На правах рукописи

КОСОВА АНАСТАСИЯ АНДРЕЕВНА

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА – Ku-АНТИГЕНА И ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД–3–ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ – С АПУРИНОВЫМИ/АПИРИМИДИНОВЫМИ САЙТАМИ В ДНК

03.01.04 − биохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

Ходырева Светлана Николаевна, д.б.н., доцент
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Маргулис Борис Александрович, д.б.н., профессор
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, г.н.с.

Кубарева Елена Александровна, д.х.н., профессор
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г.н.с.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Защита состоится «20» апреля 2018 г. в $12^{\underline{00}}$
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « » марта 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
к.х.н., доцент Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Клетки живых организмов постоянно подвергаются воздействию множества факторов экзогенного и эндогенного происхождения. Это неизбежно приводит к возникновению в их ДНК разнообразных повреждений, которые существенно влияют на стабильность генома, что может проявляться в инактивации генов или изменении свойств белков, закодированных в них. Данные события лежат в основе онкотрансформации.

Апуриновые/апиримидиновые (АР) сайты, возникающие в клетках млекопитающих с частотой от 10 000 до 50 000 раз в сутки, — одни из наиболее распространенных повреждений геномной ДНК (Lindahl, 1993). Нерепарированные АР-сайты мутагенны и цитотоксичны. Потеря оснований ДНК, приводящая к формированию АР-сайтов, происходит путем спонтанного гидролиза *N*-гликозидной связи или в результате катализируемого ДНК-гликозилазами удаления поврежденных оснований на ранней стадии процесса эксцизионной репарации оснований (ЭРО). Считается, что независимо от механизма возникновения АР-сайты репарируются системой ЭРО. В большинстве случаев репарация АР-сайтов начинается с гидролиза фосфодиэфирной связи с 5′-стороны от АР-сайта — катализирует этот процесс апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 (APE1). АР-сайты также могут расщепляться ДНК-гликозилазами или другими ферментами, имеющими АР-лиазную активность, по механизму β- или β,δ-элиминирования. Получившиеся интермедиаты процессируются ферментами ЭРО на последующих стадиях (Krokan et al., 2000). Несмотря на то, что основным ферментом, инициирующим репарацию АР-сайтов в клетках млекопитающих, является APE1, существуют также и запасные пути репарации АР-сайтов. По-видимому, по APE1-зависимому механизму происходит репарация изолированных АР-сайтов, которые возникают при умеренном уровне повреждений ДНК. Однако при воздействии некоторых сильных стрессовых факторов, таких как ионизирующее излучение, а также лекарственных препаратов-радиомиметиков АР-сайты могут входить в состав множественных повреждений (называемых еще кластерными повреждениями), которые также включают двухцепочечные и одноцепочечные разрывы и окисленные основания в пределах 1–2 витков спирали ДНК (Ward, 1988). Репарация кластерных повреждений в настоящее время недостаточно изучена, и ее исследование представляет большой интерес, поскольку в узнавании и репарации АР-сайтов в контексте кластерных повреждений, вероятно, участвуют особые белки.

Остатки дезоксирибозы в составе АР-сайтов находятся в равновесии между циклической, фуранозной, и ациклической, альдегидной, формами (Atamna et al., 2000). Альдегидная форма АР-сайта может образовывать с аминогруппой белка интермедиат — основание Шиффа. Способностью

формировать основания Шиффа с дезоксирибозой АР-сайта (в том числе и с его расщепленными формами) обладают не только ферменты, основной функцией которых является участие в ЭРО, но и многие другие белки (Ходырева и Лаврик, 2011). Связываясь с АР-сайтами, данные белки могут не только участвовать в их репарации, но и обеспечивать их временную защиту и передачу клеточного сигнала.

Формирование основания Шиффа — обратимый процесс, но интермедиат можно стабилизировать, восстанавливая его боргидридом натрия (Левина и др., 1980). Получающийся ковалентный аддукт белок–ДНК стабилен в условиях последующего анализа. Таким образом, сшивку белков с АР-сайтами в комбинации с масс-спектрометрией можно применять для целенаправленного поиска и идентификации неизвестных белков, которые могут взаимодействовать с этими повреждениями ДНК, в прокариотических и эукариотических клетках. С использованием данного подхода были идентифицированы такие белки, как Ku-антиген и поли(ADP-рибозо)полимераза 1 (PARP1) человека (Ilina et al., 2008; Khodyreva et al., 2010).

Кроме того, было показано, что несколько белков, в частности, участник ЭРО XRCC1 (Nazarkina et al., 2007), метилтрансфераза ALKBH1 (Muller et al., 2013) и PARP1 (Prasad et al., 2014), способны формировать боргидрид-независимые («суицидальные») сшивки с АР-сайтами, но механизм и биологическая значимость данных взаимодействий изучены не до конца.

Целью данной работы являлись поиск и идентификация белков клеток человека, формирующих ковалентные аддукты с АР-сайтами в составе ДНК-дуплексов, имитирующих некоторые типы кластерных повреждений, а также исследование функциональной значимости взаимодействий данных белков с АР-сайтами в ДНК.

В ходе работы планировалось решить следующие **задачи**:

1) провести поиск белков, взаимодействующих с образованием основания Шиффа с АР-сайтами в составе различных АР-ДНК, в экстрактах клеток человека;

2) с помощью комбинации аффинной хроматографии и масс-спектрометрического анализа идентифицировать белки в составе аддуктов с АР-ДНК;

3) для выяснения функциональной значимости обнаруженных взаимодействий белков с АР-ДНК выделить эти белки из культивируемых клеток человека в индивидуальном состоянии;

4) изучить взаимодействие очищенных белков с различными АР-ДНК, оценить их способность расщеплять АР-сайты и взаимодействовать с ферментами эксцизионной репарации оснований.

Методология и методы исследования. Исследования выполнены с использованием экстрактов культивируемых клеток человека и

индивидуальных белков. В работе применены такие методы, как аффинная модификация белков химически активными ДНК, хроматография, иммуноферментная детекция белков, электрофоретический и масс-спектрометрический анализ, а также культивирование эукариотических клеток.

Научная новизна и практическая значимость работы.

В рамках данной работы усовершенствован метод идентификации белков, взаимодействующих с АР-сайтами, с помощью комбинации аффинной модификации, аффинной хроматографии и MALDI-TOF масс-спектрометрии, который ранее был апробирован в лаборатории автора. Для увеличения выхода сшивок целевых белков с ДНК и снижения уровня неспецифических сшивок введена стадия обогащения клеточных экстрактов по целевым белкам за счет сульфат-аммонийного осаждения белков или хроматографических методов. Это позволяет получить необходимое для идентификации количество продуктов сшивки белок–ДНК без использования высоких концентраций белков экстрактов и/или ДНК.

В данной работе подробно охарактеризовано обнаруженное ранее взаимодействие Ku с АР-сайтами. В частности, было установлено, что эффективность формирования боргидрид-зависимых аддуктов Ku с АР-ДНК зависит от ее структуры. Впервые показана способность Ku расщеплять АР-сайты в составе определенного типа двухцепочечной ДНК, и установлен механизм данной реакции. Показано, что Ku способен инициировать запасной APE1-независимый путь репарации АР-сайтов, который может реализовываться в клетках при дефиците АР-эндонуклеазной активности, например, при фармакологическом ингибировании активности APE1 в процессе химиотерапии.

Впервые обнаружено и детально изучено взаимодействие гликолитического фермента глицеральдегид-3-фостфатдегидрогеназы (GAPDH) с АР-сайтами. Показана ее способность формировать с данными повреждениями как богидрид-зависимые, так и боргидрид-независимые (необратимые) ковалентные аддукты, которые могут образовываться в клетках в условиях окислительного стресса. Взаимодействие GAPDH с АР-сайтами, вероятно, препятствует их репарации и может быть одним из факторов, приводящих к клеточной гибели. Полученные данные позволяют углубить знания о механизмах клеточного ответа на АР-сайты, что имеет большое значение для таких практических областей, как разработка методов терапии онкозаболеваний.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. АР-ДНК-дуплекс с выступающими одноцепочечными участками (DDE-АР-ДНК) эффективно образует боргидрид-зависимые аддукты с белками экстрактов клеток человека, кажущиеся молекулярные массы которых составляют около 100 кДа и 45 кДа; данные аддукты характерны только для АР-ДНК такой структуры.

2. Белок в составе 100-кДа аддукта представлен Ku80-субъединицей Ku-антигена, а в состав 45-кДа аддукта входит GAPDH.
3. Эффективность образования 100-кДа аддукта Ku80–DDE-AP-ДНК обусловлена определенным сочетанием длины выступающих концов, основания напротив AP-сайта и положения AP-сайта в цепи. Ku-антиген способен расщеплять AP-сайты в составе DDE-AP-ДНК, в отличие от аналогичного AP-ДНК-дуплекса с тупыми концами; расщепление происходит по механизму β-элиминирования и более эффективно для апуриновых сайтов. Проявляя AP-лиазную активность, Ku-антиген способен инициировать запасной APE1-независимый путь репарации AP-сайтов в реконструированной системе.
4. GAPDH эффективно формирует аддукты с DDE-AP-ДНК и одноцепочечной AP-ДНК, в отличие от AP-ДНК-дуплекса с тупыми концами, и при этом не проявляет значимой AP-лиазной активности. GAPDH также способна формировать аддукты с AP-ДНК, расщепленной по механизму β-элиминирования. GAPDH образует как боргидрид-зависимые, так и боргидрид-независимые аддукты с AP-ДНК. Образование аддуктов GAPDH–AP-ДНК ингибируется NAD^+. Восстановление дисульфидных мостиков в GAPDH приводит к резкому уменьшению образования сшивок с AP-ДНК.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 5 научных статей в рецензируемых журналах. Все журналы индексируются в международных базах Web of Science и/или Scopus. Результаты работы были представлены на 15 международных и российских конференциях: 51-й Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2013), XX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2013), 6th GDRI Meeting “From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies” (Париж, Франция, 2013), Зимней научной школе «Современная биология и биотехнологии будущего» (Звенигород, 2014), FEBS EMBO 2014 Conference (Париж, Франция, 2014), I и II Международных конференциях молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов “OpenBIO” (Кольцово, 2014 и 2015), The Fourth Meeting of the CNRS Laboratoire International Associé NUCPROT (Новосибирск, 2015), VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015), VIII International meeting “From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies” (Тбилиси, Грузия, 2015), 10th Quinquennial Conference on Responses to DNA damage: from molecule to disease (Эгмонд-ан-Зее, Нидерланды, 2016), FEBS Advanced Course “Ligand-Binding Theory and Practice” (Нове-Гради, Чехия, 2016), Международной конференции «Химическая биология-2016», посвященной 90-летнему юбилею академика Д. Г. Кнорре (Новосибирск, 2016), 10th International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology (Новосибирск, 2016), 42nd FEBS Congress (Иерусалим, Израиль, 2017).

Личный вклад автора. Все результаты, приведенные в диссертации, получены самим автором или при его непосредственном участии. Кроме того, автор активно участвовала в анализе результатов и написании статей.

Структура и объём работы. Диссертационная работа состоит из введения, трёх глав, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Материал изложен на 154 страницах и содержит 46 рисунков, 4 таблицы, 4 приложения и список литературы из 222 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В данной работе Ku80-субъединица Ku-антигена и GAPDH были идентифицированы как белки, формирующие боргидрид-зависимые аддукты с АР-сайтами в составе ДНК-дуплекса, структура которого имитирует кластерное повреждение. Затем эти белки были выделены из культивируемых клеток человека в индивидуальном состоянии, и было детально изучено влияние структуры частичных АР-ДНК-дуплексов на их взаимодействие с белками.

1. Идентификация белков клеточных экстрактов человека, формирующих сшивки с АР-сайтами

1.1. Боргидрид-зависимая сшивка белков клеточных экстрактов с разными типами АР-ДНК

Ранее при поиске белков клеточных экстрактов, способных взаимодействовать с АР-сайтами в составе различных ДНК-структур, было показано, что наборы продуктов сшивки белок–ДНК определяются наличием в АР-ДНК структурных особенностей и в ряде случаев образуются уникальные продукты, которые характерны только для конкретной ДНК (Ilina et al., 2008). В частности, частичный ДНК-дуплекс, в котором АР-сайт-содержащий олигонуклеотид формирует 5′- и 3′-выступающие одноцепочечные концы длиной 8 нт (DDE-АР-ДНК), образует два основных продукта с кажущейся молекулярной массой около 100 кДа и 45 кДа; 100-кДа продукт характерен только для этой АР-ДНК. В рамках вышеуказанной работы был идентифицирован только белок, формировавший основной продукт с АР-ДНК-дуплексом с тупыми концами (BE-АР-ДНК). Им оказалась Ku80-субъединица Ku-антигена. Ku-антиген высших эукариот, состоящий из двух субъединиц с мол. массами около 70 кДа (Ku70) и 83 кДа (Ku80), является ДНК-связывающим компонентом ДНК-зависимой протеинкиназы. Главная функция Ku заключается в участии в репарации двухцепочечных разрывов ДНК по механизму негомологичного соединения концов (НГСК): он обеспечивает узнавание двухцепочечных разрывов и служит платформой для сборки других белков НГСК около разрыва. Кроме того, Ku имеет множество функций в различных клеточных процессах.

С целью дальнейшего развития походов для поиска и идентификации АР-сайт-узнающих белков в данной работе апробировали использование

флуоресцентно меченых АР-ДНК-зондов. Для модификации белков клеточных экстрактов были применены три типа ДНК, созданные на основе 32-мерного олигонуклеотида с АР-сайтом в середине и флуоресцентной меткой на 5′-конце, — одноцепочечная (оц) АР-ДНК, BE-АР-ДНК и DDE-АР-ДНК. Данные, представленные на рис. 1, доказывают применимость таких АР-ДНК. BE-АР-ДНК формирует в экстрактах клеток человека основной продукт сшивки белок–ДНК с кажущейся молекулярной массой около 90 кДа (дор. 2 и 5). Для DDE-АР-ДНК (дор. 3 и 6) также характерен аддукт с меньшей электрофоретической подвижностью, кажущаяся молекулярная масса которого составляет около 100 кДа. Для оц АР-ДНК (дор. 1 и 4) и DDE-АР-ДНК (дор. 3 и 6) характерен основной продукт с молекулярной массой около 45 кДа; более того, этот выход этого аддукта больше, чем аддукта Ku80 с BE-АР-ДНК; он формируется не только в экстрактах клеток человека, но и в экстракте клеток CHO (яичника китайского хомячка) (дор. 7 и 9). Следует отметить, что в случае BE-АР-ДНК 45-кДа аддукт присутствует только в следовых количествах, что свидетельствует о специфичности узнавания белком АР-ДНК с оц участками.

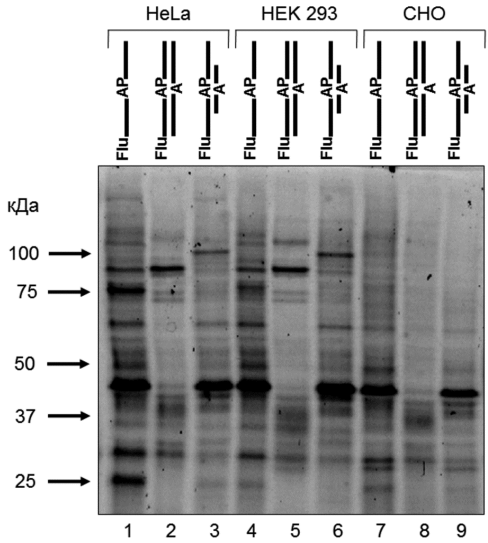

Рис. 1. Скан флуоресценции в геле после электрофоретического разделения продуктов боргидрид-зависимой сшивки белков клеточных экстрактов (3 мг/мл) с 500 нМ АР-ДНК с флуоресцентной меткой (5,6-карбоксифлуоресцеин). Названия клеточных линий и типы АР-ДНК указаны на рисунке.

Ввиду эффективной и специфичной сшивки с АР-ДНК белков, формирующих 100-кДа и 45-кДа аддукты, представлялась интересной идентификация данных белков.

1.2. Идентификация Ku

Методика идентификации белков, способных взаимодействовать с АР-сайтами путем формирования основания Шиффа, была разработана и апробирована в нашей лаборатории ранее (Ilina et al., 2008; Khodyreva et al., 2010). Данный подход включает следующие этапы (рис. 2). Сначала проводят

сшивку белков клеточного экстракта с ^{32}P-меченой АР-ДНК, содержащей остаток биотина в препаративных количествах. Затем осуществляют очистку «пришитых» белков с помощью аффинной хроматографии на парамагнитных частицах, покрытых стрептавидином. После удаления неспецифически связанных белков в процессе отмывки продукты сшивки белков с ДНК элюируют с сорбента и разделяют их с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в системе Лэммли. Полосу белка, видимую по окрашиванию кумасси и точно соответствующую полосе на радиоавтографе, вырезают из геля. Белок непосредственно в геле подвергают исчерпывающему трипсинолизу и экстрагированные пептиды анализируют MALDI-TOF масс-спектрометрией. По результатам масс-спектрометрического анализа проводится пептидное картирование — поиск белка в базах данных с использованием компьютерных программ, таких как “Mascot”. В данной программе используется оценка MOWSE Score, которая вычисляется как -10*Log(P), где P — вероятность того, что результат идентификации является случайным событием.

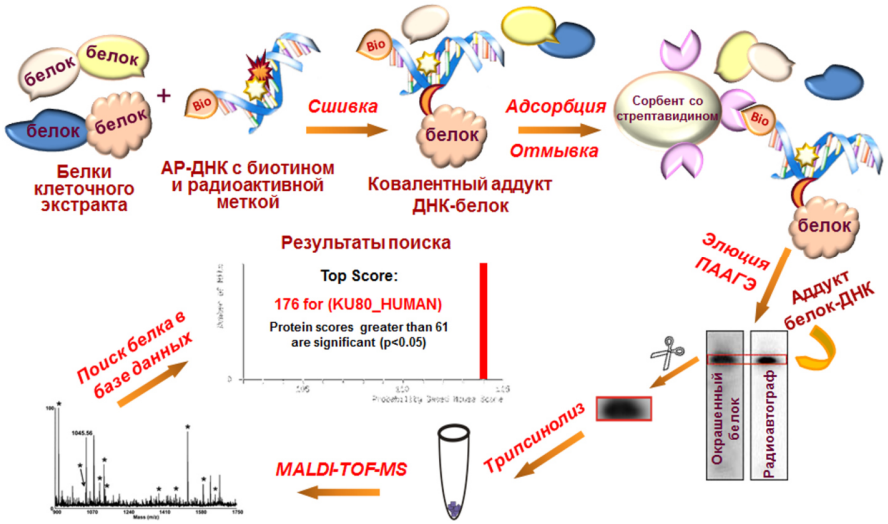

Рис. 2. Схема идентификации белков, способных взаимодействовать с АР-сайтами путем формирования основания Шиффа. Bio обозначает остаток биотина, желтая звездочка — радиоактивную метку, оранжевая — АР-сайт. Пояснения см. в тексте.

Для препаративного выделения 100-кДа аддукта использовали фракцию экстракта клеток HEK293, обогащенную по целевому белку (элюат с гепарин-сефарозы 450–490 мМ NaCl). Продукты, специфически адсорбированные за счет взаимодействия остатка биотина в составе ДНК со стрептавидином, иммобилизованным на сорбенте, дополнительно разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле. По окрашиванию кумасси из геля

вырезали 5 белковых полос с мол. массами от 100 до 70 кДа (рис. 3). Четырем верхним белковым полосам соответствуют полосы на радиоавтографе. Это свидетельствует о присутствии в составе продукта ДНК, содержащей радиоактивную метку (причем полоса на уровне 100 кДа при обоих способах визуализации имеет наибольшую интенсивность). Белок в составе каждого из данных аддуктов достоверно идентифицирован как Ku80-субъединица Ku-антигена, при этом оценки MOWSE Score составили 176 (для белка в составе 100-кДа аддукта), 149, 67 и 85. Белок в самой нижней полосе, для которого нет соответствующего сигнала на радиоавтографе, идентифицирован как Ku70-субъединица. Задержка Ku70 на сорбенте обусловлена прочными белок-белковыми взаимодействиями с Ku80-полипептидом. Функционально активный Ku представляет собой гетеродимер, состоящий из Ku80- и Ku70-полипептидов, который разделяется на мономеры в процессе анализа.

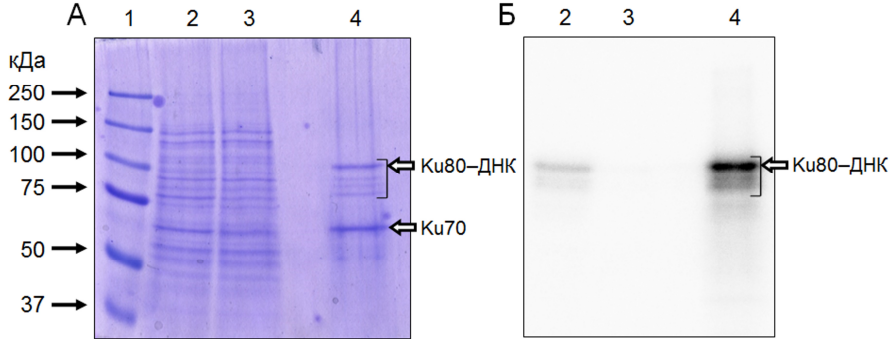

Рис. 3. Анализ и очистка ковалентных аддуктов белок–АР-ДНК с молекулярными массами 90–100 кДа для идентификации белков в их составе с помощью MALDI-TOF-MS. В эксперименте использовали белки экстракта клеток HEK293, элюированные с гепарин-сефарозы, и 200 нМ DDE-АР-ДНК. Стрелками обозначены полосы, которые вырезали из геля для идентификации белков.
(А) Скан геля, окрашенного кумасси R-250. Дор. 1 – маркеры молекулярной массы; дор. 2 – аликвота (25 мкл), отобранная из реакционной смеси перед инкубацией с сорбентом, содержащим стрептавидин; дор. 3 – аликвота (25 мкл), отобранная из реакционной смеси после инкубации с сорбентом (несвязавшиеся белки); дор. 4 – ковалентные аддукты и белки, связавшиеся с сорбентом.
(Б) Радиоавтограф геля, изображенного на Рис. А.

1.3. Идентификация GAPDH

Препаративное выделение 45-кДа аддукта проводили по вышеописанной схеме, но для аффинной модификации белков АР-ДНК использовали фракцию белков экстракта клеток HeLa, осажденных сульфатом аммония в диапазоне 66–88% от насыщения, которая обогащена целевым белком. Полосе с мол. массой около 45 кДа, детектируемой по окрашиванию кумасси, соответствует полоса на радиоавтографе, что свидетельствует о присутствии

ДНК в составе продукта. Белок в составе этого аддукта с достоверной оценкой MOWSE Score, равной 82, идентифицирован как изоформа GAPDH, присутствующая в базе данных NCBI под названием «урацил-ДНК-гликозилаза» (“UDG”). GAPDH широко известна как фермент гликолиза и представляет собой тетрамер, состоящий из идентичных субъединиц с мол. массой около 37 кДа. Как и Ku, GAPDH имеет множество дополнительных функций в клетке, в том числе связанных с ее локализацией в ядре. В частности, GAPDH имеет несколько предполагаемых функций, связанных с репарацией ДНК.

Последовательность “UDG” (изоформы GAPDH), впервые приведенная в работе (Meyer-Siegler et al., 1991) (331 а.о.), отличается от последовательности «классической» GAPDH (335 а.о.) заменой а.о. 194–213 и делецией а.о. 328–330. Исходя из сравнения данных последовательностей, можно предположить, что наблюдаемое несоответствие является результатом ошибки секвенирования.

1.4. Иммуноферментная детекция GAPDH

Идентичность белка GAPDH в составе 45-кДа аддукта была подтверждена с помощью иммуноферментной детекции. Продукты сшивки GAPDH с АР-ДНК регистрируются как при детекции ДНК (радиоавтограф), так и с использованием анти-GAPDH антител (рис. 4, дор. 2, 4, 6).

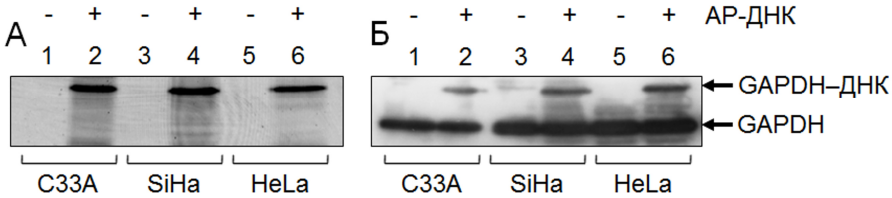

Рис. 4. Иммунодетекция GAPDH и ее аддуктов с АР-ДНК в клеточных экстрактах. Использовали цельноклеточные экстракты C33A (дор. 1 и 2) и SiHa (дор. 3 и 4), а также фракционированный экстракт клеток HeLa (белки, осажденные сульфатом аммония в диапазоне 66–88% от насыщения) (дор. 5 и 6). С белками каждого из экстрактов делали по две реакционные смеси, в одну из которых добавляли 1 мкМ DDE-AP-ДНК с флуоресцентной меткой (дор. 2, 4 и 6), в другую (контроль) — аналогичный объем реакционного буфера (дор. 1, 3 и 5). После инкубации при 37 °С в течение 10 мин в обе смеси добавляли $NaBH_4$ и проводили электрофоретическое разделение продуктов реакции и детекцию флуоресценции ДНК в геле (рис. А). После этого белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану и детектировали GAPDH методом вестерн-блоттинга с использованием моноклональных антител и конъюгата вторичных антител с пероксидазой хрена (рис. Б).

2. Исследование взаимодействия Ku с ДНК, содержащими АР-сайты

2.1. Эффективность сшивки Ku с АР-сайтом зависит от структуры ДНК

Полученные с использованием экстрактов данные о способности Ku80 формировать с DDE-AP-ДНК два типа аддуктов с разной подвижностью

(разд. 1.1, рис. 1) неоднозначны из-за существования KARP-1 — изоформы Ku80 с мол. массой около 93 кДа. Сшивка DDE-AP-ДНК с очищенным Ku однозначно доказывает, что в состав аддуктов входит «классическая» изоформа Ku80-субъединицы. Существование двух продуктов сшивки, формируемых Ku80 с DDE-AP-ДНК, может быть следствием присоединения AP-ДНК к разным аминокислотам-мишеням. Кроме того, показано, что полоса 100-кДа аддукта имеет бóльшую интенсивность в случае более длинных выступающих концов (данные не проиллюстрированы).

Затем было изучено влияние положения AP-сайта в DDE-AP-ДНК с выступающими концами длиной 8 нт на набор продуктов сшивки Ku с ДНК. В данных ДНК положение AP-сайта варьировали относительно 5′-конца меченого олигонуклеотида (рис. 5). С каждым из этих дуплексов белки экстракта клеток HeLa формируют разные наборы ковалентных аддуктов. Очищенный Ku с высоким выходом формирует с этими AP-ДНК спектр аддуктов, для которых есть соответствующие по подвижности продукты в наборах, регистрируемых в экстрактах. Интересно, что 100-кДа аддукт формируется только в случае, когда AP-сайт расположен в середине радиоактивно меченой цепи DDE-AP-ДНК (дор. 5 на рис. 5А и Б).

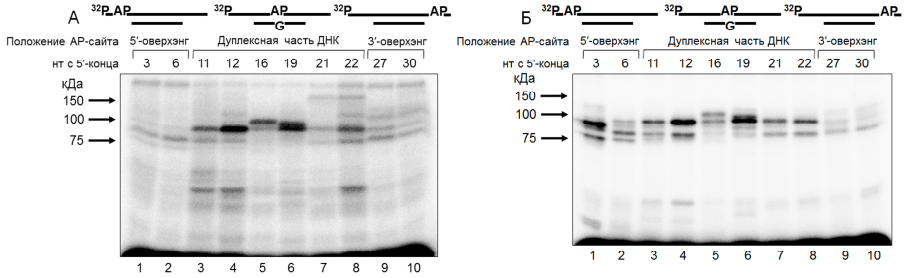

Рис. 5. Взаимодействие Ku с DDE-AP-ДНК зависит от расположения AP-сайта. Радиоавтографы гелей после электрофоретического разделения продуктов боргидрид-зависимой сшивки белков экстракта клеток HeLa (3 мг/мл) (А) и очищенного Ku (250 нМ) (Б) с 500 нМ DDE-AP-ДНК с различным положением AP-сайта. Указано положение AP-сайта относительно 5′-конца меченой цепи.

Чтобы определить, как основание напротив AP-сайта влияет на взаимодействие Ku с AP-ДНК, была сопоставлена эффективность сшивки очищенного Ku и белков экстракта клеток HeLa с AP-ДНК, содержащей пиримидиновые или пуриновые основания напротив AP-сайта (рис. 6Б и А соответственно). Эффективность сшивки Ku зависит как от структуры AP-ДНК, так и от основания напротив AP-сайта. В частности, в DDE-AP-ДНК Ku более эффективно взаимодействует с апуриновыми сайтами, чем с апиримидиновыми (рис. 6Б, сравните дор. 3 и 4 с дор. 1 и 2). Аналогичная тенденция наблюдается в реакциях с белками экстракта клеток HeLa (рис. 6А). Ku, по крайней мере в виде индивидуального белка, не проявляет

аналогичной специфичности в случае BE-AP-ДНК, более того, выход продуктов сшивки с апуриновыми сайтами даже ниже, чем с апиримидиновыми.

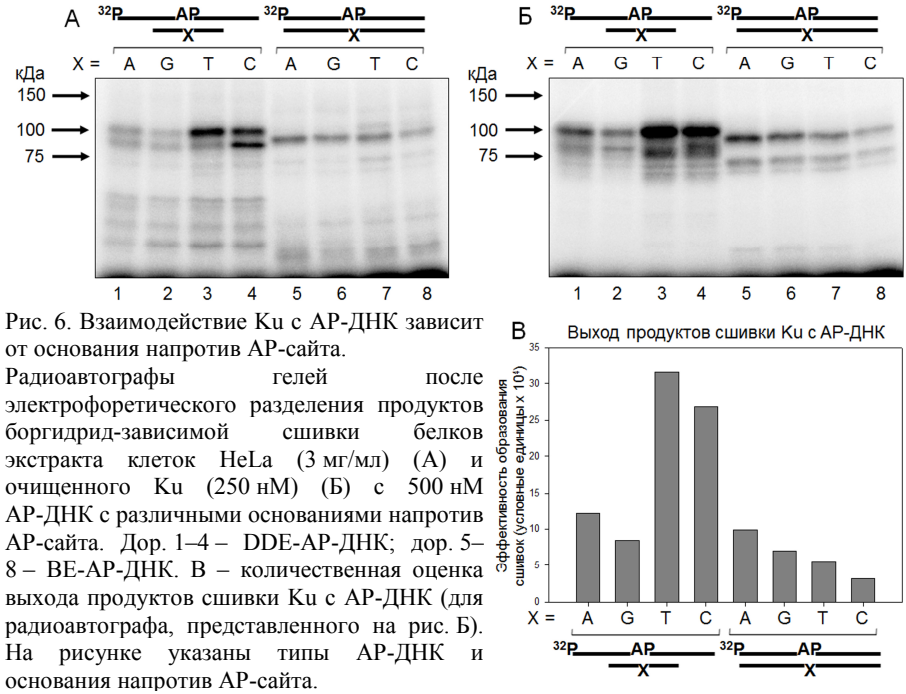

Рис. 6. Взаимодействие Ku с AP-ДНК зависит от основания напротив AP-сайта.
Радиоавтографы гелей после электрофоретического разделения продуктов боргидрид-зависимой сшивки белков экстракта клеток HeLa (3 мг/мл) (А) и очищенного Ku (250 нМ) (Б) с 500 нМ AP-ДНК с различными основаниями напротив AP-сайта. Дор. 1–4 – DDE-AP-ДНК; дор. 5–8 – BE-AP-ДНК. В – количественная оценка выхода продуктов сшивки Ku с AP-ДНК (для радиоавтографа, представленного на рис. Б). На рисунке указаны типы AP-ДНК и основания напротив AP-сайта.

2.2. Ku расщепляет DDE-AP-ДНК, проявляя специфичность по отношению к апуриновым сайтам

Ранее было установлено, что Ku-антиген не расщепляет AP-сайты в BE-AP-ДНК (Ilina et al., 2008). Обнаруженное в данной работе формирование другого типа ковалентных аддуктов с DDE-AP-ДНК (с мол. массой около 100 кДа) и зависимость эффективности сшивок от основания напротив AP-сайта ставят вопрос о продуктивности этих взаимодействий, т.е. способности Ku расщеплять AP-сайты. При взаимодействии с DDE-AP-ДНК Ku проявляет специфичность, более эффективно расщепляя апуриновые сайты (с dT или dC напротив AP-сайта) (рис. 7А, дор. 6, 7 и 8, 9 и рис. 7Б). Уровень расщепления апуриновых сайтов в DDE-AP-ДНК составляет около 50% за 15 мин и достигает около 90% за 60 мин, в то время как для апиримидиновых сайтов уровень расщепления не превышает 30% за 60 мин (рис. 7А, дор. 2–5 и рис. 7Б). BE-AP-ДНК с различными основаниями напротив AP-сайта (рис. 7А, дор. 11–18) и оц AP-ДНК (данные не показаны) являются худшими субстратами, уровень расщепления AP-сайтов — не более 10% за 60 мин (рис. 7Б). Следует отметить, что очищенный Ku формирует

95-кДа аддукт как с BE-AP-ДНК, так и с оц AP-ДНК; низкий уровень расщепления в данном случае свидетельствует о том, что такой тип взаимодействия Ku с AP-ДНК является непродуктивным. Уровень расщепления апуриновых сайтов в составе DDE-AP-ДНК практически на порядок выше, чем в составе BE-AP-ДНК.

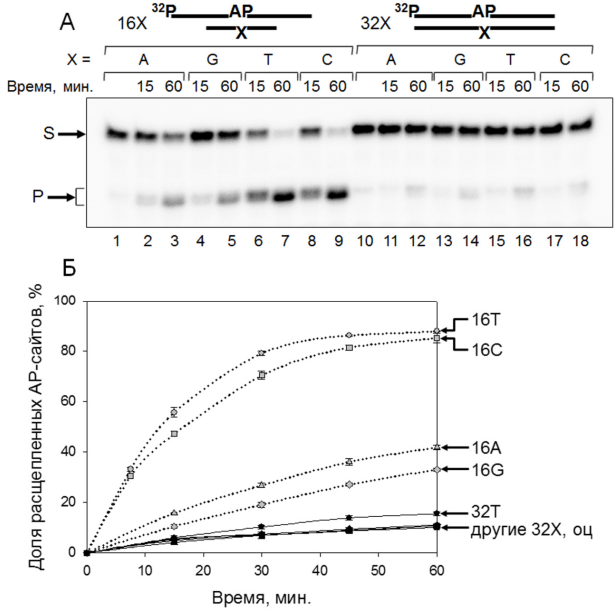

Рис. 7. Зависимость расщепления Ku-антигеном AP-сайтов в ДНК от основания напротив AP-сайта.

(А) Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения AP-ДНК с различными основаниями напротив AP-сайта после их инкубации с Ku. 250 нМ Ku инкубировали в течение указанных интервалов времени с 50 нМ DDE-AP-ДНК, обозначаемой как 16X, где X – основание напротив AP-сайта (дор. 2–9), или BE-AP-ДНК, обозначаемой как 32X (дор. 11–18). Дор. 1 и 10 – DDE-AP-ДНК и BE-AP-ДНК соответственно, инкубированные в отсутствие белков при 37 °C в течение 60 мин. На рисунке указаны типы AP-ДНК и основания напротив AP-сайта. S – исходные субстраты (32-мерные AP-ДНК), P – продукты расщепления ДНК по положению AP-сайта.

(Б) Кинетические кривые расщепления Ku-антигеном AP-сайтов в составе разных типов ДНК. Условия такие же, как на рис. А. На рисунке представлены средние значения трех независимых экспериментов и стандартные отклонения.

Принимая во внимание способность Ku довольно эффективно расщеплять AP-сайты в составе DDE-AP-ДНК, можно было бы предположить, что 100-кДа и 95-кДа продукты могут соответствовать аддуктам Ku80 с нерасщепленной и расщепленной AP-ДНК соответственно. С помощью сшивки Ku с AP-ДНК, содержащими радиоактивную метку на 5′-

или 3′-конце, показано, что все аддукты, формируемые Ku80, содержат нерасщепленную АР-ДНК.

2.3. Репарация АР-сайтов в DDE-АР-ДНК, инициированная Ku

Электрофоретический анализ продуктов расщепления АР-ДНК Ku-антигеном и ДНК-гликозилазой/АР-лиазой Endo III, катализирующей β-элиминирование, показал одинаковую подвижность данных продуктов (данные не проиллюстрированы). Это свидетельствует, что Ku-антиген также расщепляет АР-сайты путем β-элиминирования, оставляя 3′-фосфо-α,β-ненасыщенный альдегид (3′-PUA) на 3′-конце.

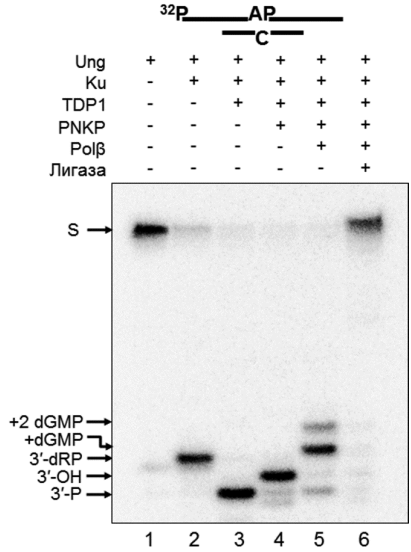

Рис. 8. Репарация АР-сайта, инициируемая Ku.

Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов, полученных при инкубации 10 нМ DDE-ДНК с различными комбинациями ферментов, осуществляющих последовательные этапы репарации АР-сайта. ДНК, содержащую остаток урацила, предварительно инкубировали сначала с урацил-ДНК-гликозилазой в течение 30 мин при 37 °С для получения АР-сайтов (дор. 1–6), затем с 100 нМ Ku в течение 60 мин при 37 °С (дор. 2–6). После этого добавляли различные комбинации 100 нМ TDP1 (дор. 3–6), 10 нМ PNKP (дор. 4–6), 100 нМ Polβ (дор. 5–6) и ДНК-лигазы Т4 (5 ед. акт./мкл) (дор. 6) и инкубировали в течение 16 ч. при 15 °С. Вверху указаны компоненты, представленные в реакционных смесях.

Затем была проанализирована возможность Ku-зависимой репарации АР-сайтов в минимальной реконструированной системе, состоящей из очищенных белков (рис. 8). DDE-АР-ДНК сначала инкубировали с Ku (дор. 2), затем в реакционные смеси добавляли различные комбинации тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (TDP1), полинуклеотидкиназы/3′-фосфатазы (PNKP), ДНК-полимеразы β (Polβ) и ДНК-лигазы Т4. TDP1 выщепляет 3′-PUA остаток, что приводит к появлению продукта с фосфатом на 3′-конце (дор. 3). Затем PNKP удаляет 3′-фосфат, в результате чего на 3′-конце остается ОН-группа (дор. 4), и Polβ заполняет брешь, используя dGTP в качестве субстрата (дор. 5). Наконец, ДНК-лигаза восстанавливает целостность сахарофосфатного остова ДНК (дор. 6). Таким образом, Ku может инициировать репарацию АР-сайта, которую продолжают ферменты, осуществляющие последующие стадии процессинга АР-сайта, создавая продукты ожидаемой структуры на каждой промежуточной стадии.

Безусловно, для определения физиологической роли этого типа взаимодействия Ku с АР-сайтами требуются дальнейшие исследования. Учитывая данные свойства Ku, можно предположить, что он играет роль в репарации АР-сайтов в составе некоторых сложных повреждений ДНК, составной частью которых являются двухцепочечные разрывы с выступающими одноцепочечными участками. Возможность опосредованного Ku пути репарации АР-сайтов необходимо учитывать в схемах комбинированной терапии, предполагающих повреждение ДНК с помощью ионизирующего излучения или лекарственных препаратов-радиомиметиков и фармакологическое ингибирование активности TDP1 и/или APE1.

3. Исследование взаимодействия GAPDH с ДНК, содержащими повреждения, и ферментами репарации

3.1. GAPDH взаимодействует с ДНК, содержащими АР-сайты

Для детального изучения взаимодействия GAPDH с АР-ДНК данный белок был выделен из культивируемых клеток человека (HeLa).

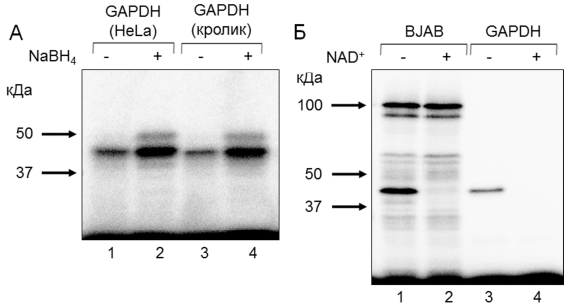

Рис. 9. Взаимодействие очищенной GAPDH с АР-ДНК.
(А) Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения аддуктов 2,5 мкМ GAPDH, выделенной из клеток HeLa (дор. 1 и 2) и мышц кролика (дор. 3 и 4), с 500 нМ DDE-АР-ДНК. В случае дор. 2 и 4 реакционные смеси перед электрофоретическим разделением обрабатывали $NaBH_4$, в случае дор. 1 и 3 обработку не проводили.
(Б) Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов боргидрид-зависимой сшивки белков экстракта клеток BJAB (2,3 мг/мл) (дор. 1 и 2) и очищенной 2,5 мкМ GAPDH (дор. 3 и 4) с 500 нМ DDE-АР-ДНК в отсутствие 1 мМ NAD^+ (дор. 1 и 3) или в его присутствии (дор. 2 и 4). Перед электрофоретическим разделением реакционные смеси обрабатывали $NaBH_4$.

GAPDH из мышц кролика и GAPDH из клеток HeLa примерно с одинаковой эффективностью формируют по два боргидрид-зависимых аддукта: основной 45-кДа аддукт и минорный 50-кДа аддукт (рис. 9А, дор. 2 и 4). Возможно, 45-кДа аддукты соответствуют сшивке GAPDH с расщепленной АР-ДНК, а 50-кДа аддукты — с нерасщепленной. Интересно, что 45-кДа аддукты формируются даже в отсутствие боргидрида, хотя их

выход в этом случае меньше (сравните дор. 1, 3 и 2, 4). Около 30% формирующихся сшивок GAPDH–АР-ДНК являются боргидрид-независимыми. Эти данные свидетельствуют о том, что GAPDH (по крайней мере, частично) может формировать ковалентные аддукты с АР-ДНК по механизму, не опосредованному образованием основания Шиффа.

Каждый мономер GAPDH содержит NAD^+-связывающий сайт. Ранее было показано, что NAD^+ ингибирует связывание GAPDH с ДНК (Arutyunova et al., 2003). Анализ влияния NAD^+ на сшивку GAPDH с DDE-АР-ДНК продемонстрировал, что данное соединение практически полностью ингибирует формирование 45-кДа аддукта очищенной GAPDH человека (рис. 9Б).

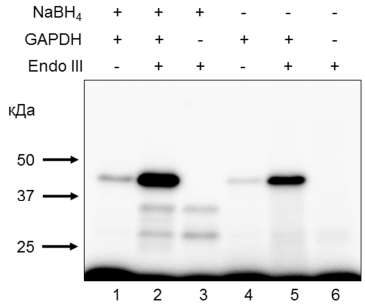

Рис. 10. Взаимодействие GAPDH с АР-ДНК, расщепленной ДНК-гликозилазой Endo III по механизму β-элиминирования. Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения аддуктов, образуемых 2,5 мкМ GAPDH и/или 10 нМ Endo III с 500 нМ DDE-АР-ДНК, в присутствии или в отсутствие $NaBH_4$. Компоненты реакционных смесей указаны на рисунке.

Кроме того, было установлено, что несмотря на образование основания Шиффа, которое является характерным интермедиатом, формирующимся в процессе расщепления АР-сайта по механизму β-элиминирования, GAPDH не проявляет АР-лиазную активность. Для определения природы ДНК в составе аддукта с GAPDH использовали сшивку с АР-ДНК, содержащими радиоактивную метку на 5′- или 3′-конце, а также сшивку с АР-ДНК в присутствии ДНК-гликозилазы/АР-лиазы Endo III. Отсутствие полос аддуктов в случае АР-ДНК с 3′-концевой меткой свидетельствовало о том, что GAPDH формирует аддукты не с интактной АР-ДНК, а с её 5′-концевой частью. Совпадение электрофоретической подвижности продуктов сшивки GAPDH с АР-ДНК в присутствии и в отсутствие ДНК-гликозилазы Endo III (рис. 10) подтверждает предположение о том, что в состав основного аддукта GAPDH входит 5′-концевая часть АР-ДНК. Эти данные также показывают, что GAPDH формирует продукт сшивки с расщепленным АР-сайтом намного эффективнее, чем с интактным, поскольку выход аддукта GAPDH–АР-ДНК увеличивается в 16 раз, когда в реакционную смесь добавлена Endo III (сравните дор. 1 и 2). Выход боргидрид-независимого аддукта GAPDH–АР-ДНК также значительно увеличивается (в 13 раз) после добавления Endo III (сравн. дор. 4 и 5).

Ярким примером спорной функции GAPDH в репарации является урацил-ДНК-гликозилазная (UDG) активность, показанная в работе (Meyer-Siegler et al., 1991) и последующих работах этого коллектива. В дальнейшем

другие исследователи не обнаружили указанной активности (Caradonna et al., 1996). В нашей работе UDG-активность GAPDH была проверена с использованием двух типов ДНК: дуплекса, содержащего один остаток урацила, и субстрата поли(dA•dU). В обоих случаях UDG-активность GAPDH не детектировалась.

3.2. Использование АР-ДНК в качестве зонда для детекции GAPDH в клеточных экстрактах

Ранее в нашей лаборатории был разработан метод специфичной детекции Ku в клеточных экстрактах с использованием радиоактивно меченой BE-АР-ДНК (Ilina et al., 2010). Поэтому было интересно определить, можно ли использовать АР-ДНК в качестве специфичных зондов для детекции GAPDH в клеточных экстрактах. С этой целью была проведена сшивка АР-ДНК с очищенной GAPDH и с белками экстрактов различных линий клеток человека: HeLa (аденокарцинома шейки матки), HEK293 (почки эмбриона человека), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), Jurkat (острая Т-клеточная лимфома), BJAB (В-клеточная лимфома Бёркитта) и Im9 (В-клеточная множественная миелома) (рис. 11Б, нечетные дорожки). Параллельно было оценено содержание GAPDH в экстрактах методом вестерн-блоттинга (рис. 11А, дор. 2–7). Анализ данных показал отсутствие корреляции между выходом сшивок GAPDH–АР-ДНК и содержанием GAPDH в экстрактах по данным вестерн-блоттинга. Возможной причиной несоответствия между выходом продуктов сшивки с АР-ДНК и содержанием GAPDH в экстрактах может являться функциональное состояние GAPDH. В частности, эффективность связывания GAPDH с ДНК зависит от состояния SH-групп остатков цистеина: окисленная GAPDH связывается с ДНК более эффективно (Arutyunova et al., 2003). Для проверки этого предположения проведено сравнение выхода сшивок GAPDH–АР-ДНК в экстрактах, необработанных и обработанных *трис*(2-карбоксиэтил)фосфином (TCEP), который способен восстанавливать S-S мостики.

Во всех случаях наблюдается схожее ингибирование формирования боргидрид-зависимых аддуктов GAPDH–АР-ДНК после предынкубации GAPDH с TCEP, независимо от выхода данных аддуктов в отсутствие TCEP (рис. 11Б, сравните попарно четные и нечетные дорожки). Таким образом, восстановление дисульфидной связи в GAPDH приводит значительному уменьшению количества аддуктов с АР-ДНК. Таким образом, сшивка АР-ДНК с GAPDH (с обработкой TCEP и без нее) может быть полезна для характеристики окислительного состояния GAPDH в клеточных экстрактах. Следует отметить, что широко используемый метод вестерн-блоттинга позволяет определить общее количество GAPDH в экстракте, но не ее окислительное состояние.

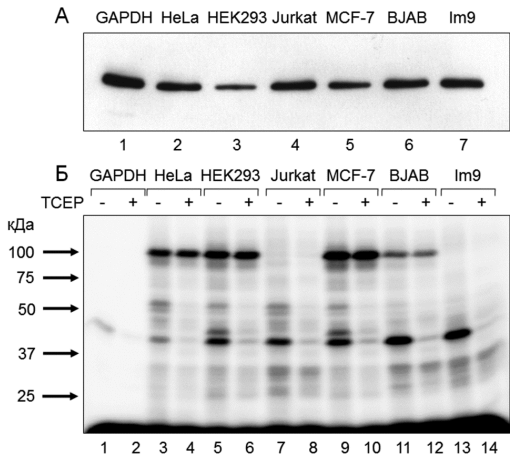

Рис. 11. Влияние восстановления дисульфидной связи в GAPDH на ее сшивку с АР-ДНК.
(А) Детекция GAPDH в экстрактах клеток человека методом вестерн-блоттинга (скан рентгеновской пленки). Дор. 1 – 0,1 мкг GAPDH; дор. 2–7 – 2 мкг белков клеточных экстрактов. Названия клеточных линий указаны на рисунке.
(Б) Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов боргидрид-зависимой сшивки белков экстрактов клеток человека (2,3 мг/мл) и GAPDH (2,5 мкМ) с 500 нМ DDE-AP-ДНК после 30 мин предынкубации в присутствии 2 мМ TCEP или в его отсутствие.

Таким образом, на основе полученных результатов и литературных данных можно предположить реализацию в клетках следующего сценария (рис. 12).

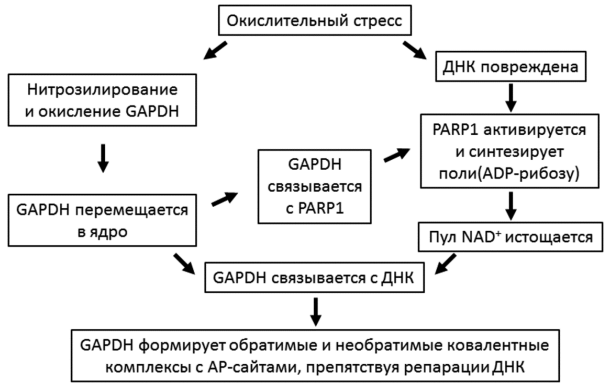

Рис. 12. Схема взаимосвязи процессов, происходящих в клетках в условиях окислительного стресса и приводящих к формированию аддуктов GAPDH с АР-сайтами. Пояснения см. в тексте.

В условиях окислительного стресса Cys152 образует дисульфидный мостик с Cys156 в активном центре GAPDH, что повышает ее способность связываться с ДНК (Arutyunova et al., 2003). Также в данных условиях в другой субъединице тетрамера может происходить нитрозилирование Cys152, способствующее перемещению GAPDH в комплексе с Е3 убиквитин-лигазой Siah1 в ядро (Hara et al., 2005), где она, вероятно, присутствует в форме мономера или димера (Arutyunova et al., 2003). Повреждение ДНК при

окислительном стрессе приводит к активации PARP1, которая синтезирует поли(ADP-рибозу) из NAD^+. Кроме того, GAPDH, переместившаяся в ядро, способна связываться с PARP1 и активировать ее (Nakajima et al., 2015). В результате высокой активации PARP1 истощается клеточный пул NAD^+, освобождается NAD^+-связывающий центр GAPDH, и фермент приобретает способность связываться с ДНК. Если в оц фрагменте ДНК присутствует расщепленный АР-сайт, GAPDH формирует стабильный ковалентный аддукт с этим повреждением. Таким образом, формирование необратимого комплекса GAPDH с ДНК, возможно, является «суицидальным» событием, которое препятствует репарации ДНК в случае, если накоплено слишком много повреждений, и может быть одним из факторов, приводящих к клеточной гибели. В целом, такое предположение согласуется с литературными данными и нашими наблюдениями, но, безусловно, для его подтверждения необходимы дальнейшие исследования.

Заключение

В данной работе при поиске белков клеточных экстрактов, взаимодействующих с АР-сайтами, Ku80-субъединица Ku-антигена и GAPDH были идентифицированы как белки, формирующие боргидрид-зависимые аддукты с АР-сайтами в составе ДНК-дуплекса с 5′- и 3′-выступающими одноцепочечными концами. Затем с использованием этих белков, выделенных в индивидуальном состоянии из культивируемых клеток человека, было детально исследовано их взаимодействие с различными ДНК, содержащими АР-сайты.

Способность Ku взаимодействовать с АР-сайтами была известна ранее; при этом считалось, что существует два типа данного взаимодействия: в случае, если АР-сайт находится в двухцепочечной ДНК далеко от ее концов, Ku связывается с ним, не расщепляя его, и защищает его от расщепления другими белками (Ilina et al., 2008). Если же АР-сайт находится в составе выступающих одноцепочечных участков ДНК или вблизи от них, Ku расщепляет его, подготавливая «грязные» концы двухцепочечного разрыва к лигированию (Roberts et al., 2010; Strande et al., 2012). Данная работа представляет собой логическое продолжение предыдущих исследований взаимодействия Ku с АР-сайтами. Так, была детально изучена способность Ku формировать боргидрид-зависимые аддукты с АР-ДНК, различающимися длиной выступающих концов, основанием напротив АР-сайта и положением АР-сайта в цепи. Кроме того, было впервые показано, что Ku способен расщеплять АР-сайты, находящиеся в двухцепочечной части ДНК, далеко от ее концов, хотя для этого ДНК должна содержать на концах одноцепочечные участки определенной длины. Такая структура ДНК имитирует кластерное повреждение, которое может возникать в клетках под действием ионизирующего излучения и лекарственных препаратов-радиомиметиков, а также в ходе переключения изотипов иммуноглобулинов в В-клетках. Также в

настоящей работе был установлен механизм, по которому Ku расщепляет АР-сайты, и показано, что Ku проявляет специфичность, предпочтительно расщепляя апуриновые сайты в DDE-АР-ДНК. Таким образом, Ku способен инициировать альтернативный путь репарации АР-сайтов, находящихся в составе кластерных повреждений определенного типа. Данный путь может реализовываться в клетках человека, когда подавлена активность APE1 — основного фермента, отвечающего за репарацию АР-сайтов, например, при экспрессии мутантных форм APE1 или при фармакологическом ингибировании этого белка в некоторых видах комбинированной терапии опухолевых заболеваний.

Способность гликолитического фермента GAPDH взаимодействовать с АР-сайтами была обнаружена в данной работе впервые. Хотя эта способность кажется неожиданной, ранее уже было показано, что GAPDH является многофункциональным белком и может перемещаться в ядро и взаимодействовать с интактной и поврежденной ДНК и некоторыми ферментами репарации. Кроме того, в данной работе установлено, что GAPDH способна формировать два типа аддуктов с АР-сайтами: боргидрид-зависимые (опосредованные образованием основания Шиффа) и боргидрид-независимые, механизм образования которых неизвестен. В формировании боргидрид-независимых аддуктов, вероятно, принимают участие отличные от ε-аминогруппы лизина нуклеофильные группы белка. Также представляется значимым тот факт, что GAPDH не обладает способностью расщеплять АР-сайты, однако предпочтительно формирует аддукты с АР-ДНК, расщепленной по определенному механизму. В разных работах, посвященных функциям GAPDH в репарации, ей приписывалась как «положительная», так и «отрицательная» роль в этом процессе. Также разными авторами получены данные как о проапоптотическом, так и об антиапоптотическом действии GAPDH. Данные, полученные в настоящей работе, скорее свидетельствуют в пользу «отрицательной» роли GAPDH в репарации и ее проапоптотическом действии, поскольку, формируя необратимый комплекс с АР-сайтом, GAPDH осложняет его репарацию. Сценарий, в ходе которого происходит перемещение GAPDH в ядро и ее связывание с поврежденной ДНК, вероятно, реализуется в клетках в условиях окислительного стресса. Преимущественно цитоплазматическая локализация GAPDH в нормальных физиологических условиях и неэффективное образование ею аддуктов с АР-сайтами в составе двухцепочечной ДНК, несмотря на высокую копийность этого белка, по-видимому, являются факторами, исключающими токсический эффект боргидрид-независимого взаимодействия GAPDH с АР-сайтами. В целом, данная работа показывает, что идентификация белков, взаимодействующих с АР-сайтами, помогает выявить ранее неизвестные дополнительные функции таких белков. Значение этих функций *in vivo* предстоит установить в ходе дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. Поиск белков клеток человека, взаимодействующих с апуриновыми/апиримидиновыми (АР) сайтами в ДНК с образованием основания Шиффа, выявил, что АР-ДНК-дуплекс с выступающими одноцепочечными участками (DDE-АР-ДНК) эффективно образует боргидрид-зависимые аддукты с кажущимися молекулярными массами около 100 кДа и 45 кДа, которые характерны только для АР-ДНК такой структуры.

2. Сочетанием аффинной хроматографии и масс-спектрометрического анализа проведена идентификация белков в составе указанных аддуктов с АР-ДНК. Установлено, что:

• белок в составе 100-кДа аддукта представлен Ku80-субъединицей Ku-антигена;

• в состав 45-кДа аддукта входит глицеральдегид-3-фостфатдегидрогеназа (GAPDH).

3. С использованием экстрактов культивируемых клеток человека и выделенного из них в индивидуальном состоянии Ku-антигена показано, что:

• эффективность образования 100-кДа аддукта Ku80–DDE-АР-ДНК обусловлена определенным сочетанием длины выступающих концов, основания напротив АР-сайта и положения АР-сайта в цепи;

• Ku-антиген способен расщеплять АР-сайты в составе DDE-АР-ДНК, в отличие от аналогичной АР-ДНК с тупыми концами; расщепление происходит по механизму β-элиминирования и более эффективно для апуриновых сайтов;

• проявляя АР-лиазную активность, Ku-антиген способен инициировать запасной путь репарации АР-сайтов в реконструированной системе.

4. С использованием экстрактов культивируемых клеток человека и выделенной из них в индивидуальном состоянии GAPDH установлено, что:

• GAPDH эффективно формирует аддукты с DDE-АР-ДНК и одноцепочечной АР-ДНК, в отличие от АР-ДНК с тупыми концами, и при этом не проявляет значимой АР-лиазной активности;

• GAPDH также способна формировать аддукты с АР-ДНК, расщепленной по механизму β-элиминирования;

• GAPDH образует как боргидрид-зависимые, так и боргидрид-независимые аддукты с АР-ДНК;

• образование аддуктов GAPDH–АР-ДНК ингибируется NAD^+; GAPDH теряет способность образовывать аддукты с АР-ДНК после восстановления дисульфидных мостиков в составе белка.

Результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

1. **Kosova A.A.**, Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Ku80 interaction with apurinic/apyrimidinic sites depends on the structure of DNA ends // Biopolym. Cell –2014. –V. 30. –N 1. –P. 42–46.
2. **Косова А.А.**, Лаврик О.И., Ходырева С.Н. Роль Ku-антигена в репарации апуриновых/апиримидиновых сайтов в ДНК // Молекуляр. биология –2015. –Т. 49. –№ 1. –С. 67–74.
3. **Kosova A.A.**, Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) interacts with apurinic/apyrimidinic sites in DNA // Mutat. Res. –2015. –V. 779. –P. 46–57.
4. **Kosova A.A.**, Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Ku antigen displays the AP lyase activity on a certain type of duplex DNA // Biochim. Biophys. Acta –2016. –V. 1864. –N 9. –P. 1244–1252.
5. **Косова А.А.**, Ходырева С.Н., Лаврик О.И. Роль глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) в репарации ДНК // Биохимия –2017. –Т. 82. –№ 6. –С. 859–872.