

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Кладова Ольга Алексеевна

**Конформационная динамика ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII в
процессе взаимодействия с ДНК**

03.01.04 – биохимия

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

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

Новосибирск – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1. Повреждения ДНК.....	9
1.2. Типы репарации ДНК.....	11
1.3. Эксцизионная репарация оснований.....	13
1.4. Структурные суперсемейства ДНК-гликозилаз.....	16
1.4.1. Суперсемейство урацил-ДНК-гликозилазы.....	16
1.4.2. Суперсемейство HhH.....	17
1.4.2.1. Структурные особенности эндонуклеазы III.....	19
1.4.3. Суперсемейство Fpg/Nei.....	23
1.4.3.1. Структурные особенности эндонуклеазы VIII.....	24
1.4.4. Заключение к разделу 1.4.....	28
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	31
2.1. Выделение фермента Endo III.....	31
2.2. Выделение фермента Endo VIII.....	32
2.3. Получение олигодезоксирибонуклеотидов.....	32
2.4. Введение метки ³² P.....	35
2.5. Получение кинетических зависимостей степени расщепления субстратов.....	35
2.6. Получение флуоресцентных кинетических кривых.....	36
2.7. Количественная обработка результатов.....	37
2.8. Определение термодинамических параметров.....	38
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	40
3.1. Конформационная динамика ДНК-субстратов при взаимодействии с Endo III.....	40
3.1.1. Конформационная динамика ДНК цепи, содержащей повреждение.....	41
3.1.1.1. Взаимодействие с G-лигандом.....	41
3.1.1.2. Взаимодействие с F-лигандом.....	42
3.1.1.3. Взаимодействие с AP-субстратом.....	43
3.1.1.4. Взаимодействие с DHU-субстратом.....	44
3.1.2. Исследование конформационной динамики комплементарной цепи ДНК.....	46
3.1.2.1. Взаимодействие с G-лигандом.....	46
3.1.2.2. Взаимодействие с F-лигандом.....	47
3.1.2.3. Взаимодействие с AP- субстратом.....	48
3.1.2.4. Взаимодействие с DHU-субстратом.....	49

3.2. Анализ накопления продуктов реакции в зависимости от времени.....	51
3.3. Сравнительный анализ конформационных изменений в ДНК-дуплексах, содержащих различные флуорофоры, при взаимодействии с Endo III WT	53
3.4. Взаимодействие мутантных форм фермента Endo III, содержащих замены каталитических аминокислотных остатков K120A и D138A с ДНК-субстратами.....	57
3.4.1. Конформационные изменения цепи ДНК, содержащей повреждение, при взаимодействии с Endo III K120A.....	57
3.4.1.1. Взаимодействие с F-лигандом.....	57
3.4.1.2. Взаимодействие с DHU-субстратом.....	57
3.4.2. Сравнительный анализ конформационных изменений ДНК-дуплексов, содержащих флуорофорную группу 2-аPu.....	58
3.4.3. Конформационные изменения комплементарной цепи ДНК, при взаимодействии с Endo III K120A.....	59
3.4.3.1. Взаимодействие с G-лигандом.....	59
3.4.3.2. Взаимодействие с F-лигандом.....	60
3.4.3.3. Взаимодействие с AP-субстратом.....	61
3.4.3.4. Взаимодействие с DHU-субстратом.....	62
3.4.4. Анализ накопления продуктов реакции в зависимости от времени.....	63
3.4.5. Сравнительный анализ конформационных изменений ДНК-дуплексов, содержащих флуорофорную группу tC ^O	65
3.5. Кинетический анализ взаимодействия Endo III WT с ДНК субстратами при разных температурах.....	67
3.5.1. Взаимодействие с G-лигандом.....	67
3.5.2. Взаимодействие с F-лигандом.....	69
3.5.3. Взаимодействие с DHU-субстратом.....	71
3.5.4. Анализ накопления продукта реакции при различной температуре.....	73
3.5.5. Термодинамический анализ взаимодействия Endo III с ДНК-субстратами.....	74
3.5.5.1. Взаимодействие с G-лигандом.....	74
3.5.5.2. Взаимодействие с F-лигандом.....	77
3.5.5.3. Взаимодействие с DHU-субстратом.....	77
3.5.5.4. Сравнительный анализ термодинамических данных.....	78
3.6. Конформационная динамика фермента Endo VIII, его мутантных форм и ДНК субстратов.....	81
3.6.1. Конформационные изменения мутантных форм Endo VIII.....	81

3.6.1.1. Взаимодействие с DNU-субстратом.....	84
3.6.1.2. Взаимодействие с AP-субстратом.....	87
3.6.2. Функциональная роль остатков Leu70, Tyr71, Phe121, Phe230 и Pro253.....	90
3.7. Конформационная динамика ДНК-субстратов при взаимодействии с ферментом Endo VIII дикого типа и каталитически неактивной формой E2Q.....	93
3.7.1. Взаимодействие с С-лигандом.....	93
3.7.2. Взаимодействие с F-лигандом.....	95
3.7.3. Взаимодействие с AP-субстратом.....	96
3.7.4. Взаимодействие с DNU-субстратом.....	97
3.8. Кинетический анализ взаимодействия Endo VIII WT с ДНК субстратами при разных температурах.....	100
3.8.1. Взаимодействие с G-лигандом.....	100
3.8.2. Взаимодействие с F-лигандом.....	101
3.8.3. Взаимодействие с DNU-субстратом.....	103
3.9. Термодинамический анализ взаимодействия Endo VIII с ДНК-субстратами.....	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	110
ВЫВОДЫ.....	113
Список сокращений.....	114
Список литературы.....	116

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Способность гетероциклических оснований ДНК участвовать в химических превращениях, таких как окисление, алкилирование и дезаминирование, может приводить к нарушению генетической информации из-за изменения структурно-термодинамических параметров комплементарных пар [1, 2]. Например, мутагенный эффект модифицированного азотистого основания 8-оксо-7,8-дигидрогуанина (8-охоG), часто образующегося при окислении ДНК, вызван тем, что 8-охоG в син-конформации образует пару Хугстеновского типа с аденином. Вследствие этого в ходе репликации происходит образование пары 8-охоG:A, что в последующем цикле репликации приводит к трансверсии G:C → T:A [3–6]. При гидролитическом дезаминировании цитозина и 5-метилцитозина (5-meC) образуются неканонические пары U:G и T:G. Последующая репликация данных пар приводит к закреплению мутации C:G → T:A [7, 8]. Алкилирование гетероциклических оснований является источником образования множества различных модифицированных производных, таких как 6-метилгуанин (6-meG), 7-метилгуанин (7-meG) или 3-метиладенин (3-meA) и других. В то время, как 6-meG обладает мутагенными свойствами из-за своей способности образовывать пару с тимином, 7-meG и 3-meA могут блокировать ДНК-полимеразы, поэтому являются цитотоксичными [9–13].

Окислительное повреждение компонентов клетки является следствием аэробного дыхания, в ходе которого образуются активные формы кислорода (ROS, reactive oxygen species). Их воздействие на ДНК может приводить к появлению, в основном, необъемных окислительных повреждений азотистых оснований [14–16]. Система эксцизионной репарации оснований ДНК (BER, base excision repair), отвечающая за удаление данных повреждений, представляет собой комплекс специфических ферментов, начальные этапы которой обеспечиваются ДНК-гликозилазами, которые узнают поврежденное основание, и за счет различных механизмов осуществляют гидролиз N-гликозидной связи в цепи ДНК [17–19]. Одними из таких ферментов являются ДНК-гликозилазы Endo III и Endo VIII из *E. coli*, которые обладают субстратной специфичностью преимущественно к модифицированным пиримидиновым основаниям.

Несмотря на большой интерес к выяснению природы высокой специфичности ДНК-гликозилаз, непонятным остается вопрос, как именно ДНК-гликозилазы распознают поврежденные азотистые основания среди огромного числа неповрежденных нуклеотидов, и какие именно аминокислотные остатки играют роль в процессе узнавания повреждения и его последующего химического превращения.

Целью данной работы было изучение в предстационарных условиях особенностей конформационной динамики фермент-субстратных комплексов в процессе образования каталитически-компетентного состояния на примере ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII, принадлежащих к разным структурным семействам.

В задачи настоящего исследования входило:

- установление последовательности конформационных изменений в молекулах ферментов и ДНК-субстратов в ходе ферментативного процесса;
- определение ключевых аминокислотных остатков ферментов, участвующих на ранних стадиях узнавания поврежденного нуклеотида;
- выяснение роли каталитически-значимых аминокислотных остатков в конформационной динамике ферментов и их связывании с ДНК-субстратами;
- определение термодинамических параметров отдельных стадий взаимодействия ферментов с ДНК-субстратами.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Образование каталитически-компетентного состояния ДНК-гликозилазами Endo III и Endo VIII сопровождается взаимными последовательными конформационными превращениями и фермента, и ДНК-субстрата.
- 2) Аминокислотные остатки Leu81 у Endo III и Leu70 у Endo VIII выполняют функцию «сенсора» поврежденного нуклеотида на ранних стадиях узнавания повреждения.
- 3) Аминокислотные остатки Asp138 у Endo III и Glu2 у Endo VIII важны не только для осуществления каталитической реакции, но также играют важную роль в процессе образования фермент-субстратного комплекса.
- 4) ДНК-гликозилазы Endo III и Endo VIII, принадлежащие к разным структурным суперсемействам, имеют общие термодинамические особенности узнавания поврежденного нуклеотида.

Конформационные изменения в молекулах ДНК-гликозилаз в ходе ферментативного процесса были зарегистрированы по изменению интенсивности остатков Trp, входящих в состав ДНК-гликозилаз. Для регистрации конформационных изменений в ДНК-субстратах использовали флуоресцентные аналоги азотистых оснований (2-аминопурин, 1,3-диаза-2-оксофеноксазин) либо FRET-пару FAM/BHQ1. Поскольку узнавание субстратов и их превращение протекает в миллисекундном и секундном диапазонах, для регистрации конформационных изменений и смешивания растворов фермента и субстрата использовали метод «остановленного потока» (stopped-flow), позволяющий смешивать образцы за 1,4 мс. В работе использовали модельные ДНК-субстраты, содержащие в центральной части F-сайт (нерасщепляемый аналог AP-сайта), AP-сайт или 5,6-дигидроуридин. В качестве контроля

неспецифического связывания использовали неповрежденный ДНК-дуплекс (неспецифический лиганд). Усложнение структуры модифицированного нуклеотида позволило установить конформационные превращения, характерные для специфического узнавания субстратов и/или каталитической стадии ферментативного процесса, а также изменения, возникающие на ранних этапах неспецифического связывания ферментов с ДНК. Для определения роли отдельных аминокислотных остатков ферментов в процессах узнавания поврежденного азотистого основания были использованы мутантные формы. В ходе работы проведен анализ взаимодействия мутантных форм фермента Endo VIII, содержащих замены L70S, L70W, Y71W, F121W, F230W или P253W. Кроме того, для установления влияния каталитических аминокислотных остатков на конформационную динамику ферментов и ДНК были использованы мутантные формы, содержащие замены каталитических аминокислотных остатков: Endo III K120A, D138A и Endo VIII E2Q.

Научная новизна работы и практическая значимость работы. В представленной работе произведено кинетическое и термодинамическое исследование взаимодействия двух ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII и их мутантных форм с ДНК-субстратами различной степени специфичности. В работе было показано, что в процессе фермент-субстратного взаимодействия конформационные изменения претерпевают как ферменты, так и ДНК-дуплексы. Сопоставление полученных данных о конформационной динамике молекул ферментов и ДНК-субстратов с известными рентгеноструктурными данными позволили предложить молекулярно-кинетическую модель взаимодействия Endo III и Endo VIII с ДНК, установить роль отдельных аминокислотных остатков в ферментативном процессе, а также определить термодинамические параметры отдельных стадий взаимодействия ферментов с ДНК.

Личный вклад автора. Все описанные в работе результаты получены самим автором или при его непосредственном участии. Автор активно участвовал в анализе полученных результатов и написании статей.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 4 научные статьи, индексируемые в базах Web of Science и Scopus.

Результаты диссертации были представлены на конференциях: VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015), «45th Meeting of the EEMGS» (Копенгаген, Дания, 2016), «42nd FEBS Congress» (Иерусалим, Израиль, 2017), VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Москва, 2017), «43rd FEBS Congress» (Прага, Чехия, 2018), 11 Международная мультikonференция по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (Новосибирск, 2018).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов, их обсуждения, заключения и списка литературы. Работа изложена на 131 странице, содержит 56 рисунков, 22 схемы и 18 таблиц. Библиография включает 196 литературных источников.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Повреждения ДНК

ДНК является реакционноспособным соединением, способным к окислению, алкилированию, самопроизвольному гидролизу и другим химическим превращениям [20]. Различные эндогенные факторы, а также экзогенные химические агенты окружающей среды, ионизирующее и УФ-излучение могут приводить к повреждению ДНК [21, 22]. Все эти факторы приводят к возникновению огромного спектра модифицированных нуклеотидов, отличающихся как по своей химической природе, так и по структуре [23, 24].

Внедрение dUMP в процессе репликации и спонтанное дезаминирование цитозина может приводить к возникновению урацила в ДНК [25–27]. Гидролитическое дезаминирование цитозина приводит к появлению от 70 до 200 урацилов в ДНК в день [20]. Несмотря на то, что количество остатков урацила в геномной ДНК достаточно мало, появляющиеся пары U:G являются мутагенными, поскольку в ходе репликации приводят к трансверсии C:G → T:A [27].

Пуриновые и пиримидиновые основания в ДНК окисляются активными формами кислорода, которые образуются внутри клетки, как в ходе собственного метаболизма, так и под действием различных факторов, например, ионизирующей радиации или некоторых химических агентов, что может приводить к их повреждению [28–31]. Из четырех оснований ДНК гуанин имеет самый низкий окислительно/восстановительный потенциал, и поэтому является самым легко окисляемым азотистым основанием, что приводит к образованию 8-оксо-8-охоG в окислительных условиях, и 2,6-диамино-4-гидрокси-5-формапидопиримидина (ФаруG) в щелочных условиях [32, 33]. Образовавшийся 8-охоG в ДНК также имеет потенциал окисления ниже, чем оставшиеся четыре азотистых основания ДНК, и может быть окислен далее, до спироиминодигидантоина (Sp) и гуанидинодигидантоина (Gh) [33]. Не смотря на то, что данное повреждение практически не блокирует репликативные ДНК-полимеразы, за исключением ДНК полимеразы-йота [34], его образование в ДНК может приводить к возникновению мутаций. Чаще всего такими мутациями являются трансверсии G:C → T:A, поскольку при синтезе ДНК репликативные либо репаративные ДНК-полимеразы встраивают напротив 8-охоG dAMP либо dCMP [35]

Окисление аденина активными формами кислорода может приводить к образованию 8-оксо-7,8-дигидроаденина (8-охоA), 4,6-диамино-5-формапидопиримидина (ФаруA), и 2-гидроксиаденина [31, 36]. Повреждение ФаруA присутствует как в нормальных, так и в опухолевых тканях [37], и является наиболее частным продуктом окисления аденина при γ -облучении [38].

Основным продуктом окисления цитозина является 5-гидроксицитозин, который образуется в ДНК как спонтанно, так и под действием перекиси водорода или схожих окислительных агентов [31]. 5-гидроксицитозин также может возникать при дегидратации 2-дезоксцитидин гликоля. Кроме того 5-гидроксицитозин может подвергаться дезаминированию и приводить к образованию 5-гидроксиурацила [27].

Одним из наиболее изученных продуктов окисления тимина является тимингликоль [39–42]. Тимингликоль образуется под действием гидроксил радикалов по двойной связи тимина в С5 либо С6 позиции [43]. Тимингликоль может блокировать некоторые репликативные ДНК-полимеразы человека, не способные осуществлять синтез через повреждение [44–47]. Помимо тимингликоля его окисленные аналоги включают в себя 5-гидрокси-5,6-дигидротимин и 5,6-дигидротимин.

Другим модифицированным гетероциклическим основанием, обнаруженным в тканях мышей и человека является 5-гидроксиметилцитозин, являющийся окисленной формой 5-метилцитозина [48]. Дезаминирование 5-гидроксиметилцитозина приводит к возникновению 5-гидроксиметилурацила [49].

Алкилирующие агенты присутствуют как в окружающей среде, так и возникают внутри клетки. Например, кофермент многих биологических реакций S-аденозилметионин может вызывать возникновение таких алкилированных производных гетероциклических оснований как 7-meG и 3-meA [50]. Чаще всего сайтами модификации в гетероциклических основаниях становятся атомы кислорода и азота, также алкилирование может происходить и по атомам кислорода, входящих в состав фосфатных групп в ДНК. Тип возникающего продукта алкилирования зависит от того, в каком положении в ДНК либо в РНК находится гетероциклическое основание, и какой агент на него воздействует. Алкилированные нуклеотиды являются мутагенными и цитотоксичными. В основном алкилирование по атомам кислорода (например O⁶-алкилгуанин, O⁴-алкилтимин) мутагенно и цитотоксично, в то время как N-алкилированные производные (например N³-алкиладенин и N¹-алкиладенин) являются цитотоксичными, но не приводят к возникновению мутаций [51]. Кроме того, окисление жирных кислот может приводить к возникновению различных продуктов распада [52], каждый из которых может непосредственно реагировать с ДНК, вызывая возникновение мутагенных и цитотоксичных повреждений. Такими повреждениями ДНК являются этено-производные гетероциклических оснований: 1,N⁶-этенoadенин, 3,N⁴-этенocитозин, N²,3-этенoгуанин и 1,N²-этенoгуанин. Установлено, что алкилированное производное гуанина, 1,N²-этенoгуанин, является мутагенным [53, 54]. Поврежденное основание 1,N⁶-этенoadенин образуется в ДНК после взаимодействия аденина с метаболитом винилхлорида – хлороацетальдегидом [53, 54].

Повреждение азотистых оснований ДНК может повлиять на свойства комплементарной пары, что в свою очередь может привести к нарушению стабильности генома [1]. Поэтому такие повреждения должны быть удалены из ДНК до репликации. Все упомянутые выше повреждения, возникающие в ДНК, являются субстратами для различных ферментативных систем репарации ДНК, появившихся в процессе эволюции для поддержания стабильности геномной информации.

1.2. Типы репарации ДНК

Системы репарации ДНК, затрагивающие повреждения гетероциклических оснований либо нуклеотидов, можно разделить на пять различных типов: прямая репарация поврежденных нуклеотидов, эксцизионная репарация оснований (base excision repair, BER), эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER), инцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide incision repair, NIR) и репарация мисматчей (mismatch repair, MMR).

К наиболее простым способам репарации поврежденных нуклеотидов относится их фотореактивация при участии особого фермента – ДНК-фотолиазы. ДНК-фотолиаза узнает и специфично связывается с циклобутановыми пиримидиновыми димерами, возникающими под действием ультрафиолетового света [55–57]. Облучение комплекса фермента с повреждением светом с длиной волны от 300 до 500 нм приводит к активации фермента и возвращению пиримидинового димера в мономерную форму [58, 59]. Еще одним примером непосредственной репарации поврежденного азотистого основания служит деметилирование ферментом O⁶-алкилгуаниналкилтрансферазой (AGT), которая переносит алкильную группу с Об атома гуанина на собственный аминокислотный остаток цистеина фермента [59]. Прямое деметилирование N¹-метиладенина и 3-метилцитозина осуществляется под действием фермента AlkB из *E.coli* [60, 61] и ферментами AHN2 и AHN3 у человека [62].

Повреждения ДНК, которые затрагивают только одиночные гетероциклические основания без значительного изменения структуры двойной спирали ДНК, наиболее часто удаляются системой эксцизионной репарации оснований. Субстратами для ферментов BER являются продукты дезаминирования, окисления и алкилирования азотистых оснований [49, 63]. Первый этап репарации катализируется ферментами ДНК-гликозилазами, которые расщепляют N-гликозидную связь между гетероциклическим основанием и 2'-дезоксирибозой. ДНК-гликозилазы обеспечивают несколько основных функции BER: нахождение повреждения, его распознавание и удаление. Второй ферментативный этап в BER катализируется AP-эндонуклеазой, которая распознает AP-сайт, являющийся одним из продуктов действия ДНК-гликозилаз, и расщепляет фосфодиэфирную связь с 5'-стороны от повреждения, тем самым

образуя необходимый 3'-ОН для ресинтеза ДНК [64]. Затем репарационные ДНК-полимеразы встраивают корректный нуклеотид, и ДНК-лигазы завершают ферментативный путь, восстанавливая целостность дезоксирибозо-фосфатного остова.

АР-эндонуклеаза также участвует в альтернативном пути удаления окисленных азотистых оснований – инцизионной репарации оснований (NIR) [65], при котором АР-эндонуклеаза непосредственно удаляет поврежденное основание, внося разрыв в ДНК с образованием на концах 3'-гидроксильной и 5'-фосфатной групп. Таким путем могут удаляться, например, 5,6-дигидроуридин, 5,6-дигидротимидин, α -аденозин и α -тимидин [66–68].

Повреждения ДНК, содержащие объемные заместители, такие как аддукты бензопирена, и повреждения, вызванные кросс-сшивками внутри цепей ДНК под действием ультрафиолетового света, обычно удаляются системой эксцизионной репарации нуклеотидов. В отличие от системы BER, которая инициируется специализированными ДНК-гликозилазами, удаляющими необъемные поврежденные азотистые основания, в системе NER белки, распознающие повреждение, не обладают нуклеазной или гликозилазной активностью и не могут удалять повреждение напрямую. Вместо этого узнавание поврежденного участка приводит к привлечению специальных нуклеаз, удаляющих от 12 до 30 нуклеотидов, включая поврежденный [69]. Проблема поиска различных повреждений, не обладающих общей структурой или химической природой, в NER является более сложной. Для распознавания и удаления повреждений в системе NER у *E. coli* нужны, по крайней мере, три белка (UvrA, UvrB, UvrC), и более десятка белков у человека [70]. В отличие от ДНК-гликозилаз и АР-эндонуклеаз, которые являются консервативными ферментами практически у всех организмов, бактериальные и эукариотические белки NER не обладают заметной гомологией.

В пути репарации мисматчей MMR в основном удаляются нуклеотиды не правильно встроенные ДНК-полимеразой в процессе репликации, тем самым MMR повышает общую точность репликации. Схожим образом с BER и NER, в MMR используется набор белков с широкой субстратной специфичностью для удаления всех возможных мисматчей [71–73]. Так же, как и в NER, белок, распознающий мисматч не обладает ферментативной активностью по отношению к ДНК, и его роль заключается в привлечении эндо- и экзонуклеаз для удаления новой синтезированной дочерней цепи ДНК, а не матричной цепи, тем самым приводя к удалению ошибок в процессе репликации ДНК [74]. Задачами MMR являются распознавание «повреждения», которым, в данном случае, может быть любой из четырех природных нуклеотидов, и репарация дочерней цепи ДНК.

1.3. Эксцизионная репарация оснований

Необъемные модифицированные азотистые основания ДНК удаляются путем эксцизионной репарации оснований [75]. ДНК-гликозилазы являются первыми ферментами на этом пути, которые ответственны за нахождение и удаление поврежденных оснований ДНК. ДНК-гликозилазы распознают поврежденное гетероциклическое основание среди огромного числа неповрежденных. Поскольку модифицированные гетероциклические основания представляют собой химически различные структуры, большинство организмов имеют несколько ДНК-гликозилаз для того, чтобы защитить свой геном от всего спектра возможных повреждений. Сложно представить такую ситуацию, в которой для каждого повреждения нашелся бы один единственный фермент, способный его распознать и удалить, что привело бы к появлению огромного количества ферментов. Напротив, оказалось, что многие ДНК-гликозилазы имеют специфичность к ряду субстратов [76].

Путь эксцизионной репарации был открыт более 40 лет назад при поиске фермента, который бы катализировал удаление урацила, образующегося в ДНК. Впервые ферментативная активность по удалению урацила из ДНК и его высвобождение в качестве свободного гетероциклического основания была обнаружена в клетках *E. coli* [77]. В последующем времени другими группами исследователей было продемонстрировано, что урацил-ДНК-гликозилаза, отвечающая за удаление урацила из ДНК, представляет собой консервативный фермент репарации ДНК, который представлен в большинстве организмов [78].

Первой обнаруженной ДНК-гликозилазой, обладающей субстратной специфичностью к окисленным пиримидинам, была Endo III (Nth). Эта ДНК-гликозилаза была открыта в *E. coli*, основываясь на способности этого фермента узнавать повреждения ДНК, вызванные радиацией [79]. Позднее было показано, что субстратами для Endo III и его гомолога у человека NTHL1 являются различные модифицированные пиримидины [80–84].

Формаидопиримидин-ДНК-гликозилаза, или Fpg, была следующей ДНК-гликозилазой открытой в *E. coli* [33] и была выделена как отдельный фермент благодаря своей способности удалять формаидопиримидины из ДНК. Fpg также удаляет 8-охоG и дальнейшие продукты окисления 8-охоG – Sp и Gh, когда они расположены напротив цитозина [85]. Fpg является единственным ферментом в *E. coli*, ответственным за удаление 8-охоG. Он также был найден в растениях и некоторых грибах [86]. Тем не менее, для удаления 8-охоG млекопитающие используют другой фермент, названный 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой OGG1, и структурно отличающийся от Fpg.

Еще одна ДНК-гликозилаза – Endo VIII (Nei) была обнаружена значительно позднее [87] и имеет перекрытие субстратной специфичности с Endo III, а также с Fpg. Endo VIII и его

гомологи у человека – ДНК-гликозилазы группы NEIL распознают широкий спектр модифицированных пиримидинов, формадинопириимидинов, Sp и Gh [88–91]. Становится очевидным, что ДНК-гликозилазы, которые узнают и удаляют окисленные основания ДНК, обладают широкой субстратной специфичностью.

По типу катализируемой реакции ДНК-гликозилазы разделяются на два класса: монофункциональные и бифункциональные. Монофункциональные ДНК-гликозилазы гидролизуют N-гликозидную связь, используя активированную молекулу воды для нуклеофильной атаки, с образованием AP-сайта в качестве конечного продукта, который в дальнейшем узнается AP-эндонуклеазами. Бифункциональные ДНК-гликозилазы гидролизуют N-гликозидную связь, высвобождая модифицированное основание с образованием AP-сайта. При этом бифункциональные ДНК-гликозилазы могут использовать различные аминокислотные остатки, например Lys или Pro, в качестве нуклеофила, для удаления основания, и образования ковалентного интермедиата – основания Шиффа с субстратом. В ходе этой реакции в AP-сайте происходит разрыв 3'-фосфодиэфирной связи (AP-лиазная активность) путем β -элиминирования с образованием с 3'-стороны одноцепочечного разрыва и остатка 2,3-ненасыщенного 4-гидрокси-2-пентенала и свободного фосфата на 5'-конце. Некоторые ДНК-гликозилазы, например Fpg и Endo VIII, осуществляют реакцию β , δ -элиминирования, что приводит к образованию разрыва в ДНК с 3'- и 5'-фосфатными группами на концах [92].

Путь эксцизионной репарации оснований ДНК предполагает наличие как минимум четырех основных ферментов [93]. Такими ферментами являются ДНК-гликозилазы, AP-эндонуклеаза, ДНК-полимераза и ДНК-лигаза. Последовательное действие этих ферментов приводит к удалению поврежденного нуклеотида и его замене на неповрежденный. В настоящее время общепринятая модель пути эксцизионной репарации оснований включает в себя пять основных ферментативных стадий для репарации поврежденного гетероциклического основания. Первым шагом BER является распознавание поврежденного азотистого основания ДНК-гликозилазой. После распознавания повреждения соответствующей ДНК-гликозилазой, этот фермент катализирует разрыв N-гликозидной связи, что приводит к эффективному удалению поврежденного основания и образованию AP-сайта. Дезоксирибозо-фосфатный остов ДНК расщепляется либо AP-эндонуклеазой, либо ДНК-гликозилазами, обладающими AP-лиазной активностью. AP-эндонуклеаза катализирует образование одноцепочечного разрыва в ДНК с 5'-стороны от AP-сайта. Примечательно, что ДНК-гликозилазы, обладающие AP-лиазной активностью, образуют одноцепочечный разрыв в ДНК с 3'-стороны от AP-сайта. Образовавшийся разрыв является субстратом для AP-эндонуклеазы, которая катализирует образование однонуклеотидного пропуска в ДНК. Стоит отметить, что такой разрыв содержит 3'-гидроксильную группу и 5'-фосфатную группу. Такие группы являются субстратами для

ферментов, которые далее принимают участие в пути BER. ДНК-полимераза присоединяет комплементарный нуклеотид и ДНК-лигаза завершает репарационный процесс лигированием концов ДНК. Позднее в работе [94] продемонстрировали, что ДНК-полимераза β катализирует высвобождение 5'-концевого дезоксирибофосфатного остатка (dRP), образующегося при расщеплении AP-сайта AP-эндонуклеазой. Поэтому ДНК-полимераза β катализирует две необходимых для BER реакции: она использует свою ДНК-полимеразную активность для заполнения однонуклеотидного пропуска, а также dRP-лиазную активность для гидролиза фосфодиэфирной связи, для того чтобы подготовить подходящий субстрат для лигирования [95, 96]. Однонуклеотидный короткозаплаточный путь завершается действием ДНК-лигазы 3 (LIG3) [94, 97].

Также была описана альтернативная форма BER, названная длиннозаплаточным путем [97]. В длиннозаплаточном пути после действия AP-эндонуклеазы APE1 и образования разрыва с 5'-стороны от AP-сайта в процессе участвуют ДНК-полимеразы β или δ , PCNA, флэп-эндонуклеаза I (FEN1) и, возможно, репликативная ДНК-лигаза 1 (LIG1). В PCNA-зависимом комплексе, POL β катализирует присоединение от 5 до 10 нуклеотидов, тем самым вытесняя старую цепь ДНК вновь синтезированной. Это приводит к образованию флэп-структуры, которая является субстратом флэп-эндонуклеазы FEN1 [98]. FEN1 катализирует удаление нависающей ДНК-цепи, синтезированной POL β . После открытия длиннозаплаточного пути BER, он также был воссоздан с использованием очищенных ферментов человека. Реконструирование длиннозаплаточного пути BER показало необходимость участия фермента FEN1, который не является необходимым при короткозаплаточном пути BER [93, 99].

Механизм выбора между короткозаплаточным и длиннозаплаточным путем в настоящее время не установлен. Существуют несколько гипотез переключения с одного пути на другой. Переход от короткозаплаточного пути на длиннозаплаточный может зависеть от концентрации АТФ вблизи AP-сайта, которая частично модулируется LIG3 и белком XRCC1 [99]. Было показано, что длиннозаплаточный путь BER происходит чаще при низких концентрациях АТФ, в то время как короткозаплаточный путь BER является более предпочтительным при повышенных концентрациях АТФ. Также было показано, что если dRP может эффективно удаляться под действием POL β , эксцизионная репарация оснований идет по короткозаплаточному пути. В случае, если dRP по какой-либо причине не удален с 5'-конца разрыва, BER идет по длиннозаплаточному механизму.

1.4. Структурные суперсемейства ДНК-гликозилаз

Все ДНК-гликозилазы можно классифицировать несколькими различными способами. На основании ферментативной активности ДНК-гликозилазы можно разделить на моно- и бифункциональные. Широкий спектр повреждений, возникающих в ДНК, дает возможность разделить ДНК-гликозилазы по субстратной специфичности. Ещё одним вариантом классификации, наиболее удачным с точки зрения поиска общих закономерностей узнавания поврежденных нуклеотидов, является разделение ДНК-гликозилаз по типу их структурной организации.

1.4.1. Суперсемейство урацил-ДНК-гликозилазы

Суперсемейство урацил-ДНК-гликозилазы включает в себя различные ферменты, из которых на сегодняшний день наиболее изученными являются представители структурных семейств UNG, Mug/TDG и ssUNG/SMUG, представленные в клетках эукариот. Урацил-ДНК-гликозилазы являются достаточно консервативными ферментами, тем не менее, гомология последовательности у данных ферментов является достаточно низкой за исключением коротких консервативных мотивов, образующих активный центр ферментов. Все урацил-ДНК-гликозилазы содержат характерный домен, состоящий из четырех центральных параллельных β -складок, находящихся по крайней мере, между двух α -спиралей с каждой стороны [100–105]. Петли, соединяющие эти элементы, содержат аминокислотные остатки, которые связываются с фосфатными группами в ДНК, образуют активный центр и карман, в котором располагается поврежденное основание.

Наиболее представленными ферментами из данного структурного суперсемейства являются урацил-ДНК-гликозилазы принадлежащие к семейству UNG (ферменты Ung в *E. coli*, Ung1p в дрожжах, UNG у человека). Данные ферменты являются высокоспецифичными по отношению к урацилу, и практически не удаляют его другие модификации [106]. Урацил-ДНК-гликозилазы связывают урацил в специальном сайте, образованном консервативными аминокислотными остатками, что обеспечивает уникальную селективность при удалении урацила. В отличие от ферментов семейства UNG, способных удалять урацил, расположенный напротив любого азотистого основания, ферменты структурного семейства Mug/TDG проявляют специфичность к урацилу и тимину, расположенным напротив гуанина [105, 107, 108]. Было показано, что фермент человека TDG способен удалять тимин из пар T:G, T:C и T:T [109], а так же бром-урацил из пары с гуанином [110]. Бактериальный фермент Mug преимущественно удаляет урацил из пары с гуанином, но при высоких концентрациях также способен удалять тимин из пары с гуанином [111].

Еще одним семейством урацил-ДНК-гликозилаз является структурное семейство ДНК-гликозилазы SMUG1 (single-strand specific monofunctional uracil-DNA-glycosylase). Ферменты из данного семейства были обнаружены только в клетках эукариот [103, 104, 112]. Первоначально, данные ферменты были описаны как специфичные по отношению к урацилу, расположенному в одноцепочечной ДНК. Позднее, было показано, что предпочтительным субстратом является двуцепочечная ДНК, если в системе присутствует AP-эндонуклеаза, которая способна стимулировать число оборотов фермента [104]. SMUG1 также удаляет 5-гидроксиметилурацил, 5-формилурацил и 5-гидроксиурацил из ДНК [49].

1.4.2. Суперсемейство HhH

ДНК-гликозилазы структурного суперсемейства спираль-шпилька-спираль обладают различной субстратной специфичностью, механизмом катализа и аминокислотными остатками, участвующими в удалении поврежденного основания. Несмотря на это, широкая группа ДНК-гликозилаз была объединена наличием структурного мотива HhH. Данный мотив был впервые обнаружен в Endo III [113]. Было показано, что аминокислотные остатки из HhH-мотива связываются с ДНК независимо от её последовательности. На сегодняшний момент известно множество структур HhH-содержащих ДНК-гликозилаз [114–117]. Было показано, что HhH-мотив участвует в распознавании ДНК через взаимодействия с фосфатной группой и атомами кислорода цепи ДНК [118]. HhH-мотив также был обнаружен в ряде других белков, которые связываются с ДНК и не обладают специфичностью к какой-либо определённой последовательности. Кор HhH-содержащих гликозилаз состоит из двух α -спиральных N- и C-концевых доменов, между которыми образуется бороздка, в которой связывается ДНК. HhH-содержащие ДНК-гликозилазы могут содержать в своей структуре большое число небольших добавочных элементов, таких как железо-серусодержащий кластер [4Fe-4S] у Endo III, MutY (аденин-ДНК-гликозилаза) и Mig (тимин-ДНК-гликозилаза), домен MutT-типа в ферменте MutY, домен «цинковый палец» в TAG, и метил-CpG-связывающий домен в MBD4.

Согласно филогенетическому анализу геномов различных организмов суперсемейство HhH было разделено на несколько структурных семейств ДНК-гликозилаз с близкой структурной гомологией [119]. Ферменты структурных семейств Endo III и MutY/Mig, а также некоторые ферменты семейства Mrg II, могут содержать железо-серусодержащий кластер [4Fe-4S] [120–122]. Ферменты структурного семейства Endo III обладают субстратной специфичностью к окисленным пиримидинам [107]. Необходимо отметить, что у бактерий субстратной специфичностью к окисленным пиримидинам обладают еще два фермента Fpg и

Endo VIII, однако они принадлежат другому структурному суперсемейству H2tH, и организация этих ДНК-гликозилаз значительно отличается от структуры Endo III [101].

Семейство AlkA включает ферменты, отвечающие за удаление алкилированных пуринов: 3-метиладенин-ДНК-гликозилазу I (Tag) [123] и 3-метиладенин-ДНК-гликозилазу II (AlkA) [124]. Фермент Tag удаляет только 3-метиладенин, в то время как AlkA обладает широкой субстратной специфичностью. Помимо 3-метиладенина AlkA может удалять 3-meA, 7-meG, O²-метилтимин и O²-метилцитозин. AlkA также распознает N²-3-этенуанин, 5-гидроксиметилурацил, гипоксантин и 5-формилурацил [124].

В клетках эукариот алкилированные гетероциклические основания ДНК, такие как 3-метиладенин, 3-метилгуанин, 7-метилгуанин, удаляет фермент AAG (алкиладенин-ДНК-гликозилаза) [54, 125]. Фермент AAG принадлежит к структурному семейству 3-метиладенин-ДНК-гликозилаз, который значительно отличается от других ферментов [116, 126]. AAG состоит из одного домена со смешанной α - β структурой, который образован семью α -спиралями и восьмью β -складками. Центр фермента состоит из изогнутого антипараллельного β -листа и α -спирали α B, которая внедряется в малую бороздку ДНК при образовании фермент-субстратного комплекса [116].

Структурное семейство MutY/Mig представлено различными ферментами. Ферменты MutY удаляют аденин из пары A:8-охоG и встречается в различных организмах (MUTYH у человека), но отсутствует у *S. cerevisiae* [119]. В структуре MutY содержатся все мотивы, характерные для Endo III [100]. Фермент MUTYH человека также удаляет аденин из пары с 8-охоG более эффективно, чем из пары с гуанином или цитозином [127]. Ферменты Mig являются ДНК-гликозилазами архей, удаляющими тимин либо урацил, в паре с гуанином [128–130]. Такая ферментативная активность является аналогичной подсемейству Mug/TDG урацил-ДНК-гликозилаз, что демонстрирует тот факт, что одинаковой субстратной специфичностью могут обладать ферменты, принадлежащие к абсолютно разным структурным суперсемействам. Это утверждение может быть применено и к представителям четвертого подсемейства MrgII, найденным в нескольких видах бактерий и специфичных к алкилированным пуринам [131].

Ферменты структурного семейства OGG удаляют 8-охоG из ДНК и представлены во всех царствах живых организмов [119]. Эти ферменты можно разделить на 3 группы: OGG1, OGG2 и AGOG [132]. Большинство ферментов группы OGG1 представлено в эукариотах, но, не смотря на это, некоторые ферменты этой группы были обнаружены в бактериях, например в *F. phylum* [119]. Ферменты группы OGG2 были обнаружены в бактериях и археях, в то время как ферменты группы AGOG представлены только в археях. Несмотря на низкую гомологию последовательностей ферментов данного структурного семейства, все они содержат в своей структуре общий мотив HhH, схожее строение активного сайта и консервативные

каталитические аминокислотные остатки, что может говорить о схожем каталитическом механизме [133].

1.4.2.1. Структурные особенности эндонуклеазы III

Endo III из *E. coli* кодируется геном *nth* и является ферментом репарации ДНК, способным к удалению пиримидинов, подвергшихся окислительному повреждению. Endo III был вначале охарактеризован как фермент, обладающий нуклеазной активностью, и образующий одноцепочечный разрыв в двойной цепи ДНК, поврежденной УФ-излучением [134, 135]. В дальнейших исследованиях было показано, что Endo III обладает широкой субстратной специфичностью и наиболее активен по отношению к окисленным пиримидинам, таким как тимингликоль [136, 137]. Endo III является бифункциональной ДНК-гликозилазой, обладающей двумя типами активности: N-гликозилазной и AP-лиазной [138]. Было показано, что удаление поврежденного основания и последующая реакция β-элиминирования связаны с наличием в активном центре остатка Lys120 [139]. Создание мутантных форм ферментов подтвердило участие этого остатка как при осуществлении N-гликозилазной, так и AP-лиазной активностей. Кроме того, для осуществления катализа необходим еще один аминокислотный остаток – Asp138.

Endo III представляет собой вытянутую молекулу массой 23,4 кДа, с преимущественно α-спиральной вторичной структурой (рисунок 1) [114]. Фермент содержит 211 аминокислотных остатков, которые разделены практически поровну между двумя глобулярными доменами. Аминокислотные остатки с 22 по 132 образуют шестиспиральный домен. Остатки с 1 по 21 и с 133 по 211 образуют [4Fe-4S] кластер, в котором ионы железа координируют четыре консервативных остатка цистеина. Этот кластер не участвует в процессе гидролиза N-гликозидной связи и дальнейшей реакции β-элиминирования, но есть предположения, что он выполняет структурную функцию, ориентируя остаток поврежденного азотистого основания при связывании с ДНК.

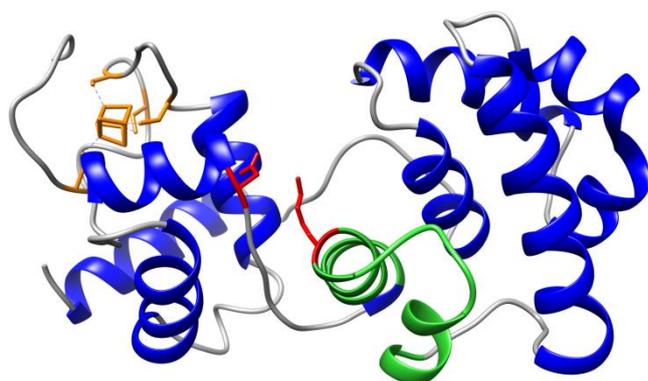


Рисунок 1. Структура фермента Endo III из *E. coli*. В структуре выделены α-спирали (синий), консервативный мотив HhH (зеленый), [4Fe-4S] кластер (оранжевый) и каталитически активные аминокислотные остатки Lys120 и Asp138 (красный) (PDB ID: 2ABK).

Шестиспиральный домен Endo III образован шестью антипараллельными α -спиралями ($\alpha B - \alpha G$), имеющими тесные контакты между собой. Спираль αD содержит две части, состоящие из семи аминокислотных остатков, изогнутых под углом 60° . Спирали αF и αG образуют дополнительный слой, а αB расположена в центре остальных пяти спиралей.

Железо-серусодержащий кластер фермента Endo III образован четырьмя α -спиралями. N-концевая спираль αA укладывается с тремя C-концевыми спиралью αH , αI и αJ примерно под 90° , образуя четырех-спиральный домен, содержащий $[4Fe-4S]$ кластер. Три C-концевых спирали соединяются короткими петлями. Лигандами $[4Fe-4S]$ кластера являются аминокислотные остатки цистеинов 187, 194, 197 и 203, расположенные в коротком фрагменте (17 аминокислотных остатков), который в свою очередь включен в протяженную последовательность, образующую вокруг $[4Fe-4S]$ кластера правозакрученную спираль. Последовательность (Cys- X_6 -Cys- X_2 -Cys- X_5 -Cys) не похожа на какую-либо другую последовательность для Fe-S содержащих белков с известной структурой. В Endo III железо-серусодержащий кластер не участвует в окислительно-восстановительных превращениях. В данном случае, это редкий пример того, как железо-серусодержащий кластер служит для стабилизации белковой структуры.

Шести-спиральный домен и $[4Fe-4S]$ кластер ковалентно связаны друг с другом вытянутой петлей, содержащей 12 аминокислотных остатков (с 17 по 28). Во взаимодействии между этими двумя доменами не принимают участие ароматические аминокислоты, а основными взаимодействиями являются водородные связи и солевые мостики.

HhH мотив состоит из двух α -спиралей (рисунок 1), которые пересекаются под углом и связаны β -шпилькой. В большинстве HhH-содержащих ДНК-гликозилаз с известной структурой петля со шпилькой имеет консервативную последовательность L/F-P/K/H-G-V-I-G-K-R-T [118].

На сегодняшний момент получены кристаллические структуры Endo III из *E. coli* в свободной форме и Endo III из *G. stearothermophilus* в комплексе с ДНК (рисунок 2) [114, 140], чьи последовательности совпадают на 43% [113]. Было показано, что под действием фермента ДНК изгибается примерно на 55° , кроме того происходит сближение доменов фермента.

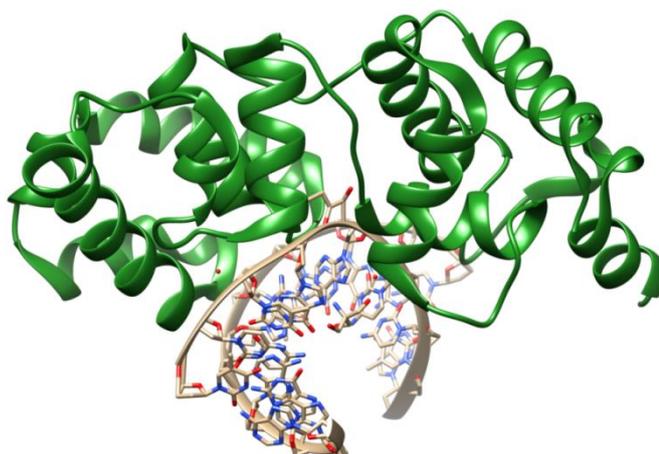


Рисунок 2. Структура Endo III из *G. stearothermophilus* в комплексе с ДНК (PDB ID: 1ORN).

Фермент образует множественные контакты как с цепью ДНК, содержащей повреждение, так и с комплементарной цепью, причем Endo III взаимодействует преимущественно с фосфатными группами, расположенными с обеих сторон от повреждения (аминокислотные остатки Gln42, Asp45, Thr140, His141, Arg186) (рисунок 3). Также было показано, что, как и многие другие ДНК-гликозилазы, Endo III встраивает аминокислотные остатки внутрь ДНК-дуплекса [140–142]. У фермента из *G. stearothermophilus* такими аминокислотными остатками являются Gln42, Ile80 и Leu82. Помимо этого, нуклеотид, содержащий повреждение, выворачивается из двойной спирали ДНК, а гетероциклическое основание помещается в активный центр фермента.

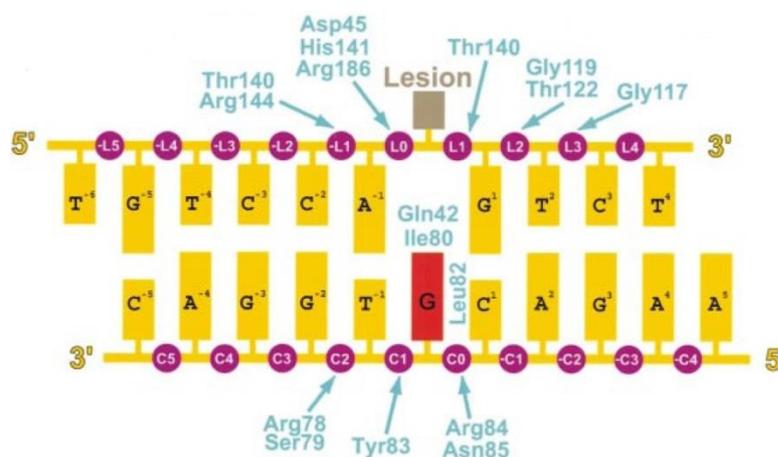


Рисунок 3. Схема контактов аминокислотных остатков Endo III из *G. stearothermophilus*, образующихся при связывании фермента с ДНК [140].

Значительным отличием Endo III от белков других семейства HhN является то, что Endo III взаимодействует с остовом обеих цепей ДНК, а не только с той, которая содержит повреждение, как в случае других ферментов из этого семейства, например AlkA и hOGG1. Все эти ферменты, включая Endo III, помещают спираль (αE) так, что положительно заряженный

конец спирали может образовывать электростатические взаимодействия с отрицательно заряженным остовом цепи ДНК, не содержащей повреждения. Дополнительные взаимодействия осуществляются с помощью остатков аминокислот Arg78, Ser79, Tyr83, Arg84 и Asn85 (рисунок 4).

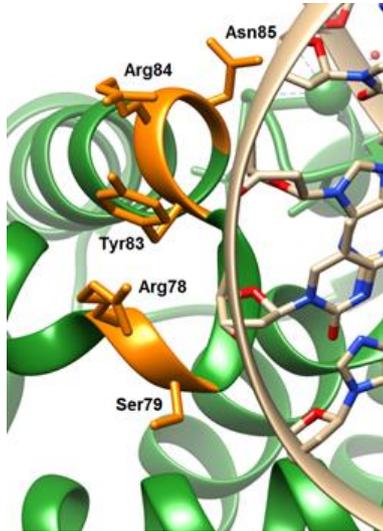


Рисунок 4. Контакты аминокислотных остатков с неповрежденной цепью ДНК (PDB ID: 1ORN).

Все HhN белки внедряют аминокислотные остатки со стороны N-конца α E спирали в ДНК-дуплекс, взаимодействуя с основанием, расположенным напротив повреждения. В Endo III из *G. stearothermophilus* таким остатком является Leu81. Одной из характеристик ДНК-гликозилаз является способность фермента выворачивать поврежденный нуклеотид из дуплекса ДНК в свой активный центр. ДНК-гликозилазы суперсемейства HhN внедряют аминокислотные остатки, расположенные в петле α B- α C, в ДНК-спираль, для стабилизации внеспирального положения поврежденного нуклеотида. В Endo III такую роль играет остаток Gln42. Амидная группа Gln42 осуществляет стэкинг с поврежденным основанием с 3'-стороны и образует водородные связи с остатком 2'-дезоксирибозы (рисунок 5).

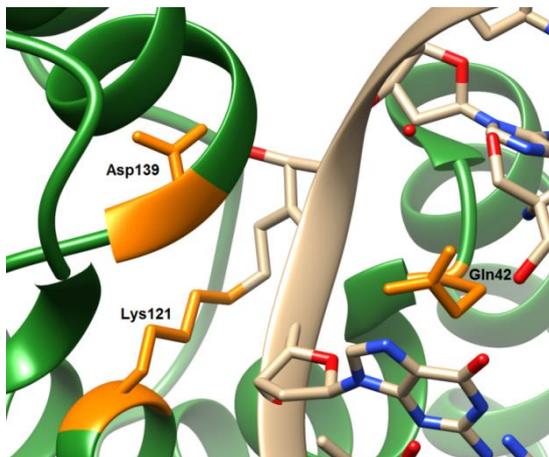


Рисунок 5. Структура ковалентного интермедиата Endo III с ДНК, содержащей AP-сайт (PDB ID: 1ORN).

Исходя из данных о кристаллической структуре, можно сделать вывод, что при связывании Endo III с ДНК происходят структурные перестройки в обоих биополимерах. Однако рентгеноструктурный анализ не даёт ответа на вопрос, каким образом происходят эти

изменения, какова последовательность встраивания аминокислотных остатков в ДНК-дуплекс и какое количество стадий необходимо для достижения конформации фермента и ДНК, необходимой для катализа.

Каталитически активным аминокислотным остатком является Lys120, ϵ -NH₂-группа которого атакует С1'-атом 2'-дезоксирибозы приводя к образованию ковалентного интермедиата – основания Шиффа и замещению поврежденного основания (рисунок 6). Далее происходит реакция β -элиминирования и разрыв дезоксирибозо-фосфатного остова. Последующий гидролиз фермент-субстратного комплекса приводит к высвобождению фермента и образованию одноцепочечного разрыва в ДНК-дуплексе с 2,3-ненасыщенным 4-гидрокси-2-пентеналем на 3'-конце и фосфатной группой на 5'-конце.

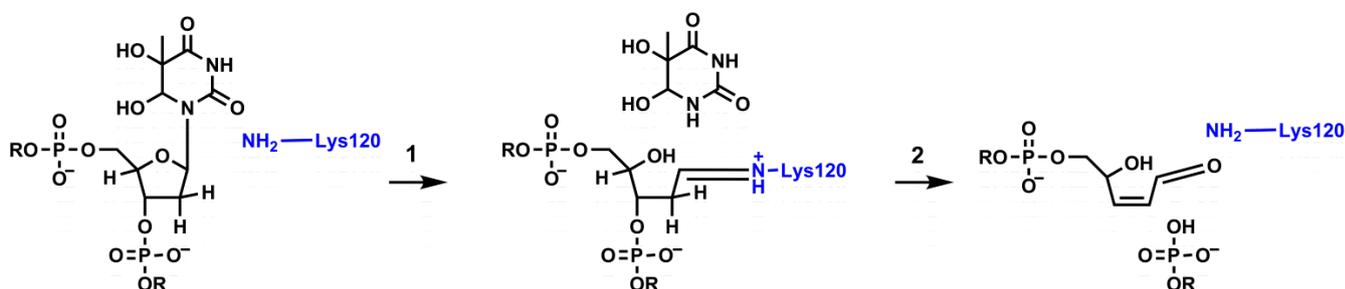


Рисунок 6. Химические стадии процесса катализа Endo III (стадия 1: гидролиз N-гликозидной связи и удаление поврежденного основания с образованием основания Шиффа; стадия 2: β -элиминирование 3'-фосфатной группы).

1.4.3. Суперсемейство Fpg/Nei

Последним структурным суперсемейством ДНК-гликозилаз является суперсемейство Fpg/Nei, представленное в клетках *E.coli* двумя ферментами – Fpg и Endo VIII [143]. У человека к представителям данного структурного суперсемейства относятся ферменты NEIL1, NEIL2 и NEIL3 [144–147], являющиеся структурными гомологами Endo VIII. Члены данного суперсемейства имеют несколько схожих структурных мотивов, необходимых для связывания ДНК и катализа, таких как N-концевая PE-спираль, мотив спираль-два поворота-спираль (H2tH), и ДНК-связывающий домен типа «цинковый палец» (Cys-X₂-Cys-X₁₆-Cys-X₂-Cys). Особенностью ДНК-гликозилаз суперсемейства Fpg/Nei является удаление преимущественно окисленных гетероциклических оснований. На сегодняшний день известно, что ферменты Endo VIII и Fpg обладают субстратной специфичностью более чем к двадцати различным повреждениям. Тем не менее, наличие активности по отношению к некоторым субстратам была обнаружена только на олигонуклеотидных моделях, но не для геномной ДНК.

Фермент Fpg (MutM) представляет собой белок массой 30,2 кДа, состоящий из 269 аминокислотных остатков и обладающий как N-гликозилазной, так и AP-лиазной активностью

[148]. Fpg является основным ферментом в клетках *E. coli*, удаляющим 8-охоG, 4,6-диамино-5-формапидопиримидин и 2,6-диамино-4-гидрокси-5-формапидопиримидин [33, 149]. Также была обнаружена небольшая активность Fpg по отношению к олигодезоксирибонуклеотидным дуплексами, содержащим 2,6-диамино-4-гидрокси-5N-метилформапидопиримидин, 5-гидроксицитозин и 5-гидроксиурацил [150, 151]. Фермент Fpg содержит в своей структуре ион цинка, в составе мотива «цинковый палец», образованного аминокислотными остатками цистеинов Cys244, Cys247, Cys264, Cys267 [152]. Данные биохимических исследований и сайт-направленного мутагенеза свидетельствуют о ДНК-связывающей роли этих аминокислотных остатков цистеина, так как их замены снижали каталитическую активность фермента [152]. Было показано, что специфичность фермента Fpg к 8-охоG связана с наличием структурной петли, которая образует специфичные контакты с 8-охоG, тем самым стабилизируя активный центр [153]. Fpg обладает в 40 раз большей аффинностью к 8-охоG, чем к 8-охоA, что может говорить о том, что карбонильная группа в C8-положении 8-охоGa необходима для правильного распознавания субстрата в активном центре фермента [150].

Фермент NEIL1 узнает и удаляет окисленные пиримидиновые основания в ДНК, такие как 5,6-дигидроурацил, 5-гидроксиурацил, тимингликоль и 5,6-дигидротимин [89, 90, 154]. NEIL1 состоит из двух доменов, N-концевой домен обладает смешанной $\alpha\beta$ структурой, C-концевой домен преимущественно состоит из α -спиралей, две из которых образуют консервативный ДНК-связывающий мотив H2tH. Примечательно то, что в структуре фермента присутствует элемент, имитирующий организацию мотива «цинковый палец», но не содержащий ион Zn^{2+} , поскольку у NEIL1 в данном мотиве отсутствуют аминокислотные остатки цистеинов, координирующие ион Zn^{2+} [155]. Фермент NEIL2 также удаляет модифицированные пиримидины, но обладает уникальной специфичностью к повреждениям, находящимся в не полностью двуцепочечной ДНК, имеющей структуру пузыря, также активен по отношению к одноцепочечной ДНК. У NEIL2 присутствуют все консервативные мотивы характерные для представителей структурного суперсемейства Fpg/Nei.

1.4.3.1. Структурные особенности Endo VIII

Фермент Endo VIII из *E. coli* был открыт как фермент, узнающий окисленные пиримидины [156]. Endo VIII кодируется геном *nei* и представляет собой белок, состоящий из 263 аминокислот, N-концевой и C-концевой районы которого обладают значительной гомологией с бактериальным белком Fpg [157]. Фермент Endo VIII был первым из суперсемейства Fpg/Nei, для которого удалось получить кристаллические структуры как для свободного фермента, так и комплекса с ДНК [142, 158].

В структуре фермента можно выделить два домена: это N-концевой (аминокислотные остатки с 1 по 120) и С-концевой (аминокислотные остатки с 135 по 262), связанные линкером (аминокислотные остатки с 120 по 135) (рисунок 7). N-концевой домен начинается с длинной α -спирали (α A, аминокислотные остатки с 2 по 18), за которой следует двухслойная структура β -сэндвич (β 1- β 8, аминокислотные остатки с 22 по 111), где каждый слой образован четырьмя антипараллельными β -складками. Короткая α -спираль (α B, аминокислотные остатки с 34 по 40) расположена между складками β 1 и β , а β -сэндвич домен заканчивается короткой α -спиралью (α C, аминокислотные остатки с 114 по 124). С-концевой домен включает в себя пять α -спиралей (α D- α H, аминокислотные остатки с 135 по 211), где α E и α F представляют консервативный мотив «спираль-два поворота-спираль» (H2tH). За α -спиральным районом следует одиночная консервативная антипараллельная β -шпилька цинкового пальца (β 9- β 10, аминокислотные остатки с 245 по 256).

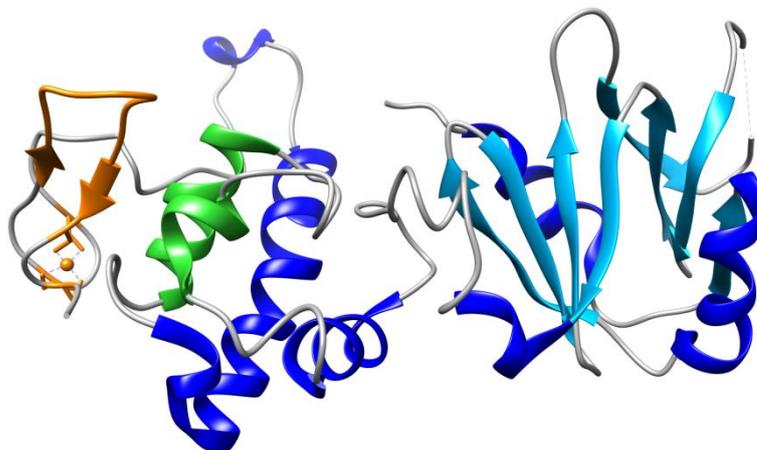


Рисунок 7. Структура фермента Endo VIII из *E.coli* (PDB ID:1Q39). В структуре выделены α -спирали (синий), β -складки (голубой), консервативный мотив H2tH (зеленый) и мотив цинковый палец (оранжевый). Неструктурированные области обозначены серым цветом.

Особенностью Endo VIII в свободной форме и в комплексе с ДНК, является положение N- и С-концевых доменов фермента относительно друг друга (рисунок 8). Как видно на рисунке 8, образование фермент-субстратного комплекса приводит к сближению доменов за счет изгиба линкерной области примерно на 50° относительно друг друга. При этом наложение С-концевого домена в свободном ферменте и в комплексе с ДНК свидетельствует о малой конформационной подвижности этого домена в ответ на связывание ДНК. Тем не менее, структура N-концевого домена в комплексе с ферментом отличается от фермента в свободной форме. Размер Endo VIII в свободной форме значительно отличается от размера Endo VIII в комплексе с ДНК [142]. Такие изменения в размерах глобулы фермента отражают то, что при комплексообразовании с ДНК фермент переходит из вытянутой «открытой» формы в компактную «закрытую» форму.

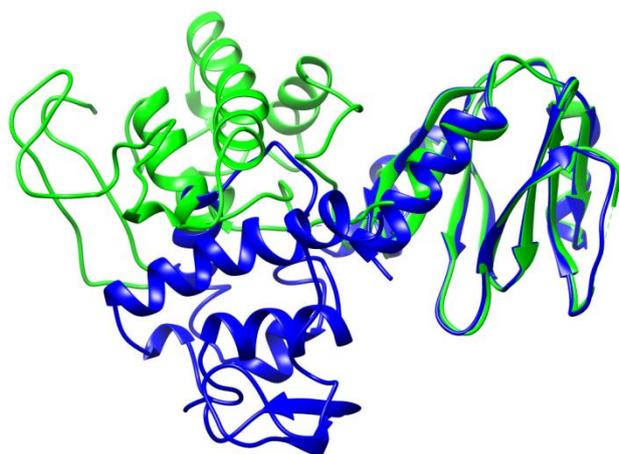


Рисунок 8. Наложение структуры Endo VIII в комплексе с ДНК (синий) (PDB ID: 1K3W) и свободного фермента (зелёный) (PDB ID: 1Q39).

Помимо этого, структура ДНК, связанной с Endo VIII также изменяется. Фермент изгибает ДНК в месте повреждения и выворачивает поврежденный нуклеотид в свой активный центр. На рисунке 9 представлена схема контактов Endo VIII с олигодезоксирибонуклеотидом, содержащим тимингликоль.

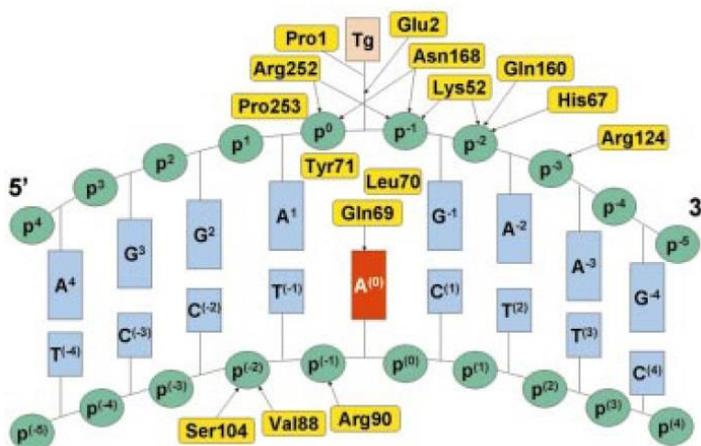


Рисунок 9. Схема контактов аминокислотных остатков Endo VIII из *E. coli*, образующихся при связывании фермента с ДНК [142].

В связывании и образовании контактов с ДНК принимают участие аминокислотные остатки, расположенные в различных консервативных структурных элементах Endo VIII. Специфические взаимодействия с повреждением в активном центре осуществляют каталитические аминокислотные остатки Pro1 и Glu2. К другим структурным элементам, принимающим участие в связывании ДНК, относятся: петля между $\beta 5$ и $\beta 6$ (аминокислотные остатки Val88 и Arg90), $\beta 7$ - $\beta 8$ (Ser104); петля содержащая два поворота H2tH мотива (аминокислотные остатки с 167 по 169); петля, соединяющая β -складки цинкового пальца (аминокислотные остатки с 251 по 253). Аминокислотные остатки из $\beta 4$ - $\beta 5$ петли (Gln69, Leu70, Tyr71) встраиваются внутрь ДНК-дуплекса. Дополнительные контакты с цепью ДНК, содержащей повреждение, осуществляют аминокислотные остатки из H2tH мотива (Asn168) и домена цинковый палец (Arg252 и Pro253). Аминокислотные остатки из мотива H2tH и

цинковый палец вместе с ϵ -аминогруппой Lys52 стабилизируют изогнутую ДНК, ориентируя её за счет сети водородных связей с фосфатными группами с обеих сторон от поврежденного основания.

Endo VIII выворачивает модифицированный нуклеотид за счет комбинации взаимодействий с Asn168 и Arg252, и встраиванием аминокислотных остатков Gln69, Leu70, Tyr71 в цепь ДНК [159]. После того как поврежденное основание удаляется, а основание напротив остается внутри цепи, стабилизированное одиночной водородной связью, образованной атомом N3 и остатком Gln69. Образовавшееся пространство в цепи ДНК заполняется остатками Gln69, Leu70 и Tyr71, расположенными в короткой петле, соединяющей β 4 и β 5 (рисунок 10).

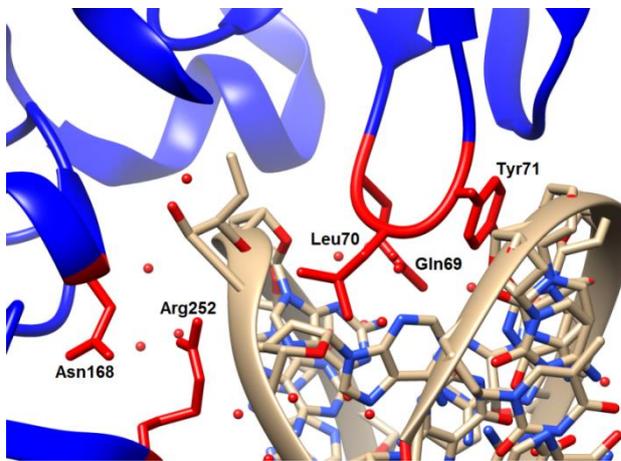


Рисунок. 10. Структура активного центра Endo VIII. Аминокислотные остатки Gln69, Leu70 и Tyr71 внедряются в двойную спираль ДНК. Аминокислотные остатки Asn168 и Arg252 контактируют с боковой цепью ДНК.

Поскольку структурно Endo VIII очень похож на Fpg, то можно предположить, что процесс катализа у ферментов происходит схожим образом [85, 143, 158, 160]. На рисунке 11 представлен каталитический механизм действия Endo VIII. Процесс инициируется нуклеофильной атакой по С1' положению поврежденного нуклеотида иминогруппой Pro1 что приводит к удалению поврежденного азотистого основания и образованию основания Шиффа. Последующие стадии включают реакции β - и δ -элиминирования. Фермент регенерируется путем гидролиза основания Шиффа и высвобождения 4-оксо-2-пентенала.

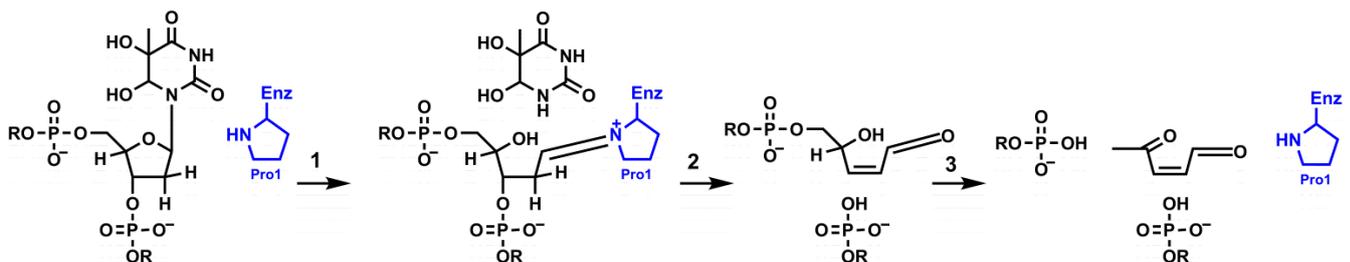


Рисунок 11. Химические стадии процесса катализа Endo VIII (1: гидролиз N-гликозидной связи и удаление поврежденного основания с образованием основания Шиффа; 2: β -элиминирование 3'-фосфатной группы; стадия 3: δ -элиминирование 5'-фосфатной группы).

1.4.4. Заключение к разделу 1.4

Эффективность пути эксцизионной репарации оснований связана с необычайной специфичностью узнавания и удаления поврежденных гетероциклических оснований, в присутствии огромного числа неповрежденных. Во многом, это может быть объяснено структурными особенностями ферментов. Тем не менее, остается до конца не ясным, как именно ДНК-гликозилазы узнают поврежденные азотистые основания ДНК, и за счет каких механизмов существует перекрывание субстратной специфичности у ферментов, принадлежащих к разным структурным суперсемействам и не имеющих ничего общего в структуре. Примером таких ферментов могут служить две ДНК-гликозилазы – Endo III и Endo VIII, которые способны удалять окисленные пиримидины. Обе эндонуклеазы распознают и удаляют продукты окислительного повреждения пиримидинов. На рисунке 12 представлены структуры некоторых субстратов. Общими субстратами для Endo III и Endo VIII являются: тимингликоль [136, 137, 161–163], урацилгликоль [137, 162–164], 5,6-дигидротимин [136, 137, 162, 165], 5-гидроксиурацил [136, 156, 162, 166, 167], мочевины [167], AP-сайт [167–169], 2,6-диамино-4-оксо-5-формапидопиримидин [170], 4,6-диамино-5-формапидопиримидин [137, 162, 170], гуанидиногидантоин [171], спиромидиногидантоин [171], 5,6-дигидроурацил [137, 162], 5,6-дигидроксицитозин [162, 168], 5-гидрокси-5,6-дигидротимин [162, 168], 5-гидрокси-5,6-дигидроурацил [162, 168], 5,6-дигидроксиурацил [162]. Однако существуют субстраты, которые могут удаляться только одним из ферментов. Так для Endo VIII такими субстратами являются ксантин [124] и оксанин [124], а для Endo III аллоксан [137], 5-гидроксицитозин [136, 137, 156, 166] и цитозингликоль [172].

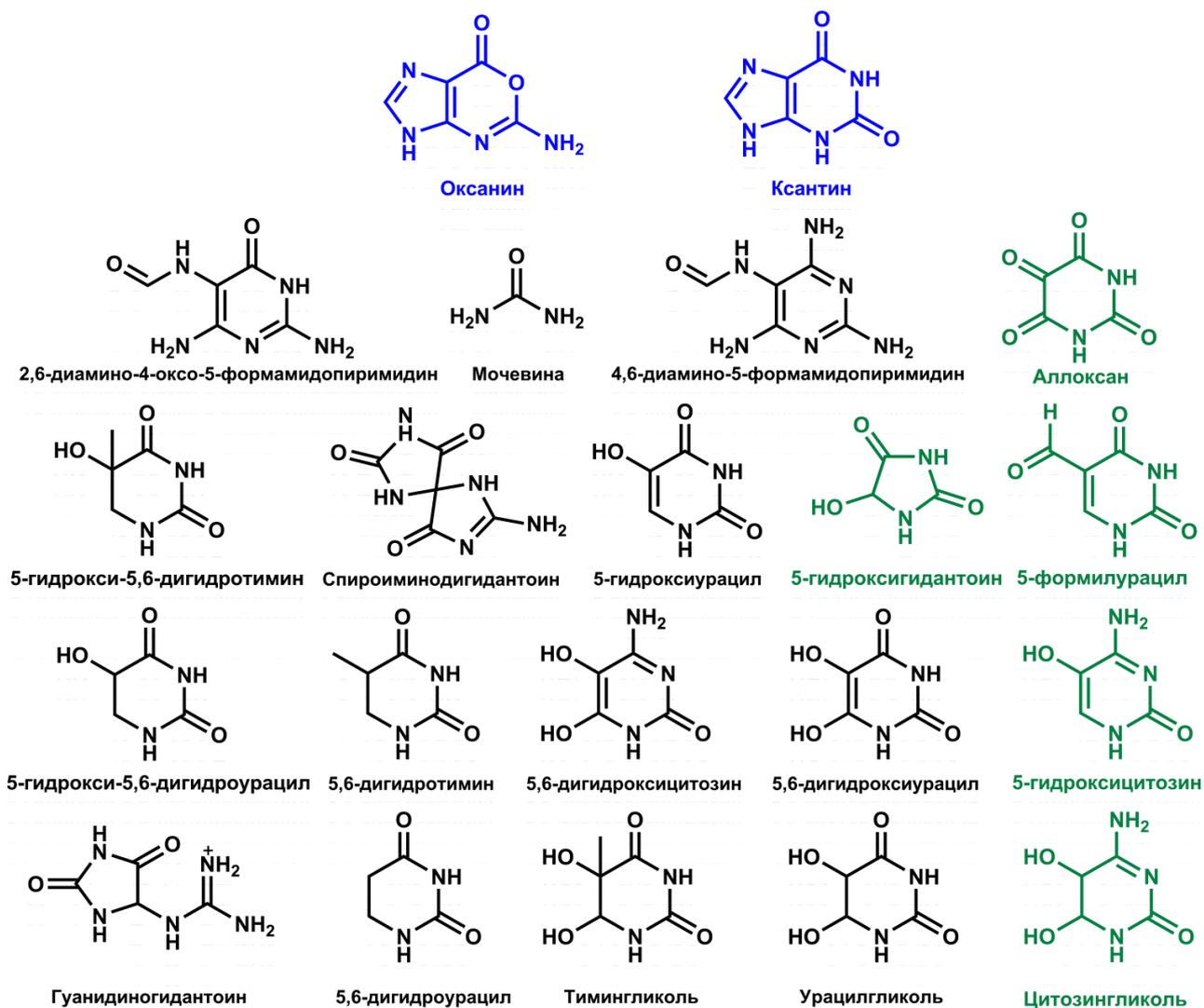


Рисунок 12. Модифицированные пиримидины и пурины, являющие субстратами для ферментов Endo VIII и Endo III. Синим цветом выделены азотистые основания, которые не являются субстратами для фермента Endo III. Зеленым цветом выделены азотистые основания, которые не являются субстратами для фермента Endo VIII.

На сегодняшний момент известно достаточно много рентгеноструктурных данных о различных ДНК-гликозилазах. Тем не менее, для некоторых из них, например Endo III, до сих пор не известна структура комплекса фермента с ДНК, содержащей повреждение. Практически важной задачей является определение не только каталитически значимых аминокислотных остатков, но и тех аминокислот, которые образуют контакты с дезоксирибозо-фосфатным остовом ДНК. Более того, до сих пор остается не ясной природа высокой специфичности ДНК-гликозилаз. Имеющиеся рентгеноструктурные данные могут дать информацию лишь об определенном положении фермента и/или ДНК-субстрата и, таким образом, не отражают часть взаимодействий между ферментом и ДНК, возникающих на ранних стадиях взаимодействия. Поэтому существует необходимость в использовании методов, способных регистрировать на малых временах кинетику образования промежуточных состояний комплексов ферментов с

ДНК, которые не могут быть отражены в кристаллической структуре. Одним из таких методов является метод «остановленного потока», который позволяет смешивать образцы фермента и субстрата примерно за 1 мс. Используя флуоресцентные красители в структуре ДНК-дуплексов, либо регистрируя изменение интенсивности флуоресценции остатков Trp ферментов, можно получить данные об изменении конформации биополимеров в процессе их взаимодействия. Изучение конформационной динамики в предстационарном режиме позволяет регистрировать те стадии, которые невозможно зарегистрировать методами рентгеноструктурного анализа, и установить последовательность событий, происходящих при формировании фермент-субстратного комплекса.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Выделение фермента Endo III

Для выделения фермента Endo III (*E. coli*) была сконструирована плазмида pET28c. Для этого методом ПЦР был наработан ДНК-фрагмент, содержащий ген Endo III, с использованием плазмиды pNth10 и праймеров 5'-GGAATTCCATATGAATAAAGCAAAACGCC-3' и 5'-GCGGATCCTCAGATGTCAACTTTCTCTTTG-3'. Плазмида pNth10, содержащая ген Endo III, была любезно предоставлена Dr. М.К. Сапарбаевым (Институт им. Густава Русси, Франция) [173]. Размер ДНК-фрагмента составлял 654 пар оснований. ПЦР продукты были разделены в 1,0 % агарозном/ТАЕ геле, вырезаны и очищены согласно протоколу QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Хильден, Германия). Ген Endo III был клонирован в вектор экспрессии pET28c по сайтам рестрикции ферментов NdeI и BamHI и отсеквенирован. Мутантные формы K120A и Asp138Ala внутри кодирующей последовательности Endo III были сконструированы с использованием протокола сайт-направленного мутагенеза (QuikChange XL, Stratagene, Ла-Холья, США).

Фермент Endo III дикого типа и его мутантные формы K120A и D138A были выделены из штамма *E. coli* Rosetta 2, трансформированных плазмидой, несущей вставку соответствующего гена pET28c-Nth. Клетки *E. coli* Rosetta 2 выращивались в среде LB medium (1 л), содержащей 50 мкг/мл канамицина при 37 °С до оптической плотности 0,6-0,7 при 600 нм. Затем температуру уменьшали до 20 °С и индуцировали транскрипцию путём добавления изопропил-β-D-тиогалактопиранозида до концентрации 0,2 мМ. После этого клетки инкубировали в течение 16 часов, а затем осаждали методом центрифугирования при 12000 об/мин в течение 10 мин. Осажденные клетки ресуспендировали в буфере, содержащем 40 мМ NaCl, 20 мМ HEPES-NaOH, pH=7,8 и смесь ингибиторов протеаз (Inhibitor cocktail, Complete, Мангейм, Германия). Ресуспендированные клетки лизировали используя пресс Френча (Thermo Electron Corporation, Нидем, США). Все последующие процедуры проводили при температуре 4 °С. Клеточный лизат центрифугировали при 30000 об/мин 40 мин. Затем в супернатант добавляли раствор NaCl до концентрации 200 мМ. Полученную смесь наносили на колонку, содержащую Q-сефарозу (Q-Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences, Уппсала, Швеция) с последующим элюированием буфером, содержащим 200 мМ NaCl, 20 мМ HEPES-NaOH, pH=7,8. Фракции, содержащие фермент, были объединены. Затем к ним добавляли растворы имидазола и NaCl до концентрации 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол. Полученную смесь наносили на хелатирующую колонку (HiTrap-Chelating™, Amersham Biosciences). Хроматографию проводили в буферном растворе (500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 20 мМ

HEPES-NaOH, pH=7.8) в линейном градиенте от 20 до 500 мМ имидазола. Поглощение раствора детектировали при длине волны 280 нм. Гомогенность белковой фракции препарата определяли методом гель-электрофореза в ПААГ.

2.2 Выделение фермента Endo VIII

Плазмида pET24b-Nei, несущая ген фермента Endo VIII дикого типа, была любезно предоставлена проф. д.б.н. Д.О. Жарковым (Институт химической биологии и фундаментальной медицины). Фермент Endo VIII дикого типа (*E. coli*) и его мутантные формы L70S, L71W, F121W, F230W, P253W, E2Q, полученные методом сайт-направленного мутагенеза (QuikChange XL, Stratagene, Ла-Холья, США), были выделены из штамма *E. coli* Rosetta 2, трансформированных плазмидой pET24b, содержащий ген фермента Endo VIII. Клетки выращивали при 37 °С в LB среде, содержащей 50 мкг/мл канамицина, до оптической плотности равной 0,6-0,7. Далее добавляли 0,2 мМ изопропил-β-D-тиогалактопиранозид для индукции транскрипции. Индуцированную клеточную среду оставляли инкубироваться при 20 °С на 16 часов. После этого клеточную среду центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 мин. Осажденные клетки ресуспендировали в буфере, содержащем 40 Мм NaCl, 20 мМ HEPES-NaOH, pH=7,8 и смесь ингибиторов протеаз (Inhibitor cocktail, Complete, Мангейм, Германия). Дальнейшие процедуры проводили при 4 °С. Методом Френч-пресса лизировали клеточную суспензию. Полученный лизат центрифугировали при 30000 об/мин 40 мин. Супернатант отделяли, добавляли в него раствор NaCl до концентрации 200 мМ. Затем клеточный лизат наносили на подготовленную Q-сефарозную колонку (Q-Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences, Уппсала, Швеция) с последующим элюированием буфером, содержащим 200 мМ NaCl, 20 мМ HEPES-NaOH, pH=7,8. Фракции, содержащие фермент объединяли, добавляли раствор имидазола и NaCl до концентраций равных 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол. Подготовленный раствор наносили на колонку (HiTrap-Chelating™, Amersham Biosciences). Дальнейшую хроматографию проводили в линейном буферном градиенте от 20 до 500 мМ имидазола. Поглощение раствора детектировали при длине волны 280 нм. Гомогенность белковой фракции препарата определяли методом электрофореза в ПААГ.

2.3 Получение олигодезоксирибонуклеотидов

Использованные в работе олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в Лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН на автоматическом ДНК/РНК синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Новосибирск, Россия) с использованием коммерческих амидофосфитов 2'-дезоксирибонуклеозидов и CPG-носителей (GlenResearch, США). В работе использовали двенадцатизвенные, тринадцатизвенные и семнадцатизвенные

олигодезоксирибонуклеотиды (таблица 1), содержащие в одной из цепей повреждение, неповрежденный нуклеотид и флуорофорную группу, а в комплементарной цепи флуорофорную группу либо неповрежденный нуклеотид. Синтезированные олигодезоксирибонуклеотиды очищали с помощью ВЭЖХ на ионообменной колонке (PRP-X500 Hamilton Company (12-30 мкм) 3,9×300 мм) и последующей обращенно-фазовой хроматографией (Bondapak C18 (15-20 мкм) 3,9×300 мм, Waters, Ирландия). Гомогенность выделенных олигонуклеотидов проверяли с помощью денатурирующего электрофореза в 20%-ном ПААГ. Концентрацию олигонуклеотидов измеряли по оптической плотности растворов при длине волны 260 нм, и рассчитывали по закону Бугера-Ламберта-Бера, исходя из коэффициентов молярной экстинкции [174].

Олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие AP-сайт, получали при взаимодействии олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих урацил, с урацил-ДНК-гликозилазой Ung. Для этого олигонуклеотид, содержащий уридин (0,1 мкмоль), обрабатывали урацил-ДНК-гликозилазой Ung из *E. coli* (15 ед. акт.) (СибЭнзим, Россия) в 150 мкл буфера (20 мМ Tris-HCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ ДТТ, 0,1 мг/мл BSA, pH = 8,0). Реакционную смесь выдерживали 14 ч при 37 °С. Присутствие AP-сайта в выделенном продукте и его чистоту проверяли методом гелевого электрофореза. Для проверки количественного образования AP-сайта образец олигонуклеотида (0,1 о.е.) обрабатывали 10%-ным пиперидином в воде при 95 °С и проводили разделение продуктов реакции в 20%-ом ПААГ.

В качестве специфических субстратов для ферментов Endo III и Endo VIII использовали олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие в своей последовательности модифицированное гетероциклическое основание 5,6-дигидроуридин (DHU) или AP-сайт (AP). Остаток 2-гидроксиметил-3-гидрокси тетрагидрофурана в последовательности использовали в качестве нерасщепляемого аналога AP-сайта (F). В качестве неспецифического субстрата для ферментов Endo III и Endo VIII использовали неповрежденные дуплексы. Для флуоресцентной регистрации конформационных изменений в структуре олигодезоксирибонуклеотидов в одну из цепей вводили флуоресцентные аналоги азотистых оснований. Для регистрации конформационных изменений цепи ДНК, содержащей повреждение, использовали флуорофорную группу 2-аминопурина (2-aPu), расположенную с 3'-стороны от повреждения. Для регистрации конформационных изменений в комплементарной цепи, использовали флуорофорную группу 1,3-диаза-2-оксофеноксазина (tC^O), расположенную напротив повреждения. Для регистрации конформационной динамики ДНК-дуплекса в целом использовали FRET пару красителей FAM-BHQ1. Флуорофорная группа FAM располагалась на 5'-конце цепи ДНК, содержащей повреждение. Группа тушителя BHQ1 располагалась на 5'-конце комплементарной цепи ДНК. Структуры использованных модифицированных

нуклеотидов и флуорофорных групп представлены на рисунке 13. Последовательности всех использованных в работе олигодезоксирибонуклеотидов представлены в таблице 1.

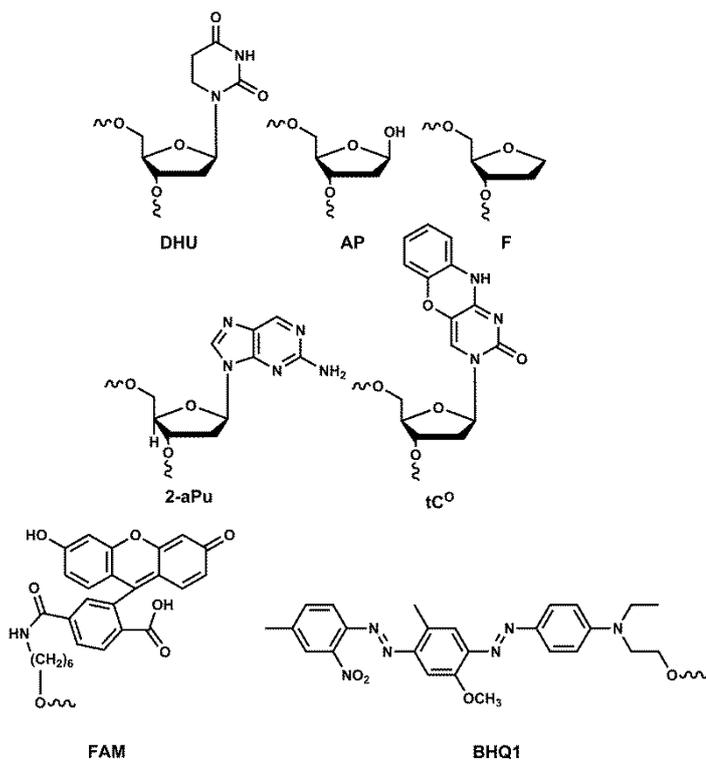


Рисунок 13. Структуры модифицированных нуклеотидов и флуорофоров, использованных в работе: 5,6-дигидроуридин (DHU), AP-сайт (AP), 2-гидроксиметил-3-гидрохситетрагидрофуран (F), 2-аминопурин (2-aPu), 1,3-диаза-2-окософеноксазин (tC⁰), FAM, BHQ1.

Таблица 1. Последовательности олигодезоксирибонуклеотидов в составе ДНК-дуплексов, использованных в работе.

X/tC ⁰ 12 X = DHU, AP, F, G	5'-d(CTCTC(X)CCTTCC) 3'-d(GAGAG(tC ⁰)GGAAGG)
AP/G12	5'-d(CTCTC(AP)CCTTCC) 3'-d(GAGAG(G)GGAAGG)
X_2-aPu/G12 X = DHU, AP, F, G	5'-CTCTC(X)(2-aPu)CTTCC 3'-d(GAGAG(G)GAAGG)
DHU /tC ⁰ 13	5'-d(TCTCTC(DHU)CCTTCC) 3'-d(AGAGAG(tC ⁰)GGAAGG)
X/N13 X = DHU, AP N = A, T, G, C	5'-d(TCTCTC(X)CCTTCC) 3'-d(AGAGAG(N)GGAAGG)
X/tC ⁰ 17 X = DHU, F, G	5'-d(TCTCTCTC(X)CCTTCCTT) 3'-d(AGAGAGAG(tC ⁰)GGAAGGAA)
DHU/G17	5'-d(TCTCTCTC(DHU)CCTTCCTT) 3'-d(AGAGAGAG(G)GGAAGGAA)
FAM_X/BHQ1_G17 X = C, F, AP, DHU	5'-d(FAM-GCTCA(X)GTACAGAGCTG) 3'-d(CGAGT(G)CATGTCTCGAC-BHQ1)

2.4. Введение метки ^{32}P

Для введения метки ^{32}P по 5'-концу олигодезоксирибонуклеотидов, 30 пмоль олигодезоксирибонуклеотида в 30 мкл буферного раствора 50 мМ Tris-HCl, pH = 7,6, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит, 30 пмоль [γ - ^{32}P]-АТФ (уд. акт. 4 мкКи/пмоль) выдерживали 2 часа с 10 ед. акт. полинуклеотидкиназы фага Т4 при 37 °С [175]. Реакционную смесь осаждали 10-кратным объемом 2% LiClO₄ в ацетоне. Меченный олигодезоксирибонуклеотид очищали методом гель-фильтрации. Для этого подготавливали принимающую колонку, содержащую 400 мкл водной суспензии сорбента Sephadex G-25 Medium (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Уппсала, Швеция). Колонку с сорбентом предварительно центрифугировали при 3000 об/мин в течение 2 минут. После этого на сорбент наносили реакционную смесь, и дополнительно центрифугировали при 3000 об/мин в течение 1 минуты.

2.5. Получение кинетических зависимостей степени расщепления субстратов

Все эксперименты с участием белков были выполнены в буферном растворе 50 мМ Tris-HCl, pH=7,5, 50 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 7% глицерин и при температуре 25 °С, если не указано иное. Для получения кинетических зависимостей степени расщепления субстрата от времени, к 30 мкл буферного раствора, содержащего 2,0 мкМ ^{32}P -меченный субстрат и эквимольное количество комплементарной цепи, добавляли 30 мкл фермента с концентрацией 2,0 либо 4,0 мкМ в том же буферном растворе. После быстрого перемешивания реакционной смеси из нее отбирали аликвоты объемом 10 мкл, которые помещали в предварительно подготовленные пробирки, содержащие 10 мкл раствора 7 М мочевины, 0,1% бромфенолового синего и 0,1% ксиленцианола.

Для определения каталитической активности мутантных форм Endo III по отношению к ДНУ-содержащим субстратам, отобранные после взаимодействия с ферментом реакционные пробы подвергали щелочной обработке NaOH (1 М), и оставляли инкубироваться на 15 мин при 37 °С. Реакционную смесь нейтрализовали соответствующим объемом 2 М соляной кислоты. Перед нанесением на гель пробы инкубировали при 93 °С в течение 3 минут, затем наносили на ПААГ. Для определения степени расщепления субстрата полученный гель накладывали на флуоресцентный экран (Bio Rad Imaging Screen) на 10 ч при минус 20 °С. Для определения степени расщепления субстрата радиоавтограф переводили в цифровую форму, используя прибор Molecular Imager FX phosphoimager (Bio-Rad, США). Анализ расщепления субстратов проводили в программном пакете Gel-Pro Analyzer 4,0 (Media Cybernetics, США). Величину степени расщепления рассчитывали как отношение площадей пиков продуктов к сумме площадей пиков продуктов и пика исходного олигодезоксирибонуклеотида.

2.6. Получение флуоресцентных кинетических кривых

Кривые изменения интенсивности флуоресценции были зарегистрированы на спектрофотометрах «остановленного потока» SX.20 и SX.18MV (Applied Photophysics, Великобритания). Мертвое время приборов составляло 1,0 и 1,38 мс, соответственно. Каждую кривую изменения интенсивности флуоресценции получали путём усреднения как минимум трёх кривых.

В таблице 2 приведены длины волн возбуждения и испускания флуоресценции всех использованных в работе репортерных групп и длины волн в максимуме спектра оптического поглощения тушителей. В качестве детектора интегральной интенсивности флуоресценции использовали ФЭУ с установленным светофильтром (Corion filter и Schott filter). Светофильтр подбирали таким образом, чтобы он имел поглощение при длине волны возбуждающего света и пропускание в области максимума испускания флуоресценции данного флуорофора. Собственная флуоресценция белков обуславливалась присутствием аминокислотных остатков Trp и Tyr. При возбуждении при длине волны 290 нм основной вклад (>90%) во флуоресценцию белка обеспечивают аминокислотные остатки Trp.

Для регистрации конформационных изменений ДНК использовали флуоресцентные аналоги гетероциклических оснований – 2-aPu и tC^O. Изменение интенсивности флуоресценции 2-aPu зависит от полярности микроокружения вблизи этой флуорофорной группы. При повышении полярности микроокружения интенсивность флуоресценции 2-aPu увеличивается [176–179]. При внедрении 2-aPu в ДНК, интенсивность флуоресценции выше в одно-, чем в двуцепочечном состоянии [178]. Флуоресценция аналога цитозина – tC^O так же зависит от микроокружения флуорофора [180, 181].

Таблица 2. Длины волн испускания и возбуждения флуоресценции для репортерных групп, использованных в работе.

Флуорофор/тушитель	Длина волны возбуждения, нм	Длина волны в максимуме испускания, нм	Светофильтр
Trp	290	345	WG-320
2-aPu	310	360	LG-370
tC ^O	360	460	GG-395
FAM	494	525	OG-515
BHQ1*	534	-	-

*приведена длина волны в максимуме спектра оптического возбуждения

При длительном облучении белков и флуорофорных групп ультрафиолетовым светом происходит деградация Tgr либо флуорофорных групп, которая сопровождается уменьшением интенсивности флуоресценции (бличинг). Для коррекции полученных флуоресцентных кривых использовали уравнение (1):

$$F = ((F_{\text{эксп}} - F_0) \times e^{(k_{\text{bleach}} \times t)} + F_0, \quad (1)$$

где F – интенсивность флуоресценции с учетом бличинга, $F_{\text{эксп}}$ – экспериментальное значение флуоресценции, F_0 – значение фоновой флуоресценции, k_{bleach} – константа скорости бличинга, t – время. Величину k_{bleach} определяли по скорости бличинга раствора белка в отсутствие ДНК-субстратов.

Для того, чтобы рассчитать константы скорости конформационных переходов, получали набор кинетических кривых для разных концентраций фермента либо субстрата при температуре 25 °С, если не указано иное. Регистрацию проводили при концентрациях одного порядка для фермента и субстрата. При регистрации конформационных изменений в ДНК-дуплексах фиксировали концентрацию использованных ДНК-субстратов и варьировали концентрацию фермента. Как правило, концентрация олигодезоксирибонуклеотидов составляла 1,0 мкМ (в кювете), а концентрация фермента от 0,5 до 5,0 мкМ. При регистрации конформационных изменений в молекуле фермента фиксировали концентрацию использованных ферментов и варьировали концентрацию ДНК-дуплексов.

Для получения термодинамических данных, эксперименты повторяли при разных температурах. Для Endo III эксперименты проводили в диапазоне температур от 5 до 37 °С, для Endo VIII – от 5 до 25 °С.

2.7. Количественная обработка результатов

Количественную обработку результатов экспериментов проводили путем оптимизации значений параметров, входящих в кинетические схемы. Для этого использовали метод нелинейной регрессии, включающий численное интегрирование дифференциальных уравнений, описывающих кинетику процесса с помощью программ Origin 8.0 (OriginLab, США) и DynaFit (BioKin, США) [182].

Для определения минимальной кинетической схемы, описывающей взаимодействие фермента с субстратами и расчета констант скорости всех элементарных стадий данной схемы, использовали программу DynaFit (BioKin, США). При обработке данных кинетические кривые разбивали на временные диапазоны таким образом, что каждый следующий диапазон полностью включал предыдущий. Это давало возможность постепенно усложнять и оптимизировать модель взаимодействия фермента с субстратом. Начальный диапазон кривых,

как правило, отражал стадии связывания и давал возможность определить их константы скорости. При обработке следующего временного диапазона ранее использованный механизм усложняли, добавляя к нему еще одну равновесную или неравновесную стадию, при этом фиксировали константы, определенные для начальных стадий. После расчета констант скорости добавленных стадий осуществляли общую коррекцию значений констант скорости путем одновременной оптимизации значений всех параметров системы. Такой пошаговый подход позволил дискриминировать различные схемы фермент-субстратного взаимодействия и определить величины констант скорости и констант равновесия элементарных стадий, входящих в эти схемы.

2.8. Определение термодинамических параметров

Определение термодинамических параметров конформационных изменений в процессе взаимодействия ДНК-субстратов и лигандов с Endo III и Endo VIII проводили при регистрации изменения интенсивности флуоресценции tC^O . Для этого использовали 17-звенные ДНК дуплексы, содержащие флуорофорную группу tC^O в девятом положении.

Для получения термодинамических параметров отдельных стадий процесса использовали данные, полученные путем регистрации изменений интенсивности флуоресценции от времени при различных температурах. Для каждой температуры определяли значения индивидуальных констант скорости прямых и обратных реакций обратимых и необратимых стадий (k_i и k_{-i} , где i – номер стадии) и рассчитывали значения констант равновесия отдельных стадий многостадийного процесса образования фермент-субстратных промежуточных комплексов K_i (k_i/k_{-i}). Термодинамические параметры каждой i -ой стадии находили из зависимости между константой равновесия (K_i) и температурой, описываемой уравнением Вант-Гоффа (2):

$$\ln(K_i) = -\Delta G_i^\circ/RT = -\Delta H_i^\circ/RT + \Delta S_i^\circ/R, \quad (2)$$

ΔG_i° – стандартная свободная энергия Гиббса, ΔH_i° – стандартная энтальпия, ΔS_i° – стандартная энтропия, R – универсальная газовая постоянная, T – температура в градусах Кельвина.

Из зависимости величины константы скорости необратимой химической стадии k_i от температуры, описываемой с помощью уравнения Эйринга теории переходного состояния, были рассчитаны значения стандартной энтальпии и энтропии активации (3):

$$\ln(k_i/T) = \ln(k_B/h) + \Delta S^{\circ\ddagger}/R - \Delta H^{\circ\ddagger}/RT, \quad (3)$$

где k_i – константа скорости химической стадии, k_B – постоянная Больцмана, h – постоянная Планка, R – газовая постоянная, T – абсолютная температура в градусах Кельвина.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Конформационная динамика ДНК-субстратов при взаимодействии с Endo III

На сегодняшний момент для изучения конформационных переходов в структуре биомолекул активно применяется метод «остановленного потока», который позволяет не только быстро смешивать растворы фермента и субстрата, но и регистрировать изменения оптического сигнала в зависимости от времени. Чаще всего информацию о структурных перестройках фермента получают путем регистрации изменений интенсивности флуоресценции остатков Trp, содержащихся в ферменте [183–185]. Такой подход является наиболее удобным, поскольку флуоресцентные группы уже содержатся в последовательности белка. В ферменте Endo III содержатся два остатка триптофана Trp132 и Trp178, расположенные на поверхности белковой глобулы. В ходе взаимодействия Endo III с ДНК-субстратом DHU/G17 интенсивность флуоресценции фермента практически не менялась, что свидетельствовало об отсутствии изменений в микроокружении остатков Trp (рисунок 14).

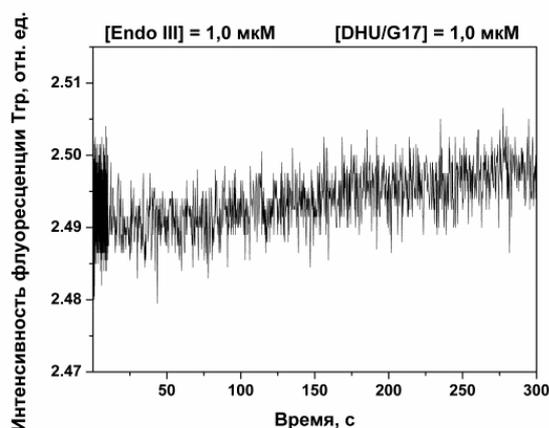


Рисунок 14. Изменение интенсивности флуоресценции Trp при взаимодействии Endo III с DHU/G17-субстратом ($[Endo III] = 1,0 \text{ мкМ}$, $[DHU/G17] = 1,0 \text{ мкМ}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Поскольку регистрация конформационных изменений Endo III оказалась не возможной, конформационные превращения фермент-субстратного комплекса регистрировали по изменению интенсивности специальных репортерных групп, находящихся в модельных ДНК-субстратах. Поскольку из рентгеноструктурных данных известно, что Endo III образует контакты с цепью ДНК как с 3'-, так и с 5'-стороны от повреждения, причем взаимодействует с тремя нуклеотидами с каждой из сторон, то теоретически, для связывания с ДНК ферменту необходим участок длиной от 6 до 7 нуклеотидов. В нашей работе были использованы ДНК-дуплексы, содержащие 12-17 нуклеотидов, чтобы обеспечить образование всех возможных контактов Endo III с ДНК-субстратом.

Для регистрации конформационных изменений ДНК в ДНК-дуплексы (таблица 1), представляющие собой субстраты различной степени специфичности, вводили флуорофорные группы либо 1,3-диаза-2-оксофеноксазина (tC^O), в комплементарной цепи напротив повреждений, либо 2-аминопурин (2-aPu), с 3'-стороны от повреждения. В качестве специфического субстрата был выбран дуплекс, содержащий в центральном положении 5,6-дигидроуридин (DHU). ДНК-дуплекс, содержащий AP-сайт, выступал в качестве промежуточного продукта ферментативной реакции, поскольку AP-сайт образуется после осуществления Endo III N-гликозилазной реакции. В качестве нерасщепляемого аналога AP-сайта был выбран остаток 2-гидроксиметил-3-гидрокситетрагидрофурана (F-сайт). Для исследования неспецифических взаимодействий Endo III с ДНК использовали неповрежденный ДНК-дуплекс, содержащий в центральном положении гуанозин (G).

Кроме фермента Endo III дикого типа (WT) были исследованы мутантные формы Endo III K120A и D138A, содержащие замены ключевых аминокислотных остатков. Аминокислотный остаток Asp138 депротонирует ϵ -аминогруппу Lys120. Остаток Lys120 является каталитически важным, и образует основание Шиффа с C1'-атомом дезоксирибозы. Для уточнения природы отдельных стадий ферментативного процесса были получены термодинамические параметры отдельных стадий взаимодействия ДНК-дуплексов с Endo III. Для этого проводили анализ кинетики фермент-субстратного взаимодействия при разных температурах (от 5 до 37 °C), при этом для предотвращения термического плавления использовали «удлиненные» 17-звенные ДНК-дуплексы, содержащие флуорофорную группу tC^O (таблица 1).

3.1.1. Конформационная динамика ДНК цепи, содержащей повреждение

3.1.1.1. Взаимодействие с G-лигандом

Для регистрации конформационных изменений неповрежденного ДНК-дуплекса использовали 12-звенный G₂-aPu/G12-лиганд (таблица 1), содержащий остаток 2-aPu в 7 положении. Как видно на рисунке 15, связывание Endo III с неповрежденным G₂-aPu-лигандом не вызывало значительного изменения интенсивности флуоресценции остатка 2-aPu. По-видимому, образование неспецифического комплекса Endo III с неповрежденной ДНК лишь незначительно нарушает структуру дуплекса и не приводит к изменению микроокружения флуорофора.

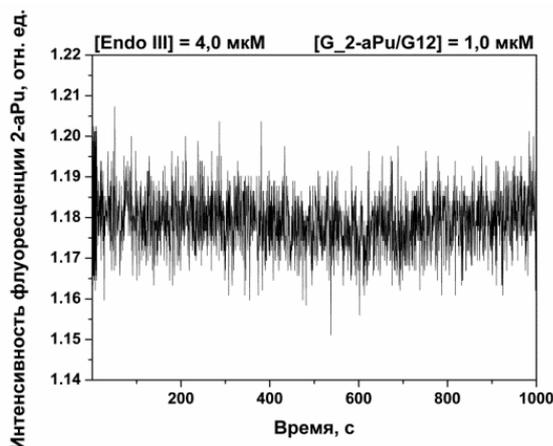


Рисунок 15. Изменение интенсивности флуоресценции 2-аPu при взаимодействии Endo III с G_2-аPu/G12-лигандом ($[Endo III] = 4,0 \text{ мкМ}$, $[G_2\text{-аPu/G12}] = 1,0 \text{ мкМ}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$).

3.1.1.2. Взаимодействие с F-лигандом

Для регистрации конформационных изменений ДНК цепи, содержащей повреждение, при специфическом связывании с Endo III, регистрировали изменения интенсивности флуоресценции ДНК-субстрата, содержащего флуорофорную группу 2-аPu с 3'-стороны от остатка F. Поскольку F является нерасщепляемым сайтом для Endo III, то их взаимодействие может отражать только стадии связывания, но не катализа. Как видно на рисунке 14, на кинетических кривых, характеризующих образование фермент-субстратного комплекса имеется лишь одна фаза изменения интенсивности флуоресценции 2-аPu. На всех кривых в концентрационной серии падение флуоресцентного сигнала наблюдали на временах до 10 с (рисунок 16). Падение интенсивности флуоресценции 2-аPu свидетельствует об увеличении гидрофобности микроокружения в области остатка 2-аPu. Наиболее вероятным предположением причины такого изменения флуоресцентного сигнала может быть этап встраивания аминокислотных остатков Endo III в полость в ДНК-дуплексе, образующуюся из-за отсутствия комплементарного нуклеотида. Согласно рентгеноструктурным данным такими аминокислотными остатками могут быть Gln41, Ile79 и Leu81. Данный процесс соответствует одностадийному обратимому превращению (схема 1). Значения констант скорости реакций, соответствующих предложенному механизму, представлены в таблице 3.

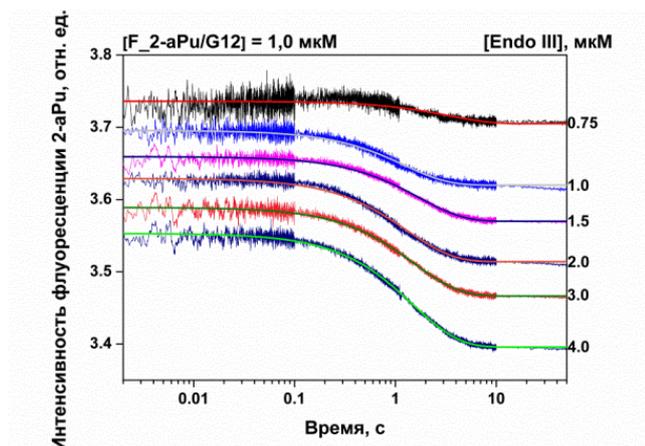
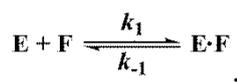


Рисунок 16. Изменение интенсивности флуоресценции 2-аPu при взаимодействии Endo III с F_2-аPu/G12-лигандом при изменении концентрации Endo III ($[F_2\text{-aPu/G12}] = 1,0 \text{ мкМ}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Схема 1



где E – фермент, F – лиганд, E•F – фермент-субстратный комплекс.

3.1.1.3. Взаимодействие с AP-субстратом

AP-сайт является расщепляемым субстратом для Endo III, поскольку после связывания фермента происходит реакция β -элиминирования. На рисунке 17 представлены кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков 2-аPu, находящегося в дуплексе, содержащем AP-сайт. Концентрация Endo III варьировалась от 1,0 до 4,0 мкМ. Можно выделить несколько фаз изменения флуоресцентного сигнала: рост интенсивности флуоресценции примерно до 0,2 с, фаза падения (от 0,2 до 3 с), рост (от 3 до 15 с), и стадия плато, начинающаяся с 15 с. Полученные кинетические кривые соответствуют механизму, содержащему две обратимых стадии связывания, необратимую каталитическую стадию, и стадию диссоциации фермент-субстратного комплекса (схема 2). Константы прямых и обратных стадий, а также константы равновесия представлены в таблице 3. Первая константа связывания k_1 ($(3,4 \pm 0,6) \times 10^6 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$), характеризующая образование фермент-субстратного комплекса почти в 20 раз выше, чем для F_2-аPu/G12 субстрата ($(1,3 \pm 0,1) \times 10^5 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$). Однако константа ассоциации K_1 является одинаковой для обоих субстратов. Наблюдаемая разница в аффинности Endo III к исследованным субстратам обеспечивается второй стадией связывания, которая не была зарегистрирована в случае F-содержащего субстрата. Можно предположить, что для окончательного образования фермент-субстратного комплекса необходим

дополнительный этап конформационной подстройки активного центра. Третьей стадией в предложенной схеме является необратимая стадия, наиболее вероятно отражающая каталитическую реакцию β -элиминирования 3'-фосфатной группы, характеризующуюся каталитической константой скорости $k_{\text{cat}} = 0,38 \pm 0,02 \text{ с}^{-1}$.

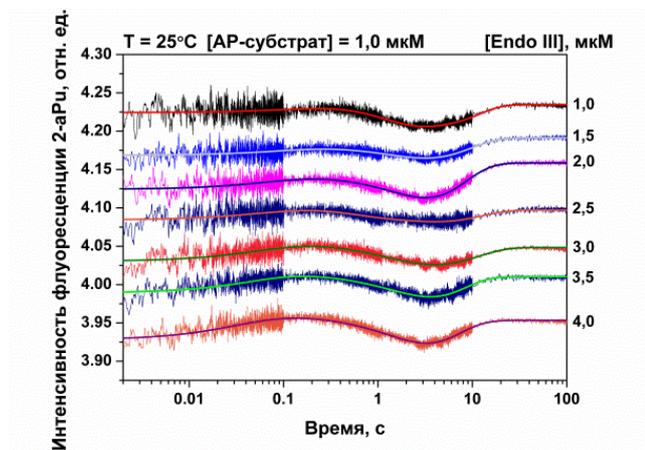


Рисунок 17. Изменение интенсивности флуоресценции 2-аПу при взаимодействии Endo III AP_2-аПу/G12-субстратом при изменении концентрации Endo III ($[AP_2\text{-aPu/G12}] = 1,0 \text{ мкМ}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Схема 2



где E – фермент, AP – субстрат, $[E \cdot AP]_i$ – фермент-субстратные комплексы, $[E \cdot P]$ – комплекс фермент-продукт, P – продукт реакции.

3.1.1.4. Взаимодействие с DHU-субстратом

Хотя на сегодняшний момент не получены сведения о структуре комплекса фермента Endo III из *E. coli* с ДНК, содержащей повреждение, известны рентгеноструктурные данные для комплекса Endo III с ДНК, содержащей AP-сайт [140]. В таком комплексе поврежденное основание вывернуто из двойной спирали ДНК в активный центр фермента. Выворачивание основания DHU из ДНК должно приводить к изменению микроокружения 2-аПу на менее гидрофобное. На полученных кривых изменения интенсивности флуоресценции 2-аПу (рисунок 18) присутствует фаза быстрого роста флуоресцентного сигнала на временах до 5 мс. Вероятно, дестабилизация дуплекса в месте повреждения и начальный этап выворачивания DHU происходит уже на самой ранней стадии связывания фермента с ДНК. После выворачивания DHU, образовавшаяся полость в ДНК дуплексе заполняется интеркалирующими аминокислотными остатками фермента. Данный процесс также наблюдался и при

взаимодействии Endo III с AP-содержащим субстратом, и сопровождается падением интенсивности флуоресценции вплоть до 20 с. Последующая фаза роста флуоресцентного сигнала, по-видимому, отражает каталитический этап и стадию диссоциации комплекса фермент-продукт. Полученные кинетические кривые были охарактеризованы четырехстадийным механизмом, аналогичным механизму для AP-субстрата (схема 3). Рассчитанные константы скоростей и равновесия представлены в Таблице 3. При анализе полученных значений можно заключить, что на первом этапе связывания Endo III обладает в 4 раза меньшей аффинностью к DHU-субстрату, чем к AP-субстрату. Константы скоростей второй стадии, характеризующий этап встраивания аминокислотных остатков фермента в ДНК-дуплекс, практически не отличаются для DHU и AP-субстрата. Не смотря на то, что при взаимодействии с DHU-субстратом Endo III катализирует две реакции – гидролиз N-гликозидной связи и реакцию β -элиминирования, была зарегистрирована только одна необратимая стадия. Значение каталитической константы k_{cat} ($0,054 \pm 0,009 \text{ с}^{-1}$) для DHU-субстрата, практически в 7 раз меньше, чем для AP-субстрата ($0,38 \pm 0,02 \text{ с}^{-1}$). Вероятно, при использованных экспериментальных условиях, близких к одному обороту фермента, стадия гидролиза N-гликозидной связи является скоростью-лимитирующей, что согласуется с литературными данными [167, 168].

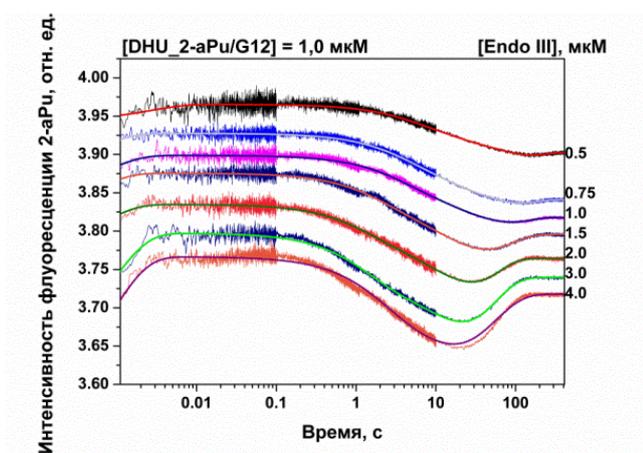
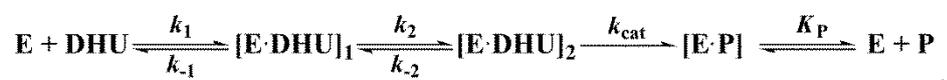


Рисунок 18. Изменение интенсивности флуоресценции 2-аPu при взаимодействии Endo III с DHU_2-аPu/G12-субстратом при изменении концентрации Endo III ($[DHU_2-аPu/G12] = 1,0 \text{ мкМ}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Схема 3



где E – фермент, DHU- субстрат, $[E \cdot DHU]_i$ – фермент-субстратные комплексы, $[E \cdot P]$ – комплекс фермент-продукт, P – продукт реакции.

Таблица 3. Значения констант скорости и равновесия, характеризующие взаимодействие фермента Endo III с ДНК-субстратами, содержащими флуорофорную группу 2-aPu с 3'-стороны от повреждения.

Константы	ДНК		
	F_2-aPu/G12	AP_2-aPu/G12	DHU_2-aPu/G12
$k_1, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	$(1,3\pm 0,1)\times 10^5$	$(3,4\pm 0,6)\times 10^6$	$(9,5\pm 0,5)\times 10^7$
k_{-1}, c^{-1}	$0,30\pm 0,03$	6 ± 1	670 ± 30
$K_1\times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	$0,40\pm 0,05$	$0,6\pm 0,2$	$0,14\pm 0,01$
k_2, c^{-1}	-	$0,47\pm 0,04$	$0,29\pm 0,09$
k_{-2}, c^{-1}	-	$0,06\pm 0,02$	$0,04\pm 0,02$
K_2	-	8 ± 3	7 ± 3
$k_{\text{cat}}, \text{c}^{-1}$	-	$0,38\pm 0,02$	$0,054\pm 0,009$
$K_{\text{ass}}\times 10^{6*}, \text{M}^{-1}$	-	5 ± 3	$1,0\pm 0,5$
$K_p\times 10^5, \text{M}$	-	$1,1\pm 0,6$	$1,6\pm 0,6$

$$* K_{\text{ass}} = \prod_{j=1}^{j=i} K_j$$

3.1.2. Исследование конформационной динамики комплементарной цепи ДНК

Для дополнительной детализации конформационных изменений в ДНК-дуплексе, происходящих при взаимодействии с ферментом Endo III, регистрировали конформационные изменения, происходящие с комплементарной цепью ДНК. Были использованы ДНК-дуплексы, содержащие в качестве флуорофорной группы остаток tC^{O} , расположенный в комплементарной цепи напротив повреждения.

3.1.2.1. Взаимодействие с G-лигандом

При регистрации неспецифического связывания Endo III с дуплексом G/tC^O12, содержащим остаток гуанина напротив флуорофорной группы, наблюдали увеличение интенсивности флуоресценции остатка tC^{O} с выходом флуоресцентного сигнала на плато к 10-15 с (рисунок 19). Как предположили ранее для другого члена структурного суперсемейства ферментов HhH – фермента hOGG1 [183], начальная стадия связывания ДНК включает в себя образование водородных связей между двумя аминокислотными остатками, вклинивающимися в ДНК – Arg154 и Arg204 (Arg78 и Arg84 у фермента Endo III из *B. stearothermophilus*) и гетероциклическим основанием цитозинном, расположенным напротив поврежденного основания. Более того, как предполагали для аминокислотных остатков Tyr203 и Asn149 фермента hOGG1, боковая цепь Leu81 у Endo III может частично встраиваться в ДНК-дуплекс в

процессе образования неспецифического комплекса, а боковая карбонильная группа Gln41 образует контакты с основанием, находящимся напротив повреждения. Кроме этого, аналогично hOGG1, интенсивность флуоресценции tC^O может повышаться из-за локального плавления ДНК дуплекса. Полученные кинетические данные хорошо описываются Схемой 6, включающей в себя одну обратимую стадию. Значения констант скорости реакций, соответствующих схеме 4, представлены в таблице 4.

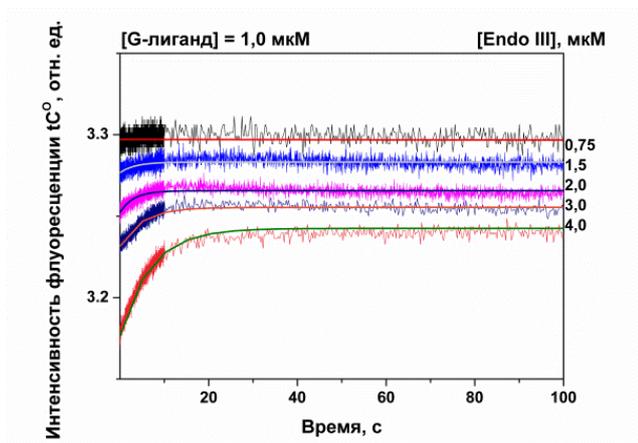
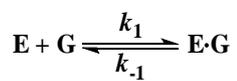


Рисунок 19. Изменение интенсивности флуоресценции tC^O при взаимодействии Endo III с G/ tC^O 12-лигандом при изменении концентрации Endo III ($[G/tC^O12] = 1,0$ мкМ, $T = 25$ °C).

Схема 4



где E – фермент, G – неспецифический лиганд, содержащий остаток гуанина, E•G – комплекс фермента с неспецифическим лигандом.

3.1.2.2. Взаимодействие с F-лигандом

Взаимодействие Endo III с F-лигандом вызывает двухфазное изменение интенсивности флуоресценции tC^O (рисунок 20). Стадия быстрого падения интенсивности флуоресценции завершалась к 10 мс, за которой следовала стадия небольшого роста интенсивности флуоресценции до 5 с. Полученные данные соответствовали схеме 5, содержащей две обратимых стадии. Значения констант скоростей прямых и обратных стадий представлены в таблице 4.

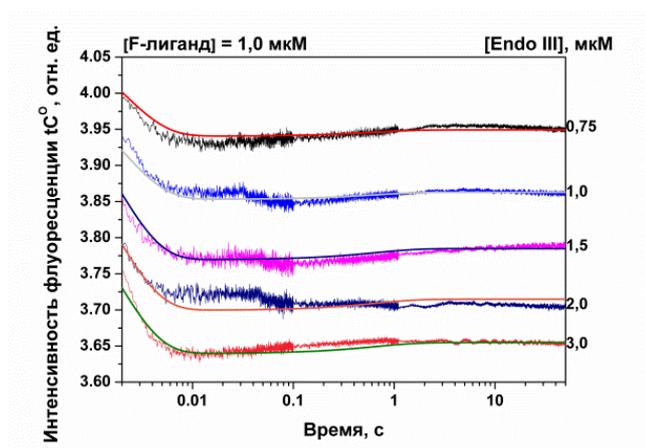


Рисунок 20. Изменение интенсивности флуоресценции tC^O при взаимодействии Endo III с F/ tC^O 12-лигандом при изменении концентрации Endo III ($[F/tC^O12] = 1,0 \text{ мкМ}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Схема 5



где E – фермент, F – нерасщепляемый аналог субстрата, $[E \cdot F]_i$ – комплексы фермента с аналогом субстрата.

Стоит отметить, что при регистрации изменений интенсивности флуоресценции группы tC^O , расположенной напротив F-сайта, удалось зарегистрировать изменения, вызванные связыванием с Endo III, которые происходят на более ранних этапах, чем это было видно при регистрации интенсивности флуоресценции 2-аPu. Такие особенности изменения флуоресцентного сигнала подкрепляют гипотезу, что в образовании начального специфического фермент-субстратного комплекса участвуют обе цепи ДНК [183]. Кроме этого, исходя из полученных значений констант скоростей, можно сделать вывод, что Endo III нарушает микроокружение tC^O в комплементарной цепи в 1000 раз быстрее, по сравнению с флуорофорной группой 2-аPu. Из этого можно сделать вывод, что первые контакты Endo III образует с цепью ДНК, комплементарной цепи, содержащей повреждение.

3.1.2.3. Взаимодействие с AP-субстратом

При взаимодействии Endo III с AP/ tC^O 12 субстратом, зарегистрированные изменения интенсивности флуоресценции tC^O носили более сложный характер (рисунок 21).

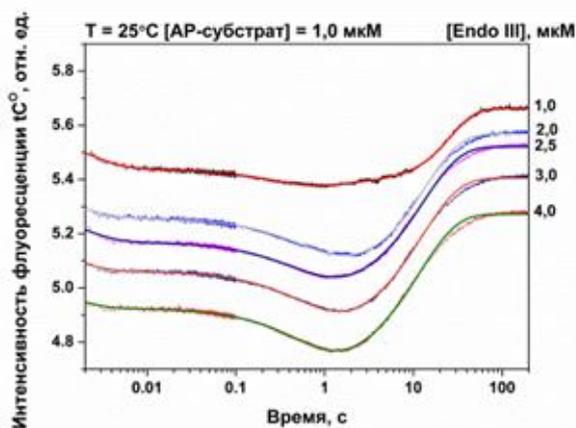


Рисунок 21. Изменение интенсивности флуоресценции tC^O при взаимодействии Endo III с AP/ tC^O 12-субстратом при изменении концентрации Endo III ($[AP/tC^O12] = 1,0$ мкМ, $T = 25$ °C).

Первая фаза падения интенсивности флуоресценции продолжалась до 10 мс, как и в случае с F-лигандом. Вторая стадия падения интенсивности флуоресценции продолжалась с 10 мс до 1 с. Вероятно, две фазы падения интенсивности флуоресценции tC^O отражают распознавание ферментом Endo III AP-сайта. Реакция β -элиминирования, приводящая к образованию разрыва в поврежденной цепи и высвобождению продукта, сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции tC^O на временах больше 1 с и выходит на плато к 20-30 с. Минимальная кинетическая схема, описывающая изменение флуоресцентного сигнала, содержала те же стадии, что и схема, предложенная в случае 2-аPu содержащего субстрата (схема 2). Константы скорости реакций, соответствующих данной схеме, приведены в таблице 4. В случае tC^O -содержащего AP-субстрата, константа скорости первой стадии начального связывания в 23 раза больше, чем для 2-аPu-содержащего AP-субстрата. Константа скорости необратимой каталитической реакции для 2-аPu-содержащего AP-субстрата k_{cat} ($0,38 \pm 0,02$ с⁻¹) в 3 раза быстрее, чем для tC^O -содержащего AP-субстрата ($0,13 \pm 0,01$ с⁻¹). Это может быть связано с тем, что наличие в ДНК флуорофорной группы tC^O влияет на активность фермента, поскольку размер флуорофорной группы превышает размер природных гетероциклических оснований.

3.1.2.4. Взаимодействие с DHU-субстратом

При взаимодействии Endo III с DHU-субстратом, изменения интенсивности флуоресценции tC^O имели такой же вид, что и для AP-субстрата (рисунок 22). Поскольку в ДНК-дуплексе присутствует поврежденное гетероциклическое основание 5,6-дигидроурацил, то после образования каталитически-компетентного комплекса происходят две реакции: гидролиз N-гликозидной связи и реакция β -элиминирования. Дополнительная стадия гидролиза N-гликозидной связи приводит к тому, что полученные изменения интенсивности флуоресценции сдвигаются в сторону большего времени, по сравнению с AP-субстратом.

Кинетические кривые согласуются с минимальной схемой, соответствующей схеме для 2-аРи-содержащего ДНК-дуплекса (схема 3). Значения констант скорости для дуплекса, содержащего DHU, приведены в таблице 4. Значение каталитической константы k_{cat} ($0,077 \pm 0,003 \text{ с}^{-1}$), полученное для tC⁰-содержащего дуплекса, близко к значению k_{cat} ($0,054 \pm 0,009 \text{ с}^{-1}$), рассчитанному для 2-аРи-содержащего дуплекса. Значение констант скорости, отвечающих за стадии связывания так же близки. Тем не менее, в случае DHU-содержащего субстрата, конформационные изменения, вызванные связыванием с Endo III происходят практически одновременно в обеих цепях ДНК.

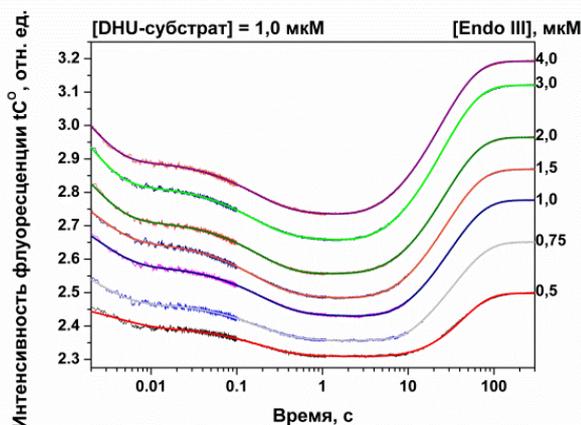


Рисунок 22. Изменение интенсивности флуоресценции tC⁰ при взаимодействии Endo III с DHU/tC⁰12-субстратом при изменении концентрации Endo III ($[DHU/tC^012] = 1,0 \text{ мкМ}$, $T = 25 \text{ °C}$).

Таблица 4. Значения констант скорости и равновесия, характеризующие взаимодействие фермента Endo III с ДНК-субстратами, содержащими остаток tC⁰ напротив повреждения

Константы	ДНК			
	G/tC ⁰ 12	F/tC ⁰ 12	AP/tC ⁰ 12	DHU/tC ⁰ 12
$k_1, \text{M}^{-1}\text{с}^{-1}$	$(3,8 \pm 0,9) \times 10^3$	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^8$	$(8 \pm 2) \times 10^7$	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^8$
$k_{-1}, \text{с}^{-1}$	$0,20 \pm 0,01$	80 ± 20	360 ± 50	130 ± 10
K_1, M	$(1,9 \pm 0,5) \times 10^4$	$(2,3 \pm 0,5) \times 10^6$	$(0,20 \pm 0,06) \times 10^6$	$(0,8 \pm 0,2) \times 10^6$
$k_2, \text{с}^{-1}$	-	$0,09 \pm 0,03$	5 ± 2	6 ± 1
$k_{-2}, \text{с}^{-1}$	-	$1,0 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$
K_2	-	$0,09 \pm 0,03$	8 ± 3	$2,50 \pm 0,05$
$k_{cat}, \text{с}^{-1}$	-	-	$0,13 \pm 0,01$	$0,077 \pm 0,003$
K_{ass}, M^{-1}	-	$(2 \pm 1) \times 10^5$	$(2 \pm 1) \times 10^6$	$(2,0 \pm 0,5) \times 10^6$
$K_p, \text{M} \times 10^5$	-	-	$1,5 \pm 0,5$	9 ± 2

3.2. Анализ накопления продуктов реакции в зависимости от времени

Для определения зависимости степени накопления продукта от времени были проведены эксперименты по прямому наблюдению за накоплением продуктов реакции с использованием ^{32}P -меченного DHU-содержащего субстрата DHU/G13 (рисунок 23).

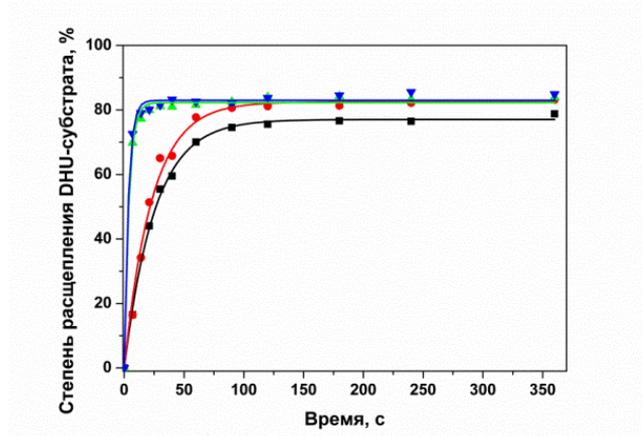


Рисунок 23. Накопление продукта превращения субстрата DHU/G13 в зависимости от концентрации фермента Endo III при ($[\text{DHU/G13}] = 1,0 \text{ мкМ}$, $[\text{Endo III}] = 0,25 \text{ мкМ}$ (■), $[\text{Endo III}] = 0,5 \text{ мкМ}$ (●), $[\text{Endo III}] = 1,0 \text{ мкМ}$ (▲), $[\text{Endo III}] = 2,0 \text{ мкМ}$ (▼), $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Поскольку фермент Endo III является бифункциональной ДНК-гликозилазой и осуществляет катализ двух ферментативных реакций, N-гликозилазной и AP-лиазной, часть проб обрабатывали щелочью в условиях, позволяющих провести химическое расщепление ДНК-цепи по AP-сайту с целью выяснения времени протекания AP-лиазной реакции. Как видно из рисунка 24, скорости накопления продукта при обработке проб щелочью и без обработки совпадают, что говорит о том, что катализ двух реакций происходит одновременно. Можно предположить, что скорость AP-лиазной реакции равна, либо превышает скорость N-гликозилазной реакции, то есть, N-гликозилазная реакция является лимитирующей стадией каталитического процесса. Это согласуется с кинетическими данными, полученными при регистрации изменений интенсивности флуоресценции 2-aPu и $t\text{C}^{\text{O}}$ (значения $k_{\text{cat}}^{2\text{-aPu}}$ и $k_{\text{cat}}^{t\text{CO}}$), откуда следует, что лимитирующим этапом катализа Endo III является удаление поврежденного основания, а не связывание с субстратом или внесение разрыва в ДНК. Это может быть связано с необходимостью подстройки конформации активного центра к широкому спектру повреждений, которые узнает и удаляет фермент.

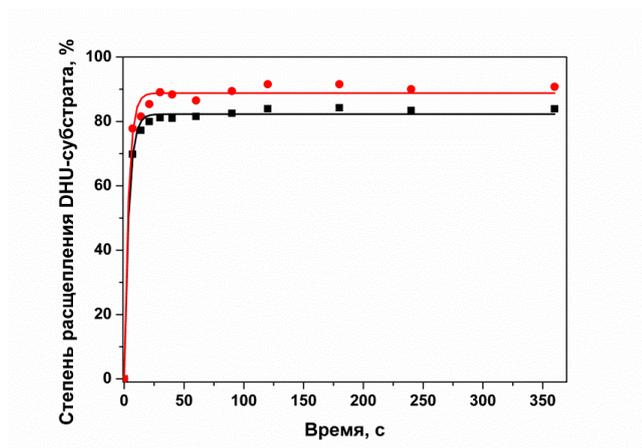


Рисунок 24. Накопление продукта превращения субстрата DNU/G13 при $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$: (■) – при обработке реакционной смеси щелочью (N-гликозилазная реакция) и (●) – без обработки щелочью (AP-лиазная реакция).

Для получения зависимости степени расщепления DNU-содержащего субстрата от природы основания, расположенного напротив повреждения, были проведены эксперименты по прямому наблюдению за накоплением продуктов реакции с использованием ^{32}P -меченного субстрата DNU/N13, где $N = G, C, A, T$. Зависимость эффективности расщепления субстратов от времени представлена на рисунке 25. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что Endo III быстрее и эффективнее удаляет повреждение, находящееся напротив пуриносодержащих нуклеотидов. Быстрее всего происходит расщепление ДНК-субстрата, содержащего в комплементарной цепи G напротив DNU. Медленнее всего фермент расщепляет субстрат в котором повреждение находится напротив цитидина.

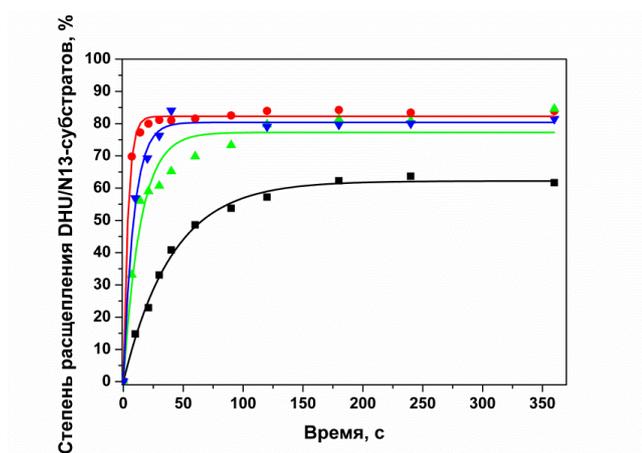


Рисунок 25. Зависимость степени накопления продукта превращения субстрата DNU/N13 от природы основания, расположенного напротив повреждения, при взаимодействии Endo III с DNU/N13-субстратами (■) – C, (●) – G, (▲) – T, (▼) – A ($[\text{Endo III}] = 1,0\text{ мкМ}$, $[\text{DNU/N13}] = 1,0\text{ мкМ}$, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

3.3. Сравнительный анализ конформационных изменений в ДНК-дуплексах, содержащих различные флуорофоры, при взаимодействии с *Endo III WT*

Несмотря на то, что фермент *Endo III* из *E. coli* является родоначальником структурного суперсемейства ДНК-гликозилаз, содержащих HhH мотив, до начала выполнения данной работы в литературе были представлены лишь кинетические данные о конформационных превращениях другого представителя этого структурного суперсемейства – фермента hOGG1 [186]. На основании этого предполагалось, что удастся зарегистрировать изменения интенсивности остатков триптофанов Trp132 и Trp178, находящихся в *Endo III*. Остаток Trp178 находится внутри [4Fe-4S] кластера, образованного α -спиралями, и маловероятно, что данный кластер является достаточно мобильным при связывании фермента с ДНК и претерпевает существенные конформационные изменения. Аминокислотный остаток Trp132 находится на поверхности фермента в петле между двумя доменами, напротив ДНК-связывающей бороздки. Можно было предположить, что при связывании фермента в ДНК будут происходить значительные структурные перестройки, и микроокружение остатка Trp132 будет изменяться. Однако для *Endo III* не удалось зарегистрировать изменений интенсивности флуоресценции остатков Trp. Вероятно, при связывании с ДНК в структуре фермента не происходит значительных изменений, либо микроокружение Trp132 меняется не значительно для того, чтобы удалось зарегистрировать изменение интенсивности его флуоресценции.

При анализе структуры *Endo III* из *G. stearothermophilus* в комплексе с ДНК (PDB ID: 1ORN) можно выявить несколько особенностей. ДНК в комплексе изогнута в месте повреждения, угол изгиба составляет примерно 55° , малая бороздка значительно открыта, а поврежденный нуклеотид вывернут из двойной спирали ДНК в активный центр фермента. Четыре основных структурных элемента принимают участие в изгибании ДНК. Первым таким элементом является поворот, соединяющий α -спирали αB и αC и примыкающие к нему части α -спиралей (аминокислотные остатки Ser40-Leu47), который внедряется в малую бороздку двойной спирали ДНК и выталкивает поврежденный нуклеотид. Образующаяся полость заполняется аминокислотным остатком Gln42, при этом примыкающее с 3'-стороны гетероциклическое основание контактирует с боковой амидной группой глутамин. Вторым структурным элементом являются α -спирали αF и начало αG (Arg78-Asn85), которые образуют контакты с нуклеотидом, расположенным напротив повреждения и его фланкирующими нуклеотидами, причем аминокислотный остаток Leu82 вклинивается между гетероциклическим основанием, располагающимся напротив повреждения, и гетероциклическим основанием с 5'-стороны от него, тем самым образуя изгиб в этой цепи ДНК. Кроме того, цепь двойной спирали, расположенная с 3'-стороны от повреждения сдавливается шпилькой и началом второй α -

спирали αI из мотива HhH (Leu115-Lys121). Эти взаимодействия приводят к изгибанию поврежденной цепи, а Lys121 образует основание Шиффа в процессе удаления поврежденного основания.

Совместно с известными данными рентгеноструктурного анализа и полученными данными об изменении интенсивности флуоресценции репортерных групп в ДНК-дуплексах, удалось интерпретировать конформационные перестройки в структурах биополимеров. Флуоресценция синтетического аналога гетероциклического основания 2-aPu снижается в менее полярном окружении, поэтому падение интенсивности флуоресценции 2-aPu на начальных этапах реакции с F-лигандом и AP- и DHU-субстратами связано со встраиванием Gln41 в полость, образующуюся при выворачивании нуклеотида, и стэкинг-взаимодействием боковой амидной группы Gln41 с основанием 2-aPu. Согласно различным ЯМР-данным F-сайт и AP-сайт в ДНК-дуплексах обычно слегка смещены в сторону большой либо малой бороздки, а то время как гетероциклическое основание, расположенное напротив, остается на месте. Когда гуанин, расположенный напротив повреждения находится в контексте GGC, AP-сайт, вероятно, остается внутри двойной спирали ДНК, и примыкающие к нему гетероциклические основания становятся доступными для растворителя, тогда как стэкинг с Gln41 при связывании Endo III должен приводить к падению интенсивности флуоресценции. Как и другие 5,6-насыщенные пиримидины, 5,6-дигидроурацил смещён либо частично находится вне спирали ДНК, что приводит к тому, что соседние азотистые основания становятся доступными для молекул растворителя [187]. Быстрый рост интенсивности флуоресценции 2-aPu в случае DHU-субстрата указывает на фиксацию повреждения в вывернутом из ДНК состоянии. Тем не менее, интенсивность флуоресценции снижается на более продолжительных временах, чем в случае AP-субстрата. Это указывает на то, что внедрение остатка Gln41 в полость в ДНК является менее энергетически выгодным в случае DHU, по сравнению с AP-субстратом.

При регистрации изменений интенсивности флуоресценции другой репортерной группы – tC^O , в случае F-лиганда наблюдали однофазное падение интенсивности флуоресценции, а в случае AP- и DHU-субстратов – двухфазное падение. Связывание Endo III с G-лигандом приводило к росту интенсивности флуоресценции tC^O , рост интенсивности флуоресценции наблюдали также на второй стадии для F-лиганда. Мотив αF - αG фермента Endo III связывается с неповрежденной цепью ДНК исключительно через боковые карбонильные группы и является достаточно гибким, для того чтобы вместить G либо A в двух разных конформациях [140], поэтому предположительно tC^O должен связываться без значительного нарушения функционально важных контактов с неповрежденной цепью. Для Endo III также показано, что фермент обладает определенной специфичностью по отношению к основанию расположенному напротив повреждения. Хотя Endo III эффективно удаляет DHU, стоящий в паре с любым

гетероциклическим основанием, его структурный гомолог hOGG1 не удаляет повреждения, расположенные напротив аденина [188].

Зависимость квантового выхода флуоресценции tC^O интерпретировать немного сложнее. В одноцепочечной ДНК флуоресценция tC^O зависит от стэкинг-взаимодействий, но практически не меняется в двуцепочечном состоянии. Если tC^O располагается между двух G, флуоресценция в одноцепочечной ДНК снижается по сравнению с двуцепочечной [180]. Можно предположить, что первое падение интенсивности флуоресценции tC^O в случае F-лиганда и AP- и DHU-субстрата может быть связано с изгибанием ДНК под действием Endo III, либо с вклиниванием Leu81 и выворачиванием поврежденного нуклеотида из ДНК. Примечательно, что эти события, похоже, отражаются на кривых изменения интенсивности флуоресценции $2-aPu$ до внедрения Gln41, указывая, что начальные стадии изгиба ДНК не нуждаются в активном вклинивании поворота $\alpha B-\alpha C\alpha$ в двойную спираль ДНК. Вид флуоресцентных кривых для tC^O предполагает, что рост интенсивности флуоресценции для неспецифического дуплекса может быть связан с частичным плавлением ДНК. Как можно видеть из таблиц 3 и 4 для F-, AP- и DHU связывания $k_1^{2-aPu} < k_1^{tCO}$, означает, что это нарушение контактов в ДНК происходит после образования начальных контактов с Endo III. Такое нарушение конформации ДНК как в специфическом, так и в неспецифическом комплексе может быть следствием попыток фермента вывернуть нуклеотид вне зависимости от того, поврежден он или нет. Активное выворачивание неповрежденного азотистого основания из ДНК в процессе поиска повреждения также было обнаружено для фермента hOGG1 [115]. Кроме того, во всех доступных структурах ДНК в комплексе с ДНК-гликозилазами аминокислотный остаток, вклинивающийся в ДНК-дуплекс, уже находится внутри ДНК. Поэтому можно ожидать того же и для аминокислотного остатка Leu81 в Endo III. Тем не менее, другой возможной причиной роста интенсивности флуоресценции tC^O на ранних стадиях неспецифического связывания с ДНК может быть вклинивание Leu81, как часть процесса поиска повреждения, влияющее на микроокружение tC^O в полностью комплементарной ДНК.

Вторая стадия связывания F-лиганда вызывает рост интенсивности флуоресценции tC^O . С другой стороны, вторая стадия, полученная для AP- и DHU-субстрата сопровождалась падением флуоресцентного сигнала. Тем не менее, маловероятно, что на данном этапе происходят взаимодействия с $\alpha F-\alpha G$ мотивом, поскольку они одинаковы в комплексах с F-лигандом и восстановленным промежуточным продуктом – основанием Шиффа [140]. Можно предположить, что увеличенный размер флуорофорной группы tC^O дает возможность ей частично перекрываться с основаниями, расположенными в поврежденной цепи и улавливать структурные изменения, происходящие тогда, когда комплекс фермента с сайтом ДНК, содержащей повреждение, трансформируется в каталитически компетентную конформацию.

Сравнение структур ДНК вблизи повреждений в случае F-сайта и восстановленного основания Шиффа указывает на то, что F-сайт располагается глубже в активном центре фермента, и свободное пространство между соседними основаниями с 5'- и 3'-стороны является более узким.

3.4. Взаимодействие мутантных форм фермента *Endo III*, содержащих замены каталитических аминокислотных остатков K120A и D138A с ДНК-субстратами

Для более подробного выяснения деталей взаимодействия *Endo III* с ДНК использовали мутантные формы фермента, содержащие замены каталитических аминокислотных остатков Lys120 и Asp138 на аланин.

3.4.1. Конформационные изменения цепи ДНК, содержащей повреждение, при взаимодействии с *Endo III* K120A

3.4.1.1. Взаимодействие с F-лигандом

Конформационные изменения ДНК были зарегистрированы по изменению интенсивности флуоресценции остатков 2-аPu (рисунок 26). При взаимодействии *Endo III* K120A с ДНК-дуплексом, содержащим F-сайт, наблюдается падение интенсивности флуоресценции 2-аPu до 20-30 с, аналогичное падению в случае фермента *Endo III* дикого типа (рисунок 16). Такое изменение интенсивности флуоресценции может также характеризовать стадию связывания фермента с F-содержащим ДНК-дуплексом и описывается одностадийным равновесием (схема 1). Значения констант скорости для дуплекса F-содержащего дуплекса приведены в таблице 5.

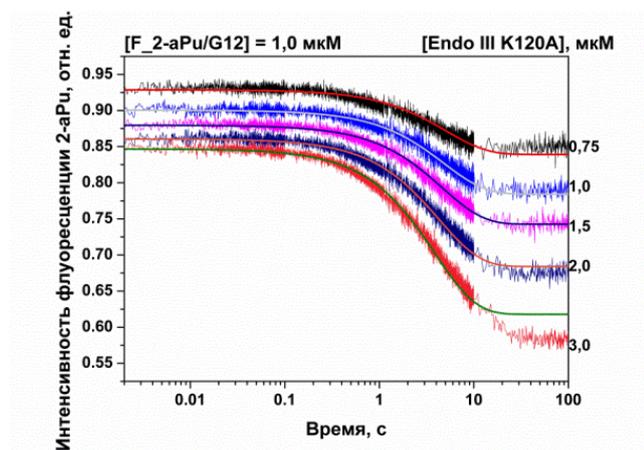


Рисунок 26. Изменение интенсивности флуоресценции 2-аPu при взаимодействии *Endo III* K120A с F_2-аPu/G12-лигандом при изменении концентрации *Endo III* K120A ($[F_2\text{-aPu/G12}] = 1,0 \text{ мкМ}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$).

3.4.1.2. Взаимодействие с DHU-субстратом

Характер изменений интенсивности флуоресценции 2-аPu при взаимодействии *Endo III* K120A с DHU-содержащим дуплексом повторяет кинетические кривые для ДНК-дуплекса, содержащего F-сайт (рисунок 27). Наблюдается падение интенсивности флуоресценции

примерно до 30-40 с, возможно, характеризующее встраивание аминокислотных остатков фермента в ДНК-дуплекс. Такие изменения описываются одной обратимой стадией (схема 6). Константы скорости реакций, соответствующих данной схеме, приведены в таблице 5.

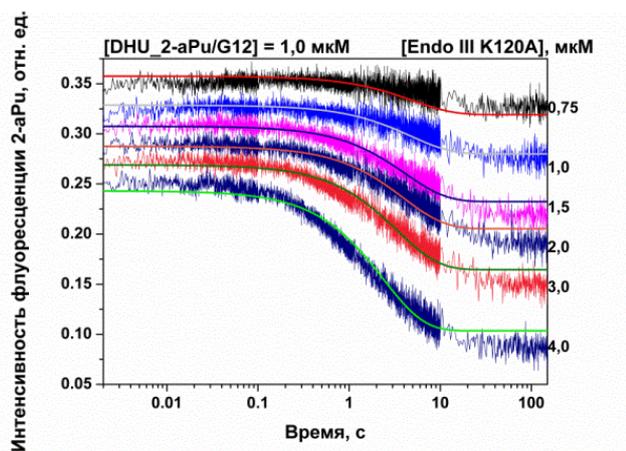
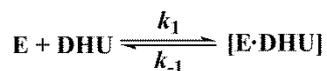


Рисунок 27. Изменение интенсивности флуоресценции 2-аPu при взаимодействии Endo III K120A с DHU_2-аPu/G12-субстратом при изменении концентрации Endo III K120A ([DHU_2-аPu/G12] = 1,0 мкМ, T = 25 °С).

Схема 6



где E – фермент, DHU – субстрат, содержащий остаток 5,6-дигидроурацила, E•DHU – комплекс фермента с субстратом.

Таблица 5. Значения констант скорости и равновесия, характеризующие взаимодействие фермента Endo III K120A с ДНК-субстратами, содержащими 2-аPu с 3'-стороны от повреждения.

Константы	ДНК	
	F_2-аPu/G12	DHU_2-аPu/G12
$k_1 \times 10^{-6}, M^{-1}c^{-1}$	0,06±0,01	0,05±0,02
k_{-1}, c^{-1}	0,11±0,02	0,06±0,02
K_1, M	$(0,5 \pm 0,1) \times 10^6$	$(0,8 \pm 0,4) \times 10^6$

3.4.2. Сравнительный анализ конформационных изменений ДНК-дуплексов, содержащих флуорофорную группу 2-аPu

Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции 2-аPu, характеризующие взаимодействие Endo III K120A с F- и DHU-содержащими дуплексами, имели схожий вид. В обоих случаях было зарегистрировано одностадийное падение интенсивности

флуоресценции, которое отражает стадию связывания фермента с ДНК-дуплексом. Константы скорости прямой и обратной стадий для F- и DHU-содержащих дуплексов практически не отличаются, однако, в случае DHU-субстрата наблюдается немного более прочное связывание за счет меньшего значения константы скорости обратной стадии k_{-1} (таблица 5). Ввиду отсутствия у Endo III K120A каталитической активности, не происходит роста интенсивности флуоресценции 2-аРи на более длительных временах, как в случае фермента дикого типа.

Сравнение данных, полученных для взаимодействия Endo III K120A и WT с F-содержащим дуплексом, показывает, что в случае мутантной формы K120A падение интенсивности флуоресценции более продолжительно и растянуто во времени. При сравнении констант скорости для Endo III K120A и фермента дикого типа оказывается, что в случае ДНК-дуплекса, содержащего F-лиганд, константа k_1 , отражающая стадию связывания, отличается всего в 2 раза, в то время как для DHU-содержащего дуплекса отличие этой константы достигает двух порядков. Поскольку, наблюдая за изменением интенсивности флуоресценции 2-аРи, удалось зарегистрировать только один конформационный переход, характеризующий образование фермент-субстратного комплекса, то полученные данные отражают суперпозицию множества процессов, происходящих при взаимодействии K120A с DHU-содержащим дуплексом.

3.4.3. Конформационные изменения комплементарной цепи ДНК, при взаимодействии с Endo III K120A

3.4.3.1. Взаимодействие с G-лигандом

При взаимодействии мутантной формы Endo III K120A с G-содержащим дуплексом, происходит уменьшение интенсивности флуоресценции в интервале времени до 10 с, которое можно описать одной обратимой стадией (схема 4). Такое изменение интенсивности флуоресценции отражает процесс неспецифического связывания мутантной формы фермента с ДНК-дуплексом (рисунок 28). Значения констант скорости реакций, соответствующих схеме 4, представлены в таблице 6.

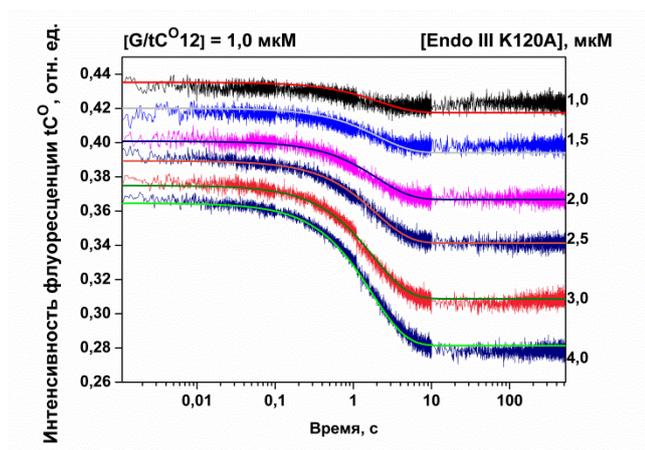


Рисунок 28. Изменение интенсивности флуоресценции tC^O при взаимодействии Endo III K120A с G/tC^O12 -лигандом при изменении концентрации Endo III K120A ($[G/tC^O12] = 1,0$ мкМ, $T = 25$ °C).

3.4.3.2. Взаимодействие с F -лигандом

При переходе от неповрежденного дуплекса, к дуплексу, содержащему F -сайт F/tC^O12 , на кинетических кривых появляются дополнительные переходы (рисунок 29). Можно выделить быстрое падение интенсивности флуоресценции, которое происходит за 10 мс; далее видна фаза роста, длящаяся до 90-100 мс, затем происходит падение интенсивности флуоресценции, которое выходит на плато к 10 с. Такие изменения на кинетических кривых соответствует трём обратимым стадиям (схема 7). Первое падение, возможно, соответствует стадии неспецифического связывания фермента с ДНК-дуплексом. Два последующих изменения могут отражать процессы встраивания аминокислот фермента в ДНК-дуплекс. Константы скорости реакций, соответствующих данной схеме, приведены в таблице 6.

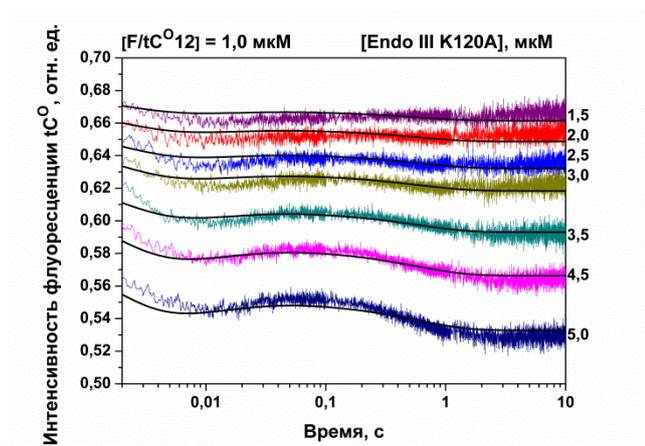
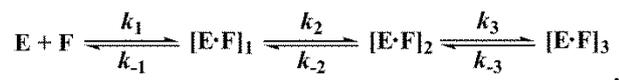


Рисунок 29. . Изменение интенсивности флуоресценции tC^O при взаимодействии Endo III K120A с F/tC^O12 -лигандом при изменении концентрации Endo III K120A ($[F/tC^O12] = 1,0$ мкМ, $T = 25$ °C).

Схема 7



где E – фермент, F – остаток тетрагидрофурана, $(E \cdot F)_n$ – комплекс фермента с нерасщепляемым лигандом.

3.4.3.3. Взаимодействие с AP-субстратом

На кинетических кривых взаимодействия Endo III K120A с ДНК-дуплексом, содержащим AP-сайт напротив tC^O , можно выделить 2 стадии падения интенсивности флуоресценции: до 150 мс и до 2 с (рисунок 30). По-видимому, обе стадии отражают стадии связывания и встраивания аминокислотных остатков фермента в ДНК-дуплекс. В отличие от фермента дикого типа, у мутантной формы фермента отсутствует фаза увеличения интенсивности флуоресценции на больших временах. Поскольку у мутантной формы Endo III K120A отсутствует каталитический остаток Lys120, отвечающий за реакцию β -элиминирования, то изменения на кинетических кривых могут соответствовать только стадиям связывания ДНК и встраивания аминокислотных остатков фермента в ДНК-дуплекс. После 2 с интенсивность флуоресценции выходит на плато. Таким изменениям удовлетворяет схема, содержащая две обратимых стадии связывания (схема 8). Константы скорости реакций, соответствующих данной схеме, приведены в таблице 6.

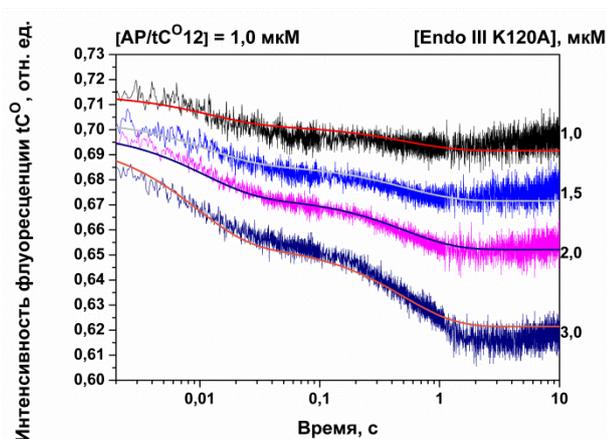


Рисунок 30. Изменение интенсивности флуоресценции tC^O при взаимодействии Endo III K120A с AP/ tC^O12 -субстратом при изменении концентрации Endo III K120A ($[AP/tC^O12] = 1,0$ мкМ, $T = 25$ °C).

Схема 8



где E – фермент, AP – субстрат, содержащий остаток дезоксирибозы, $(E \cdot AP)_n$ – комплекс фермента с субстратом.

3.4.3.4. Взаимодействие с DHU-субстратом

При анализе взаимодействия мутантной формы фермента Endo III K120A с DHU-субстратом были зарегистрированы кинетические кривые изменения интенсивности флуорофорной группы tC^O , находящейся напротив специфического повреждения 5,6-дигидроурацила (рисунок 31). Из полученных данных можно выделить стадию падения интенсивности флуоресценции tC^O примерно до 10 с. Такое изменение было охарактеризовано двумя обратимыми стадиями, которые, вероятно, соответствуют связыванию фермента с субстратом (схема 9). На кинетической кривой, соответствующей концентрации Endo III K120A = 3,0 мкМ (синяя), можно выделить две фазы падения интенсивности флуоресценции: первую – на временах менее 0,1 с, что в 10 раз медленнее, чем у фермента дикого типа, и вторую – более медленную фазу на временах менее 10 с. В отличие от фермента дикого типа, на кинетических кривых отсутствует рост интенсивности флуоресценции, который характеризует образование продукта реакции и его диссоциацию из активного центра фермента. Константы скорости отдельных стадий приведены в таблице 6.

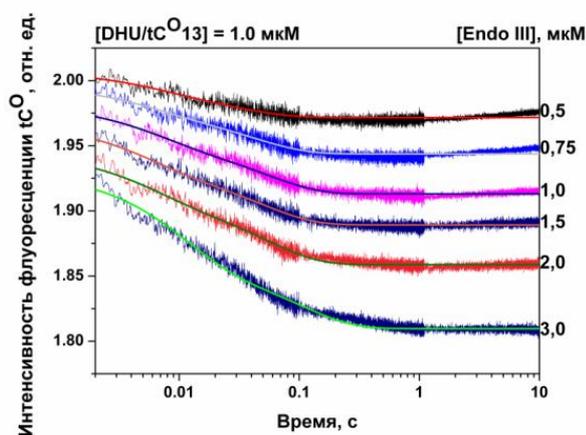


Рисунок 31. Изменение интенсивности флуоресценции tC^O при взаимодействии Endo III K120A с DHU/ tC^O13 -субстратом при изменении концентрации Endo III ($[DHU/tC^O13] = 1,0$ мкМ, $T = 25$ °C).

Схема 9



где E – фермент, DHU – субстрат, содержащий остаток 5,6-дигидроурацила, $[E \cdot DHU]_n$ – комплекс фермента с субстратом.

Таблица 6. Значения констант скорости и равновесия, характеризующие взаимодействие фермента Endo III K120A с ДНК-субстратами, содержащими остаток tC⁰ напротив повреждения.

Константы	ДНК			
	G/tC ⁰ 12	F/tC ⁰ 12	AP/tC ⁰ 12	DHU/tC ⁰ 13
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	0,03±0,01	10±1	16±4	8±2
k_{-1}, c^{-1}	0,42±0,03	210±40	190±50	60±20
$K_1 \times 10^{-5}, \text{M}^{-1}$	0,07±0,02	0,50±0,01	0,8±0,3	1,3±0,5
k_2, c^{-1}	-	50±10	0,6±0,3	5±1
k_{-2}, c^{-1}	-	40±10	2,3±0,3	12±2
K_2	-	1,1±0,5	0,3±0,1	0,4±0,1
k_3, c^{-1}	-	2,0±0,4	-	-
k_{-3}, c^{-1}	-	1,5±0,2	-	-
K_3	-	1,3±0,3	-	-
$K_{\text{ass}} \times 10^{-4}, \text{M}^{-1}$	-	7±2	3±2	5±3

3.4.4. Анализ накопления продуктов реакции в зависимости от времени

Были выполнены эксперименты по прямому наблюдению за накоплением продуктов реакции с использованием радиоактивно-меченных субстратов, содержащих DHU либо AP-сайт напротив G (рисунок 32). Поскольку у Endo III K120A отсутствует каталитический остаток Lys120, участвующий в реакции β-элиминирования, то пробы с DHU-содержащим субстратом обрабатывали 1 М раствором NaOH. В использованном временном диапазоне (последняя точка – 60 минут) не удалось зарегистрировать накопление продукта. Для сравнения, расщепление субстрата ферментом дикого типа составляло 90% в точке равной 60 с (рисунок 24). Это говорит о том, что замена каталитического Lys120 на аланин приводит к потере способности фермента осуществлять не только AP-лиазную активность, но и N-гликозилазную активность. Эти данные были подтверждены как электрофоретическими экспериментами, так и методом «остановленного потока».

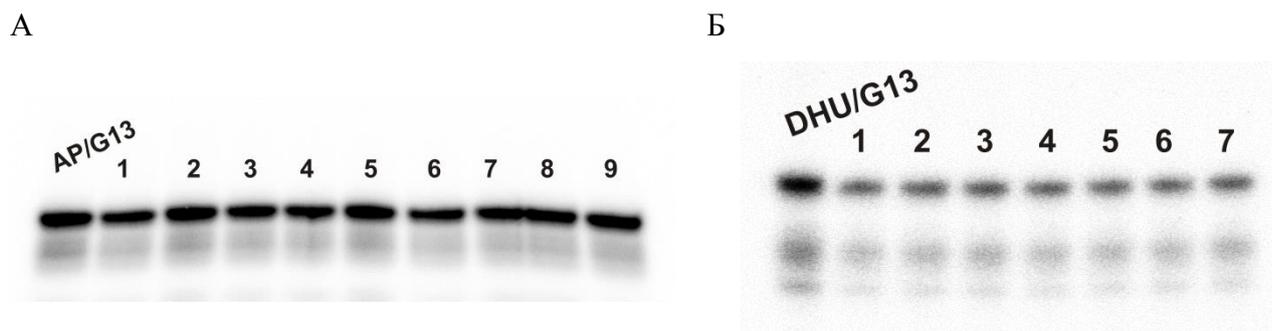


Рисунок 32. (А) Анализ продуктов расщепления AP-субстрата мутантной формой Endo III K120A ($[\text{Endo III K120A}] = 2,0 \text{ мкМ}$, $[\text{ДНК-субстрат}] = 1,0 \text{ мкМ}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$). Время: 1 – 10 с, 2 – 30 с, 3 – 1 мин, 4 – 2 мин, 5 – 5 мин, 6 – 10 мин, 7 – 15 мин, 8 – 30 мин, 9 – 60 мин (Б) Анализ продуктов расщепления DHU-субстрата мутантной формой Endo III K120A после обработки NaOH ($[\text{Endo III K120A}] = 2,0 \text{ мкМ}$, $[\text{ДНК-субстрат}] = 1,0 \text{ мкМ}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$). Время: 1 – 5 мин, 2 – 10 мин, 3 – 20 мин, 4 – 30 мин, 5 – 40 мин, 6 – 50 мин, 7 – 60 мин.

Для проверки активности другой использованной в работе мутантной формы фермента Endo III D138A также использовали радиоактивно-меченные субстраты, содержащие DHU либо AP-сайт. Так же, как и для мутантной формы K120A, взаимодействие D138A с данными субстратами не приводило к накоплению продукта (рисунок 33).

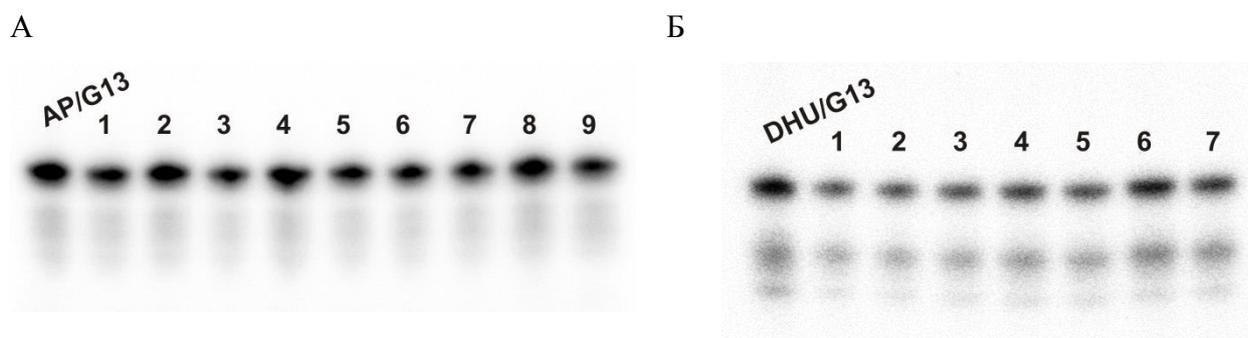


Рисунок 33. (А) Анализ продуктов расщепления AP-субстрата мутантной формой Endo III D138A ($[\text{Endo III D138A}] = 2,0 \text{ мкМ}$, $[\text{ДНК-субстрат}] = 1,0 \text{ мкМ}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$). Время: 1 – 10 с, 2 – 30 с, 3 – 1 мин, 4 – 2 мин, 5 – 5 мин, 6 – 10 мин, 7 – 15 мин, 8 – 30 мин, 9 – 60 мин (Б) Анализ продуктов расщепления DHU-субстрата мутантной формой Endo III D138A после обработки NaOH ($[\text{Endo III D138A}] = 2,0 \text{ мкМ}$, $[\text{ДНК-субстрат}] = 1,0 \text{ мкМ}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$). Время: 1 – 5 мин, 2 – 10 мин, 3 – 20 мин, 4 – 30 мин, 5 – 40 мин, 6 – 50 мин, 7 – 60 мин.

При регистрации изменения интенсивности флуоресценции tC^O , находящегося в составе DHU-субстрата, в процессе взаимодействия с Endo III D138A не наблюдали изменений флуоресценции (рисунок 34). На полученной кинетической кривой отсутствует падение интенсивности флуоресценции на начальном участке, относящееся к первичному связыванию фермента с ДНК-дуплексом, что свидетельствует о потере способности фермента образовывать фермент-субстратный комплекс. Также на полученной экспериментальной кривой отсутствует рост интенсивности флуоресценции tC^O на длительных временах, который мог бы означать

расщепление DHU-субстрата, что, в совокупности с данными, полученными при прямом наблюдении за образованием продукта реакции, позволяет сделать заключение о том, что мутантная форма D138A не обладает каталитической активностью. По-видимому, замена D138A приводит к тому, что фермент теряет способность связываться с ДНК.

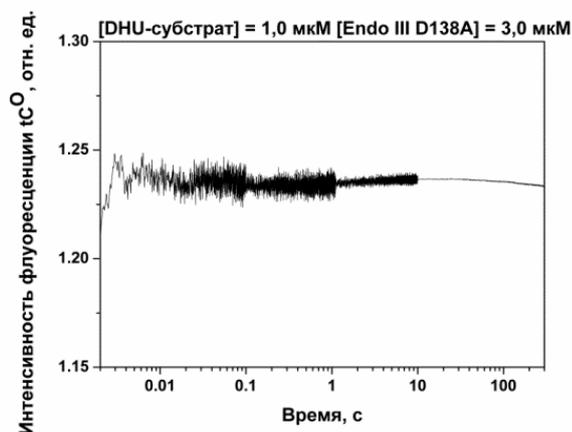


Рисунок 34. Изменение интенсивности флуоресценции tC^O при взаимодействии с Endo III D138A с DHU/ tC^O 13-субстратом ($[DHU/tC^O13] = 1,0$ мкМ, $[D138A \text{ Endo III}] = 3,0$ мкМ, $T = 25$ °C).

3.4.5. Сравнительный анализ конформационных изменений ДНК-дуплексов, содержащих флуорофорную группу tC^O

Используя ДНК-дуплексы, содержащие различные лиганды, удалось зарегистрировать различные конформационные переходы в ДНК-дуплексе, при его взаимодействии с Endo III K120A. Так, на кинетических кривых для ДНК-дуплексов, содержащих F-сайт, AP-сайт и DHU присутствует одинаковое изменение интенсивности флуоресценции tC^O – падение до 10-20 мс. Такое изменение отражает неспецифическое связывание фермента с ДНК, которое может отражать процесс встраивания аминокислотных остатков фермента в ДНК-дуплекс, что подтверждает небольшой разброс значений констант прямой и обратной реакции k_1 и k_{-1} , соответственно (таблица 6). Для специфических субстратов, содержащих AP-сайт и DHU, происходит ещё одна стадия падения интенсивности флуоресценции до 2-3 с, которая может отражать процесс выворачивания поврежденного основания в активный центр фермента, при этом значения констант скорости этой стадии (k_2 и k_{-2}) практически не отличаются, что может говорить о том, что после прочного связывания, фермент способен одинаково эффективно выворачивать в активный центр как нуклеотид с повреждённым основанием, так и остаток 2'-дезоксирибозы. Для F-содержащего дуплекса изменения на кинетических кривых флуоресценции содержат несколько другие изменения: присутствуют стадии роста (до 100 мс) и падения (до 2-3 с). По-видимому, прежде чем быть вывернутым в активный центр фермента,

F-содержащий дуплекс подвергается дополнительному конформационному переходу. Возможно эта дополнительная стадия является следствием отсутствия гидроксильной группы у C1' атома.

Однако, в случае взаимодействия мутантной формы Endo III D138A с DHU/tC^O-субстратом, изменения интенсивности флуоресценции tC^O зарегистрировано не было. Так же при замене Asp138 на Ala фермент Endo III теряет способности катализировать и гидролиз N-гликозидной связи, и реакцию β-элиминирования. Из этого можно сделать вывод, что участие Asp138 во взаимодействиях с ДНК важно не только на этапе катализа химической реакции, но и на самих ранних этапах взаимодействия с ДНК.

3.5. Кинетический анализ взаимодействия *Endo III* WT с ДНК субстратами при разных температурах

Для уточнения природы зарегистрированных изменений интенсивности флуоресценции флуорофорной группы tC^O при взаимодействии с диким типом *Endo III*, методом «остановленного потока» были проведены серии экспериментов при различных температурах (5-37 °С). Для этого использовали 17-звенные ДНК дуплексы, содержащие повреждения разной степени специфичности (G, F-сайт и DHU) в одной из цепей, а в комплементарной – флуорофорную группу tC^O .

3.5.1. Взаимодействие с G-лигандом

Методом «остановленного потока» были получены кинетические кривые, характеризующие изменение интенсивности флуоресценции флуорофорной группы tC^O , находящейся напротив остатка гуанина в ДНК-дуплексе. Такое взаимодействие отражает неспецифическое связывание фермента *Endo III* с ДНК, поскольку фермент не может расщепить этот субстрат. На рисунке 35 представлена концентрационная серия кривых при 30 °С.

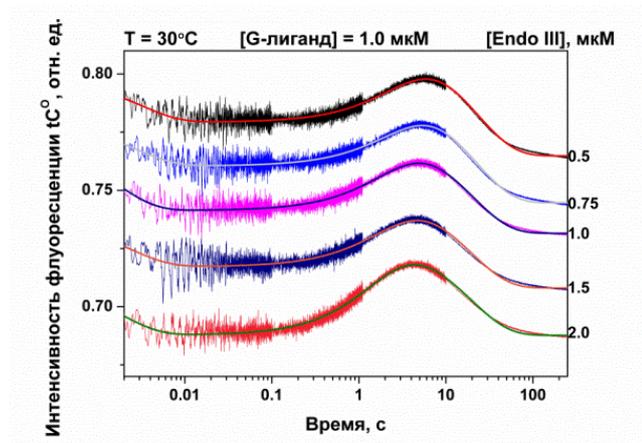
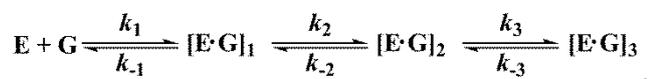


Рисунок 35. Изменение интенсивности флуоресценции tC^O при взаимодействии *Endo III* с G/ tC^O 17 лигандом при изменении концентрации *Endo III*, $[G/tC^O17] = 1,0$ мкМ, $T = 30$ °С.

На полученных кривых присутствуют несколько фаз изменения интенсивности флуоресценции. Можно выделить фазу падения интенсивности флуоресценции tC^O , заканчивающуюся примерно к 10 мс. Далее происходит рост интенсивности флуоресценции, достигающий максимальной амплитуды к 8 с, после которого следует ещё одно падение интенсивности флуоресценции, выходящее на плато примерно к 100 с. С увеличением концентрации фермента можно отметить увеличение амплитуды сигнала и более быстрое протекание всех фаз изменения флуоресцентного сигнала. Данный процесс был описан схемой,

включающей в себя три обратимых стадии связывания (схема 10). Полученные в результате обработки данных константы скоростей прямых и обратных стадий представлены в таблице 7.

Схема 10



где E – фермент, G – лиганд, $[E \cdot G]_i$ – фермент-субстратный комплекс.

Первое падение интенсивности флуоресценции, по-видимому, связано с изменением окружения флуорофорной группы tC^O на более гидрофобное. Подобную фазу можно наблюдать для двух других использованных субстратов, F и DHU, хотя в случае неспецифического дуплекса амплитуда сигнала значительно меньше. Вероятно, данная стадия протекает быстрее для неспецифического дуплекса, и основные изменения сигнала проходят за мёртвое время смешения растворов. Тем не менее, данный процесс может отражать неспецифическое связывание Endo III с ДНК-дуплексом. Дальнейший рост интенсивности флуоресценции может быть связан с изменением микроокружения флуорофорной группы на более гидрофильное, однако флуоресценция tC^O также является чувствительной к одноцепочечному/двухцепочечному состоянию ДНК.

Как видно из рисунка 36, при понижении температуры некоторые изменения интенсивности флуоресценции tC^O пропадают. Для всех температур присутствует фаза падения интенсивности флуоресценции, заканчивающаяся примерно к 10 мс. При более низких температурах стоит отметить замедление этой фазы, в то время как при увеличении температуры данная стадия ускоряется настолько, что, по-видимому, проходит за мёртвое время прибора. Кроме того, для всех температур можно выделить фазу роста интенсивности флуоресценции. При этом, в температурном диапазоне от 20 до 37 °С, после роста интенсивности флуоресценции наблюдается фаза падения флуоресцентного сигнала, которая отсутствует для кривых, полученных при 5, 10 и 15 °С. Таким образом, для кривых от 20 до 37 °С можно выделить три характерных фазы изменения интенсивности флуоресценции, а для кривых, полученных от 5 до 15 °С, всего две. Как видно из рисунка 36, вторая стадия роста флуоресцентного сигнала зависит от температуры. При 37 °С рост происходит сигнала продолжается примерно до 3 с, тогда как при 5 °С фаза роста продолжается до 100 с, что приводит к различию в величине k_2 примерно в 30 раз (таблица 7).

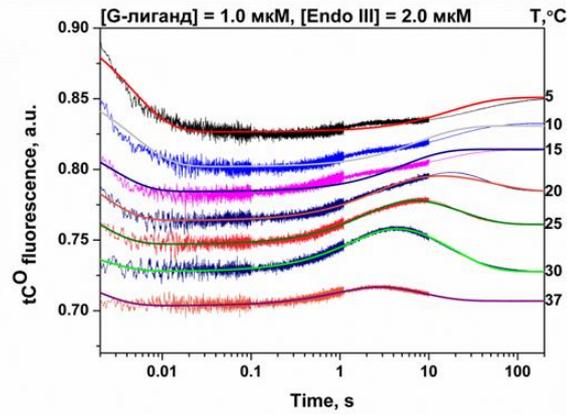


Рисунок 36. Изменение интенсивности флуоресценции tC^O при взаимодействии Endo III с G/ tC^O 17 лигандом при изменении температуры от 5 до 37 °C, ($[G/tC^O17] = 1,0$ мкМ, $[Endo III] = 2,0$ мкМ).

Таблица 7. Значения констант скорости и равновесия, характеризующих взаимодействие фермента Endo III с G-лигандом, содержащим напротив остаток tC^O , при разных температурах.

Константы	T, °C						
	5	10	15	20	25	30	37
$k_1 \times 10^{-6}, M^{-1}c^{-1}$	27±2	30±4	45±5	52±5	61±4	70±10	72±3
k_{-1}, c^{-1}	110±3	130±10	240±10	300±20	360±10	380±40	500±20
$K_1 \times 10^{-6}, M^{-1}$	0,25±0,01	0,23±0,04	0,19±0,02	0,18±0,02	0,17±0,01	0,17±0,03	0,15±0,01
k_2, c^{-1}	0,034±0,006	0,15±0,05	0,33±0,01	0,5±0,1	0,6±0,1	0,9±0,3	1,0±0,2
k_{-2}, c^{-1}	0,013±0,003	0,04±0,01	0,078±0,004	0,09±0,03	0,07±0,03	0,12±0,06	0,5±0,1
K_2	2,6±0,8	4±2	4,2±0,2	5±3	9±4	8±5	2,0±0,6
k_3, c^{-1}	-	-	-	0,004±0,002	0,014±0,004	0,017±0,003	0,029±0,006
k_{-3}, c^{-1}	-	-	-	0,015±0,003	0,050±0,004	0,05±0,02	0,09±0,04
K_3	-	-	-	0,3±0,1	0,27±0,09	0,3±0,1	0,3±0,2
$K_{ass} \times 10^{-5}, M^{-1}$	7±2	8±5	8±1	3±1	4±1	4±1	1,0±0,4

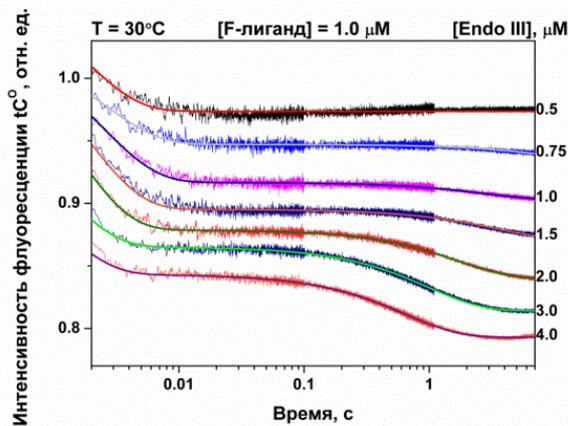
3.5.2. Взаимодействие с F-лигандом

При взаимодействии фермента Endo III с субстратом, содержащим нерасщепляемый аналог AP-сайта, можно выделить несколько изменений интенсивности флуоресценции tC^O . Связывание F-лиганда с ферментом Endo III вызывает двухфазные изменения интенсивности флуоресценции tC^O (рисунок 37). Так на кривых, полученных при всех температурах присутствует быстрое падение интенсивности флуоресценции заканчивающееся примерно за

0,1 с. Такое же изменение присутствует и на кривых, полученных для ДНУ, и, по-видимому, отражает один и тот же процесс, а именно первичное неспецифическое связывание фермента с ДНК-дуплексом. Однако, при повышении температуры, начиная с 15 °С, на кинетических кривых можно выделить дополнительное изменение интенсивности флуоресценции tC^O . Можно наблюдать ещё одну фазу падения интенсивности флуоресценции, примерно заканчивающуюся к 10 с. Такое падение флуоресцентного сигнала говорит об образовании более гидрофобной области возле флуорофорной группы. Примечательно, что на кривых, полученных для расщепляемого ДНУ-субстрата, также присутствуют две стадии падения флуоресценции, однако вторая стадия проходит значительно быстрее, практически на 1,5 порядка.

Данные полученные методом «остановленного потока» для различных концентраций Endo III при фиксированной концентрации ДНК при каждой температуре были обработаны в соответствии с механизмом, включающем в себе две обратимые стадии (схема 11). Рассчитанные константы скорости прямых и обратных стадий, а также константы равновесия представлены в таблице 8.

А



Б

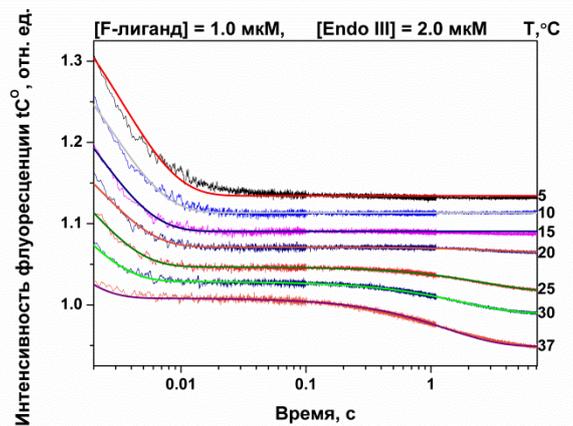


Рисунок 37. Изменение интенсивности флуоресценции tC^O при взаимодействии Endo III с F/ tC^O 17 лигандом (А) при изменении концентрации Endo III, $[F/tC^O17] = 1,0$ мкМ, $T = 30$ °С (Б) при изменении температуры от 5 °С до 37 °С, $[F/tC^O17] = 1,0$ мкМ, $[Endo III] = 2,0$ мкМ.

Схема 11



где E – фермент, F – лиганд, $[E \cdot F]_i$ – фермент-субстратный комплекс.

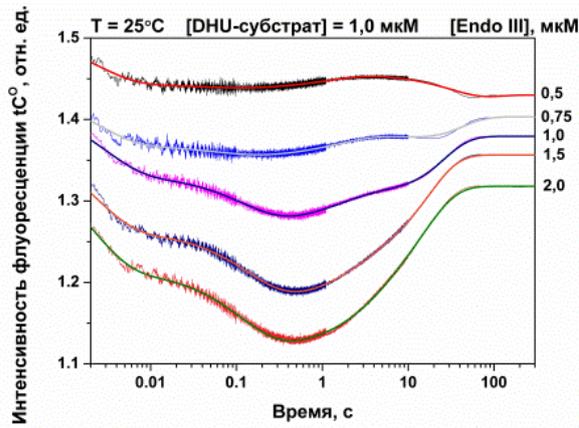
Таблица 8. Значения констант скорости и равновесия, характеризующих взаимодействие фермента Endo III с F-лигандом, содержащим напротив остаток tC⁰, при разных температурах.

Константы	Т, °С						
	5	10	15	20	25	30	37
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	90±20	100±20	100±20	100±10	160±20	172±6	190±30
k_{-1}, c^{-1}	120±10	150±20	170±20	210±20	300±50	395±6	530±30
$K_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	0,7±0,1	0,7±0,1	0,6±0,1	0,49±0,06	0,5±0,1	0,44±0,02	0,36±0,06
k_2, c^{-1}	-	-	-	0,005±0,001	0,06±0,01	0,19±0,01	0,23±0,06
k_{-2}, c^{-1}	-	-	-	0,17±0,04	0,37±0,02	0,804±0,003	0,50±0,02
K_2	-	-	-	0,03±0,01	0,15±0,04	0,24±0,01	0,5±0,1
$K_{\text{ass}}, \text{M}^{-1}$	-	-	-	$(1,5 \pm 0,7) \times 10^4$	$(8 \pm 4) \times 10^4$	$(1,0 \pm 0,8) \times 10^5$	$(1,7 \pm 0,6) \times 10^5$

3.5.3. Взаимодействие с DHU-субстратом

Для DHU-содержащего субстрата набор tC⁰ флуоресцентных кривых, полученных при различных температурах и при варьировании концентрации фермента Endo III представлен на рисунке 38. Как показано на рисунке, изменения интенсивности флуоресценции tC⁰ содержат по крайней мере четыре фазы: две фазы падения интенсивности флуоресценции (до 10 мс и 200 мс соответственно) и две фазы увеличения интенсивности флуоресценции (до 5 с и 30 с). Для каждой температуры набор флуоресцентных кривых был обработан кинетической схемой 3, соответствующей ранее полученному механизму для флуоресцентных кривых, полученных при регистрации изменения интенсивности флуоресценции 2-аРи и tC⁰. Константы скорости элементарных стадий и константы равновесия приведены в таблице 9.

А



Б

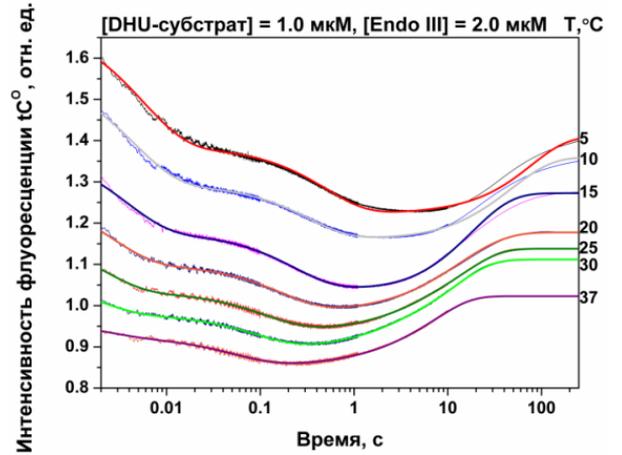


Рисунок 38. Изменение интенсивности флуоресценции tC^0 при взаимодействии Endo III с DHU/ tC^0 17 субстратом. (А) при изменении концентрации Endo III, $[DHU/tC^0 17] = 1,0$ мкМ, $T = 30$ °С, (Б) при изменении температуры от 5 °С до 37 °С, $[Endo III] = 2,0$ мкМ, $[DHU/tC^0 17] = 1,0$ мкМ.

Таблица 9. Значения констант скорости и равновесия, характеризующих взаимодействие фермента Endo III с DHU-субстратом, содержащим напротив остаток tC^0 .

Константы	Т, °С						
	5	10	15	20	25	30	37
$k_1 \times 10^{-6}, M^{-1} c^{-1}$	50±7	60±10	90±10	100±20	116±5	130±30	144±7
k_{-1}, c^{-1}	47±6	60±10	90±20	110±20	150±10	170±20	210±40
$K_1 \times 10^{-6}, M^{-1}$	0,4±0,2	1,0±0,3	1,0±0,2	0,9±0,2	0,8±0,1	0,8±0,2	0,7±0,1
k_2, c^{-1}	2,1±0,7	2,6±0,4	3,5±0,3	3,8±0,4	3,8±0,4	5±1	10±2
k_{-2}, c^{-1}	1,0±0,1	1,3±0,1	2,0±0,4	4,1±0,5	5,5±0,2	7±1	15±1
K_2	2,2±0,7	1,9±0,4	1,8±0,4	0,9±0,1	0,7±0,1	0,7±0,2	0,7±0,1
k_{cat}, c^{-1}	0,027±0,006	0,045±0,007	0,13±0,03	0,27±0,06	0,39±0,04	0,41±0,09	0,8±0,2
$K_{ass} \times 10^{-6}, M^{-1}$	0,9±0,8	2±1	1,8±0,8	0,8±0,3	0,6±0,2	0,6±0,3	0,5±0,1
$K_p \times 10^6, M$	0,3±0,2	0,3±0,2	0,6±0,5	0,7±0,6	2±1	1±1	3±2

Необходимо отметить, что первая фаза падения интенсивности флуоресценции, соответствующая образованию неспецифического комплекса, в котором фермент нарушает структуру ДНК и окружение флуорофора становится более полярным, имеет схожую форму как для DHU-субстрата, так и для F- и G-лигандов. Тем не менее, константы ассоциации этой стадии K_1 повышаются в ряду $G < F < DHU$ указывая на то, что происходит стабилизация начального комплекса с поврежденной ДНК.

Вторая стадия снижения интенсивности флуоресценции tC^O связана с распознаванием основания DHU и его выворачиванием из двойной спирали ДНК, как предполагалось ранее. В этом случае tC^O становится более доступным для полярных молекул воды. На этом этапе была обнаружена значительная разница между специфическим DHU-субстратом и не специфическим G-лигандом, что указывает на то, что вторая стадия является наиболее важной для дискриминации между поврежденным и неповрежденным гетероциклическим основанием.

Третья фаза, при которой флуоресцентный сигнал повышается в случае DHU-субстрата, соответствует трансформации фермент-субстратного комплекса в каталитически активную конформацию необходимую для осуществления гидролиза N-гликозидной связи и AP-лиазной реакции. Согласно имеющимся данным о структуре комплекса фермента Endo III из *G. stearothermophilus* с DHU-субстратом аминокислотные остатки Leu82 и Gln42 внедряются в спираль ДНК (Leu81 и Gln41 в Endo III из *E. coli*) и 5,6-дигидроурацил вывернут в активный центр фермента. Такие структурные перестройки приводят к тому, что окружение tC^O становится менее полярным, что приводит к увеличению флуоресцентного сигнала. Последняя четвертая стадия, в которой флуоресцентный сигнал выходит на плато соответствует обратимой диссоциации фермент-субстратного комплекса.

3.5.4. Кинетика накопления продукта реакции при различной температуре

Методом электрофореза в ПААГ были получены данные о накоплении продукта реакции (рисунок 39). Ранее было показано, что AP-лиазная реакция не является лимитирующей и протекает со скоростью, примерно равной скорости N-гликозилазной реакции. Это согласуется с полученными данными, в которых регистрировали только одно изменение интенсивности флуоресценции в процессе удаления DHU. Характерные времена накопления ДНК-продукта совпадают с характерными временами увеличения интенсивности флуоресценции tC^O в интервале от 1 до 100 с, что указывает на то, что изменения интенсивности флуоресценции в этом интервале отражают химические стадии ферментативной реакции.

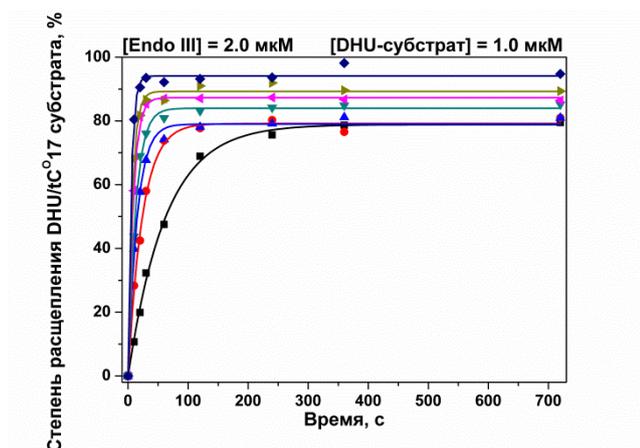


Рисунок 39. Накопление продукта превращения субстрата ДНУ/тС⁰17 в зависимости от температуры (■ – 5 °С, ● – 10 °С, ▲ – 15 °С, ▼ – 20 °С, ◆ – 25 °С, ▲ – 30 °С, ◆ – 37 °С).

3.5.5. Термодинамический анализ взаимодействия Endo III с ДНК-субстратами

Исследуя быстропротекающие процессы методом «остановленного потока» можно определить термодинамические параметры, при проведении реакции при различной температуре. На основании значений констант скорости отдельных стадий, соответствующих определенному механизму, были рассчитаны константы равновесия стадий, входящих в кинетическую схему. Для определения термодинамических параметров ΔH^0 и ΔS^0 взаимодействия Endo III с ДНК были построены зависимости $\ln(K)$ и $\ln(k_i/T)$ от $1/T$.

3.5.5.1. Взаимодействие с G-лигандом

При анализе флуоресцентных кривых взаимодействия G-содержащего лиганда с Endo III минимальная кинетическая схема содержала три стадии превращения (схема 10). Для каждой стадии были определены термодинамические константы равновесия K_i , и построена их зависимость от температуры (рисунок 40), согласно уравнению (2).

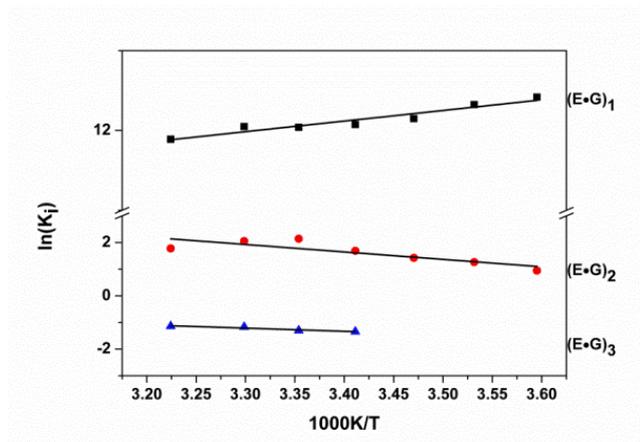


Рисунок 40. Взаимодействие Endo III с G-лигандом. Зависимость $\ln(K_i)$ от $1/T$.

Рассчитанные термодинамические параметры ΔH^0 и ΔS^0 , а также значения стандартной энергии Гиббса ΔG^0_i для 25 °С представлены в таблице 10.

Таблица 10. Термодинамические параметры отдельных стадий взаимодействия ДНК-гликозилазы Endo III с G- и F-лигандами и DHU-субстратом.

ДНК	Номер стадии	ΔH^0 , ккал/моль	ΔS^0 , кал/(моль×К)	ΔG^0_{298} , ккал/моль	Описание стадии
G/tC ⁰	1	-2,6±0,3	15,1±1,1	-7,1±0,1	Первичное связывание, предположительное встраивание Leu81, уменьшение полярности окружения tC ⁰
	2	5,5±1,5	22±5	-1,3±0,3	Предположительное встраивание Gln41, увеличение полярности окружения tC ⁰
	3	2,3±0,5	5,3±1,4	0,7±0,2	Попытка выворачивания какого-либо основания в активный центр фермента, уменьшение полярности окружения tC ⁰
	$\sum_{i=1}^{i=3}$	5,2±2,3	42,4±7,8	-7,7±0,6	
F/tC ⁰	1	-3,5±0,4	14±1	-7,8±0,1	Первичное связывание, предположительное встраивание Leu81, уменьшение полярности окружения tC ⁰
	2	17,0±0,1	53,3±0,5	1,1±0,2	Предположительное встраивание Gln41, уменьшение полярности окружения tC ⁰
	$\sum_{i=1}^{i=2}$	13,5±0,5	67,3±1,5	-6,7±0,3	
DHU/tC ⁰	1	-2,4±0,2	19±1	-8,0±0,1	Первичное связывание, предположительное встраивание Leu81, уменьшение полярности окружения tC ⁰
	2	-7,5±1,2	-25±4	0,2±0,1	Предположительное встраивание Gln41, образование каталитически компетентного комплекса, уменьшение полярности окружения tC ⁰
	$\sum_{i=1}^{i=2}$	-9,9±1,4	-6,0±5,0	-7,8±0,3	
	3	18±2*	-1,0±0,1*	18±2*	Переходное состояние каталитической химической реакции, увеличение полярности окружения tC ⁰
	4	-11±2	9±6	-7,9±0,5	Образование комплекса с продуктом реакции, увеличение полярности окружения tC ⁰

*Рассчитано по уравнению (3).

3.5.5.2. Взаимодействие с F-лигандом

Для определения термодинамических параметров взаимодействия F-лиганда с Endo III использовали аналогичный подход, что и для G-лиганда. При анализе полученных флуоресцентных кривых взаимодействия F-лиганда с Endo III минимальная кинетическая схема содержала две стадии связывания ДНК с ферментом (схема 11). Построенная зависимость рассчитанных констант равновесия K_i от $1/T$ имела линейный вид (рисунок 41). Рассчитанные термодинамические параметры ΔH^0 и ΔS^0 , а также значения стандартной энергии Гиббса ΔG_i^0 для 25 °С представлены в таблице 10.

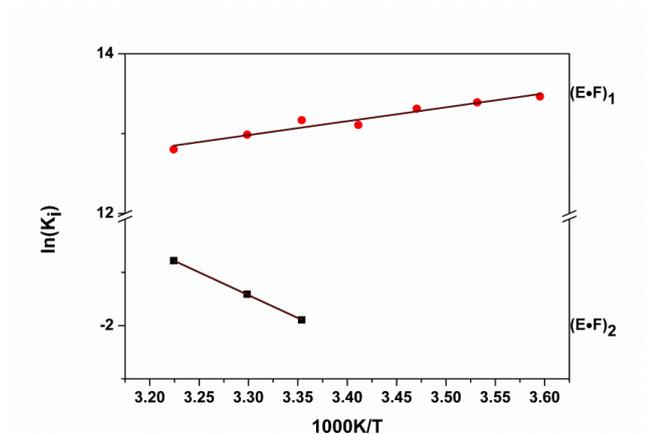
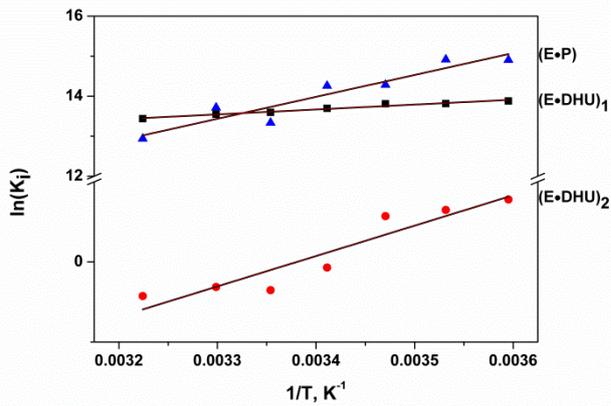


Рисунок 41. Взаимодействие Endo III с F-лигандом. Зависимость $\ln(K_i)$ от $1/T$ в соответствии с уравнением Вант-Гоффа.

3.5.5.3. Взаимодействие с DHU-субстратом

При анализе конформационных изменений ДНК-субстрата было определено, что минимальная кинетическая схема его взаимодействия с Endo III включает четыре стадии (схема 3). Зависимость K_i от $1/T$ также имела линейный вид (рисунок 42). Зависимость величины константы скорости необратимой химической стадии k_{cat} от температуры соответствовала уравнению (3). Рассчитанные термодинамические параметры ΔH^0 и ΔS^0 , а также значения стандартной энергии Гиббса ΔG_i^0 при 25 °С представлены в таблице 10. Там же приведены значения свободной энергии (ΔG^0 при 25 °С), энтальпии и энтропии активации.

А



Б

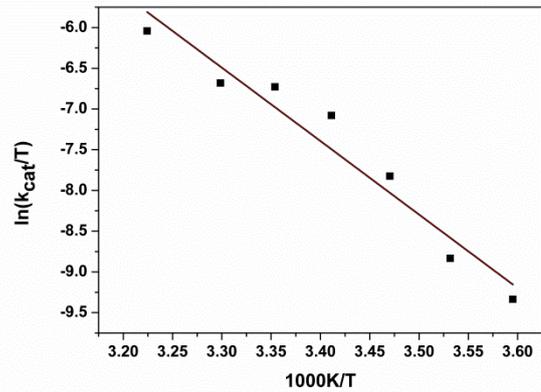


Рисунок 42. Взаимодействие Endo III с DHU-субстратом. (А) Зависимость $\ln(K_i)$ от $1/T$ в соответствии с уравнением Вант-Гоффа (2); (Б) Зависимость $\ln(k_i/T)$ от $1/T$ в соответствии с уравнением Эйринга (3).

3.5.5.4. Сравнительный анализ термодинамических данных

Образование первого комплекса для любого из исследованных ДНК-дуплексов связано с отрицательным изменением энтальпии и положительным изменением энтропии, что указывает на схожую природу взаимодействий на этапе образования начального фермент-субстратного комплекса. Наиболее вероятно это связано с плавлением ДНК в точке контакта и конформационным изменениям в ДНК-связывающем сайте Endo III. Значение изменения энергии Гиббса равное минус 7 ккал/моль является типичным для комплексов фермент-ДНК [189]. Образование комплекса фермент-ДНК ограничивает конформационные движения фермента и ДНК, тем самым приводя к снижению энтропии. Повышение энтропии обеспечивается высвобождением молекул воды из области контакта фермент-ДНК, как в случае [190–192]. Изменения интенсивности флуоресценции tC^O при образовании первичного комплекса свидетельствуют о нарушении стэкинга оснований. Такое нарушение конформации ДНК в случае специфического и неспецифического комплексов может быть результатом попыток фермента вывернуть нуклеотид вне зависимости от того поврежден он или нет. Активное выворачивание неповрежденного гетероциклического основания из ДНК в процессе поиска повреждения было обнаружено для фермента человека hOGG1. Кроме этого, на всех доступных структурах комплексов ДНК-гликозилаз с неповрежденной ДНК, в ДНК уже внедрен "вклинивающийся" аминокислотный остаток фермента. Полученные кинетические данные и данные о структуре фермент-субстратного комплекса позволили предположить, что таким аминокислотным остатком у Endo III является Leu81. Таким образом, возможные молекулярные события, приводящие к падению интенсивности флуоресценции tC^O на первой стадии связывания с ДНК, могут быть внедрением Leu81 в двойную спираль как часть процесса

поиска повреждения, что влияет на микроокружение tC^O в полностью комплементарном неповреждённом ДНК-дуплексе.

Вторая стадия взаимодействия с DHU-субстратом и F-лигандом также приводит к падению интенсивности флуоресценции tC^O , что отражает образование каталитически компетентного состояния. Тем не менее, термодинамические параметры этой стадии значительно отличаются для этих ДНК-дуплексов. Вторая стадия для DHU-субстрата характеризуется отрицательным изменением энтальпии и отрицательным изменением энтропии. На данном этапе поврежденный нуклеотид выворачивается в активный центр фермента и образуются новые контакты между аминокислотными остатками в активном центре и основанием DHU. Кроме того, новые контакты образуются и между аминокислотными остатками Leu81 и Gln41 в процессе их встраивания в ДНК. При этом структура фермент-субстратного комплекса становится более жесткой и компактной, что объясняет уменьшение энтропии. В случае F-лиганда отсутствие поврежденного основания приводит к потере этих специфичных контактов, тем самым вызывая положительное изменение энтальпии и энтропии на данной стадии. Расходование энергии на этой стадии компенсируется возрастанием энтропии, предположительно из-за дегидратации бороздок ДНК в области контакта с ферментом. В результате, эта стадия характеризуется малыми величинами энергии Гиббса как для DHU-субстрата, так и для F-лиганда. Такой энергетический профиль является очень важным для трансформации структуры фермент-субстратного комплекса в каталитически компетентное состояние.

В случае неспецифического G-лиганда в процессе второй стадии, фермент образует контакты с обеими цепями ДНК. При этом, остаток Gln41 взаимодействует с основанием, расположенным напротив поврежденного нуклеотида. Следовательно, из-за этих взаимодействий, микроокружение tC^O становится менее полярным и интенсивность флуоресценции tC^O повышается. На третьей стадии интенсивность флуоресценции tC^O снова падает. Вероятно, внедрение аминокислотных остатков в двойную спираль ДНК приводит к вытеснению нуклеотидов, включая tC^O , во внешнюю полярную область цепи ДНК. Третья стадия взаимодействия Endo III с G-лигандом является энергетически нейтральной ($\Delta G^0_{298} = 0,7 \pm 0,2$ ккал/моль), но происходит очень медленно. Эта стадия, вероятно, отражает попытки фермента вывернуть неповрежденное гетероциклическое основание в активный центр фермента.

Таким образом, при сравнительном анализе термодинамических данных было установлено, что общие термодинамические изменения между процессами связывания Endo III со специфическим и неспецифическим дуплексом имеют четкие качественные отличия. Суммарное связывание с G- и F-лигандами характеризуется положительным изменением

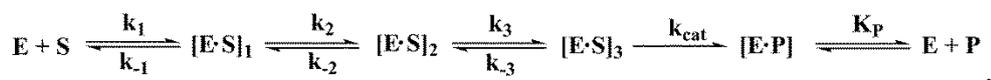
энтропии и энтальпии, но в случае связывания с DHU-субстратом – это полностью энтальпийно-контролируемый. Вторая стадия связывания DHU-субстрата отражает подстройку фермент-субстратного комплекса необходимую для образования каталитически-активного состояния и характеризуется отрицательными изменениями, как энтальпии, так и энтропии. Отрицательное значение ΔH°_2 указывает на стабилизацию комплекса в процессе образования новых, энергетически выгодных связей среди реагирующих атомов, в то время как отрицательное значение ΔS°_2 указывает на компактизацию и увеличенную жесткость комплекса.

3.6. Конформационная динамика фермента *Endo VIII*, его мутантных форм и ДНК субстратов

3.6.1. Конформационные изменения мутантных форм *Endo VIII*

Ранее была зарегистрирована конформационная динамика *Endo VIII* при его взаимодействии с ДНК [193]. Было показано, что процесс связывания *Endo VIII* как со специфическим, так и с неспецифическим ДНК-дуплексом представляет собой многостадийный процесс. Поскольку конформационные изменения при образовании фермент-субстратного комплекса происходят в обоих биополимерах, для уточнения полученного механизма была зарегистрирована конформационная динамика ДНК-дуплекса в процессе его взаимодействия с *Endo VIII*, которую регистрировали по изменениям интенсивности флуоресценции аналогов азотистых оснований: 2-аPu, пирролоцитозина, tC^O и 3-гидроксихромона [187]. Было показано, что оба типа данных, полученных методом «остановленного потока», соответствовали кинетической схеме, включающей в себя три обратимых стадии связывания, необратимую стадию катализа, и обратимую стадию высвобождения продукта из активного центра фермента (схема 12). Согласно анализу полученных данных, первая обратимая стадия может отражать быстрое первичное связывание фермента с ДНК, приводящее к образованию неспецифического фермент-субстратного комплекса. Второе превращение соответствует стадиям изгибания ДНК, выворачиванию поврежденного основания из двойной спирали ДНК и его перемещению в активный сайт *Endo VIII*. Данная стадия завершается встраиванием аминокислотных остатков Gln69, Leu70 и Tyr71 в образовавшуюся полость в ДНК. На третьей стадии взаимодействия *Endo VIII* с ДНК-субстратом происходит окончательная подстройка структуры активного центра под вывернутое поврежденное основание и образование каталитически компетентного комплекса, что приводит к протеканию четвертой, каталитической стадии, представленной в кинетической схеме. На этом этапе фермент катализирует гидролиз N-гликозидной связи, а также реакции β-элиминирования 3'-фосфата и δ-элиминирования 5'-фосфата. Последняя стадия в предложенной кинетической схеме отражает диссоциацию фермент-субстратного комплекса.

Схема 12



где E – фермент *Endo VIII*, S – ДНК-субстрат, P – продукт реакции, [E·S]_i – комплексы *Endo VIII* с ДНК-дуплексом, k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакции каждой стадии, k_{cat} – константа скорости каталитической реакции, K_p – константа диссоциации комплекса фермент-продукт.

Поскольку изменения в структуре фермента играют важную роль в распознавании поврежденного основания и его дальнейшего удаления, были зарегистрированы изменения интенсивности остатков Trp, введенных в структуру фермента Endo VIII методом сайт-направленного мутагенеза. Для уточнения роли некоторых аминокислотных остатков и дальнейшего разъяснения стадий связывания фермента с ДНК, были сконструированы мутантные формы Endo VIII, содержащие в своей последовательности замену Leu70, Tyr71, Phe121, Phe230 и Pro253 на Trp либо Ser. В структуре фермента аминокислотные остатки Phe121, Phe230 и Pro253 расположены в ДНК-связывающем сайте, в непосредственной близости от каталитической аминокислоты Pro1 и связанной ДНК (рисунок 43). Замена этих аминокислотных остатков на Trp позволила регистрировать изменения интенсивности Trp, находящегося вблизи активного центра фермента. Были также произведены замены аминокислотных остатков Leu70 и Tyr71, которые расположены в короткой петле (аминокислотные остатки с 67 по 71), находящейся между β 4 и β 5 складками. Известно, что данные аминокислотные остатки вместе с Gln69 встраиваются в двойную спираль ДНК. Замена Leu70 и Tyr71 на Trp позволила зарегистрировать изменения интенсивности триптофана, находящегося в непосредственной близости от поврежденного основания. Кроме того, остаток Leu70 был заменен на Ser для определения роли бокового радикала в процессе взаимодействия с ДНК.

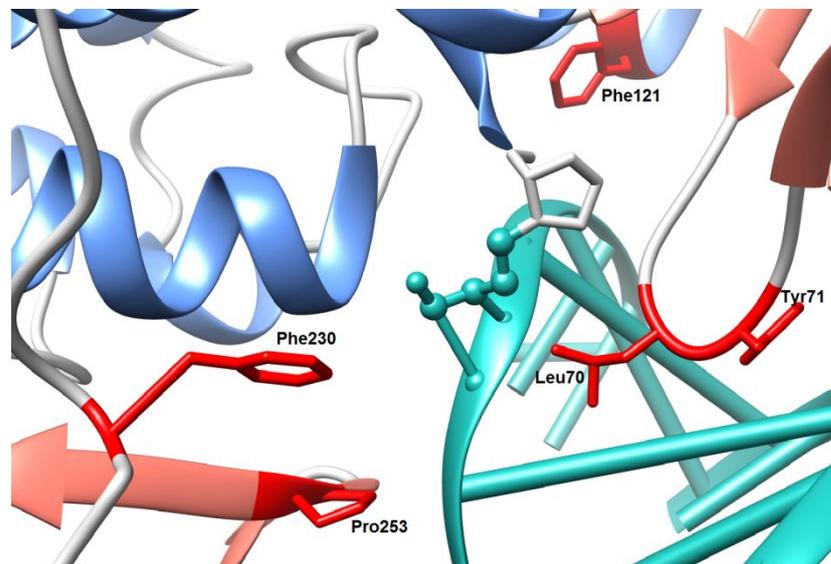


Рисунок 43. Структура активного центра Endo VIII (PDB ID: 1K3W). Красным цветом выделены аминокислотные остатки, выбранные для замены.

Предварительно был проведен анализ активности всех полученных мутантных форм фермента Endo VIII. Для этого анализировали продукты реакции мутантных форм Endo VIII с 32 P-радиоактивно мечеными субстратами, содержащими DHU либо AP-сайт. Разделение

реакционной смеси проводили в 20%-ом полиакриламидном геле, полученные результаты представлены на рисунке 44.

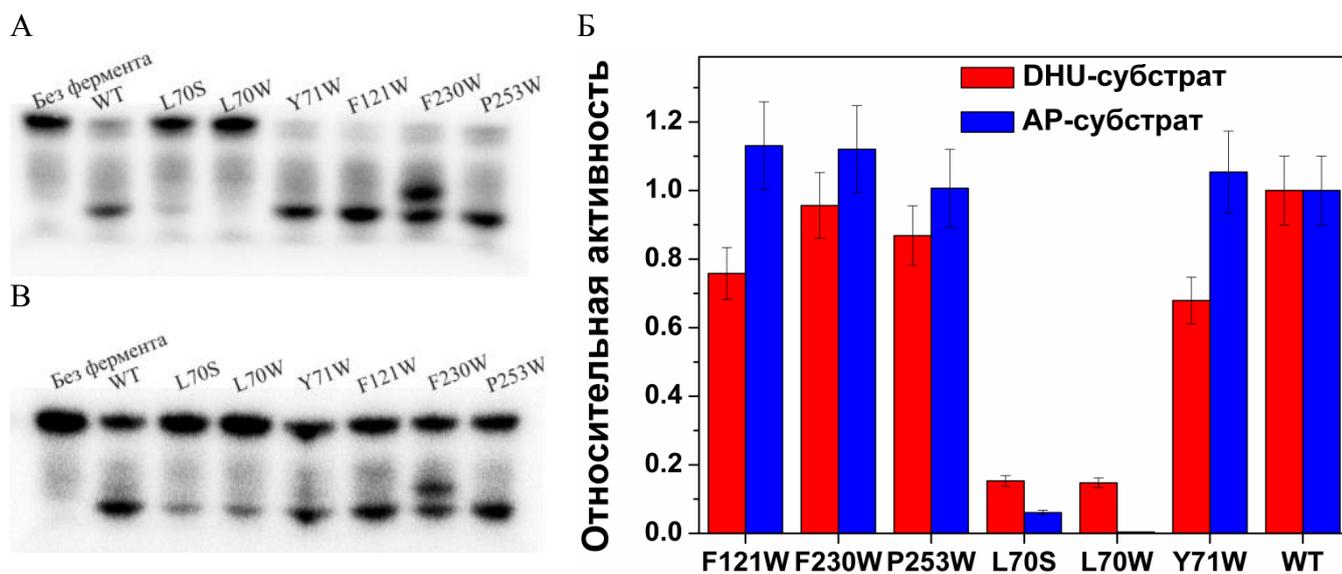


Рисунок 44. Степень расщепления радиоактивно-меченных AP- и DHU- субстратов ферментом Endo VIII за 500 с, T = 25 °C (А) Взаимодействие Endo VIII с AP-субстратом ([AP/G13] = 1,0 мкМ, [Endo VIII] = 1,0 мкМ) (Б) Относительная активность Endo VIII при взаимодействии с AP- и DHU-субстратом (В) Взаимодействие Endo VIII с DHU-субстратом ([DHU/G13] = 1,0 мкМ, [Endo VIII] = 2,0 мкМ).

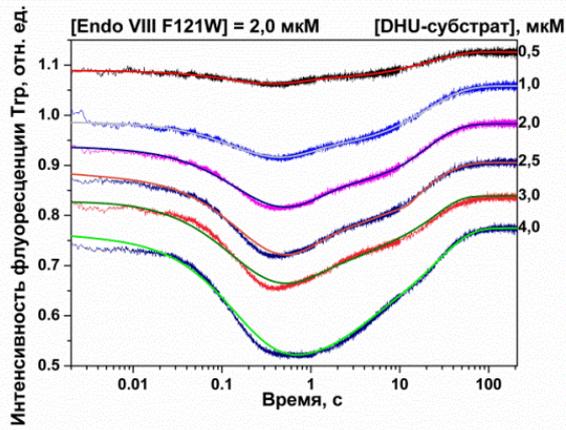
Как видно из рисунка 44, наибольший эффект на активность Endo VIII оказывала замена Leu70. Как видно из гистограммы (Б), Мутантные формы L70W и L70S практически теряют способность катализировать расщепление AP-сайтов, и обладают слабой активностью по отношению к DHU-субстрату. Замены остальных аминокислотных остатков на Trp не приводили к значительному снижению активности фермента. Примечательно, что в случае мутантной формы F230W при разделении продуктов реакции фермента в геле, была выявлена дополнительная полоса, соответствующая продукту β -элиминирования. Вероятно, такая замена приводит к замедлению реакции δ -элиминирования, катализируемой ферментом. В случае Endo VIII дикого типа обе реакции элиминирования происходят быстро, и в геле наблюдается только одна полоса – от конечного продукта δ -элиминирования.

Анализ конформационной динамики фермента в режиме реального времени позволил уточнить роль аминокислотных остатков, подвергшихся замене, при взаимодействии с ДНК-субстратами. Для этого методом «остановленного потока» была исследована предстационарная кинетика ферментативного процесса. В качестве флуорофорной группы выступали аминокислотные остатки Trp, и конформационная динамика мутантных форм фермента регистрировалась для случая взаимодействия с 13-звенными ДНК-дуплексами, содержащими DHU либо AP-сайт в одной из цепей.

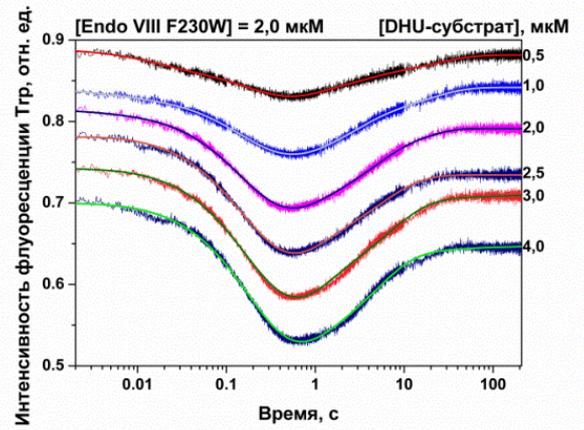
3.6.1.1. Взаимодействие с DHU-субстратом

На всех полученных кривых изменения интенсивности Tgr можно выделить несколько переходов (рисунок 45). Для всех мутантных форм было зарегистрировано начальное падение интенсивности флуоресценции. В случае замен Y71W, F121W, F230W, P253W данное изменение интенсивности флуоресценции Tgr протекало примерно за одно и то же время от 0,35 до 0,4 с. По-видимому, на данном этапе замены выбранных аминокислот на Tgr не влияют на первичную стадию связывания Endo VIII с DHU-субстратом, что приводит к образованию неспецифического фермент-субстратного комплекса. Далее для этих мутантных форм наблюдается фаза роста интенсивности флуоресценции Tgr, однако данная фаза при сравнении не совпадает по времени для разных мутантных форма Endo VIII. Для F230W Endo VIII происходит рост интенсивности флуоресценции Tgr, который выходит на плато примерно к 40 с. При взаимодействии мутантной формы P253W с DHU-субстратом после начального падения интенсивности флуоресценции Tgr наблюдаются две фазы роста интенсивности флуоресценции на временах до 10 с и до 60 с соответственно. Изменения интенсивности флуоресценции остатков Tgr для мутантных форм Y71W и F121W имели ещё более сложный характер. Помимо начального падения интенсивности флуоресценции Tgr, для обеих мутантных форм наблюдался трехфазный рост интенсивности флуоресценции. Первая фаза роста происходила до 2 с для обоих ферментов, вторая фаза роста – до 20 и 10 с для Y71W и F121W, соответственно. Третья фаза роста интенсивности флуоресценции выходила на плато примерно к 70 с.

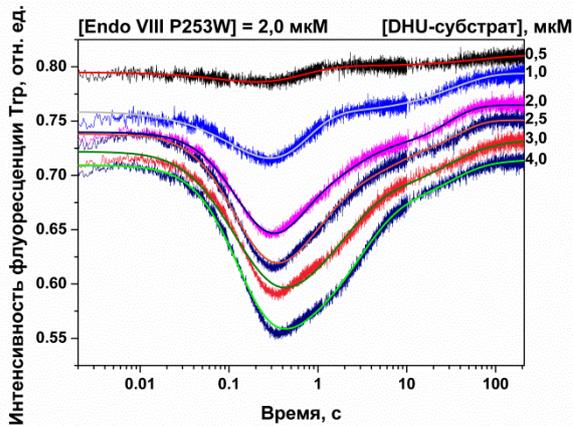
А



Б



В



Г

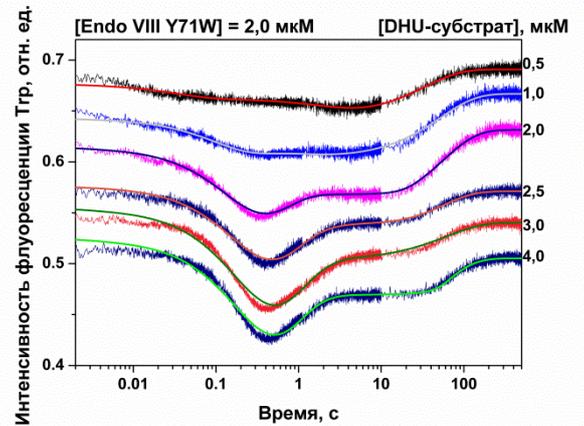
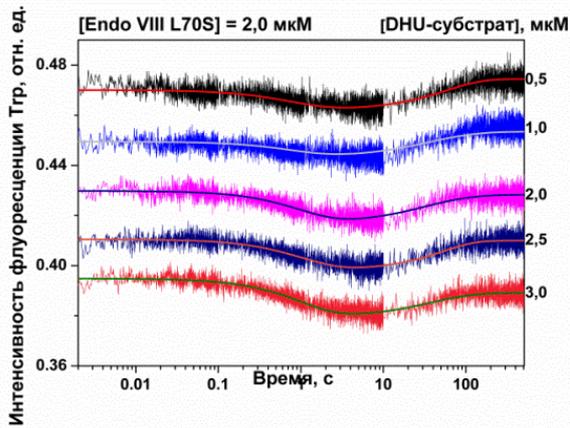


Рисунок 45. Изменение интенсивности флуоресценции Trp при взаимодействии мутантных форм Endo VIII с DHU-субстратом (А) [Endo VIII F121W] = 2,0 мкМ, T = 25 °С (Б) [Endo VIII F230W] = 2,0 мкМ, T = 25 °С (В) [Endo VIII P253W] = 2,0 мкМ, T = 25 °С (Г) [Endo VIII Y71W] = 2,0 мкМ, T = 25 °С.

Анализ полученных данных выявил, что замена Leu70 на Trp либо Ser значительно влияет на конформационную динамику фермента, по сравнению с диким типом и другими мутантными формами фермента, использованными в работе (рисунок 46). Изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp, находящихся в мутантных формах L70S и L70W имели схожий характер. Удалось зарегистрировать фазу падения интенсивности флуоресценции до 4 и 10 с для L70S и L70W, соответственно. Далее наблюдали увеличение флуоресцентного сигнала, выходящее на плато примерно к 70 с.

А



Б

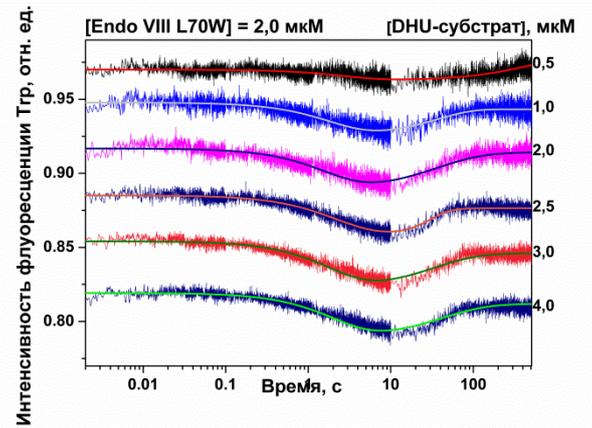
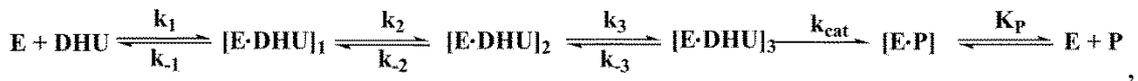


Рисунок 46. Изменение интенсивности флуоресценции Trp при взаимодействии мутантных форм Endo VIII с DHU-субстратом (А) [Endo VIII L70S] = 2,0 мкМ, T = 25 °С (Б) [Endo VIII,L70W] = 2,0 мкМ, T = 25 °С.

При определении кинетической схемы взаимодействия мутантных форм фермента Endo VIII с DHU-субстратом было установлено, что кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp мутантных форм Y71W, F121W, F230W, P253W соответствуют схеме предложенной ранее для фермента дикого типа (схема 13).

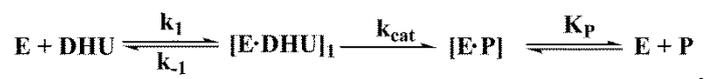
Схема 13



где E – фермент, DHU – субстрат, [E•DHU]_i – фермент-субстратные комплексы, [E•P] – комплекс фермент-продукт, P – продукт реакции.

Данная схема содержит три обратимых стадии связывания, одну необратимую стадию катализа и обратимую стадию диссоциации фермент-субстратного комплекса. В случае мутантных форм L70W и L70S, кинетические кривые взаимодействия с DHU-субстратом были охарактеризованы схемой 14, содержащей одну обратимую стадию связывания, необратимую стадию катализа и стадию высвобождения продукта из активного центра фермента. Полученные константы скоростей отдельных стадий приведены в таблице 11.

Схема 14



где E – фермент, DHU – субстрат, [E•DHU]₁ – фермент-субстратные комплексы, [E•P] – комплекс фермент-продукт, P – продукт реакции.

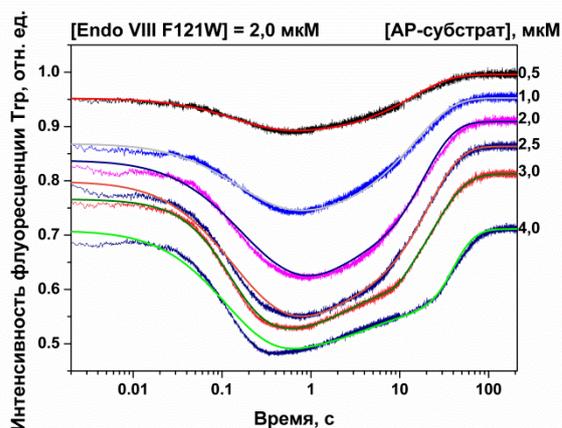
Таблица 11. Значения констант скорости и равновесия, характеризующих взаимодействие мутантных форм фермента Endo VIII с DHU-субстратом.

Константы	Мутантные формы Endo VIII						WT [193]
	L70S	L70W	Y71W	F121W	F230W	P253W	
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	0,09±0,02	0,06±0,01	21±3	40±10	30±2	27±2	36±7
k_{-1}, c^{-1}	1,0±0,1	0,4±0,1	330±30	120±30	310±50	310±30	410±20
$K_1 \times 10^{-5}, \text{M}^{-1}$	0,9±0,2	1,5±0,5	0,6±0,1	3±1	1,0±0,2	0,9±0,1	0,9±0,2
k_2, c^{-1}	-	-	16±3	17±4	21±3	23±3	27±2
k_{-2}, c^{-1}	-	-	2,5±0,1	0,6±0,3	1,2±0,1	0,8±0,1	1,8±0,3
K_2	-	-	6±1	30±20	18±3	29±5	15±3
k_3, c^{-1}	-	-	0,4±0,1	0,6±0,2	0,82±0,04	1,00±0,03	1,6±0,1
k_{-3}, c^{-1}	-	-	1,1±0,1	0,9±0,1	0,66±0,06	1,2±0,1	1,5±0,2
K_3	-	-	0,4±0,1	0,7±0,2	1,2±0,1	0,83±0,07	1,1±0,2
$k_{\text{cat}}, \text{c}^{-1}$	0,09±0,01	0,08±0,03	0,14±0,03	0,26±0,09	0,38±0,01	0,40±0,03	0,35±0,02
$K_{\text{ass}}, \text{M}^{-1}$	-	-	$(1,4 \pm 0,4) \times 10^5$	$(6 \pm 2) \times 10^6$	$(2,2 \pm 0,2) \times 10^6$	$(2,2 \pm 0,2) \times 10^6$	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^6$
$K_p \times 10^6, \text{M}$	1,0±0,2	0,7±0,5	0,4±0,1	0,6±0,1	0,6±0,2	0,63±0,08	0,7±0,7

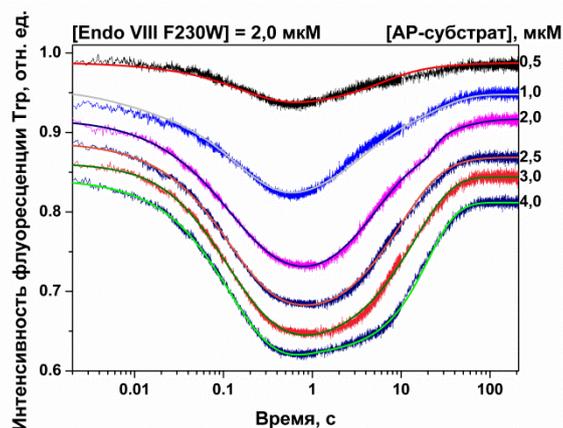
3.6.1.2. Взаимодействие с AP-субстратом

Изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp мутантных форм фермента Endo VIII при взаимодействии с AP-содержащим субстратом имели вид, аналогичный полученному для DHU-субстрата (рисунок 47 и 48). Для мутантных форм Y71W, F121W, F230W, P253W было зарегистрировано начальное падение интенсивности остатков Trp от 0,25 до 0,4 с. Далее для мутантной формы Y71W увеличение флуоресцентного сигнала происходило до 2 с, для F121W – до 20 с, F230W – 7 с и для P253W до 3 с. В случае мутантных форм F121W и F230W следующая стадия роста интенсивности флуоресценции выходила на плато к 100 с и 70 с, соответственно. Для форм Y71W и P253W было зарегистрировано несколько стадий роста интенсивности флуоресценции Trp. Для оставшихся мутантных форм кинетическая схема взаимодействия с AP-субстратом также содержала пять стадий, как и предложенная для DHU (схема 15). Были определены константы скоростей отдельных стадий и равновесные константы скорости, полученные данные приведены в таблице 12.

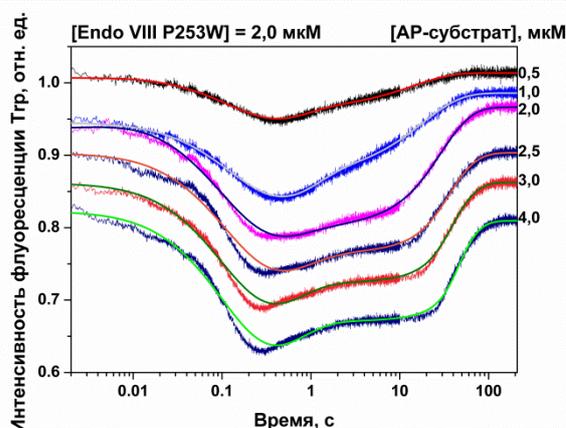
А



Б



В



Г

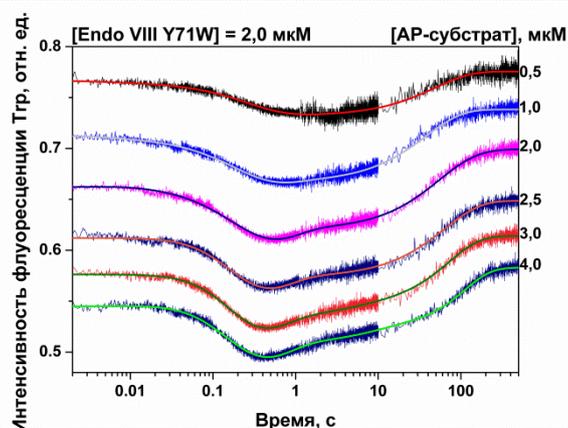
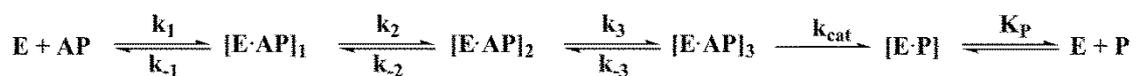


Рисунок 47. Изменение интенсивности флуоресценции Trp при взаимодействии мутантных форм Endo VIII с AP-субстратом (А) [Endo VIII F121W] = 2,0 мкМ, T = 25 °C (Б) [Endo VIII F230W] = 2,0 мкМ, T = 25 °C (В) [Endo VIII P253W] = 2,0 мкМ, T = 25 °C (Г) [Endo VIII Y71W] = 2,0 мкМ, T = 25 °C.

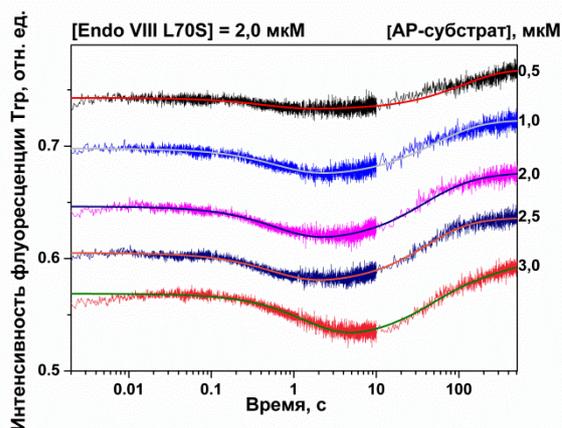
Схема 15



где E – фермент, AP – субстрат, [E·AP]_i – фермент-субстратные комплексы, [E·P] – комплекс фермент-продукт, P – продукт реакции.

Изменения интенсивности остатков Trp в мутантных формах L70S и L70W обладали меньшей амплитудой, и содержали меньше перегибов. Для обеих мутантных форм было зарегистрировано падение интенсивности флуоресценции Trp до 4 с, и дальнейший рост интенсивности флуоресценции до 100 с. Такие изменения так же соответствовали трехстадийной кинетической схеме, предложенной ранее для DHU-субстрата (схема 16).

А



Б

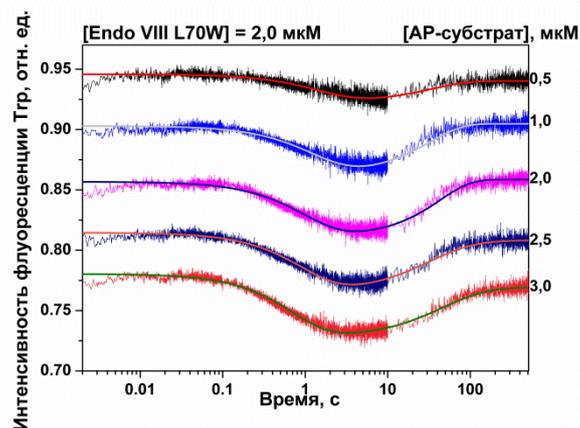


Рисунок 48. Изменение интенсивности флуоресценции Trp при взаимодействии мутантных форм Endo VIII с AP-субстратом (А) [Endo VIII L70S] = 2,0 мкМ, T = 25 °С (Б) [Endo VIII L70W] = 2,0 мкМ, T = 25 °С.

Схема 16



где E – фермент, AP – субстрат, [E•AP]_i – фермент-субстратные комплексы, [E•P] – комплекс фермент-продукт, P – продукт реакции.

Таблица 1. Значения констант скорости и равновесия, характеризующих взаимодействие мутантных форм фермента Endo VIII с AP-субстратом

Константы	Мутантные формы Endo VIII						WT [193]
	L70S	L70W	Y71W	F121W	F230W	P253W	
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	0,09±0,01	0,11±0,02	14±2	16±1	18±8	18±3	12±1
k_{-1}, c^{-1}	0,90±0,03	0,60±0,05	170±20	130±10	80±30	130±30	260±10
$K_1 \times 10^{-5}, \text{M}^{-1}$	1,0±0,1	1,8±0,4	0,8±0,1	1,2±0,1	2±1	1,4±0,4	0,50±0,04
k_2, c^{-1}	-	-	21±2	35±3	25±6	37±4	30±1
k_{-2}, c^{-1}	-	-	1,4±0,1	0,9±0,3	1,0±0,3	1,9±0,5	4,4±0,2
K_2	-	-	15±2	40±10	30±10	19±6	6,8±0,4
k_3, c^{-1}	-	-	0,13±0,01	0,8±0,1	0,9±0,1	0,35±0,02	2,1±0,1
k_{-3}, c^{-1}	-	-	1,0±0,1	3,0±0,6	5±1	1,9±0,2	1,1±0,1
K_3	-	-	0,13±0,02	0,27±0,06	0,19±0,05	0,18±0,02	1,9±0,2
k_{cat}, c^{-1}	0,09±0,01	0,080±0,007	0,29±0,03	0,41±0,05	1,0±0,1	0,45±0,08	0,79±0,03
K_{ass}, M^{-1}	-	-	$(0,16 \pm 0,02) \times 10^6$	$(1,3 \pm 0,3) \times 10^6$	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^6$	$(4,8 \pm 0,5) \times 10^5$	$(6,5 \pm 0,7) \times 10^5$
$K_p \times 10^6, \text{M}$	0,18±0,02	0,2±0,1	0,11±0,01	1,5±0,4	1,1±0,6	1,4±0,2	1,8±0,3

3.6.2. Функциональная роль остатков *Leu70*, *Tyr71*, *Phe121*, *Phe230* и *Pro253*

Остатки *Leu70* и *Tyr71* были выбраны в качестве потенциальных аминокислот, которые вклиниваются в ДНК-дуплекс на раннем этапе связывания фермента с ДНК, таким образом, действуя в качестве «сенсора» повреждения. Согласно рентгеноструктурным данным оба аминокислотных остатка имеют непосредственный контакт с ДНК-основаниями, расположенными напротив поврежденного основания либо с 5'- и 3'-стороны от него. Остаток *Phe121* расположен с пептидным линкере, соединяющим два белковых домена, образующих ДНК-связывающий сайт, и взаимодействует с фосфатными группами ДНК. Остаток *Phe230* также образует контакты с фосфатными группами и принимает участие в образовании кармана, где связывается поврежденный нуклеотид. Остаток *Pro253* находится в ДНК-связывающем центре фермента. Он взаимодействует с фосфатными группами, расположенными с 5'-стороны от поврежденного нуклеотида.

Согласно анализу разделения продуктов реакции в ПААГ на взаимодействие фермента Endo VIII с DHU- и AP-субстратом практически не влияют замены аминокислотных остатков *Tyr71*, *Phe121*, *Phe230*, *Pro253* на Trp. Наибольшее отличие от фермента дикого типа было показано для мутантных форм L70W и L70S. Данные замены приводили к практически полному исчезновению активности Endo VIII по отношению к AP-субстрату и пятикратному уменьшению по отношению к DHU-субстрату. Все исследованные мутантные формы имели различия по амплитуде и форме получаемого флуоресцентного сигнала. Уменьшение ферментативной активности, вызванное заменой аминокислотных остатков, приводило к падению амплитуды флуоресцентного сигнала на начальных этапах.

В случае F121W общая константа ассоциации K_{ass} была в четыре раза выше, чем для фермента дикого типа. Тем не менее, величина k_{cat} оказалась в два раза ниже, чем у Endo VIII WT.

Phe230 является одним из аминокислотных остатков, образующих активный сайт, в который выворачивается поврежденное основание. Этот аминокислотный остаток взаимодействует с 5'-фосфатной группой поврежденного нуклеотида. Для мутантной F230W формы были обнаружены слабые отличия от фермента дикого типа. Это может означать, что при замене *Phe230* на Trp, последний может образовывать схожие контакты с вывернутым основанием, как и остаток *Phe*. Тем не менее, замена F230W замедляет реакцию δ -элиминирования 5'-фосфатной группы. Это означает, что Trp230 образует контакты с 5'-фосфатной группой на последней стадии каталитической реакции.

В то же время мутантная форма P253W имела активность схожую, с ферментом дикого типа. *Pro253* расположен в связывающем центре фермента. Тем не менее, тот факт, что замена

Pro230 на Trp не влияла на активность фермента может означать несколько вариантов. Возможно, остаток Trp образует те же контакты, что и Pro253, или контакты, образующиеся между Pro253 и дезоксирибозо-фосфатным остовом ДНК, не являются критически важными для достижения каталитически компетентного состояния.

На основании данных о структуре и мутационному анализу можно предположить, что остаток Trp71 может служить в качестве своеобразного «клина», который внедряется в ДНК [192]. Тем не менее, замена Y71W незначительно снижала каталитическую активность фермента. Более того, замена Y71A не влияла на каталитическую активность фермента [194]. Эти данные позволили предположить, что контакты, образованные Trp71, не являются ключевыми для образования каталитически-компетентного комплекса. Замена Y71W приводила к уменьшению амплитуды сигнала Trp по сравнению с диким типом на полученных флуоресцентных кривых. Анализ констант скоростей реакции показал, что замена Y71W влияет на вторую и третью стадию в кинетической схеме образования каталитического комплекса и снижает общую константу связывания K_{ass} от 4 до 10 раз по сравнению с ферментом дикого типа.

Из полученных данных следует, что замена остатка Leu70 значительно влияет как на каталитическую активность фермента, так и на его способность связываться с ДНК. Замены L70S и L70W приводит к значительному (от 5 до 10 раз) уменьшению каталитической активности Endo VIII и снижению амплитуды сигнала в фазе падения интенсивности флуоресценции Trp. Фаза падения интенсивности флуоресценции протекала значительно медленнее, примерно до 10 с, по сравнению с ферментом дикого типа (примерно 0,2 с). Это указывает на то, что остаток Leu70 является важным на начальных этапах образования фермент-субстратного комплекса. Наиболее вероятно, что замена Leu70 нарушает сеть контактов, необходимых на начальном этапе распознавания повреждения.

Кинетический механизм, полученный для мутантных форм L70S и L70W включал в себя только одну стадию связывания, которая протекает в 300 раз медленнее, чем начальная стадия для других мутантных форм Endo VIII, исследованных в работе, и фермента дикого типа. Специфичность L70W и L70S к DHU-содержащему субстрату была в 10 раз ниже, чем в остальных случаях, а каталитическая константа k_{cat} – в четыре раза ниже, чем у фермента дикого типа. При сравнении двух схем, предложенных для выбранных мутантных форм, можно сделать заключение, что стадии 2 и 3 в кинетической схеме, приводящие к образованию фермент-субстратного комплекса, всё равно происходят, поскольку эти мутантные формы обладали активностью, хоть и значительно более низкой. Однако данные стадии не были зарегистрированы, поскольку скорость их протекания лимитируется предшествующим медленным процессом. Из полученных кинетических данных можно сделать предположение,

что аминокислотный остаток Leu70 выступает из белковой глобулы и образует контакты с ДНК раньше, чем остаток Tyr71. Более того, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что Leu70 выступает в качестве сенсора повреждения, который используется ферментом Endo VIII для поиска поврежденного нуклеотида. Тем не менее, остаток Tyr71 необходим для стабилизации вывернутого положения поврежденного азотистого основания и для реорганизации структуры фермента для достижения конформации, необходимой для осуществления катализа.

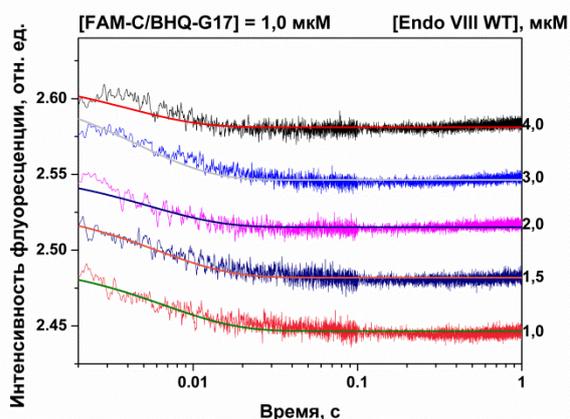
3.7. Конформационная динамика ДНК-субстратов при взаимодействии с ферментом Endo VIII дикого типа и каталитически неактивной формой E2Q

Для определения роли аминокислотного остатка Glu2 в процессе связывания фермента с ДНК и его дальнейшего каталитического превращения, была использована мутантная форма E2Q Endo VIII. Известно, что в структурном суперсемействе ДНК-гликозилаз H2tH Glu2 является строго консервативным аминокислотным остатком. Было показано, что его замена приводит к неспособности фермента катализировать N-гликозилазную, но не AP-эндонуклеазную реакцию [195]. Такие же результаты были показаны и для фермента Fpg, содержащего тот же аминокислотный остаток в структуре [196]. Для регистрации конформационных изменений в ДНК субстратах, при взаимодействии с Endo VIII WT и E2Q были использованы 17-звенные ДНК-дуплексы, содержащие FRET пару красителей FAM/BHQ1 на 5'-концах цепей ДНК-дуплекса.

3.7.1. Взаимодействие с C-лигандом

При взаимодействии фермента Endo VIII дикого типа и его мутантной формы E2Q с неповрежденным ДНК-дуплексом (C-лиганд) наблюдается уменьшение FRET-сигнала на начальном участке кинетических кривых (рисунок 49). Такое изменение отражает сближение концов ДНК-дуплекса, вызванное его изгибанием, при котором происходит более эффективное тушение эмиссии флуорофора FAM. Из рентгеноструктурных данных известно, что при связывании фермента Endo VIII с ДНК, содержащей повреждение, происходит изгибание дуплекса, таким образом, согласно кинетическим данным процесс изгибания ДНК происходит уже на этапе образования неспецифического комплекса. Зарегистрированные изменения интенсивности флуоресценции были обработаны одной обратимой стадией (схема 17), при этом, как видно из таблиц 13 и 14, параметры образования неспецифического комплекса не зависят от наличия мутации E2Q, что свидетельствует о том, что эта замена не влияет на образование первичного комплекса и изгибания ДНК.

А



Б

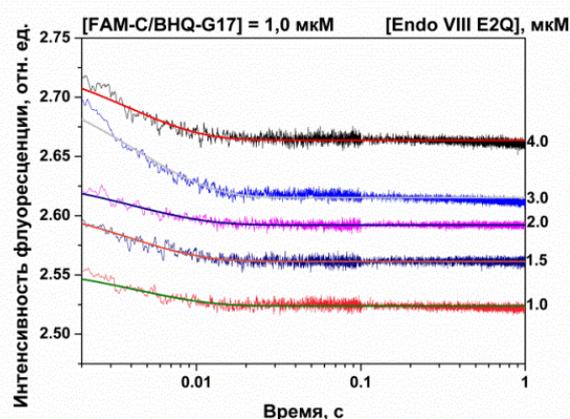


Рисунок 49. Изменение интенсивности флуоресценции FRET-сигнала при взаимодействии (А) Endo VIII с С-лигандом, [С-лиганд] = 1,0 мкМ, T = 25 °С (Б) Endo VIII E2Q с С-лигандом, [С-лиганд] = 1,0 мкМ, T = 25 °С.

Схема 17



где E – фермент, C – лиганд, E·C – фермент-субстратный комплекс.

Таблица 13. Значения констант скорости и равновесия, характеризующих взаимодействие Endo VIII WT, полученные при анализе данных FRET.

Константы	С-лиганд	Ф-лиганд	AP-субстрат	DHU-субстрат
$k_1 \times 10^{-6}, M^{-1}c^{-1}$	53±17	47±6	35±4	27±1
k_{-1}, c^{-1}	70±20	200±40	190±30	150±20
$K_1 \times 10^{-6}, M^{-1}$	0,7±0,3	0,20±0,05	0,20±0,03	0,20±0,02
k_2, c^{-1}	-	-	6±1	5,0±0,4
k_{-2}, c^{-1}	-	-	2,6±0,8	0,6±0,1
K_2	-	-	2,3±0,9	8±2
k_{cat}, c^{-1}	-	-	10±2	9±1
k_4, c^{-1}	-	-	2,8±0,8	8,1±0,6
K_{ass}, M^{-1}	-	-	$(5\pm 2) \times 10^5$	$(1,6\pm 0,6) \times 10^6$

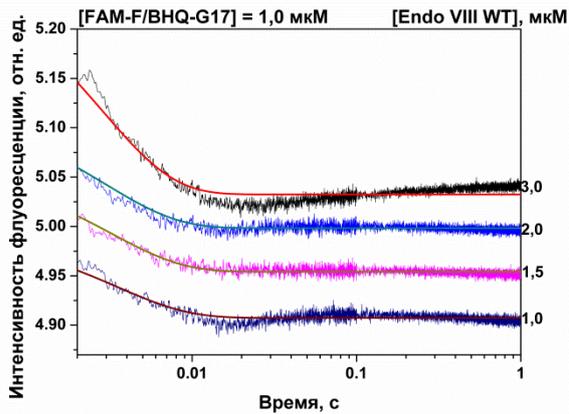
Таблица 14. Значения констант скорости и равновесия, характеризующих взаимодействие Endo VIII E2Q, полученные при анализе данных FRET.

Константы	С-лиганд	Ф-лиганд	AP-субстрат	DHU-субстрат
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$	50±10	63±8	30±1	64±8
k_{-1}, c^{-1}	60±10	160±50	240±80	250±30
$K_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	0,7±0,3	0,4±0,1	0,12±0,04	0,26±0,05
k_2, c^{-1}	-	-	3,8±0,9	-
k_{-2}, c^{-1}	-	-	1,0±0,2	-
K_2	-	-	4±1	-
$k_{\text{cat}}, \text{c}^{-1}$	-	-	2,0±0,6	-
k_4, c^{-1}	-	-	1,3±0,9	-
$K_{\text{ass}}, \text{M}^{-1}$	-	-	$(5 \pm 3) \times 10^5$	-

3.7.2. Взаимодействие с F-лигандом

При переходе к ДНК дуплексу, содержащему F-сайт, полученные кривые изменения интенсивности флуоресценции оставались схожими с кривыми для неспецифического дуплекса (рисунок 50). Можно выделить фазу падения интенсивности флуоресценции до 20 мс, как для фермента дикого типа, так и для мутантной формы E2Q. Такое изменение также отражает сближение концов ДНК-дуплекса, происходящее при связывании фермента с субстратом. Данное изменение можно описать одной обратимой стадией (схема 17, таблицы 13 и 14). Стоит отметить, что параметры образования комплекса с неповрежденным С-лигандом и F-лигандом имеют близкие значения, что свидетельствует о том, что FRET позволяет регистрировать только стадию образования первичного комплекса с F-лигандом. При этом последующие специфические взаимодействия с F-лигандом, ведущие к выворачиванию поврежденного нуклеотида и встраиванию аминокислотных остатков в дуплекс, не приводят к дальнейшим изменениям расстояния между остатками FAM и BHQ1 и, соответственно, не позволяют зарегистрировать эти процессы методом FRET.

А



Б

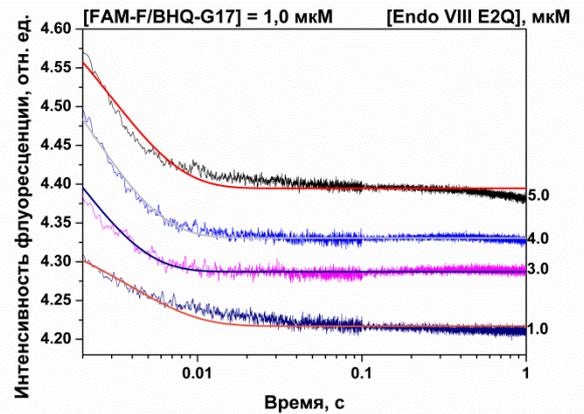
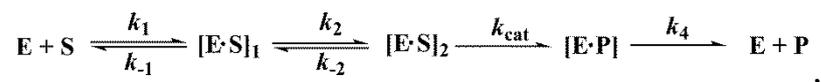


Рисунок 50. Изменение интенсивности флуоресценции FRET-сигнала при взаимодействии (А) Endo VIII с F-лигандом, [F-лиганд] = 1,0 мкМ, T = 25 °С (Б) Endo VIII E2Q с F-лигандом, [F-лиганд] = 1,0 мкМ, T = 25 °С.

3.7.3. Взаимодействие с AP-субстратом

При взаимодействии Endo VIII WT и E2Q с ДНК-субстратом, содержащим в качестве специфического повреждения AP-сайт, обе концентрационные серии содержат несколько изменений интенсивности флуоресценции (рисунок 51). Можно выделить падение интенсивности флуоресценции до 0,1 с в случае фермента дикого типа, и до 0,2 с для мутантной формы E2Q. Далее на кинетических кривых наблюдается фаза роста интенсивности флуоресценции для обоих ферментов, с выходом сигнала на плато к 10 с в обоих случаях. Такие изменения интенсивности флуоресценции FAM могут отражать несколько процессов: первоначальное падение свидетельствует о сближении двух FRET-меток, последующее возрастание флуоресценции, вероятно, связано с отдалением красителей друг от друга в пространстве. Поскольку Endo VIII WT и E2Q могут расщеплять субстраты с AP-сайтом стадия увеличения интенсивности флуоресценции отражает каталитический процесс и последующую диссоциацию комплекса фермент-продукт. Такие изменения на кинетических кривых были описаны двумя обратимыми стадиями связывания, необратимой каталитической стадией, и необратимой стадией диссоциации продукта из активного центра фермента (схема 18).

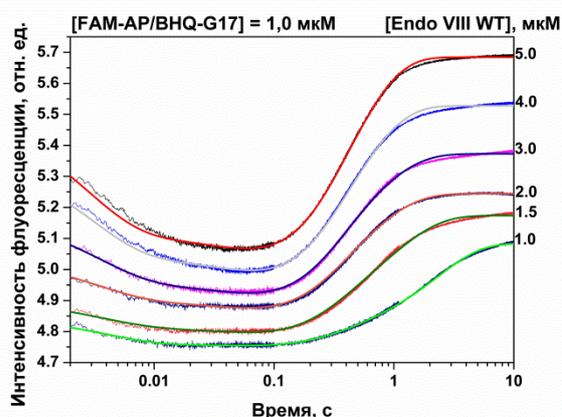
Схема 18



где E – фермент, S – субстрат, $[E \cdot S]_i$ – фермент-субстратные комплексы, $[E \cdot P]$ – комплекс фермент-продукт, P – продукт реакции.

Необходимо отметить, что из полученных кинетических данных не удалось корректно рассчитать значение константы равновесия, характеризующую последнюю стадию – диссоциацию комплекса с продуктом. По-видимому, это связано с тем, что после распада комплекса фермент-продукт, происходит дальнейшее плавление дуплекса-продукта на короткие олигодезоксирибонуклеотиды и удаление одного из фрагментов, несущего FAM краситель. Таким образом, обратное связывание фермента с таким расплавленным продуктом уже не приводит к изменению сигнала FRET и не позволяет корректно определить значение константы скорости связывания с продуктом.

А



Б

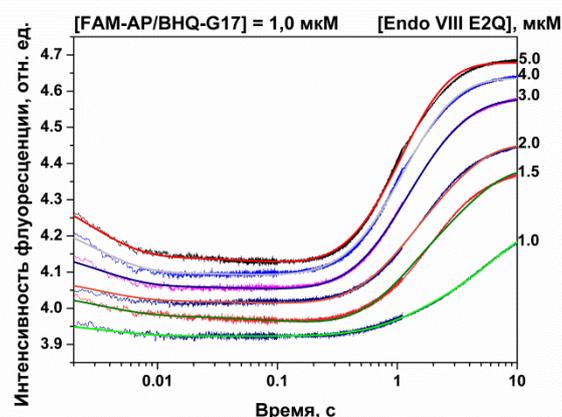


Рисунок 51. Изменение интенсивности флуоресценции FRET-сигнала при взаимодействии (А) Endo VIII с AP-субстратом, [AP-субстрат] = 1,0 мкМ, T = 25 °C (Б) Endo VIII E2Q с AP-субстратом, [AP-субстрат] = 1,0 мкМ, T = 25 °C.

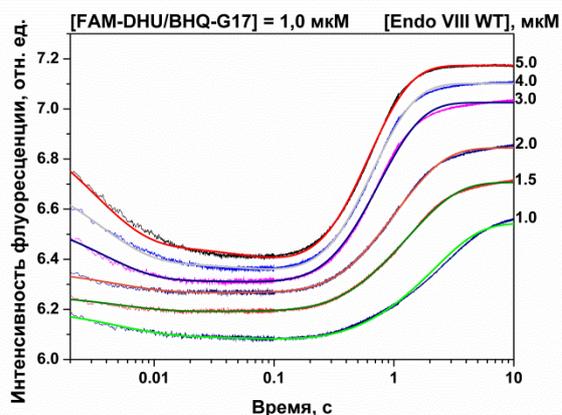
3.7.4. Взаимодействие с DHU-субстратом

При взаимодействии Endo VIII дикого типа с ДНК-субстратом, содержащим остаток 5,6-дигидроуридина в качестве специфического повреждения, изменения на кинетических кривых и их форма очень похожи на полученные для AP-субстрата (рисунок 52). Тем не менее, падение интенсивности флуоресценции в случае DHU происходит чуть медленнее, чем для AP-сайта – до 0,2 с. Далее происходит фаза роста интенсивности флуоресценции, и её выход на плато к 3 с. Такие изменения можно описать той же кинетической схемой (схема 18), что и для AP-сайта.

В случае фермента Endo VIII, содержащего мутацию E2Q, полученные данные имеют другой вид. Известно, что данная замена аминокислот приводит к потере способности фермента катализировать гидролиз N-гликозилазной связи. На полученных кривых изменения интенсивности флуоресценции можно выделить фазу падения, как было показано в случае неповрежденного C-лиганда. Такие изменения интенсивности флуоресценции можно охарактеризовать одной обратимой стадией связывания (схема 19). При этом параметры

образования комплекса с DHU-субстратом имеют близкие значения с параметрами для С- и F-лигандов.

А



Б

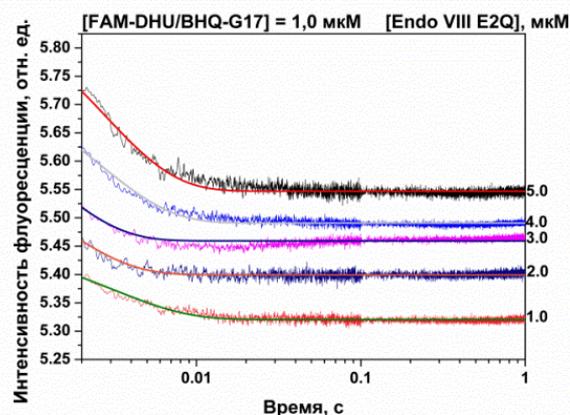
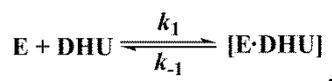


Рисунок 52. Изменение интенсивности флуоресценции FRET-сигнала при взаимодействии (А) Endo VIII с DHU-субстратом, [DHU-субстрат] = 1,0 мкМ, T = 25 °С (Б) Endo VIII E2Q с DHU-субстратом, [DHU-субстрат] = 1,0 мкМ, T = 25 °С.

Схема 19



где E – фермент, DHU-субстрат, [E•DHU] – фермент-субстратные комплексы, [E•P] – комплекс фермент-продукт, P – продукт реакции.

Таким образом, можно заключить, что на всех полученных кривых изменения интенсивности флуоресценции FAM присутствуют различные стадии. Так для всех использованных ДНК-дуплексов (С, F, AP, DHU) на кривых изменения интенсивности флуоресценции присутствует стадия падения интенсивности флуоресценции. Такое изменение говорит о сближении остатка FAM и группы тушителя BHQ1. Данный процесс может отражать изгибание ДНК-дуплекса ферментом Endo VIII, при этом происходит сближение концов ДНК-дуплекса. Данная стадия не значительно отличается у фермента дикого типа и E2Q. Вероятно, замена E2Q не влияет на начальные этапы связывания фермента. Однако такая замена приводит к замедлению AP-лиазной активности у Endo VIII E2Q практически в пять раз ($k_{\text{cat}}(\text{WT}) = 10 \pm 2$, $k_{\text{cat}}(\text{E2Q}) = 2,0 \pm 0,6$). Самое большое отличие в конформационной динамике ДНК-дуплекса наблюдалось при сравнении взаимодействия DHU-субстрата с Endo VIII WT и E2Q. Из полученных флуоресцентных кривых можно сделать вывод, что мутантная форма E2Q не расщепляет ДНК-субстрат, содержащий DHU, поскольку на длительных временах не происходит увеличение флуоресцентного сигнала, характерное для стадии высвобождения продукта из активного центра фермента. Взаимодействие мутантной формы E2Q с DHU-субстратом включает в себя только одну стадию – стадию начального связывания фермента с

ДНК. В отличие от фермента дикого типа, у мутантной формы E2Q при взаимодействии с DHU-субстратом отсутствует вторая стадия, которая, вероятно, отражает этапы окончательной подстройки активного центра фермента и достижение каталитически-компетентной конформации.

3.8. Кинетический анализ взаимодействия Endo VIII WT с ДНК субстратами при разных температурах

Для регистрации конформационных изменений в ДНК-субстратах в работе использовали 17-звенные ДНК-дуплексы содержащие флуорофорную группу tC^O напротив DHU, выступающего в качестве специфичного повреждения, которое узнаётся и удаляется ферментом Endo VIII. Кроме того, в работе использовали ДНК-дуплекс, содержащий F-сайт, который имитирует промежуточный продукт ферментативной реакции – AP-сайт. Неспецифичный ДНК-дуплекс содержал остаток гуанина напротив tC^O .

3.8.1. Взаимодействие с G-лигандом

В случае взаимодействия Endo VIII с ДНК-дуплексом, содержащим остаток гуанина напротив флуорофорной группы, на кинетических кривых можно выделить фазу роста интенсивности флуоресценции tC^O (рисунок 53). При увеличении температуры выход на плато данного изменения сдвигается с 30 мс при 5 °С до 20 мс при 25 °С. Изменения на кинетических кривых соответствует одностадийному связыванию фермента с ДНК-дуплексом (схема 20). В таблице 15 представлены значения констант скорости прямой и обратной стадии взаимодействия Endo VIII с ДНК-дуплексом, содержащим G-лиганд, для разных температур.

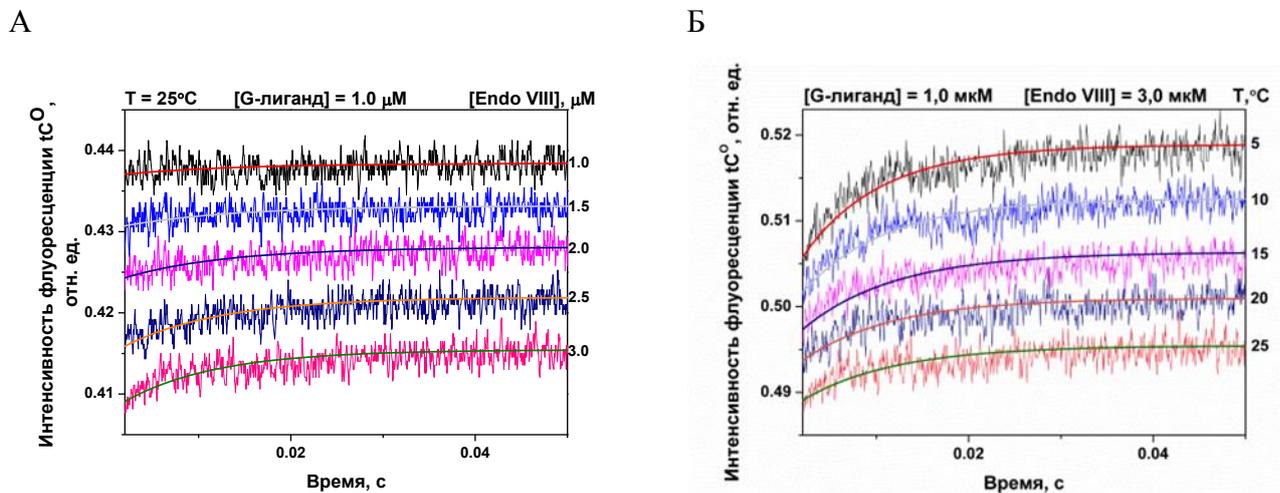
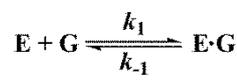


Рисунок 53. Изменение интенсивности флуоресценции tC^O при взаимодействии Endo VIII с G/ tC^O 17-лигандом (А) при изменении концентрации Endo VIII, $[G/tC^O17] = 1,0 \text{ мкМ}$, $T = 25 \text{ °C}$ (Б) при изменении температуры от 5 °С до 25 °С, $[G/tC^O17] = 1,0 \text{ мкМ}$, $[Endo VIII] = 3,0 \text{ мкМ}$.

Схема 20



где E – фермент Endo VIII, G – ДНК-дуплекс, содержащий G напротив tC^O , E·G – комплекс Endo VIII с ДНК-дуплексом, k_1 и k_{-1} – константы скорости прямой и обратной реакции.

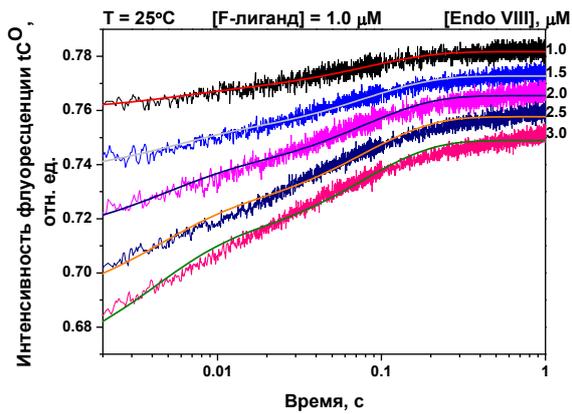
Таблица 15. Значения констант скорости и равновесия, характеризующие взаимодействие фермента Endo VIII и G-лигандом при разных температурах.

Константы	Т, °С				
	5	10	15	20	25
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	16±7	16±8	15±9	14±6	9±2
k_{-1}, c^{-1}	50±30	60±40	50±20	60±40	40±20
$K_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	0,3±0,2	0,3±0,2	0,3±0,2	0,2±0,1	0,2±0,1

3.8.2. Взаимодействие с F-лигандом

При взаимодействии Endo VIII с F-лигандом был зарегистрирован рост интенсивности флуоресценции tC^0 (рисунок 54). При обработке полученных данных была определена минимальная кинетическая схема реакции, соответствующая двум обратимым стадиям образования фермент-субстратного комплекса (схема 21). Первая фаза роста интенсивности tC^0 четко прослеживается на концентрационных сериях кривых, полученных при 5 °С и 10 °С. На данных, полученных при 5 °С первая фаза роста интенсивности флуоресценции tC^0 длится до 15 мс, при 10 °С – до 10 мс. На этих же временах происходит увеличение интенсивности флуоресценции, зарегистрированное при взаимодействии с G-лигандом. По-видимому, до 10 мс в структуре ДНК-дуплексов происходит одно и то же конформационное превращение, вызванное связыванием с Endo VIII. Вторая стадия роста интенсивности флуоресценции tC^0 завершается к 1 с при 5 °С, к 700 мс при 10 °С, к 600 мс при 15 °С, к 300 мс при 20 °С, и к 200 мс при 25 °С. По сравнению с данными, полученными для G-лиганда, изменения на кинетических кривых взаимодействия F-содержащего ДНК-дуплекса с Endo VIII обладают большей амплитудой, что может говорить как о большей эффективности образования комплекса между ферментом и ДНК, так и о больших конформационных перестройках, возникающих в структуре ДНК-дуплекса. Рассчитанные значения констант скорости реакций и констант равновесия приведены в таблице 16.

А



Б

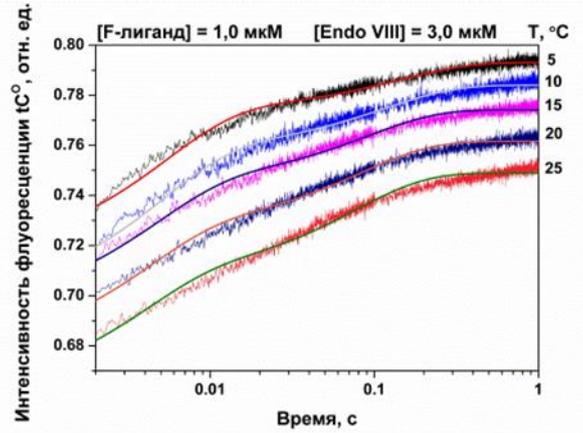


Рисунок 54. Изменение интенсивности флуоресценции tC^O при взаимодействии Endo VIII с F/ tC^O -лигандом (А) при изменении концентрации Endo VIII, $[F/tC^O17] = 1,0$ мкМ, $T = 25$ °С (Б) при изменении температуры от 5 °С до 25 °С, $[F/tC^O17] = 1,0$ мкМ, $[Endo VIII] = 3,0$ мкМ.

Схема 21



где E – фермент Endo VIII, F – ДНК-дуплекс, содержащий остаток тетрагидрофурана напротив флуорофорной группы tC^O , $[E \cdot F]_i$ – комплексы Endo VIII с ДНК-дуплексом, k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакции каждой стадии.

Таблица 16. Значения констант скорости и равновесия, характеризующие взаимодействие фермента Endo VIII и F-лигандом при разных температурах.

Константы	T, °C				
	5	10	15	20	25
$k_1 \times 10^{-6}, M^{-1}c^{-1}$	35±9	35±5	37±5	39±5	40±8
k_{-1}, c^{-1}	90±20	100±20	110±30	130±40	140±50
$K_1 \times 10^{-6}, M^{-1}$	0,4±0,1	0,35±0,08	0,3±0,1	0,3±0,1	0,3±0,1
k_2, c^{-1}	0,3±0,1	0,9±0,3	1,4±0,2	3±1	3±1
k_{-2}, c^{-1}	7±2	8±1	10±1	11±1	12±1
K_2	0,04±0,02	0,11±0,03	0,13±0,02	0,24±0,09	0,26±0,08
$K_{ass} \times 10^{-4}, M^{-1}$	2±1	4±2	4±2	7±5	8±5

3.8.3. Взаимодействие с DNU-субстратом

При взаимодействии Endo VIII с DNU-субстратом интенсивность флуоресценции tC^O также изменялась в зависимости от времени. На всех концентрационных сериях, полученных при разных температурах (от 5 до 25 °С) можно выделить схожие изменения интенсивности флуоресценции (рисунок 55).

Первым изменением на полученных кинетических кривых является быстрая фаза роста интенсивности флуоресценции tC^O . Данное изменение четко присутствует на серии кривых изменения интенсивности флуоресценции полученных при 5 °С и 10 °С, при этом фаза роста наблюдается до 10 мс при 5 °С и примерно до 6 мс при 10 °С. При увеличении температуры данное изменение интенсивности флуоресценции практически пропадает. Вслед за первой фазой роста интенсивности флуоресценции tC^O можно выделить дальнейшее увеличение флуоресцентного сигнала. Длительность данной фазы уменьшается в зависимости от температуры, так при 5 °С данная фаза длится до 300 мс, а при увеличении температуры время сокращается до 80 мс при 25 °С.

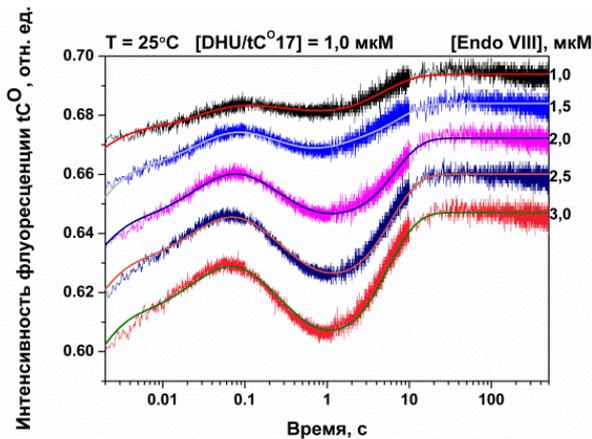
По-видимому, в пределах одной фазы изменения интенсивности флуоресценции tC^O происходит несколько последовательных стадий трансформации фермент-субстратного комплекса. Действительно, при обработке полученных данных об изменении интенсивности флуоресценции tC^O методом нелинейной регрессии с использованием программы DynaFit, фаза роста интенсивности флуоресценции соответствовала двух-стадийному связыванию Endo VIII с ДНК-субстратом. Наблюдаемое увеличение интенсивности флуоресценции может отражать разрыхление двойной спирали ДНК, а также встраивание аминокислотных остатков Gln 69, Leu70 и Tyr71.

Далее на всех полученных кривых можно выделить стадию падения интенсивности флуоресценции tC^O . Данный процесс имеет выраженную зависимость от температуры. Так при 5 °С фаза падения интенсивности флуоресценции длится до 10 с, при 10 °С – до 7 с, при 15 °С – до 4 с, при 20 °С – до 2 и при 25 °С – до 1 с. Такое изменение соответствует еще одной стадии образования фермент-субстратного комплекса. Можно предположить, что падение интенсивности флуоресценции указывает на изменение микроокружения tC^O . Вероятно, данное изменение отражает внедрение аминокислотных остатков фермента Endo VIII в ДНК-дуплекс, и выворачивание поврежденного нуклеотида в активный центр фермента.

Вслед за глубоким падением интенсивности флуоресценции происходит увеличение флуоресцентного сигнала, сопровождающееся с выходом на плато. Данная стадия также имеет выраженную зависимость от температуры: при 5 °С выход на плато интенсивности флуоресценции происходит к 100 с, при 10 °С к 90 с, при 15 °С – к 40 с, при 20 °С к 30 с, а при

25 °С – к 10 с. При обработке полученных данных данная фаза роста интенсивности флуоресценции соответствовала одной необратимой стадии катализа и одной обратимой стадии диссоциации фермент-субстратного комплекса. Таким образом, при регистрации взаимодействия Endo VIII с ДНК-субстратом, содержащим остаток DNU были получены кинетические кривые, содержащие четыре фазы изменения интенсивности флуоресценции: две фазы роста интенсивности флуоресценции, фазу падения, и ещё одну фазу роста. Полученные кинетические кривые хорошо описываются схемой 22, включающей в себя три стадии образования фермент-субстратного комплекса, которые, по-видимому, отражают различные этапы связывания Endo VIII с ДНК. Необратимую стадию можно соотнести с катализом химической реакции, а обратимую стадию – с диссоциацией комплекса фермент-продукт. Рассчитанные значения констант скорости отдельных стадий и константы равновесия приведены в таблице 17.

А



Б

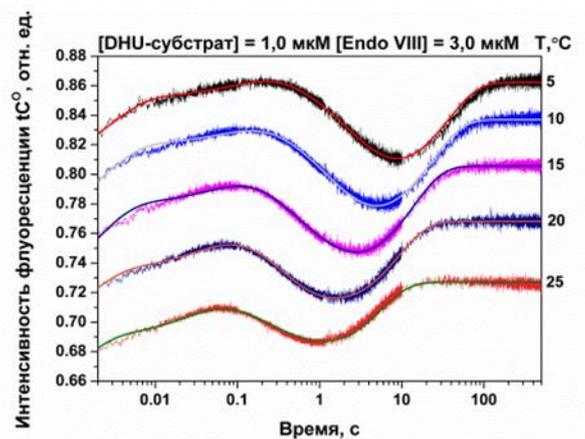
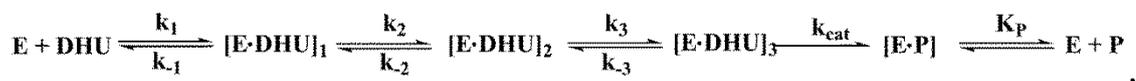


Рисунок 55. Изменение интенсивности флуоресценции tC^O при взаимодействии Endo VIII с DNU/ tC^O17 субстратом (А) при изменении концентрации Endo VIII, $[DNU/tC^O17] = 1,0$ мкМ, $T = 25$ °С (Б) при изменении температуры от 5 °С до 25 °С, $[DNU/tC^O17] = 1,0$ мкМ, $[Endo VIII] = 3,0$ мкМ.

Схема 22



где E – фермент Endo VIII, DNU – ДНК-дуплекс, содержащий остаток DNU напротив tC^O , P – продукт реакции, $[E \cdot DNU]_i$ – комплексы Endo VIII с ДНК-дуплексом, k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакции каждой стадии, k_{cat} – константа скорости каталитической реакции, K_P – константа диссоциации комплекса фермент-продукт.

Таблица 17. Значения констант скорости и равновесия, характеризующие взаимодействие фермента Endo VIII и DHU-содержащим субстратом при разных температурах.

Константы	T, °C				
	5	10	15	20	25
$k_1 \times 10^{-6}, M^{-1}c^{-1}$	35±7	40±6	45±7	61±4	80±10
k_{-1}, c^{-1}	230±30	270±40	320±10	440±70	580±50
$K_1 \times 10^{-6}, M^{-1}$	0,15±0,04	0,15±0,03	0,14±0,02	0,14±0,03	0,14±0,03
k_2, c^{-1}	1,0±0,2	1,7±0,1	2,6±0,4	3,6±0,6	4±1
k_{-2}, c^{-1}	0,34±0,08	0,62±0,03	0,9±0,7	1,2±0,9	1,3±0,3
K_2	2,7±0,9	2,8±0,2	3±2	3±3	3±1
k_3, c^{-1}	7±1	8,1±0,6	12±2	18±4	29±3
k_{-3}, c^{-1}	1,6±0,3	1,9±0,6	2,5±0,6	3±1	4±2
K_3	4±1	4±1	5±1	5±2	7±3
k_{cat}, c^{-1}	0,06±0,02	0,09±0,05	0,15±0,05	0,22±0,08	0,34±0,02
$K_{ass} \times 10^{-6}, M^{-1}$	1,6±0,4	1,7±0,6	1,8±0,5	2,2±0,8	3±1
$K_p \times 10^5, M$	1,7±0,8	2,1±0,9	2,4±0,9	2,7±0,8	3±2

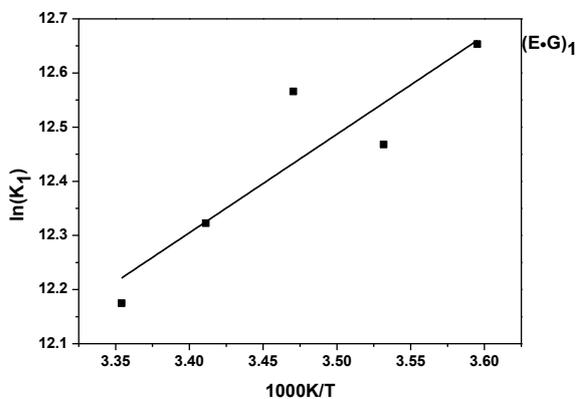
Таким образом, для всех использованных в работе ДНК-субстратов удалось зарегистрировать изменения интенсивности флуоресценции остатка tC^O . Стоит отметить, что первая фаза роста интенсивности флуоресценции tC^O присутствует на всех использованных субстратах. Для G-содержащего дуплекса данная фаза длится до 20 мс, для F – до 10 мс и для DHU – до 6 мс. Вероятно, данное изменение отражает один и тот же процесс, происходящий при связывании Endo VIII с ДНК. Следующая стадия роста интенсивности флуоресценции наблюдается до 200 мс для F-лиганда и до 90 мс для DHU-субстрата. Данное изменение соответствует стадии образования второго фермент-субстратного комплекса. Вероятно, на данном этапе происходит встраивание аминокислотного остатка Leu70 фермента Endo VIII в двойную спираль ДНК и проверка поврежденного нуклеотида, которая продолжается вплоть до 1 с, в случае DHU-субстрата. На кинетических кривых, полученных для DHU-содержащего дуплекса, видно, что за фазой роста интенсивности флуоресценции tC^O , следует падение сигнала, отражающее образование третьего фермент-субстратного комплекса. На этом этапе интенсивность флуоресценции tC^O является минимальной, что говорит о возрастании гидрофобности микроокружения флуорофорной группы. Это может быть следствием окончательного встраивания двух других аминокислотных остатков Gln69 и Tyr71 в цепь ДНК,

выворачивания поврежденного нуклеотида в активный центр Endo VIII, и формирования тесного контакта фермента с субстратом.

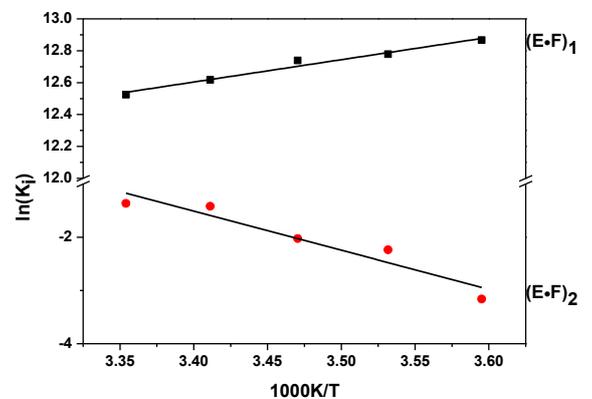
3.9. Термодинамический анализ взаимодействия Endo VIII с ДНК-субстратами

Константы скорости отдельных стадий взаимодействия Endo VIII со всеми ДНК-субстратами при разных температурах использовали для расчета констант равновесия этих стадий (K_i). Константы равновесия отдельных стадий использовали для получения зависимости $\ln(K_i)$ от $1/T$. Также получена зависимость $\ln(k_{cat}/T)$ от $1/T$, характеризующая необратимую каталитическую стадию в случае DHU-субстрата. Все зависимости имели линейный вид (рисунок 56) и позволили рассчитать изменения энтальпии и энтропии для обратимых стадий (ΔH_i^0 и ΔS_i^0) и переходного состояния каталитической стадии ($\Delta H^{0,\ddagger}$ и $\Delta S^{0,\ddagger}$) (таблица 18).

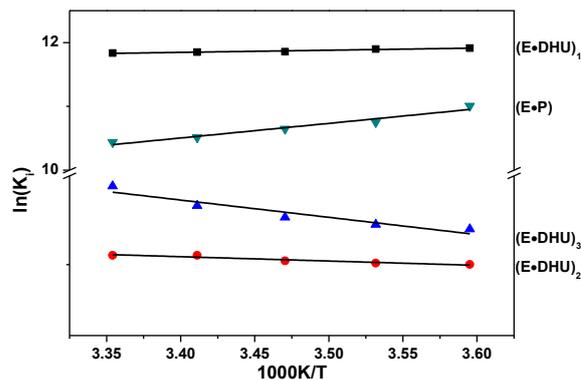
А



Б



В



Г

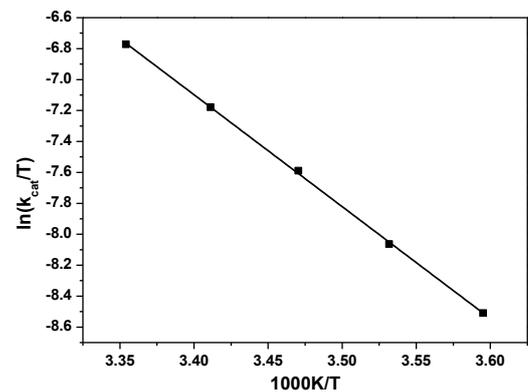


Рисунок 56. (А) Зависимость $\ln(K_1)$ взаимодействия Endo VIII с G/tC⁰17 от $1/T$; (Б) Зависимость $\ln(K_i)$ взаимодействия Endo VIII с F/tC⁰17 от $1/T$; (В) Зависимость $\ln(K_i)$ взаимодействия Endo VIII с DHU/tC⁰17 от $1/T$; (Г) Зависимость $\ln(k_{cat}/T)$.

Таблица 18. Термодинамические параметры взаимодействия ДНК-гликозилазы Endo VIII с G- и F-лигандами и DHU-субстратом

ДНК	Номер стадии	ΔH^0 , ккал/моль	ΔS^0 , кал/(моль×К)	ΔG^0_{298} , ккал/моль	Описание стадии
G/tC ⁰	1	-3,6±0,9	12±3	-7,2±0,1	Первичное связывание, попытка вклинивания остатка Leu70, увеличение полярности окружения tC ⁰
F/tC ⁰	1	-2,8±0,3	16±1	-7,4±0,2	Первичное связывание, вклинивание остатка Leu70, увеличение полярности окружения tC ⁰
	2	15±3	47±9	0,8±0,2	Изгибание двойной спирали ДНК, увеличение полярности окружения tC ⁰
	$\sum_{i=1}^{i=2}$	12,2±3,3	60±10	-6,6±0,4	
DHU/tC ⁰	1	-0,7±0,1	21,3±0,4	-7,0±0,1	Первичное связывание, вклинивание аминокислотного остатка Leu70, увеличение полярности окружения tC ⁰
	2	1,0±0,2	5,5±0,6	-0,7±0,2	Встраивание аминокислотного остатка Tyr71 в ДНК, уменьшение полярности окружения tC ⁰
	3	3,9±0,7	17±2	-1,1±0,2	Образование каталитически-компетентного комплекса
	$\sum_{i=1}^{i=3}$	4,2±1	43,8±3	-8,8±0,5	
	4	14,4±0,1*	-12,4±0,5*	18±2*	Катализ, увеличение полярности окружения tC ⁰
	5	-4,5±0,6	5±2	-6,2±0,3	Образование комплекса с продуктом реакции, увеличение полярности окружения tC ⁰

*Расчитано по уравнению (3).

При анализе термодинамических параметров взаимодействия Endo VIII с ДНК-субстратами, удалось выделить некоторые общие особенности. Для первой стадии образования фермент-субстратного комплекса получены близкие величины изменения ΔG^0_{298} . Помимо схожего временного диапазона изменения интенсивности tC^0 , энергетика данной стадии является практически одинаковой. Это говорит о том, что вероятно, до 10 мс со всеми использованными ДНК-дуплексами происходит один и тот же процесс. По-видимому, при первичном связывании Endo VIII с ДНК не происходит дискриминация субстратов, и более глубокое внедрение аминокислотных остатков фермента происходит позднее, при образовании последующих фермент-субстратных комплексов. Для всех использованных субстратов первичное связывание с ферментом сопровождается уменьшением энтальпии и небольшим повышением энтропии. Отрицательное значение энтальпии может указывать на образование энергетически выгодных контактов между ДНК-дуплексом и ферментом. Повышение энтропии, вероятно, связано с локальным плавлением ДНК-дуплекса.

Термодинамический анализ 2-ой стадии связывания Endo VIII с ДНК-дуплексами, которая была зарегистрирована в случае F и DNU-содержащих олигонуклеотидов, выявил различие в протекании этого процесса. В случае F-лиганда значение ΔG^0_{298} является положительным, что говорит о невыгодности протекания этого процесса, и, по-видимому, данное изменение не происходит при низких температурах. На это указывает и высокое положительное значение ΔH . Тем не менее, значение $\Delta S^0 = 47 \pm 9$ кал/(моль \times К) компенсирует невыгодную с точки зрения энтальпии реакцию. Для DNU-содержащего субстрата вторая стадия образования фермент-субстратного комплекса является энергетически разрешённой, значение ΔG^0_{298} второй стадии составляет $-0,7 \pm 0,2$ ккал/моль. Данная стадия сопровождается незначительным увеличением ΔH^0 и ΔS^0 . На третьей стадии взаимодействия Endo VIII с DNU-субстратом, которая предшествует каталитической реакции, должно происходить изгибание ДНК-дуплекса, окончательное встраивание аминокислотных остатков фермента в структуру ДНК и выворачивание поврежденного нуклеотида в активный центр Endo VIII. Вероятно, значительный рост энтропии может быть также связан с десольватацией и дегидратацией функциональных групп фермента и ДНК-субстрата. Четвертой стадией взаимодействия Endo VIII с ДНК-субстратом является необратимая каталитическая реакция, в ходе которой образуются разрывы сахаро-фосфатного остова ДНК с 5'- и 3'-стороны. Каталитическая стадия происходит с большими затратами энергии, на что указывают значения $\Delta G^0_{298} = 18,0 \pm 0,6$ ккал/моль и $\Delta H = 14,4 \pm 0,1$ ккал/моль. Последней стадией взаимодействия Endo VIII с DNU-содержащим олигонуклеотидом является стадия диссоциации фермент-субстратного комплекса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе произведено кинетическое и термодинамическое исследование взаимодействия двух ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII и их мутантных форм с ДНК-субстратами различной степени специфичности. Ферменты Endo III и Endo VIII принадлежат к разным структурным суперсемействам, но обладают перекрывающейся субстратной специфичностью по отношению к модифицированным пиримидиновым основаниям. В работе было показано, что в процессе фермент-субстратного взаимодействия конформационные изменения претерпевают как ферменты, так и ДНК-дуплексы.

Поскольку взаимодействие ДНК-гликозилаз с ДНК протекает в миллисекундном и секундном диапазонах, то в работе использовали метод «остановленного потока», который позволяет смешивать растворы фермента и субстрата за ~1,4 мс. Конформационные превращения ферментов регистрировали по изменению интенсивности флуоресценции остатков Trp. Для наблюдения за конформационной динамикой ДНК-дуплексов в процессе их взаимодействия с ферментами, регистрировали изменения интенсивности флуоресценции специальных флуорофорных групп, находящихся в структуре ДНК-субстратов (2-аPu, tC^O, FAM). Для определения природы отдельных стадий, включая специфическое и неспецифическое взаимодействие ферментов с ДНК, использовали ДНК-дуплексы, содержащие в качестве повреждения различные модифицированные нуклеотиды. В качестве специфических субстратов выступали ДНК-дуплексы, содержащие в своей структуре остаток DNU либо AP-сайт, которые являются субстратами как для Endo III так и для Endo VIII. Для определения стадий, соответствующих специфическому связыванию ферментов с ДНК, использовали ДНК-дуплекс, содержащий F-сайт. Для определения параметров неспецифического взаимодействия ферментов с ДНК, использовали ДНК-дуплексы, не содержащие повреждённых нуклеотидов. Для установления роли отдельных аминокислотных остатков в последовательных этапах фермент-субстратного взаимодействия, дополнительно исследовалась конформационная динамика различных мутантных форм фермента Endo VIII, а также конформационная динамика ДНК-субстратов, при взаимодействии с мутантными формами фермента Endo III.

При взаимодействии ДНК-субстратов с Endo III, ДНК претерпевает ряд последовательных конформационных изменений, которые отражают различные её этапы взаимодействия с ферментом. Было показано, что образование начальных контактов Endo III с ДНК включает взаимодействие фермента с комплементарной цепью ДНК-дуплекса. При этом, вероятно, уже на этом этапе фермент пытается вывернуть нуклеотид в свой активный центр, вне зависимости от того, есть ли в нем повреждение или нет. Примечательно, что замена каталитического аминокислотного остатка D138A приводит к тому, что, по-видимому, фермент

становится неспособным связываться с ДНК даже на начальных этапах. Помимо этого показано, что на этапе образования начальных контактов происходит вклинивание в цепь ДНК аминокислотного остатка Leu81, который является своеобразным сенсором повреждения у Endo III. Установлено, что у фермента Endo VIII также присутствует такой аминокислотный остаток – Leu70, который встраивается внутрь ДНК-дуплекса раньше других интеркалирующих аминокислотных остатков (Gln69 и Trp71). Было показано, что замена интеркалирующего аминокислотного остатка – Leu70 на Trp либо Ser приводит к значительной потере каталитической активности фермента. На полученных кривых изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp мутантных форм Endo VIII L70W и L70S амплитуда сигнала была значительно меньше, чем у других мутантных форм. Можно сделать вывод, что замена Leu70 замедляет стадии связывания Endo VIII с ДНК. При исследовании конформационной динамики мутантной формы Endo VIII Y71W было установлено, что первая стадия связывания фермента с ДНК практически не отличается от фермента дикого типа. Trp71 является еще одним аминокислотным остатком, для которого было обнаружено его встраивание в ДНК-дуплекс. При этом, замена Y71W практически не приводила к изменению каталитической активности Endo VIII. Сделан вывод о том, что аминокислотный остаток Leu70 начинает участвовать в процессе фермент-субстратного взаимодействия раньше, чем Trp71. Для обеих исследованных ДНК-гликозилаз на первой стадии фермент-субстратного взаимодействия происходит вклинивание аминокислотного остатка-сенсора в цепь ДНК, образование энергетически выгодных контактов и, вероятно, плавление цепи ДНК в области специфического сайта, что сопровождается ростом энтропии.

После образования начальных контактов с ДНК, оба фермента нуждаются в дополнительной подстройке активных центров для достижения каталитически компетентного состояния. При исследовании конформационной динамики ДНК были зарегистрированы дополнительные стадии, отражающие этот процесс. Примечательно, что на этапах связывания ферментов с различными ДНК-дуплексами, для обоих ферментов можно выделить стадии, характеризующиеся положительным изменением энтальпии. Однако, невыгодное изменение энтальпии компенсируется ростом энтропии, что свидетельствует о дегидратации области контактов фермента и ДНК-субстрата и десольватации взаимодействующих функциональных групп.

Для Endo III и Endo VIII было зарегистрировано наличие необратимых стадий, соответствующих химическим превращениям. При этом для обоих ферментов было получено одинаковое значение свободной энергии активации $\Delta G_0^{298,\#} = 18,0$ ккал/моль. Каталитическая стадия сопровождается положительным ростом энтальпии, что указывает на дополнительные затраты энергии для протекания химической реакции, и отрицательным изменением энтропии.

По-видимому, на этапе катализа образуется более жесткий фермент-субстратный комплекс вследствие образования ковалентной связи между каталитическими остатками Lys120 или Pro1 и остатком 2'-дезоксирибозы. Было установлено, что для Endo III скорость-лимитирующей стадией является гидролиз N-гликозидной связи, в то время как Endo VIII такой стадией является реакция β -элиминирования, которая протекает медленнее чем N-гликозилазная реакция.

При исследовании конформационной динамики мутантных форм фермента Endo VIII, преимущественно содержащих замены аминокислотных остатков на Trp, также удалось зарегистрировать отдельные стадии взаимодействия фермента с ДНК-субстратами.

Таким образом, в результате работы установлена последовательность элементарных стадий взаимодействия ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII из *E.coli* с ДНК-субстратами и изучена конформационная динамика ферментов и ДНК, предложены кинетические схемы и получены термодинамические параметры быстропротекающих стадий взаимодействия ферментов с субстратами.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что конформационные превращения фермент-субстратных комплексов, образованных ДНК-гликозилазой Endo III дикого типа и ее мутантными формами, а также мутантными формами ДНК-гликозилазы Endo VIII с поврежденной и неповрежденной ДНК, происходят через последовательность стадий с образованием нескольких промежуточных состояний.
2. Установлено, что ДНК-гликозилазы Endo III и Endo VIII, принадлежащие к разным структурным суперсемействам, используют стратегию раннего узнавания поврежденного нуклеотида с помощью вклинивания в ДНК-дуплекс аминокислотных остатков – «сенсоров» повреждения, которыми выступают Leu70 у Endo VIII и Leu81 у Endo III.
3. Показано, что замена каталитических аминокислотных остатков Lys120 и Asp138 на Ala приводит к потере у фермента Endo III как N-гликозилазной, так и AP-лиазной активности. При этом мутантная форма Endo III K120A обладает способностью связываться с ДНК, а замена D138A приводит к блокированию начальных стадий связывания ДНК. Замена каталитического остатка E2Q у Endo VIII сопровождается потерей лишь N-гликозилазной, но не AP-лиазной активности.
4. Впервые получены термодинамические параметры быстропротекающих стадий взаимодействия ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII с ДНК-субстратами. Установлено, что затраты энергии на образование каталитически компетентных состояний фермент-субстратных комплексов, компенсируются за счет увеличения энтропии, вероятно, вследствие дегидратации области контакта фермента с ДНК-субстратом.

Список сокращений

3-meA	– 3-метиладенин
5-meC	– 5-метилцитозин
6-meG	– 6-метилгуанин
7-meG	– 7-метилгуанин
8-oxoG	– 8-оксо-7,8-дигидрогуанин
AAG	– алкиладенин-ДНК-гликозилаза человека
AlkA	– алкиладенин-ДНК-гликозилаза <i>Escherichia coli</i>
APe1	– AP-эндонуклеаза человека
aPu	– 2-аминопурин
AP-сайт	– апуриновый/апиримидиновый сайт
BER	– base excision repair, эксцизионная репарация оснований
BHQ1	– тушитель флуоресценции black hole quencher 1
DHU	– 5,6-дигидроурацил
EDTA —	– этилендиаминтетраацетат
Endo III/ Nth	– эндонуклеаза III <i>Escherichia coli</i>
Endo VIII/ Nei	– эндонуклеаза VIII <i>Escherichia coli</i>
FAM	– 6-карбоксифлуоресцеин
Fapy	– 2,6-диамино-4-окси-формаидопиримидин
Fpg	– формаидопиримидин-ДНК-гликозилаза <i>Escherichia coli</i>
FRET	– резонансный перенос энергии флуоресценции
F	– 2-гидроксиметил-3-гидрокситетрагидрофуран
H2tH	– мотив, содержащий структуру «спираль – два поворота – спираль»
HEPES	– 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота
HhH	– мотив, содержащий структуру «спираль – шпилька – спираль»
MBD4	– метилцитозин-связывающий домен 4 человека
MutY	– аденин-ДНК-гликозилаза <i>Escherichia coli</i>
OGG1	– 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза человека
PDB ID	– идентификационный номер в банке банных кристаллических структур
ROS —	– reactive oxygen species, активные формы кислорода
tC ^o	– 1,3-диаза-2-оксофеноксазин
Tris	– трис-(гидроксиметил)-аминометан
ДТТ:	– 1,4-дителиотреит
ПААГ	– полиакриламидный гель

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

Список литературы

1. Kunz C., Saito Y., Schär P. DNA Repair in Mammalian Cells // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2009. – Vol. 66. – № 6. – P. 1021–1038.
2. Friedberg E.C., Aguilera A., Gellert M., Hanawalt P.C., Hays J. B., Lehmann A.R., Lindahl T., Lowndes N., Sarasin A., Wood R.D. DNA repair: from molecular mechanism to human disease // *DNA Repair.* – 2006. – Vol. 5. – №8. – P. 986–996.
3. Boiteux S., Coste F., Castaing B. Repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: Properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N-glycosylases // *Free Radic. Biol. Med.* – 2017. – Vol. 107. – P. 179–201.
4. Banda D.M., Nuñez N.N., Burnside M.A., Bradshaw K.M., David S.S. Repair of 8-oxoG:A mismatches by the MUTYH glycosylase: mechanism, metals and medicine // *Free Radic. Biol. Med.* – 2017. – Vol. 107. – P. 202–215.
5. Kamiya H., Kurokawa M. Mutagenic bypass of 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-hydroxyguanine) by DNA polymerase κ in human cells // *Chem. Res. Toxicol.* – 2012. – Vol. 25. – №8. – P. 1771–1776.
6. Suzuki T., Kamiya H. Mutations induced by 8-hydroxyguanine (8-oxo-7,8-dihydroguanine), a representative oxidized base, in mammalian cells. // *Genes Environ.* – 2017. – Vol. 39. – P. 2.
7. Duncan B.K., Miller J.H. Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA // *Nature.* – 1980. – Vol. 287. – №5782. – P. 560–561.
8. Sassa A., Kanemaru Y., Kamoshita N., Honma M., Yasui M. Mutagenic consequences of cytosine alterations site-specifically embedded in the human genome. // *Genes Environ.* – 2016. – Vol. 38. – №1. – P. 17.
9. Sobol R.W., Wilson S.H. Mammalian DNA beta-polymerase in base excision repair of alkylation damage // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 68. – P. 57–74.
10. Kaina B., Fritz G., Coquerelle T. Contribution of O6-alkylguanine and N-alkylpurines to the formation of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and gene mutations: new insights gained from studies of genetically engineered mammalian cell lines // *Environ. Mol. Mutagen.* – 1993. – Vol. 22. – №4. – P. 283–292.
11. Kaina B., Ziouta A., Ochs K., Coquerelle T. Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models // *Mutat. Res.* – 1997. – Vol. 381. – №2. – P. 227–241.
12. Kaina B., Ochs K., Grösch S., Fritz G., Lips J., Tomicic M., Dunkern T., Christmann M. BER, MGMT, and MMR in defense against alkylation-induced genotoxicity and apoptosis // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 68. – P. 41–54.

13. Quiros S., Roos W.P., Kaina B. Processing of O6-methylguanine into DNA double-strand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles // *Cell Cycle*. – 2010. – Vol. 9. – №1. – P. 168–178.
14. Rowe L.A., Degtyareva N., Doetsch P.W. DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae* // *Free Radic. Biol. Med.* – 2008. – Vol. 45. – №8. – P. 1167–1177.
15. Hsie A.W., Recio L., Katz D.S., Lee C.Q., Wagner M., Schenley R.L. Evidence for reactive oxygen species inducing mutations in mammalian cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1986. – Vol. 83. – №24. – P. 9616–9620.
16. Sakai A., Nakanishi M., Yoshiyama K., Maki H. Impact of reactive oxygen species on spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli* // *Genes to Cells*. – 2006. – Vol. 11. – №7. – P. 767–778.
17. Krokan H.E., Standal R., Slupphaug G. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA // *Biochem. – J.* – 1997. – Vol. 325. – №1. – P. 1–16.
18. Krokan H.E., Bjørås M. Base excision repair // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2013. – Vol. 5. – №4. – P. a012583.
19. Seeberg E., Eide L., Bjørås M. The base excision repair pathway // *Trends Biochem. – Sci.* – 1995. – Vol. 20. – №10. – P. 391–397.
20. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature*. – 1993. – Vol. 362. – №6422. – P. 709–715.
21. Rastogi R.P., Richa, Kumar A., Tyagi M.B., Sinha R.P. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair // *J. Nucleic Acids*. – 2010. – Vol. 2010. – P. 592980.
22. Borrego-Soto G., Ortiz-López R., Rojas-Martínez A. Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer // *Genet. Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 38. – №4. – P. 420–432.
23. Sinha R.P., Häder D.P. UV-induced DNA damage and repair: a review // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2002. – Vol. 1. – №4. – P. 225–236.
24. Sachs R.K., Chen, P.L., Hahnfeldt P.J., Hlatky L.R. DNA damage caused by ionizing radiation // *Math. Biosci.* – 1992. – Vol. 112. – №2. – P. 271–303.
25. Krokan H.E., Drabløs F., Slupphaug G. Uracil in DNA – occurrence, consequences and repair // *Oncogene*. – 2002. – Vol. 21. – №58. – P. 8935–8948.
26. Andersen S., Heine T., Sneve R., König I., Krokan H.E., Epe B., Nilsen H. Incorporation of dUMP into DNA is a major source of spontaneous DNA damage, while excision of uracil is not required for cytotoxicity of fluoropyrimidines in mouse embryonic fibroblasts // *Carcinogenesis*. – 2004. – Vol. 26. – №3. – P. 547–555.

27. Kavli B., Otterlei M., Slupphaug G., Krokan H. Uracil in DNA - General mutagen, but normal intermediate in acquired immunity // *DNA Repair (Amst)*. – 2007. – Vol. 6. – №4. – P. 505–516.
28. Wang Y. Bulky DNA Lesions induced by reactive oxygen species // *Chem. Res. Toxicol.* – 2008. – Vol. 21. – №2. – P. 276–281.
29. Zuo S., Boorstein R.J., Teebor G.W. Oxidative damage to 5-methylcytosine in DNA // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – Vol. 23. – №16. – P. 3239–3243.
30. Douki T., Delatour T., Paganon F., Cadet J. Measurement of oxidative damage at pyrimidine bases in γ -irradiated DNA // *Chem. Res. Toxicol.* – 1996. – Vol. 9. – №7. – P. 1145–1151.
31. Bjelland S., Seeberg E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation // *Mutat. Res.* – 2003. – Vol. 531. – №1–2. – P. 37–80.
32. Saito I., Takayama M., Nakamura T., Sugiyama H., Komeda Y., Iwasaki M. The most electron-donating sites in duplex DNA: guanine-guanine stacking rule // *Nucleic Acids Symp.* – Ser. – 1995. – № 34. – P. 191–192.
33. 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. – Vol. 6. – №11. – P. 3673–3684.
34. Zhang Y., Yuan F., Wu X., Taylor J.S., Wang Z. Response of human DNA polymerase ι to DNA lesions // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – Vol. 29. – №4. – P. 928–935.
35. Hanes J.W., Thal D.M., Johnson K.A. Incorporation and replication of 8-oxo-deoxyguanosine by the human mitochondrial DNA polymerase // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281. – №47. – P. 36241–36248.
36. Asagoshi K., Yamada T., Terato H., Ohyama Y., Monden Y., Arai T., Nishimura S., Aburatani H., Lindahl T., Ide H. Distinct repair activities of human 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase and formamidopyrimidine DNA glycosylase for formamidopyrimidine and 7,8-dihydro-8-oxoguanine // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – №7. – P. 4956–4964.
37. Olinski R., Zastawny T., Budzbon J., Skokowski J., Zegarski W., Dizdaroglu M. DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues // *FEBS Lett.* – 1992. – Vol. 309. – №2. – P. 193–198.
38. Bonicel A., Mariaggi N., Hughes E., Teoule R. In vitro gamma irradiation of DNA: identification of radioinduced chemical modifications of the adenine moiety // *Radiat. Res.* – 1980. – Vol. 83. – №1. – P. 19–26.
39. Hutchinson F. Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 1985. – Vol. 32. – P. 115–154.

40. Hayes R.C., Petrullo L.A., Huang H., Wallace S.S., LeClerc J.E. Oxidative damage in DNA: Lack of mutagenicity by thymine glycol lesions // *J. Mol. Biol.* – Academic Press, 1988. – Vol. 201. – №2. – P. 239–246.
41. Rouet P., Essigmann J.M. Possible role for thymine glycol in the selective inhibition of DNA synthesis on oxidized DNA templates // *Cancer Res.* – 1985. – Vol. 45. – №12 Pt 1. – P. 6113–6118.
42. Basu A.K., Loechler E.L., Leadon S.A., Essigmann J.M. Genetic effects of thymine glycol: site-specific mutagenesis and molecular modeling studies // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – Vol. 86. – №20. – P. 7677–7681.
43. Sassa A., Beard W.A., Shock D.D., Wilson S.H. Steady-state, pre-steady-state, and single-turnover kinetic measurement for DNA glycosylase activity // *J. Vis. Exp.* – 2013. – № 78. – P. 1–9.
44. Kusumoto R., Masutani C., Iwai S., Hanaoka F. Translesion synthesis by human DNA polymerase η across thymine glycol lesions // *Biochemistry.* – 2002. – Vol. 41. – №19. – P. 6090–6099.
45. Fischhaber P.L., Gerlach V.L., Feaver W.J., Hatahet Z., Wallace S.S., Friedberg E.C. Human DNA polymerase κ bypasses and extends beyond thymine glycols during translesion synthesis in vitro, preferentially incorporating correct nucleotides // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – №40. – P. 37604–37611.
46. Belousova E.A., Maga G., Fan Y., Kubareva E.A., Romanova E.A., Lebedeva N.A., Oretskaya T.S., Lavrik O.I. DNA polymerases β and λ bypass thymine glycol in gapped DNA structures // *Biochemistry.* – 2010. – Vol. 49. – №22. – P. 4695–4704.
47. Shtygasheva A.A., Belousova E.A., Rechkunova N.I., Lebedeva N.A., Lavrik, O. I. DNA polymerases beta and lambda as potential participants of TLS during genomic DNA replication on the lagging strand // *Biochemistry.* – 2008. – Vol. 73. – №11. – P. 1207–1213.
48. Kriaucionis S., Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in purkinje neurons and the brain // *Science.* – 2009. – Vol. 324. – №5929. – P. 929–930.
49. Masaoka A., Matsubara M., Hasegawa R., Tanaka T., Kurisu S., Terato H., Ohya Y., Karino N., Matsuda A., Ide H. Mammalian 5-formyluracil–DNA glycosylase. 2. Role of SMUG1 uracil–DNA glycosylase in repair of 5-formyluracil and other oxidized and deaminated base lesions // *Biochemistry.* – 2003. – Vol. 42. – №17. – P. 5003–5012.
50. Rydberg B., Lindahl T. Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction // *EMBO J.* – 1982. – Vol. 1. – №2. – P. 211–216.
51. Margison G.P., Santibáñez Koref M.F., Povey A.C. Mechanisms of carcinogenicity/chemotherapy by O6-methylguanine // *Mutagenesis.* – 2002. – Vol. 17. – №6. – P. 483–487.

52. Marnett L.J. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage // *Toxicology*. – 2002. – Vol. 181–182. – P. 219–222.
53. Dosanjh M.K., Chenna A., Kim E., Fraenkel-Conrat H., Samson L., Singer B. All four known cyclic adducts formed in DNA by the vinyl chloride metabolite chloroacetaldehyde are released by a human DNA glycosylase // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1994. – Vol. 91. – №3. – P. 1024–1028.
54. Lee C.-Y.I., Delaney J.C., Kartalou M., Lingaraju G.M., Maor-Shoshani A., Essigmann J.M., Samson L.D. Recognition and processing of a new repertoire of DNA substrates by human 3-methyladenine DNA glycosylase (AAG) // *Biochemistry*. – 2009. – Vol. 48. – №9. – P. 1850–1861.
55. Yoon J.-H., Lee C.-S., O'Connor T.R., Yasui A., Pfeifer G.P. The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight // *J. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 299. – №3. – P. 681–693.
56. Cadet J., Grand A., Douki T. Solar UV radiation-induced DNA bipyrimidine photoproducts: formation and mechanistic insights // *Top. Curr. Chem.* – 2014. – Vol. 356. – P. 249–275.
57. Protić-Sabljić M., Tuteja N., Munson P.J., Hauser J., Kraemer K.H., Dixon K. UV light-induced cyclobutane pyrimidine dimers are mutagenic in mammalian cells // *Mol. Cell. Biol.* – 1986. – Vol. 6. – №10. – P. 3349–3356.
58. Kelner A. Effect of visible light on the recovery of *Streptomyces Griseus* Conidia from ultraviolet irradiation injury // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1949. – Vol. 35. – №2. – P. 73–79.
59. Carell T., Burgdorf L.T., Kundu L.M., Cichon M. The mechanism of action of DNA photolyases // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2001. – Vol. 5. – №5. – P. 491–498.
60. Trewick S.C., Henshaw T.F., Hausinger R.P., Lindahl T., Sedgwick B. Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage // *Nature*. – 2002. – Vol. 419. – №6903. – P. 174–178.
61. Falnes P.Ø., Johansen R.F., Seeberg E. AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli* // *Nature*. – 2002. – Vol. 419. – №6903. – P. 178–182.
62. Duncan T., Trewick S.C., Koivisto P., Bates P.A., Lindahl T., Sedgwick B. Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 99. – №26. – P. 16660–16665.
63. Fromme J.C., Verdine G.L. Base Excision Repair // *Adv. Protein Chem.* – 2004. – Vol. 69. – P. 1–41.
64. Mol C.D., Hosfield D.J., Tainer J.A. Abasic site recognition by two apurinic/aprimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means // *Mutat. Res.* – 2000. – Vol. 460. – №3–4. – P. 211–229.
65. Gros L., Ishchenko A.A., Ide H., Elder R.H., Sapparbaev M.K. The major human AP endonuclease (Ape1) is involved in the nucleotide incision repair pathway // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol. 32. – №1. – P. 73–81.

66. Ishchenko A.A., Ide H., Ramotar D., Nevinsky G., Sapparbaev M. Alpha-anomeric deoxynucleotides, anoxic products of ionizing radiation, are substrates for the endonuclease IV-type AP endonucleases // *Biochemistry*. – 2004. – Vol. 43. – №48. – P. 15210–15216.
67. Ide H., Ramotar D., Nevinsky G., Sapparbaev M. Alpha-deoxyadenosine, a major anoxic radiolysis product of adenine in DNA, is a substrate for *Escherichia coli* endonuclease IV // *Biochemistry*. – 1994. – Vol. 33. – №25. – P. 7842–7847.
68. Ischenko A.A., Sapparbaev M.K. Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage // *Nature*. – 2002. – Vol. 415. – №6868. – P. 183–187.
69. Truglio J.J., Croteau D.L., Van Houten B., Kisker C. Prokaryotic Nucleotide Excision Repair: The UvrABC System // *Chem. Rev.* – 2006. – Vol. 106. – №2. – P. 233–252.
70. Hanawalt P.C., Ford J.M., Lloyd D.R. Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer // *Mutat. Res.* – 2003. – Vol. 544. – №2–3. – P. 107–114.
71. Yang W. Structure and function of mismatch repair proteins // *Mutat. Res.* – 2000. – Vol. 460. – №3–4. – P. 245–256.
72. Hsieh P. Molecular mechanisms of DNA mismatch repair // *Mutat. Res.* – 2001. – Vol. 486. – №2. – P. 71–87.
73. Yang W., Junop M.S., Ban C., Obmolova G., Hsieh P. DNA mismatch repair: from structure to mechanism // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. – Biol.* – 2000. – Vol. 65. – P. 225–232.
74. Iyer R.R., Pluciennik A., Burdett V., Modrich P.L. DNA Mismatch repair: functions and mechanisms // *Chem. Rev.* – 2006. – Vol. 106. – №2. – P. 302–323.
75. David S.S., Shea V.L.O., Kundu S. base excision repair of oxidative DNA damage // *Nature*. – 2010. – Vol. 447. – №7147. – P. 941–950.
76. Wallace S.S. DNA glycosylases search for and remove oxidized DNA bases // *Environ. – Mol. – Mutagen.* – 2013. – Vol. 54. – №9. – P. 691–704.
77. Lindahl T. Uracil-DNA glycosylase from *Escherichia coli* // *Methods Enzymol.* – 1980. – Vol. 65. – №C. – P. 284–290.
78. Olsen L.C., Aasland R., Wittwer C.U., Krokan H.E., Helland D.E. Molecular cloning of human uracil-DNA glycosylase, a highly conserved DNA repair enzyme // *EMBO J.* – 1989. – Vol. 8. – №10. – P. 3121–3125.
79. Strniste G.F., Wallace S.S. Endonucleolytic incision of x-irradiated deoxyribonucleic acid by extracts of *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1975. – Vol. 72. – №6. – P. 1997–2001.
80. Yang N., Chaudhry M.A., Wallace S.S. Base excision repair by hNTH1 and hOGG1: A two edged sword in the processing of DNA damage in γ -irradiated human cells // *DNA Repair (Amst.)*. – 2006. – Vol. 5. – №1. – P. 43–51.

81. Ide H., Kotera M. Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA // *Biol. Pharm. Bull.* – 2004. – Vol. 27. – №4. – P. 480–485.
82. Prasad A., Wallace S.S., Pederson D.S. Initiation of base excision repair of oxidative lesions in nucleosomes by the human, bifunctional DNA glycosylase NTH1 // *Mol. Cell. Biol.* – 2007. – Vol. 27. – №24. – P. 8442–8453.
83. Miyabe I., Zhang Q.-M., Kino K., Sugiyama H., Takao M., Yasui A., Yonei S. Identification of 5-formyluracil DNA glycosylase activity of human hNTH1 protein // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – Vol. 30. – №15. – P. 3443–3448.
84. Matsumoto Y., Zhang Q.M., Takao M., Yasui A., Yonei S. Escherichia coli Nth and human hNTH1 DNA glycosylases are involved in removal of 8-oxoguanine from 8-oxoguanine/guanine mispairs in DNA // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – Vol. 29. – №9. – P. 1975–1981.
85. Prakash A., Doublé S., Wallace S.S. The Fpg/Nei family of DNA glycosylases // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* – 2012. – Vol. 110. – P. 71–91.
86. Kathe S.D., Barrantes-Reynolds R., Jaruga P., Newton M.R., Burrows C.J., Bandaru V., Dizdaroglu M., Bond J.P., Wallace S.S. Plant and fungal Fpg homologs are formamidopyrimidine DNA glycosylases but not 8-oxoguanine DNA glycosylases // *DNA Repair (Amst.)*. – 2009. – Vol. 8. – №5. – P. 643–653.
87. Melamede R.J., Hatahet Z., Kow Y.W., Ide H., Wallace S.S. Isolation and characterization of endonuclease VIII from Escherichia coli // *Biochemistry.* – 1994. – Vol. 33. – №5. – P. 1255–1264.
88. Rosenquist T.A., Zaika E., Fernandes A.S., Zharkov D.O., Miller H., Grollman A.P. The novel DNA glycosylase, NEIL1, protects mammalian cells from radiation-mediated cell death // *DNA Repair (Amst.)*. – 2003. – Vol. 2. – №5. – P. 581–591.
89. Dou H., Mitra S., Hazra T.K. (2003) Repair of Oxidized Bases in DNA Bubble Structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2 // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, – №50 – P. 49679–49684.
90. Hailer M.K., Slade P.G., Martin B.D., Rosenquist T.A., Sugden K.D. (2005) Recognition of the oxidized lesions spiroiminodihydantoin and guanidinohydantoin in DNA by the mammalian base excision repair glycosylases NEIL1 and NEIL2 // *DNA Repair (Amst.)*. – 2005. – Vol 4 – №1 – P. 41–50.
91. Liu M., Doublé S., Wallace S. S. (2013) Neil3, the final frontier for the DNA glycosylases that recognize oxidative damage // *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* – 2013 – Vol. – 743–744. – P. 4–11.
92. McCullough A.K., Dodson M.L., Lloyd R.S. Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures // *Annu. Rev. Biochem.* – 1999. – Vol. 68. – №1. – P. 255–285.

93. Kubota Y., Nash R.A., Klungland A., Schär P., Barnes D.E., Lindahl T. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein // *EMBO J.* – 1996. – Vol. 15. – №23. – P. 6662–6670.
94. Matsumoto Y., Kim K. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair // *Science.* – 1995. – Vol. 269. – №5224. – P. 699–702.
95. Sobol R.W., Horton J.K., Kühn R., Gu H., Singhal R.K., Prasad R., Rajewsky K., Wilson S.H. Requirement of mammalian DNA polymerase- β in base-excision repair // *Nature.* – 1996. – Vol. 379. – №6561. – P. 183–186.
96. Wei Y.F., Robins P., Carter K., Caldecott K., Pappin D.J., Yu G.L., Wang R.P., Shell B.K., Nash R.A., Schär P. Molecular cloning and expression of human cDNAs encoding a novel DNA ligase IV and DNA ligase III, an enzyme active in DNA repair and recombination // *Mol. Cell. Biol.* – 1995. – Vol. 15. – №6. – P. 3206–3216.
97. Frosina G., Fortini P., Rossi O., Carrozzino F., Raspaglio G., Cox L.S., Lane D.P., Abbondandolo A., Dogliotti E. Two pathways for base excision repair in mammalian cells // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271. – №16. – P. 9573–9578.
98. Kim K., Biade S., Matsumoto Y. Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – №15. – P. 8842–8848.
99. Petermann E., Ziegler M., Oei S.L. ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair // *DNA Repair (Amst).* – 2003. – Vol. 2. – №10. – P. 1101–1114.
100. Huffman J.L., Sundheim O., Tainer J.A. DNA base damage recognition and removal: New twists and grooves // *Mutat. Res.* – 2005. – Vol. 577. – №1. – P. 55–76.
101. Hitomi K., Iwai S., Tainer J.A. The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: Implications for DNA damage recognition, removal, and repair // *DNA Repair (Amst).* – 2007. – Vol. 6. – №4. – P. 410–428.
102. Parikh S.S., Putnam C.D., Tainer J.A. Lessons learned from structural results on uracil-DNA glycosylase // *Mutat. Res.* – 2000. – Vol. 460. – №3–4. – P. 183–199.
103. Pearl L.H. Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily // *Mutat. Res.* – 2000. – Vol. 460. – №3–4. – P. 165–181.
104. Wibley J.E.A., Waters T.R., Haushalter Karl., Verdine G.L., Pearl L.H. Structure and specificity of the vertebrate anti-mutator uracil-DNA glycosylase SMUG1 // *Mol. Cell.* – 2003. – Vol. 11. – №6. – P. 1647–1659.
105. 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. – Vol. 333. – №3. – P. 515–526.

106. Liu P., Burdzy A., Sowers L.C. Substrate recognition by a family of uracil-DNA glycosylases: UNG, MUG, and TDG // *Chem. Res. Toxicol.* – 2002. – Vol. 15. – №8. – P. 1001–1009.
107. David S.S., Williams S.D. Chemistry of Glycosylases and Endonucleases Involved in Base-Excision Repair // *Chem. Rev.* – 1998. – Vol. 98. – №3. – P. 1221–1262.
108. Cortazar D., Kunz C., Saito Y., Steinacher R., Schar P. The enigmatic thymine DNA glycosylase // *DNA Repair (Amst.)* – 2007. – Vol. 6. – №4. – P. 489–504.
109. Neddermann P., Jiricny J. The purification of a mismatch-specific thymine-DNA glycosylase from HeLa cells // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268. – №28. – P. 21218–21224.
110. Neddermann P., Jiricny J. Efficient removal of uracil from G.U mismatches by the mismatch-specific thymine DNA glycosylase from HeLa cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1994. – Vol. 91. – №5. – P. 1642–1646.
111. Barrett T.E., Savva R., Panayotou G., Barlow T., Brown T., Jiricny J., Pearl L.H. Crystal structure of a G:T/U mismatch-specific DNA glycosylase: mismatch recognition by complementary-strand interactions // *Cell* – 1998. – Vol. 92. – №1. – P. 117–129.
112. Visnes T., Doseth B., Pettersen H.S., Hagen L., Sousa M.M.L., Akbari M., Otterlei M., Kavli B., Slupphaug G., Krokan H.E. Uracil in DNA and its processing by different DNA glycosylases // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 2009. – V. 364. – №1517 – P. 563–568.
113. Thayer M.M., Ahern H., Xing D., Cunningham R.P., Tainer J. Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure // *EMBO J.* – 1995. – Vol. 14. – №16. – P. 4108–4120.
114. Kuo C.F., McRee D.E., Fisher C.L., O’Handley S.F., Cunningham R.P., Tainer J.A. Atomic Structure of the DNA Repair [4Fe-4S] Enzyme Endonuclease III // *Science*. – 1992. – Vol. 258. – №5081. – P. 434–440.
115. Banerjee A., Yang W., Karplus M., Verdine G.L. Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damaged DNA // *Nature*. – 2005. – Vol. 434. – №7033. – P. 612–618.
116. Hollis T., Lau A., Ellenberger T. Structural studies of human alkyladenine glycosylase and E. coli 3-methyladenine glycosylase // *Mutat. Res.* – 2000. – V. 460. – №3-4. – P. 201–210.
117. Eichman B.F., O’Rourke E.J., Radicella J.P., Ellenberger, T. Crystal structures of 3-methyladenine DNA glycosylase MagIII and the recognition of alkylated bases // *EMBO J.* – 2003. – V. 22. – №19. – P. 4898–4909.
118. Doherty A.J., Serpell L.C., Ponting C.P. The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – Vol. 24. – №13. – P. 2488–2497.

119. 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. – Vol. 20. – №10. – P. 1603–1611.
120. Lukianova O.A., David S.S. A role for iron–sulfur clusters in DNA repair // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2005. – Vol. 9. – №2. – P. 145–151.
121. Fuss J.O., Tsai C.-L., Ishida J.P., Tainer J.A. Emerging critical roles of Fe–S clusters in DNA replication and repair // *Biochim. Biophys. Acta* – 2015. – Vol. 1853. – №6. – P. 1253–1271.
122. Nuñez N.N., Majumdar C., Lay K.T. Fe–S clusters and MutY base excision repair glycosylases: purification, kinetics, and DNA affinity measurements // *Methods Enzymol.* – 2018. – Vol. 599. – P. 21–68.
123. Metz A.H., Hollis T., Eichman B.F. DNA damage recognition and repair by 3-methyladenine DNA glycosylase I (TAG) // *EMBO J.* – 2007. – Vol. 26. – №9. – P. 2411–2420.
124. Terato H., Masaoka A., Asagoshi K., Honsho A., Ohya Y., Suzuki T., Yamada M., Makino K., Yamamoto K., Ide H. Novel repair activities of AlkA (3-methyladenine DNA glycosylase II) and endonuclease VIII for xanthine and oxanine, guanine lesions induced by nitric oxide and nitrous acid // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – Vol. 30. – №22. – P. 4975–4984.
125. O'Brien P.J., Ellenberger T. Dissecting the Broad Substrate Specificity of Human 3-Methyladenine-DNA Glycosylase // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – №11. – P. 9750–9757.
126. Hendershot J.M., O'Brien P.J. Search for DNA damage by human alkyladenine DNA glycosylase involves early intercalation by an aromatic residue // *J. Biol. Chem.* – 2017. – Vol. 292. – P. 16070–16080.
127. McGoldrick J.P., Yeh Y.C., Solomon M., Essigmann J.M., Lu A.L. Characterization of a mammalian homolog of the *Escherichia coli* MutY mismatch repair protein // *Mol. Cell. Biol.* – 1995. – Vol. 15. – №2. – P. 989–996.
128. Fondufe-Mittendorf Y.N., Härer C., Kramer W., Fritz H.-J. Two amino acid replacements change the substrate preference of DNA mismatch glycosylase Mig.MthI from T/G to A/G // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – Vol. 30. – №2. – P. 614–621.
129. Mol C.D., Arvai A.S., Begley T.J., Cunningham R.P., Tainer J.A. Structure and activity of a thermostable thymine-DNA glycosylase: evidence for base twisting to remove mismatched normal DNA bases // *J. Mol. Biol.* – 2002. – Vol. 315. – №3. – P. 373–384.
130. Yang H., Fitz-Gibbon S., Marcotte E.M., Tai J.H., Hyman E.C., Miller J.H. Characterization of a thermostable DNA glycosylase specific for U/G and T/G mismatches from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum* // *J. Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182. – №5. – P. 1272–1279.
131. Begley T.J., Haas B.J., Noel J., Shekhtman A., Williams W.A., Cunningham R.P. A new member of the endonuclease III family of DNA repair enzymes that removes methylated purines from DNA // *Curr. Biol.* – 1999. – Vol. 9. – №12. – P. 653–656.

132. Robey-Bond S.M., Barrantes-Reynolds R., Bond J.P., Wallace S.S., Bandaru V. Clostridium acetobutylicum 8-oxoguanine DNA glycosylase (Ogg) differs from eukaryotic Oggs with respect to opposite base discrimination // *Biochemistry*. – 2008. – Vol. 47. – №29. – P. 7626–7636.
133. Faucher F., Doublé S., Jia Z. 8-oxoguanine DNA glycosylases: one lesion, three subfamilies // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – Vol. 13. – №6. – P. 6711–6729.
134. Radman M. Endonuclease III: an endonuclease from Escherichia coli that introduces single polynucleotide chain scissions in ultraviolet-irradiated DNA // *Basic Life Sci.* – 1975. – Vol. 5A. – №5. – P. 197–200.
135. Katcher H.L., Wallace S.S. Characterization of the Escherichia coli x-ray endonuclease, endonuclease III // *Biochemistry*. – 1983. – Vol. 22. – №17. – P. 4071–4081.
136. 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. – Vol. 38. – №11. – P. 3335–3344.
137. Dizdaroglu M., Bauche C., Rodriguez H., Laval J. Novel substrates of Escherichia coli Nth protein and its kinetics for excision of modified bases from DNA damaged by free radicals // *Biochemistry*. – 2000. – Vol. 39. – №18. – P. 5586–5592.
138. Bailly V., Verly W.G. Escherichia coli endonuclease III is not an endonuclease but a beta-elimination catalyst // *Biochem. J.* – 1987. – Vol. 242. – №2. – P. 565–572.
139. Cunningham, R. P., and Weiss, B. Endonuclease III (nth) mutants of Escherichia coli // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1985. – Vol. 82. – №2. – P. 474–478.
140. Fromme J.C.C., Verdine G.L. Structure of a trapped endonuclease III-DNA covalent intermediate // *EMBO J.* – 2003. – Vol. 22. – №13. – P. 3461–3471.
141. Gilboa, R., Zharkov, D. O., Golan, G., Fernandes, A. S., Gerchman, S. E., Matz, E., Kycia, J. H., Grollman, A. P., and Shoham, G. Structure of formamidopyrimidine-DNA glycosylase covalently complexed to DNA // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – №22. – P. 19811–19816.
142. 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. – Vol. 21. – №4. – P. 789–800.
143. Zharkov D.O., Shoham G., Grollman A.P. Structural characterization of the Fpg family of DNA glycosylases // *DNA Repair*. – 2003.
144. Wallace S.S., Bandaru V., Kathe S.D., Bond J.P. The enigma of endonuclease VIII // *DNA Repair (Amst)*. – 2003. – Vol. 2. – №5. – P. 441–453.

145. Bandaru V., Sunkara S., Wallace S.S., Bond J.P. A novel human DNA glycosylase that removes oxidative DNA damage and is homologous to Escherichia coli endonuclease VIII // DNA Repair (Amst). – 2002. – Vol. 1. – №7. – P. 517–529.
146. Hazra T.K., Kow Y.W., Hatahet Z., Imhoff B., Boldogh I., Mokkaapati S.K., Mitra S., Izumi T. Identification and Characterization of a Novel Human DNA Glycosylase for Repair of Cytosine-derived Lesions // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277. – №34. – P. 30417–30420.
147. Hazra T.K., Izumi T., Boldogh I., Imhoff B., Kow Y.W., Jaruga P., Dizdaroglu M., Mitra S. Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2002. – Vol. 99. – №6. – P. 3523–3528.
148. Bailly V., Verly W.G., O'Connor T.R., Laval, J. Mechanism of DNA strand nicking atapurinic/aprimidinic sites by Escherichia coli [formamidopyrimidine]DNA glycosylase // Biochem. – J. – 1989. – Vol. 262. – №2. – P. 581–589.
149. Boiteux S., O'Connor T.R., Lederer F., Gouyette A., Laval J. Homogeneous Escherichia coli FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA atapurinic/aprimidinic sites // J. Biol. Chem. – 1990. – Vol. 265. – №7. – P. 3916–3922.
150. 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. – 1991. – Vol. 88. – №11. – P. 4690–4694.
151. Laval J., Jurado J., Sagarbaev M.K., Sidorkina O. Antimutagenic role of base-excision repair enzymes upon free radical-induced DNA damage // Mutat. Res. – 1998. – Vol. 402. – №1–2. – P. 93–102.
152. 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. – Vol. 268. – №12. – P. 9063–9070.
153. Fromme, J. C., and Verdine, G. L. DNA Lesion Recognition by the Bacterial Repair Enzyme MutM // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278. – №51 – P. 51543–51548.
154. Fleming, A. M., and Burrows, C. J. Formation and processing of DNA damage substrates for the hNEIL enzymes // Free Radic. Biol. Med. – 2017. – Vol. 107. – P. 35–52.
155. Doublet S., Bandaru V., Bond J.P., Wallace S.S. The crystal structure of human endonuclease VIII-like 1 (NEIL1) reveals a zincless finger motif required for glycosylase activity // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2004. – Vol. 101. – №28. – P. 10284–10289.
156. Jiang, D., Hatahet, Z., Melamed, R. J., Kow, Y. W., and Wallace, S. S. Characterization of Escherichia coli endonuclease VIII // J. Biol. Chem. . – 1997. – Vol. 272. – №51. – P. 32230–32239.

157. Jiang D., Hatahet Z., Blaisdell J.O., Melamede R.J., Wallace S.S. Escherichia coli endonuclease VIII: Cloning, sequencing, and overexpression of the nei structural gene and characterization of nei and nei nth mutants // *J. Bacteriol.* – 1997. – Vol. 179. – №11. – P. 3773–3782.
158. Golan G., Zharkov D.O., Feinberg H., Fernandes A.S., Zaika E.I., Kycia J.H., Grollman A.P., Shoham G. Structure of the uncomplexed DNA repair enzyme endonuclease VIII indicates significant interdomain flexibility // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – Vol. 33. – №15. – P. 5006–5016.
159. Kung H.C., Bolton P.H. Structure of a duplex DNA containing a thymine glycol residue in solution // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – №14. – P. 9227–9236.
160. 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. – Vol. 36. – №16. – P. 5084–5096.
161. Miller H., Fernandes A.S., Zaika E., McTigue M.M., Torres M.C., Wentz M., Iden C.R., Grollman A.P. Stereoselective excision of thymine glycol from oxidatively damaged DNA // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol. 32. – №1. – P. 338–345.
162. Dizdaroglu M., Laval J., Boiteux S. Substrate specificity of the Escherichia coli endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals // *Biochemistry.* – 1993. – Vol. 32. – №45. – P. 12105–12111.
163. Asagoshi K., Odawara H., Nakano H., Miyano T., Terato H., Ohshima Y., Seki S., Ide H. Comparison of substrate specificities of Escherichia coli endonuclease III and its mouse homologue (mNTH1) using defined oligonucleotide substrates // *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 39. – №37. – P. 11389–11398.
164. 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. – Vol. 273. – №16. – P. 10026–10035.
165. Bjoras, M., Luna, L., Johnsen, B., Hoff, E., Haug, T., Rognes, T., and Seeberg, E. Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites // *EMBO J.* – 1997. – Vol. 16. – №20. – P. 6314–6322.
166. Wang D., Essigmann J.M. Kinetics of oxidized cytosine repair by endonuclease III of Escherichia coli // *Biochemistry.* – 1997. – Vol. 36. – №28. – P. 8628–8633.
167. Katafuchi A., Nakano T., Masaoka A., Terato H., Iwai S., Hanaoka F., Ide H. Differential Specificity of human and Escherichia coli endonuclease III and VIII homologues for oxidative base lesions // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – №14. – P. 14464–14471.
168. Jurado J., Sapparbaev M., Matray T.J., Greenberg M.M., Laval J. The ring fragmentation product of thymidine C5-hydrate when present in DNA is repaired by the Escherichia coli Fpg and Nth proteins // *Biochemistry.* – 1998. – Vol. 37. – №21. – P. 7757–7763.

169. Greenberg M.M., Weledji Y.N., Kroeger K.M., Kim J., Goodman M.F. In vitro effects of a C4'-oxidized abasic site on DNA polymerases // *Biochemistry*. – 2004. – Vol. 43. – №9. – P. 2656–2663.
170. Wiederholt C.J., Patro J.N., Jiang Y.L., Haraguchi K., Greenberg M.M. Excision of formamidopyrimidine lesions by endonucleases III and VIII is not a major DNA repair pathway in *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – Vol. 33. – №10. – P. 3331–3338.
171. Hazra T.K., Muller J.G., Manuel R.C., Burrows C.J., Lloyd R.S., Mitra S. Repair of hydantoins, one electron oxidation product of 8-oxoguanine, by DNA glycosylases of *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – Vol. 29. – №9. – P. 1967–1974.
172. Tremblay S., Wagner J.R. Dehydration, deamination and enzymatic repair of cytosine glycols from oxidized poly(dG-dC) and poly(dI-dC) // *Nucleic Acids Res.* – Oxford University Press. – 2008. – Vol. 36. – №1. – P. 284–293.
173. 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. – Vol. 28. – №10. – P. 4444–4449.
174. Fasman G.D. *Handbook of biochemistry and molecular biology* // CRC Press – 1975. – 3rd ed. – Cleveland.
175. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. // *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.* – 1984. – Мир. – Москва.
176. Jones A.C., Neely R.K. 2-aminopurine as a fluorescent probe of DNA conformation and the DNA–enzyme interface // *Q. Rev. Biophys.* – 2015. – Vol. 48. – №02. – P. 244–279.
177. Rachofsky E.L., Osman R., Ross J.B.A. Probing structure and dynamics of DNA with 2-aminopurine: effects of local environment on fluorescence // *Biochemistry*. – 2001. – Vol. 40. – №4. – P. 946–956.
178. Jean J.M., Hall K.B. 2-Aminopurine fluorescence quenching and lifetimes: Role of base stacking // *PNAS*. – 2000. – Vol. 98. – №1. – P. 37–41.
179. Bharill S., Sarkar P., Ballin J.D., Gryczynski I., Wilson G.M., Gryczynski Z. Fluorescence intensity decays of 2-aminopurine solutions: lifetime distribution approach // *Anal. Biochem.* – 2008. – Vol. 377. – №2. – P. 141–149.
180. Sandin P., Börjesson K., Li H., Mårtensson J., Brown T., Wilhelmsson L.M., Albinsson B. Characterization and use of an unprecedentedly bright and structurally non-perturbing fluorescent DNA base analogue // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – Vol. 36. – №1. – P. 157–167.
181. Börjesson K., Sandin P., Wilhelmsson L.M. Nucleic acid structure and sequence probing using fluorescent base analogue tC^O // *Biophys. Chem.* – 2009. – Vol. 139. – №1. – P. 24–28.

182. Kuzmič P. DynaFit-a software package for enzymology // *Methods Enzymol.* – 2009. – Vol. 467. – №C. – P. 247–280.
183. Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S. Step-by-step mechanism of DNA damage recognition by human 8-oxoguanine DNA glycosylase // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1840. – №1. – P. 387–395.
184. Kuznetsov N.A., Vorobjev Y.N., Krasnoperov L.N., Fedorova O.S. Thermodynamics of the multi-stage DNA lesion recognition and repair by formamidopyrimidine-DNA glycosylase using pyrrolocytosine fluorescence—stopped-flow pre-steady-state kinetics // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – Vol. 40. – №15. – P. 7384–7392.
185. Kuznetsov N.A., Kuznetsova A.A., Vorobjev Y.N., Krasnoperov L.N., Fedorova O.S. Thermodynamics of the DNA damage repair steps of human 8-oxoguanine DNA glycosylase // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – №6. – P. e98495.
186. 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. – Vol. 33. – №12. – P. 3919–3931.
187. Kuznetsova A.A., Vorobjev Y.N., Barthes N.P.F., Michel B.Y., Burger A., Fedorova O.S. New environment-sensitive multichannel DNA fluorescent label for investigation of the protein-DNA interactions // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – №6. – P. E2091–E2099.
188. 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. – Vol. 403. – №6772. – P. 859–866.
189. Privalov P.L., Dragan A.I., Crane-Robinson C., Breslauer K.J., Remeta D.P., Minetti C.A.S.A. What drives proteins into the major or minor grooves of DNA? // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 365. – №1. – P. 1–9.
190. Privalov P.L., Crane-Robinson C. Forces maintaining the DNA double helix and its complexes with transcription factors // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 2018. – Vol. 135. – P. 30–48.
191. Privalov P.L., Jelesarov I., Read C.M., Dragan A.I., Crane-Robinson C. The energetics of HMG box interactions with DNA: thermodynamics of the DNA binding of the HMG box from mouse *sox-5* // *J. Mol. Biol.* – 1999. – Vol. 294. – №4. – P. 997–1013.
192. Jen-Jacobson L., Engler L.E., Jacobson L.A. Structural and thermodynamic strategies for site-specific DNA binding proteins // *Structure.* – 2000. – Vol. 8. – №10. – P. 1015–1023.
193. Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., Fedorova O.S. Conformational dynamics of the interaction of *Escherichia coli* endonuclease VIII with DNA substrates // *DNA Repair (Amst).* – 2012. – Vol. 11. – №11. – P. 884–891.

194. Nelson S.R., Dunn A.R., Kathe S.D., Warshaw D.M., Wallace S.S. Two glycosylase families diffusively scan DNA using a wedge residue to probe for and identify oxidatively damaged bases // *Proc. Natl. Acad.* – 2014. – Vol. 111. – №20. – P. E2091–E2099.
195. 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. – Vol. 277. – №4. – P. 2938–2944.
196. 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. – Vol. 39. – №49. – P. 15266–15271.