полностью или частично сохраняли связанный Zn (таблица 14), структура самого пальца оставалась, по-видимому, неизменной. Молекулярной динамикой также не удалось выявить очевидного влияния мутаций на область белка, доступной для растворителя, или ориентацию цинкового пальца относительно остального белка. Таким образом, поддержание стабильности С-концевого домена белка представляется более вероятной функцией мостика Q234–R244, чем поддержание конформации мотива цинкового пальца.

Таким образом, впервые были выявлены функционально важные взаимодействия, удаленные от активного центра фермента, на основании коэволюционного анализа. Как и в случае с другими вычислительными подходами, такие предсказания должны быть подтверждены экспериментально, и могут использоваться для более глубокого механистического исследования роли внутрибелковых взаимодействий.

#### **4.5. Роль выворачивания поврежденного нуклеотида в узнавании 8-оксогуанина ферментами Fpg и OGG1**

На текущий момент компьютерное моделирование остается достаточно ресурсозатратным способом предсказывать элементы, выполняющие структурные или каталитические функции в составе фермента. Логично дополняя друг друга, вычислительные и структурные методы способны предсказывать роль определенных аминокислот и взаимодействий между ними в функционировании фермента. Тем не менее, даже такой инструментарий не позволяет с абсолютной уверенностью рассуждать о механизме узнавания

субстрата и каталитическом процессе. Опыт показывает, что наиболее информативными результаты получаются с привлечением дополнительных методов, таких как сайт-направленный мутагенез, исследование ферментативной кинетики, использование химических аналогов субстрата и т. п.

Согласно данным Европейского комитета по стандартизации окислительного повреждения ДНК (ESCODD) встречаемость 8-охоGua в человеческих клетках составляет около одного повреждения на  $10^6$  неповрежденных гуанинов [330]. При этом остается неясным, каким образом OGG1 человека способен настолько быстро и специфично различать достаточно редкое повреждение в ДНК. Это же касается и его бактериального аналога Fpg. Несмотря на абсолютно разные третичные структуры ферментов, в их составе можно выделить аналогичные аминокислотные остатки, выполняющие, как предполагается, схожие функции в ходе узнавания и выворачивания нуклеотида. В серии работ с использованием кинетики остановленной струи миллисекундного разрешения для обоих белков детектировались множественные кинетические интермедиаты в ходе реакции [326, 331-335], каждый из которых теоретически может способствовать узнаванию подходящего субстрата и препятствовать процессингу других оснований. Было сделано предположение, что выворачивание нуклеотида может быть ключевым моментом в узнавании 8-охоGua, причем по крайней мере один или несколько актов узнавания происходит на ранних стадиях выворачивания, поскольку чрезвычайно быстрое скольжение гликозилаз по ДНК практически полностью исключает возможность полного извлечения инспектируемого основания из цепочки и перемещение в активный центр фермента [336]. Поскольку с момента потери стэкинг-взаимодействий 8-охоGua с соседними основаниями и до момента его попадания в активный центр фермента не происходит значимых конформационных изменений в области флюоресцирующих остатков Fpg и OGG1, применение метода остановленной струи для более детального анализа стадий выворачивания нуклеотида становится невозможным. Поэтому в сотрудничестве с группой профессора К. Симмерлингом (Университет штата Нью-Йорк, США) были энергетически и структурно охарактеризованы процессы выворачивания нуклеотидов, содержащих 8-охоGua и Gua, для OGG1 человека и Fpg *Geobacillus stearothermophilus* с использованием направленной молекулярной динамики. Ферменты выбирались исходя из наличия для них кристаллических структур высокого разрешения, покрывающих, по возможности, как предельные состояния выворачивания, то есть в составе спирали ДНК и активном центре фермента, так и предполагаемые интермедиаты это процесса.

Анализ профилей свободной энергии, рассчитанных для выворачивания нуклеотидов с 8-охоGua и Gua обоими ферментами, выявил значительную разницу в энергии конечных

состояний (рисунок 45). Так, более энергетически выгодным для Gua оказалось внутриспиральное расположение, в то время как для 8-охоGua — внеспиральное вывернутое расположение. В случае Frg разница между предельными состояниями Gua составила ~20 ккал/моль, при этом энергетический барьер, преодолеваемый для извлечения основания из стопки ДНК, соответствовал ~22 ккал/моль. Выворачивание 8-охоGua оказалось кинетически более выгодным: преодоление барьера всего в ~7 ккал/моль дополнительно компенсируется теми же ~7 ккал/моль за счет разницы энергий внутриспирального состояния повреждения и вывернутого в активный центр Frg. Аналогичная картина наблюдалась и для человеческой гликозилазы, где для нормального Gua предельные состояния оказались практически изоэнергетичны, но для преодоления барьера требуется ~7–8 ккал/моль. Значительно меньший барьер в ~4 ккал/моль нужно преодолеть для выворачивания 8-охоGua из спирали, при этом выигрыш из-за разницы в энергиях состояний составляет около 12 ккал/моль.

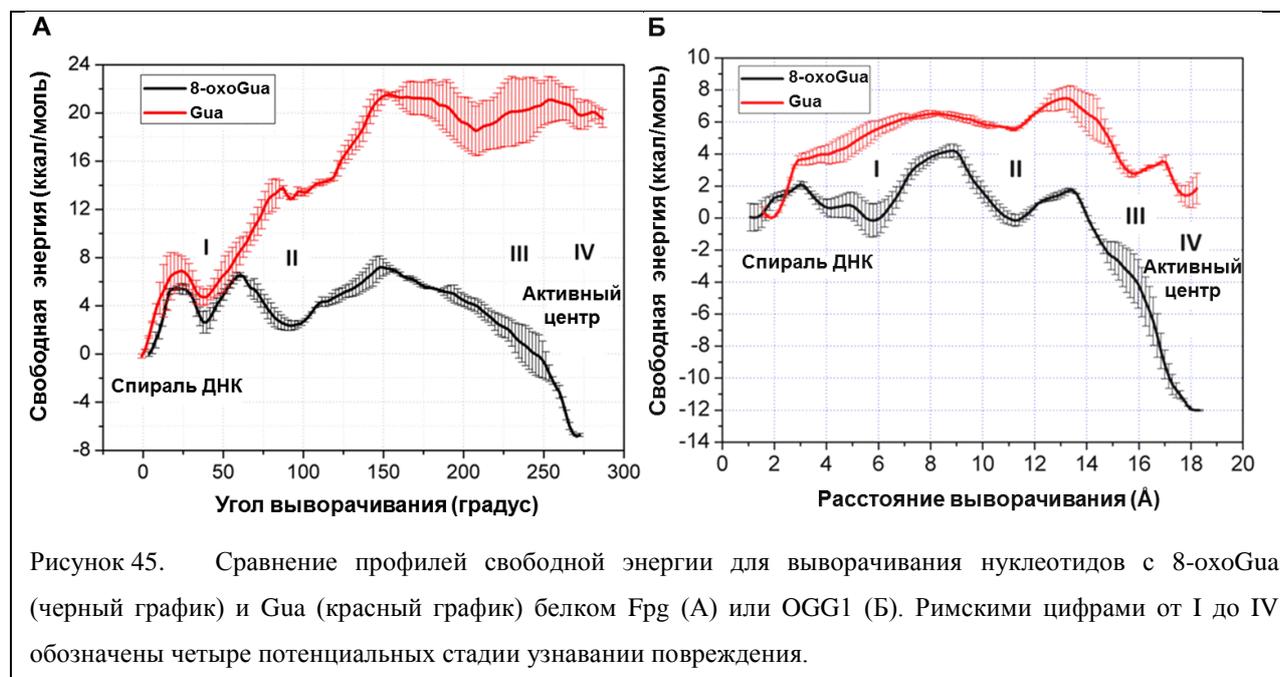


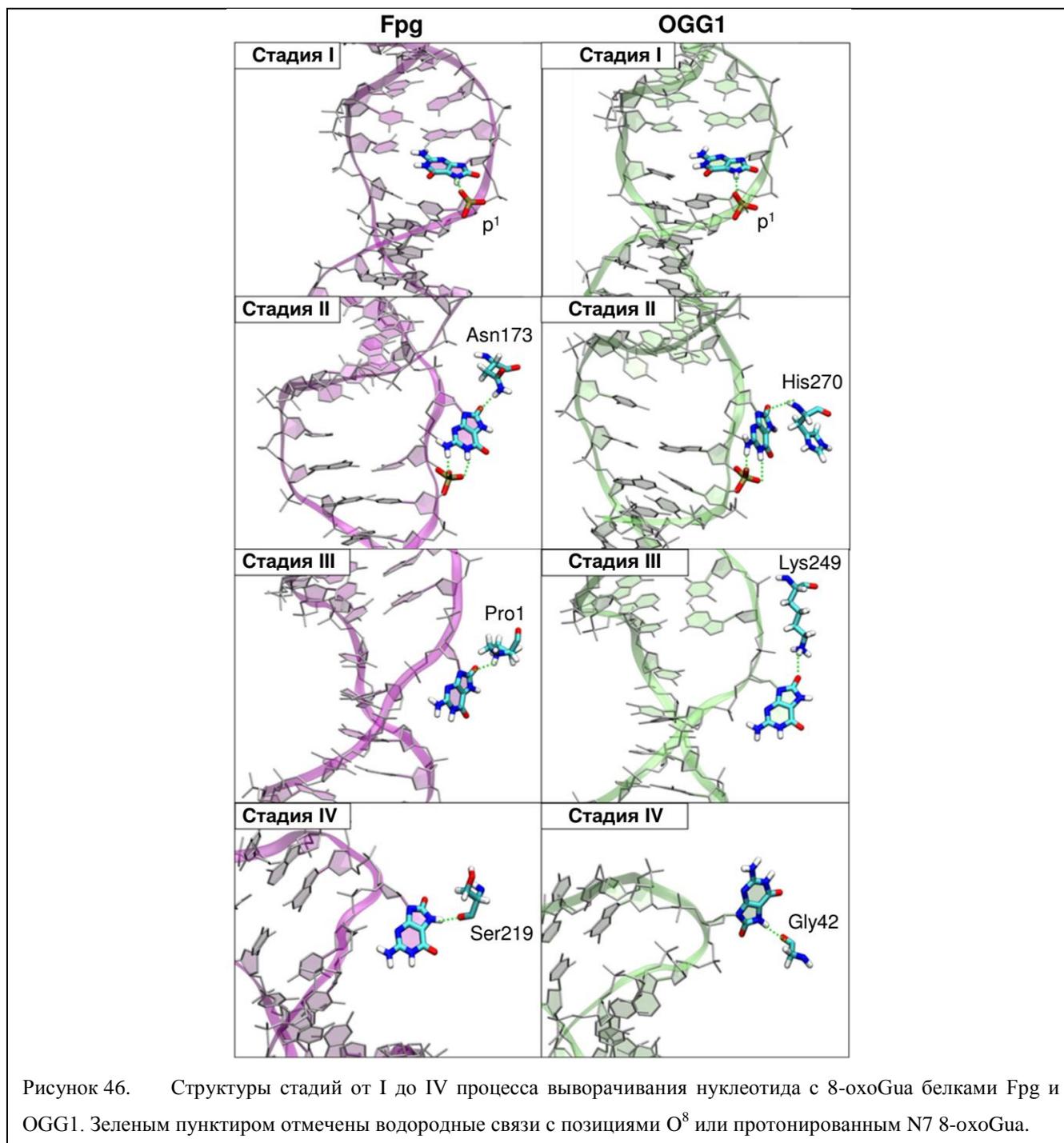
Рисунок 45. Сравнение профилей свободной энергии для выворачивания нуклеотидов с 8-охоGua (черный график) и Gua (красный график) белком Frg (А) или OGG1 (Б). Римскими цифрами от I до IV обозначены четыре потенциальных стадии узнавания повреждения.

Профили свободной энергии для обоих ферментов содержат, главным образом, четыре явных области с существенной разницей в энергии для Gua и 8-охоGua. Области соответствуют последовательным стадиям выворачивания нуклеотидов с соответствующими интермедиатами энергетической и, вероятно, структурной верификации повреждения (рисунок 45).

На стадии I, где впервые неповрежденный Gua может быть распознан, как непригодный для катализа, происходит разрыв комплементарного и стэкинг взаимодействий 8-охоGua или Gua и их частичное выворачивание из стопки оснований. В отсутствие N7 атома водорода Gua не стабилизирован в структуре OGG1, а его ориентация в Frg не благоприятствует

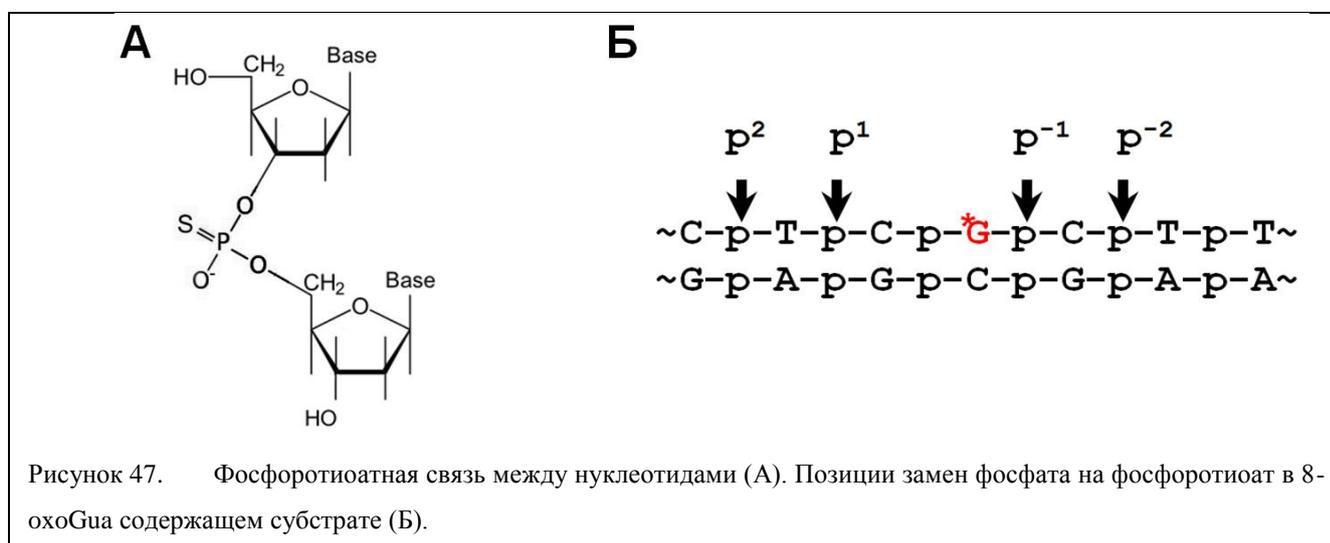
дальнейшему протеканию каталитических процессов. В то же время 8-охоGua стабилизируется 5'-фосфатом ( $p^1$ ) в обоих ферментах.

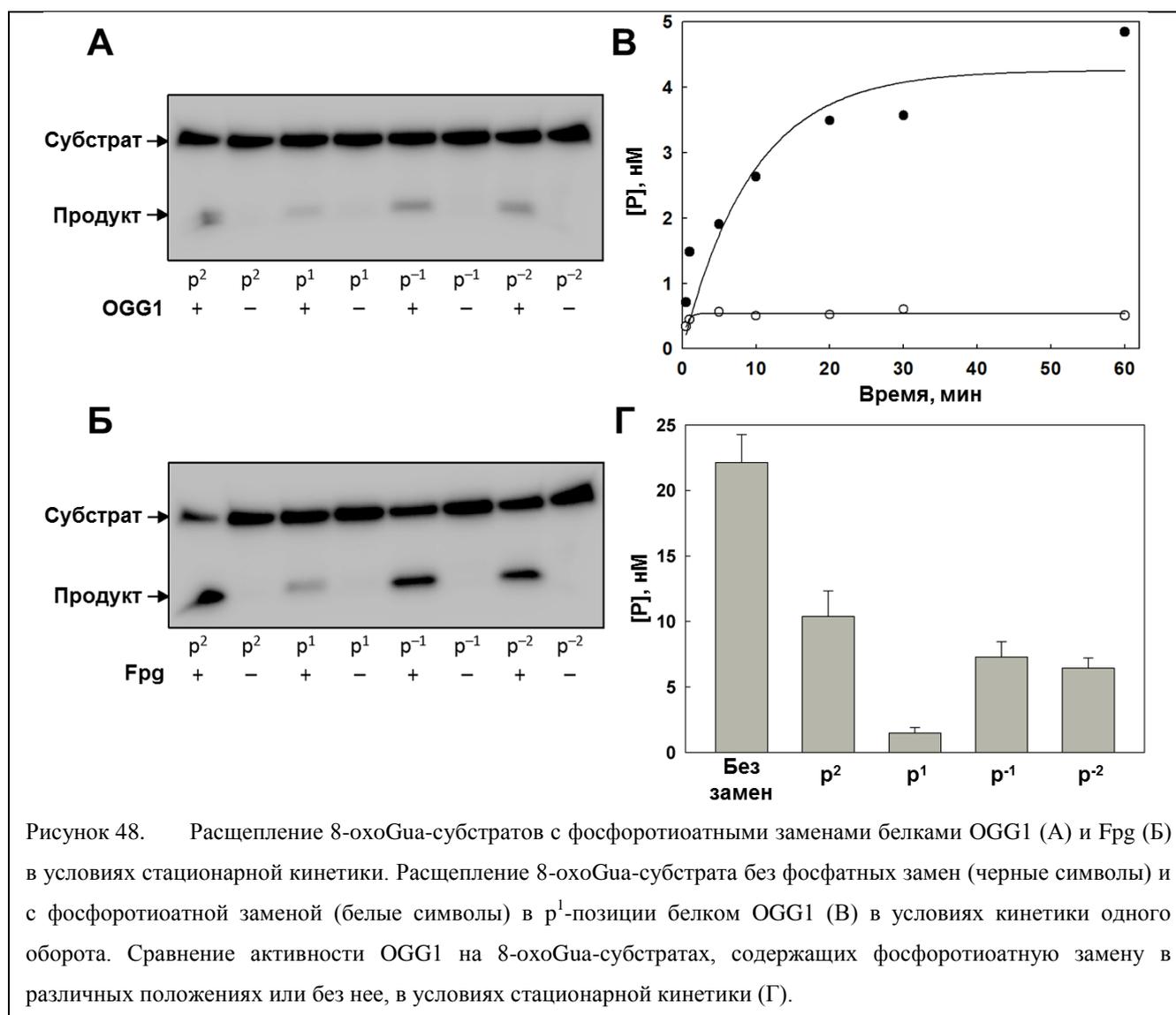
На стадии II 8-охоGua, помимо  $p^1$ , дополнительно стабилизируется His270 в случае OGG1 или Asn173 в случае Fpg (рисунок 46). Аналогичные взаимодействия с Gua оказываются невозможными по причине отсутствия атома  $O^8$ .



Поскольку в ходе моделирования выворачивания было выявлено важное промежуточное взаимодействие между 8-охоGua и  $p^1$ , представлялось необходимым изучить влияние изменений в этом фосфате на активность фермента. В качестве замены была выбрана

фосфоротиоатная группа (рисунок 47 А). Сохраняя отрицательный заряд фосфатной группы, фосфоротиоат содержит более объемный, более гидрофобный, легче поляризуемый и менее электроотрицательный атом серы вместо одного нестикового кислорода. В результате заряд в большей степени сконцентрирован на оставшемся кислороде, а сера остается практически нейтральной. Описанные отличия, предполагалось, должны изменять взаимодействие межнуклеотидной группы с окружением. Для проверки этой гипотезы были сконструированы ДНК-субстраты, содержащие в одной цепи 8-охоGua и фосфоротиоаты в позициях  $p^2$ ,  $p^1$ ,  $p^{-1}$  или  $p^{-2}$  (рисунок 47 Б). Отсутствие субстрата с заменой в  $p^0$  позиции связано с недоступностью подходящего фосфорамидита для синтеза. Полученные субстраты использовались для проверки активности OGG1 человека и Fpg *E. coli*. Так, замена в  $p^1$  позиции значительно снижала активность обоих ферментов (рисунок 48 А и Б). Причем для OGG1 это справедливо как в условиях стационарной кинетики, так и в условиях кинетики одного оборота (рисунок 48 В и Г). Двукратное падение активности в случае замен в других положениях может объясняться тем, что для реакции использовался рацемат из *R*- и *S*-фосфоротиоатов, только один из которых сохраняет связи с ферментом. Примечательно, что  $p^1$  не образует прямого контакта с белком и не участвует в химических этапах реакции, катализируемой ДНК-гликозилазами. Таким образом, ингибирование OGG1 и Fpg фосфоротиоатной группой, наиболее вероятно, имеет конформационную природу, предсказанную компьютерным моделированием.





На стадии III оба фермента начинали взаимодействовать с O<sup>8</sup> повреждения своими каталитическими остатками: Pro1 в случае Fpg или Lys249 в случае OGG1. В отсутствие O<sup>8</sup> Gua образует водородную связь с остатком Pro1 через N7, принимая неблагоприятную конформацию. В OGG1 на стадии III основание Gua совсем не стабилизировано. Для дальнейшего попадания Gua в активный центр любой из гликозилаз требуется преодолеть небольшой энергетический барьер, в то время как видимого барьера в случае 8-охоGua не наблюдалось.

Конечная точка выворачивая нуклеотида — активный центр фермента. Согласно профилям свободной энергии, стадия IV— это стабильное состояние для 8-охоGua. При попадании Gua в активный центр ни аминокислотное окружение, ни само основание не могут быть правильным образом ориентированы для катализа.

В ходе компьютерного моделирования выворачивания нуклеотидов белком Fpg был предсказан ряд ключевых аминокислотных остатков для стабилизации основных конформеров

на траектории выворачивания. Среди них каталитический Pro1, Arg263 и Asn173, стабилизирующие вывернутое основание в активном центре, и Arg111, участвующий в узнавании и стабилизации комплементарного повреждению Cyt, высококонсервативны среди всех последовательностей Fpg. С целью экспериментальной проверки предсказанной важности этих остатков в узнавании повреждения был получен набор мутаций в биохимически хорошо изученном белке Fpg из *E. coli*. Arg108 (Arg111 в Fpg *G. stearothermophilus*) был заменен на Lys, Gln и Leu. В первом случае, предполагается, сохраняется стерический объем, полярность и заряд, во втором — стерический объем и полярность, в третьем — только объем. Asn168 (Asn173 в Fpg *G. stearothermophilus*) был заменен на Asp, чтобы исключить возможность донорства водородной связи и добавить заряд, или на Gln для незначительного увеличения размера. Arg258 (Arg263 в Fpg *G. stearothermophilus*), исходя из того же принципа, был заменен на Lys, Gln или полностью элиминирован заменой на Ala. Мутагенез остатка Pro1 не проводился, поскольку он непосредственно участвует в катализе. Все описанные мутантные формы были выделены в рекомбинантном виде, и их активности исследованы в условиях стационарной кинетики. В результате было установлено, что все мутации делали Fpg практически неспособным к расщеплению 8-охоGua-субстрата (рисунок 49), в то время как существенного влияния на AP-лиазную активность обнаружено не было (рисунок 50). Это свидетельствует о том, что вносимые мутации не нарушают основную структуру белка, не затрагивают его способность связывать ДНК-субстрат или надлежащим образом ориентировать каталитические остатки Pro1 и Glu2, а влияние на активность, по всей вероятности, объясняется нарушением процесса выворачивания поврежденного нуклеотида.

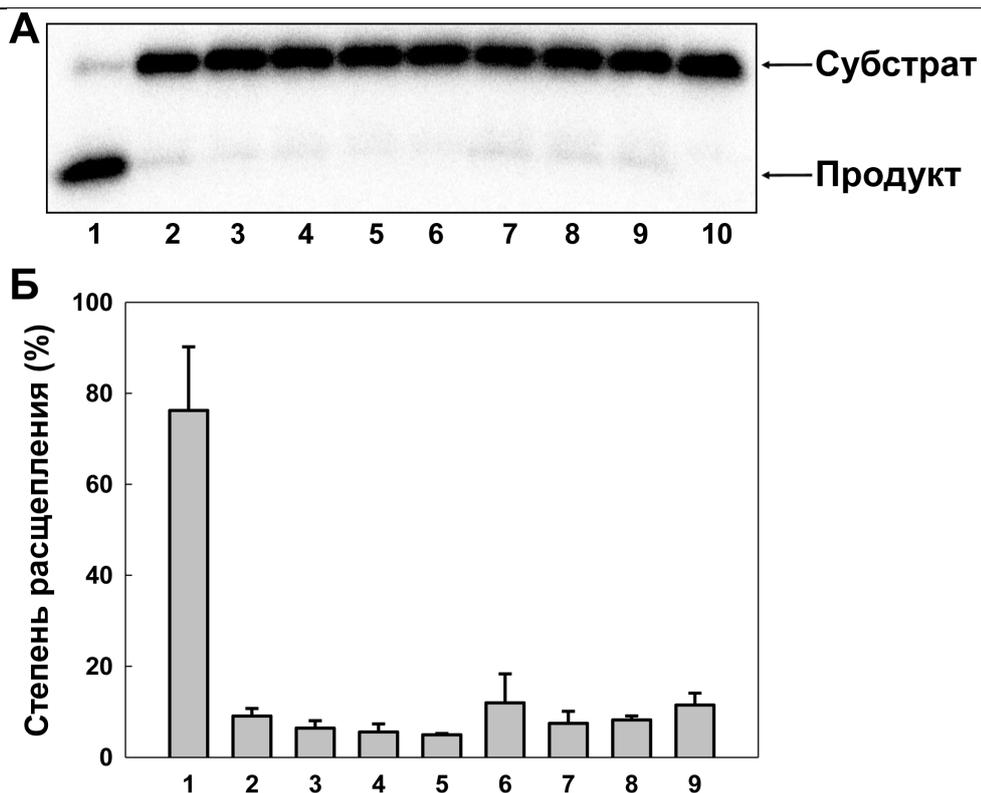
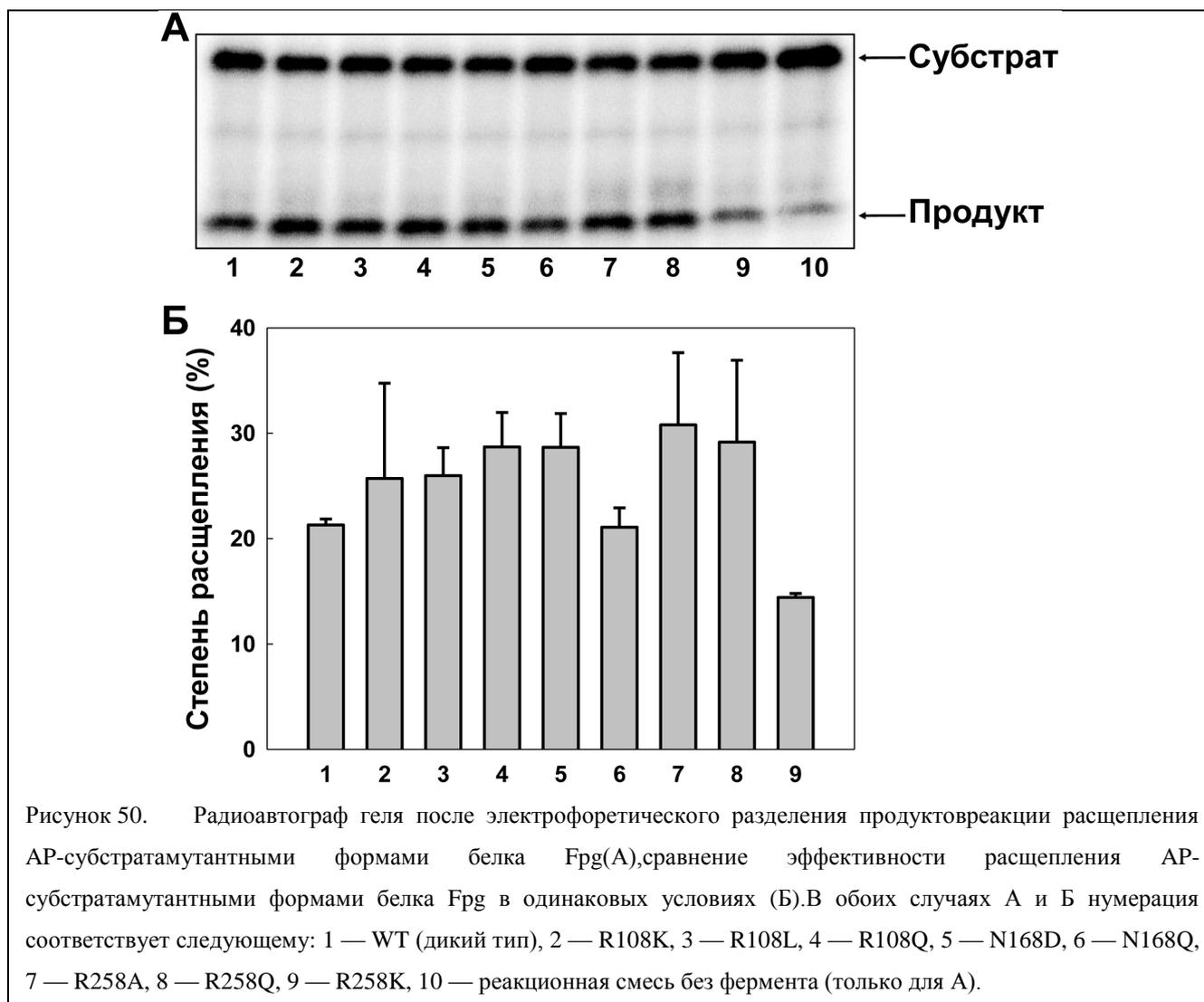


Рисунок 49. Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов реакции расщепления 8-охоGua-субстрата мутантными формами белка Frg (А), сравнение эффективности расщепления 8-охоGua-субстрата мутантными формами белка Frg в одинаковых условиях (Б). В обоих случаях А и Б нумерация соответствует следующему: 1 — дикий тип, 2 — R108K, 3 — R108L, 4 — R108Q, 5 — N168D, 6 — N168Q, 7 — R258A, 8 — R258Q, 9 — R258K, 10 — реакционная смесь без фермента (только для А).



Кинетические параметры расщепления 8-охоGua-субстрата подтверждают роль Arg108, Asn168 и Arg258 в процессе выворачивания (таблица 15). Мутации слабо влияли на  $K_M$  там, где константу удалось определить в качестве независимого параметра, вновь свидетельствуя о том, что аминокислотные замены не влияют на сродство фермента к субстрату и стабильность фермент-субстратного комплекса. Значения каталитических констант, напротив, снижались по крайней мере в десять раз, подтверждая нарушение процессов, следующих за связыванием субстрата. Наименьшее влияние на константу скорости наблюдалось для замены N168Q благодаря сохранению возможности образовывать водородные связи. Однако происходит это, вероятно, в гораздо менее благоприятной конформации из-за наличия дополнительной метиленовой группы. Из всех замен Arg258 наибольшую активность сохранил мутант R258Q, свидетельствуя о большей важности  $\pi$ -стекинга и водородного связывания с этим остатком для координирования 8-охоGua по сравнению с электростатическими взаимодействиями. Наконец,

мутанты Arg108 проявляли остаточную активность только при сохранении заряда, как в случае с заменой на Lys.

Таблица 15. Кинетические параметры расщепления 8-охоGua-субстрата мутантными формами белка Fpg*E. coli* и белком дикого типа.

Замена в Fpg	$K_M$ , нМ	$k_{cat}$ , мин <sup>-1</sup>	$k_{sp}$ , нМ <sup>-1</sup> ×мин <sup>-1</sup>
WT (Дикий тип)	8,1±2,3	1,7±0,1	0,21±0,03
R108K	18±4	$(7,0±0,6) \times 10^{-2}$	$(3,9±0,3) \times 10^{-3}$
R108L	— <sup>1</sup>	— <sup>1</sup>	$(6,4±0,3) \times 10^{-4}$
R108Q	— <sup>1</sup>	— <sup>1</sup>	$(6,4±0,2) \times 10^{-4}$
N168D	— <sup>1</sup>	— <sup>1</sup>	$(4,7±0,2) \times 10^{-4}$
N168Q	8,1±1,9	0,16±0,01	$(2,0±0,2) \times 10^{-2}$
R258A	— <sup>1</sup>	— <sup>1</sup>	$(7,6±0,3) \times 10^{-4}$
R258Q	6,3±3,0	0,08±0,01	$(1,3±0,3) \times 10^{-2}$
R258K	— <sup>1</sup>	— <sup>1</sup>	$(6,0±0,4) \times 10^{-4}$

<sup>1</sup> Не удалось определить в качестве отдельного параметра из-за слабого расщепления.

Таким образом, несмотря на отсутствие структурной гомологии между OGG1 и Fpg оба белка эффективно используют схожие энергетические и структурные механизмы ранней многостадийной верификации повреждений, что, вероятно, существенно облегчает быстрое распознавание поврежденного основания, необходимое при сканировании ДНК в масштабах целого генома. Обнаруженное сходство механизмов для двух разных структурных классов ферментов позволяет предположить, что такой способ узнавания повреждений может быть общим в репарации ДНК.

#### 4.6. Влияние целостности сахарофосфатного остова ДНК на механизм Fpg

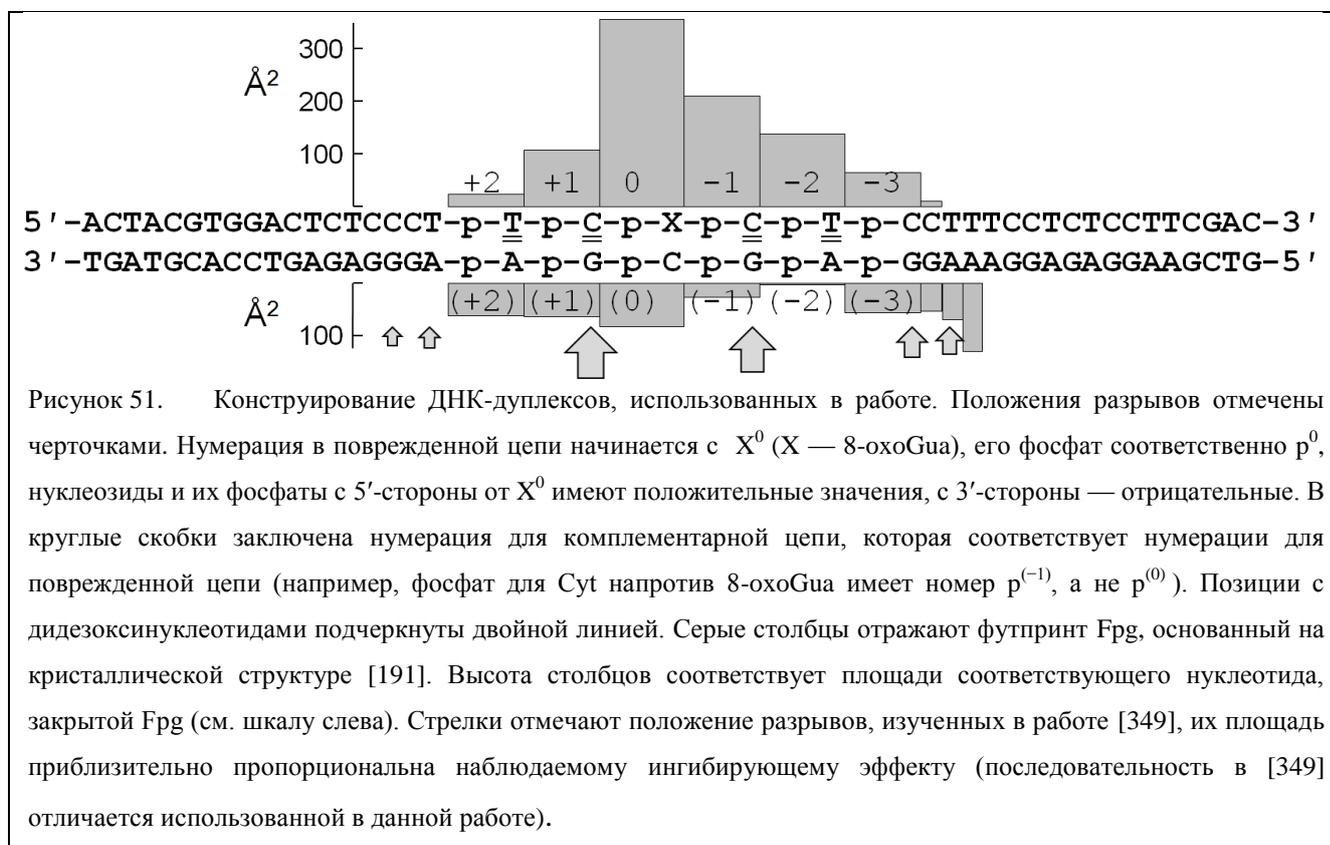
ДНК-гликозилазы представляют собой структурно гетерогенную группу ферментов, объединенных общей функцией — препятствовать распространению поврежденных оснований ДНК, иницируя путь ЭРО [112, 124]. Несмотря на структурные различия, большинство гликозилаз имеют общую особенность, определяемую химией реакции и конформацией канонической ДНК. Для гидролиза гликозидной связи необходима нуклеофильная атака по атому С1' поврежденного нуклеотида, при этом нуклеофилом может выступать как активированная молекула воды, так и депротонированный амин в активном центре фермента [124, 125]. В норме доступ к атому С1' в структуре В-ДНК для реакционных групп белка сильно ограничен, поэтому для преодоления структурных преград необходим ряд конформационных преобразований [337]. С этой целью ДНК-гликозилазы всех суперсемейств сильно изламывают ДНК в области повреждения, вытесняя тем самым модифицированный нуклеотид в

специальный карман. Такая крайне напряженная конформация стабилизируется множественными контактами с ДНК и включением ряда аминокислотных остатков в структуру ДНК-дуплекса. В ходе распознавания повреждения конформационным преобразованиям подвергается структура не только ДНК, но и белка. Происходят преобразования, вероятно, синхронно благодаря высокоточным организованным взаимодействиям между остатками белка и ДНК. Учитывая, что ДНК-гликозилазы должны удалять повреждения из любого контекста, разумно предположить, что такие контакты образуются преимущественно с сахарофосфатным остовом ДНК. Как было показано в ходе множества структурных и молекулярно-динамических исследований, действительно, гликозилазы крайне редко взаимодействуют непосредственно с основаниями ДНК за исключением поврежденного основания и основания напротив него, однако образуют с межнуклеозидными фосфатами плотную сеть как непосредственных связей, так и взаимодействий с участием молекулы воды [168, 172, 178, 180, 191, 338]. Таким образом, можно заключить, что правильное выворачивание поврежденного нуклеотида будет сильно зависеть от целостности сахарофосфатного остова вблизи повреждения в ДНК-субстрате.

Сочетание одноцепочечного разрыва с поврежденным основанием в субстратах ранее исследовалось главным образом в контексте кластерных повреждений, образующихся под действием ионизирующего излучения в водном растворе. Для белка Fpg было установлено, что при наличии в неповрежденной цепи однонуклеозидной брешы или разрыва цепи с соседним нуклеотидом без основания активность фермента падала от 2 до 20 раз, когда такой разрыв находился сразу с 3'- или 5'-стороны от основания, комплементарного 8-охоGua или в диапазоне пяти нуклеотидов с 5'-стороны от этого основания (рисунок 51) [339]. Никакого эффекта не наблюдалось, если разрыв в неповрежденной цепи находился с другой стороны от 8-охоGua [339]. Человеческая и дрожжевая ДНК-гликозилазы OGG1, существенно отличающиеся от Fpg по структуре, показывали похожие закономерности [340, 341]. В случае, когда разрыв находился в одной цепи с 8-охоGua, OGG1 слабо выщеплял поврежденное основание из субстрата с разрывом между вторым и третьим нуклеотидом с 3'-стороны от 8-охоGua, если AP-сайт находился с 3'-стороны разрыва [342]. Однако разрывы, расположенные дальше в 3'-сторону или в 5'-области, практически не влияли на активность [342].

С точки зрения механизма действия ДНК-гликозилаз эти исследования, к сожалению, недостаточно информативны, поскольку «разрыв» в их контексте подразумевает межнуклеотидную брешь без остатка фосфата или основания, к тому же количество исследованных положений весьма ограничено. В литературе не обнаружено работ, посвященных исследованию роли непрерывности сахарофосфатного остова для эффективного катализа превращения субстратов ДНК-гликозилазами.

Подобно другим гликозилазам, Frg вытесняет 8-охоGua из стопки оснований ДНК, проходя несколько стадий верификации повреждения в ходе выворачивания, что практически исключает удаление Gua [182, 331, 343-347]. Согласно анализу кристаллических структур ДНК в комплексе с Frg из различных видов, белок главным образом образует контакты с фосфатами вблизи от повреждения [182, 191, 348]. Поэтому для оценки важности целостности сахарофосфатного остова для расщепления ДНК-субстрата белком Frg были сконструированы субстраты, в которых отсутствовала одна из шести ближайших фосфоэфирных связей поврежденной цепи с каждой из сторон от 8-охоGua (рисунок 51). Для каждого субстрата, содержащего разрыв, были определены кинетические параметры расщепления. Важно отметить, что в отличие от некоторых прежних работ, посвященных активности Frg в отношении 8-охоGua вблизи одноцепочечного «разрыва», который в действительности был межнуклеотидной брешью без остатка фосфата, использованные субстраты содержали фосфатную группу при разрыве, сохраняя тем самым возможность образования всех водородных и электростатических связей с этим остатком. Ожидается, однако, что отсутствие одной фосфоэфирной связи нарушит синхронность движений фосфата и соседнего остатка сахара, разделенных разрывом.



Четыре связи оказались абсолютно необходимыми для активности Frg. Они включали ковалентные связи 5' и 3' гидроксильных групп 8-охоGua, связь между  $C^{-1}$  и его фосфатом и  $T^{-2}$

и его фосфатом (рисунок 52, таблица 16). Удаление любой из этих связей приводило к полной потере активности Fpg в отношении соответствующего субстрата. В структуре Fpg *E. coli* в комплексе с ДНК только фосфаты  $p^0$ ,  $p^{-1}$ , и  $p^{-2}$  поврежденной цепи образуют плотную сеть взаимодействий с аминокислотными остатками белка [191]. Вследствие таких взаимодействий фосфаты  $p^0$  и  $p^{-1}$  располагаются ближе друг к другу, чем в обычной В-ДНК. Другие ДНК-гликозилазы, принадлежащие другим структурным семействам, например, урацил-ДНК-гликозилаза, MutY, OGG1 и эндонуклеаза III, используют аналогичный механизм сжимания остова ДНК для «выдавливания» поврежденных нуклеотидов, но при этом сближают  $p^{+1}$  и  $p^{-1}$  сильнее, чем  $p^0$  и  $p^{-1}$  [281, 288, 350, 351]. Предположительно, простого наличия фосфата в положениях  $p^0$  и  $p^{-1}$  еще недостаточно для правильного выворачивания нуклеотида или ориентирования его в активном центре, для этого необходимы механические силы, действующие через неразрывную связь. Помимо ориентирования нуклеотида в активном центре, потеря связи с фосфатом может влиять на конформацию дезоксирибозы, которая, как предполагается, влияет на узнавание повреждений и катализ Fpg [352-354]. Еще одна возможная причина заключается в том, что введение дополнительного отрицательного заряда в фосфатный моноэфир может отрицательно сказаться на эффективности реакции, однако, это представляется менее вероятным, поскольку отрицательный заряд недалеко от  $C1'$ , по-видимому, стимулирует, а не подавляет разрыв *N*-гликозидной связи [355, 356]. Потребность в неповрежденности связи  $p^{-2}$ - $T^{-2}$  менее очевидна. Фосфат в этой позиции взаимодействует с белковыми остатками, которые составляют часть «седлового мотива», участвующего в динамической дестабилизации ДНК во время поиска повреждения [357], поэтому соображения о важности неразрывности с остальной ДНК могут быть применимы и в случае  $p^{-2}$ . Таким образом, неудивительно, что целостность по крайней мере некоторых связей с участием  $p^0$ ,  $p^{-1}$ , и  $p^{-2}$  критична для функционирования фермента.

Таблица 16. Кинетические параметры расщепления субстрата, содержащего разрыв, белком Frg

Цепь	Фосфат	Положение разрыва относительно фосфата	$K_M$ , нМ	$k_{cat}$ , мин <sup>-1</sup>	$k_{sp}$ , нМ <sup>-1</sup> ·мин <sup>-1</sup>
Без разрыва			$9.7 \pm 1.4$	$0.33 \pm 0.03$	$(3.4 \pm 0.5) \times 10^{-2}$
Поврежденная	+2	5'	$7.0 \pm 1.3$	$1.3 \pm 0.1$	$(1.9 \pm 0.5) \times 10^{-1}$
	+2	3'	$7.5 \pm 1.6$	$1.4 \pm 0.1$	$(1.9 \pm 0.5) \times 10^{-1}$
	+1	5'	$48 \pm 5$	$1.2 \pm 0.1$	$(2.5 \pm 0.5) \times 10^{-2}$
	+1	дидезокси			— <sup>1</sup>
	+1	3'	$23 \pm 5$	$2.8 \pm 0.2$	$(1.2 \pm 0.3) \times 10^{-1}$
	0	5'	$14 \pm 1$	$2.7 \pm 0.1$	$(1.9 \pm 0.4) \times 10^{-1}$
	0	дидезокси			— <sup>1</sup>
	0	3'			— <sup>1</sup>
	-1	5'			— <sup>1</sup>
	-1	3'			— <sup>1</sup>
	-2	5'	$8.2 \pm 2.1$	$0.22 \pm 0.02$	$(2.7 \pm 0.9) \times 10^{-2}$
	-2	дидезокси			— <sup>1</sup>
	-2	3'			— <sup>1</sup>
	-3	5'	$11 \pm 3$	$0.88 \pm 0.06$	$(8.0 \pm 2.6) \times 10^{-2}$
	-3	дидезокси	$4.0 \pm 1.0$	$0.55 \pm 0.03$	$(1.4 \pm 0.4) \times 10^{-1}$
-3	3'	$12 \pm 4$	$0.83 \pm 0.06$	$(6.9 \pm 2.6) \times 10^{-2}$	
Комплементарная	(+2)	5'	$18 \pm 5$	$1.3 \pm 0.1$	$(7.2 \pm 2.4) \times 10^{-2}$
	(+2)	3'	$21 \pm 5$	$1.5 \pm 0.1$	$(7.1 \pm 2.1) \times 10^{-2}$
	(+1)	5'	$14 \pm 3$	$0.68 \pm 0.03$	$(4.9 \pm 1.3) \times 10^{-2}$
	(+1)	3'	$27 \pm 6$	$0.84 \pm 0.06$	$(3.1 \pm 0.8) \times 10^{-2}$
	(0)	5'	$36 \pm 11$	$1.0 \pm 0.1$	$(2.8 \pm 1.0) \times 10^{-2}$
	(0)	3'	$30 \pm 5$	$0.65 \pm 0.04$	$(2.2 \pm 0.5) \times 10^{-2}$
	(-1)	5'	$28 \pm 4$	$0.80 \pm 0.04$	$(2.9 \pm 0.6) \times 10^{-2}$
	(-1)	3'	$28 \pm 6$	$1.7 \pm 0.1$	$(6.1 \pm 1.7) \times 10^{-2}$
	(-2)	5'	$12 \pm 2$	$0.60 \pm 0.03$	$(5.0 \pm 1.2) \times 10^{-2}$
	(-2)	3'	$27 \pm 5$	$0.83 \pm 0.05$	$(3.1 \pm 0.8) \times 10^{-2}$
	(-3)	5'	$23 \pm 8$	$0.90 \pm 0.10$	$(3.9 \pm 1.5) \times 10^{-2}$
(-3)	3'	$17 \pm 3$	$1.1 \pm 0.5$	$(6.5 \pm 3.3) \times 10^{-2}$	

<sup>1</sup>Нет расщепления.

Гораздо более неожиданным оказалось отсутствие эффекта или даже увеличение активности Frg при нарушении других связей остова. Удаление связей между C<sup>-1</sup> и его 3'-фосфатом или T<sup>+2</sup> и его 3'-фосфатом оказывало незначительный негативный эффект на  $k_{sp}$  (~25%), в то время как нарушение других связей увеличивало активность от 2 до 5 раз. В большинстве случаев увеличение активности было вызвано возросшим  $k_{cat}$ , при этом  $K_M$  значительно не менялось (таблица 16). Это свидетельствует о том, что разрывы в определенных положениях могут снимать конформационное напряжение в предкаталитическом комплексе или лучше стабилизировать переходное состояние, практически не влияя на сродство Frg к соответствующему субстрату.

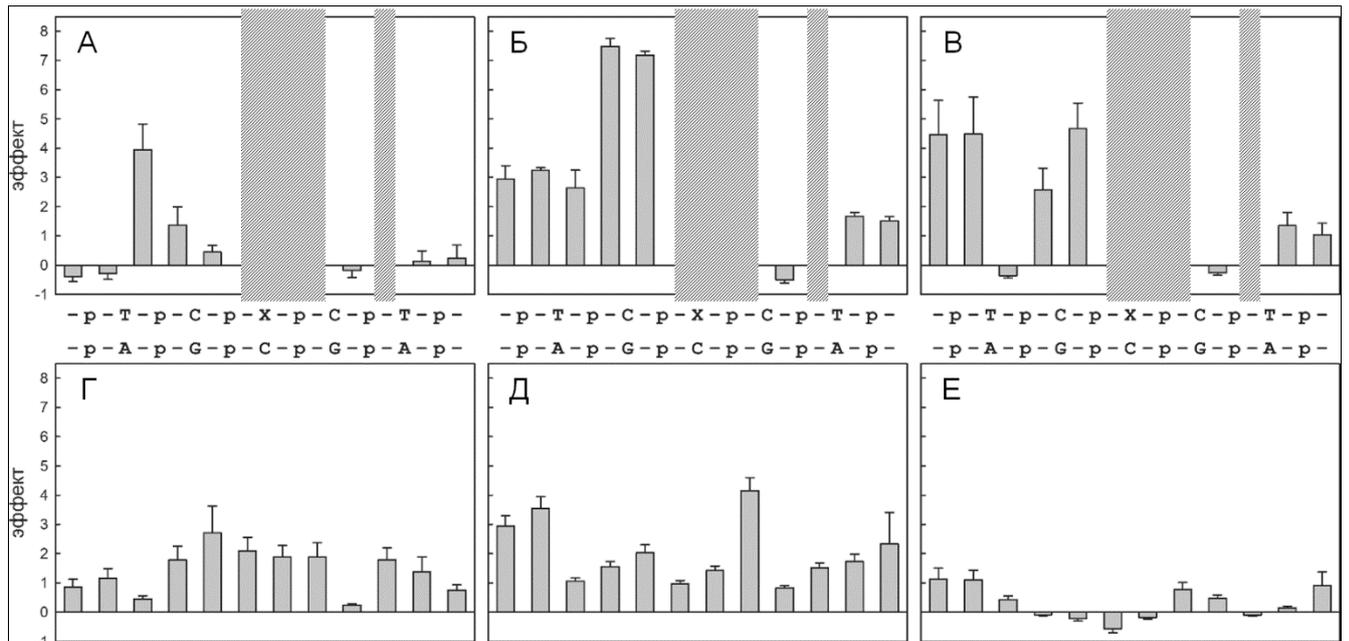


Рисунок 52. Влияние разрыва на кинетику расщепления 8-охоGua содержащего субстрата белком Frg (X=8-охоGua). А–В — субстраты с разрывом в поврежденной цепи; Г–Е — субстраты с разрывом в неповрежденной цепи. Поврежденная цепь представлена в направлении 5'→3'. А и Г —  $K_M$  для всех положений разрыва в обеих цепях субстрата; Б и Д —  $k_{cat}$  для всех положений разрыва в обеих цепях субстрата; В и Е —  $k_{sp}$  для всех положений разрыва в обеих цепях субстрата. «Эффект» — разность между константами субстратов в присутствии разрыва и без него, нормированная на меньшее из этих значений. Заштрихованные области обозначают положение разрывов, делающих субстрат устойчивым к расщеплению белком Frg.

Чтобы оценить необходимость целостности неповрежденной цепи для активности Frg разрывы аналогичным образом вносились в область шести нуклеотидов вокруг 8-охоGua, но уже в комплементарной цепи. Несмотря на то, что Frg покрывает более протяженную область комплементарной цепи, контакты с фосфатами здесь значительно скуднее, главным образом с  $p^{(0)}$ ,  $p^{(+1)}$  и  $p^{(+2)}$  [191]. Кроме того Phe110 после выворачивания повреждения занимает место между обедненными комплементарными связями Cyt и основанием с 5'-стороны от него.

В согласии со слабыми взаимодействиями фосфатов с Frg, разрыв фосфоэфирных связей в комплементарной цепи слабо влиял на активность фермента при рассмотрении  $k_{sp}$ . Отличия от контрольного субстрата без разрывов составляли от 0,6 до 2,1 раза (таблица 16). Несмотря на то, что  $k_{sp}$  практически не менялась, значения  $K_M$  и  $k_{cat}$  в каждом случае увеличивались, демонстрируя компенсацию более низкого сродства Frg к дуплексу с разрывом большей скоростью расщепления субстрата. Среди всех положений разрыва наибольшее снижение активности наблюдалось, когда связь разрывалась рядом с комплементарным повреждению Cyt, хотя в абсолютных значениях  $k_{sp}$  такое снижение составляло лишь от 1,2 до 1,6 раза.

Отсутствие отрицательного влияния разрывов во всех положениях неповрежденной цепи было довольно неожиданным, особенно в свете данных о том, что бреши ДНК без остатка

фосфата или основания в нескольких положениях неповрежденной цепи снижали активность Fpg [358]. Из структуры комплекса Fpg достаточно очевидно сжатие сахарофосфатного остова вокруг C<sup>(0)</sup>. Однако сеть контактов белка с фосфатами неповрежденной цепи намного менее плотная, а поверхность контакта меньше, чем в случае поврежденной цепи (рисунок 51). Энергия взаимодействия неповрежденной цепи с Fpg в абсолютном значении в 2,5 раза меньше энергии для поврежденной цепи [359]. Вполне вероятно, что конформационные изменения неповрежденной цепи следуют за изменениями поврежденной, а не вызываются белком напрямую. В случае поврежденной цепи разрывы с 5'-стороны от 8-охоGua за редким исключением увеличивали активность Fpg, тогда как в 3'-области частично или полностью подавляли.

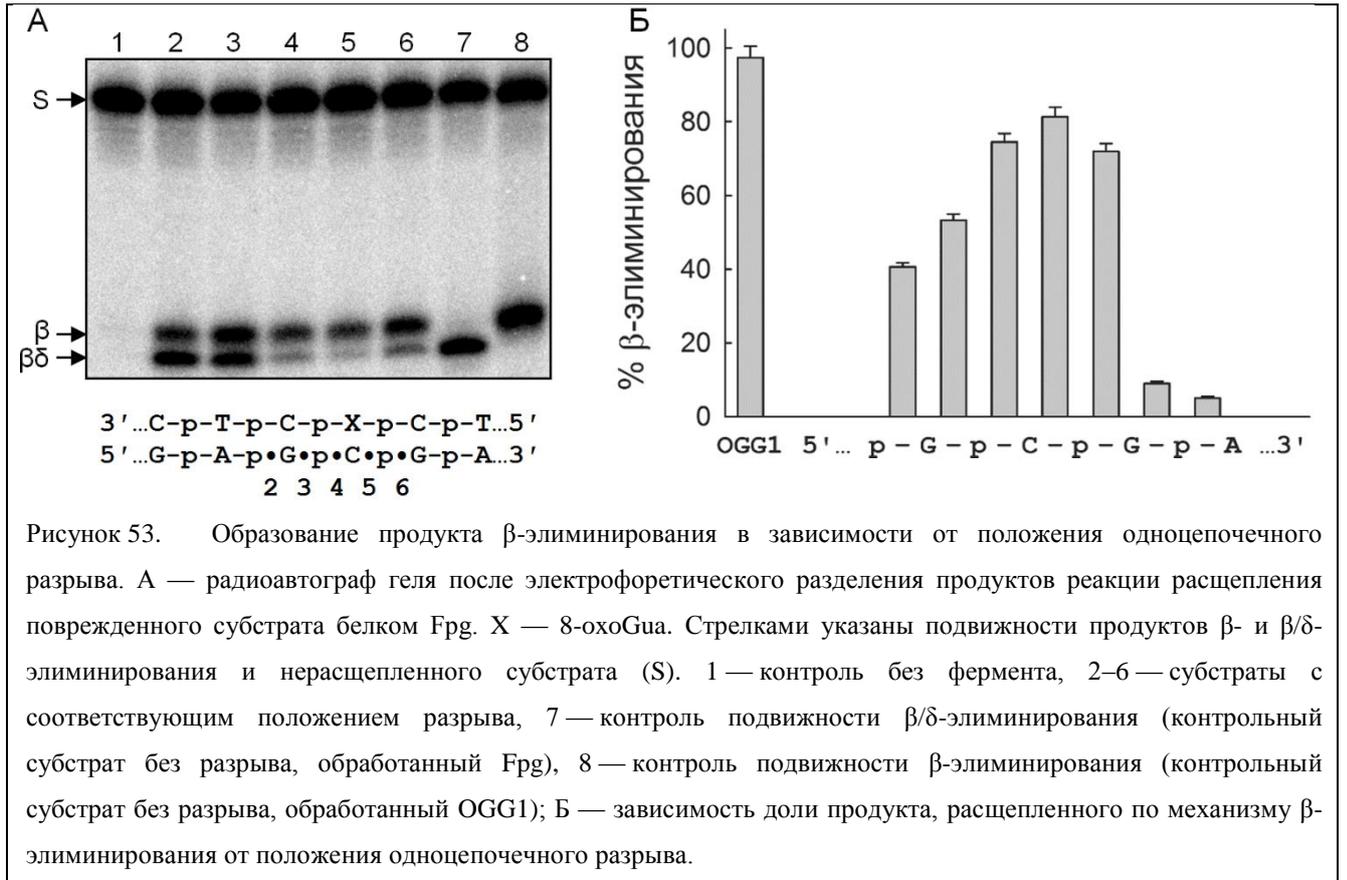
Разрывы, при которых содержатся фосфат и гидроксил, очевидно, больше подходят для исследования эффектов, связанных с целостностью цепи, чем однофосфатные бреши. Тем не менее, такие субстраты содержат 5' или 3' гидроксильные группы с одной стороны разрыва, что добавляет тяжелый атом кислорода и вероятность образовать дополнительную водородную связь в области разрыва. Возможность исключить такие последствия была исследована для четырех позиций (разрыв с 5'-стороны от p<sup>+1</sup>, p<sup>0</sup>, p<sup>-2</sup>, and p<sup>-3</sup>) поврежденной цепи путем замены нуклеотида с 3'-концевым гидроксидом на 2',3'-дидезокси аналог. Поскольку 8-оксо-2',3'-дидезокси-гуанозин-5'-трифосфат коммерчески не доступен, замена в этой позиции не исследовалась.

Дидезоксинуклеотиды, соседние с разрывами с 5'-стороны, в большей степени подавляли реакцию по сравнению с дезокси-аналогами и по своему действию напоминали 3'-разрывы при соответствующем фосфате, хотя количество исследованных позиций весьма ограничено (таблица 16). Только для положения p<sup>-3</sup> расщепление дидезокси-субстрата было сопоставимо с его дезокси-аналогом. Включение дидезоксинуклеотидов во всех остальных трех субстратах делали их полностью устойчивыми к расщеплению ферментом Fpg. Важно отметить, что и в случае дезоксинуклеотидов субстраты с разрывами с 5'-стороны от p<sup>+1</sup> и p<sup>-2</sup> были наихудшими для фермента из всей серии (таблица 16, рисунок 52). В противовес этому, дезокси-разрыв с 5'-стороны от p<sup>0</sup> усиливал активность фермента, в то время как разрыв с дидезоксинуклеотидом в том же положении оказывал инактивирующее действие. Согласно данным рентгеноструктурного анализа и молекулярной динамики комплекса Fpg-ДНК [191, 360], фенильный гидроксил каталитически важного остатка Tyr236 находится в радиусе 3,5 Å от O3' и O1P фосфата p<sup>0</sup>, и это взаимодействие, вероятно, разрушается при полной потере O3'. Эксперименты с ДНК-полимеразами показали, что 2',3'-дидезоксинуклеотиды, несмотря на высокую конформационную схожесть с их 2'-дезокси-аналогами [361], требуют существенной

перестройки активного центра фермента, снижая эффективность катализа до трех порядков [362, 363]. В разрывах с гидроксилом и фосфатом существует вероятность образования водородной связи между этими группами, что может частично компенсировать потерю ковалентной связи. Отсутствие такой возможности в разрывах с дидезоксинуклеотидом может объяснить их более выраженные эффекты.

Fpg — бифункциональная ДНК-гликозилаза, способная выщеплять модифицированное основание и далее вносить разрыв в сахарофосфатный остов в месте повреждения. Химически этот разрыв состоит из двух последовательных реакций  $\beta$ - и  $\delta$ -элиминирования, в ходе которых удаляются фосфаты при C3' и при C5' соответственно. Способность катализировать  $\beta/\delta$ -элиминирование — характерная черта гликозилаз, принадлежащих суперсемейству спираль–два поворота–спираль, которое объединяет Fpg, эндонуклеазу VIII и белки NEIL, в то время как многие другие гликозилазы, например OGG1 человека, расщепляют субстрат по механизму только  $\beta$ -элиминирования.

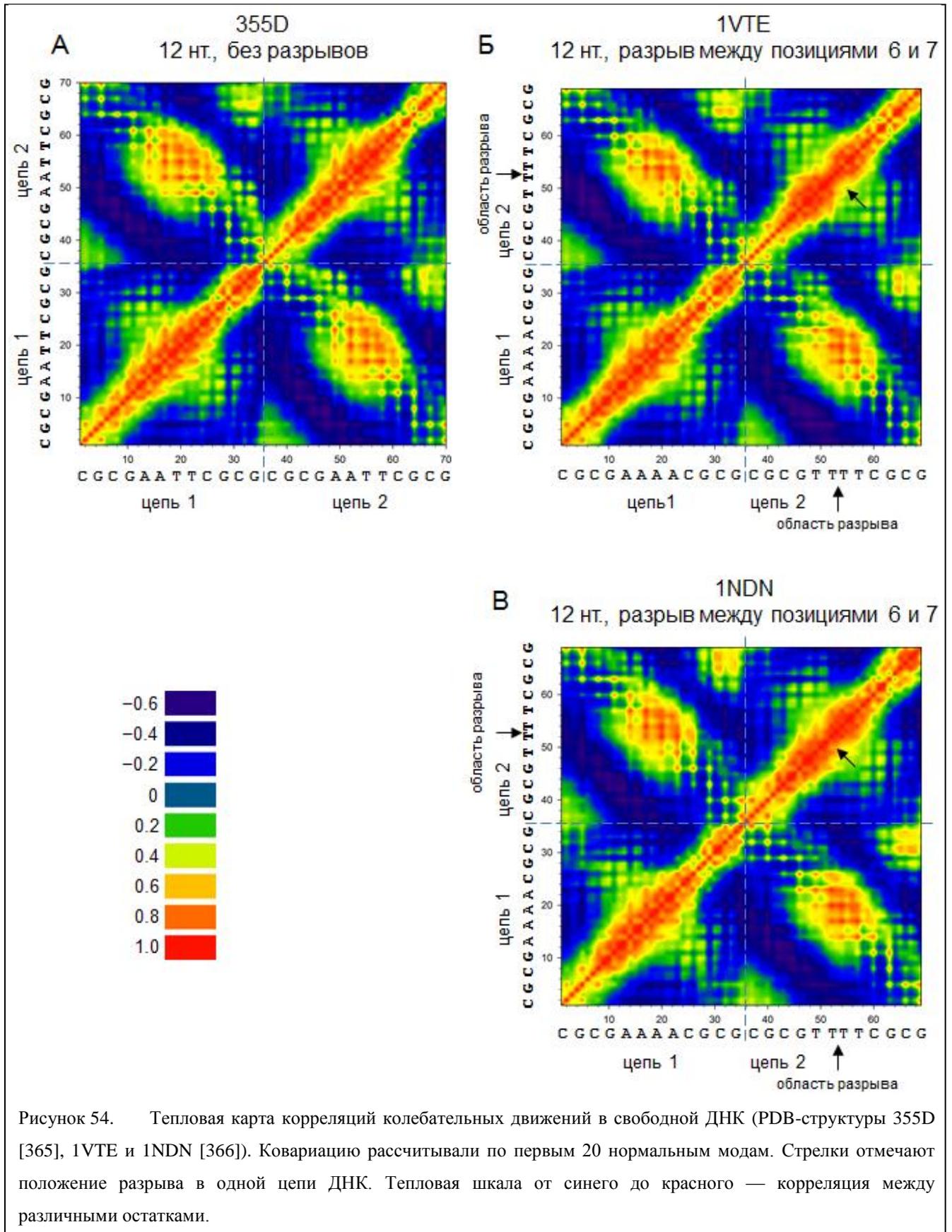
В ходе исследования влияния разрывов в неповрежденной цепи на активность Fpg в некоторых случаях была замечена нетипичная миграция полос относительно маркера подвижности  $\beta/\delta$ -элиминирования (рисунок 53). Систематический анализ подвижности продуктов выявил, что разрывы цепи вблизи Cyt, комплементарного повреждению, и двух соседних нуклеотидов провоцировали преждевременную остановку реакции, катализируемой Fpg, при этом начинал накапливаться продукт  $\beta$ -элиминирования (рисунок 53). Доля продукта  $\beta$ -элиминирования резко падала по мере удаления разрыва от повреждения и практически исчезала к четвертому по удаленности положению от Cyt. Наблюдаемый сдвиг в сторону  $\beta$ -элиминирования, вероятно, может объясняться образованием двухцепочечного разрыва после высвобождения продукта и неспособностью Fpg связываться и процессировать ДНК-субстраты вблизи их концов. Возникает вопрос: требуется ли в норме для стадии  $\delta$ -элиминирования высвобождение субстрата после  $\beta$ -элиминирования с последующим повторным связыванием, как это было показано для эндонуклеазы V бактериофага T4 [364]? Тем не менее, в эксперименте с субстратом без разрывов накоплению продукта  $\delta$ -элиминирования не препятствовало добавление избытка немеченой ДНК-ловушки через 10 с после инициации реакции, что согласуется с литературными данными, что продукт  $\beta$ -элиминирования не детектируется для Fpg методом замороженной струи [332]. Можно заключить, что обычно процессы  $\beta/\delta$ -элиминирования в Fpg протекают согласованно, однако наличие разрыва в противоположной цепочке может разъединить эти два шага реакции.

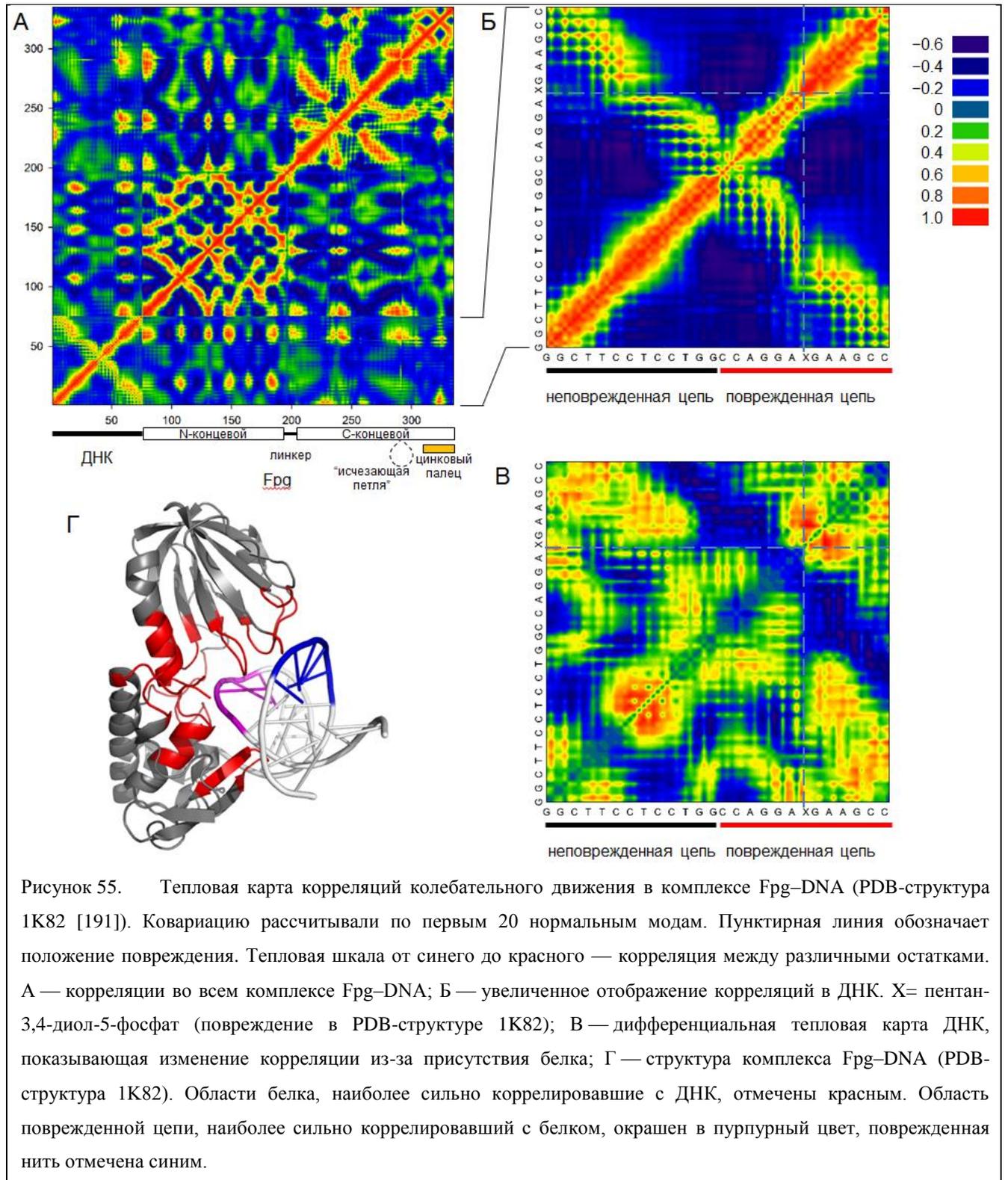


Чтобы найти возможное объяснение наблюдаемому влиянию разрыва цепи на активность белка, были проанализированы колебания в комплексе Frg–ДНК методом упругой сети (*elastic network*) [292, 293]. В данном методе белок и ДНК представляются как набор узлов — точечных масс, обычно это атомы Ca для белков и P, C2 и C4' для нуклеиновых кислот, связанных идеальными пружинами в пределах некоторого радиуса. Колебания всей системы раскладываются на нормальные моды с возрастающими частотами. Как правило, самые медленные частоты отражают глобальные движения системы, в то время как высокочастотные моды имеют локальный характер и не распространяются через структуру. Стоит отметить, что метод упругой сети не требует проведения молекулярной динамики, а основывается на статичной структуре и действующих в ней силах с коэффициентами упругости, полученными эмпирически из B-факторов в кристаллографических базах данных и B-фактора для моделируемой структуры.

В отдельном ДНК-дуплексе длиной 12 нт. (PDB-структура 355D [365]) наблюдались сильные корреляции колебаний вдоль каждой из цепей на участках длиной ~2–3 нт., за исключением концевых частей (рисунок 54А, главная диагональ карты из левого нижнего в правый верхний угол). Корреляции с комплементарной цепью также были очевидными, однако более слабыми (рисунок 54А, диагональ карты из левого верхнего в правый нижний угол).

Введение разрыва в центр одной из цепей (PDB-структуры 1NDN, 1VTE [366]) разобщило движения внутри цепи в этой точке, но слабо влияло на корреляции между цепями (рисунок 54 Б и В). В комплексе Fpg–ДНК (1K82 [191]), несмотря на сильно искаженную структуру ДНК, корреляции в неповрежденной цепи были схожими с таковыми для свободной ДНК (рисунок 55 А и Б). В поврежденной же цепи корреляции с 5'-стороны от повреждения даже в местах контактов с белком были заметно слабее корреляций с 3'-стороны, где белок образует больше контактов с ДНК (рисунок 55 Б). Вероятно, разрывы ДНК не оказывают существенного влияния на изначально менее скоординированные движения в 5'-области поврежденной цепи. Сравнение мод колебаний ДНК в полном комплексе и в отсутствие белка показало, что присутствие белка усиливало корреляции вдоль цепи ДНК между поврежденным нуклеотидом и двумя нуклеотидами с 3'-стороны от него и разобщило колебания с 5'-областью (красные участки на рисунке 55 В). В комплементарной цепи корреляции усиливались с 3'-стороны относительно С<sup>(0)</sup>. Несколько сегментов полипептидной цепи коррелировали с участками ДНК обеих цепей вблизи повреждения (рисунке 55 А и Г). Примечательно, что колебания в каталитическом N-концевом домене коррелировали с обеими цепями ДНК, в то время как С-концевой домен лучше коррелировал с поврежденной цепью. В структурах Fpg *G. stearothermophilus* в комплексе с ДНК с внутриспиральным и вывернутым положениями 8-охоGua (PDB-структуры 3GQ3 [295], 1R2Y [281]) наблюдались схожие с Fpg *E. coli* вибрационные моды.





В то время как конформационные изменения в ДНК при связывании с белком достоверно установлены и в деталях разработаны динамические модели, описывающие выворачивание нуклеотидов, практически не уделяется внимания вкладу отдельных энергетических компонентов в переходы между конформерами. Для излома в свободной ДНК разложение энергии показывает, что напряжение, возникающее в сахарофосфатном остове при

сгибании оси, высвобождается через раскрытие пары оснований, т. е. нарушении комплементарных взаимодействий и выворачивании нуклеотидов, что свидетельствует о передаче напряжения вдоль ковалентного контура [367]. В ходе исследования механизма урацил-ДНК-гликозилазы, по структуре существенно отличающейся от Frg, но использующей тот же принцип выворачивания поврежденного нуклеотида из ДНК, было обнаружено, что фермент направляет энергию от связывания  $p^{-2}$  на выдавливание жестких циклических сахаров нуклеотидов в положениях  $+1$  и  $-1$  в конформацию, оптимальную для катализа, и сопутствующее сжатие  $p^{+1}$  и  $p^{-1}$  [368]. Таким образом полученные результаты хорошо укладываются в представление о функционировании ДНК-гликозилазы, при котором механическая связь в ДНК-субстрате критична для конформационных преобразований, инициированных ферментом. Тем не менее, остается неясным, насколько целостность сахарофосфатного остова будет общим требованием в случае других гликозилаз.

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящей работы с привлечением различных физико-химических подходов охарактеризован процесс удаления поврежденных оснований 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилазами из разных организмов и определены факторы, влияющие на узнавание поврежденной ДНК. Ключевые предсказания вычислительных методов были подтверждены биохимически. Исследование было сфокусировано не только на определении структурных детерминант белка, определяющих молекулярные основы узнавания повреждённого основания, но и на структурных аспектах самого ДНК-субстрата, влияющих на этот процесс.

В области исследований механизма действия ДНК-гликозилаз в последние годы сложилось представление о многостадийном узнавании поврежденных оснований, который позволяет надежно отличать их на фоне огромного избытка нормальной ДНК [285, 286, 369-371]. В соответствии с ним, после первичного связывания фермента с ДНК комплекс претерпевает несколько конформационных изменений, и в промежуточных кинетически стабильных конформерах возникают специфичные для повреждения контакты, которые не могут быть образованы с нормальными основаниями. Настоящее исследование развивает и углубляет эту модель. В нем впервые показано, что несколько таких селективных конформеров возникают на стадии выворачивания поврежденного основания, которая ранее рассматривалась как один этап в процессе узнавания. Кроме того, представленные данные свидетельствуют о важности механического напряжения, передающегося по ковалентному контуру ДНК, для ее конформационных преобразований, инициированных ферментом. Представляется интересной возможность связать измеренную в работе энергию стэкинга с константами скорости конформационных переходов для окончательной привязки стадий реакции, наблюдаемых методом остановленной струи с детекцией флуоресценции, к внедрению интеркалирующей группы фермента и выворачиванию основания, сопровождающимся разрушением стэкинга.

Результаты работы легли в основу нескольких ориентированных и прикладных исследований, ведущихся в лаборатории геномной и белковой инженерии ИХБФМ СО РАН, связанных с рациональным дизайном ДНК-гликозилаз и их применением как инструментов в лабораторной практике. В их число входят разработка ферментов для детекции полиморфизмов ДНК, создание методов сборки ковалентно стабилизированных ДНК-белковых конструкций и нового метода иммунодетекции повреждений ДНК на основе белков Fpg и OGG1.

## 6. ВЫВОДЫ

1. Показано, что присутствие неканонических пар с двух сторон от поврежденного звена приводит к значительному увеличению  $K_M$  для ферментов OGG1 и Fpg, в то время как значения  $k_{cat}$  меняются в гораздо меньшем диапазоне. Значения  $k_{cat}$  для OGG1 коррелируют с конформационным параметром *twist* в окружении повреждения. Влияние стабильности нуклеотидного окружения места повреждения на каталитическую активность обоих ферментов во многом совпадает, несмотря на существенные отличия в их структурах.

2. Определены термодинамические параметры стэкинга 8-охоGua и Gua в составе ДНК. Независимо от контекста 8-охоGua оказывает дестабилизирующее действие (от 0,7 до 4,3 ккал/моль) на стэкинг оснований. Зависимость энергии стэкинг-взаимодействий от нуклеотидного контекста для 8-охоGua и неповрежденного Gua существенно различаются.

3. Установлено, что изолированный С-концевой домен Fpg способен связывать ДНК и обладает остаточной AP-лиазной активностью, в то время как изолированный N-концевой домен Fpg не проявляет ни ДНК-связывающей, ни каталитической активности.

4. Впервые приведен биохимический анализ эволюционно консервативных взаимодействий в молекуле белка Fpg. Показано, что мостик Arg54–Glu131, удаленный от активного центра необходим для эффективного связывания ДНК-субстрата. Эволюционно консервативный мостик Gln234–Arg244 придает белку термическую стабильность, но практически не влияет на его ферментативную активность. Взаимодействие Tyr170–Ser208 в динамике неустойчиво, однако Tyr170 образует связь с Thr214 в центре связывания 8-охоGua.

5. Показано, что замены аминокислотных остатков Arg108, Asn168 и Arg258 в Fpg, участвующих по данным компьютерного моделирования в динамическом узнавании 8-охоGua, инактивируют фермент по отношению к 8-охоGua-содержащие субстратам, однако практически не влияют на AP-лиазную активность. Установлена критическая роль фосфатной группы через один нуклеотид с 5'-стороны от 8-охоGua на ранних стадиях узнавания 8-охоGua ферментами OGG1 и Fpg.

6. Установлено, что одноцепочечные разрывы в поврежденной цепи в нескольких ближайших положениях к 8-охоGua приводят к полной потере активности Fpg. При этом одноцепочечные разрывы в комплементарной цепи не снижают эффективность расщепления, однако по мере приближения разрыва к месту напротив повреждения приводят к повышению доли продуктов  $\beta$ -элиминирования.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

8-oxoGua	8-оксогуанин; 2-амино-7,9-дигидро-1 <i>H</i> -пурин-6,8-дион
8-oxodGuo	8-оксо-2'-дезоксирибогуанозин
8-oxodGMP	8-оксо-2'-дезоксирибогуанозин-5'-фосфат
5-OH-Cyt	5-гидроксицитозин; 4-амино-5-гидроксипиримидин-2(1 <i>H</i> )-он
5-OH-Ura	5-гидроксиурацил; 5-гидроксипиримидин-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> )-дион
2-OH-Ade	2-гидроксиаденин
8-oxoAde	8-оксоаденин; 6-амино-7,9-дигидро-8 <i>H</i> -пурин-8-он
8-oxodGTP	8-оксо-2'-дезоксигуанозин-5'-трифосфат
Fapy-Gua	2,4-диамино-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-илформамид
mFapy-Gua	2,4-диамино-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-ил(метил)формамид
Fapy-Ade	4,6-диаминопиримидин-5-илформамид
dRib	2'-дезоксирибоза
Нур	гипоксантин
εAde	1,N6-этенoadенозин
dN	дезоксирибонуклеотид
dGuo	2'-дезоксирибогуанозин
dNTP	дезоксирибонуклеозидтрифосфат
H2TH	мотив «спираль — два поворота — спираль» ( <u>h</u> elix — <u>2</u> turns — <u>h</u> elix)
HhH	мотив «спираль — шпилька — спираль» ( <u>h</u> elix — <u>h</u> airpin — <u>h</u> elix)
IPTG	изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид
PDB	банк данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот
SDS	додецилсульфат натрия
THF	стабильный циклический аналог АР-сайта, (3-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)метилфосфат
Tris	трис(гидроксиметил)аминометан
АП	апуриновый-апиримидиновый
АФК	активные формы кислорода
БСА	бычий сывороточный альбумин
ДТТ	1,4-дитиотреит
дц	двухцепочечный(ая)
оц	одноцепочечный(ая)
ОДН	олигодезоксирибонуклеотид(ы), олигодезоксирибонуклеотидный

ПААГ	полиакриламидный гель
РСА	рентгеноструктурный анализ
ЦПД	циклобутановый пиримидиновый димер
ЭДТА	этилендиаминтетраацетат
ЭРО	эксцизионная репарация оснований
ЯМР	ядерный магнитный резонанс

Символ «...» обозначает связь в разд. 4.5

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

## СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kamminga H., de Chadarevian S. Representations of the double helix // Cambridge: Wellcome unit for the history of medicine. – 1995. – 45.
2. Lu X.J., Olson W.K. Resolving the discrepancies among nucleic acid conformational analyses // *J Mol Biol.* – 1999. – V. 285. – № 4. – P. 1563-1575.
3. El Hassan M.A., Calladine C.R. Conformational characteristics of DNA: empirical classifications and a hypothesis for the conformational behaviour of dinucleotide steps // *Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences.* – 1997. – V. 355. – № 1722. – P. 43-100.
4. Bloomfield V.A., Crothers D.M., Tinoco I. Physical chemistry of nucleic acids. – New York ; London: Harper & Row. – 1974. – 517.
5. Calladine C.R., Drew H.R. Principles of sequence-dependent flexure of DNA // *J Mol Biol.* – 1986. – V. 192. – № 4. – P. 907-918.
6. Travers A.A., Klug A. The bending of DNA in nucleosomes and its wider implications // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 1987. – V. 317. – № 1187. – P. 537-561.
7. Sivolob A.V., Khrapunov S.N. Translational positioning of nucleosomes on DNA: the role of sequence-dependent isotropic DNA bending stiffness // *J Mol Biol.* – 1995. – V. 247. – № 5. – P. 918-931.
8. Sobel E.S., Harpst J.A. Effects of Na<sup>+</sup> on the persistence length and excluded volume of T7 bacteriophage DNA // *Biopolymers.* – 1991. – V. 31. – № 13. – P. 1559-1564.
9. Hagerman P.J. Flexibility of DNA // *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* – 1988. – V. 17. – P. 265-86.
10. Shore D., Baldwin R.L. Energetics of DNA twisting. I. Relation between twist and cyclization probability // *J Mol Biol.* – 1983. – V. 170. – № 4. – P. 957-981.
11. Taylor W.H., Hagerman P.J. Application of the method of phage T4 DNA ligase-catalyzed ring-closure to the study of DNA structure. II. NaCl-dependence of DNA flexibility and helical repeat // *J Mol Biol.* – 1990. – V. 212. – № 2. – P. 363-376.
12. Frontali C., Dore E., Ferrauto A., Gratton E., Bettini A., Pozzan M.R., Valdevit E. An absolute method for the determination of the persistence length of native DNA from electron micrographs // *Biopolymers.* – 1979. – V. 18. – № 6. – P. 1353-1373.
13. Bednar J., Furrer P., Katritch V., Stasiak A.Z., Dubochet J., Stasiak A. Determination of DNA persistence length by cryo-electron microscopy. Separation of the static and dynamic contributions to the apparent persistence length of DNA // *J Mol Biol.* – 1995. – V. 254. – № 4. – P. 579-594.
14. Berge T., Jenkins N.S., Hopkirk R.B., Waring M.J., Edwardson J.M., Henderson R.M. Structural perturbations in DNA caused by bis-intercalation of ditercalinium visualised by atomic force microscopy // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – V. 30. – № 13. – P. 2980-2986.
15. Travers A.A., Thompson J.M. An introduction to the mechanics of DNA // *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.* – 2004. – V. 362. – № 1820. – P. 1265-1279.
16. Travers A.A., Muskhelishvili G., Thompson J.M. DNA information: from digital code to analogue structure // *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.* – 2012. – V. 370. – № 1969. – P. 2960-2986.
17. Calladine C.R. Mechanics of sequence-dependent stacking of bases in B-DNA // *J Mol Biol.* – 1982. – V. 161. – № 2. – P. 343-352.
18. Yanagi K., Prive G.G., Dickerson R.E. Analysis of local helix geometry in three B-DNA decamers and eight dodecamers // *J Mol Biol.* – 1991. – V. 217. – № 1. – P. 201-214.
19. Hunter C.A. Sequence-dependent DNA structure. The role of base stacking interactions // *J Mol Biol.* – 1993. – V. 230. – № 3. – P. 1025-1054.

20. Young M.A., Ravishanker G., Beveridge D.L., Berman H.M. Analysis of local helix bending in crystal structures of DNA oligonucleotides and DNA–protein complexes // *Biophys J.* – 1995. – V. 68. – № 6. – P. 2454–2468.
21. Orrell R.W. Endocrine myopathies // *Handb Clin Neurol.* – 2007. – V. 86. – P. 343–355.
22. Hunter C.A. Sequence–dependent DNA structure // *Bioessays.* – 1996. – V. 18. – № 2. – P. 157–162.
23. Virstedt J., Berge T., Henderson R.M., Waring M.J., Travers A.A. The influence of DNA stiffness upon nucleosome formation // *J Struct Biol.* – 2004. – V. 148. – № 1. – P. 66–85.
24. Buttinelli M., Minnock A., Panetta G., Waring M., Travers A. The exocyclic groups of DNA modulate the affinity and positioning of the histone octamer // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – V. 95. – № 15. – P. 8544–8549.
25. Dornberger U., Flemming J., Fritzsche H. Structure determination and analysis of helix parameters in the DNA decamer d(CATGGCCATG)<sub>2</sub> comparison of results from NMR and crystallography // *J Mol Biol.* – 1998. – V. 284. – № 5. – P. 1453–1463.
26. Neugebauerova S., Kypr J. Invariant and variable base stacking geometries in B–DNA and A–DNA // *J Biomol Struct Dyn.* – 2000. – V. 18. – № 1. – P. 73–81.
27. Protozanova E., Yakovchuk P., Frank–Kamenetskii M.D. Stacked–unstacked equilibrium at the nick site of DNA // *J. Mol. Biol.* – 2004. – V. 342. – № 3. – P. 775–785.
28. Koo H.S., Wu H.M., Crothers D.M. DNA bending at adenine . thymine tracts // *Nature.* – 1986. – V. 320. – № 6062. – P. 501–506.
29. Diekmann S. Analyzing DNA curvature in polyacrylamide gels // *Methods Enzymol.* – 1992. – V. 212. – P. 30–46.
30. Brukner I., Dlakic M., Savic A., Susic S., Pongor S., Suck D. Evidence for opposite groove–directed curvature of GGGCC and AAAAA sequence elements // *Nucleic Acids Res.* – 1993. – V. 21. – № 4. – P. 1025–1029.
31. Charney E., Chen H.H., Rau D.C. The flexibility of A–form DNA // *J Biomol Struct Dyn.* – 1991. – V. 9. – № 2. – P. 353–362.
32. Fang Y., Spisz T.S., Hoh J.H. Ethanol–induced structural transitions of DNA on mica // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – V. 27. – № 8. – P. 1943–1949.
33. Satchwell S.C., Drew H.R., Travers A.A. Sequence periodicities in chicken nucleosome core DNA // *J Mol Biol.* – 1986. – V. 191. – № 4. – P. 659–675.
34. Shrader T.E., Crothers D.M. Effects of DNA sequence and histone–histone interactions on nucleosome placement // *J Mol Biol.* – 1990. – V. 216. – № 1. – P. 69–84.
35. Drew H.R., Weeks J.R., Travers A.A. Negative supercoiling induces spontaneous unwinding of a bacterial promoter // *EMBO J.* – 1985. – V. 4. – № 4. – P. 1025–1032.
36. Luger K., Mader A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature.* – 1997. – V. 389. – № 6648. – P. 251–260.
37. Richmond T.J., Davey C.A. The structure of DNA in the nucleosome core // *Nature.* – 2003. – V. 423. – № 6936. – P. 145–150.
38. Hagerman P.J. Sequence–directed curvature of DNA // *Annu Rev Biochem.* – 1990. – V. 59. – P. 755–781.
39. Caddle M.S., Lussier R.H., Heintz N.H. Intramolecular DNA triplexes, bent DNA and DNA unwinding elements in the initiation region of an amplified dihydrofolate reductase replicon // *J Mol Biol.* – 1990. – V. 211. – № 1. – P. 19–33.
40. Anderson J.N. Detection, sequence patterns and function of unusual DNA structures // *Nucleic Acids Res.* – 1986. – V. 14. – № 21. – P. 8513–33.
41. Homberger H.P. Bent DNA is a structural feature of scaffold–attached regions in *Drosophila melanogaster* interphase nuclei // *Chromosoma.* – 1989. – V. 98. – № 2. – P. 99–104.

42. von Kries J.P., Phi-Van L., Diekmann S., Stratling W.H. A non-curved chicken lysozyme 5' matrix attachment site is 3' followed by a strongly curved DNA sequence // *Nucleic Acids Res.* – 1990. – V. 18. – № 13. – P. 3881–3885.
43. Milot E., Belmaaza A., Wallenburg J.C., Gusew N., Bradley W.E., Chartrand P. Chromosomal illegitimate recombination in mammalian cells is associated with intrinsically bent DNA elements // *EMBO J.* – 1992. – V. 11. – № 13. – P. 5063–5070.
44. Howard M.T., Lee M.P., Hsieh T.S., Griffith J.D. Drosophila topoisomerase II–DNA interactions are affected by DNA structure // *J Mol Biol.* – 1991. – V. 217. – № 1. – P. 53–62.
45. Linial M., Shlomai J. Sequence-directed bent DNA helix is the specific binding site for Crithidia fasciculata nicking enzyme // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1987. – V. 84. – № 23. – P. 8205–8209.
46. Linial M., Shlomai J. The sequence-directed bent structure in kinetoplast DNA is recognized by an enzyme from Crithidia fasciculata // *J Biol Chem.* – 1987. – V. 262. – № 31. – P. 15194–15201.
47. Linial M., Shlomai J. Bent DNA structures associated with several origins of replication are recognized by a unique enzyme from trypanosomatids // *Nucleic Acids Res.* – 1988. – V. 16. – № 14A. – P. 6477–6492.
48. Linial M., Shlomai J. A unique endonuclease from Crithidia fasciculata which recognizes a bend in the DNA helix. Specificity of the cleavage reaction // *J Biol Chem.* – 1988. – V. 263. – № 1. – P. 290–297.
49. Caserta M., Amadei A., Di Mauro E., Camilloni G. In vitro preferential topoisomerization of bent DNA // *Nucleic Acids Res.* – 1989. – V. 17. – № 21. – P. 8463–8474.
50. Lyamichev V. Unusual conformation of (dA)<sub>n</sub>(dT)<sub>n</sub>-tracts as revealed by cyclobutane thymine–thymine dimer formation // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – V. 19. – № 16. – P. 4491–4496.
51. Becker M.M., Wang Z. Origin of ultraviolet damage in DNA // *J Mol Biol.* – 1989. – V. 210. – № 3. – P. 429–438.
52. Miller J.H., Fan-Chiang C.–C.P., Straatsma T.P., Kennedy M.A. 8–Oxoguanine enhances bending of DNA that favors binding to glycosylases // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – V. 125. – № 20. – P. 6331–6336.
53. Barone F., Lankas F., Spackova N., Sponer J., Karran P., Bignami M., Mazzei F. Structural and dynamic effects of single 7–hydro–8–oxoguanine bases located in a frameshift target DNA sequence // *Biophys. Chem.* – 2005. – V. 118. – № 1. – P. 31–41.
54. Shore D., Baldwin R.L. Energetics of DNA twisting. II. Topoisomer analysis // *J Mol Biol.* – 1983. – V. 170. – № 4. – P. 983–1007.
55. Steenken S., Jovanovic S.V. How Easily Oxidizable Is DNA? One–Electron Reduction Potentials of Adenosine and Guanosine Radicals in Aqueous Solution // *J. Am. Chem. Soc.* – 1997. – V. 119. – № 3. – P. 617–618.
56. Cadet J., Douki T., Gasparutto D., Ravanat J.–L. Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biochemical features // *Mutat. Res.* – 2003. – V. 531. – № 1–2. – P. 5–23.
57. Burrows C.J., Muller J.G. Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission // *Chem Rev.* – 1998. – V. 98. – № 3. – P. 1109–1152.
58. Niles J.C., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Mass spectrometric identification of 4–hydroxy–2,5–dioxo–imidazolidine–4–carboxylic acid during oxidation of 8–oxoguanosine by peroxyxynitrite and KHSO<sub>5</sub>/CoCl<sub>2</sub> // *Chem. Res. Toxicol.* – 2004. – V. 17. – № 11. – P. 1501–1509.
59. Burrows C.J., Muller J.G. Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission // *Chem. Rev.* – 1998. – V. 98. – № 3. – P. 1109–1151.
60. Jaruga P., Kirkali G., Dizdaroglu M. Measurement of formamidopyrimidines in DNA // *Free Radic. Biol. Med.* – 2008. – V. 45. – № 12. – P. 1601–1609.

61. Niles J.C., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Spiroiminodihydantoin and guanidinohydantoin are the dominant products of 8-oxoguanosine oxidation at low fluxes of peroxynitrite: Mechanistic studies with  $^{18}\text{O}$  // *Chem. Res. Toxicol.* – 2004. – V. 17. – № 11. – P. 1510–1519.
62. Nishimura S. Involvement of mammalian OGG1 (MMH) in excision of the 8-hydroxyguanine residue in DNA // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – V. 32. – № 9. – P. 813–821.
63. Nakamoto H., Kaneko T., Tahara S., Hayashi E., Naito H., Radak Z., Goto S. Regular exercise reduces 8-oxodG in the nuclear and mitochondrial DNA and modulates the DNA repair activity in the liver of old rats // *Exp. Gerontol.* – 2007. – V. 42. – № 4. – P. 287–295.
64. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature.* – 1993. – V. 362. – № 6422. – P. 709–715.
65. Roots R., Okada S. Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in x-ray-induced DNA strand breaks of killing of mammalian cells // *Radiat Res.* – 1975. – V. 64. – № 2. – P. 306–320.
66. Steenken S. Purine bases, nucleosides and nucleotides: Aqueous solution redox chemistry and transformation of their radical cations and  $e^-$  and OH adducts // *Chem. Rev.* – 1989. – V. 89. – № 3. – P. 503–520.
67. Aida M., Nishimura S. An ab initio molecular orbital study on the characteristics of 8-hydroxyguanine // *Mutat. Res.* – 1987. – V. 192. – № 2. – P. 83–89.
68. Cho B.P., Kadlubar F.F., Culp S.J., Evans F.E.  $^{15}\text{N}$  nuclear magnetic resonance studies on the tautomerism of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-hydroxyguanine, and other C8-substituted guanine nucleosides // *Chem. Res. Toxicol.* – 1990. – V. 3. – № 5. – P. 445–452.
69. Kouchakdjian M., Bodepudi V., Shibutani S., Eisenberg M., Johnson F., Grollman A.P., Patel D.J. NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex. 8-Oxo-7H-dG(*syn*)-dA(*anti*) alignment at lesion site // *Biochemistry.* – 1991. – V. 30. – № 5. – P. 1403–1412.
70. Oda Y., Uesugi S., Ikehara M., Nishimura S., Kawase Y., Ishikawa H., Inoue H., Ohtsuka E. NMR studies of a DNA containing 8-hydroxydeoxyguanosine // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – V. 19. – № 7. – P. 1407–1412.
71. Lipscomb L.A., Peek M.E., Morningstar M.L., Verghis S.M., Miller E.M., Rich A., Essigmann J.M., Williams L.D. X-ray structure of a DNA decamer containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* – 1995. – V. 92. – № 3. – P. 719–723.
72. Gannett P.M., Sura T.P. Base pairing of 8-oxoguanosine and 8-oxo-2'-deoxyguanosine with 2'-deoxyadenosine, 2'-deoxycytosine, 2'-deoxyguanosine, and thymidine // *Chem. Res. Toxicol.* – 1993. – V. 6. – № 5. – P. 690–700.
73. Thiviyanathan V., Somasunderam A., Hazra T.K., Mitra S., Gorenstein D.G. Solution structure of a DNA duplex containing 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine opposite deoxyguanosine // *J. Mol. Biol.* – 2003. – V. 325. – № 3. – P. 433–442.
74. Plum G.E., Grollman A.P., Johnson F., Breslauer K.J. Influence of the oxidatively damaged adduct 8-oxodeoxyguanosine on the conformation, energetics, and thermodynamic stability of a DNA duplex // *Biochemistry.* – 1995. – V. 34. – № 49. – P. 16148–16160.
75. Singh S.K., Szulik M.W., Ganguly M., Khutsishvili I., Stone M.P., Marky L.A., Gold B. Characterization of DNA with an 8-oxoguanine modification // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – V. 39. – № 15. – P. 6789–6801.
76. Pinak M. Electrostatic energy analysis of 8-oxoguanine DNA lesion—molecular dynamics study // *Comput. Biol. Chem.* – 2003. – V. 27. – № 3. – P. 431–441.
77. Ganguly M., Wang F., Kaushik M., Stone M.P., Marky L.A., Gold B. A study of 7-deaza-2'-deoxyguanosine 2'-deoxycytidine base pairing in DNA // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – V. 35. – № 18. – P. 6181–6195.
78. Wang F., Li F., Ganguly M., Marky L.A., Gold B., Egli M., Stone M.P. A bridging water anchors the tethered 5-(3-aminopropyl)-2'-deoxyuridine amine in the DNA major groove

- proximate to the N+2 C.G base pair: implications for formation of interstrand 5'-GNC-3' cross-links by nitrogen mustards // *Biochemistry*. – 2008. – V. 47. – № 27. – P. 7147–7157.
79. 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.
  80. Kamiya H. Mutagenic potentials of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: Approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31. – № 2. – P. 517–531.
  81. Shibutani S. Quantitation of base substitutions and deletions induced by chemical mutagens during DNA synthesis in vitro // *Chem. Res. Toxicol.* – 1993. – V. 6. – № 5. – P. 625–629.
  82. Briebe L.G., Eichman B.F., Kokoska R.J., Doubliň S., Kunkel T.A., Ellenberger T. Structural basis for the dual coding potential of 8-oxoguanosine by a high-fidelity DNA polymerase // *EMBO J.* – 2004. – V. 23. – № 17. – P. 3452–3461.
  83. Kamath-Loeb A.S., Hizi A., Kasai H., Loeb L.A. Incorporation of the guanosine triphosphate analogs 8-oxo-dGTP and 8-NH<sub>2</sub>-dGTP by reverse transcriptases and mammalian DNA polymerases // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – № 9. – P. 5892–5898.
  84. Kong Q., Lin C.L. Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases // *Cell Mol Life Sci.* – 2010. – V. 67. – № 11. – P. 1817–1829.
  85. Li Z., Wu J., Deleo C.J. RNA damage and surveillance under oxidative stress // *IUBMB Life.* – 2006. – V. 58. – № 10. – P. 581–588.
  86. Hayakawa H., Kuwano M., Sekiguchi M. Specific binding of 8-oxoguanine-containing RNA to polynucleotide phosphorylase protein // *Biochemistry*. – 2001. – V. 40. – № 33. – P. 9977–9982.
  87. Hayakawa H., Uchiumi T., Fukuda T., Ashizuka M., Kohno K., Kuwano M., Sekiguchi M. Binding capacity of human YB-1 protein for RNA containing 8-oxoguanine // *Biochemistry*. – 2002. – V. 41. – № 42. – P. 12739–12744.
  88. Thorp H.H. The importance of being r: greater oxidative stability of RNA compared with DNA // *Chem Biol.* – 2000. – V. 7. – № 2. – P. 33–36.
  89. Shan X., Lin C.L. Quantification of oxidized RNAs in Alzheimer's disease // *Neurobiol Aging*. – 2006. – V. 27. – № 5. – P. 657–662.
  90. Martinet W., De Meyer G.R., Herman A.G., Kockx M.M. RNA damage in human atherosclerosis: pathophysiological significance and implications for gene expression studies // *RNA Biol.* – 2005. – V. 2. – № 1. – P. 4–7.
  91. Chen Y.-H., Bogenhagen D.F. Effects of DNA lesions on transcription elongation by T7 RNA polymerase // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – № 8. – P. 5849–5855.
  92. Taddei F., Hayakawa H., Bouton M., Cirinesi A., Matic I., Sekiguchi M., Radman M. Counteraction by MutT protein of transcriptional errors caused by oxidative damage // *Science*. – 1997. – V. 278. – № 5335. – P. 128–130.
  93. Wood M.L., Dizdaroglu M., Gajewski E., Essigmann J.M. Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: Genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome // *Biochemistry*. – 1990. – V. 29. – № 30. – P. 7024–7032.
  94. Valinluck V., Tsai H.-H., Rogstad D.K., Burdzy A., Bird A., Sowers L.C. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32. – № 14. – P. 4100–4108.
  95. Turk P.W., Laayoun A., Smith S.S., Weitzman S.A. DNA adduct 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine (8-hydroxyguanine) affects function of human DNA methyltransferase // *Carcinogenesis*. – 1995. – V. 16. – № 5. – P. 1253–1255.
  96. Ghosh R., Mitchell D.L. Effect of oxidative DNA damage in promoter elements on transcription factor binding // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – V. 27. – № 15. – P. 3213–3218.

97. Opresko P.L., Fan J., Danzy S., Wilson D.M., III, Bohr V.A. Oxidative damage in telomeric DNA disrupts recognition by TRF1 and TRF2 // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – V. 33. – № 4. – P. 1230–1239.
98. Bodepudi V., Shibutani S., Johnson F. Synthesis of 2'-deoxy-7,8-dihydro-8-oxoguanosine and 2'-deoxy-7,8-dihydro-8-oxoadenosine and their incorporation into oligomeric DNA // *Chem. Res. Toxicol.* – 1992. – V. 5. – № 5. – P. 608–617.
99. 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.
100. Bhattacharyya D., Tano K., Bunick G.J., Uberbacher E.C., Behnke W.D., Mitra S. Rapid, large-scale purification and characterization of 'Ada protein' (O6 methylguanine–DNA methyltransferase) of *E. coli* // *Nucleic Acids Res.* – 1988. – V. 16. – № 14A. – P. 6397–6410.
101. Olsson M., Lindahl T. Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Methyl group transfer from O6-methylguanine to a protein cysteine residue // *J Biol Chem.* – 1980. – V. 255. – № 22. – P. 10569–10571.
102. Pegg A.E., Byers T.L. Repair of DNA containing O6-alkylguanine // *FASEB J.* – 1992. – V. 6. – № 6. – P. 2302–2310.
103. Pegg A.E., Dolan M.E., Moschel R.C. Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine–DNA alkyltransferase // *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* – 1995. – V. 51. – P. 167–223.
104. Eggleston A.K., West S.C. Recombination initiation: easy as A, B, C, D... chi? // *Curr Biol.* – 1997. – V. 7. – № 12. – P. 745–749.
105. Jeggo P.A., Taccioli G.E., Jackson S.P. Menage a trois: double strand break repair, V(D)J recombination and DNA-PK // *Bioessays.* – 1995. – V. 17. – № 11. – P. 949–957.
106. Ramsden D.A., Gellert M. Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks // *EMBO J.* – 1998. – V. 17. – № 2. – P. 609–614.
107. Modrich P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair // *Annu Rev Genet.* – 1991. – V. 25. – P. 229–253.
108. Hoeijmakers J.H. Nucleotide excision repair I: from *E. coli* to yeast // *Trends Genet.* – 1993. – V. 9. – № 5. – P. 173–177.
109. Hoeijmakers J.H. Nucleotide excision repair. II: From yeast to mammals // *Trends Genet.* – 1993. – V. 9. – № 6. – P. 211–217.
110. Demple B., Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology // *Annu Rev Biochem.* – 1994. – V. 63. – P. 915–48.
111. Wiederhold L., Leppard J.B., Kedar P., Karimi-Busheri F., Rasouli-Nia A., Weinfeld M., Tomkinson A.E., Izumi T., Prasad R., Wilson S.H., Mitra S., Hazra T.K. AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells // *Mol Cell.* – 2004. – V. 15. – № 2. – P. 209–220.
112. Zharkov D.O. Base excision DNA repair // *Cell Mol Life Sci.* – 2008. – V. 65. – № 10. – P. 1544–1565.
113. 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.
114. Bennett S.E., Sung J.-S., Mosbaugh D.W. Fidelity of uracil-initiated base excision DNA repair in DNA polymerase  $\beta$ -proficient and -deficient mouse embryonic fibroblast cell extracts // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – № 45. – P. 42588–42600.
115. Dantzer F., Bjørås M., Luna L., Klungland A., Seeberg E. Comparative analysis of 8-oxoG:C, 8-oxoG:A, A:C and C:C DNA repair in extracts from wild type or 8-oxoG DNA glycosylase deficient mammalian and bacterial cells // *DNA Repair.* – 2003. – V. 2. – № 6. – P. 707–718.
116. Almeida K.H., Sobol R.W. A unified view of base excision repair: Lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification // *DNA Repair.* – 2007. – V. 6. – № 6. – P. 695–711.

117. Fortini P., Dogliotti E. Base damage and single-strand break repair: Mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways // DNA Repair. – 2007. – V. 6. – № 4. – P. 398–409.
118. Greenberg M.M., Weledji Y.N., Kroeger K.M., Kim J. In vitro replication and repair of DNA containing a C2'-oxidized abasic site // Biochemistry. – 2004. – V. 43. – № 48. – P. 15217–15222.
119. Sung J.-S., Demple B. Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA // FEBS J. – 2006. – V. 273. – № 8. – P. 1620–1629.
120. Sung J.-S., Mosbaugh D.W. Escherichia coli uracil- and ethenocytosine-initiated base excision DNA repair: Rate-limiting step and patch size distribution // Biochemistry. – 2003. – V. 42. – № 16. – P. 4613–4625.
121. Ranalli T.A., Tom S., Bambara R.A. AP endonuclease 1 coordinates flap endonuclease 1 and DNA ligase I activity in long patch base excision repair // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277. – № 44. – P. 41715–41724.
122. Sukhanova M.V., Khodyreva S.N., Lebedeva N.A., Prasad R., Wilson S.H., Lavrik O.I. Human base excision repair enzymes apurinic/apyrimidinic endonuclease1 (APE1), DNA polymerase  $\beta$  and poly(ADP-ribose) polymerase 1: Interplay between strand-displacement DNA synthesis and proofreading exonuclease activity // Nucleic Acids Res. – 2005. – V. 33. – № 4. – P. 1222–1229.
123. David S.S., Williams S.D. Chemistry of glycosylases and endonucleases involved in base-excision repair // Chem. Rev. – 1998. – V. 98. – № 3. – P. 1221–1261.
124. Stivers J.T., Jiang Y.L. A mechanistic perspective on the chemistry of DNA repair glycosylases // Chem. Rev. – 2003. – V. 103. – № 7. – P. 2729–2760.
125. Berti P.J., McCann J.A.B. Toward a detailed understanding of base excision repair enzymes: Transition state and mechanistic analyses of *N*-glycoside hydrolysis and *N*-glycoside transfer // Chem. Rev. – 2006. – V. 106. – № 2. – P. 506–555.
126. Denver D.R., Swenson S.L., Lynch M. An evolutionary analysis of the helix-hairpin-helix superfamily of DNA repair glycosylases // Mol. Biol. Evol. – 2003. – V. 20. – № 10. – P. 1603–1611.
127. Huffman J.L., Sundheim O., Tainer J.A. DNA base damage recognition and removal: New twists and grooves // Mutat. Res. – 2005. – V. 577. – № 1–2. – P. 55–76.
128. Zharkov D.O., Grollman A.P. MutY DNA glycosylase: Base release and intermediate complex formation // Biochemistry. – 1998. – V. 37. – № 36. – P. 12384–12394.
129. Bailly V., Verly W.G., O'Connor T., Laval J. Mechanism of DNA strand nicking at apurinic/apyrimidinic sites by *Escherichia coli* [formamidopyrimidine]DNA glycosylase // Biochem. J. – 1989. – V. 262. – № 2. – P. 581–589.
130. Bhagwat M., Gerlt J.A. 3'- and 5'-strand cleavage reactions catalyzed by the Fpg protein from *Escherichia coli* occur via successive  $\beta$ - and  $\delta$ -elimination mechanisms, respectively // Biochemistry. – 1996. – V. 35. – № 2. – P. 659–665.
131. Kim J., Linn S. The mechanisms of action of *E. coli* endonuclease III and T4 UV endonuclease (endonuclease V) at AP sites // Nucleic Acids Res. – 1988. – V. 16. – № 3. – P. 1135–1141.
132. Latham K.A., Lloyd R.S.  $\delta$ -Elimination by T4 endonuclease V at a thymine dimer site requires a secondary binding event and amino acid Glu-23 // Biochemistry. – 1995. – V. 34. – № 27. – P. 8796–8803.
133. Mazumder A., Gerlt J.A., Absalon M.J., Stubbe J., Cunningham R.P., Withka J., Bolton P.H. Stereochemical studies of the  $\beta$ -elimination reactions at aldehydic abasic sites in DNA: Endonuclease III from *Escherichia coli*, sodium hydroxide, and Lys-Trp-Lys // Biochemistry. – 1991. – V. 30. – № 4. – P. 1119–1126.

134. Mazumder A., Gerlt J.A., Rabow L., Absalon M.J., Stubbe J., Bolton P.H. UV endonuclease V from bacteriophage T4 catalyzes DNA strand cleavage at aldehydic abasic sites by a *syn*  $\beta$ -elimination reaction // *J. Am. Chem. Soc.* – 1989. – V. 111. – № 20. – P. 8029–8030.
135. Jiang D., Hatahet Z., Melamede R.J., Kow Y.W., Wallace S.S. Characterization of *Escherichia coli* endonuclease VIII // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – № 51. – P. 32230–32239.
136. Dodson M.L., Michaels M.L., Lloyd R.S. Unified catalytic mechanism for DNA glycosylases // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – № 52. – P. 32709–32712.
137. Sun B., Latham K.A., Dodson M.L., Lloyd R.S. Studies of the catalytic mechanism of five DNA glycosylases: Probing for enzyme–DNA imino intermediates // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – № 33. – P. 19501–19508.
138. Zharkov D.O., Rieger R.A., Iden C.R., Grollman A.P.  $\text{NH}_2$ -terminal proline acts as a nucleophile in the glycosylase/AP-lyase reaction catalyzed by *Escherichia coli* formamidopyrimidine–DNA glycosylase (Fpg) protein // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – № 8. – P. 5335–5341.
139. 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.
140. Ikeda S., Biswas T., Roy R., Izumi T., Boldogh I., Kurosky A., Sarker A.H., Seki S., Mitra S. Purification and characterization of human NTH1, a homolog of *Escherichia coli* endonuclease III: Direct identification of Lys-212 as the active nucleophilic residue // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – № 34. – P. 21585–21593.
141. Schrock R.D., III, Lloyd R.S. Reductive methylation of the amino terminus of endonuclease V eradicates catalytic activities: Evidence for an essential role of the amino terminus in the chemical mechanisms of catalysis // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266. – № 26. – P. 17631–17639.
142. Schrock R.D., III, Lloyd R.S. Site-directed mutagenesis of the  $\text{NH}_2$  terminus of T4 endonuclease V: The position of the  $\alpha\text{NH}_2$  moiety affects catalytic activity // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – № 2. – P. 880–886.
143. Nash H.M., Lu R., Lane W.S., Verdine G.L. The critical active-site amine of the human 8-oxoguanine DNA glycosylase, hOgg1: Direct identification, ablation and chemical reconstitution // *Chem. Biol.* – 1997. – V. 4. – № 9. – P. 693–702.
144. Fuxreiter M., Warshel A., Osman R. Role of active site residues in the glycosylase step of T4 endonuclease V. Computer simulation studies on ionization states // *Biochemistry.* – 1999. – V. 38. – № 30. – P. 9577–9589.
145. Osman R., Fuxreiter M., Luo N. Specificity of damage recognition and catalysis of DNA repair // *Comput. Chem.* – 2000. – V. 24. – № 3–4. – P. 331–339.
146. Zoltewicz J.A., Clark D.F., Sharpless T.W., Grahe G. Kinetics and mechanism of the acid-catalyzed hydrolysis of some purine nucleosides // *J. Am. Chem. Soc.* – 1970. – V. 92. – № 6. – P. 1741–1750.
147. Garrett E.R., Mehta P.J. Solvolysis of adenine nucleosides. I. Effects of sugars and adenine substituents on acid solvolyses // *J. Am. Chem. Soc.* – 1972. – V. 94. – № 24. – P. 8532–8541.
148. Jiang Y.L., Stivers J.T. Reconstructing the substrate for uracil DNA glycosylase: Tracking the transmission of binding energy in catalysis // *Biochemistry.* – 2001. – V. 40. – № 25. – P. 7710–7719.
149. Werner R.M., Jiang Y.L., Gordley R.G., Jagadeesh G.J., Ladner J.E., Xiao G., Tordova M., Gilliland G.L., Stivers J.T. Stressing-out DNA? The contribution of serine–phosphodiester interactions in catalysis by uracil DNA glycosylase // *Biochemistry.* – 2000. – V. 39. – № 41. – P. 12585–12594.

150. Werner R.M., Stivers J.T. Kinetic isotope effect studies of the reaction catalyzed by uracil DNA glycosylase: Evidence for an oxocarbenium ion—uracil anion intermediate // *Biochemistry*. – 2000. – V. 39. – № 46. – P. 14054–14064.
151. Bianchet M.A., Seiple L.A., Jiang Y.L., Ichikawa Y., Amzel L.M., Stivers J.T. Electrostatic guidance of glycosyl cation migration along the reaction coordinate of uracil DNA glycosylase // *Biochemistry*. – 2003. – V. 42. – № 43. – P. 12455–12460.
152. Dinner A.R., Blackburn G.M., Karplus M. Uracil–DNA glycosylase acts by substrate autocatalysis // *Nature*. – 2001. – V. 413. – № 6857. – P. 752–755.
153. Deng L., Schrger O.D., Verdine G.L. Unusually strong binding of a designed transition–state analog to a base–excision DNA repair protein // *J. Am. Chem. Soc.* – 1997. – V. 119. – № 33. – P. 7865–7866.
154. Schrer O.D., Nash H.M., Jiricny J., Laval J., Verdine G.L. Specific binding of a designed pyrrolidine abasic site analog to multiple DNA glycosylases // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – № 15. – P. 8592–8597.
155. Purmal A.A., Rabow L.E., Lampman G.W., Cunningham R.P., Kow Y.W. A common mechanism of action for the *N*–glycosylase activity of DNA *N*–glycosylase/AP lyases from *E. coli* and T4 // *Mutat. Res.* – 1996. – V. 364. – P. 193–207.
156. McCullough A.K., Sanchez A., Dodson M.L., Marapaka P., Taylor J.–S., Lloyd R.S. The reaction mechanism of DNA glycosylase/AP lyases at abasic sites // *Biochemistry*. – 2001. – V. 40. – № 2. – P. 561–568.
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. Winter R.B., von Hippel P.H. Diffusion–driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 2. The *Escherichia coli* repressor–operator interaction: Equilibrium measurements // *Biochemistry*. – 1981. – V. 20. – № 24. – P. 6948–6960.
159. 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.
160. 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. – № 21. – P. 5113–5127.
161. 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.
162. 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.
163. Higley M., Lloyd R.S. Processivity of uracil DNA glycosylase // *Mutat. Res.* – 1993. – V. 294. – № 2. – P. 109–116.
164. Francis A.W., David S.S. *Escherichia coli* MutY and Fpg utilize a processive mechanism for target location // *Biochemistry*. – 2003. – V. 42. – № 3. – P. 801–810.
165. Carey D.C., Strauss P.R. Human apurinic/aprimidinic endonuclease is processive // *Biochemistry*. – 1999. – V. 38. – № 50. – P. 16553–16560.
166. Мечетин Г.В., Жарков Д.О. Механизм поиска субстратов ферментами эксцизионной репарации оснований // *Докл. Акад. наук.* – 2011. – V. 437. – № 5. – P. 695–698.
167. Vassilyev D.G., Kashiwagi T., Mikami Y., Ariyoshi M., Iwai S., Ohtsuka E., Morikawa K. Atomic model of a pyrimidine dimer excision repair enzyme complexed with a DNA substrate: Structural basis for damaged DNA recognition // *Cell*. – 1995. – V. 83. – № 5. – P. 773–782.

168. 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.
169. Lau A.Y., Schrger O.D., Samson L., Verdine G.L., Ellenberger T. Crystal structure of a human alkylbase–DNA repair enzyme complexed to DNA: Mechanisms for nucleotide flipping and base excision // *Cell.* – 1998. – V. 95. – № 2. – P. 249–258.
170. Lau A.Y., Wyatt M.D., Glassner B.J., Samson L.D., Ellenberger T. Molecular basis for discriminating between normal and damaged bases by the human alkyladenine glycosylase, AAG // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* – 2000. – V. 97. – № 25. – P. 13573–13578.
171. Parikh S.S., Walcher G., Jones G.D., Slupphaug G., Krokan H.E., Blackburn G.M., Tainer J.A. Uracil–DNA glycosylase–DNA substrate and product structures: Conformational strain promotes catalytic efficiency by coupled stereoelectronic effects // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* – 2000. – V. 97. – № 10. – P. 5083–5088.
172. Bruner S.D., Norman D.P.G., Verdine G.L. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8–oxoguanine in DNA // *Nature.* – 2000. – V. 403. – № 6772. – P. 859–866.
173. Norman D.P.G., Bruner S.D., Verdine G.L. Coupling of substrate recognition and catalysis by a human base–excision DNA repair protein // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – V. 123. – № 2. – P. 359–360.
174. Zharkov D.O., Golan G., Gilboa R., Fernandes A.S., Gerchman S.E., Kycia J.H., Rieger R.A., Grollman A.P., Shoham G. Structural analysis of an *Escherichia coli* endonuclease VIII covalent reaction intermediate // *EMBO J.* – 2002. – V. 21. – № 4. – P. 789–800.
175. Fromme J.C., Bruner S.D., Yang W., Karplus M., Verdine G.L. Product–assisted catalysis in base–excision DNA repair // *Nat. Struct. Biol.* – 2003. – V. 10. – № 3. – P. 204–211.
176. Fromme J.C., Verdine G.L. Structure of a trapped endonuclease III–DNA covalent intermediate // *EMBO J.* – 2003. – V. 22. – № 13. – P. 3461–3471.
177. Norman D.P.G., Chung S.J., Verdine G.L. Structural and biochemical exploration of a critical amino acid in human 8–oxoguanine glycosylase // *Biochemistry.* – 2003. – V. 42. – № 6. – P. 1564–1572.
178. Fromme J.C., Banerjee A., Huang S.J., Verdine G.L. Structural basis for removal of adenine mispaired with 8–oxoguanine by MutY adenine DNA glycosylase // *Nature.* – 2004. – V. 427. – № 6975. – P. 652–656.
179. Chung S.J., Verdine G.L. Structures of end products resulting from lesion processing by a DNA glycosylase/lyase // *Chem. Biol.* – 2004. – V. 11. – № 12. – P. 1643–1649.
180. Banerjee A., Yang W., Karplus M., Verdine G.L. Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damaged DNA // *Nature.* – 2005. – V. 434. – № 7033. – P. 612–618.
181. Barrett T.E., Schrger O.D., Savva R., Brown T., Jiricny J., Verdine G.L., Pearl L.H. Crystal structure of a thwarted mismatch glycosylase DNA repair complex // *EMBO J.* – 1999. – V. 18. – № 23. – P. 6599–6609.
182. 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.
183. Hoseki J., Okamoto A., Masui R., Shibata T., Inoue Y., Yokoyama S., Kuramitsu S. Crystal structure of a family 4 uracil–DNA glycosylase from *Thermus thermophilus* HB8 // *J. Mol. Biol.* – 2003. – V. 333. – № 3. – P. 515–526.
184. Jiang Y.L., Stivers J.T. Mutational analysis of the base–flipping mechanism of uracil DNA glycosylase // *Biochemistry.* – 2002. – V. 41. – № 37. – P. 11236–11247.
185. Abner C.W., Lau A.Y., Ellenberger T., Bloom L.B. Base excision and DNA binding activities of human alkyladenine DNA glycosylase are sensitive to the base paired with a lesion // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – № 16. – P. 13379–13387.

186. Connor E.E., Wyatt M.D. Active-site clashes prevent the human 3-methyladenine DNA glycosylase from improperly removing bases // *Chem. Biol.* – 2002. – V. 9. – № 9. – P. 1033–1041.
187. 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.
188. 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.
189. 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.
190. Tchou J., Kasai H., Shibutani S., Chung M.-H., Laval J., Grollman A.P., Nishimura S. 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* – 1991. – V. 88. – № 11. – P. 4690–4694.
191. 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.
192. O'Connor T.R., Graves R.J., de Murcia G., Castaing B., Laval J. Fpg protein of *Escherichia coli* is a zinc finger protein whose cysteine residues have a structural and/or functional role // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – № 12. – P. 9063–9070.
193. Tchou J., Michaels M.L., Miller J.H., Grollman A.P. Function of the zinc finger in *Escherichia coli* Fpg protein // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – № 35. – P. 26738–26744.
194. Castaing B., Geiger A., Seliger H., Nehls P., Laval J., Zelwer C., Boiteux S. Cleavage and binding of a DNA fragment containing a single 8-oxoguanine by wild type and mutant FPG proteins // *Nucleic Acids Res.* – 1993. – V. 21. – № 12. – P. 2899–2905.
195. Laity J.H., Lee B.M., Wright P.E. Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2001. – V. 11. – № 1. – P. 39–46.
196. van Aalten D.M.F., Erlanson D.A., Verdine G.L., Joshua-Tor L. A structural snapshot of base-pair opening in DNA // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* – 1999. – V. 96. – № 21. – P. 11809–11814.
197. Zharkov D.O., Shoham G., Grollman A.P. Structural characterization of the Fpg family of DNA glycosylases // *DNA Repair.* – 2003. – V. 2. – № 8. – P. 839–862.
198. Burley S.K., Petsko G.A. Aromatic–aromatic interaction: A mechanism of protein structure stabilization // *Science.* – 1985. – V. 229. – № 4708. – P. 23–28.
199. Tchou J., Grollman A.P. The catalytic mechanism of Fpg protein: Evidence for a Schiff base intermediate and amino terminus localization of the catalytic site // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – № 19. – P. 11671–11677.
200. McCullough A.K., Dodson M.L., Lloyd R.S. Initiation of base excision repair: Glycosylase mechanisms and structures // *Annu. Rev. Biochem.* – 1999. – V. 68. – P. 255–285.
201. 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.
202. Sidorkina O., Dizdaroglu M., Laval J. Effect of single mutations on the specificity of *Escherichia coli* FPG protein for excision of purine lesions from DNA damaged by free radicals // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – V. 31. – № 6. – P. 816–823.
203. Rabow L.E., Kow Y.W. Mechanism of action of base release by *Escherichia coli* Fpg protein: Role of lysine 155 in catalysis // *Biochemistry.* – 1997. – V. 36. – № 16. – P. 5084–5096.
204. 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.

205. Karakaya A., Jaruga P., Bohr V.A., Grollman A.P., Dizdaroglu M. Kinetics of excision of purine lesions from DNA by *Escherichia coli* Fpg protein // *Nucleic Acids Res.* – 1997. – V. 25. – № 3. – P. 474–479.
206. Tchou J., Bodepudi V., Shibutani S., Antoshechkin I., Miller J., Grollman A.P., Johnson F. Substrate specificity of Fpg protein: Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – № 21. – P. 15318–15324.
207. Tretyakova N.Y., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Peroxynitrite-induced secondary oxidative lesions at guanine nucleobases: Chemical stability and recognition by the Fpg DNA repair enzyme // *Chem. Res. Toxicol.* – 2000. – V. 13. – № 7. – P. 658–664.
208. Speina E., Ciesla J.M., Wyjck J., Bajek M., Kusmierek J.T., Tudek B. The pyrimidine ring-opened derivative of 1,*N*<sup>6</sup>-ethenoadenine is excised from DNA by the *Escherichia coli* Fpg and Nth proteins // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – № 24. – P. 21821–21827.
209. Li Q., Laval J., Ludlum D.B. Fpg protein releases a ring-opened *N*-7 guanine adduct from DNA that has been modified by sulfur mustard // *Carcinogenesis.* – 1997. – V. 18. – № 5. – P. 1035–1038.
210. Oleykowski C.A., Mayernik J.A., Lim S.E., Groopman J.D., Grossman L., Wogan G.N., Yeung A.T. Repair of aflatoxin B1 DNA adducts by the UvrABC endonuclease of *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – № 11. – P. 7990–8002.
211. Hatahet Z., Kow Y.W., Purmal A.A., Cunningham R.P., Wallace S.S. New substrates for old enzymes: 5-hydroxy-2'-deoxycytidine and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine are substrates for *Escherichia coli* endonuclease III and formamidopyrimidine DNA *N*-glycosylase, while 5-hydroxy-2'-deoxyuridine is a substrate for uracil DNA *N*-glycosylase // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – № 29. – P. 18814–18820.
212. Purmal A.A., Lampman G.W., Bond J.P., Hatahet Z., Wallace S.S. Enzymatic processing of uracil glycol, a major oxidative product of DNA cytosine // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – № 16. – P. 10026–10035.
213. D'Ham C., Romieu A., Jaquinod M., Gasparutto D., Cadet J. Excision of 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine, 5,6-dihydrothymine, and 5-hydroxycytosine from defined sequence oligonucleotides by *Escherichia coli* endonuclease III and Fpg proteins: Kinetic and mechanistic aspects // *Biochemistry.* – 1999. – V. 38. – № 11. – P. 3335–3344.
214. Boiteux S., Huisman O. Isolation of a formamidopyrimidine-DNA glycosylase (*fpg*) mutant of *Escherichia coli* K12 // *Mol. Gen. Genet.* – 1989. – V. 215. – № 2. – P. 300–305.
215. Bessho T., Tano K., Kasai H., Nishimura S. Deficiency of 8-hydroxyguanine DNA endonuclease activity and accumulation of the 8-hydroxyguanine in mutator mutant (*mutM*) of *Escherichia coli* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1992. – V. 188. – № 1. – P. 372–378.
216. 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 at apurinic/apyrimidinic sites // *J Biol Chem.* – 1990. – V. 265. – № 7. – P. 3916–3922.
217. O'Connor T.R., Laval J. Physical association of the 2,6-diamino-4-hydroxy-5*N*-formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli* and an activity nicking DNA at apurinic/apyrimidinic sites // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1989. – V. 86. – № 14. – P. 5222–5226.
218. Graves R.J., Felzenszwalb I., Laval J., O'Connor T.R. Excision of 5'-terminal deoxyribose phosphate from damaged DNA is catalyzed by the Fpg protein of *Escherichia coli* // *J Biol Chem.* – 1992. – V. 267. – № 20. – P. 14429–14435.
219. Bailly V., Verly W.G., O'Connor T., Laval J. Mechanism of DNA strand nicking at apurinic/apyrimidinic sites by *Escherichia coli* [formamidopyrimidine]DNA glycosylase // *Biochem J.* – 1989. – V. 262. – № 2. – P. 581–589.
220. Hatahet Z., Zhou M., Reha-Krantz L.J., Morrical S.W., Wallace S.S. In search of a mutational hotspot // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* – 1998. – V. 95. – № 15. – P. 8556–8561.

221. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E., III, Tekaiia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.-A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S., Barrell B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence // *Nature*. – 1998. – V. 393. – № 6685. – P. 537–544.
222. Mizrahi V., Andersen S.J. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence? // *Mol. Microbiol.* – 1998. – V. 29. – № 6. – P. 1331–1339.
223. Andersson G.E., Sharp P.M. Codon usage in the *Mycobacterium tuberculosis* complex // *Microbiology*. – 1996. – V. 142 ( Pt 4). – P. 915–925.
224. de Miranda A.B., Alvarez-Valin F., Jabbari K., Degraeve W.M., Bernardi G. Gene expression, amino acid conservation, and hydrophobicity are the main factors shaping codon preferences in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae* // *J Mol Evol.* – 2000. – V. 50. – № 1. – P. 45–55.
225. Guo Y., Bandaru V., Jaruga P., Zhao X., Burrows C.J., Iwai S., Dizdaroglu M., Bond J.P., Wallace S.S. The oxidative DNA glycosylases of *Mycobacterium tuberculosis* exhibit different substrate preferences from their *Escherichia coli* counterparts // *DNA Repair*. – 2010. – V. 9. – № 2. – P. 177–190.
226. Сидоренко В.С., Рот М.А., Филипенко М.Л., Невинский Г.А., Жарков Д.О. Новые ДНК-гликозилазы из *Mycobacterium tuberculosis* // *Биохимия*. – 2008. – V. 73. – № 4. – P. 542–552.
227. Guo Y., Wallace S.S., Bandaru V. A novel bicistronic vector for overexpressing *Mycobacterium tuberculosis* proteins in *Escherichia coli* // *Protein Expr. Purif.* – 2009. – V. 65. – № 2. – P. 230–237.
228. Chung M.-H., Kim H.-S., Ohtsuka E., Kasai H., Yamamoto F., Nishimura S. An endonuclease activity in human polymorphonuclear neutrophils that removes 8-hydroxyguanine residues from DNA // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1991. – V. 178. – № 3. – P. 1472–1478.
229. Auffret van der Kemp P., Thomas D., Barbey R., de Oliveira R., Boiteux S. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *OGG1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-*N*-methylformamidopyrimidine // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* – 1996. – V. 93. – P. 5197–5202.
230. Nash H.M., Bruner S.D., Schdger O.D., Kawate T., Addona T.A., Spooner E., Lane W.S., Verdine G.L. Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily // *Curr. Biol.* – 1996. – V. 6. – № 8. – P. 968–980.
231. Rosenquist T.A., Zharkov D.O., Grollman A.P. Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* – 1997. – V. 94. – № 14. – P. 7429–7434.
232. Lu R., Nash H.M., Verdine G.L. A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer // *Curr. Biol.* – 1997. – V. 7. – № 6. – P. 397–407.
233. Prieto Alamo M.J., Jurado J., Francastel E., Laval F. Rat 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase: Substrate specificity, kinetics and cleavage mechanism at an apurinic site // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – V. 26. – № 22. – P. 5199–5202.
234. Radicella J.P., Dherin C., Desmaze C., Fox M.S., Boiteux S. Cloning and characterization of *hOGG1*, a human homolog of the *OGG1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* – 1997. – V. 94. – № 15. – P. 8010–8015.

235. Arai K., Morishita K., Shinmura K., Kohno T., Kim S.-R., Nohmi T., Taniwaki M., Ohwada S., Yokota J. Cloning of a human homolog of the yeast *OGG1* gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage // *Oncogene*. – 1997. – V. 14. – № 23. – P. 2857–2861.
236. Aburatani H., Hippo Y., Ishida T., Takashima R., Matsuba C., Kodama T., Takao M., Yasui A., Yamamoto K., Asano M., Fukasawa K., Yoshinari T., Inoue H., Ohtsuka E., Nishimura S. Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue // *Cancer Res*. – 1997. – V. 57. – № 11. – P. 2151–2156.
237. Roldán-Arjona T., Wei Y.-F., Carter K.C., Klungland A., Anselmino C., Wang R.-P., Augustus M., Lindahl T. Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* – 1997. – V. 94. – № 15. – P. 8016–8020.
238. Kohno T., Shinmura K., Tosaka M., Tani M., Kim S.-R., Sugimura H., Nohmi T., Kasai H., Yokota J. Genetic polymorphisms and alternative splicing of the *hOGG1* gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA // *Oncogene*. – 1998. – V. 16. – P. 3219–3225.
239. Nishioka K., Ohtsubo T., Oda H., Fujiwara T., Kang D., Sugimachi K., Nakabeppu Y. Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced *OGG1* mRNAs // *Mol. Biol. Cell*. – 1999. – V. 10. – № 5. – P. 1637–1652.
240. Hashiguchi K., Stuart J.A., de Souza-Pinto N.C., Bohr V.A. The C-terminal  $\alpha$ O helix of human *Ogg1* is essential for 8-oxoguanine DNA glycosylase activity: The mitochondrial  $\beta$ -*Ogg1* lacks this domain and does not have glycosylase activity // *Nucleic Acids Res*. – 2004. – V. 32. – № 18. – P. 5596–5608.
241. Croteau D.L., ap Rhys C.M.J., Hudson E.K., Dianov G.L., Hansford R.G., Bohr V.A. An oxidative damage-specific endonuclease from rat liver mitochondria // *J. Biol. Chem*. – 1997. – V. 272. – № 43. – P. 27338–27344.
242. de Souza-Pinto N.C., Eide L., Hogue B.A., Thybo T., Stevnsner T., Seeberg E., Klungland A., Bohr V.A. Repair of 8-oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial DNA depends on the oxoguanine DNA glycosylase (*OGG1*) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial DNA of *OGG1*-defective mice // *Cancer Res*. – 2001. – V. 61. – № 14. – P. 5378–5381.
243. de Souza-Pinto N.C., Hogue B.A., Bohr V.A. DNA repair and aging in mouse liver: 8-oxodG glycosylase activity increase in mitochondrial but not in nuclear extracts // *Free Radic. Biol. Med*. – 2001. – V. 30. – № 8. – P. 916–923.
244. Bjørås M., Seeberg E., Luna L., Pearl L.H., Barrett T.E. Reciprocal "flipping" underlies substrate recognition and catalytic activation by the human 8-oxo-guanine DNA glycosylase // *J. Mol. Biol*. – 2002. – V. 317. – № 2. – P. 171–177.
245. Girard P.M., D'Ham C., Cadet J., Boiteux S. Opposite base-dependent excision of 7,8-dihydro-8-oxoadenine by the *Ogg1* protein of *Saccharomyces cerevisiae* // *Carcinogenesis*. – 1998. – V. 19. – № 7. – P. 1299–1305.
246. Bjørås M., Luna L., Johnsen B., Hoff E., Haug T., Rognes T., Seeberg E. Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites // *EMBO J*. – 1997. – V. 16. – № 20. – P. 6314–6322.
247. Karahalil B., Girard P.-M., Boiteux S., Dizdaroglu M. Substrate specificity of the *Ogg1* protein of *Saccharomyces cerevisiae*: Excision of guanine lesions produced in DNA by ionizing radiation- or hydrogen peroxide/metal ion-generated free radicals // *Nucleic Acids Res*. – 1998. – V. 26. – № 5. – P. 1228–1232.
248. Dherin C., Radicella J.P., Dizdaroglu M., Boiteux S. Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human  $\alpha$ -*hOgg1* protein and the polymorphic  $\alpha$ -*hOgg1*(Ser326Cys) protein

- which is frequently found in human populations // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – V. 27. – № 20. – P. 4001–4007.
249. Zharkov D.O., Rosenquist T.A., Gerchman S.E., Grollman A.P. Substrate specificity and reaction mechanism of murine 8-oxoguanine-DNA glycosylase // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – № 37. – P. 28607–28617.
  250. Jensen A., Calvayrac G., Karahalil B., Bohr V.A., Stevnsner T. Mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 incises 8-oxoadenine opposite cytosine in nuclei and mitochondria, while a different glycosylase incises 8-oxoadenine opposite guanine in nuclei // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – № 21. – P. 19541–19548.
  251. Girard P.-M., Guibourt N., Boiteux S. The Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: A 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase/AP lyase whose lysine 241 is a critical residue for catalytic activity // *Nucleic Acids Res.* – 1997. – V. 25. – № 16. – P. 3204–3211.
  252. Hill J.W., Hazra T.K., Izumi T., Mitra S. Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: Potential coordination of the initial steps in base excision repair // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – V. 29. – № 2. – P. 430–438.
  253. Sidorenko V.S., Nevinsky G.A., Zharkov D.O. Mechanism of interaction between human 8-oxoguanine-DNA glycosylase and AP endonuclease // *DNA Repair.* – 2007. – V. 6. – № 3. – P. 317–328.
  254. Sidorenko V.S., Nevinsky G.A., Zharkov D.O. Specificity of stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP endonuclease // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – V. 368. – № 1. – P. 175–179.
  255. Marsin S., Vidal A.E., Sossou M., Mñissier-de Murcia J., Le Page F., Boiteux S., de Murcia G., Radicella J.P. Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1 // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – № 45. – P. 44068–44074.
  256. Bhakat K.K., Izumi T., Yang S.-H., Hazra T.K., Mitra S. Role of acetylated human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in regulation of the parathyroid hormone gene // *EMBO J.* – 2003. – V. 22. – № 23. – P. 6299–6309.
  257. Bhakat K.K., Hazra T.K., Mitra S. Acetylation of the human DNA glycosylase NEIL2 and inhibition of its activity // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32. – № 10. – P. 3033–3039.
  258. Luna L., Bjrres M., Hoff E., Rognes T., Seeberg E. Cell-cycle regulation, intracellular sorting and induced overexpression of the human NTH1 DNA glycosylase involved in removal of formamidopyrimidine residues from DNA // *Mutat. Res.* – 2000. – V. 460. – № 2. – P. 95–104.
  259. Hu J., Imam S.Z., Hashiguchi K., de Souza-Pinto N.C., Bohr V.A. Phosphorylation of human oxoguanine DNA glycosylase ( $\alpha$ -OGG1) modulates its function // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – V. 33. – № 10. – P. 3271–3282.
  260. Bhakat K.K., Mokkalapati S.K., Boldogh I., Hazra T.K., Mitra S. Acetylation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by p300 and its role in 8-oxoguanine repair in vivo // *Mol. Cell. Biol.* – 2006. – V. 26. – № 5. – P. 1654–1665.
  261. Audebert M., Radicella J.P., Dizdaroglu M. Effect of single mutations in the OGG1 gene found in human tumors on the substrate specificity of the Ogg1 protein // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – V. 28. – № 14. – P. 2672–2678.
  262. Fan C.-Y., Liu K.L., Huang H.Y., Barnes E.L., Swalsky P.A., Bakker A., Woods J., Finkelstein S.D. Frequent allelic imbalance and loss of protein expression of the DNA repair gene hOGG1 in head and neck squamous cell carcinoma // *Lab. Invest.* – 2001. – V. 81. – № 10. – P. 1429–1438.
  263. Hagiwara A., Kitajima Y., Sato S., Miyazaki K. Allelic loss of the DNA repair gene OGG1 against oxidative damage in esophageal squamous cell carcinoma // *Oncol. Rep.* – 2005. – V. 13. – № 6. – P. 1009–1016.
  264. Klungland A., Rosewell I., Hollenbach S., Larsen E., Daly G., Epe B., Seeberg E., Lindahl T., Barnes D.E. Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of

- oxidative base damage // Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. – 1999. – V. 96. – № 23. – P. 13300–13305.
265. Minowa O., Arai T., Hirano M., Monden Y., Nakai S., Fukuda M., Itoh M., Takano H., Hippou Y., Aburatani H., Masumura K.-i., Nohmi T., Nishimura S., Noda T. *Mmh/Ogg1* gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice // Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. – 2000. – V. 97. – № 8. – P. 4156–4161.
266. Osterod M., Hollenbach S., Hengstler J.G., Barnes D.E., Lindahl T., Epe B. Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice // Carcinogenesis. – 2001. – V. 22. – № 9. – P. 1459–1463.
267. Xie Y., Yang H., Cunanan C., Okamoto K., Shibata D., Pan J., Barnes D.E., Lindahl T., McIlhatton M., Fishel R., Miller J.H. Deficiencies in mouse *myh* and *ogg1* result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the *k-ras* oncogene in lung tumors // Cancer Res. – 2004. – V. 64. – № 9. – P. 3096–3102.
268. Russo M.T., De Luca G., Degan P., Parlanti E., Dogliotti E., Barnes D.E., Lindahl T., Yang H., Miller J.H., Bignami M. Accumulation of the oxidative base lesion 8-hydroxyguanine in DNA of tumor-prone mice defective in both the *Myh* and *Ogg1* DNA glycosylases // Cancer Res. – 2004. – V. 64. – № 13. – P. 4411–4414.
269. Sakumi K., Tominaga Y., Furuichi M., Xu P., Tsuzuki T., Sekiguchi M., Nakabeppu Y. *Ogg1* knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by *Mth1* gene disruption // Cancer Res. – 2003. – V. 63. – № 5. – P. 902–905.
270. Asahara H., Wistort P.M., Bank J.F., Bakerian R.H., Cunningham R.P. Purification and characterization of *Escherichia coli* endonuclease III from the cloned *nth* gene // Biochemistry. – 1989. – V. 28. – № 10. – P. 4444–4449.
271. Lokhov S.G., Pyshnyi D.V. Thermodynamic and spectral properties of DNA miniduplexes with the terminal G x A mispairs and 3' or 5' dangling bases // FEBS Lett. – 1997. – V. 420. – № 2–3. – P. 134–138.
272. Petersheim M., Turner D.H. Base-stacking and base-pairing contributions to helix stability: thermodynamics of double-helix formation with CCGG, CCGGp, CCGGAp, ACCGGp, CCGGUp, and ACCGGUp // Biochemistry. – 1983. – V. 22. – № 2. – P. 256–263.
273. Ponomarenko M.P., Kolchanova A.N., Kolchanov N.A. Generating programs for predicting the activity of functional sites // J Comput Biol. – 1997. – V. 4. – № 1. – P. 83–90.
274. Kirpota O.O., Endutkin A.V., Ponomarenko M.P., Ponomarenko P.M., Zharkov D.O., Nevinsky G.A. Thermodynamic and kinetic basis for recognition and repair of 8-oxoguanine in DNA by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase // Nucleic Acids Res. – 2011. – V. 39. – № 11. – P. 4836–4850.
275. Porello S.L., Leyes A.E., David S.S. Single-turnover and pre-steady-state kinetics of the reaction of the adenine glycosylase MutY with mismatch-containing DNA substrates // Biochemistry. – 1998. – V. 37. – № 42. – P. 14756–14764.
276. Kuznetsov S.V., Sidorkina O.M., Jurado J., Bazin M., Tauc P., Brochon J.C., Laval J., Santus R. Effect of single mutations on the structural dynamics of a DNA repair enzyme, the *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase—a fluorescence study using tryptophan residues as reporter groups // Eur J Biochem. – 1998. – V. 253. – № 2. – P. 413–420.
277. Afonnikov D.A., Oshchepkov D.Y., Kolchanov N.A. Detection of conserved physico-chemical characteristics of proteins by analyzing clusters of positions with co-ordinated substitutions // Bioinformatics. – 2001. – V. 17. – № 11. – P. 1035–1046.
278. Marks D.S., Hopf T.A., Sander C. Protein structure prediction from sequence variation // Nat Biotechnol. – 2012. – V. 30. – № 11. – P. 1072–1080.
279. Endutkin A.V., Koptelov S.S., Popov A.V., Torgasheva N.A., Lomzov A.A., Tsygankova A.R., Skiba T.V., Afonnikov D.A., Zharkov D.O. Residue coevolution reveals functionally

- important intramolecular interactions in formamidopyrimidine–DNA glycosylase // *DNA Repair (Amst)*. – 2018. – V. 69. – P. 24–33.
280. Попов А.В., Воробьев Ю.Н. Программа GUI–BioPASED для моделирования молекулярной динамики биополимеров с графическим пользовательским интерфейсом // *Мол. биол.* – 2010. – V. 44. – № 4. – P. 648–654.
281. Fromme J.C., Verdine G.L. DNA lesion recognition by the bacterial repair enzyme MutM // *J Biol Chem.* – 2003. – V. 278. – № 51. – P. 51543–51548.
282. 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.
283. Jónsson H., Mills G., Jacobsen K.W. Nudged Elastic Band method for finding minimum energy paths of transitions / *Classical and Quantum Dynamics in Condensed Phase Simulations*. Berne B.J., Ciccotti G., Coker D.F., Eds. – Singapore: World Scientific // 1998. – P. 385–404.
284. Bergonzo C., Campbell A.J., Walker R.C., Simmerling C. A Partial Nudged Elastic Band Implementation for Use with Large or Explicitly Solvated Systems // *Int J Quantum Chem.* – 2009. – V. 109. – № 15. – P. 3781.
285. 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.
286. Li H., Endutkin A.V., Bergonzo C., Fu L., Grollman A., Zharkov D.O., Simmerling C. DNA Deformation–Coupled Recognition of 8–Oxoguanine: Conformational Kinetic Gating in Human DNA Glycosylase // *J Am Chem Soc.* – 2017. – V. 139. – № 7. – P. 2682–2692.
287. Banerjee A., Santos W.L., Verdine G.L. Structure of a DNA glycosylase searching for lesions // *Science.* – 2006. – V. 311. – № 5764. – P. 1153–1157.
288. Bruner S.D., Norman D.P., Verdine G.L. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8–oxoguanine in DNA // *Nature.* – 2000. – V. 403. – № 6772. – P. 859–866.
289. Banerjee A., Verdine G.L. A nucleobase lesion remodels the interaction of its normal neighbor in a DNA glycosylase complex // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – V. 103. – № 41. – P. 15020–15025.
290. Banerjee A., Yang W., Karplus M., Verdine G.L. Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damaged DNA // *Nature.* – 2005. – V. 434. – № 7033. – P. 612–618.
291. Wereszczynski J., McCammon J.A. Statistical mechanics and molecular dynamics in evaluating thermodynamic properties of biomolecular recognition // *Q Rev Biophys.* – 2012. – V. 45. – № 1. – P. 1–25.
292. Doruker P., Atilgan A.R., Bahar I. Dynamics of proteins predicted by molecular dynamics simulations and analytical approaches: application to alpha–amylase inhibitor // *Proteins.* – 2000. – V. 40. – № 3. – P. 512–524.
293. Atilgan A.R., Durell S.R., Jernigan R.L., Demirel M.C., Keskin O., Bahar I. Anisotropy of fluctuation dynamics of proteins with an elastic network model // *Biophys J.* – 2001. – V. 80. – № 1. – P. 505–515.
294. Eyal E., Lum G., Bahar I. The anisotropic network model web server at 2015 (ANM 2.0) // *Bioinformatics.* – 2015. – V. 31. – № 9. – P. 1487–1489.
295. 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.
296. Popov A.V., Vorobjev Y.N., Zharkov D.O. MDTRA: a molecular dynamics trajectory analyzer with a graphical user interface // *J Comput Chem.* – 2013. – V. 34. – № 4. – P. 319–325.

297. Goodsell D.S., Dickerson R.E. Bending and curvature calculations in B-DNA // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – V. 22. – № 24. – P. 5497–5503.
298. Gromiha M.M., Ponnuswamy P.K. Hydrophobic distribution and spatial arrangement of amino acid residues in membrane proteins // *Int J Pept Protein Res.* – 1996. – V. 48. – № 5. – P. 452–460.
299. Zharkov D.O., Rosenquist T.A., Gerchman S.E., Grollman A.P. Substrate specificity and reaction mechanism of murine 8-oxoguanine-DNA glycosylase // *J Biol Chem.* – 2000. – V. 275. – № 37. – P. 28607–28617.
300. Kamiya H. Mutagenic potentials of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides: survey and summary // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31. – № 2. – P. 517–531.
301. Hatahet Z., Zhou M., Reha-Krantz L.J., Morrical S.W., Wallace S.S. In search of a mutational hotspot // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – V. 95. – № 15. – P. 8556–8561.
302. Sassa A., Beard W.A., Prasad R., Wilson S.H. DNA sequence context effects on the glycosylase activity of human 8-oxoguanine DNA glycosylase // *J Biol Chem.* – 2012. – V. 287. – № 44. – P. 36702–36710.
303. Chelobanov B.P., Laktionov P.P., Khar'kova M.V., Rykova E.Y., Pyshnyi D.V., Pyshnaya I.A., Silnikov V.N., Vlassov V.V. Investigation of surface oligonucleotide-binding proteins of eucaryotic cells by affinity modification with reactive oligonucleotide derivatives // *Russ Chem B+.* – 2002. – V. 51. – № 7. – P. 1204–1211.
304. Пышный Д.В., Иванова Е.М. Термодинамические параметры коаксиального стэкинга при гибридизации олигодезоксирибонуклеотидов встык // *Изв. Акад. Наук. Сер. Хим.* – 2002. – № 7. – P. 1057–1066.
305. Oda Y., Uesugi S., Ikehara M., Nishimura S., Kawase Y., Ishikawa H., Inoue H., Ohtsuka E. NMR studies of a DNA containing 8-hydroxydeoxyguanosine // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – V. 19. – № 7. – P. 1407–1412.
306. Lipscomb L.A., Peek M.E., Morningstar M.L., Verghis S.M., Miller E.M., Rich A., Essigmann J.M., Williams L.D. X-ray structure of a DNA decamer containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1995. – V. 92. – № 3. – P. 719–723.
307. Plum G.E., Grollman A.P., Johnson F., Breslauer K.J. Influence of the oxidatively damaged adduct 8-oxodeoxyguanosine on the conformation, energetics, and thermodynamic stability of a DNA duplex // *Biochemistry.* – 1995. – V. 34. – № 49. – P. 16148–16160.
308. Hoppins J.J., Gruber D.R., Miars H.L., Kiryutin A.S., Kasymov R.D., Petrova D.V., Endutkin A.V., Popov A.V., Yurkovskaya A.V., Fedechkin S.O., Brockerman J.A., Zharkov D.O., Smirnov S.L. 8-Oxoguanine Affects DNA Backbone Conformation in the EcoRI Recognition Site and Inhibits Its Cleavage by the Enzyme // *PLoS ONE.* – 2016. – V. 11. – № 10. – P. E0164424.
309. Sidorkina O.M., Laval J. Role of the N-terminal proline residue in the catalytic activities of the *Escherichia coli* Fpg protein // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – № 14. – P. 9924–9929.
310. Burgess S., Jaruga P., Dodson M.L., Dizdaroglu M., Lloyd R.S. Determination of active site residues in *Escherichia coli* endonuclease VIII // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – № 4. – P. 2938–2944.
311. Kraut D.A., Carroll K.S., Herschlag D. Challenges in enzyme mechanism and energetics // *Annu Rev Biochem.* – 2003. – V. 72. – P. 517–571.
312. Daniel R.M., Dunn R.V., Finney J.L., Smith J.C. The role of dynamics in enzyme activity // *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* – 2003. – V. 32. – P. 69–92.
313. Hammes-Schiffer S., Benkovic S.J. Relating protein motion to catalysis // *Annu Rev Biochem.* – 2006. – V. 75. – P. 519–541.
314. 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.

315. Zharkov D.O., Grollman A.P. Combining structural and bioinformatics methods for the analysis of functionally important residues in DNA glycosylases // *Free Radic Biol Med.* – 2002. – V. 32. – № 12. – P. 1254–1263.
316. 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.
317. Shindyalov I.N., Kolchanov N.A., Sander C. Can 3–Dimensional Contacts in Protein Structures Be Predicted by Analysis of Correlated Mutations // *Protein Eng.* – 1994. – V. 7. – № 3. – P. 349–358.
318. Little D.Y., Chen L. Identification of Coevolving Residues and Coevolution Potentials Emphasizing Structure, Bond Formation and Catalytic Coordination in Protein Evolution // *PLoS ONE.* – 2009. – V. 4. – № 3. – P. E4762
319. Morcos F., Pagnani A., Lunt B., Bertolino A., Marks D.S., Sander C., Zecchina R., Onuchic J.N., Hwa T., Weigt M. Direct–coupling analysis of residue coevolution captures native contacts across many protein families // *P Natl Acad Sci USA.* – 2011. – V. 108. – № 49. – P. E1293–E1301.
320. Sutto L., Marsili S., Valencia A., Gervasio F.L. From residue coevolution to protein conformational ensembles and functional dynamics // *P Natl Acad Sci USA.* – 2015. – V. 112. – № 44. – P. 13567–13572.
321. Jelesarov I., Karshikoff A. Defining the role of salt bridges in protein stability // *Methods Mol Biol.* – 2009. – V. 490. – P. 227–60.
322. Privalov P.L. Intermediate states in protein folding // *J Mol Biol.* – 1996. – V. 258. – № 5. – P. 707–25.
323. Malhotra P., Udgaonkar J.B. How cooperative are protein folding and unfolding transitions? // *Protein Sci.* – 2016. – V. 25. – № 11. – P. 1924–1941.
324. 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.
325. Tchou J., Bodepudi V., Shibutani S., Antoshechkin I., Miller J., Grollman A.P., Johnson F. Substrate specificity of Fpg protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA // *J Biol Chem.* – 1994. – V. 269. – № 21. – P. 15318–15324.
326. Koval V.V., Kuznetsov N.A., Zharkov D.O., Ishchenko A.A., Douglas K.T., Nevinsky G.A., Fedorova O.S. Pre–steady–state kinetics shows differences in processing of various DNA lesions by *Escherichia coli* formamidopyrimidine–DNA glycosylase // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32. – № 3. – P. 926–935.
327. Zharkov D.O., Golan G., Gilboa R., Fernandes A.S., Gerchman S.E., Kycia J.H., Rieger R.A., Grollman A.P., Shoham G. Structural analysis of an *Escherichia coli* endonuclease VIII covalent reaction intermediate // *EMBO J.* – 2002. – V. 21. – № 4. – P. 789–800.
328. O'Connor T.R., Graves R.J., de Murcia G., Castaing B., Laval J. Fpg protein of *Escherichia coli* is a zinc finger protein whose cysteine residues have a structural and/or functional role // *J Biol Chem.* – 1993. – V. 268. – № 12. – P. 9063–9070.
329. Tchou J., Michaels M.L., Miller J.H., Grollman A.P. Function of the zinc finger in *Escherichia coli* Fpg protein // *J Biol Chem.* – 1993. – V. 268. – № 35. – P. 26738–26744.
330. Comparative analysis of baseline 8–oxo–7,8–dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus // *Carcinogenesis.* – 2002. – V. 23. – № 12. – P. 2129–2133.
331. 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.

332. Kuznetsov N.A., Zharkov D.O., Koval V.V., Buckle M., Fedorova O.S. Reversible chemical step and rate-limiting enzyme regeneration in the reaction catalyzed by formamidopyrimidine–DNA glycosylase // *Biochemistry*. – 2009. – V. 48. – № 48. – P. 11335–11343.
333. Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., Vorobjev Y.N., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Fedorova O.S. Pre-steady-state kinetic study of substrate specificity of *Escherichia coli* formamidopyrimidine–DNA glycosylase // *Biochemistry*. – 2007. – V. 46. – № 2. – P. 424–435.
334. Kuznetsov N.A., Koval V.V., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Zharkov D.O., Fedorova O.S. Kinetic conformational analysis of human 8-oxoguanine–DNA glycosylase // *J Biol Chem*. – 2007. – V. 282. – № 2. – P. 1029–1038.
335. Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Fedorova O.S. Kinetics of substrate recognition and cleavage by human 8-oxoguanine–DNA glycosylase // *Nucleic Acids Res*. – 2005. – V. 33. – № 12. – P. 3919–3931.
336. Blainey P.C., van Oijen A.M., Banerjee A., Verdine G.L., Xie X.S. A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* – 2006. – V. 103. – № 15. – P. 5752–5757.
337. Demple B. DNA repair flips out // *Curr. Biol*. – 1995. – V. 5. – № 7. – P. 719–721.
338. 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.
339. Petersheim M., Turner D.H. Proton magnetic resonance melting studies of CCGGp, ACCGGp, ACCGGp, CCGGUp, and ACCGGUp // *Biochemistry*. – 1983. – V. 22. – № 2. – P. 269–277.
340. Heiser A., Coleman D., Dannull J., Yancey D., Maurice M.A., Lallas C.D., Dahm P., Niedzwiecki D., Gilboa E., Vieweg J. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors // *J Clin Invest*. – 2002. – V. 109. – № 3. – P. 409–417.
341. Petersheim M., Turner D.H. Nuclear overhauser studies of CCGGp, ACCGGp, and ACCGGUp // *Biochemistry*. – 1983. – V. 22. – № 2. – P. 264–268.
342. Budworth H., Matthewman G., O'Neill P., Dianov G.L. Repair of tandem base lesions in DNA by human cell extracts generates persisting single-strand breaks // *J. Mol. Biol*. – 2005. – V. 351. – № 5. – P. 1020–1029.
343. Fromme J.C., Verdine G.L. DNA lesion recognition by the bacterial repair enzyme MutM // *J. Biol. Chem*. – 2003. – V. 278. – № 51. – P. 51543–51548.
344. Banerjee A., Santos W.L., Verdine G.L. Structure of a DNA glycosylase searching for lesions // *Science*. – 2006. – V. 311. – № 5764. – P. 1153–1157.
345. 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.
346. Qi Y., Spong M.C., Nam K., Karplus M., Verdine G.L. Entrapment and structure of an extrahelical guanine attempting to enter the active site of a bacterial DNA glycosylase, MutM // *J. Biol. Chem*. – 2010. – V. 285. – № 2. – P. 1468–1478.
347. Qi Y., Nam K., Spong M.C., Banerjee A., Sung R.J., Zhang M., Karplus M., Verdine G.L. Strandwise translocation of a DNA glycosylase on undamaged DNA // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2012. – V. 109. – № 4. – P. 1086–1091.
348. Serre L., Pereira de Jesus K., Boiteux S., Zelwer C., Castaing B. Crystal structure of the *Lactococcus lactis* formamidopyrimidine–DNA glycosylase bound to an abasic site analogue-containing DNA // *EMBO J*. – 2002. – V. 21. – № 12. – P. 2854–2865.
349. David-Cordonnier M.-H., Laval J., O'Neill P. Recognition and kinetics for excision of a base lesion within clustered DNA damage by the *Escherichia coli* proteins Fpg and Nth // *Biochemistry*. – 2001. – V. 40. – № 19. – P. 5738–5746.

350. 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.
351. Fromme J.C., Banerjee A., Huang S.J., Verdine G.L. Structural basis for removal of adenine mispaired with 8–oxoguanine by MutY adenine DNA glycosylase // *Nature.* – 2004. – V. 427. – № 6975. – P. 652–656.
352. Isaev S.A., Leontiev A.I., Baranov P.A., Pyshnyi I.A., Usachov A.E. Numerical analysis of the vortex intensification of heat transfer in a channel with a set of deep spherical dimples on one of the walls // *Dokl Phys.* – 2002. – V. 47. – № 10. – P. 755–757.
353. Sung R.J., Zhang M., Qi Y., Verdine G.L. Sequence–dependent structural variation in DNA undergoing intrahelical inspection by the DNA glycosylase MutM // *J Biol Chem.* – 2012. – V. 287. – № 22. – P. 18044–18054.
354. Sowlati–Hashjin S., Wetmore S.D. Computational investigation of glycosylase and beta–lyase activity facilitated by proline: applications to FPG and comparisons to hOgg1 // *J Phys Chem B.* – 2014. – V. 118. – № 50. – P. 14566–14577.
355. Stivers J.T., Jiang Y.L. A mechanistic perspective on the chemistry of DNA repair glycosylases // *Chem Rev.* – 2003. – V. 103. – № 7. – P. 2729–2759.
356. Berti P.J., McCann J.A. Toward a detailed understanding of base excision repair enzymes: transition state and mechanistic analyses of N–glycoside hydrolysis and N–glycoside transfer // *Chem Rev.* – 2006. – V. 106. – № 2. – P. 506–555.
357. 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.
358. David–Cordonnier M.H., Boiteux S., O'Neill P. Efficiency of excision of 8–oxo–guanine within DNA clustered damage by XRS5 nuclear extracts and purified human OGG1 protein // *Biochemistry.* – 2001. – V. 40. – № 39. – P. 11811–11818.
359. 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.
360. Pyshnyi D.V., Ivanova E.M. Thermodynamic parameters of coaxial stacking on stacking hybridization of oligodeoxyribonucleotides // *Russ Chem B+.* – 2002. – V. 51. – № 7. – P. 1145–1155.
361. Reddy D.V., Jagannadh B., Kunwar A.C. NMR study of dideoxynucleotides with anti–human immunodeficiency virus (HIV) activity // *J Biochem Biophys Methods.* – 1996. – V. 31. – № 3–4. – P. 113–121.
362. Kellinger M.W., Johnson K.A. Nucleotide–dependent conformational change governs specificity and analog discrimination by HIV reverse transcriptase // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – V. 107. – № 17. – P. 7734–7739.
363. Wang W., Wu E.Y., Hellinga H.W., Beese L.S. Structural factors that determine selectivity of a high fidelity DNA polymerase for deoxy–, dideoxy–, and ribonucleotides // *J Biol Chem.* – 2012. – V. 287. – № 34. – P. 28215–28226.
364. Latham K.A., Lloyd R.S. Delta–elimination by T4 endonuclease V at a thymine dimer site requires a secondary binding event and amino acid Glu–23 // *Biochemistry.* – 1995. – V. 34. – № 27. – P. 8796–8803.
365. Shui X., McFail–Isom L., Hu G.G., Williams L.D. The B–DNA dodecamer at high resolution reveals a spine of water on sodium // *Biochemistry.* – 1998. – V. 37. – № 23. – P. 8341–8355.
366. Aymami J., Coll M., van der Marel G.A., van Boom J.H., Wang A.H., Rich A. Molecular structure of nicked DNA: a substrate for DNA repair enzymes // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1990. – V. 87. – № 7. – P. 2526–2530.

367. Ramstein J., Lavery R. Energetic coupling between DNA bending and base pair opening // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1988. – V. 85. – № 19. – P. 7231–725.
368. Jiang Y.L., Stivers J.T. Reconstructing the substrate for uracil DNA glycosylase: tracking the transmission of binding energy in catalysis // Biochemistry. – 2001. – V. 40. – № 25. – P. 7710–7719.
369. Kreppel A., Blank I.D., Ochsenfeld C. Base-Independent DNA Base-Excision Repair of 8-Oxoguanine // J Am Chem Soc. – 2018. – V. 140. – № 13. – P. 4522–4526.
370. Da L.T., Yu J. Base-flipping dynamics from an intrahelical to an extrahelical state exerted by thymine DNA glycosylase during DNA repair process // Nucleic Acids Res. – 2018. – V. 46. – № 11. – P. 5410–5425.
371. Dodd T., Yan C., Kossmann B.R., Martin K., Ivanov I. Uncovering universal rules governing the selectivity of the archetypal DNA glycosylase TDG // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2018. – V. 115. – № 23. – P. 5974–5979.