

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Косова Анастасия Андреевна

**Взаимодействие многофункциональных белков человека —
Ки-антигена и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы —
с апуринowymi/апиримидиновыми сайтами в ДНК**

03.01.04 — Биохимия

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н., доцент

Ходырева Светлана Николаевна

Новосибирск — 2018

*Посвящается моей маме Нине Васильевне Косовой,
которая пробудила во мне интерес к науке,
поддерживает меня во всех моих начинаниях
и всегда будет для меня примером настоящего Учёного*

ОГЛАВЛЕНИЕ

Принятые сокращения	6
Введение	8
Глава 1. Обзор литературы	14
1.1. Апуриновые/апиримидиновые сайты в ДНК	14
1.1.1. Общие свойства AP-сайтов	14
1.1.2. Боргидрид-зависимая сшивка белков с AP-сайтами в ДНК.....	17
1.1.3. Стабильные сшивки белков с AP-сайтами без фиксации NaBH_4	19
1.2. Ku-антиген	20
1.2.1. Ku в репарации двухцепочечных разрывов ДНК.....	20
1.2.2. Дополнительные функции Ku	24
1.2.3. Взаимодействие Ku с AP-сайтами	27
1.2.4. Ku в ЭРО.....	28
1.3. GAPDH.....	32
1.3.1. Перемещение GAPDH в ядро и связывание с ДНК	33
1.3.1.1 GAPDH — один из ферментов гликолиза, способных связываться с нуклеиновыми кислотами.....	33
1.3.1.2 Посттрансляционные модификации GAPDH, связанные с ее перемещением в ядро.....	34
1.3.1.3 Предполагаемые аминокислотные последовательности в GAPDH, отвечающие за ее ядерную локализацию и экспорт из ядра.....	36
1.3.1.4 Окисление GAPDH	37
1.3.1.5 Перемещение GAPDH в ядро в условиях апоптоза и ее проапоптотические функции	37
1.3.1.6 Роль GAPDH в транскрипции.....	39
1.3.1.7 Роль GAPDH в регуляции длины теломер	40
1.3.2. Взаимодействие GAPDH с повреждениями ДНК	40
1.3.2.1 Предполагаемая урацил-ДНК-гликозилазная активность GAPDH	40
1.3.2.2 Роль GAPDH в узнавании аналогов нуклеотидов в ДНК	41
1.3.3. Взаимодействие GAPDH с ферментами репарации.....	43
1.3.3.1 APE1	43
1.3.3.2 PARP1	45
1.3.4. Бактериальная GAPDH	47
Заключение	48
Глава 2. Материалы и методы	51

2.1. Материалы	51
2.1.1. Общие материалы	51
2.1.2. Стандартные буферы и смеси	51
2.1.3. Хроматографические сорбенты и колонки	52
2.1.4. Ферменты, белковые факторы и клеточные линии.....	52
2.1.5. Антитела	53
2.1.6. Олигодезоксинуклеотиды.....	53
2.2. Методы исследования	54
2.2.1. Гель-электрофорез.....	54
2.2.1.1. Электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях ..	54
2.2.1.2. Электрофорез в системе Лэммли.....	55
2.2.2. Получение олигонуклеотидных субстратов	56
2.2.2.1. Получение двухцепочечных ОДН	56
2.2.2.2. Введение радиоактивной метки в 5'-конец ОДН и создание ОДН, содержащего радиоактивную метку в середине цепи	56
2.2.2.3. Введение радиоактивной метки в 3'-конец ОДН	57
2.2.2.4. Очистка меченых ОДН	57
2.2.2.5. Получение ОДН, содержащих AP-сайты.....	58
2.2.3. Приготовление цельноклеточных экстрактов	58
2.2.4. Боргидрид-зависимая сшивка белков с AP-ДНК	58
2.2.5. Идентификация белков клеточных экстрактов, взаимодействующих с AP-ДНК, с помощью MALDI-TOF-MS.....	59
2.2.5.1. Препаративная боргидрид-зависимая сшивка.....	59
2.2.5.2. Выделение комплексов белок–ДНК с помощью аффинной хроматографии на сорбенте “Streptavidin MagneSphere”	60
2.2.5.3. Подготовка проб для MALDI-TOF-MS анализа.....	60
2.2.6. Вестерн-блоттинг	61
2.2.7. Анализ AP-лиазной активности Ku	62
2.2.8. Реконструкция репарации AP-сайта, инициируемой Ku.....	62
2.2.9. Оценка стабильности комплексов GAPDH–AP-ДНК.....	62
2.2.10. Фракционирование экстракта клеток BJAB	62
2.2.11. Оценка урацил-ДНК-гликозилазной и AP-лиазной активностей GAPDH с использованием олигонуклеотидных субстратов	63
2.2.12. Оценка урацил-ДНК-гликозилазной активности GAPDH с использованием субстрата поли(dA•dU)	63

2.2.13. Поли(ADP-рибозил)ирование GAPDH.....	64
2.2.14. Расщепление AP-сайтов APE1 и NEIL1 в присутствии GAPDH.....	64
Глава 3. Результаты и их обсуждение	65
3.1. Идентификация белков клеточных экстрактов человека, формирующих сшивки с AP-сайтами, с помощью MALDI-TOF-MS.....	65
3.1.1. Боргидрид-зависимая сшивка белков клеточных экстрактов с разными типами AP-ДНК.....	65
3.1.2. Идентификация Ku.....	68
3.1.3. Идентификация GAPDH.....	75
3.1.4. Иммуноферментная детекция GAPDH.....	80
3.2. Исследование взаимодействия Ku с ДНК, содержащими AP-сайты.....	81
3.2.1. Эффективность сшивки Ku с AP-сайтом зависит от структуры ДНК.....	81
3.2.2. Ku расщепляет DDE-AP-ДНК, проявляя специфичность по отношению к апуриновым сайтам.....	86
3.2.3. Ku расщепляет AP-сайты по механизму β -элиминирования: репарация AP-сайтов в DDE-AP-ДНК, инициированная Ku.....	89
3.3. Исследование взаимодействия GAPDH с ДНК, содержащими повреждения, и ферментами репарации.....	93
3.3.1. GAPDH взаимодействует с ДНК, содержащими AP-сайты.....	93
3.3.2. Возможное взаимодействие других дегидрогеназ с AP-ДНК.....	101
3.3.3. GAPDH не проявляет урацил-ДНК-гликозилазную активность.....	103
3.3.4. Взаимодействие GAPDH с PARP1, APE1 и NEIL1.....	105
3.3.5. Использование AP-ДНК в качестве зонда для детекции GAPDH в клеточных экстрактах.....	108
Заключение.....	114
Выводы.....	117
Список литературы.....	118
Приложение 1. Идентификация Ku80 и Ku70.....	138
Приложение 2. Идентификация GAPDH.....	144
Приложение 3. Параметры пептидов, определенных методом MALDI-TOF-MS, которые соответствуют теоретическим пептидам гидролиза Ku80 и Ku70 трипсином.....	147
Приложение 4. Параметры пептидов, определенных методом MALDI-TOF-MS, которые соответствуют теоретическим пептидам гидролиза GAPDH трипсином.....	152

Принятые сокращения

3'-PUA	3'-фосфо- α,β -ненасыщенный альдегид (3'- p hospho- α,β - u nsaturated a ldehyde)
5'-dRP	2'-дезоксирибозо-5'-фосфат
5,6-FAM	5,6-карбоксихлорофлуоресцеин
AP-сайт	апуриновый/апиримидиновый сайт
AP-ДНК	ДНК, содержащая AP-сайт
APЕ1	апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 человека
AS	сульфат аммония
BE-ДНК	ДНК-дуплекс с тупыми концами
BSA	бычий сывороточный альбумин
C33A	линия клеток аденокарциномы шейки матки
CHO	линия клеток дикого типа, полученная из яичника китайского хомячка <i>Cricetulus griseus</i> (C hinese h amster o vary)
DDE-ДНК	ДНК-дуплекс, содержащий выступающие одноцепочечные 5'- и 3'-концы
dNMP	дезоксирибонуклеозидмонофосфат
DTT	дитиотреитол
Endo III	эндонуклеаза III (ДНК- <i>N</i> -гликозилаза) <i>E. coli</i>
GAPDH	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
HEK293	линия, полученная трансфекцией клеток почки эмбриона человека ДНК аденовируса 5 (h uman e mbrionic k idney)
HeLa	линия клеток аденокарциномы шейки матки
HMGB1/2	белки с высокой электрофоретической подвижностью 1 и 2 (h igh m obility g roup) класса HMG-Box
Ku	Ku-антиген
LDH	лактатдегидрогеназа
MALDI-TOF-MS	матричная лазерная десорбционная времяпролетная масс-спектрометрия (m atrix a ssisted l aser d esorbtion/ i onization – t ime o f f light – m ass- s pectrometry)
MDH	малатдегидрогеназа
MOWSE	алгоритм поиска белков по молекулярным массам их протеолитических пептидов (m olecular w eight s earch)
NEIL1	ДНК- <i>N</i> -гликозилаза человека, относящаяся к семейству Fpg/Nei (N ei- l ike 1)
NP-40	нонилфеноксиполиэтоксилэтанол
OGG1	8-оксогуанин-ДНК- <i>N</i> -гликозилаза 1 человека

PARP1	поли(ADP-рибозо)полимераза 1
PCNA	ядерный антиген пролиферирующих клеток (p roliferating c ell n uclear a ntigen)
PNKP	полинуклеотидкиназа/3'-фосфатаза человека
Polβ	ДНК-полимераза β
Q	четвертичный амин
RFC	репликативный фактор C (r eplication f actor C)
RPA	репликативный белок А человека (r eplication p rotein A)
SDS	додecilсульфат натрия (s odium d odecyl s ulfate)
SiHa	линия клеток аденокарциномы шейки матки
SP	сульфопропил
TCEP	<i>трис</i> (2-карбоксиитил)фосфин
TDP1	тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -тетраметилэтилендиамин
THF	3-гидрокси-2-гидроксиметилтетрагидрофуран
UDG	урацил-ДНК-гликозилаза/урацил-ДНК-гликозилазный
Ung	урацил-ДНК- <i>N</i> -гликозилаза <i>E. coli</i> (u racil-DNA N - g lycosylase)
XRCC1/5/6	белок, входящий в группу комплементации 1/5/6, обуславливающий чувствительность клеток к рентгеновскому излучению (x -ray r epair c ross- c omplementing protein); XRCC5 и XRCC6 — альтернативные названия Ku80- и Ku70-полипептидов соответственно
β-мкэ	2-меркаптоэтанол
а.о.	аминокислотный остаток
ДНК-ПК	ДНК-зависимая сериновая-треониновая протеинкиназа
дц	двухцепочечный
НГСК	негомологичное соединение концов
нт.	нуклеотид
ОДН	олигодезоксинуклеотид(ы), олигодезоксинуклеотидный
оц	одноцепочечный
ПААГ	полиакриламидный гель
п.н.	пара нуклеотидов
ПНК	полинуклеотидкиназа бактериофага T4
Трис	2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол
ЭДТА	этилендиамин- <i>N,N,N',N'</i> -тетрауксусная кислота
ЭРО	эксцизионная репарация оснований

Введение

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 [1]. Число АР-сайтов может значительно увеличиваться в условиях стресса, таких как воздействие рентгеновского или УФ-излучения, окислительных и алкилирующих агентов. Нерепарированные АР-сайты мутагенны и цитотоксичны [2]. 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) [3]. Стационарный уровень АР-сайтов в клетках млекопитающих составляет ~ 1 повреждение на 10⁶ нуклеотидов [4]. В основном репарация АР-сайтов происходит с очень высокой скоростью [5]. В то же время, часть АР-сайтов может присутствовать в геномной ДНК в течение довольно длительного времени [6]. В связи с этим возникает вопрос о природе этих медленно репарируемых АР-сайтов и о механизмах быстрой и отложенной репарации данных повреждений. 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) [7]. АР-сайты также могут расщепляться ДНК-гликозилазами или другими ферментами, имеющими АР-лиазную активность, по механизму β- или β,δ-элиминирования [3, 7]. Получившиеся интермедиаты процессируются ферментами ЭРО на последующих стадиях [7].

Несмотря на то, что основным ферментом, инициирующим репарацию АР-сайтов в клетках млекопитающих, является APE1, существуют также и запасные пути репарации АР-сайтов, независимые от APE1. 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 АР-сайты могут возникать в составе множественных повреждений (называемых еще кластерными повреждениями) [8, 9]. Действительно, установлено, что в дополнение к

двухцепочечным разрывам (основной тип повреждений), возникающим при воздействии излучения, характеризуемого высокой линейной передачей энергии, зачастую образуются AP-сайты в пределах 8–10 п.н. от концов разрыва [10]. Репарация кластерных повреждений в настоящее время недостаточно изучена, и ее исследование представляет большой интерес, поскольку в узнавании и репарации AP-сайтов в контексте кластерных повреждений, вероятно, участвуют особые белки. Так, было показано, что Ku-антиген (белок, основной функцией которого является участие в репарации двухцепочечных разрывов по пути негомологичного соединения концов) способен расщеплять AP-сайты на выступающих одноцепочечных 5'-концах ДНК для их подготовки к лигированию в ходе репарации [11].

Остатки дезоксирибозы в составе AP-сайтов находятся в равновесии между циклической, фуранозной, и ациклической, альдегидной, формами [4]. Альдегидная форма AP-сайта может образовывать с аминогруппой белка интермедиат — основание Шиффа. Способностью формировать основания Шиффа с дезоксирибозой AP-сайта (в том числе и с его расщепленными формами) обладают не только ферменты, основной функцией которых является участие в ЭРО (такие как бифункциональные ДНК-гликозилазы и ДНК-полимераза β), но и ряд других белков [12].

Формирование основания Шиффа — обратимый процесс, но интермедиат можно зафиксировать, восстанавливая его боргидридом натрия [13]. Получающийся ковалентный аддукт белок–ДНК стабилен в условиях последующего анализа. Таким образом, сшивку белков с AP-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 [14–17].

Кроме того, было показано, что несколько белков, в частности, участник ЭРО XRCC1 [18], метилтрансфераза ALKBH1 [19] и PARP1 [20], способны формировать боргидрид-независимые («суицидальные») сшивки с AP-сайтами; однако механизм и биологическая значимость данных взаимодействий изучены не до конца.

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

В процессе выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести поиск белков, взаимодействующих с образованием основания Шиффа с AP-сайтами в составе различных AP-ДНК, в экстрактах клеток человека.
2. С помощью комбинации аффинной хроматографии и масс-спектрометрического анализа идентифицировать белки в составе аддуктов с AP-ДНК.
3. Для выяснения функциональной значимости обнаруженных взаимодействий белков с AP-ДНК выделить эти белки из культивируемых клеток человека в индивидуальном состоянии.
4. Изучить взаимодействие очищенных белков с различными AP-ДНК, оценить их способность расщеплять AP-сайты и взаимодействовать с ферментами эксцизионной репарации оснований.

Научная новизна и практическая значимость работы:

В рамках данной работы усовершенствован метод идентификации белков, взаимодействующих с AP-сайтами, с помощью комбинации аффинной хроматографии и MALDI-TOF масс-спектрометрии, который ранее был апробирован в лаборатории автора, — введена предварительная стадия обогащения клеточного экстракта по целевому белку путем фракционирования, которое осуществляется с помощью хроматографии или осаждения сульфатом аммония в определенном диапазоне насыщения. Это позволяет получить необходимое для идентификации количество продуктов сшивки белок–ДНК без использования высоких концентраций белков экстрактов и/или ДНК, в результате чего многократно снижается вероятность неспецифического связывания/сшивки ДНК с белками.

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

Впервые обнаружено и детально изучено взаимодействие гликолитического фермента глицеральдегид-3-фостфатдегидрогеназы (GAPDH) с AP-сайтами. Показана ее способность формировать с данными повреждениями как боргидрид-зависимые, так и

боргидрид-независимые (необратимые) ковалентные аддукты, которые могут образовываться в клетках в условиях окислительного стресса. Взаимодействие GAPDH с AP-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 AP-сайты, что имеет большое значение для таких практических областей, как разработка методов терапии онкозаболеваний.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. AP-ДНК-дуплекс с выступающими одноцепочечными участками (DDE-AP-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 AP-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 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^+ . GAPDH теряет способность образовывать аддукты с AP-ДНК после восстановления дисульфидных мостиков в составе белка.

Апробация работы и публикации. По материалам диссертации опубликовано 20 работ, в том числе 5 научных статей в рецензируемых журналах и 15 тезисов конференций. Список статей:

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 (1) – P. 42–46.

2. **Косова А.А.**, Лаврик О.И., Ходырева С.Н. Роль Ку-антигена в репарации апуриновых/апириимидиновых 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 (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.

Результаты работы были представлены на 6 зарубежных и 9 российских международных 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-летию 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 участвовал в анализе результатов и написании статей. Хроматографическое фракционирование клеточных экстрактов и выделение Ку-антигена и GAPDH из клеток

человека проведены совместно с научным руководителем д.б.н. С.Н. Ходыревой. Масс-спектры MALDI-TOF были сняты в Центре масс-спектрометрического анализа ИХБФМ СО РАН.

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю д.б.н. С.Н. Ходыревой за руководство, помощь в проведении экспериментальных работ, в анализе и обсуждении полученных результатов.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Апуриновые/апиримидиновые сайты в ДНК

1.1.1. Общие свойства AP-сайтов

Апуриновые/апиримидиновые (AP) сайты — один из наиболее часто встречающихся типов нарушений в структуре ДНК. В любой момент времени в клетках млекопитающих присутствует приблизительно 1 AP-сайт на 10^6 нуклеотидов [4]. Частота их возникновения в клетках в физиологических условиях была определена различными методами, и оценка варьирует от 0,05–0,15 AP-сайтов на 10^6 нуклеотидов в час по данным экстраполяции скорости термической апуринизации к физиологическим условиям [21] до 10–30 AP-сайтов на 10^6 нуклеотидов в час по данным модификации AP-сайтов специфическими реагентами *in situ* [4]. При генотоксическом стрессе число AP-сайтов в ДНК увеличивается. Потеря оснований ДНК в клетке происходит за счёт спонтанного гидролиза *N*-гликозидной связи между дезоксирибозой и основанием, а также в результате катализируемого ДНК-гликозилазами удаления оснований в процессе ЭРО [3].

Гидролиз *N*-гликозидной связи наиболее эффективно происходит в кислых условиях, но идет с достаточной скоростью и при физиологических значениях температуры и pH [21, 22]. Обработка плазмиды pBR 322 0,1 М NaCl, 0,01 М цитратом натрия (pH 5) при 70 °С в течение 8 мин приводит к формированию 2 AP-сайтов на молекулу ДНК [23]. Эффективность протонирования азотистого основания, запускающего гидролиз *N*-гликозидной связи, определяется значением pK_a протонируемого атома (атомы азота N1 аденина, N7 гуанина и N3 цитозина, атом кислорода O2 тимина). В физиологических условиях скорость гидролиза *N*-гликозидной связи в пуриновых дезоксирибонуклеотидах на 1–2 порядка выше, чем в пиримидиновых, причем для дезоксигуанозина она примерно в 1,5 раза выше, чем для дезоксиаденозина [24–26]. Химические модификации азотистых оснований, приводящие к формированию положительного заряда, ослабляют *N*-гликозидную связь. Например, такие алкилирующие реагенты как диметилсульфат модифицируют главным образом позицию N7 гуанина, тем самым повышая частоту потери данного основания на несколько порядков. Скорость формирования AP-сайтов в алкилированной ДНК возрастает с увеличением температуры [27].

Типичные примеры ферментативного расщепления AP-сайтов показаны на рис. 1.1. Основной путь расщепления AP-сайтов в клетках высших эукариот — это их гидролиз, катализируемый AP-эндонуклеазой 1 (APE1) в присутствии ионов магния, с

формированием продуктов, содержащих 3'-концевую гидроксильную группу и 2'-дезоксирибозо-5'-фосфат (5'-dRP) [7, 28, 29]. Вторым путем, характерным, в частности, для бифункциональных ДНК-гликозилаз, опосредован образованием основания Шиффа между аминогруппой в составе белка и дезоксирибозой AP-сайта (см. разд. 1.1.2) и приводит к формированию α,β -4-гидроксипентен-2-аля (также называемого 3'-фосфо- α,β -ненасыщенным альдегидом, или сокращенно 3'-PUA) на 3'-конце и фосфатной группы на 5'-конце (β -элиминирование) или фосфатных групп на 3'- и 5'-концах (β,δ -элиминирование) [3, 7]. Эти интермедиаты процессируются ферментами ЭРО на последующих стадиях. Кроме того, недавно было показано, что тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1) способна расщеплять AP-сайты и удалять остаток 3'-дезоксирибозы с образованием 3'-концевой фосфатной группы, и эта реакция не опосредована образованием основания Шиффа [30].

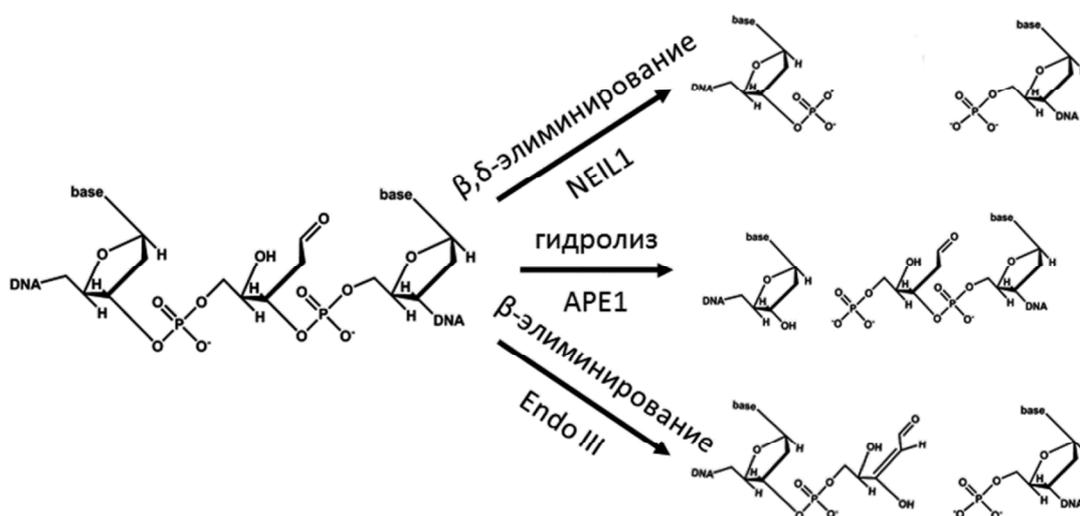


Рис. 1.1. Пути расщепления AP-сайта в процессе ЭРО. Пояснения см. в тексте.

Нерепарированные AP-сайты мутагенны и цитотоксичны [31]. Например, формирование множественных AP-сайтов под действием антибиотика лейнамицина обуславливает цитотоксическое действие этого противоопухолевого агента [32]. Увеличение времени жизни AP-сайтов в клетках вследствие экспрессии неактивной формы APE1 повышает чувствительность клеток к противоопухолевым препаратам, вызывающим повреждения ДНК [33]. Под влиянием таких факторов, как повышенная температура, а также при воздействии на ДНК нуклеофильных и основных реагентов и ионов Mg^{2+} AP-сайты могут подвергаться спонтанному гидролизу, в результате чего в ДНК возникают оц разрывы. Период полупревращения AP-сайтов в оц разрывы в физиологических условиях может достигать до нескольких суток [23].

В некоторых случаях в клетке создаются условия для образования AP-сайтов без их последующей репарации. Это происходит, например, в ходе переключения изотипов иммуноглобулинов в В-клетках, поскольку для этого необходимо возникновение мутаций в ДНК. Вследствие дезаминирования цитозина, катализируемого ферментом цитидиндезаминазой, в ДНК этих клеток возникает урацил, который удаляется урацил-ДНК-гликозилазой (UDG) с образованием AP-сайтов [34, 35].

AP-сайты вызывают паузы в ходе транскрипции [36]. Достигая AP-сайтов, РНК-полимеразы либо останавливаются и затем диссоциируют, либо катализируют включение AMP в РНК напротив AP-сайта в ДНК (по так называемому «правилу А») [37]. Кроме того, AP-сайты приводят к задержке или введению мутаций при репликации ДНК [38, 39], так как многие ДНК-полимеразы тоже подчиняются «правилу А», включая dAMP напротив AP-сайтов, находящихся в составе ДНК-матрицы [40, 41]. Было показано, что *in vivo* большинство мутаций в плазмидной ДНК, содержащей AP-сайты, представляет собой замены исходного основания на тимин по «правилу А» [42]. ДНК-полимеразы семейства γ (транслезионные ДНК-полимеразы) более эффективно преодолевают AP-сайты по сравнению с репликативными ДНК-полимеразами, однако и в данном случае при включении dNMP напротив AP-сайтов высока частота мутаций [41, 43]. Транслезионные полимеразы, а также ДНК-полимераза β (Pol β) и высокоошибочные репликативные ДНК-полимеразы, такие как обратная транскриптаза HIV-1, могут включать напротив AP-сайта не только dAMP, но и другие dNMP, а также вызывать делеции [40, 44]. AP-сайт преодолевается более эффективно, если в этом задействованы две специализированные ДНК-полимеразы, одна из которых включает dNMP напротив него, другая — следующий dNMP в 3'-направлении [45]. Вспомогательные факторы репликации эукариот PCNA, RFC и RPA стимулируют работу ДНК-полимераз на матрицах, содержащих AP-сайты [46].

Под действием ионизирующего излучения и лекарственных препаратов-радиомиметиков в ДНК возникают кластерные повреждения, состоящие из комбинации AP-сайтов, окисленных оснований и разрывов цепи в пределах 1–2 витков спирали ДНК [8, 9]. Повреждения на разных цепях ДНК в составе кластера репарируются ферментами ЭРО со значительно меньшей эффективностью, чем соответствующие изолированные повреждения. Например, кластерное повреждение, состоящее из двух смещённых друг относительно друга AP-сайтов на противоположных цепях ДНК, обычно подвергается репарации под действием APE1 *in vitro* значительно медленнее, чем одиночный AP-сайт, причем этот эффект выражен сильнее для AP-сайтов, расположенных ближе друг к другу [47–53]. Однако скорость расщепления AP-сайта в составе дуплекса, имитирующего

кластерное повреждение ДНК, может быть и больше, чем одиночного, если AP-сайт в противоположной цепи удален от него на расстояние 4–10 п.н. в 5'-сторону или на 6–14 п.н. в 3'-сторону. Таким образом, скорость расщепления кластеризованных AP-сайтов под действием APE1 зависит от расстояния и взаимной ориентации AP-сайтов [53]. AP-сайты, входящие в состав кластерных повреждений, остаются в клетках даже по прошествии 24 ч с момента возникновения, тогда как изолированные AP-сайты репарируются в течение 1 ч [4, 54].

Представляет интерес идентификация белков, взаимодействующих с AP-сайтами в ДНК и, возможно, участвующих в регуляции их репарации. AP-ДНК может использоваться в данном случае как химически активный ДНК-реагент, который по отношению к белкам является более селективным, чем ДНК, содержащие фотоактивируемые аналоги нуклеотидов, которые также используются для изучения белково-нуклеиновых взаимодействий [12].

1.1.2. Боргидрид-зависимая сшивка белков с AP-сайтами в ДНК

Остатки дезоксирибозы в AP-сайтах находятся в равновесии циклической фуранозной и ациклической альдегидной форм [4] (рис. 1.2). Альдегидная форма, содержание которой составляет всего 1–2% от общего числа AP-сайтов, способна образовывать основания Шиффа с первичными аминогруппами белков (рис. 1.3). Преимущественно это белки, участвующие в ЭРО.

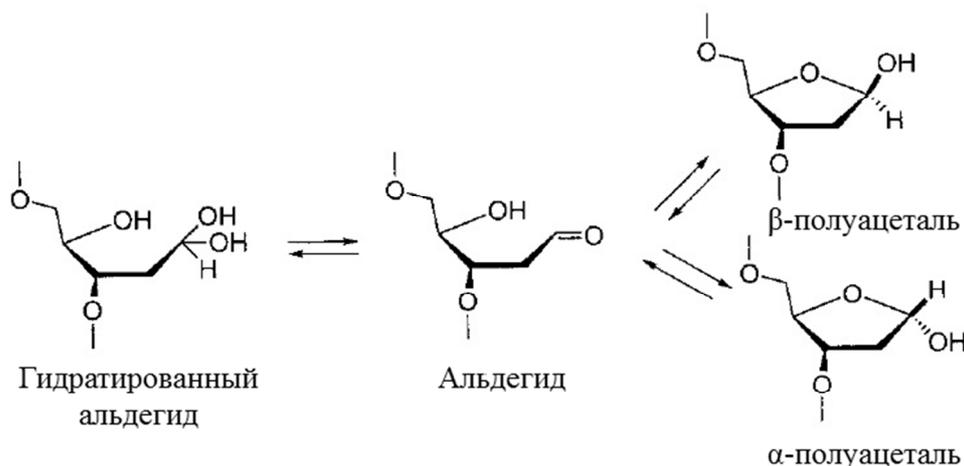


Рис. 1.2. Различные формы AP-сайта.

Образование основания Шиффа — обратимый процесс, однако это основание можно восстановить (обычно для этих целей используют NaBH_4 или NaBH_3CN) с образованием негидролизуемого ковалентного аддукта белок–ДНК [13], обнаруживаемого при электрофоретическом анализе белков. ДНК с AP-сайтом, расщепленным за счет AP-лиазной активности бифункциональных ДНК-гликозилаз (3'-PUA) или

гидролизированным AP-эндонуклеазами (5'-dRP), также могут образовывать основания Шиффа.

Большинство белков, способных формировать основания Шиффа с дезоксирибозой AP-сайта (в том числе и с его расщепленными формами), связано с процессом ЭРО. Образование основания Шиффа в качестве интермедиата характерно для расщепления AP-сайтов по механизму β -элиминирования бифункциональными ДНК-гликозилазами [55], хотя некоторые гликозилазы (например, MutY *E. coli*) способны формировать основание Шиффа без последующего β -элиминирования [56].

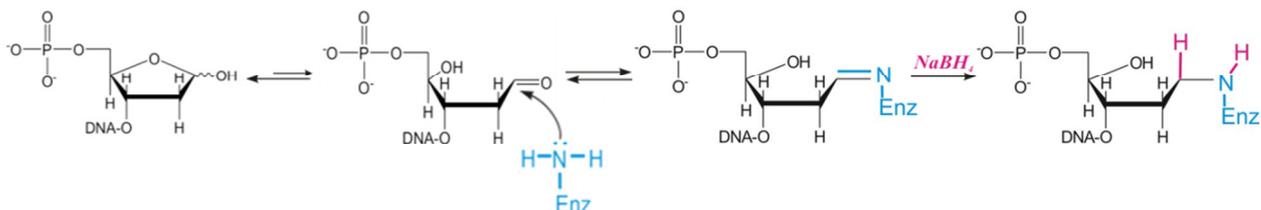


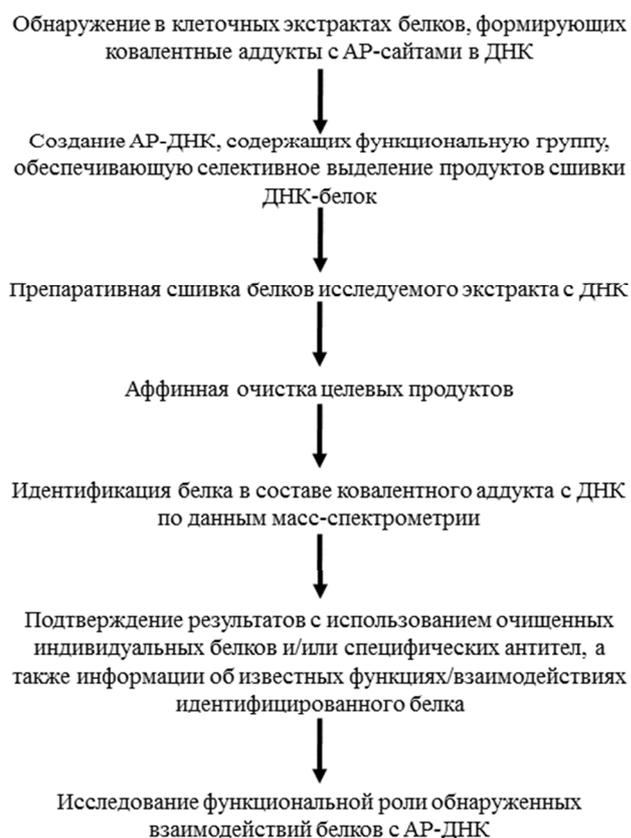
Рис. 1.3. Боргидрид-зависимая сшивка белков с AP-сайтами.

Восстановление NaBH_4 было использовано многими авторами для однозначного выявления аминокислотных остатков (а.о.) ДНК-гликозилаз, участвующих в образовании основания Шиффа. После проведения данной реакции осуществляли протеолиз и идентификацию сшитого с ДНК пептидного фрагмента секвенированием по Эдману или методами масс-спектрометрии. Методы сайт-направленного мутагенеза, которые иногда применяются для выявления а.о., формирующих основания Шиффа, не дают прямого ответа на вопрос, играет ли данная аминокислотная группа роль нуклеофила при замещении или нужна для других целей в катализе.

С использованием эндонуклеазы V фага T4 (ДНК-гликозилаза пиримидиновых димеров) в работе [57] было впервые экспериментально показано, что механизм действия бифункциональных ДНК-гликозилаз включает образование иминового интермедиата, стабилизируемого под действием NaBH_4 . С помощью химического гидролиза белка в составе комплекса, восстановленного NaBH_4 , было показано, что в образовании интермедиата в качестве нуклеофила участвует α -аминогруппа N-концевого остатка Thr. Позднее с помощью боргидрид-зависимой сшивки было доказано формирование основания Шиффа в ходе реакции, катализируемой формамидопиримидин-ДНК-гликозилазой *E. coli* (Fpg), с участием N-концевого Pro [58, 59], а также в ходе реакции, катализируемой 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой 1 эукариот (OGG1), с участием ϵ -аминогруппы Lys249 [60]. С использованием данного метода формирование основания Шиффа с ДНК также было доказано для ДНК-гликозилаз Nei *E. coli* [58, 61], Mut Y *E. coli* [56], NTHL1 человека [62] и др.

Разными авторами было показано взаимодействие с AP-сайтами с образованием основания Шиффа для таких белков, как ДНК-полимеразы β , γ , θ , ι , κ , λ [63–68], различные ДНК-лигазы [69], интеграна HIV-1 [70], рибосомный белок S3 *Drosophila* [71] и человека [72, 73] и нуклеозиддифосфаткиназа NM23-H2/NDP человека [74]. Связываясь с AP-сайтами, данные белки могут не только участвовать в их репарации, но и обеспечивать их временную защиту и передачу клеточного сигнала.

Две группы исследователей независимо с использованием идентичных подходов осуществили целенаправленный поиск белков, взаимодействующих с AP-сайтами, в прокариотических (*E. coli*) и эукариотических клетках (*Saccharomyces cerevisiae*, *Bos taurus*, *Homo sapiens*) [14–17, 75, 76]. Ниже приведена типичная схема идентификации белков, взаимодействующих с AP-сайтами, и дальнейшего изучения обнаруженных взаимодействий:



1.1.3. Стабильные сшивки белков с AP-сайтами без фиксации NaBH_4

Разными авторами было показано, что несколько белков, в частности, участник ЭРО XRCC1 [18], ALKBH1 (метилтрансфераза, обладающая AP-лиазной активностью) [19] и PARP1 [20], способны формировать стабильные сшивки с AP-сайтами без фиксации NaBH_4 ; однако механизм и биологическая значимость данных взаимодействий изучены не до конца. XRCC1 формирует аддукты с AP-ДНК при участии двух своих доменов:

N-концевого домена (NTD) и BRCT1-домена, находящегося в середине белка. При этом XRCC1 более эффективно взаимодействует с 3'-PUA, получающимся после расщепления AP-сайта по механизму β -элиминирования, чем с интактным AP-сайтом [18]. ALKBH1 формирует ковалентный аддукт с 5'-концевым фрагментом расщепленной ДНК при участии своего N-концевого домена, тогда как лизины, отвечающие за AP-лиазную активность, расположены в другом участке белка [19]. PARP1 формирует ковалентные аддукты с AP-сайтами при участии своего N-концевого домена, содержащего много остатков лизина. Предполагается, что сшивка PARP1 с продуктом расщепления AP-сайта является «суицидальным» событием (то есть одним из факторов, приводящих к клеточной гибели) в случае, когда работа системы ЭРО нарушена [20]. Как в случае ALKBH1, так и в случае PARP1 точки пришивки не были идентифицированы, однако было показано, что при обработке PARP1 иодоацетамидом и в случае мутаций C256A и C256A/C854A уровень формирования боргидрид-независимых аддуктов значительно снижался [20]. Авторы обеих работ предполагают, что в формировании боргидрид-независимых аддуктов участвуют нуклеофильные группы белков.

1.2. Ки-антиген

1.2.1. Ки в репарации двухцепочечных разрывов ДНК

Наиболее опасными повреждениями ДНК являются дц разрывы. Они возникают под действием ионизирующего излучения, которое либо непосредственно разрушает химические связи в ДНК, либо взаимодействует с молекулами воды, формируя пероксид и свободные радикалы, повреждающие ДНК. Разрывы, возникающие в одной из цепей ДНК, как правило, не приводят к катастрофическим последствиям, поскольку вторая неповрежденная цепь содержит всю необходимую информации для однозначного восстановления поврежденной цепи. Но если разрывы возникают одновременно в двух цепях на небольшом расстоянии друг от друга, ДНК фрагментируется. Даже один нерепарированный дц разрыв может привести к гибели клетки, а неправильное восстановление структуры в месте таких разрывов — вызвать мутации или потерю генетической информации. Кластерные повреждения (разд. 1.1.1, рис. 1.4) также опасны для жизнедеятельности клеток, поскольку в процесс репарации большинства повреждений обязательно входит стадия формирования разрыва цепи и, следовательно, при этом могут формироваться дц разрывы [10, 8].

В клетках высших эукариот за репарацию дц разрывов отвечают три разных системы, различающиеся механизмами и наборами задействованных в процессе

ферментов и белков: гомологичная рекомбинация и негомологичное соединение концов (НГСК), которое в свою очередь подразделяется на две ветви — каноническое и альтернативное [77–80]. По первому пути репарируются в основном дц разрывы, возникающие в фазах клеточного цикла S и G₂, то есть когда ДНК уже реплицирована. При образовании дц разрыва в одной молекуле, вторая молекула может быть использована в качестве матрицы для повторного синтеза ДНК в месте повреждения. Этот процесс, осуществляемый специальным ансамблем белков, происходит без потери информации благодаря присутствию второй неповрежденной молекулы.

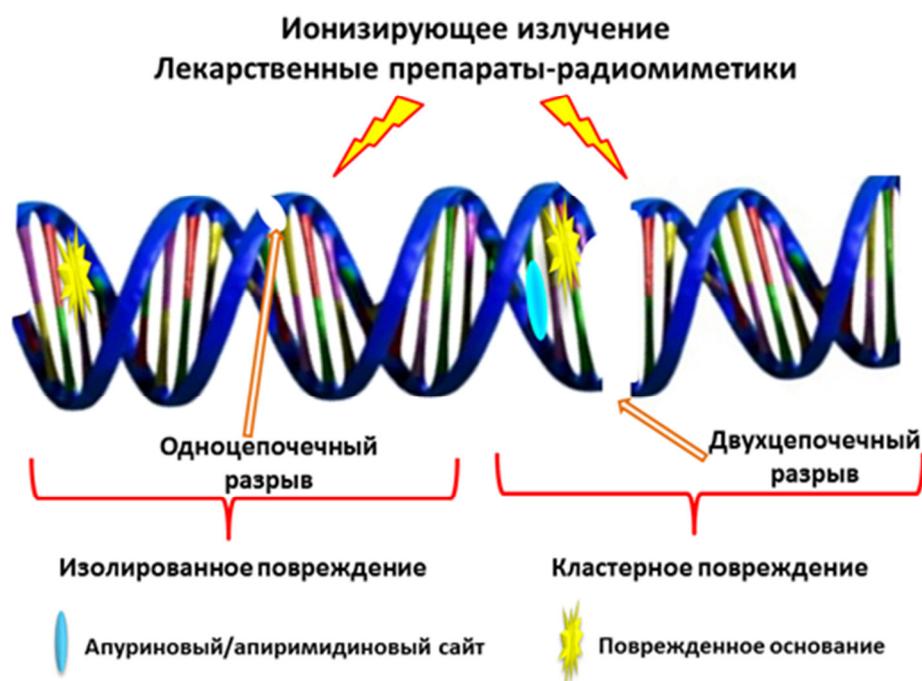


Рис. 1.4. Повреждения ДНК, вызываемые ионизирующим излучением и лекарственными препаратами-радиомиметиками.

В остальной части клеточного цикла, когда клетки содержат только по одной копии молекул ДНК, репарация дц разрывов осуществляется системой НГСК. Классический вариант НГСК инициируется связыванием с концами дц разрыва белка Ку-антигена, который абсолютно необходим для этого процесса; затем в случае необходимости может осуществляться незначительный их процессинг (например, «подрезка» различными нуклеазами, достройка ДНК-полимеразами, (де)фосфорилирование); завершается данный путь репарации соединением разорванных концов под действием специфичного для НГСК лигазного комплекса — XRCC4–LigIV. О значимости Ку для репарации дц разрывов свидетельствуют дефекты клеток, лишенных этого белка: неточное соединение концов, чрезвычайная чувствительность клеток к действию ионизирующего излучения, наличие хромосомных разрывов и транслокаций, а также анеуплоидия [81–84].

В альтернативное НГСК, которое осуществляется в отсутствие канонического пути, вовлечена активность другого лигазного комплекса — XRCC1–LigIII, и этот процесс характеризуется наличием делеций (вставок) и участков микрогомологии в отрепарированном сегменте ДНК.

Структура Ku идеально приспособлена для НГСК. Он состоит из двух субъединиц с молекулярными массами около 70 кДа (Ku70) и 83 кДа (Ku80). Ku является ДНК-связывающим компонентом ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК), которая помимо него содержит еще каталитическую субъединицу. Обе субъединицы Ku содержат по три домена: N-концевой домен (vWA, alpha helix/beta barrel von Willebrand A), центральный домен, участвующий в связывании ДНК и димеризации субъединиц и C-концевой спиральный домен. Субъединицы димеризуются через центральные домены, формируя кольцо из переплетенных участков обеих субъединиц. Внутренняя поверхность кольца содержит остатки положительно заряженных аминокислот, что обеспечивает эффективное взаимодействие с сахарофосфатным остовом ДНК [85] (рис. 1.5).

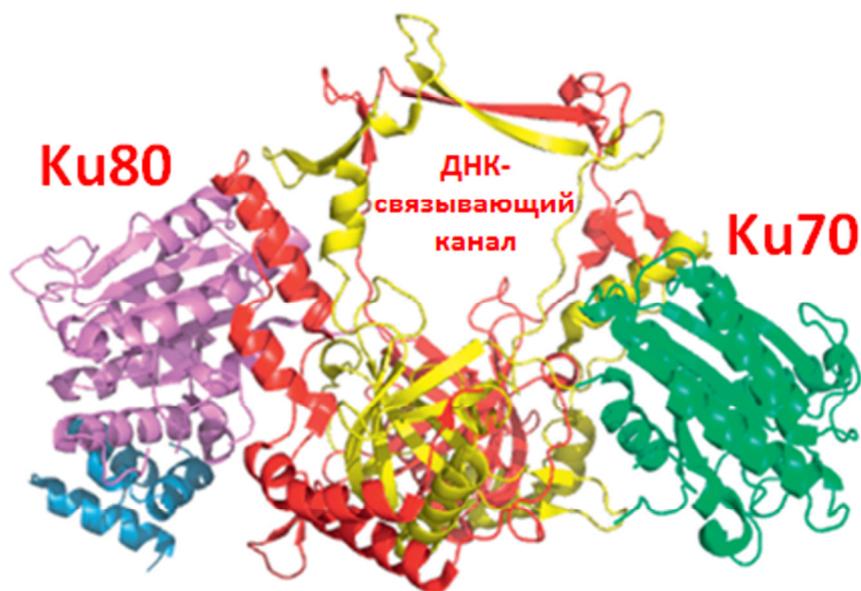


Рис. 1.5. Структура Ku (по данным работы [85], PDB ID: 1JEY).

Процесс канонического НГСК может быть подразделен на 5 стадий: узнавание концов ДНК Ku-антигеном, образование синаптического комплекса двумя молекулами Ku, связанными с концами ДНК, процессинг концов ДНК до состояния, пригодного для лигирования, лигирование разрывов и удаление Ku [77–80].

При взаимодействии Ku с ДНК он, подобно бусине, нанизывается на нить ДНК. Две молекулы Ku, «надетые» на концы ДНК, взаимодействуют друг с другом и удерживают концы ДНК вблизи для проведения последующей репарации. Способ связывания Ku с ДНК по типу «бусина на нитке» позволяет белку беспрепятственно

скользить по ДНК, что необходимо для функционирования репаративного комплекса. Кроме того, напоминающая корзинку укладка субъединиц Ku способствует относительно свободному доступу других белков репарации к ДНК в области «ручки», а «тело» корзинки служит платформой для сборки белков репарации вокруг повреждения. В упрощенном виде схема НГСК представлена на рис. 1.6 [77–80].

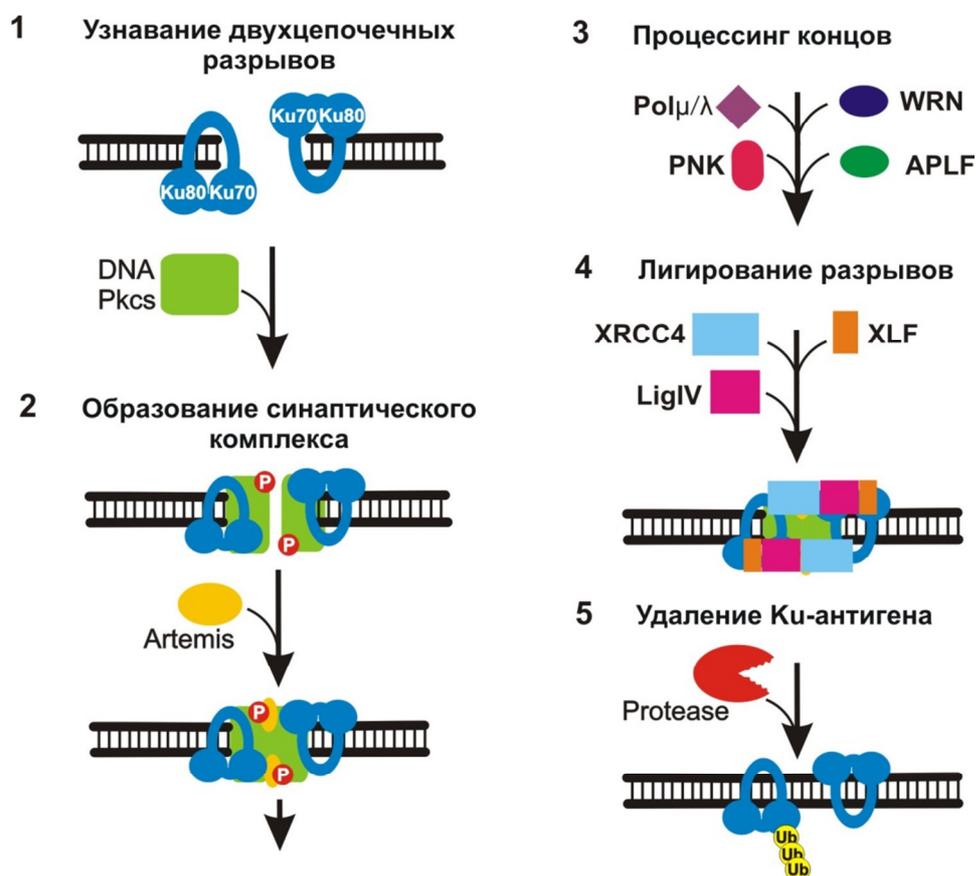


Рис. 1.6. Упрощенная схема репарации дц разрывов ДНК путем канонического НГСК.
 DNA PKcs — каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы; Pol μ/λ — ДНК-полимеразы μ/λ; P — фосфат; Ub — остаток убиквитина. Расшифровка остальных сокращений приведена в тексте.

Между стадиями узнавания дц разрыва Ку-антигеном и лигирования разрыва в репарацию могут быть вовлечены различные белки в зависимости от типа повреждений. Так, например, при воздействии ионизирующего излучения могут возникать разрывы, содержащие группы, блокирующие стадию лигирования — 3'-фосфаты, 3'-фосфогликоляты, 5'-гидроксилы, что требует участия различных наборов белков для создания совместимых концов. В ансамбль белков входят полинуклеотидкиназа/фосфатаза (PNKP); специализированные нуклеазы для «подрезки» концов, такие как АТР-зависимая геликаза синдрома Вернера (WRN), белок мейотической рекомбинации 11 (MRE11), экзонуклеаза Artemis, экзонуклеаза I (ExoI), фактор, схожий с апратаксином и PNKP (APLF); ДНК-полимеразы μ, λ и др. для ресинтеза участков ДНК; геликаза RECQ1; TDP1 и ДНК-лигаза IV (LigIV) в комплексе с белком, входящим в

группу комплементации 4, обуславливающим чувствительность клеток к рентгеновскому излучению (XRCC4) и фактором, схожим с XRCC4 (XLF), которые обеспечивают восстановление целостности сахарофосфатного остова ДНК.

Одна из наименее изученных стадий канонического НГСК — это удаление Ku после завершения лигирования разрывов. Из-за способа связывания с ДНК «бусина на нитке» после лигирования концов Ku оказывается «пойманным» на ДНК. Одним из наиболее вероятных механизмов освобождения ДНК от Ku считается деградация белка после его убиквитинирования, однако существуют данные в пользу других способов удаления Ku с ДНК [79]. Для установления точного механизма требуются дальнейшие исследования.

1.2.2. Дополнительные функции Ku

Нужно отметить, что значение Ku для организмов не ограничивается его участием в НГСК (рис. 1.7). Этот белок «открывали» несколько раз, изучая различные процессы. Впервые Ku был обнаружен как белок, вызывающий возникновение аутоантител в сыворотке крови пациентов с некоторыми заболеваниями соединительной ткани, и назван по первым буквам фамилии пациента, у которого впервые были найдены антитела [86]. Эти заболевания включают полимиозит, склеродерму, системную красную волчанку и др. и характеризуются наличием у пациентов антител к компонентам собственных клеток. Антитела к Ku-антигену были обнаружены и у пациентов с другими аутоиммунными заболеваниями, в частности, ревматоидным артритом [87, 88].



Рис. 1.7. Функции Ku.

Уже в первой работе было установлено, что Ku преимущественно находится в ядрах клеток [86]. Затем была обнаружена способность этого белка взаимодействовать с ДНК, хотя его функция еще оставалась неизвестной. Потребовалось несколько лет, чтобы установить, что Ku участвует в процессе репарации дц разрывов и представляет собой ДНК-связывающий компонент ДНК-ПК — ключевого белка НГСК [79, 89, 90].

Затем было обнаружено множество функций Ku в различных клеточных процессах [79, 89, 90] (рис. 1.7). В некоторых случаях роль Ku в процессе напрямую следует из его способности участвовать в репарации дц разрывов ДНК. Это относится к уникальному физиологическому процессу, происходящему на ранних этапах развития клеток иммунной системы, известному как V(D)J-рекомбинация. В геноме закодированы несколько вариантов повторяющихся сегментов, принадлежащих к трем классам: V (variable), D (diversity) и J (joining). В процессе V(D)J-рекомбинации сегменты генов, по одному из каждого класса, соединяются вместе. Объединенные последовательности сегментов V(D)J кодируют участки цепей антитела (или рецептора), ответственные за узнавание антигенов. В разных клетках объединяются разные наборы сегментов, и «потомки» этих клеток наследуют разные гены иммуноглобулинов (рецепторов). Эти события происходят еще до встречи организма с бактериями, вирусами и другими патогенами и обеспечивают первичное (врожденное) разнообразие антител (рецепторов). В процессе такой рекомбинации образуются дц разрывы в ДНК, и Ku, обеспечивая их репарацию, участвует в объединении сегментов. Нарушение функций Ku приводит к так называемому тяжелому комбинированному иммунодефициту [91].

Помимо функций, непосредственно связанных с репарацией дц разрывов ДНК, Ku вовлечен в ряд клеточных процессов, которые так или иначе связаны с поддержанием структуры ДНК.

Ku способен узнавать участки ДНК со специфическими последовательностями, в которых начинается ее репликация, а также взаимодействовать с белками этого процесса в отсутствие ДНК; причем снижение количества Ku отрицательно влияет на процесс репликации [92]. Также было обнаружено связывание Ku со специфическими последовательностями в ДНК, которые служат районами для прикрепления ДНК к белкам ядерного матрикса, что способствует укладке хроматина в виде петель [93]. Интересно, что в этих двух случаях при связывании Ku с ДНК не требуется наличия дц разрывов, но для обоих типов последовательностей характерно легкое плавление спирали ДНК. Кроме того, показано, что Ku участвует в регуляции транскрипции, связываясь с промоторами генов белков теплового шока [94–96]; также он способен связываться с участками РНК-полимеразы II, отвечающими за элонгацию [97].

Ku связан с поддержанием целостности теломер. С одной стороны, теломеры предотвращают узнавание концов хромосомы белками репаративной машины как ДНК разрыва, подлежащего репарации. С другой стороны, в нормальных клетках при каждом ее делении теломеры становятся короче. Однако в раковых клетках длина теломер поддерживается на постоянном уровне, и клетки не утрачивают способность к делению. Локализация субъединиц Ku на теломерах была показана в клетках дрожжей и млекопитающих; при отсутствии одной из субъединиц теломеры укорачивались [98–101]. Кроме того, было обнаружено, что Ku может взаимодействовать не только с теломерной ДНК, но и с белками, связывающими теломерные повторы (TRF1 и TRF2) [102–105] и с теломеразой, причем как с ее белковой составляющей (обратной транскриптазой hTERT) [106], так и с ее РНК-компонентой [107]; таким образом Ku способствует работе теломеразы и препятствует «сшиванию» теломер друг с другом [108, 109].

Приведенные примеры функций Ku демонстрируют, насколько велика его роль в сохранении и реализации генетической информации, однако данный белок имеет и другие функции. Несмотря на то, что Ku локализуется главным образом в ядре, он может не только находиться в цитоплазме, но и функционировать независимым от ДНК образом. Цитоплазматическая форма белка участвует в ответе клеток на токсические воздействия. Ku70-субъединица вовлечена в регуляцию апоптоза. С одной стороны, Ku70, связывая белок BAX (Bcl-2 {*B-cell lymphoma 2*} associated X protein), предотвращает его перемещение в митохондрии [110]. Это перемещение запускает апоптоз, поэтому, действуя таким образом, Ku70 проявляет антиапоптотическую активность. С другой стороны, Ku70 может удалять остатки убиквитина с белка BAX, продлевая жизнь этого белка и, следовательно, давая BAX возможность выполнить свою функцию по запуску апоптоза [111]. Для многих раковых клеток характерна способность «ускользнуть» от выполнения программы апоптоза, что подчеркивает необходимость пристального внимания к Ku в раковых клетках.

Кроме того, Ku может находиться на внешней поверхности клеток в виде, связанном с цитоплазматической мембраной. В этом случае он способствует проникновению бактерии *Rickettsia conorii* и парвовируса B19 в клетку [112, 113]. Также эта цитоплазматическая форма Ku участвует в клеточной адгезии к некоторым типам клеток и межклеточному матриксу [114]. Ku, расположенный на внешней стороне мембраны, способствует миграции клеток, помогая специальной протеазе «прогрызть» для клетки путь, частично разрушая межклеточный матрикс [114]. Таким образом, Ku может способствовать образованию метастазов при онкозаболевании.

1.2.3. Взаимодействие Ku с AP-сайтами

Поскольку формирование основания Шиффа — процесс обратимый, можно предположить, что этот тип взаимодействия работает как защитный и/или регуляторный механизм. Основываясь на этом предположении, в работе [14] была проверена способность ДНК-ПК, состоящей из Ku и каталитической субъединицы, расщеплять AP-сайт, расположенный в середине одной из цепей ДНК-дуплекса длиной 32 п.н. с тупыми концами. Расщепления AP-сайтов в присутствии ДНК-ПК не детектировали — наоборот, холофермент ДНК-ПК ингибировал гидролиз AP-сайтов эндонуклеазой APE1, что косвенно подтверждало предположение авторов данной работы о защитной/регуляторной функции формирования основания Шиффа. С этим предположением также согласуется стабильность комплексов Ku80–ДНК, сформированных Ku-антигеном экстракта клеток HeLa [14].

Позднее другими авторами было показано, что Ku обладает биологически значимой 5'-dRP/AP-лиазной активностью вблизи дц концов ДНК, в особенности по отношению к AP-сайтам, расположенным в оц выступающем 5'-концевом участке [11]. AP-лиазная и 5'-dRP-лиазная активности необходимы для удаления групп, блокирующих репарацию ДНК в процессе подготовки концов ДНК к лигированию в НГСК. При более детальном анализе субстратной специфичности AP-лиазной активности Ku было установлено, что эффективность расщепления AP-сайтов зависит от нескольких факторов, в том числе от структуры концов ДНК и положения AP-сайта относительно концов ДНК [115]. Оказалось, что AP-сайты расщепляются более эффективно, если они локализованы в 5'-концевых оц участках ДНК, по сравнению с AP-сайтами, расположенными в 3'-концевых оц участках. Данное различие, по мнению авторов работы [115], связано с тем, что при расщеплении AP-сайтов, расположенных в 5'-концевых оц участках, на 5'-конце цепи ДНК остается фосфатная группа, которая может быть непосредственно использована в процессе лигирования. Для AP-сайтов, расположенных в 3'-концевых оц участках, продукты расщепления содержат на 3'-конце группу, блокирующую лигирование, — α,β -ненасыщенный альдегид (транс-4-гидрокси-2-пентеналь-5-фосфат). Следует отметить, что 5'-dRP/AP-лиазная активность Ku зависит от того, насколько AP-сайт «заглублен» в дуплексную часть ДНК. Так, Ku не проявляет AP-лиазную активность, если AP-сайты заглублены в дуплексную часть ДНК более, чем на 3 п.н. [115]. Базируясь на детальном анализе AP-лиазной активности Ku в зависимости от структуры AP-ДНК, авторы предложили изящную схему «разделения труда между НГСК и ЭРО» в процессе репарации AP-сайтов. AP-сайты непосредственно вблизи 5'-конца репарируются системой белков НГСК, в которой функцию расщепления AP-сайтов выполняет Ku. Если

же AP-сайты отстоят от 5'-конца цепи ДНК на значительное расстояние, то в качестве системы для их репарации рассматривается ЭРО, поскольку Ku не проявляет значимой активности в расщеплении таких AP-сайтов. Это согласуется с данными об устойчивости AP-сайтов в ДНК-дуплексе, расположенных на расстоянии 16 п.н. от тупых концов, к действию Ku в составе ДНК-ПК [14].

Методом сайт-направленного мутагенеза было показано, что лизины N-концевой части Ku70 (K31, K160 и K164) участвуют в расщеплении AP-сайтов, и, вероятно, некоторые из них играют роль нуклеофилов в данном процессе [11]. Это согласуется с данными для Ku дикого типа: в случае AP-ДНК, не расщепляемой Ku (AP-сайт расположен в дц части), не образуется сшивок с субъединицей Ku70 [11, 115]. В то же время, Ku, содержащий мутантную форму Ku70, в которой все три вышеуказанных лизина заменены на аланины, образует боргидрид-зависимые сшивки Ku80–AP-ДНК, при этом AP-лиазная активность Ku на наиболее эффективном субстрате (AP-сайт расположен на 5'-конце в оц участке) снижена незначительно [11, 115]. В этом случае лизины Ku80 могут замещать лизины Ku70 в катализе. В последующей работе было установлено, что при расщеплении AP-сайтов Ku-антигеном роль главного нуклеофила играет K31 Ku70. AP-лиазная активность белка полностью исчезала только в случае, если в нем одновременно присутствовали мутации K31 и K160 Ku70, а также 6 остатков лизина Ku80 [116].

Таким образом, Ku взаимодействует с AP-ДНК различной структуры, причем лизины обеих субъединиц могут участвовать в образовании основания Шиффа [14, 11, 115]. Эффективность сшивки той или другой субъединицы с AP-ДНК для белка дикого типа определяется структурными особенностями ДНК. Часть комплексов, несмотря на образование основания Шиффа, не продуктивна в расщеплении ДНК. Основание Шиффа может спонтанно гидролизироваться, приводя к диссоциации комплексов Ku–AP-ДНК. Вероятно, в этом случае взаимодействие Ku с AP-ДНК служит для временной защиты AP-сайтов или регуляции их расщепления другими ферментами.

1.2.4. Ku в ЭРО

В большинстве случаев клетки дрожжей и человека, а также мыши с делецией Ku имеют фенотипы, которые можно ожидать при нарушении НГСК, например гиперчувствительность к кластогенным агентам и сниженный иммунитет [90]. Это предполагает функционирование Ku70 и Ku80 только в составе гетеродимера Ku70/Ku80 в процессе репарации дц разрывов, возникающих при воздействии на ДНК повреждающих агентов или при V(D)J-рекомбинации [89]. Однако делеции Ku70 или Ku80 приводят к

разным фенотипам, отличающимся от фенотипов, ожидаемых при нарушении НГСК. Это позволяет предположить, что Ku70 и Ku80 могут функционировать, не входя в состав гетеродимера Ku70/Ku80. Эта идея подтверждается способностью свободного полипептида Ku70 связываться с ДНК [117]. Термин «свободный» используется для обозначения субъединиц Ku вне гетеродимера. Делеции Ku70 или Ku80 приводят к различной чувствительности мышечных фибробластов к генотоксинам, которые вызывают повреждения оснований ДНК и оц разрывы — повреждения ДНК, репарируемые ЭРО [118]. Эти наблюдения, а также способность Ku взаимодействовать с AP-сайтами в ДНК (разд. 1.2.3) косвенно подтверждают возможное участие гетеродимера Ku70/Ku80 и/или его отдельных субъединиц в ЭРО. Кроме того, предпринимались попытки доказать предположение об участии отдельных субъединиц Ku в ЭРО [119, 120].

Основываясь на известных механизмах повреждений ДНК, вызванных различными генотоксическими агентами, и путях их репарации, Li et al. предложили четыре рабочих модели, в которых последовательно исключались возможные эффекты НГСК, и доказали прямое влияние Ku80 на процесс ЭРО [119]. На клетках дикого типа и нокаутных по генам Ku80 и ДНК-лигазы IV (*ku80^{-/-}* и *lig4^{-/-}*) был проведен генотоксический скрининг нескольких агентов, вызывающих повреждения ДНК, которые обычно репарируются НГСК, ЭРО или обеими системами, а также анализ образования дц разрывов (формирование локусов γ -H2AX). В результате было показано, что клетки *ku80^{-/-}* обладают повышенной чувствительностью к генотоксинам, вызывающим повреждения оснований ДНК и образование оц разрывов. Это позволило авторам работы предположить, что в клетках *ku80^{-/-}* нарушена система ЭРО. В экспериментах *in vitro*, в которых изучали влияние ферментов ядерных экстрактов на репарацию специфических субстратов ЭРО, установили, что в экстрактах клеток *ku80^{-/-}*, но не *lig4^{-/-}* или *ku70^{-/-}*, способность к осуществлению репарации снижена. Однако эктопическая экспрессия Ku80 в клетках *ku80^{-/-}* восстанавливала их способность к ЭРО. Более того, повышенная экспрессия OGG1 и PARP1 — белков, участвующих в репарации повреждений ДНК, вызываемых активными формами кислорода (АФК), — может компенсировать отсутствие Ku80 — именно этот фактор обуславливает повышенную чувствительность клеток *ku80^{-/-}* к АФК. Таким образом, путем детального пошагового анализа подтверждена гипотеза о негативном влиянии делеции Ku80 на несколько стадий ЭРО и показано, что Ku80 функционирует, не образуя гетеродимер с Ku70. При дальнейшем изучении не связанных с НГСК функций субъединиц Ku было установлено, что при удалении Pol β с помощью РНК-интерференции в *ku80^{-/-}* фибробластах их чувствительность к метилметансульфонату повышается, тогда как избыточная экспрессия Pol β восстанавливает нормальный уровень

чувствительности [120]. Основываясь на данных экспериментов, в которых повышенная экспрессия OGG1, PARP1 или Pol β в клетках *ku80*^{-/-} восстанавливала нормальный уровень их чувствительности к повреждающим агентам, авторы данной работы предположили, что делеция Ku80 приводит к снижению способности клеток осуществлять ЭРО, но не полностью нарушает данный процесс.

Поскольку у клеток *ku80*^{-/-} снижена способность к репарации AP-сайтов [119], Choi et al. предположили, что свободный Ku70 ингибирует активность APE1, и проанализировали чувствительность клеток, лишенных Ku70, Ku80 или обоих белков, к ингибитору APE1 [120]. Оказалось, что в отсутствие одного из белков, Ku70 или Ku80, чувствительность клеток к ингибитору APE1 повышается, тогда как отсутствие обоих полипептидов не влияет на чувствительность. Эктопическая экспрессия мышинового Ku80 в клетках *ku80*^{-/-} возвращала их чувствительность к прежнему уровню. Кроме того, избыточная экспрессия APE1 также восстанавливала нормальный уровень чувствительности клеток *ku80*^{-/-}. На основании этих данных можно предположить, что отдельные субъединицы Ku специфично взаимодействуют с AP-сайтами, но не так, как это делает гетеродимер Ku70/Ku80. В экспериментах *in vitro* по исследованию связывания белков с AP-ДНК и ингибированию этого процесса с использованием конкурентной ДНК было показано, что обе субъединицы в индивидуальном состоянии связываются с AP-ДНК более эффективно, чем с обычной ДНК. Гетеродимер Ku70/Ku80 тоже связывался с AP-ДНК — на что указывало образование сшивок AP-ДНК с обеими его субъединицами, — но это взаимодействие нельзя было считать специфическим [120].

Следует отметить, что предполагаемое влияние свободного Ku80 и свободного Ku70 на процесс ЭРО не всегда тождественно. Так, свободный Ku70 и его N-концевой фрагмент, но не свободный Ku80, ингибируют активность APE1. Как свободный Ku80, так и свободный Ku70 повышают чувствительность клеток к ингибитору APE1, что может быть достигнуто за счет конкуренции с APE1 за связывание с AP-сайтом, тогда как *in vitro* свободный Ku80 не ингибирует расщепление AP-сайтов [120]. Таким образом, в клетках влияние Ku70 и Ku80, находящихся вне гетеродимера, на репарацию AP-сайтов, по-видимому, гораздо сложнее, чем в системах *in vitro*, реконструированных из очищенных белков. В любом случае, дисбаланс между Ku70 и Ku80 может негативно влиять на процесс ЭРО в клетках при некоторых условиях. Например, замечено, что при старении в лимфоцитах наблюдаются отклонения от эквимолярного соотношения Ku70 и Ku80 [121].

Для того чтобы однозначно установить роль свободных субъединиц Ku в процессе ЭРО, необходимо определить механизмы связывания Ku и его отдельных субъединиц с AP-сайтами на «непрерывной» ДНК. Согласно кристаллографическим данным, в

формировании ДНК-связывающей петли Ku, которая окружает ДНК, участвуют обе субъединицы [85]. Анализ результатов индуцированных УФ-светом сшивок Ku с ДНК, в которой фотоактивируемые группы расположены в различных положениях цепи, а один конец заблокирован, чтобы предотвратить возможность связывания белка (рис. 1.8), позволяют предположить, что ДНК входит в ДНК-связывающий канал гетеродимера со стороны Ku80 и затем протягивается до Ku70 [122]. Эти данные хорошо согласуются с результатами рентгеноструктурного анализа об ориентации субъединиц Ku в комплексе с ДНК, структура которой также обеспечивает «посадку» белка только с одного конца [85].

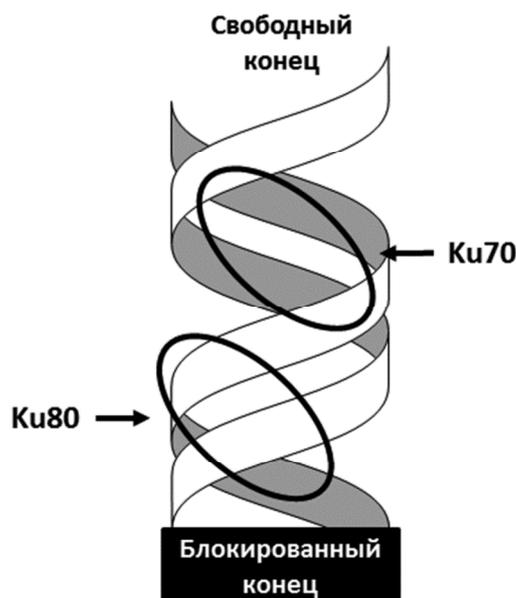


Рис. 1.8. Схема контактов субъединиц Ku с ДНК (по данным работы [122]). Овалами выделены области ДНК-дуплекса, которые преимущественно формируют сшивки с указанной субъединицей Ku. Блокирование одного конца ДНК осуществляли за счет связывания стрептавидина с остатком биотина, введенным в конец цепи ДНК.

Стоит заметить, что механизм связывания гетеродимера Ku70/Ku80 с ДНК вдали от дц концов ДНК остается неизвестным, хотя показано, что в этом процессе играет роль С-концевой SAP-домен Ku70, представляющий собой модификацию мотива «спираль–протяженный участок–спираль» (НЕН) [85, 123]. SAP-домен не задействован в формировании ДНК-связывающего канала, участвуя в гетеродимеризации Ku, а также, по-видимому, отвечает за остановки, которые иногда наблюдаются при перемещении Ku по линейным молекулам ДНК [89]. В экспериментах *in vitro* установлено, что за ингибирование активности APE1 на AP-ДНК с дц концами отвечает N-концевой домен Ku70 (а.о. 1–115). Эти результаты полностью согласуются с данными экспериментов с боргидрид-зависимой сшивкой, где показано предпочтительное связывание N-концевого домена Ku70 с AP-сайтами ДНК-субстрата с тупыми концами [120]. Однако до сих пор неизвестно, реализуется ли сходный тип связывания в случае клеточной ДНК, когда поблизости нет дц концов.

1.3. GAPDH

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH) (КФ 1.2.1.12) широко известна как фермент гликолиза, катализирующий реакцию: D-глицеральдегид-3-фосфат + NAD^+ + $\text{HPO}_4^{2-} \leftrightarrow 1,3\text{-дифосфоглицерат} + \text{NADH} + \text{H}^+$. Активный фермент является тетрамером с молекулярной массой ~ 150 кДа, состоящим из одинаковых субъединиц с молекулярной массой ~ 37 кДа [124]. GAPDH имеет NAD^+ -связывающий сайт, расположенный в пределах а.о. от 1 до 150, и глицеральдегид-3-фосфат-связывающий сайт (а.о. 151–335) [125].



Рис. 1.9. Разнообразие функций GAPDH в клетке.

Данные, накопленные за два последних десятилетия, позволяют отнести GAPDH, как и Ku, к категории белков, называемых “moonlighting proteins” [126, 127]. Такие белки способны выполнять «неожиданную работу по совместительству»: они имеют множественные автономные, зачастую несвязанные между собой функции, которые отличаются от основной ферментативной активности белка [126, 127]. Проявление такой мультифункциональности часто характерно для высококонсервативных белков, постоянный уровень экспрессии которых довольно высок [127]. Это в полной мере относится и к GAPDH, которая эволюционно консервативна и ее доля может составлять

до 10–20% от общего количества белка в клетке [124]. Несмотря на множественность функций GAPDH, в соматических клетках этот белок кодируется единственным структурным геном, и в клетках выявлен только один тип транскриптов гена *gapdh* [128, 129].

Для GAPDH выявлено множество клеточных функций, которые не связаны с гликолизом. Различные функции GAPDH в клеточном метаболизме подробно рассмотрены в ряде обзоров (рис. 1.9) [130–136]. В данной части обзора литературы основное внимание уделено свойствам GAPDH, касающимся ее взаимодействия с ДНК и участия в ДНК-зависимых процессах.

1.3.1. Перемещение GAPDH в ядро и связывание с ДНК

GAPDH в соответствии с ее основной функцией должна локализоваться в цитоплазме клеток. В то же время описано множество функций GAPDH, связанных с ее взаимодействием с ДНК и РНК. Это закономерно ставит вопросы о движущих силах и механизмах, которые могут обеспечить ядерную локализацию GAPDH, ее перемещение в ядро и обратный транспорт. Не менее важен вопрос о структурных элементах GAPDH, обеспечивающих узнавание белком нуклеиновых кислот.

В составе GAPDH не выявлено известных РНК-связывающих мотивов. Тем не менее, GAPDH связывается с широким рядом молекул РНК *in vitro* и в клетках. Следует отметить, что впервые связывание GAPDH с РНК *in vivo* было продемонстрировано на примере полирибосом в работе [137]. В дальнейшем было накоплено множество данных по взаимодействию GAPDH с различными типами РНК, которые детально рассмотрены в недавно опубликованном обзоре [138].

1.3.1.1 GAPDH — один из ферментов гликолиза, способных связываться с нуклеиновыми кислотами

Способность GAPDH связываться с ДНК была обнаружена более сорока лет назад. Уже в первых работах было продемонстрировано, что GAPDH более эффективно взаимодействует с оц ДНК [139–144]. Предположение о возможной функциональной значимости взаимодействия GAPDH с ДНК прежде всего основывалось на факте ее обнаружения в ядре [142]. Кроме того, было установлено, что GAPDH прочно связывается с ядерной ДНК [145]. В этой работе было показано, что GAPDH остается в ядерной фракции даже после обработки клеток ДНКазой или 5 М NaCl.

В ряде случаев способность ферментов гликолиза связываться с ДНК была обнаружена случайно, когда клеточные белки фракционировали с использованием

аффинной хроматографии при решении других задач. В частности, при поиске эукариотических белков, связывающих оц ДНК, были выделены два белка с кажущимися мол. массами 35 и 37 кДа (по данным электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях), которые были идентифицированы как лактатдегидрогеназа и GAPDH соответственно [143]. При поиске праймер-связывающих белков в экстрактах клеток HeLa фосфоглицераткиназа была идентифицирована как один из двух белков, обнаруженных в комплексе ДНК-полимеразой α [146]. Одним из факторов, обеспечивающих связывание указанных ферментов гликолиза с ДНК, могли быть белок-белковые взаимодействия. Однако эти белки сохраняли ДНК-связывающую активность, будучи выделенными в индивидуальном состоянии. Возможно, ключевую роль в связывании указанных белков с нуклеиновыми кислотами играет их общий структурный нуклеотид-связывающий мотив — т.н. укладка Россманна. В пользу такого предположения свидетельствует тот факт, что соответствующие коферменты (NADH и NAD^+) при субмиллимолярных концентрациях эффективно ингибируют связывание лактатдегидрогеназы и GAPDH с ДНК [143, 144].

Ядерная локализация GAPDH указывает на возможное ее участие *in vivo* в процессах, связанных с ДНК, и одновременно ставит ряд вопросов: отличаются ли формы GAPDH, участвующие в таких процессах и в гликолизе, какие механизмы вовлечены в «переадресовку» GAPDH из гликолиза в ДНК-зависимые процессы и какие функции GAPDH выполняет в ядре.

Как уже отмечалось выше, в клетках обнаружен только один тип мРНК GAPDH, и наблюдаемое разнообразие функций GAPDH может быть обусловлено олигомерным состоянием белка, посттрансляционными модификациями, статусом SH-групп и др.

1.3.1.2 Посттрансляционные модификации GAPDH, связанные с ее перемещением в ядро

Протеомный анализ с использованием 2D-электрофореза и масс-спектрометрии белков из клеток Jurkat (исходных и обработанных перекисью водорода) показал, что GAPDH в необработанных клетках представлена, по крайней мере, 9 изоформами, отличающимися по изоэлектрической точке, и что белок крайне чувствителен к действию на клетки перекиси водорода [147]. Эти результаты хорошо согласуются с имеющимися в литературе данными о влиянии посттрансляционной модификации и окисления GAPDH на ее локализацию в клетке, взаимодействие с нуклеиновыми кислотами и связанные с этим функции. Действительно, некоторые посттрансляционные модификации GAPDH связаны с перемещением GAPDH в ядро (табл. 1.1, рис. 1.10), например, ацетилирование

по Lys117, Lys227 и Lys251 [148] и карбонилирование, индуцированное NO (а.о. не определены) [149]. Существуют и модификации, препятствующие перемещению GAPDH в ядро, например, фосфорилирование Thr237 [150].

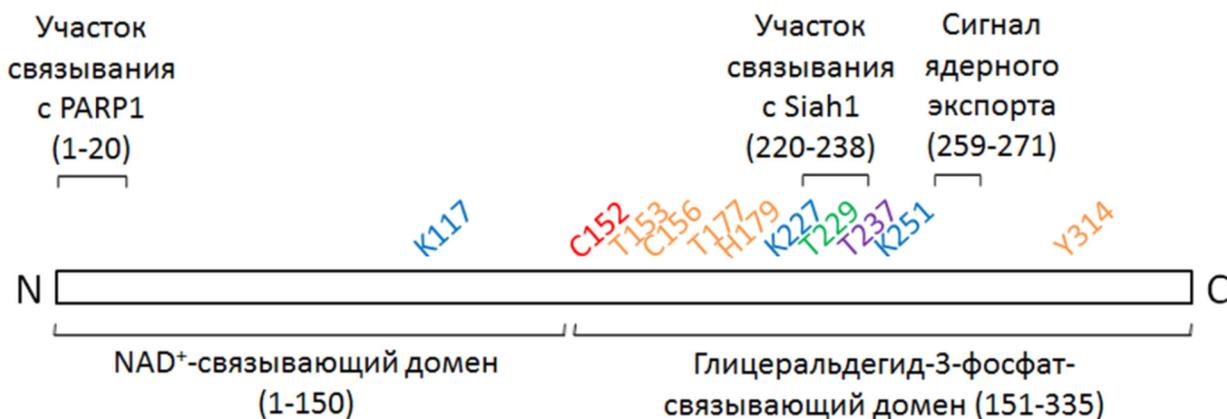


Рис. 1.10. Схема полипептида GAPDH человека с указанием расположения функциональных доменов, участков связывания с другими белками и аминокислотных остатков, указанных в табл. 1.1.

Табл. 1.1. Функциональные домены, участки связывания с другими белками и аминокислотные остатки GAPDH, которые подвергаются модификациям, способствующим (или препятствующим) ее перемещению в ядро и связыванию с ДНК.

А.о.	Функциональная значимость
1–150	NAD ⁺ -связывающий домен
151–335	Глицеральдегид-3-фосфат-связывающий домен
1–20	Участок связывания с PARP1
220–238	Участок связывания с Siah1
259–271	Сигнал ядерного экспорта
C152	Каталитический Cys, может подвергаться окислению и нитрозилированию
T153 C156 T177 H179 Y314	Участвуют в связывании H ₂ O ₂ и передаче протона при окислении каталитического Cys152
K117 K227 K251	Подвергаются ацетилированию, связанному с перемещением GAPDH в ядро
T229	Подвергается гликозилированию, приводящему к диссоциации GAPDH до мономерной формы
T237	Подвергается фосфорилированию, препятствующему перемещению GAPDH в ядро

Модификация может влиять на клеточную локализацию GAPDH опосредованно. Так, S-нитрозилирование GAPDH по остатку цистеина в активном центре (Cys152 у человека, Cys149 у кролика или Cys150 у мыши) ингибирует ее гликолитическую активность и усиливает ее связывание с белком Siah1, который имеет сигнал ядерной локализации, что способствует транспорту GAPDH, не имеющей собственного сигнала ядерной локализации, в ядро [151, 152] (функциональная значимость данного взаимодействия рассматривается в разд. 1.3.1.5. «Перемещение GAPDH в ядро в условиях апоптоза и ее проапоптотические функции»). Интересно, что за связывание с Siah1 отвечает участок в каталитическом домене GAPDH (а.о. 220–238) [151]. Кроме того, экспрессия (но не ферментативная активность) деацетилазы сиртуин-1 (SIRT1) каким-то образом удерживает GAPDH в цитозоле; в клетках, нокаутных по SIRT1, GAPDH перемещается в ядро даже в отсутствие факторов, запускающих апоптоз [153]. S-нитрозилированная GAPDH может транснаитрозировать ядерные белки, такие как SIRT1, гистон-деацетилаза 2 (HDAC2) и ДНК-зависимая протеинкиназа [154]. Гликозилирование Thr227, т. е. присоединение остатка N-ацетилглюкозамина к атому кислорода гидроксильной группы, способствует диссоциации GAPDH до мономерной формы; это может быть фактором, способствующим перемещению GAPDH в ядро [155]. Возможно, мономеру GAPDH для перемещения в ядро не требуется сигнальная последовательность, поскольку показано, что белки с мол. массой менее 40–45 кДа могут свободно перемещаться между цитоплазмой и ядром через ядерные поры [156].

1.3.1.3 Предполагаемые аминокислотные последовательности в GAPDH, отвечающие за ее ядерную локализацию и экспорт из ядра

Перемещение GAPDH в ядро и обратно может быть вызвано не только посттрансляционными модификациями. Некоторые авторы предполагают, что в GAPDH есть последовательности аминокислот, отвечающие за ее ядерную локализацию и экспорт из ядра. Так, при анализе аминокислотной последовательности GAPDH в ее глицеральдегид-3-фосфат-связывающем сайте были обнаружены участки, частично гомологичные сигналам ядерной локализации (KKVVK, а.о. 259–263) и ядерного экспорта (ALQNIP, а.о. 202–208) [132], однако их предполагаемые функции не были подтверждены экспериментально. Позднее в С-концевом домене GAPDH был обнаружен сигнал ядерного экспорта, состоящий из 13 а.о. (KKVVKQASEGPLK, а.о. 259–271). Укорочение этой последовательности или мутации в ней предотвращали связывание рецептора ядерного экспорта (CRM1, или экспортин 1) и способствовали накоплению GAPDH в ядре [157].

1.3.1.4 Окисление GAPDH

Установлено, что при окислении перекисью водорода в GAPDH может образоваться дисульфидная связь между Cys152 (основной каталитический а.о. GAPDH) и Cys156 в активном центре, кроме того, Cys152 может превратиться в цистеиновую кислоту [158]. С помощью молекулярного моделирования было показано, что GAPDH имеет специальный сайт связывания H_2O_2 , который находится в пределах каталитического домена, но отличается от сайта связывания глицеральдегид-3-фосфата, и в процессе окисления GAPDH под действием H_2O_2 участвуют также Thr153, Tyr314, His179 и Thr177, формирующие водородные связи друг с другом; между этими остатками происходит передача протона, в результате чего Cys152 превращается в цистеиновую кислоту и образуется молекула воды [159]. GAPDH обладает более высокой реакционной способностью по отношению к H_2O_2 , чем свободный цистеин, глутатион и большинство белков, регулируемых окислением [160]. Окисление GAPDH способствует выполнению ею «работы по совместительству»: в частности, она может функционировать в клетках как сенсор окисления и информационный «хаб», передающий сигналы для соответствующего ответа. Эта функция GAPDH детально рассмотрена в обзоре [160]. Следует подчеркнуть, что окисление GAPDH повышает уровень ее связывания с ДНК [160, 161]. В то же время, ингибирование связывания GAPDH с ДНК под действием NAD^+ и NADH [161] может свидетельствовать о том, что во взаимодействиях с ДНК участвует NAD^+ -связывающий сайт GAPDH. Комплекс с переносом заряда не может быть сформирован между окисленным Cys149 активного центра GAPDH кролика и NAD^+ , что приводит к снижению сродства GAPDH к NAD^+ , но не к NADH, который в результате намного эффективнее ингибирует связывание окисленной GAPDH с ДНК по сравнению с NAD^+ [161]. Структурные элементы GAPDH, ответственные за связывание с ДНК, еще не до конца изучены. Показано, что мутация Asp32, находящегося в NAD^+ -связывающем сайте GAPDH кролика, приводит к потере ферментом способности связывать оц теломерную ДНК. Аналогичный эффект дает мутация Cys149, находящегося в активном центре GAPDH. Это косвенно свидетельствует о том, что ДНК-связывающий сайт GAPDH включает в себя не только ее NAD^+ -связывающий сайт, но и активный центр [162].

1.3.1.5 Перемещение GAPDH в ядро в условиях апоптоза и ее проапоптотические функции

С помощью иммунофлуоресцентной микроскопии было показано, что GAPDH присутствует в ядрах делящихся клеток [131, 163]. В работе [164] были получены

моноклональные антитела, способные узнавать димеры, мономеры или развернутые полипептидные цепи GAPDH, но не нативную тетрамерную форму этого белка; с помощью данных антител было установлено, что GAPDH в ядре находится не в нативной форме [161]. Этому противоречат данные о том, что ядерная форма GAPDH из клеток, находящихся в состоянии апоптоза, проявляет ферментативную активность, которая свойственна только тетрамерной форме [165].

Во множестве работ было показано, что уровень GAPDH в ядре повышается в условиях апоптоза (например, [145, 151, 165–171]). Так, Saunders et al. наблюдали перемещение шести изоформ GAPDH в ядро при апоптозе нейронов, индуцированном цитозинарабинозидом. После обработки ядер нейронов данным соединением уровень модификации GAPDH радиоактивно меченым NAD^+ под действием нитропруссид натрия в них был на 60% ниже, чем в необработанных ядрах. Нитропруссид натрия способен индуцировать ковалентное присоединение NAD^+ к ряду белков, имеющих центры его связывания. Основываясь на этом, авторы предположили, что в условиях апоптоза происходит модификация, денатурация или неправильный фолдинг NAD^+ -связывающего центра GAPDH, и это каким-то образом приводит к ее перемещению в ядро и вызывает клеточный ответ, приводящий к гибели клеток [168].

В ядре GAPDH может выполнять проапоптотические функции. В одной из работ показано, что GAPDH перемещается в ядро при обработке клеток производными сафрамицина, которые являются антипролиферативными агентами, и связывается с ДНК, ковалентно модифицированной данными агентами; клеточный ответ, вызываемый аддуктами GAPDH с такой ДНК, может приводить к апоптозу раковых клеток [171]. Еще одна проапоптотическая роль GAPDH заключается в том, что она стабилизирует обычно короткоживущую E3 убиквитин-лигазу Siah1. Нитрозилирование каталитического Cys150 активного центра GAPDH крысы (у человека ему соответствует Cys152) приводит к ее связыванию с Siah1, обладающей сигналом ядерной локализации. Образовавшийся комплекс попадает в ядро, где Siah1 выполняет проапоптотические функции, способствуя протеолитическому расщеплению своих субстратов [151]. Были обнаружены факторы, препятствующие связыванию GAPDH с Siah1 и перемещению GAPDH в ядро. Так, белок GOSPEL (*GAPDH's competitor Of Siah Protein Enhances Life*) в нитрозилированной форме конкурирует с Siah1 за связывание с GAPDH [172]. Интересно, что глицеральдегид-3-фосфат в физиологической концентрации предотвращает нитрозилирование GAPDH [173]. Таким образом, снижение концентрации глицеральдегид-3-фосфата в клетке в неблагоприятных условиях может способствовать связыванию GAPDH с Siah1 и запуску апоптоза. GAPDH в ядре ацетируется по Lys160

белковым комплексом ацетилтрансфераза p300/CREB-связывающий белок (CBP), что, в свою очередь, стимулирует ацетилирование и каталитическую активность p300/CBP. В результате этого происходит активация дальнейших участников каскада, таких как p53, что приводит к клеточной гибели [174].

Интересно, что антиапоптотические соединения, такие как производные (-)-депренила, действие которых основано на их связывании с GAPDH, способствовали ее диссоциации до димерной формы [175].

1.3.1.6 Роль GAPDH в транскрипции

В нескольких работах было установлено, что GAPDH участвует в транскрипции генов, вовлеченных в антиапоптотические пути и клеточную пролиферацию, непосредственно взаимодействуя с ДНК и/или белками [176–178]. GAPDH взаимодействует с РНК-полимеразой II [179, 180] и белком промиелоидной лейкемии (PML), формирующим тельца в местах активной транскрипции [181]. Показано, что GAPDH вместе с лактатдегидрогеназой входит в состав OCA-S — комплекса из 7 белков, являющегося коактиватором транскрипционного фактора Oct-1, который связывается с одним из регуляторных элементов гена гистона H2B и активирует его транскрипцию в S-фазе [176]. При этом GAPDH взаимодействует непосредственно с белком Oct-1 и, вероятно, играет главную роль в комплексе OCA-S. Интересно, что NAD^+ стимулирует, а NADH ингибирует связывание GAPDH с Oct-1 (тогда как и NAD^+ , и NADH ингибируют связывание GAPDH с ДНК [161]). Кроме того, GAPDH взаимодействует с онкогенным транскрипционным фактором hTAF_{II}68-TEC (химерным белком, экспрессирующимся в раковых клетках вследствие хромосомной транслокации), стимулируя его активность [177]. GAPDH активирует андрогеновый рецептор, являющийся транскрипционным фактором для генов, участвующих в пролиферации и дифференцировке нормальных и раковых клеток простаты: она образует с ним комплекс в цитоплазме, который затем может перемещаться в ядро [178]. Кроме того, GAPDH, окисленная перекисью водорода, взаимодействует с комплексом белков p54nrb (54-кДа ядерный РНК-связывающий белок) и PSF (фактор сплайсинга, ассоциированный с белком, связывающимся с полипиримидиновыми трактами). Оба этих белка имеют ДНК- и РНК-связывающие домены и участвуют в процессинге РНК, регуляции транскрипции и расплетании ДНК. Комплекс белков p54nrb, PSF и GAPDH, формирующийся в клетках под действием перекиси водорода, повышает активность топоизомеразы I; таким образом, данный комплекс может способствовать транскрипции и репликации, поскольку топоизомераза I релаксирует суперскрученную ДНК [158]. В то же время, GAPDH связывается с оц ДНК с

большим сродством, чем ДНК-полимераза α , исходя из чего можно предположить, что GAPDH, находящаяся в ядре, препятствует репликации [143].

1.3.1.7 Роль GAPDH в регуляции длины теломер

Учитывая способность GAPDH эффективно взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами, можно предполагать ее участие в регуляции длины теломер. В частности, в работе [182] наблюдалось быстрое укорочение теломерной ДНК после обработки клеток A549 С6-керамидом, и при поиске белков, ассоциированных с этим процессом, было установлено, что GAPDH связана с регуляцией длины теломерной ДНК. Физиологическая роль GAPDH в поддержании/защите теломерной ДНК была подтверждена тем, что частичное подавление синтеза GAPDH в клетках с использованием siРНК приводило к быстрому укорочению теломер и, напротив, избыточная экспрессия GAPDH предотвращала деградацию теломер, индуцированную керамидом [182]. Защитная функция GAPDH была продемонстрирована в случае укорочения теломер, вызванного химиотерапевтическими препаратами — гемцитабином и доксорубицином [162]. При воздействии препаратов на клетки, экспрессирующие GAPDH дикого типа, она перемещалась в ядро и, связываясь с теломерной ДНК, защищала ее от деградации. При этом экспрессия мутантных форм GAPDH (D32A и C149A), которые также перемещались в ядро, но не обладали способностью связывать ДНК, не оказывала защитного эффекта.

С другой стороны, GAPDH может ограничивать удлинение теломер: взаимодействуя с теломеразной РНК, она ингибирует активность теломеразы, что приводит к укорочению теломерных повторов и старению раковых клеток [183].

Наконец, несколько работ посвящено взаимодействию GAPDH с различными повреждениями ДНК [184–186] и аддуктами, образующимися при воздействии на ДНК реагентов, алкилирующих основания по положениям, экспонированным в малую бороздку [171, 187].

1.3.2. Взаимодействие GAPDH с повреждениями ДНК

1.3.2.1 Предполагаемая урацил-ДНК-гликозилазная активность GAPDH

Урацил является одним из наиболее распространенных повреждений геномной ДНК. Урацил в ДНК обычно возникает в результате дезаминирования цитозина, которое может происходить спонтанно или под действием цитидиндезаминазы (например, в В-клетках при переключении изотипов иммуноглобулинов). Урацил-ДНК-гликозилазы (UDG) удаляют остатки урацила из ДНК, в результате чего образуются AP-сайты. В

1990-х гг. было опубликовано множество работ, посвященных поиску ДНК-гликозилаз человека. Определив последовательность предполагаемой кДНК UDG из плаценты человека, авторы одной из таких работ утверждали, что она идентична последовательности GAPDH [184]. Meyer-Siegler et al. проводили электрофоретическое разделение нативной тетрамерной формы GAPDH человека в денатурирующих условиях и путем элюции из геля получали мономер GAPDH с мол. массой 37 кДа. Данный мономер проявлял UDG-активность, как и белок, полученный в *E. coli* путем трансформации клеток плазмидой, содержащей кДНК “UDG” из плаценты [184]. В другой работе также была показана UDG-активность GAPDH человека, при этом она составляла 50% от активности UDG *E. coli* [188]. Однако роль данной функции GAPDH *in vivo* так и не была выяснена. Следует отметить, что в вышеупомянутых работах признаком UDG-активности GAPDH служило накопление меченых остатков урацила в кислото-растворимой форме при инкубации белка с поли(dA•[³H]dU), получение которого описано в работе [189].

В работе других авторов способность GAPDH из эритроцитов человека выщеплять остатки урацила из ДНК была проверена с использованием того же субстрата, однако ни нативная GAPDH, ни GAPDH, элюированная из геля после электрофореза в системе Лэммли и обработанная с целью восстановления природной структуры мономера, не проявляли данную активность [190]. Кроме того, GAPDH не связывалась с сорбентом Ugi-сефароза, в отличие от «классических» UDG [190]. Данные об отсутствии UDG-активности у GAPDH, полученные в экспериментах *in vitro*, согласуются с тем, что накопление GAPDH в ядре при апоптозе приводит не к увеличению, а к снижению UDG-активности [168]. Интересно, что в недавней работе UDG-активность была обнаружена в препарате GAPDH *E. coli*, однако авторы доказали, что данная активность обусловлена примесью бактериальной UDG [191] (см. разд. 1.3.4. «Бактериальная GAPDH»). Таким образом, UDG-активность GAPDH человека, описанная в работе [184] и последующих работах данной лаборатории, вероятно, не принадлежит GAPDH, а обусловлена наличием в ее препарате примесей урацил-ДНК-гликозилаз вследствие недостаточной очистки.

1.3.2.2 Роль GAPDH в узнавании аналогов нуклеотидов в ДНК

Противораковая терапия включает использование структурных аналогов азотистых оснований и нуклеозидов, являющихся субстратами в процессе клеточного метаболизма. Такими антиметаболитами являются аналоги пуринов, 5-фторурацил и цитозин-арабинозид. Когда такие соединения включаются в ДНК или РНК, они нарушают структуру и функции нуклеиновой кислоты, что приводит к гибели опухолевых клеток. Данные повреждения могут распознаваться различными системами репарации ДНК. В

работе [185] было показано, что клеточная линия лимфобластической лейкемии, в которой подавлена экспрессия гена белка MutS α , участвующего в репарации ошибочно спаренных оснований, устойчива к воздействию меркаптопурина. Было установлено, что белки ядерного экстракта формируют с ДНК-дуплексом, содержащим дезокситиогуанозин, комплекс, участвующий в репарации таких повреждений по пути, независимому от репарации ошибочно спаренных оснований. GAPDH была идентифицирована как один из 4–5 мажорных белков данного комплекса. Также было показано перемещение GAPDH в ядро после обработки клеток меркаптопурином.

В последующей работе [186] с помощью масс-спектрометрии были идентифицированы пять мажорных белков в составе комплекса: HMGB1 и HMGB2, HSC70 (белок, родственной белкам теплового шока), ERp60 (дисульфидизомераза) и GAPDH. Использование антител против GAPDH предотвращало образование комплекса. Белки ядерного экстракта формировали аналогичный комплекс с ДНК-дуплексами, содержащими цитозинарабинозид и 5-фторурацил.

Формирование белкового комплекса, распознающего синтетические нуклеотиды в ДНК, сопровождается перемещением GAPDH в ядро. Однако роль комплекса из пяти белков в клеточном ответе на включение структурных аналогов нуклеотидов в ДНК не была определена. Показано, что клетки переходят в состояние апоптоза спустя 24 ч после обработки меркаптопурином, следовательно, данный белковый комплекс может быть задействован на начальном этапе клеточного ответа, который является первым шагом к программируемой клеточной смерти.

Также GAPDH способна связываться с ковалентными аддуктами ДНК с QAD — производным алкилирующего агента сафрамицина А, который является противоопухолевым препаратом [171]. При обработке опухолевых клеток данным агентом происходило перемещение GAPDH в ядро. Подавление экспрессии GAPDH в клетках с помощью siРНК вызывало лекарственную устойчивость. Возможно, GAPDH участвует в цитотоксическом действии QAD.

Lenglet et al. установили, что GAPDH связывается с оц, дц и теломерными последовательностями ДНК, алкилированными производным бензоакриона S23906-1 [187]. Данный реагент, проявляющий цитотоксический потенциал *in vitro* и противоопухолевую активность *in vivo*, связывается с аминогруппой гуанина в малой бороздке двойной спирали ДНК, что приводит к локальному плавлению спирали и дц разрывам. Показано, что взаимодействие является сиквенс-специфичным, и определены последовательности, с которыми GAPDH связывается предпочтительно. На

клеточном уровне алкилирование S23906-1 вызывало повышение уровня связывания GAPDH и HMGB1 с хроматином.

Кроме того, GAPDH способна образовывать сшивки с ДНК за счет нуклеофильных SH-групп Cys152 и Cys246 под действием бифункциональных электрофильных реагентов, таких как 1,2-дибромэтан и диэпоксидбутан (продукт окисления бутадиена). Оба соединения используются в промышленности и являются мутагенами и канцерогенами. Однако повышенная экспрессия GAPDH, в отличие, например, от Об-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазы (AGT), не приводит к повышению уровня мутаций под действием диэпоксидбутана. Возможно, это объясняется тем, что GAPDH связывается с ДНК менее эффективно, чем AGT [192].

1.3.3. Взаимодействие GAPDH с ферментами репарации

Разными исследователями было показано *in vitro* и *in vivo*, что GAPDH человека способна взаимодействовать не только с повреждениями ДНК, но и с некоторыми ферментами репарации: APE1 и PARP1. Кроме того, недавно обнаружено взаимодействие GAPDH *E. coli* с урацил-ДНК-гликозилазой и одной из AP-эндонуклеаз.

1.3.3.1 APE1

APE1 — основной фермент, инициирующий расщепление AP-сайтов в процессе их репарации в клетках млекопитающих, — существует в двух формах: окисленной и восстановленной. APE1 в восстановленной форме способна не только выполнять основную функцию, но и активировать транскрипционные факторы, такие как p53, NF-κB, c-Jun и c-Fos. При этом формирование окисленной формы происходит *in vivo* на физиологически значимом уровне. Azam et al. обнаружили Mg²⁺-независимую AP-эндонуклеазную активность в экстрактах клеток фибробластов человека, выделили белок, проявляющий данную активность, и идентифицировали его как GAPDH [193]. Предположив, что эта активность обусловлена соочищением APE1 с GAPDH, авторы показали связывание данных белков друг с другом с помощью аффинной хроматографии и иммунопреципитации. Затем было показано, что GAPDH может катализировать восстановление окисленной формы APE1, что приводит к восстановлению AP-эндонуклеазной активности APE1 после ее окисления перекисью водорода. Мутантные формы GAPDH C152G и C156G связывались с APE1, но не активировали ее. Интересно, что при добавлении GAPDH в реакционную смесь APE1 приобретала способность катализировать гидролиз AP-сайтов даже в отсутствие ионов Mg²⁺. Доказательством физиологической значимости данной активности GAPDH авторы работы считают

чувствительность клеток с подавленной экспрессией GAPDH к метилметансульфонату и блеомицину. Данные агенты вызывают повреждения оснований ДНК, после чего в результате гидролиза *N*-гликозидной связи (спонтанного или индуцированного ДНК-гликозилазами) формируются AP-сайты. Для снижения уровня экспрессии GAPDH клетки обрабатывали siРНК, комплементарной последовательности гена GAPDH, в результате чего наблюдали повышенный уровень AP-сайтов, вызванный снижением активности APE1. Авторы приходят к выводу, что изменение уровня GAPDH в клетке влияет на способность APE1 осуществлять репарацию AP-сайтов [193].

До недавнего времени вышеупомянутая работа, опубликованная в 2008 г., являлась единственной, где было показано взаимодействие GAPDH и APE1. Однако в 2017 г. была опубликована работа, в которой взаимодействие данных белков было подробно исследовано *in vitro* и *in vivo* [194]. В данной работе было установлено, что после обработки перекисью водорода в клетках с подавленной с помощью siРНК экспрессией GAPDH значительно увеличивалось количество AP-сайтов и наблюдался повышенный по сравнению с контролем уровень апоптоза, тогда как в клетках с повышенной экспрессией GAPDH количество AP-сайтов и уровень апоптоза лишь незначительно повышались. В то же время, подавление экспрессии APE1 с помощью siРНК в клетках с повышенной экспрессией GAPDH приводило к повышению количества AP-сайтов и уровня апоптоза. Также с помощью иммунопреципитации было показано, что GAPDH связывается с APE1 после инкубации эквимольного количества данных очищенных белков в присутствии H₂O₂. Связывание GAPDH с APE1 было подтверждено методами иммуноферментного анализа ELISA и плазмонного резонанса. С использованием последнего метода также было установлено, что после окисления GAPDH с помощью H₂O₂ эффективность ее связывания с APE1 снижалась. Основываясь на этом, авторы работы предположили, что в связывании GAPDH с APE1 важную роль играют остатки цистеина GAPDH. Это предположение было подтверждено тем, что предынкубация GAPDH с конингиновой кислотой (ингибитор GAPDH, связывающийся с остатками цистеина в ее активном центре) или соединением Alexa Fluor488-малеимид, связывающимся с тиольными группами, приводила к снижению ее способности связываться с APE1. Кроме того, связывание GAPDH с APE1 было показано с помощью иммунопреципитации белков цельноклеточных экстрактов. Также с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии было установлено, что данные белки колокализуются в ядрах клеток гладкой мускулатуры, что может свидетельствовать об их связывании друг с другом, причем после обработки клеток H₂O₂ уровень колокализации GAPDH с APE1 снижается. Предынкубация клеток с конингиновой кислотой приводила к значительному повышению

уровня апоптоза, индуцированного H_2O_2 . Поскольку метод TUNEL, использованный в данной работе для определения уровня апоптоза, основан на измерении количества образующихся разрывов ДНК, авторы работы предположили, что блокирование остатков цистеина в GAPDH приводит к накоплению повреждений в ДНК. Затем был исследован уровень расщепления остатков 3-гидрокси-2-гидроксиметилтетрагидрофурана (THF) в составе олигонуклеотидного субстрата в клеточных экстрактах. THF широко применяется в исследованиях репарации как миметик AP-сайтов, являющийся субстратом APE1. Было установлено, что уровень расщепления субстрата, содержащего THF, белками ядерного экстракта, полученного из клеток дикого типа, в 2,6 раз ниже, чем при использовании ядерного экстракта, полученного из клеток с повышенной экспрессией GAPDH, причем в первом случае после обработки клеток H_2O_2 уровень расщепления падает на 60%, а во втором — остается прежним. Из этого авторы работы делают вывод, что GAPDH активирует APE1. Однако поскольку в данной работе не было изучено влияние очищенной GAPDH на расщепление AP-сайтов очищенной APE1, активацию этого фермента под действием GAPDH нельзя считать полностью доказанной.

В клетках с повышенной экспрессией GAPDH содержание APE1 было повышено в 2,7 раз по сравнению с клетками дикого типа, а содержание мРНК APE1 — в 7 раз. Кроме того, в клетках с повышенной экспрессией GAPDH наблюдалось повышенное содержание транскрипционного фактора NOXA5 и его мРНК. После подавления экспрессии GAPDH с помощью siРНК в клетках также снижался уровень NOXA5, а после аналогичного подавления экспрессии NOXA5 снижался уровень APE1. Авторы работы приходят к выводу, что активация экспрессии APE1 в клетках с повышенной экспрессией GAPDH опосредована транскрипционным фактором NOXA5. Наконец, в данной работе было показано, что гладкомышечные клетки атеросклеротических бляшек, где наблюдается повышенный уровень окислительного стресса и апоптоза, характеризуются пониженным содержанием GAPDH. Авторы приходят к заключению, что взаимодействуя с APE1, GAPDH способствует сохранению ее активности, что приводит к понижению уровня повреждений ДНК и способствует предотвращению апоптоза [194].

1.3.3.2 PARP1

В нескольких работах показано взаимодействие GAPDH с PARP1 — высококопийным полифункциональным ядерным белком высших эукариот, который, связываясь с оц и дц разрывами в ДНК, активируется и катализирует синтез из NAD^+ поли(ADP-рибозы) — разветвленного отрицательно заряженного полимера, который ковалентно присоединяется к ряду белков, участвующих в метаболизме ДНК, в том числе

к самой PARP1 [195]. В экспериментах с использованием лизатов клеток эндотелия аорты было обнаружено, что гликолитическая активность GAPDH снижается при гипергликемии, приводящей к повышению уровня образования супероксида в митохондриальной цепи переноса электронов. С помощью вестерн-блоттинга было установлено, что ингибирование активности GAPDH в клетках является следствием ее поли(ADP-рибозил)ирования, катализируемого PARP1, которая активируется в ответ на разрывы ДНК, появляющиеся под действием супероксида; при этом около 60% поли(ADP-рибозил)ированной GAPDH было обнаружено в ядерной фракции [196]. Другие авторы показали, что при ишемическом поражении почек у мышей наблюдается снижение гликолитической активности GAPDH в клетках данной ткани, причем эффект более выражен у животных дикого типа, чем у нокаутных по гену *parp1*. Как и в предыдущей работе, с помощью вестерн-блоттинга белков клеточных лизатов было установлено, что в условиях гипоксии GAPDH подвергается поли(ADP-рибозил)ированию. С использованием очищенных белков было показано, что активированная PARP1 (PARP1 + активированная ДНК) в присутствии NAD^+ ингибирует гликолитическую активность GAPDH; при этом наблюдается поли(ADP-рибозил)ирование PARP1 и GAPDH. В присутствии ингибитора PARP1 активность GAPDH восстанавливалась [197]. Аналогичные результаты были получены в другой работе на мышинной модели диабета II типа [198], где ингибирование PARP1 приводило к увеличению активности GAPDH, препятствуя ее перемещению в ядро и поли(ADP-рибозил)ированию. Кроме того, с помощью флуоресцентной микроскопии было показано, что в условиях гипоксии в ядре детектируются GAPDH и поли(ADP-рибоза), которые в значительной степени колокализуются, то есть GAPDH в ядре, по-видимому, поли(ADP-рибозил)ирована [198]. Однако неизвестно, что в данном случае первично: перемещение GAPDH в ядро или ее поли(ADP-рибозил)ирование. В пользу первого варианта говорит то, что PARP1 активируется в присутствии поврежденной ДНК — в таком случае поли(ADP-рибозил)ирование GAPDH должно происходить в ядре. Nakajima et al. идентифицировали PARP1 с помощью масс-спектрометрии при поиске ядерных белков, связывающихся с GAPDH в клетках нейробластомы в присутствии оксида азота (NO) [199]. Данный реагент приводит к модификации каталитического Cys152 GAPDH и способствует ее перемещению в ядро [151]. Связывание GAPDH и PARP1 наблюдали также в экспериментах с использованием очищенных белков. С помощью мутагенеза были определены домены, критически важные для данного взаимодействия: короткий С-концевой участок PARP1 и N-концевой участок GAPDH длиной ~ 20 а.о., содержащий высококонсервативный мотив GXGXXG; при

замене Gly10 и Gly12 на остатки аланина GAPDH утрачивала способность связываться с PARP1. Было показано, что GAPDH активирует PARP1, но при этом не является ее субстратом [199] (что противоречит данным, опубликованным в работах [196] и [197]). Связывание GAPDH с PARP1 и активация последней также были обнаружены *in vivo* в клетках стриатума крыс с нарушением мозгового кровообращения; подавление экспрессии GAPDH с помощью siРНК и ее замена на экзогенную мутантную форму G10A приводили к уменьшению объема зоны с нарушенным кровообращением [199]. Возможность специфичного связывания N-концевого участка GAPDH с C-концевым участком PARP1 была подтверждена с помощью модели данного взаимодействия, созданной методом молекулярного докинга. Авторы высказывают предположение о том, что для избыточной активации PARP1, запускающей клеточную смерть, необходимы не только разрывы ДНК, но и связывание с ядерной GAPDH [199].

1.3.4. Бактериальная GAPDH

Дополнительные функции GAPDH достаточно подробно изучены на примере фермента млекопитающих (человека, кролика или мыши), и лишь небольшое число работ посвящено дополнительным функциям GAPDH других организмов: бактерий [191, 200], дрожжей [201] и растений [202]. Так, недавно при поиске белков, взаимодействующих с GAPDH *E. coli*, была идентифицирована фосфогликолатфосфатаза — фермент, участвующий в метаболизме 2-фосфогликолата. Данный продукт формируется при репарации 3'-фосфогликолата на концах оц разрывов, появляющихся при спонтанном расщеплении AP-сайтов, которые возникают в ДНК под действием блеомицина. При обработке клеток блеомицином взаимодействие GAPDH с фосфогликолатфосфатазой усиливалось [200]. В последующей работе данных авторов была показана повышенная чувствительность клеток *E. coli*, нокаутных по гену *gapA*, кодирующему GAPDH (или с подавленной экспрессией этого гена), к блеомицину и метилметансульфонату (как и в работе [193]), но не к перекиси водорода, которая вызывает окисление каталитического остатка цистеина GAPDH [191]; это может указывать на то, что в репарации участвует восстановленная форма GAPDH. При воздействии блеомицина и метилметансульфоната на клетки, нокаутные по гену *gapA*, в них наблюдали повышенное содержание повреждений в ДНК по сравнению с контрольными клетками и активацию SOS-ответа (приостановку клеточного деления и филаментарный рост). Кроме того, в таких клетках уровень спонтанного возникновения AP-сайтов был повышен в 1,5 раза, а частота мутаций (появление устойчивости к рифампицину) — в 4,7 раза. Затем с помощью аффинной хроматографии с использованием сорбента Ni-NTA и экстрактов клеток, в

которых различные белки репарации содержали His-тег, было показано, что GAPDH связывается с AP-эндонуклеазой Endo IV и белком SSB; однако при этом не наблюдали связывание GAPDH с такими белками, как AP-эндонуклеаза Eho III (гомолог APE1 человека), ДНК-гликозилазы Tag и AlkA, участвующие в репарации алкилированных пуринов, а также ферменты Ada и Ogt, участвующие в прямой репарации Об-метилгуанина. Кроме того, авторы данной работы обнаружили, что выделенная ими GAPDH способна выщеплять урацил из ДНК-дуплекса, и предположили, что эта активность может быть обусловлена примесью UDG в препарате. Данное предположение было подтверждено тем, что UDG-активность препарата GAPDH исчезала в присутствии белка Ugi *Bacillus subtilis* (специфичный ингибитор UDG разных организмов), а также тем, что GAPDH, выделенная из штамма *E. coli*, нокаутного по гену *ung*, не обладала UDG-активностью. Также с помощью аффинной хроматографии было показано взаимодействие GAPDH с UDG, несущей His-тег [191]. Возможно, GAPDH входит в состав белковых комплексов эксцизионной репарации оснований *E. coli*, являясь основой для их сборки или регулируя активность других белков. Взаимодействуя с белком SSB, связывающимся с протяженными оц участками ДНК, GAPDH также может привлекать к месту повреждения белки других систем репарации, таких как гомологичная рекомбинация.

Заключение

Таким образом, к настоящему времени показано, что большое количество белков способно взаимодействовать с AP-сайтами в ДНК, и многие из них играют роль в репарации данных повреждений [12]. Зачастую такие белки проявляют специфичность к типу ДНК, в составе которой находится AP-сайт, поэтому, варьируя структуры AP-ДНК, используемые для сшивки белков клеточных экстрактов, можно обнаружить и идентифицировать ранее неизвестные белки-участники репарации AP-сайтов.

Разными авторами показано, что Ku-антиген, многофункциональный белок, играющий ключевую роль в репарации дц разрывов по пути НГСК, участвует также в репарации AP-сайтов, но механизм этого взаимодействия изучен далеко не полностью. С одной стороны, Ku может связываться с AP-сайтами в дц ДНК и защищать их от расщепления другими белками [14]. С другой стороны, Ku расщепляет AP-сайты, находящиеся на выступающих оц концах ДНК-дуплекса, если они мешают лигированию дц разрывов в ходе НГСК [11, 115]. Однако AP-лиазная активность Ku, вероятно, не ограничивается вышеописанным случаем, поэтому представляется важным детально изучить взаимодействие этого белка с AP-сайтами в составе других ДНК-структур, имитирующих различные кластерные повреждения, например, в дц ДНК, окруженной

длинными оц участками. Необходимо выяснить, влияет ли положение AP-сайта в такой ДНК и основание напротив него на эффективность сшивки с ним Ku и катализируемого им расщепления. Кроме того, предстоит установить, способен ли Ku инициировать альтернативный (независимый от APE1) путь репарации AP-сайтов.

Фермент гликолиза GAPDH, как и Ku, обладает множеством дополнительных функций, и разные авторы часто обнаруживают ранее неизвестные функции данного белка, многие из которых предполагают его взаимодействие с нуклеиновыми кислотами. Некоторыми исследователями было показано перемещение мономера или димера GAPDH в ядро в стрессовых условиях, однако механизм этого явления еще не до конца изучен. В нескольких работах обнаружено участие GAPDH в процессах репарации: непосредственное или в качестве модулирующего фактора. Однако такие исследования немногочисленны и иногда противоречат друг другу, поэтому основанные на них выводы о том, какую роль («положительную» или «отрицательную») GAPDH играет в репарации, неоднозначны. Так, в нескольких работах показано, что GAPDH может способствовать репарации, проявляя UDG-активность [184], активируя окисленную APE1 [193, 194] и участвуя в распознавании некоторых повреждений ДНК [185, 186]. Предполагаемое связывание GAPDH с APE1 и ее неподтвержденная UDG-активность, вероятно, обусловленная соочищением GAPDH с UDG при хроматографии вследствие их взаимодействия друг с другом, наводят на мысль о том, что GAPDH может быть основой для сборки комплекса белков эксцизионной репарации оснований. Подобное предположение было высказано авторами работы, в которой показано взаимодействие GAPDH *E. coli* с UDG и AP-эндонуклеазой [191].

В то же время, некоторые работы свидетельствуют в пользу того, что GAPDH блокирует репарацию. Так, GAPDH связывается также с ковалентными аддуктами ДНК с алкилирующими агентами, участвуя в их цитотоксическом действии [171, 187]. Кроме того, активация некоторых белков (Siah1 [151], PARP1 [199]), вызванная их взаимодействием с GAPDH в ядре, приводит к клеточной гибели. В нескольких работах было показано поли(ADP-рибозил)ирование, подавляющее гликолитическую активность GAPDH [196–198], однако в более позднем исследовании факт данной модификации не был подтвержден [199].

Поскольку данные об UDG-активности GAPDH были опубликованы достаточно давно всего в нескольких работах одной лаборатории, необходимо убедительно подтвердить или опровергнуть наличие данной активности у GAPDH. Также предстоит установить, способна ли GAPDH взаимодействовать с какими-либо повреждениями ДНК

помимо вышеназванных. Кроме того, требуется более подробная характеристика взаимодействий GAPDH с ферментами репарации, такими как APE1 и PARP1.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Материалы

2.1.1. Общие материалы

В работе использовали 2-амино-2-(гидроксиэтил)-1,3-пропандиол (Трис), N,N'-метиленабисакриламид, мочевины ("Amresco", США); акриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), Tween 20 ("Helicon", Россия); этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), дитиотреитол (DTT), *трис*(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР), метоксиамин, кумасси R-250, глицерин ("Sigma", США); персульфат аммония ("Merck", Германия); формамид, 2-меркаптоэтанол (β -мкэ), бромфеноловый синий, ксиленианол, додецилсульфат натрия (SDS), детергент NP-40, MgCl₂, NaBH₄ ("Fluka", Швейцария); маркеры молекулярной массы белков "Precision Plus Dual Color Protein Standards" ("Bio-Rad", США); смесь ингибиторов протеаз в таблетках "Complete mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail" ("Roche", Германия); парамагнитный сорбент с иммобилизованным стрептавидином "Streptavidin MagneSphere" ("Promega", США); DEAE-бумага DE-81 ("Whatman", Великобритания); Zip-Tip наконечники, содержащие обращеннофазовый сорбент C₁₈ ("Millipore", США); нитроцеллюлозную мембрану "Hybond-ECL" ("Amersham Biosciences", Германия); субстраты пероксидазы хрена "SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate" и "Pierce ECL Western Blotting substrate" ("Thermo Scientific", США); [γ -³²P]АТФ (5000 Ки/ммоль) и [α -³²P]дАТФ (3000 Ки/ммоль) (Лаборатория биотехнологии ИХБФМ СО РАН); [³²P]-меченый NAD⁺ (любезно предоставлен М.М. Кутузовым, ИХБФМ СО РАН); активированную ДНК тимуса теленка (2 о.е.₂₆₀/мл, степень активации 25%) (Лаборатория биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН); остальные реактивы и растворители квалификации х.ч. и ос.ч. отечественного производства.

2.1.2. Стандартные буферы и смеси

В работе были использованы следующие стандартные буферы и смеси, далее приводящиеся без расшифровки состава:

TBE	90 мМ Трис, 90 мМ борная кислота, 2 мМ ЭДТА
TE	10 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 1 мМ ЭДТА
TBS	50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 150 мМ NaCl
TBST	50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 150 мМ NaCl, 0,1%-ный Tween 20

2.1.3. Хроматографические сорбенты и колонки

Для очистки олигодезоксирибонуклеотидов (ОДН) после введения радиоактивной метки использовали «спин-колонки» сефадекс G-25 (“GE Healthcare”, США). При фракционировании экстрактов клеток HeLa и HEK293 и при выделении Ku и GAPDH из данных экстрактов использовали оцДНК-целлюлозу (“USB”, США), дц ДНК-целлюлозу (“ICN”, США), Q-сефарозу, SP-сефарозу и гепарин-сефарозу, сефакрил S200, (“GE Healthcare”, США), “Biogel HTP” и “DEAE Support” (“Bio-Rad”, США).

2.1.4. Ферменты, белковые факторы и клеточные линии

В работе были использованы рекомбинантные урацил-ДНК-гликозилаза *E. coli* (Ung), полинуклеотидкиназа (ПНК) и ДНК-лигаза бактериофага T4 (“Биосан”, Россия), бычий сывороточный альбумин (BSA) (“Bio-Rad”, США), трипсин – Sequencing Grade Modified (“Promega”, США). Рекомбинантные Pol β и APE1 человека были любезно предоставлены С.Н. Ходыревой (ИХБФМ СО РАН). Рекомбинантный PARP1 был любезно предоставлен М.В. Сухановой (ИХБФМ СО РАН). Рекомбинантные эндонуклеаза III *E. coli* (Endo III), TDP1 и PNKP человека были любезно предоставлены Н.А. Лебедевой (ИХБФМ СО РАН). GAPDH из мышц кролика была любезно предоставлена В.И. Муронцом (НИИ физико-химической биологии им. Белозерского МГУ).

Клетки HEK293, Jurkat, MCF-7, VJAB, Im9, SiHa и C33A были любезно предоставлены Е.С. Ильиной (ИХБФМ СО РАН). Клетки HeLa культивировали в среде DMEM (“Biolot”, Россия) в присутствии 10%-ной FBS (“HyClone”, США), 100 ед. акт./мл пенициллина (“Invitrogen”, США) и 100 мкг/мл стрептомицина (“Invitrogen”, США) во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. После образования монослоя чашки Петри с клетками промывали буфером PBS и собирали клетки путем обработки чашек раствором трипсин/версен (1:1) (“HyClone”, США), центрифугировали клетки и промывали их буфером PBS, после чего еще раз центрифугировали. Приготовление цельноклеточного экстракта описано ниже (разд. 2.2.3.). Определение количества белка в экстрактах проводили по методу Бредфорд [203]. В качестве белка для построения калибровочной кривой использовали BSA.

Ku выделяли из экстракта клеток HeLa путём фракционирования сульфатом аммония (фракция 45–65% от насыщения) и последовательных хроматографий с использованием сорбентов “DEAE Support” (“Bio-Rad”, США), Q-сефароза (“GE Healthcare”, США) и дц ДНК-целлюлоза (“ICN”, США). GAPDH выделяли из экстракта клеток HeLa путём фракционирования сульфатом аммония в (фракция 66–88% от

насыщения) и последовательных хроматографий с использованием сорбентов гепарин-сефароза, SP-сефароза, сефакрил S200 (“GE Healthcare”, США) и “Biogel НТР” (“Bio-Rad”, США).

2.1.5. Антитела

В работе использовали моноклональные мышинные антитела к GAPDH человека (GAPDH (0411)) (“Santa Cruz Biotechnology”, США) и кроличьи антитела к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (“Биосан”, Россия).

2.1.6. Олигодезоксинуклеотиды

Олигодезоксинуклеотиды (ОДН) были синтезированы в Лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН (табл. 2.1). Число в скобках в названии ОДН отражает положение остатка урацила с 5'-конца. В названии ОДН Template число соответствует длине ОДН, буква — основанию, которое в дуплексе данного ОДН с урацил-содержащим ОДН будет находиться напротив остатка урацила. Дуплексы U(16) с Template 32X для краткости обозначаются далее как BE-ДНК или 32X (в случае, когда необходимо указать основание напротив AP-сайта), а дуплексы U(16) с Template 16X — как DDE-ДНК или 16X.

Табл. 2.1. Последовательности ОДН, использованных в данной работе.

Жирным выделены остатки урацила в ОДН с флуоресцентной меткой и в ОДН, в которые вводили радиоактивную метку, а также основания в комплементарных ОДН (Template), которые в получаемых дуплексах находились напротив остатков урацила.

Название	Последовательность
U(16)	5'-GGCGATTAAGTTGGG U AACGTCAGGGTCTTCC-3'
Flu-U(16)	(5, 6-FAM)-5'-GGCGATTAAGTTGGG U AACGTCAGGGTCTTCC-3'
Flu-U(16)-bio	(5, 6-FAM)-5'-GGCGATTAAGTTGGG U AACGTCAGGGTCTTCC-3'- биотин
bio-U(16)	биотин-5'-GGCGATTAAGTTGGG U AACGTCAGGGTCTTCC-3'
T(16)	5'-GGCGATTAAGTTGGG T AACGTCAGGGTCTTCC-3'
bio-15	биотин-5'-GGCGATTAAGTTGGG-3'
17-U(1)	5'- U AACGTCAGGGTCTTCC-3'
Template for A	5'-TGGAAGACCCTGACGTTACCCAA-3'-p
Template 32A	5'-GGAAGACCCTGACGTT A CCCAACTTAATCGCC-3'
Template 32G	5'-GGAAGACCCTGACGTT G CCCAACTTAATCGCC-3'

Template 32T	5'-GGAAGACCCTGACGTT T CCCAACTTAATCGCC-3'
Template 32C	5'-GGAAGACCCTGACGTT C CCCAACTTAATCGCC-3'
Template 22A	5'-ACCCTGACGTT A CCCAACTTAA-3'
Template 16A	5'-CTGACGTT A CCCAACT-3'
Template 16G	5'-CTGACGTT G CCCAACT-3'
Template 16T	5'-CTGACGTT T CCCAACT-3'
Template 16C	5'-CTGACGTT C CCCAACT-3'
U(3)	5'-GG U GACTAAGCCGGGCAACGCCAGGGCCTCCC-3'
U(6)	5'-GGCGA U TAAGCCGGGCAACGCCAGGGCCTCCC-3'
U(11)	5'-GGCGACTAAG U CGGGCAACGCCAGGGCCTCCC-3'
U(12)	5'-GGCGACTAAG C UGGGCAACGCCAGGGCCTCCC-3'
U(16)C	5'-GGCGACTAAGCCGGG U AACGCCAGGGCCTCCC-3'
U(19)	5'-GGCGACTAAGCCGGGCA A UGCCAGGGCCTCCC-3'
U(21)	5'-GGCGACTAAGCCGGGCAACG U CAGGGCCTCCC-3'
U(22)	5'-GGCGACTAAGCCGGGCAACGC U AGGGCCTCCC-3'
U(27)	5'-GGCGACTAAGCCGGGCAACGCCAGGG U CTCCC-3'
U(30)	5'-GGCGACTAAGCCGGGCAACGCCAGGGCCT U CC-3'
Template 16G(G)	5'-CT GGCG TT G CCCC GG CT-3'

2.2. Методы исследования

2.2.1. Гель-электрофорез

2.2.1.1. Электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях

Во всех экспериментах для разделения олигонуклеотидов использовали электрофорез в 20%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) (19%-ный акриламид, 1%-ный N,N'-метиленабисакриламид, 7 М мочевины, 89 мМ Трис, 89 мМ борная кислота и 2 мМ ЭДТА, рН 8,0). Для полимеризации геля добавляли персульфат аммония до конечной концентрации 0,1% и TEMED до конечной концентрации 0,1%. Электрофорез проводили

в вертикально расположенных пластинах размером 25×20×0,1 см в течение 2–3 ч при падении напряжения 50 В/см и стабилизации по напряжению. При проведении электрофореза использовали 1-кратный TBE-буфер. Перед нанесением к образцам, содержащим ДНК с флуоресцентной меткой, добавляли равный объем 100%-ного формамида без маркерного красителя, а к образцам с радиоактивной меткой — равный объем раствора, содержащего 90%-ный формамид, 50 мМ ЭДТА, 0,025%-ный бромфеноловый синий и ксиленцианол, и прогревали при 97 °С в течение 5 мин.

После разделения продуктов реакции в геле флуоресценцию полос определяли сканированием геля с использованием системы “Molecular Imager FX” (“Bio-Rad”, США). Радиоактивность полос определяли радиолуминесцентным сканированием экрана Image Screen K (“Kodak”, США) с помощью “Molecular Imager FX” или “Typhoon FLA 9500” (“GE Healthcare”, США). Результаты обсчитывали с использованием программы “Quantity One” v4.6.3 (“Bio-Rad”).

2.2.1.2. Электрофорез в системе Лэммли

Электрофорез проводили в вертикально расположенных пластинах размером 16×20×0,1 см или 10×12×0,1 см. В качестве разделяющего геля использовали 12%-ный ПААГ (при соотношении акриламида к N,N'-метиленбисакриламиду равном 75:1), содержащий 0,1%-ный SDS и 0,375 М Трис-НСl (рН 8,8). Концентрирующий 5%-ный ПААГ (при соотношении акриламида к N,N'-метиленбисакриламиду равном 75:1) содержал 0,1%-ный SDS и 0,125 М Трис-НСl (рН 6,8). Электродный буфер содержал 0,025 М Трис, 0,192 М глицин и 0,1%-ный SDS. Перед нанесением в пробы добавляли буфер для денатурации белков (1/5 конечного объема смеси), содержащий 5%-ный SDS, 5%-ный β-мкэ, 0,3 М Трис-НСl (рН 6,8), 50%-ный глицерин и 0,01% бромфеноловый синий, и прогревали при 97 °С в течение 15 мин. Электрофорез проводили при силе тока 15 мА до вхождения образца в разделяющий гель и далее при 35 мА до миграции маркерного красителя до нижней границы геля.

После разделения продуктов реакции в геле флуоресценцию или радиоактивность полос определяли, как описано в разд. 2.2.1.1., и окрашивали гель раствором РАМА (коллоидный кумасси R-250) [204], содержащим 0,05%-ный кумасси R-250, 10%-ную уксусную кислоту, 15%-ный этанол и 3%-ный сульфат аммония в течение 30 мин, затем отмывали гель до осветления фона раствором 5%-ной уксусной кислоты в 20%-ном этаноле.

2.2.2. Получение олигонуклеотидных субстратов

2.2.2.1. Получение двухцепочечных ОДН

Для приготовления ДНК-дуплекса меченый и комплементарный ему ОДН смешивали в молярном соотношении 1:1,5 в буфере TE, помещали в микротермостат с температурой 97 °С и медленно охлаждали до комнатной температуры.

2.2.2.2. Введение радиоактивной метки в 5'-конец ОДН и создание ОДН, содержащего радиоактивную метку в середине цепи

Для введения метки в 5'-конец ОДН проводили реакцию кинирования в буфере, содержащем 70 мМ Трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl₂ и 5 мМ DTT. На 1 нмоль ОДН в объеме 25 мкл добавляли 20 ед. акт. ПНК фага T4 и 2 МБк [γ -³²P]АТР и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. В случае, если нужно было провести количественное кинирование (чтобы в дальнейшем использовать фосфорилированный ОДН для получения ОДН, содержащего метку в середине цепи), после этого добавляли «холодный» АТР до концентрации 0,15 мМ и 20 ед. акт. ПНК T4 и инкубировали 30 мин при 37 °С. Затем увеличивали концентрацию АТР до 0,3 мМ, добавляли еще 20 ед. акт. ПНК T4 и инкубировали в течение ночи при 4 °С. Реакцию останавливали прогреванием в течение 10 мин при 60 °С.

Для идентификации белков клеточных экстрактов, взаимодействующих с AP-ДНК, получали ОДН bio-*U(16), содержащий ³²P в середине цепи (рис. 2.1). Для этого смешивали ОДН bio-15, 5'-[³²P]-меченый 17-U(1) и комплементарный им ОДН Template 22A в молярном соотношении 1:1:1,5 в буфере, содержащем 70 мМ Трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl₂ и 5 мМ DTT, и получали ДНК-дуплекс, как описано в разд. 2.2.2.1. Данный дуплекс содержал оц разрыв с гидроксильной группой на 3'-конце и фосфатом на 5'-конце. Для проведения реакции лигирования к смеси, содержащей 25 мкМ ДНК-дуплекс и 1 мМ АТР, добавляли 25 ед. акт. ДНК-лигазы T4 на каждые 10 мкл смеси. Реакцию проводили в течение ночи при 4 °С и затем осуществляли очистку лигированного ОДН с помощью электрофореза в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной (разд. 2.2.2.4.). Выход лигированного ОДН, который определяли путем сравнительного анализа (с помощью электрофореза в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной) аликвот, отобранных из реакционной смеси до и после очистки, составлял 83%.

падении напряжения ≈ 25 В/см с использованием 0,5-кратного TBE-буфера. Олигонуклеотид элюировали с DEAE-бумаги тремя порциями по 25 мкл горячего 3 М раствора LiClO_4 в H_2O , осаждали 10-кратным объемом ацетона и выдерживали при -20°C в течение 3 ч. Осадок отделяли центрифугированием (14500 об./мин, 2 мин), промывали ацетоном, высушивали на воздухе при комнатной температуре и растворяли в TE-буфере.

2.2.2.5. Получение ОДН, содержащих AP-сайты

Для создания AP-ДНК 1–5 мкМ ДНК-дуплексы или оц ОДН, содержащие dUMP, инкубировали в присутствии Ung (5 ед./пмоль ДНК) в 1-кратном TE-буфере. Реакцию удаления урацила проводили в течение 30 мин при 37°C . AP-ДНК получали непосредственно перед использованием. Для проверки образования AP-сайтов в ДНК из реакционной смеси отбирали аликвоту и инкубировали ее при 97°C в течение 2 мин в присутствии 100 мМ NaOH.

2.2.3. Приготовление цельноклеточных экстрактов

Цельноклеточные экстракты готовили согласно [205]. Клетки (1×10^7) суспендировали в 200 мкл буфера, содержащего 10 мМ Трис-HCl (pH 8,0) и 200 мМ NaCl. Добавляли 200 мкл буфера, содержащего 10 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, 40%-ный глицерин, 0,2%-ный NP-40, 2 мМ DTT и ингибиторы протеаз (из расчета 1 таблетка на 5 мл буфера). Затем перемешивали при 4°C в течение 60 мин, и, для удаления клеточных осколков, центрифугировали при 4°C (14000 об./мин, 10 мин). Полученный супернатант, рассматриваемый как клеточный экстракт, хранили в аликвотах при -70°C .

2.2.4. Боргидрид-зависимая сшивка белков с AP-ДНК

Стандартные реакционные смеси для боргидрид-зависимой сшивки (10 мкл) содержали 50 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 50 мМ NaCl, 10 мМ ЭДТА, 5%-ный глицерин, 0,025%-ный NP-40, 0,25 мМ DTT, 500 нМ AP-ДНК, полученную согласно разд. 2.2.2.5 и несущую радиоактивную или флуоресцентную метку, а также очищенный белок (250 нМ Ku или 2,5 мкМ GAPDH) или клеточный экстракт, полученный согласно разд. 2.2.3. (конечная концентрация белков экстракта в реакционной смеси составляла 3 мг/мл). После добавления белков реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение 10 мин, и затем восстанавливали основания Шиффа путём добавления NaBH_4 до конечной концентрации 20 мМ с последующей инкубацией при 0°C в течение 30 мин. Продукты

реакции анализировали с помощью электрофореза в системе Лэммли в 10%- или 12%-ном геле с последующей радиоавтографией или сканированием флуоресценции.

В случае, если предварительно необходимо было восстановить дисульфидную связь в GAPDH, сначала смешивали все компоненты за исключением AP-ДНК и инкубировали на льду в присутствии 2 мМ ТСЕР не менее 30 мин; реакцию сшивки запускали добавлением AP-ДНК.

2.2.5. Идентификация белков клеточных экстрактов, взаимодействующих с AP-ДНК, с помощью MALDI-TOF-MS

2.2.5.1. Препаративная боргидрид-зависимая сшивка

Препаративную боргидрид-зависимую сшивку проводили, как описано в разд. 2.2.4., однако при этом использовали фракционированные экстракты клеток HeLa или HEK293, обогащенные по целевому белку с помощью хроматографии на гепарин-сефарозе (идентификация Ku), хроматографии на SP-сефарозе (первичная идентификация GAPDH) или осаждения сульфатом аммония в диапазоне 66–88% от насыщения (повторная идентификация GAPDH). Еще одна особенность заключалась в том, что белки «сшивали» с AP-ДНК, содержащей биотин; в данном случае меченую цепь получали лигированием ОДН bio-15 и 5'-[³²P]-меченого 17-U(1) (см. табл. 2.1 и разд. 2.2.2.2.), таким образом, что биотин оказывался на 5'-конце, а радиоактивная метка — в середине получающегося ОДН, непосредственно с 5'-стороны от AP-сайта. В таком случае, если искомым белком образует сшивку с 5'-концевым фрагментом AP-ДНК, расщепленной по механизму β-элиминирования, аддукт белок–ДНК будет содержать как биотин, так и радиоактивную метку (как и в случае аддукта, образованного белком с нерасщепленной AP-ДНК) (рис. 2.2).

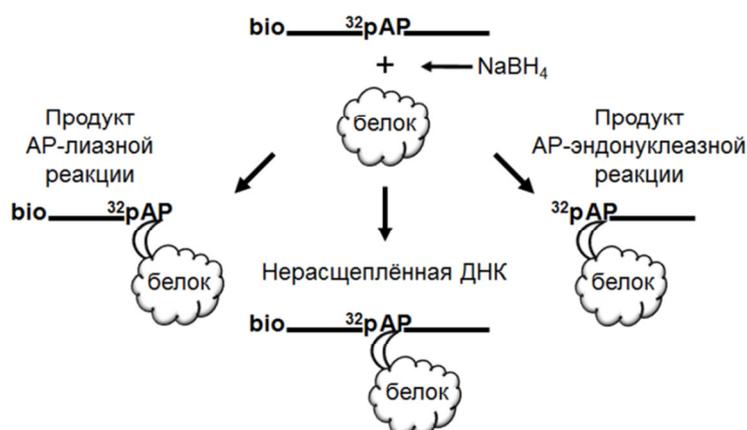


Рис. 2.2. Возможные продукты сшивки белков с ОДН bio-*U(16), содержащим биотин на 5'-конце и радиоактивную метку в середине цепи, непосредственно с 5'-стороны от AP-сайта. Пояснения см. в тексте.

2.2.5.2. Выделение комплексов белок–ДНК с помощью аффинной хроматографии на сорбенте “Streptavidin MagneSphere”

Вначале 170 мкл сорбента “Streptavidin MagneSphere” дважды промывали 250 мкл буфера 1 (75 мМ Трис-НСl (рН 7,5) 75 мМ NaCl). Надосадочную жидкость удаляли, удерживая парамагнитные частицы магнитом. Затем к сорбенту добавляли реакцию смесь объемом 280 мкл (см. разд. 2.2.5.1.) и проводили связывание образца с сорбентом в течение 1 ч при комнатной температуре, постоянно перемешивая реакцию смесь. После этого осуществляли отмывку неспецифически связанных белков, добавляя 6 раз по 250 мкл буфера 2 (75 мМ Трис-НСl (рН 9,4), 2 М NaCl) и 1 раз 250 мкл буфера 1. В каждую порцию буфера для отмывки добавляли по 10 мкл активированной ДНК, которая представляла собой ДНК тимуса теленка, обработанную ДНКазой I (2 о.е.₂₆₀/мл, степень активации 25%), для более эффективного удаления белков, не связанных ковалентно с ДНК. Надосадочную жидкость удаляли, удерживая парамагнитные частицы магнитом. Затем к сорбенту добавляли 20 мкл буфера для денатурации белков, используемого для нанесения образцов в ходе электрофореза в системе Лэммли (разд. 2.2.1.2.), инкубировали в течение 20 мин при 97 °С, после чего добавляли 20 мкл Н₂О и инкубировали еще 20 мин при 97 °С. Ковалентные аддукты и белки, связавшиеся с сорбентом, анализировали с помощью электрофореза в системе Лэммли в 12%-ном ПААГ. При использовании ДНК с флуоресцентной меткой сначала проводили сканирование флуоресценции, затем окрашивание геля кумасси R-250. В случае использования ДНК с радиоактивной меткой проводили окрашивание геля кумасси с последующей радиоавтографией. Для локализации положения комплексов белок–ДНК в геле проводили сравнение изображений геля, полученных после окрашивания кумасси и радиоавтографии (или сканирования флуоресценции).

2.2.5.3. Подготовка проб для MALDI-TOF-MS анализа

После окрашивания кумасси и радиоавтографии из геля вырезали полосу, в которой белок детектировался обоими способами. Кроме того, из того же геля вырезали полосу сходного размера — контроль, не содержащий белка. Полосы разрезали на небольшие кусочки, которые промывали 100 мкл Н₂О, после чего к ним добавляли 50 мкл смеси 50%-ного СН₃CN и 25 мМ NH₄HCO₃ (рН 8,5) и инкубировали 20 мин, встряхивая смесь при комнатной температуре. Данную процедуру повторяли до полного обесцвечивания кусочков геля, после чего их инкубировали 10 мин в 50 мкл СН₃CN и высушивали пробы на вакуумной центрифуге. После этой процедуры кусочки геля

инкубировали в 50 мМ NH₄HCO₃ (pH 8,5), содержащем 1 мкМ трипсин: сначала при 4 °С в течение 60 мин (регидратация), затем при 37 °С в течение 18 ч (протеолиз). Пептиды экстрагировали 4 раза по 20 мин: 1 раз 25 мкл 20 мМ NH₄HCO₃ (pH 8,5), и 3 раза 25 мкл смеси 50%-ного CH₃CN и 5%-ной HCOOH. Экстрагированные пептиды объединяли и сушили на вакуумной центрифуге. Затем проводили обессоливание образцов с использованием наконечников “Zip-Tip”, содержащих обращеннофазовый сорбент C₁₈, по инструкции фирмы-производителя, и передавали образцы в Центр масс-спектрометрического анализа ИХБФМ СО РАН. Результаты анализа образца получали в виде спектра сигналов, характеризующихся отношением масса/заряд (m/z). Белки идентифицировали методом пептидного картирования с помощью программ “Mascot Software” (<http://www.matrixscience.com>), “Profound” (<http://prowl.rockefeller.edu>) и базы данных “NCBIInr”.

2.2.6. Вестерн-блоттинг

Для детекции GAPDH и ее комплекса с AP-ДНК методом вестерн-блоттинга проводили боргидридную сшивку белков экстрактов клеток HeLa, SiHa и C33A с 1 мкМ AP-ДНК с флуоресцентной меткой и разделяли продукты реакции и белки клеточных экстрактов без AP-ДНК с помощью электрофореза в системе Лэммли в 12%-ном геле. Белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану “Hybond-ECL” электрофорезом на приборе для полусухого переноса Semi-Phor (“Hoefer Scientific Instruments”, США) в течение 2 ч при плотности тока 2 мА/см². Использовали буферы следующего состава: 25 мМ Трис, 40 мМ глицин, 10%-ный этанол (катодный); 300 мМ Трис, 10%-ный этанол (анодный №1); 25 мМ Трис, 10%-ный этанол (анодный №2). Мембрану блокировали в течение ночи раствором 5%-ного обезжиренного сухого молока в буфере TBST, затем инкубировали с первичными мышинными антителами к GAPDH (разведение 1:1000 в TBST) в течение 2 ч при 4 °С. После этого мембрану промывали буфером TBS 3 раза по 10 мин и буфером TBST с 5%-ным сухим молоком 1 раз в течение 10 мин, инкубировали с вторичными кроличьими антителами к IgG мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена (разведение 1:25000 в TBST), в течение 1 ч при комнатной температуре и промывали буфером TBS 3 раза по 10 мин. Мембрану инкубировали 5 мин с субстратом пероксидазы хрена “SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate”, затем экспонировали с рентгеновской плёнкой (“Kodak”, США) в течение 1–5 мин. Плёнку сканировали с использованием системы “Molecular Imager FX” (“Bio-Rad”, США). Результаты обрабатывали в программе “Quantity One” v4.6.3 (“Bio-Rad”, США). При сравнительном анализе содержания GAPDH в клеточных

экстрактах мембрану инкубировали с менее чувствительным субстратом “Pierce ECL Western Blotting substrate”.

2.2.7. Анализ AP-лиазной активности Ku

Стандартные реакционные смеси (50 мкл) содержали 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 50 мМ NaCl, 0,25 мМ ЭДТА, 5%-ный глицерин, 0,025%-ный NP-40, 0,25 мМ DTT, 50 нМ 5'-[³²P]-меченый ДНК-субстрат и 250 нМ Ku. AP-сайты получали как описано выше. После добавления Ku реакционные смеси инкубировали при 37 °С в течение 60 мин. Аликвоты (10 мкл) отбирали каждые 15 мин и стабилизировали нерасщепленные AP-сайты путем добавления О-метилгидроксиламина до конечной концентрации 30 мМ с последующей инкубацией при 0 °С в течение 30 мин. Продукты анализировали с помощью электрофореза в 20%-ном полиакриламидном геле с 7 М мочевиной.

2.2.8. Реконструкция репарации AP-сайта, иницируемой Ku

Реакционные смеси (10 мкл) содержали 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ АТР, 0,5 мМ dGTP и 10 нМ 5'-[³²P]-меченый ДНК-субстрат 16С. Субстрат предварительно инкубировали с Ung при 37 °С в течение 30 мин, затем с Ku (100 нМ) при 37 °С в течение 60 мин. После этого добавляли различные комбинации TDP1 (100 нМ), PNKP (10 нМ), Polβ (100 нМ) и ДНК-лигазы Т4 (5 ед. акт./мкл). Реакционные смеси инкубировали при 15 °С в течение 16 ч и анализировали, как описано выше.

2.2.9. Оценка стабильности комплексов GAPDH–AP–ДНК

Реакционные смеси (50 мкл) готовили как описано в разд. 2.2.4. 2,5 мкМ GAPDH предварительно инкубировали с 500 нМ 5'-[³²P] DDE-AP-ДНК в течение 10 мин при 37 °С, затем добавляли немеченую одноцепочечную ДНК Т(16) (табл. 2.1) до финальной концентрации 5 мкМ, чтобы минимизировать реассоциацию GAPDH, высвобожденной из комплекса с AP-ДНК. Аликвоты (10 мкл) отбирали каждые 30 мин, восстанавливали основания Шиффа путём добавления NaBH₄ (или добавляли аналогичный объём реакционного буфера) и анализировали с помощью электрофореза в системе Лэммли в 12%-ном геле. В качестве контроля инкубировали аналогичные реакционные смеси в отсутствие конкурентной ДНК.

2.2.10. Фракционирование экстракта клеток ВJAB

Цельноклеточный экстракт (6,25 мг) разбавляли в 4 раза, чтобы уменьшить концентрацию NaCl до 50 мМ, и наносили на колонку с 5 мл сорбента “Macro-Prep DEAE Support” (“Bio-Rad”, США), уравновешенную буфером А, который содержал 50 мМ

Трис-НСl (рН 7,4), 50 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 7 мМ β-мкэ (фракция «проскок» или «несвязавшиеся белки»). Колонку промывали тем же буфером, пока УФ-поглощение элюата не достигало фонового уровня (фракция «промывка», 30 мл). Белки, связавшиеся с сорбентом “DEAE Support”, элюировали буфером А, содержащим 600 мМ NaCl (15 мл, фракция «элюция» или «связавшиеся белки»). Все фракции концентрировали и обессоливали с помощью устройств “Vivaspin 6” и “Vivaspin 500” (с пористостью ультрамембраны, равной 10 кДа) (“GE Healthcare”, США) до конечного объема, равного 300–350 мкл. Аликвоты (по 150 мкл) фракций связавшихся и не связавшихся с сорбентом белков фракционировали сульфатом аммония.

2.2.11. Оценка урацил-ДНК-гликозилазной и AP-лиазной активностей GAPDH с использованием олигонуклеотидных субстратов

Стандартные реакционные смеси (30 мкл) содержали 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 10 мМ ЭДТА, 100 нМ 5'-[³²P]-меченый ДНК-субстрат, содержащий остаток урацила или AP-сайт и 2 мкМ GAPDH. В случае оценки AP-лиазной активности AP-сайты получали, как описано выше. После добавления GAPDH реакционные смеси инкубировали при 37 °С в течение 60 мин. Аликвоты (5 мкл) отбирали после 1, 5, 10, 30 и 60 мин и останавливали реакцию добавлением NaOH до конечной концентрации 100 мМ с последующей инкубацией при 97 °С в течение 2 мин (в случае субстрата, содержащего урацил) или О-метилгидроксиламина до конечной концентрации 30 мМ с последующей инкубацией при 0 °С в течение 30 мин (в случае субстрата, содержащего AP-сайт). Продукты анализировали с помощью электрофореза в 20%-ном полиакриламидном геле с 7 М мочевиной.

2.2.12. Оценка урацил-ДНК-гликозилазной активности GAPDH с использованием субстрата поли(dA•dU)

Реакционные смеси для приготовления субстрата поли(dA•dU) или поли(dA•dT) (50 мкл) содержали 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 2 о.е.₂₆₀/мл полиdA (“Fluka”), 100 нМ 5'-[³²P]-меченый олигодT₂₀, 100 ед. акт./мкл Taq ДНК-полимеразу и 50 мкМ dUTP или 50 мкМ dTTP. Реакционные смеси инкубировали при 37 °С в течение 30 мин и затем осаждали ДНК 96%-ным этанолом. Реакционные смеси для оценки урацил-ДНК-гликозилазной активности (5 мкл) содержали 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 10 мМ ЭДТА, 100 нМ субстрат (поли(dA•dU) или поли(dA•dT)) и 5,6 мкМ GAPDH или 18 ед. акт. Ung. После добавления GAPDH или Ung реакционные

смеси инкубировали при 37 °С в течение 60 мин и останавливали реакции добавлением 100 мМ NaOH с последующей инкубацией при 97 °С в течение 2 мин. Продукты анализировали с помощью электрофореза в 20%-ном полиакриламидном геле с 7 М мочевиной.

2.2.13. Поли(ADP-рибозил)ирование GAPDH

Реакционные смеси для поли(ADP-рибозил)ирования очищенной GAPDH (10 мкл) содержали 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 20 мМ MgCl₂, 100 мМ NaCl, активированную ДНК тимуса теленка (2 о.е.₂₆₀/мл, степень активации 25%), 50 мкМ [³²P]-меченый NAD⁺, 88 нМ PARP1 и 2 мкМ GAPDH. Реакционные смеси инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в системе Лэммли в 10%- или 12%-ном геле.

Реакционные смеси для поли(ADP-рибозил)ирования белков экстракта (10 мкл) содержали 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 20 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 500 мкМ NAD⁺ (соотношение [³²P]-меченый : немеченый 1:19), 100 нМ немеченую ДНК U(16)//16G, белки экстракта клеток HeLa (2 мг/мл), а также 50 нМ PARP1 (в одном из случаев). Реакционные смеси инкубировали при 37 °С в течение 15 мин и анализировали продукты реакции как описано выше.

2.2.14. Расщепление AP-сайтов APE1 и NEIL1 в присутствии GAPDH

В случае APE1 реакционные смеси (10 мкл) содержали 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 40 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 5 мМ MgCl₂ (или 10 мМ ЭДТА), 0,1 мг/мл BSA, 1 нМ APE1 и 1, 10 или 100 нМ GAPDH. Реакционные смеси предварительно инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, затем добавляли 10 нМ 5'-[³²P]-АР-ДНК инкубировали при 37 °С в течение 2 мин (в присутствии MgCl₂) или 30 мин (в отсутствие MgCl₂) и стабилизировали нерасщепленные АР-сайты путем добавления О-метилгидроксиламина до конечной концентрации 30 мМ (а также ЭДТА до конечной концентрации 20 мМ — в случаях, когда в смеси присутствовал MgCl₂) с последующей инкубацией при 0 °С в течение 30 мин. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 20%-ном полиакриламидном геле с 7 М мочевиной.

В случае NEIL1 реакционные смеси (10 мкл) содержали 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 50 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 2 мМ ЭДТА, 0,125 мг/мл BSA, 5 нМ NEIL1 и 40, 80, 160, 240 или 320 нМ GAPDH. 40 нМ 5'-[³²P]-АР-ДНК добавляли после смешивания всех остальных компонентов. Реакционные смеси инкубировали при 37 °С в течение 10 мин. Стабилизацию АР-сайтов и анализ продуктов реакции проводили как описано выше.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Идентификация белков клеточных экстрактов человека, формирующих сшивки с AP-сайтами, с помощью MALDI-TOF-MS

3.1.1. Боргидрид-зависимая сшивка белков клеточных экстрактов с разными типами AP-ДНК

Ранее при поиске белков клеточных экстрактов, способных взаимодействовать с AP-сайтами в составе различных ДНК-структур, было показано, что наборы продуктов сшивки белок–ДНК определяются наличием в AP-ДНК структурных особенностей и в ряде случаев образуются уникальные продукты, которые характерны только для конкретной ДНК [14]. В частности, частичный ДНК-дуплекс, в котором AP-сайт-содержащий олигонуклеотид формирует 5'- и 3'-выступающие одноцепочечные концы длиной 8 нт (DDE-AP-ДНК) (см. схемы ДНК-структур на рис. 3.1), образует два основных продукта с кажущейся молекулярной массой около 100 кДа и 45 кДа; 100-кДа продукт характерен только для этой AP-ДНК. Интенсивный 45-кДа продукт, помимо DDE-AP-ДНК, формировала также AP-ДНК с 5'-выступающей одноцепочечной частью. В рамках указанной выше работы был идентифицирован только белок, формировавший основной продукт с AP-ДНК-дуплексом с тупыми концами (BE-AP-ДНК). Им оказалась Ku80-субъединица Ku-антигена.

Для дальнейшей идентификации AP-сайт-узнающих белков и развития метода проводили сшивку белков клеточных экстрактов с тремя типами ДНК, содержащими AP-сайт в середине 32-мерного олигонуклеотида: оц AP-ДНК, BE-AP-ДНК и DDE-AP-ДНК. Была предпринята попытка заменить радиоактивно меченые AP-ДНК на AP-ДНК с флуоресцентной меткой. Олигонуклеотид с AP-сайтом содержал флуоресцентную метку (5,6-карбоксифлуоресцеин) на 5'-конце. В экспериментах со 100 нМ AP-ДНК, которую использовали в работе [14], флуоресцентная ДНК не обеспечивала приемлемого соотношения сигнал/фон, поэтому для увеличения количества продуктов сшивки белок–ДНК концентрацию AP-ДНК увеличили до 500 нМ.

Данные эксперимента по сшивке белков с AP-ДНК показаны на рис. 3.1. BE-AP-ДНК формирует в экстрактах клеток человека основной продукт сшивки белок–ДНК с кажущейся молекулярной массой около 90 кДа (дор. 2 и 5). В случае DDE-AP-ДНК (дор. 3 и 6) появляется также 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, 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.

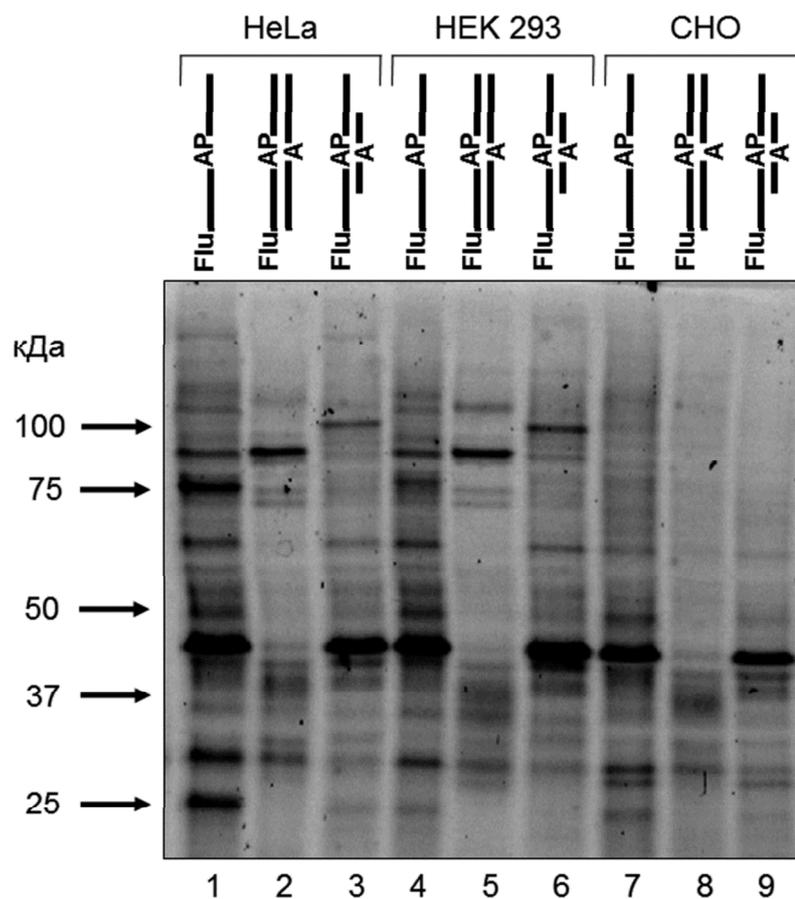


Рис. 3.1. Боргидрид-зависимая сшивка белков клеточных экстрактов с различными АР-ДНК с флуоресцентной меткой.

Скан флуоресценции в геле после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли продуктов боргидрид-зависимой сшивки белков экстрактов клеток HeLa (дор. 1–3), HEK293 (дор. 4–6) и CHO (дор. 7–9) (3 мг/мл) с 500 нМ АР-ДНК с флуоресцентной меткой: оц АР-ДНК (дор. 1, 4 и 7), BE-АР-ДНК 32А (дор. 2, 5 и 8) и DDE-АР-ДНК 16А (дор. 3, 6 и 9).

Чтобы подтвердить, что 100-кДа и 45-кДа аддукты белок–ДНК характерны именно для ДНК-структур, содержащих АР-сайты, и определить возможность образования АР-сайтов в ДНК такой структуры за счет действия эндогенных урацил-ДНК-гликозилаз, была сопоставлена способность белков клеточных экстрактов формировать боргидрид-зависимые аддукты с ДНК, содержащими предформированные АР-сайты/U/T в одинаковой позиции (рис. 3.2А для экстракта клеток HEK293 и 3.2Б для экстракта клеток VJAB). В отличие от предыдущего эксперимента, в данном случае использовали

радиоактивно меченые AP-ДНК. Набор боргидрид-зависимых аддуктов, формируемых белками экстрактов с радиоактивно мечеными AP-ДНК, практически идентичен набору, получаемому при использовании AP-ДНК с флуоресцентной меткой (сравните дор. 1–3 на рис. 3.2А с дор. 4–6 на рис. 3.1). Как и ожидалось, белки экстрактов формируют с урацил-содержащими ДНК те же аддукты, что и с AP-ДНК, хотя и с меньшей эффективностью (рис. 3.2А и 3.2Б, дор. 4–6), поскольку AP-сайты могут получаться под действием урацил-ДНК-гликозилаз, содержащихся в экстрактах; однако в случае ДНК, содержащих остатки dТ вместо AP-сайта, четкие полосы аддуктов отсутствуют (рис. 3.2А и 3.2Б, дор. 7–9).

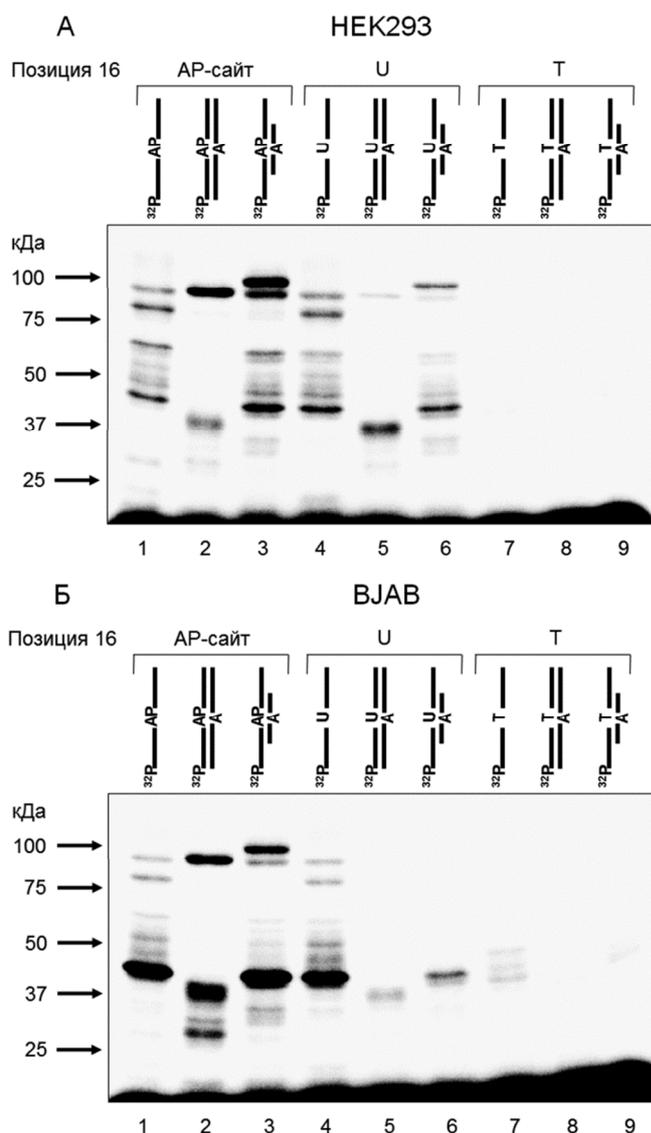


Рис. 3.2. Боргидрид-зависимая сшивка белков клеточных экстрактов с различными радиоактивно мечеными ДНК.

Радиоавтографы гелей после электрофоретического разделения в 12%-ных ПААГ по Лэммли продуктов боргидрид-зависимой сшивки белков экстрактов клеток HEK293 (А) и VJAB (Б) (2 мг/мл) с различными типами 500 нМ ДНК. В реакциях использовали AP-ДНК (дор. 1 – оц ДНК; дор. 2 – BE-ДНК; дор. 3 – DDE-ДНК), урацил-содержащие ДНК (дор. 4 – оц ДНК; дор. 5 – BE-ДНК; дор. 6 – DDE-ДНК) и тимин-содержащие ДНК (дор. 7 – оц ДНК; дор. 8 – BE-ДНК; дор. 9 – DDE-ДНК).

Поскольку в реакциях на рис. 3.2А и Б использовали радиоактивно меченую ДНК с одинаковой удельной активностью и одинаковые концентрации белков экстрактов, а гели экспонировали с экраном одновременно, можно сопоставить выходы аддуктов в этих двух случаях. Выходы 90-кДа аддукта с BE-AP-ДНК и 100-кДа аддукта с DDE-AP-ДНК примерно одинаковы для обоих экстрактов; однако при сшивке белков с аналогичными урацил-содержащими ДНК в случае экстракта НЕК293 выход данных аддуктов уменьшается, а в случае экстракта ВЈАВ они исчезают совсем. Выход 45-кДа аддукта с оц AP-ДНК (дор. 1) и DDE-AP-ДНК (дор. 3) больше в случае экстракта ВЈАВ (рис. 3.2Б), чем в случае экстракта НЕК293 (рис. 3.2А). Это может объясняться как разным содержанием белка, формирующего данный аддукт, в этих двух экстрактах, так и разницей в его функциональном состоянии и активности. Интересно, что в случае экстракта ВЈАВ выход 45-кДа аддукта почти идентичен в реакциях с оц урацил-содержащей ДНК (дор. 4) и оц AP-ДНК (дор. 1), тогда как выход этого аддукта в случае урацил-содержащей DDE-ДНК (дор. 6) намного меньше, чем для DDE-AP-ДНК (дор. 3). Возможно, такое соотношение выхода аддуктов является следствием высокой активности урацил-ДНК-гликозилаз, специфичных именно к оц ДНК, в экстракте ВЈАВ; этим может объясняться и тот факт, что белки экстракта ВЈАВ не формируют с урацил-содержащими ДНК 90-кДа и 100-кДа аддукты (ведь для этого AP-сайт должен образоваться в дц ДНК). При использовании экстракта НЕК293 выход 45-кДа аддукта практически одинаков во всех случаях, когда он возникает (рис. 3.2А, дор. 1, 3, 4, 6).

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

3.1.2. Идентификация Ки

Методика идентификации белков, способных взаимодействовать с AP-сайтами путем формирования основания Шиффа, была разработана и апробирована в нашей лаборатории ранее [12, 14]. Данный подход включает следующие этапы (рис. 3.3). Сначала проводят сшивку белков клеточного экстракта с ³²P-меченой AP-ДНК, содержащей остаток биотина (разд. 2.2.5.1) в препаративных количествах. Затем осуществляют очистку «пришитых» белков с помощью аффинной хроматографии на парамагнитных частицах, покрытых стрептавидином (разд. 2.2.5.2). Ковалентная сшивка целевого белка с ДНК позволяет использовать жесткие условия (рН 9,4, 2 М NaCl) для удаления неспецифически связанных белков в процессе отмывки, после чего продукты сшивки белков с ДНК элюируют с сорбента, прогревая его в буфере, содержащем SDS, и разделяют их с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в системе Лэммли.

(дор. 5–7). После электрофоретического разделения продуктов реакции в ПААГ по Лэммли сначала проводили детектирование флуоресцентной метки в геле (рис. 3.4А), затем окрашивание белков кумасси (рис. 3.4Б). На данном геле на дор. 2 и 7 нанесены пробы, отобранные из реакционных смесей до связывания с сорбентом, на дор. 3 и 6 — после связывания (т.е. это белки, не связавшиеся с сорбентом), на дор. 4 и 5 — элюированные с сорбента ковалентные аддукты и белки. Видно, что большая часть белков экстракта остается в растворе, а связываются с сорбентом лишь несколько белков. Целевой продукт предполагалось идентифицировать по совпадению положения в геле флуоресцентной метки, входящей в состав ДНК, ковалентно присоединенной к белку, и белка, окрашенного кумасси. На дор. 4 по флуоресценции видны одна полоса на уровне 75 кДа и две полосы на уровне 90–100 кДа (причем нижняя из них более интенсивна, чем верхняя). Подобный эффект наблюдается в экспериментах при наличии в ДНК 3'-концевой флуоресцентной метки (данные не представлены). Можно предположить, что объемная группа (в данном случае биотин) на 3'-конце каким-то образом меняет свойства данного субстрата. При окрашивании геля кумасси не наблюдается четко выраженных белковых полос, соответствующих положению флуоресцентной метки, однако наблюдаются полосы белков с другими молекулярными массами: около 120 и 70 кДа. Вероятно, эти белки непосредственно не взаимодействуют с AP-сайтами, но удерживаются на сорбенте за счет эффективного взаимодействия с биотинилированной ДНК или за счет белок-белковых взаимодействий со связанными белками. В контрольных экспериментах было установлено, что белки клеточного экстракта в отсутствие ДНК с сорбентом не связываются (данные не представлены).

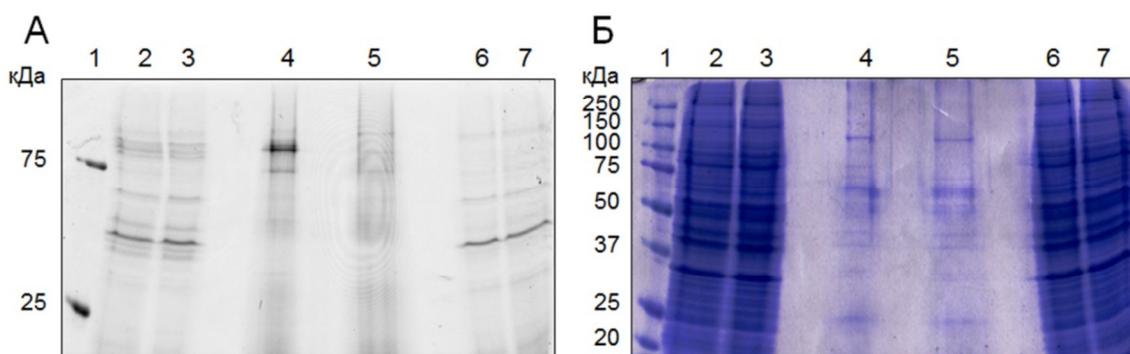


Рис. 3.4. Попытка использования AP-ДНК с флуоресцентной меткой для идентификации белков, формирующих аддукты с AP-сайтами. В эксперименте использовали белки цельноклеточного экстракта HeLa (3 мг/мл) и 500 нМ дуплекс Flu-U(16)-bio//Template 16A (дор. 2–4) или 500 нМ оц Flu-U(16)-bio (дор. 5–7).

(А) Скан флуоресценции в геле после электрофоретического разделения белков в 12%-ном ПААГ по Лэммли. Дор. 2 и 7 – пробы, отобранные до связывания с сорбентом, содержащим стрептавидин; дор. 3 и 6 – белки, не связавшиеся с сорбентом; дор. 4 и 5 – ковалентные аддукты и белки, связавшиеся с сорбентом. Дор. 1 – предварительно окрашенные маркеры молекулярной массы белков, два из которых (75 и 25 кДа) содержат ковалентно присоединенный флуорофор, регистрируемый в условиях визуализации флуоресцентных ДНК.

(Б) Скан того же геля после окрашивания кумасси.

Среди элюированных с сорбента продуктов ни по флуоресценции, ни по окраске белков не наблюдали полосы, соответствующей 45-кДа аддукту (хотя в ходе реакций данный аддукт образуется, дор. 2 и 3, 7 и 6). Возможно, это обусловлено тем, что белок, образующий 45-кДа аддукт, взаимодействует с ДНК, расщепленной по AP-лиазному механизму, в результате чего «уходит» 3'-концевой фрагмент, содержащий биотин, а образующийся аддукт с 5'-концевым фрагментом (не содержащим биотина) не может связаться со стрептавидином.

Для более эффективного выделения ковалентных аддуктов использовали дуплекс bio-*U(16)//Template 16A (полученный согласно разд. 2.2.2.1.), несущий остаток биотина на 5'-конце и радиоактивную метку в середине цепи, непосредственно перед AP-сайтом; таким образом, как биотин, так и радиоактивная метка остаются в 5'-концевом фрагменте данного ОДН после его расщепления по AP-лиазному механизму. Для проведения препаративной боргидрид-зависимой сшивки данный дуплекс смешивали с дуплексом bio-U(16)//Template 16A (без радиоактивной метки) в соотношении 1:4.

В предыдущих работах нашей лаборатории идентификацию белков, взаимодействующих с AP-сайтами, всегда проводили с использованием цельных экстрактов [12, 14]. Этот подход оказывается продуктивным, если ДНК-зонд проявляет высокий уровень селективности при боргидрид-зависимой сшивке с белками экстракта и обеспечивает достаточно высокий выход аддуктов. Высокое сродство целевого белка к ДНК-зонду и высокая копияность белка в экстракте являются благоприятными факторами для его идентификации. Если же из-за каких-то факторов (например, недостаточно эффективное связывание белка с ДНК и/или низкая чувствительность метода регистрации продуктов сшивки) для получения необходимого количества продуктов сшивки приходится использовать высокие концентрации белка и/или ДНК, увеличивается вероятность неспецифического связывания/сшивки ДНК с белками. Одним из возможных подходов в преодолении таких трудностей может быть обогащение исследуемого образца по целевому белку, что может быть достигнуто за счет использования фракционированных экстрактов. Кроме того, способность белка связываться с определенным типом сорбента дает дополнительную информацию о природе белка. Для фракционирования белков экстрактов использовали несколько различных типов сорбентов и определяли распределение целевых белков в элюате, анализируя образование сшивок белок–ДНК. При необходимости анализируемые образцы предварительно концентрировали и обессоливали.

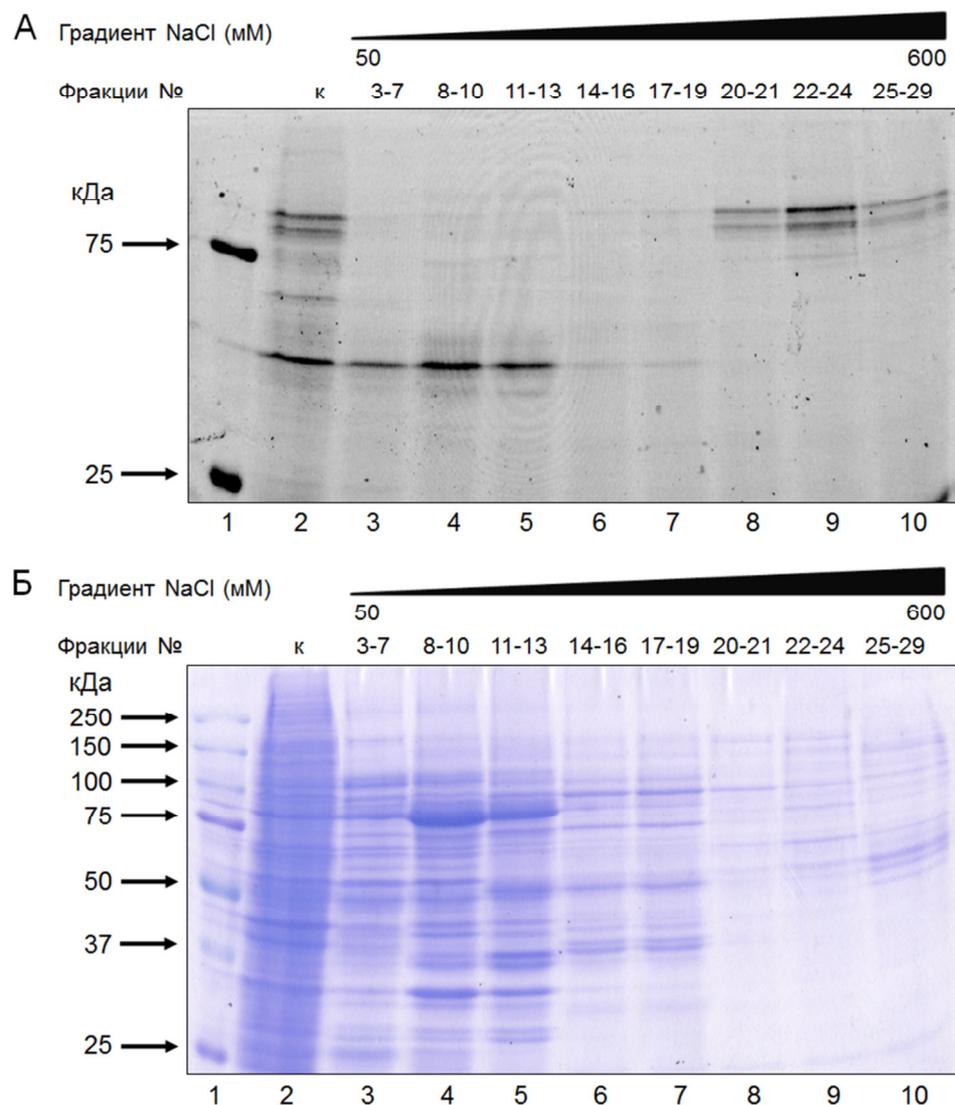


Рис. 3.5. Анализ содержания белков, формирующих аддукты с AP-ДНК, во фракциях экстракта клеток HEK293, элюированных с гепарин-сефарозы.

(А) Скан флуоресценции в геле после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли продуктов боргидрид-зависимой сшивки белков фракционированного на гепарин-сефарозе экстракта клеток HEK293 с 500 нМ DDE-AP-ДНК 16А с флуоресцентной меткой. Дор. 2 – нефракционированные белки экстракта клеток HEK293 (2 мг/мл), 3 – объединённые фракции №3–7, 4 – фракции №8–10, 5 – фракции №11–13, 6 – фракции №14–16, 7 – фракции №17–19, 8 – фракции №20–21, 9 – фракции №22–24, 10 – фракции №25–29. Дор. 1 – предварительно окрашенные маркеры молекулярной массы белков, два из которых (75 и 25 кДа) содержат ковалентно присоединенный флуорофор, регистрируемый в условиях визуализации флуоресцентных ДНК.

(Б) Скан того же геля после окрашивания кумасси.

Для препаративного выделения 100-кДа аддукта в настоящей работе использовали экстракт клеток HEK293, фракционированный на гепарин-сефарозе линейным градиентом 5–60% буфера Б. Наибольшее количество белков элюировалось во фракциях №5–16 (что соответствует 14–34% Б), на которые приходился пик оптической плотности (данные не показаны). При боргидрид-зависимой сшивке белков данных фракций с DDE-AP-ДНК преобладает 45-кДа аддукт (рис. 3.5А, дор. 3–7). Искомый 100-кДа аддукт появляется при сшивке белков начиная с фракции №20 (рис. 3.5А, дор. 8–10), и наиболее выражен для фракций №22–24, соответствующих 45–49% буфера Б (дор. 9). Также следует отметить,

что в данных фракциях не наблюдается других аддуктов, за исключением двух менее интенсивных полос с массами 90–95 кДа, которые всегда сопровождают 100-кДа аддукт. По окрашиванию геля кумасси (рис. 3.5Б, дор. 9) видно, что смесь фракций №22–24 содержит малое число белков и, следовательно, эта процедура может быть эффективно использована для селективного выделения целевого белка, формирующего 100-кДа аддукт.

Для лучшего разделения нескольких продуктов с высокими молекулярными массами использовали гель-электрофорез в 10%-ном ПААГ по Лэммли (во всех остальных экспериментах, описанных в данной работе, использовали гель-электрофорез в 12%-ном ПААГ по Лэммли). После электрофореза гель сначала окрашивали кумасси (рис. 3.6А), затем проводили радиоавтографию (рис. 3.6Б).

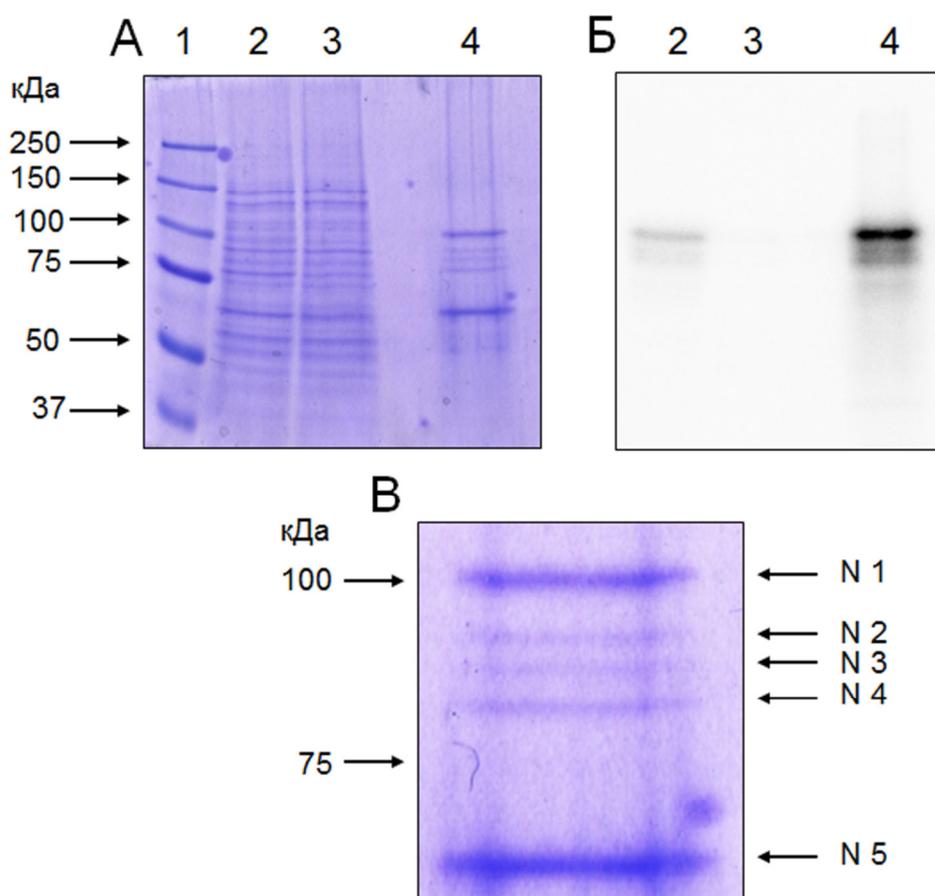


Рис. 3.6. Анализ и очистка ковалентных аддуктов белок–AP–ДНК с молекулярными массами 90–100 кДа для идентификации белков в их составе с помощью MALDI-TOF-MS. В эксперименте использовали белки экстракта клеток НЕК293, элюированные с гепарин-сефарозы, и 200 нМ DDE-AP-ДНК bio-*U(16)//Template 16A.

(А) Скан геля, окрашенного кумасси, после электрофоретического разделения белков в 10%-ном ПААГ по Лэммли. Дор. 1 – маркеры молекулярной массы белков; дор. 2 – проба, отобранная до связывания с сорбентом, содержащим стрептавидин; дор. 3 – белки, не связавшиеся с сорбентом; дор. 4 – ковалентные аддукты и белки, связавшиеся с сорбентом.

(Б) Радиоавтограф того же геля.

(В) Увеличенный фрагмент рис. А, дор. 4 (пояснения в тексте).

N 1–5 обозначают полосы, которые вырезали из геля для идентификации белков.

Из данного геля вырезали 5 белковых полос по окрашиванию кумасси с молекулярными массами от 100 до 70 кДа. Образцам были присвоены номера с 1 по 5 по мере убывания их молекулярных масс (рис. 3.6В). Полосам №1–4 по окрашиванию кумасси соответствуют полосы на радиоавтографе, что говорит о том, что данные полосы соответствуют ковалентным аддуктам белков экстракта с AP-ДНК (причем полоса на уровне 100 кДа при обоих способах визуализации имеет наибольшую интенсивность).

Кусочки геля отмывали от кумасси, высушивали, затем белок непосредственно в геле подвергали исчерпывающему трипсинолизу (разд. 2.2.5.3). После экстракции из геля полученные пептиды анализировали с помощью MALDI-TOF-MS. Результаты анализа образца получали в виде спектра сигналов, характеризующихся отношением масса/заряд (m/z). Идентификацию осуществляли методом пептидного картирования с использованием программы “Mascot software” (<http://www.matrixscience.com>) и базы данных “NCBI nr”. На основе полученных данных были идентифицированы все 5 образцов (см. приложение 1 и 3). В табл. 3.1 приведены наиболее достоверные кандидаты с оценкой, количеством совпавших пептидов и процентом последовательности полипептида, который покрывают данные пептиды.

Табл. 3.1. Параметры наиболее достоверных кандидатов для образцов №1–5 (рис. 3.6В).

№ образца	Наиболее достоверный кандидат	Молекулярная масса, Да	MOWSE Score	Количество совпавших пептидов	% последовательности полипептида
1	Ku80-полипептид (XRCC5)	82652	176	19	27
2	Ku80-полипептид (XRCC5)	82652	149	33	38
3	Ku80-полипептид (XRCC5)	82652	67	13	17
4	N-концевой протеолитический фрагмент Ku80-полипептида	64064	85	19	22
5	Ku70-полипептид (XRCC6)	69799	71	16	35

XRCC5 (X-ray repair cross-complementing protein 5) и XRCC6 (X-ray repair cross-complementing protein 6) — это альтернативные названия Ku80 и Ku70-полипептидов соответственно, данные им первоначально по активностям, благодаря которым эти белки

были открыты. Очевидно, Ku80 образует несколько ковалентных аддуктов с AP-ДНК. Ku70 присутствует во фракции, элюированной с сорбента, т.к. Ku80 связывается с ДНК, находясь в составе Ку-антигена, который является гетеродимером, состоящим из Ku80 и Ku70, и денатурирует на мономеры в процессе анализа.

Ковалентный аддукт №1 (с кажущейся молекулярной массой 100 кДа), образуемый Ku80 с DDE-AP-ДНК, имеет меньшую подвижность, чем аддукт того же белка с BE-AP-ДНК (сравните, например, дор. 3 и 2 на рис. 3.1). Это может объясняться другим типом связывания данного белка с субстратом с оц концами (и, соответственно, другой точкой пришивки, в результате чего изменяется электрофоретическая подвижность аддукта), или тем, что данный аддукт образует другая изоформа Ku80. Действительно, для образцов № 1 и 2 в числе вероятных кандидатов с достоверной оценкой (MOWSE score 171 и 142 соответственно) присутствует изоформа Ku80 с большей молекулярной массой (93464 Да), известная как KARP-1 (см. приложение 1). Большая часть последовательности Ku80-полипептида с массой 82 кДа и данной изоформы совпадает, поэтому в их масс-спектрах может присутствовать одинаковый набор пептидов. KARP-1 может образовывать гетеродимер с Ku70-субъединицей и по своим биохимическим свойствам сходна с «обычной» Ku80-субъединицей, однако не может полноценно ее заменить в процессе НГСК [206].

Интересно отметить, что набор пептидов Ku80, идентифицированных в данной работе, практически полностью перекрывается с набором пептидов этого белка, выявленным при пептидном картировании в других работах [14, 207]. Это, вероятно, обусловлено легкой ионизацией этих пептидов в условиях анализа.

Поскольку в спектре пептидов не было выявлено пептида, характерного для 93464 Да изоформы, нельзя однозначно определить, какая из изоформ этого белка принимает участие в формировании аддукта с кажущейся молекулярной массой 100 кДа. Иммуноферментная детекция также не подходит для этой цели из-за отсутствия антител, специфически узнающих изоформу 93464 Да; кроме того, антитела могут оказаться неподходящими для детекции белка в составе аддукта с ДНК, если пришивка ДНК затрагивает их эпитоп. Поэтому необходимо использование других подходов, например, выделение соответствующих белков в индивидуальном состоянии с последующим анализом их сшивки с DDE-AP-ДНК (см. разд. 3.2.1).

3.1.3. Идентификация GAPDH

Аналогичные процедуры были проведены для выделения 45-кДа аддукта. Использовали 500 нМ дуплекс bio-*U(16)//Template 16A и обогащенный по целевому

белку экстракт клеток HeLa. Для этого экстракт сначала наносили на Q-сефарозу, после чего белки, не связавшиеся с ней, наносили на SP-сефарозу и элюировали линейным градиентом NaCl (5–50% буфера Б). Затем проводили электрофоретический анализ белков во фракциях (по окрашиванию белков в геле кумасси). Соседние фракции, содержащие сходный набор белков, объединяли, концентрировали и уравнивали буфером с 50 мМ NaCl. Аликвоты полученных образцов использовали для боргидрид-зависимой сшивки белков с AP-ДНК и анализировали на содержание целевого белка по наличию соответствующих аддуктов. Данные анализа представлены на рис. 3.7.

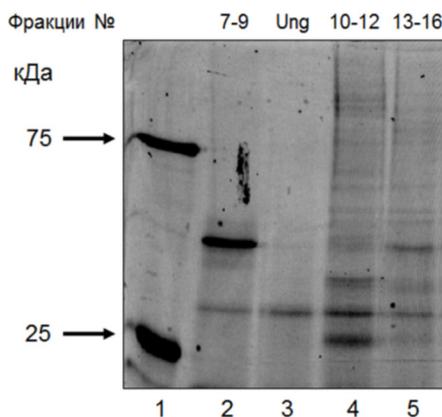


Рис. 3.7. Анализ содержания белка, формирующего 45-кДа аддукт с AP-ДНК, во фракциях экстракта клеток HeLa, элюированных с SP-сефарозы.

Скан флуоресценции в геле после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли продуктов боргидрид-зависимой сшивки белков фракционированного на SP-сефарозе экстракта клеток HeLa с 500 нМ оц AP-ДНК. Дор. 2 – объединённые фракции №7–9, дор. 4 – фракции №10–12, дор. 5 – фракции №13–16. Дор. 3 – оц ДНК Flu-U(16), обработанная Ung (контроль боргидрид-зависимой сшивки Ung). Дор. 1 – предварительно окрашенные маркеры молекулярной массы белков, два из которых (75 и 25 кДа) содержат ковалентно присоединенный флуорофор, регистрируемый в условиях визуализации флуоресцентных ДНК.

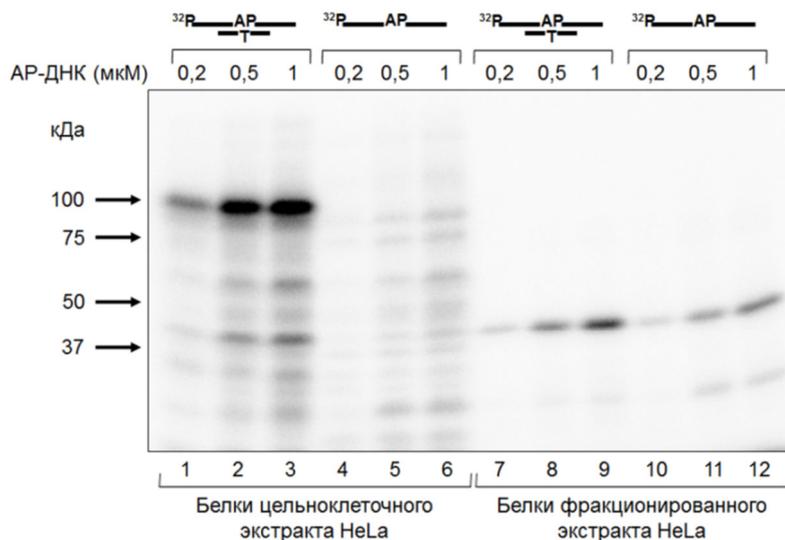


Рис. 3.8. Подбор концентрации AP-ДНК для идентификации белка в составе 45-кДа аддукта.

Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли продуктов боргидрид-зависимой сшивки белков цельноклеточного экстракта HeLa (3 мг/мл) (дор. 1–6) и экстракта HeLa, осажденного AS в диапазоне 66–88% от насыщения (дорожки 7–12), с DDE-AP-ДНК 16Т (дор. 1 и 7 – 200 нМ, дор. 2 и 8 – 500 нМ, дор. 3 и 9 – 1 мкМ) и оц AP-ДНК U(16) (дор. 4 и 10 – 200 нМ, дор. 5 и 11 – 500 нМ, дор. 6 и 12 – 1 мкМ).

Максимальное количество 45-кДа аддукта (рис. 3.7, дор. 2) регистрируется в образце, соответствующем объединенным фракциям 7–9. При этом полоса на уровне 30 кДа соответствует аддукту, формируемому Ung, которая используется для получения AP-ДНК (сравните дор. 2 и 3 (контроль Ung без экстракта)). Во фракциях, соответствующих более высокой концентрации NaCl (дор. 4 и 5), искомым аддукт практически отсутствует. Таким образом, основное количество белка, образующего 45-кДа аддукт, элюируется с SP-сефарозы при концентрации NaCl до 100 мМ.

Выбор большей, чем в предыдущем случае, концентрации дуплекса для препаративной сшивки был обусловлен тем, что выход 45-кДа аддукта значительно повышается с увеличением концентрации AP-ДНК (рис. 3.8).

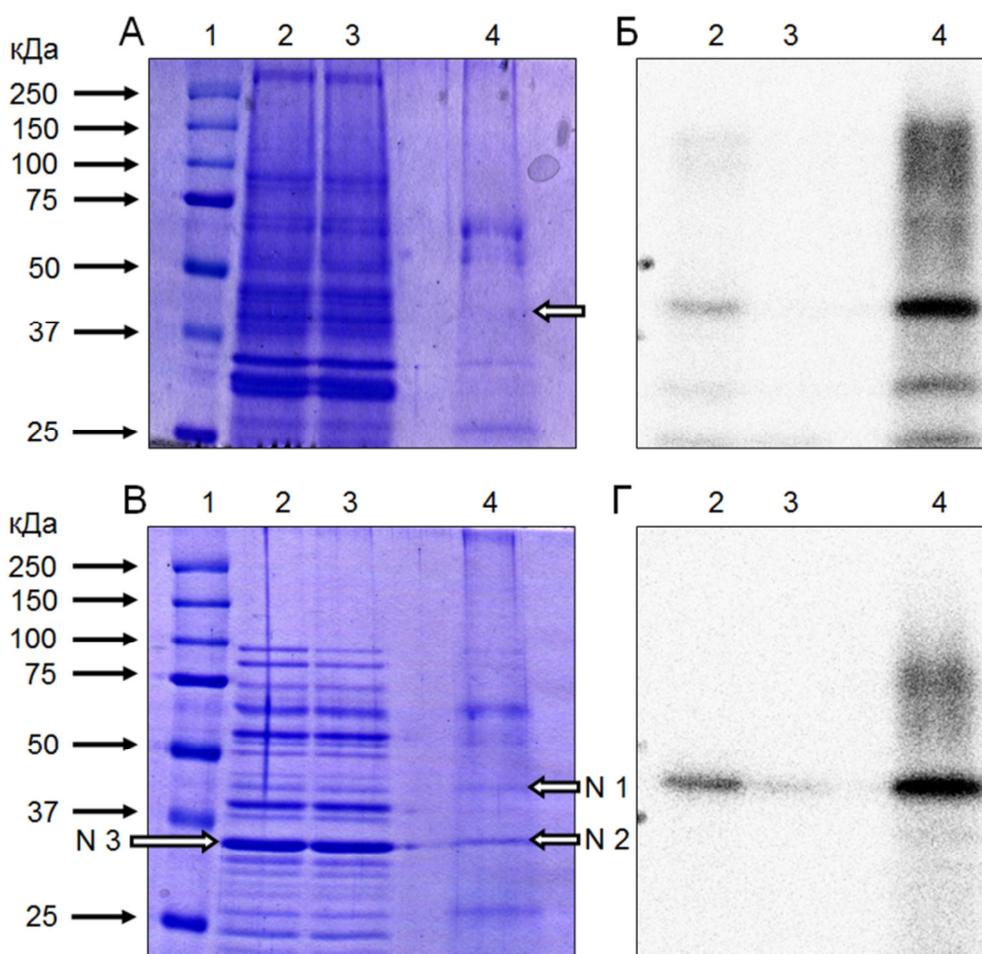


Рис. 3.9. Анализ и очистка ковалентного аддукта белок–AP-ДНК с молекулярной массой около 45 кДа для идентификации белка в его составе с помощью MALDI-TOF-MS.

А и Б – эксперимент с использованием экстракта клеток HeLa, элюированного с SP-сефарозы для обогащения по целевому белку, и 500 нМ DDE-AP-ДНК bio-U(16)/Template 16A; В и Г – эксперимент с использованием белков экстракта клеток HeLa, осажденных сульфатом аммония в диапазоне 66–88% от насыщения, и 1 мкМ DDE-AP-ДНК bio-U(16)/Template 16T.

(А и В) Сканы гелей, окрашенных кумасси, после электрофоретического разделения белков в 12%-ных ПААГ по Лэмбли. Дор. 1 – маркеры молекулярной массы; дор. 2 – алиquota (25 мкл), отобранная из реакционной смеси перед инкубацией с сорбентом, содержащим стрептавидин; дор. 3 – алиquota (25 мкл), отобранная из реакционной смеси после инкубации (несвязавшиеся белки); дор. 4 – ковалентные аддукты и белки, связавшиеся с сорбентом.

(Б и Г) Радиоавтографы гелей, изображенных на рис. А и В соответственно.

Стрелками обозначены полосы, которые вырезали из геля для идентификации белков.

На рис. 3.9Б видно, что искомый ковалентный аддукт, образующийся в ходе препаративной сшивки (дор. 2), полностью связывается с сорбентом (дор. 4). Однако несмотря на то, что искомая полоса отчётливо видна на радиоавтографе, при окрашивании белков не наблюдается четкой полосы с такой молекулярной массой (сравните дор. 4 на рис. 3.9Б и А). Кусочек геля, соответствующий полосе на радиоавтографе, был вырезан и обработан по методике, описанной выше. С помощью ресурса “Profound” белок в составе 45-кДа аддукта идентифицирован как изоформа GAPDH с молекулярной массой 35470 Да, которая носит название урацил-ДНК-гликозилаза (“UDG”) (6 совпавших пептидов, покрывающих 24% последовательности полипептида; Z score 2,43). Z score используется в данной программе для оценки вероятности того, что результат идентификации является статистически значимым (это так, если Z score выше 1,65). При этом идентифицировать белок с помощью программы “Mascot” не удалось. В программе “Mascot”, в отличие от “Profound”, используется оценка MOWSE Score, которая вычисляется как $-10 \cdot \log(P)$, где P — вероятность того, что результат идентификации является случайным событием; этот параметр имеет обратную зависимость от количества последовательностей белков в базе данных, то есть со временем может уменьшаться. Однако для более надёжной идентификации рекомендуется использовать обе программы, поскольку в них применяются разные алгоритмы [208].

С учетом данных о возможном кандидате из первой идентификации изменили способ фракционирования белков экстракта. Основываясь на данных работы по выделению GAPDH человека [209], был получен препарат белков, осажденных сульфатом аммония (AS) в диапазоне 66–88% от насыщения. Препаративную сшивку белков проводили с использованием 1 мкМ дуплекса bio-*U(16)//Template 16T для повышения выхода целевого продукта. Остальные процедуры проводили без изменений.

Из геля вырезали 3 полосы с окрашенным белком (обозначение образцов см. на рис. 3.9В). Образец №1 соответствует 45-кДа аддукту (по совпадению положения полос в геле и на радиоавтографе), что свидетельствует о присутствии ДНК в составе продукта. Продукт в образце №2, задержавшийся на сорбенте, не содержит ДНК, но белковая полоса по кажущейся молекулярной массе наиболее близка к ожидаемой для GAPDH (36 кДа). Образец №3 соответствует мажорному белку с молекулярной массой, ожидаемой для GAPDH, из аликвоты реакционной смеси для сшивки. Данные идентификации белков в образцах с использованием алгоритма “Mascot” приведены в табл. 3.2.

Белок в составе образца №1, идентифицирован как “UDG” с помощью программы “Mascot software” (табл. 3.2). Интересно, что белок с мол. массой около 37 кДа, элюированный с сорбента (образец №2), и мажорный белок с мол. массой около 37 кДа из

фракции, осажденной сульфатом аммония, идентифицированы как «классическая» GAPDH. “UDG” также присутствует в числе кандидатов для этих образцов, но с недостоверной оценкой (см. приложение 2 и 4). Присутствие GAPDH, не связанной с ДНК, во фракции, элюированной с сорбента, может объясняться тем, что GAPDH взаимодействует с AP-ДНК в форме тетрамера или димера [161], который денатурирует на мономеры в процессе анализа, или же тем, что GAPDH непосредственно связывается с сорбентом.

Табл. 3.2. Параметры наиболее достоверных кандидатов для образцов №1–3 (рис. 3.9В).

№ образца	Наиболее достоверный кандидат	Молекулярная масса, Да	MOWSE Score	Количество совпавших пептидов	% последовательности полипептида
1	Урацил-ДНК-гликозилаза (изоформа GAPDH)	35470	82	10	33
2	GAPDH	36031	68	5	19
3	GAPDH	36031	67	13	35

Последовательность полипептида «урацил-ДНК-гликозилазы» (изоформы GAPDH), впервые приведенная в работе [184] (331 а.о.), отличается от последовательности «классической» GAPDH (335 а.о.) заменой а.о. 194–213 и делецией а.о. 328–330 (рис. 3.10А).

“UDG”

```

1 mgkvkvgvng fgrigrlvtr aafnsgkvdi vaindpfidl nymvymfqyd sthgkfhgtv
61 kaengklvin gnpitifqer dpskikwgda gaeyvvestg vfttmekaga hlqggakrvi
121 isapsadapm fvmgvnheky dnslkiisna scttnclapl akvihdnfgi veglmttvha
181 itatqktvdg psgncgvmaa glrrtsslpl lalkavgkvi pelngkltgm afrvptanvs
241 vvdltcrlek pakyddikkv vkqasegplk gilgytehqv vssdfnsdth sstfdagagi
301 alndhfvkli swydnefgys nrvvdlmask e

```

GAPDH

```

1 mgkvkvgvng fgrigrlvtr aafnsgkvdi vaindpfidl nymvymfqyd sthgkfhgtv
61 kaengklvin gnpitifqer dpskikwgda gaeyvvestg vfttmekaga hlqggakrvi
121 isapsadapm fvmgvnheky dnslkiisna scttnclapl akvihdnfgi veglmttvha
181 itatqktvdg psgklwrdqr galqniipas tgaakavgkv ipelngkltg mafrvptanv
241 svvdltcrle kpakyddikk vvkqasegpl kgilgytehqv vssdfnsdt hsstfdagag
301 ialndhfvkl iswydnefgy snrvvdlmah maske

```

Рис. 3.10А. Сравнение последовательностей “UDG” и «классической» GAPDH. А.о., различающиеся у двух изоформ, подчеркнуты; а.о. GAPDH, отсутствующие в последовательности “UDG”, выделены цветом.

```

3061 ttgggggttc tggggactgg ctttccata atttcctttc aaggtgggga gggaggtaga
3121 ggggtgatgt ggggagtacg ctgcagggcc tcactccttt tgcagaccac agtccatgcc
3181 atcactgcc aacagaagac tgtggatggc cctccggga aactgtggcg tgatggccgc
3241 ggggctctcc agaacaatcat cctgcctct actggcgctg caaaggctgt gggcaaggtc
3301 atccctgagc tgaacgggaa gctcaactggc atggccttcc gtgtccccac tgccaacgtg
3361 tcagtgggtg acctgacctg ccgtctagaa aaacctgcca aatatgatga catcaagaag
3421 gtgggtaagc aggcgtcggg gggccccctc aaggcatcc tgggctacac tgagcaccag
3481 gtgggtctct ctgacttcaa cagcgacacc cactcctcca ctttgacgc tggggctggc
3541 attgccctca acgaccactt tgtcaagctc atttcctggt atgtggctgg ggccagagac
3601 tggctcttaa aaagtgcagg gtctggcgcc ctctgggtggc tggctcagaa aaagggcctt
3661 gacaactcctt ttcactcttct aggtatgaca acgaatttgg ctacagcaac aggggtgggtgg
3721 acctcatggc ccacatggcc tccaaggagt aagacccttg gaccaccagc cccagcaaga
3781 gcacaagagg aagagagaga ccctcaactgc tggggagtcc ctgccacact cagtccccc
3841 ccacactgaa tctcccctcc tcacagttgc catgtagacc cttgaaagag gggagggggc
3901 tagggagccg caccttgtca tgtaccatca ataaagtacc ctgtgctcaa cca

```

Рис. 3.10Б. Фрагмент последовательности гена «классической» GAPDH, отличающийся от последовательности гена “UDG”. Экзоны гена GAPDH выделены цветом: нуклеотиды, соответствующие последовательности гена “UDG”, выделены желтым; нуклеотиды, отсутствующие в последовательности гена “UDG”, выделены красным; участок, где происходит сдвиг рамки считывания, выделен зеленым.

Маловероятно, что аминокислотная последовательность изоформы GAPDH, названная “UDG” из-за обнаруженной способности удалять остатки урацила из ДНК, получается в результате альтернативного сплайсинга пре-мРНК GAPDH. Участок последовательности “UDG” с измененными а.о. 194–213 находится внутри экзона, далеко от его границ [130]; по-видимому, он получается в результате однонуклеотидной делеции в экзоне гена *gapdh*, что приводит к сдвигу рамки считывания (рис. 3.10Б). После этого участка в последовательности “UDG” присутствует еще одна делеция, на этот раз двух нуклеотидов, что приводит к восстановлению исходной рамки считывания. Наблюдаемое несоответствие двух последовательностей, вероятно, является результатом ошибки секвенирования. Интересно, что измененный участок находится в пределах глицеральдегид-3-фосфат-связывающего сайта GAPDH, который не участвует в связывании ДНК (см. разд. 1.3.1).

3.1.4. Иммуноферментная детекция GAPDH

Идентичность белка GAPDH в составе 45-кДа аддукта была подтверждена с помощью иммуноферментной детекции. В эксперименте использовали DDE-AP-ДНК 16А с флуоресцентной меткой и белки экстрактов культивируемых клеток человека: С33А, SiHa и HeLa (фракция, осажденная AS в диапазоне 66–88% от насыщения). Сначала делали по две реакционные смеси с белками каждого из экстрактов (согласно разд. 2.2.4), в одну из которых добавляли AP-ДНК до концентрации 1 мкМ, в другую — аналогичный объем реакционного буфера (контроль). После инкубации при 37 °С в течение 10 мин в обе смеси добавляли NaBH₄ до 20 мМ и проводили разделение продуктов реакции с помощью электрофореза по Лэммли и детекцию флуоресценции ДНК в геле. После этого

белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану и проводили вестерн-блоттинг с использованием первичных мышинных антител против GAPDH человека и вторичных кроличьих антител против IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (разд. 2.2.6).

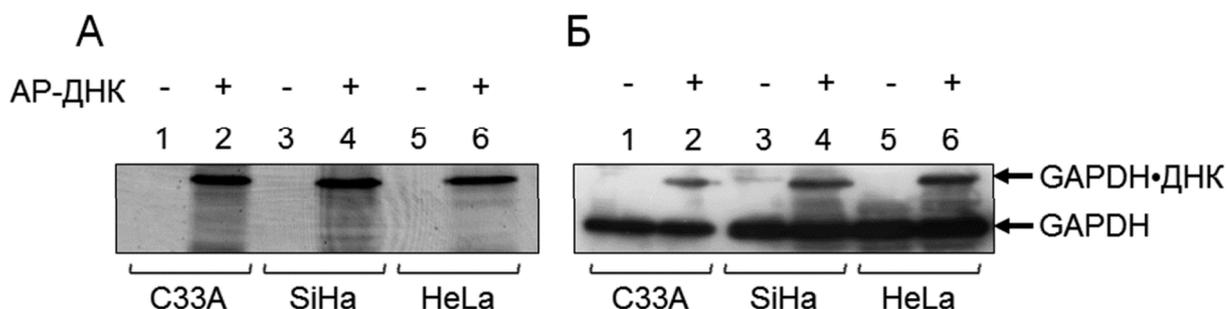


Рис. 3.11. Иммунодетекция GAPDH и ее аддуктов с AP-ДНК в клеточных экстрактах.

(А) Скан флуоресценции в геле после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли белков клеточных экстрактов (дор. 1, 3 и 5) и продуктов боргидрид-зависимой сшивки данных белков с 1 мкМ DDE-AP-ДНК 16А с флуоресцентной меткой (дор. 2, 4 и 6). Дор. 1 и 2 – цельноклеточный экстракт С33А (2 мг/мл); дор. 3 и 4 – цельноклеточный экстракт SiHa (2 мг/мл); дор. 5 и 6 – экстракт клеток HeLa, осажденный сульфатом аммония в диапазоне 66–88% от насыщения.

(Б) Иммунодетекция GAPDH (скан рентгеновской пленки). Белки из геля, изображенного на Рис. А, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и детектировали GAPDH методом вестерн-блоттинга, как описано в разд. 2.2.6.

При детекции флуоресцентной ДНК (рис. 3.11А, четные дорожки) во всех экстрактах регистрируются мажорные полосы с одинаковой электрофоретической подвижностью. При иммунодетекции (рис. 3.11Б) в нечетных дорожках регистрируется по одной основной полосе GAPDH, в четных дорожках дополнительно появляется еще по одной интенсивной полосе с электрофоретической подвижностью, соответствующей подвижности флуоресцентных продуктов (рис. 3.11А, четные дорожки). Таким образом, продукты сшивки белок–ДНК узнаются антителами к GAPDH. Это подтверждает, что GAPDH клеточных экстрактов способна образовывать сшивки с AP-сайтами.

3.2. Исследование взаимодействия Ku с ДНК, содержащими AP-сайты

3.2.1. Эффективность сшивки Ku с AP-сайтом зависит от структуры ДНК

Идентификация Ku80-субъединицы Ku-антигена как белка клеточных экстрактов человека, формирующего 100-кДа аддукт с DDE-AP-ДНК, не позволяет однозначно определить, какая из двух ее изоформ («классическая» Ku80 или KARP-1) входит в состав данного аддукта (разд. 3.1.2). Для решения данной проблемы Ku выделили из клеток HeLa (как описано в разд. 2.1.4) и провели подробный анализ его сшивки с DDE-AP-ДНК.

Кроме того, после того как было установлено, что Ku80-субъединица формирует разные аддукты с BE- и DDE-AP-ДНК, нашей целью было определение влияния структуры концов ДНК на набор аддуктов белок–ДНК. Появление дополнительного аддукта в случае DDE-AP-ДНК может быть обусловлено присоединением AP-ДНК к другим аминокислотам-акцепторам, которые находятся в благоприятном для протекания реакции положении из-за структурных особенностей комплекса Ku с таким типом AP-ДНК. На рис. 3.12Б сопоставлена эффективность сшивки белков экстракта клеток HeLa и очищенного Ku с BE-AP-ДНК (обозначена как 32A), DDE-AP-ДНК с выступающими оц концами протяженностью 5 или 8 нт (обозначены как 22A и 16A соответственно) и оц AP-ДНК.

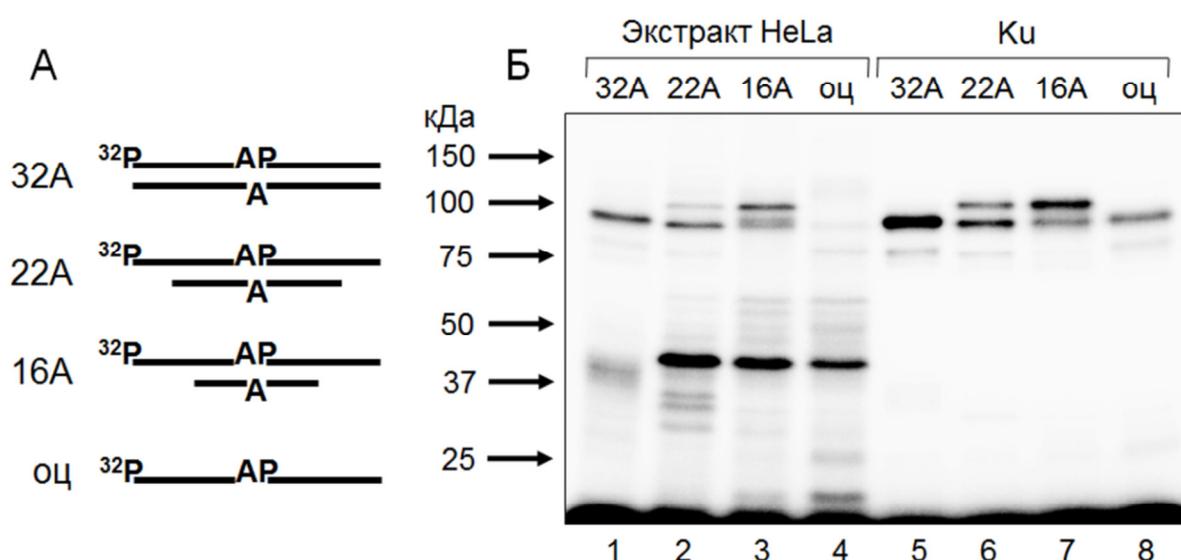


Рис. 3.12. Взаимодействие белков экстракта клеток HeLa и очищенного Ku с разными типами AP-ДНК.

(А) Схематическое изображение AP-ДНК-структур. Для создания всех AP-ДНК использовали меченую цепь U(16) (длиной 32 нт). ^{32}P и AP обозначают положение радиоактивной метки и AP-сайтов соответственно. Числа в названиях AP-ДНК (32, 22 или 16) обозначают длину комплементарной цепи в нуклеотидах. А обозначает основание напротив AP-сайта в комплементарной цепи. BE-AP-ДНК обозначена как 32A, DDE-AP-ДНК с 5'- и 3'-выступающими концами длиной 5 или 8 нт. обозначены как 22A и 16A соответственно.

(Б) Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли продуктов боргидрид-зависимой сшивки белков экстракта клеток HeLa (3 мг/мл, дор. 1–4) и очищенного Ku (250 нМ, дор. 5–8) с разными типами 500 нМ AP-ДНК. Типы AP-ДНК указаны на рисунке.

В случае ДНК 32A основной аддукт имеет молекулярную массу около 95 кДа (дор. 1 и 5). Однако с ДНК 22A и 16A Ku формирует два аддукта с молекулярными массами около 95 кДа и 100 кДа. Относительная интенсивность полос данных аддуктов зависит от длины выступающих концов AP-ДНК, причем полоса 100-кДа аддукта имеет бóльшую интенсивность в случае более длинных выступающих концов: сравните дор. 3 и 7 (выступающие концы длиной 8 нт) и дор. 2 и 6 (выступающие концы длиной 5 нт). Можно было бы предположить, что 95-кДа аддукт формирует протеолитический

фрагмент Ku80. Но такая возможность исключена, поскольку электрофоретический анализ очищенного Ku, использованного в работе, показывает, что данный препарат не содержит протеолитических фрагментов (рис. 3.13). Следовательно, как 100-кДа, так и 95-кДа аддукты сформированы «целой» Ku80-субъединицей. Кроме того, данный препарат не содержит в значимом количестве KARP-1 (изоформу Ku80 с мол. массой около 93 кДа), поэтому можно утверждать, что в состав аддуктов входит «классическая» Ku80. В экстракте клеток HeLa 100-кДа и 95-кДа аддукты, сформированные в реакциях с ДНК 22А и 16А, не являются преобладающими; в данном случае основной 45-кДа аддукт сформирован GAPDH (дор. 2 и 3) (разд. 3.1.3). Интересно, что очищенный Ku формирует 95-кДа аддукт с оц AP-ДНК (дор. 8), хотя и с меньшей эффективностью, чем с дуплексами 32А и 22А. Очень низкий выход данного аддукта в случае реакции с экстрактом клеток HeLa (дор. 4), как и в целом более низкий уровень пришивки Ku в составе экстракта по сравнению с очищенным Ku, по-видимому, является следствием конкуренции Ku с другими белками экстракта за связывание с ДНК.

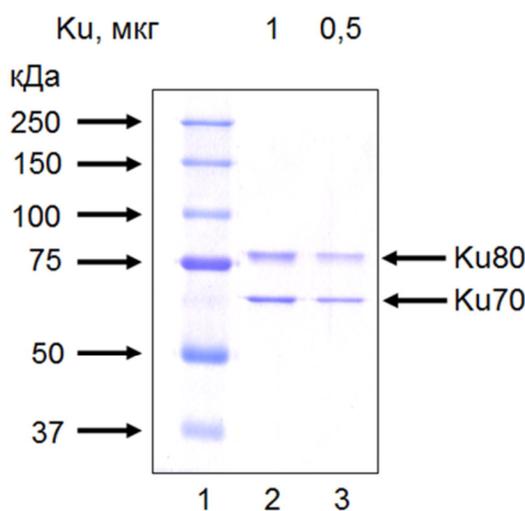


Рис. 3.13. Очищенный Ku (скан геля после окрашивания кумасси). Дор. 1 – маркеры молекулярной массы; дор. 2 и 3 – очищенный Ku (1 мкг и 0,5 мкг соответственно).

Существование двух продуктов сшивки, формируемых Ku80 с DDE-AP-ДНК, может быть следствием присоединения AP-ДНК к разным аминокислотам-мишеням. Зависимость электрофоретической подвижности ковалентных аддуктов белок–ДНК от точки присоединения ДНК была показана ранее [210]. Поскольку нельзя исключить вероятность того, что разные остатки лизина могут оказаться в благоприятных условиях для взаимодействия с AP-сайтами в различных ДНК-структурах, было изучено влияние положения AP-сайта в DDE-AP-ДНК и основания, расположенного напротив AP-сайта, на набор продуктов сшивки Ku с ДНК (как в составе экстракта, так и в чистом виде).

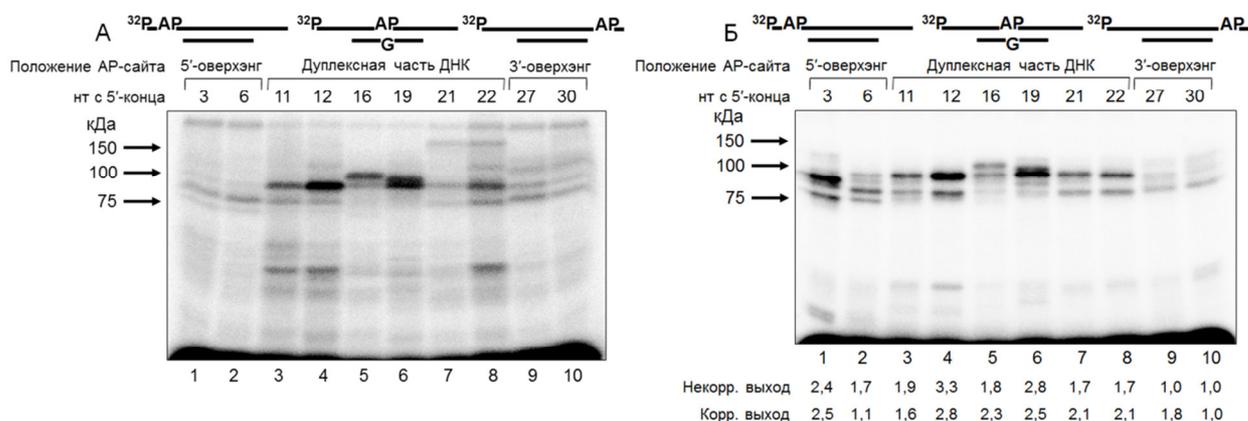


Рис. 3.14. Взаимодействие Ku с DDE-AP-ДНК зависит от расположения AP-сайта.

Радиоавтографы гелей после электрофоретического разделения в 12%-ных ПААГ по Лэммли 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. AP-сайты в позициях 11, 12, 16, 19, 21 и 22 находятся в дуплексной части AP-ДНК, AP-сайты в позициях 3, 6, 27 и 30 — на выступающих оц концах. Внизу рис. Б указаны относительные выходы продуктов сшивки. Наименьший выход (для ДНК с AP-сайтом в положении 30) принимали за 1, и относительно него нормировали выходы продуктов сшивки для других ДНК. В нижнем ряду представлены выходы, скорректированные с учетом удельной радиоактивности каждой из использованных ДНК, тогда как в верхнем ряду представлены нескорректированные значения.

Сначала варьировали положение AP-сайта в DDE-AP-ДНК с выступающими концами длиной 8 нт относительно 5'-конца меченого олигонуклеотида (рис. 3.14). Для получения набора дуплексов использовали 5'-меченые олигонуклеотиды с различным положением остатков урацила (от 3-го до 30-го) и комплементарную цепь Template 16G(G) (см. разд. 2.1.6). AP-сайты в положениях 11, 12, 16, 19, 21 и 22 расположены в дуплексной части AP-ДНК, тогда как AP-сайты в положениях 3, 6 и 27, 30 расположены на 5'- и 3'-выступающих оц концах соответственно. Следует отметить, что AP-сайты в дуплексной части ДНК во всех случаях располагаются напротив остатка dG. Поскольку AP-ДНК, использованные в этом эксперименте, имели различный уровень радиоактивности вследствие неодинаковой эффективности включения метки в олигонуклеотиды, наблюдаемая интенсивность полос не совсем верно отражает количественное распределение продуктов сшивки и поэтому может рассматриваться только на качественном уровне. С каждым из этих дуплексов Ku формирует разные наборы ковалентных аддуктов (рис. 3.14Б). Оценка относительного выхода продуктов сшивки, формируемых очищенным Ku с DDE-AP-ДНК с различным расположением AP-сайта, показана на рис. 3.14Б. Белки экстракта клеток HeLa формируют с этими AP-ДНК набор аддуктов с высоким выходом, который напоминает профиль сшивки, характерный для очищенного Ku, особенно в случае ДНК с AP-сайтами в дуплексной части (сравните дор. 3–8 на рис. 3.14А и Б). Интересно, что 100-кДа аддукт характерен только для ДНК с определенным положением AP-сайта. Он формируется только в случае,

когда AP-сайт расположен в середине радиоактивно меченой цепи DDE-AP-ДНК (положение 16) (дор. 5 на рис. 3.14А и Б). Другие белки экстракта оказывают более выраженный ингибирующий эффект на сшивку Ku с AP-сайтами, расположенными на оц 5'-конце (сравните дор. 1 и 2 на рис. 3.14А и Б), чем с AP-сайтами в других положениях.

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. 3.15Б и А соответственно). Количественный анализ выхода продуктов сшивки очищенного Ku показан на рис. 3.15В. Видно, что эффективность сшивки Ku зависит как от типа AP-ДНК, так и от основания напротив AP-сайта. В частности, в DDE-AP-ДНК Ku более эффективно взаимодействует с апуриновыми сайтами, чем с апириимидиновыми (рис. 3.15Б, сравните дор. 3 и 4 с дор. 1 и 2). Аналогичная тенденция наблюдается в реакциях с белками экстракта клеток HeLa (рис. 3.15А). В то же время, в случае VE-AP-ДНК Ku, по крайней мере, в чистом виде, не проявляет аналогичной специфичности, демонстрируя даже более низкую эффективность сшивки с апуриновыми сайтами, чем с апириимидиновыми.

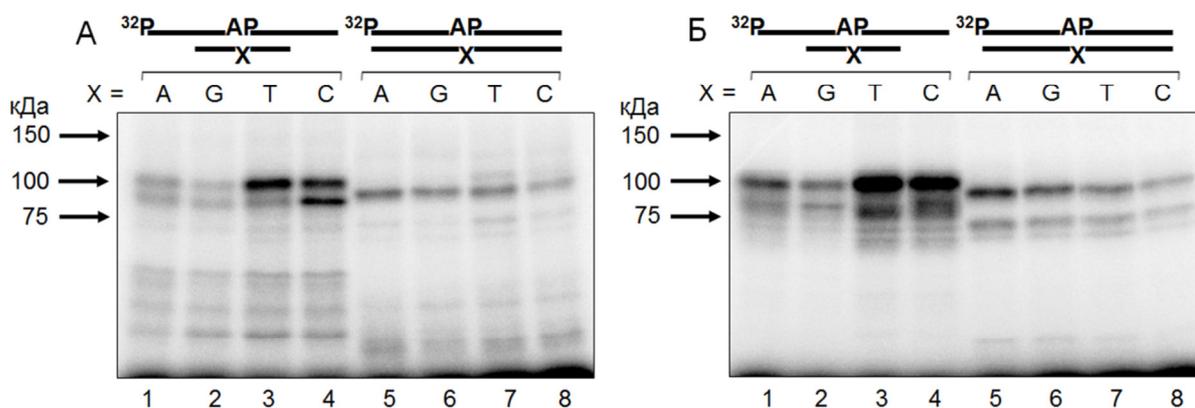
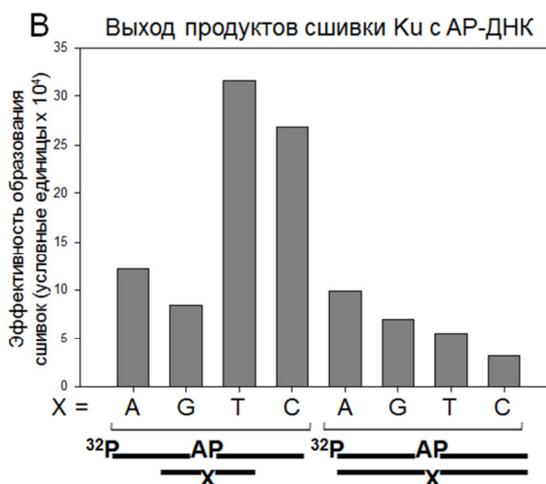


Рис. 3.15. Взаимодействие Ku с AP-ДНК зависит от основания напротив AP-сайта.

Радиоавтографы гелей после электрофоретического разделения в 10%-ных ПААГ по Лэммли 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 – VE-AP-ДНК. В – диаграмма, построенная на основе рис. Б и показывающая относительный выход продуктов сшивки Ku. На рисунке указаны типы AP-ДНК и основания напротив AP-сайта.



3.2.2. Ku расщепляет DDE-АР-ДНК, проявляя специфичность по отношению к апуриновым сайтам

Способность белка взаимодействовать с АР-сайтами посредством формирования основания Шиффа обычно связана с АР/dRP-лиазной активностью. [3, 11, 17, 19, 72, 74, 211, 212]. С другой стороны, также было показано взаимодействие белков с АР-ДНК без последующего расщепления АР-сайта [14, 18, 56, 213]. Взаимодействие Ku с АР-сайтом может сопровождаться либо не сопровождаться его расщеплением в зависимости от структуры ДНК, в составе которой находится АР-сайт (разд. 1.2.3).

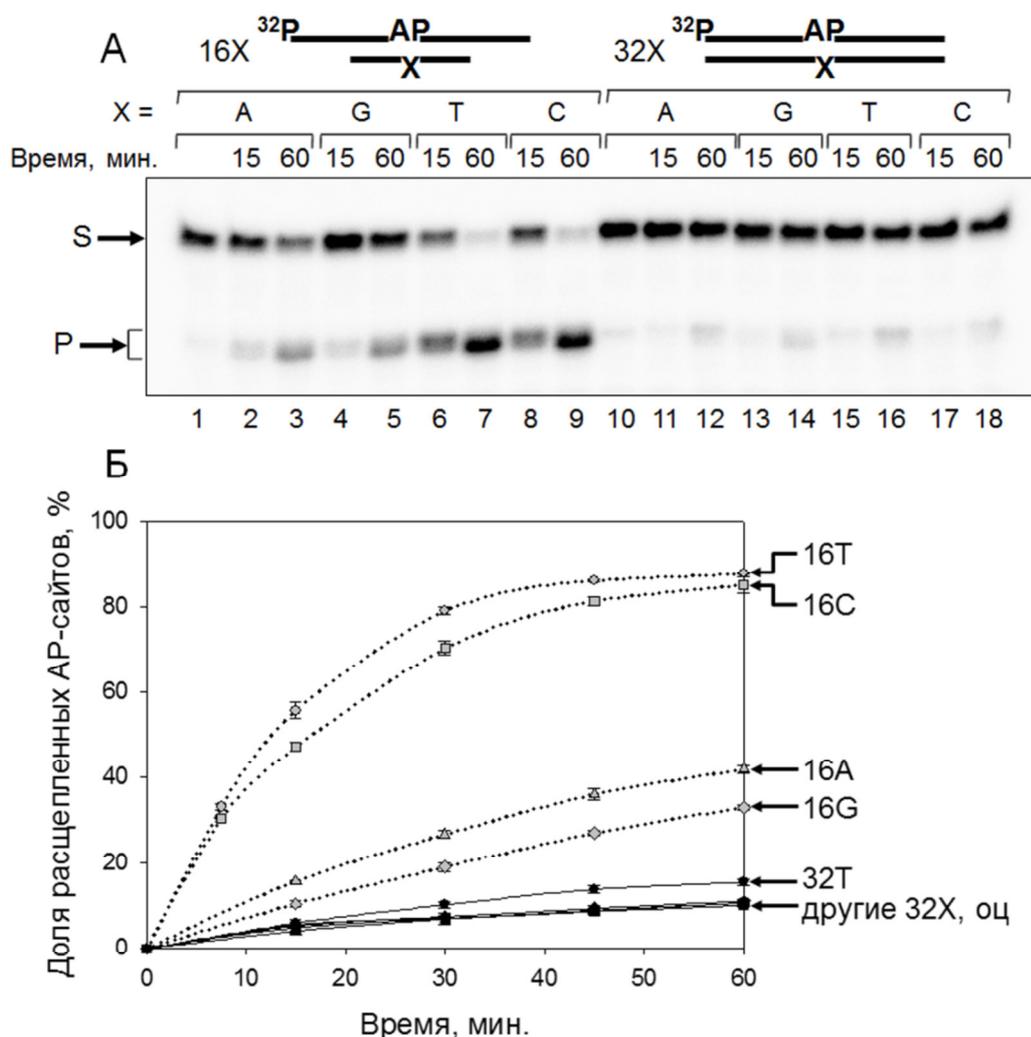


Рис. 3.16. Сравнительная эффективность расщепления АР-сайта Ku в DDE- и VE-АР-ДНК с различными основаниями напротив АР-сайта.

(А) Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной АР-ДНК с различными основаниями напротив АР-сайта после их инкубации с Ku. 250 нМ Ku инкубировали в течение 15 мин или 60 мин с 50 нМ DDE-АР-ДНК (дор. 2, 4, 6, 8 и 3, 5, 7, 9) или 50 нМ VE-АР-ДНК (дор. 11, 13, 15, 17 и 12, 14, 16, 18). На рисунке указаны типы АР-ДНК и основания напротив АР-сайта. Дор. 1 и 10 – DDE-АР-ДНК и VE-АР-ДНК соответственно, инкубированные в отсутствие белков при 37 °С в течение 60 мин. S – исходные субстраты (32-мерные АР-ДНК), P – продукты расщепления АР-сайта Ku.

(Б) Кинетические кривые расщепления Ku-антигеном АР-сайтов в составе разных типов ДНК. 50 нМ АР-ДНК инкубировали с 250 нМ Ku в течение 60 мин, отбирая аликвоты каждые 15 мин (а также после 7,5 мин инкубации в случае АР-ДНК 16Т и 16С). Был вычислен процент расщепленной АР-ДНК. Эксперимент повторяли трижды и вычисляли стандартное отклонение для каждой точки. DDE-АР-ДНК с различными основаниями напротив АР-сайта обозначены как 16X, VE-АР-ДНК — как 32X.

После обнаружения способности Ku эффективно образовывать сшивки с апуриновыми сайтами в DDE-AP-ДНК большой интерес представляла оценка способности очищенного Ku расщеплять AP-сайты в составе различных структур ДНК. Пример эксперимента для анализа уровня расщепления AP-сайта в DDE- и VE-AP-ДНК показан на рис. 3.16. Интересно, что Ku проявляет специфичность по отношению к DDE-AP-ДНК с dT или dC напротив AP-сайта (рис. 3.16А, дор. 6, 7 и 8, 9). 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. 3.16А, дор. 2–5). VE-AP-ДНК с различными основаниями напротив AP-сайта (рис. 3.16А, дор. 11–18) и оц AP-ДНК (данные не показаны) являются наименее предпочтительными субстратами: Ku расщепляет не более 10% AP-сайтов в них за 60 мин. Уровень спонтанного расщепления всех использованных AP-ДНК не превышает 5% за 60 мин (рис. 3.16А, дор. 1 и 10). Следует отметить, что очищенный Ku формирует 95-кДа аддукт как с VE-AP-ДНК, так и с оц AP-ДНК (рис. 3.12Б); низкий уровень расщепления в данном случае свидетельствует о том, что такой тип взаимодействия Ku с AP-ДНК является непродуктивным. Кинетические кривые расщепления AP-сайта Ku-антигеном показаны на рис. 3.16Б. Уровень расщепления апуринового сайта в составе DDE-AP-ДНК на порядок выше, чем в составе VE-AP-ДНК. Это может быть обусловлено различием в конформации AP-ДНК в зависимости от основания, расположенного напротив AP-сайта. Угол изгиба ДНК по положению апуринового сайта выше, чем апиримидинового [214].

Следует отметить, что существует корреляция между разным выходом необычных 100-кДа аддуктов, формируемых Ku с апуриновыми и апиримидиновыми сайтами, и эффективностью расщепления этих двух типов AP-сайтов в составе DDE-AP-ДНК. Как показано выше, при взаимодействии очищенного Ku с DDE-AP-ДНК формируется несколько продуктов сшивки, при этом две верхние более интенсивные полосы в соответствии с их кажущимися молекулярными массами можно отнести к Ku80-субъединице (рис. 3.12Б, дор. 7). Принимая во внимание способность Ku довольно эффективно расщеплять AP-сайты в составе данного типа AP-ДНК, можно предположить, что 100-кДа и 95-кДа полосы, относящиеся к Ku80, могут соответствовать аддукту Ku80 с нерасщепленным AP-сайт-содержащим олигонуклеотидом и аддукту Ku80 с 5'-концевой частью олигонуклеотида, расщепленного по положению AP-сайта соответственно. Такие типы аддуктов были ранее обнаружены для бифункциональных ДНК-гликозилаз (например, в работе [62]). Чтобы прояснить данный вопрос, была проведена сшивка Ku с VE- и DDE-AP-ДНК, содержащими радиоактивную метку на 5'- или 3'-конце (рис. 3.17).

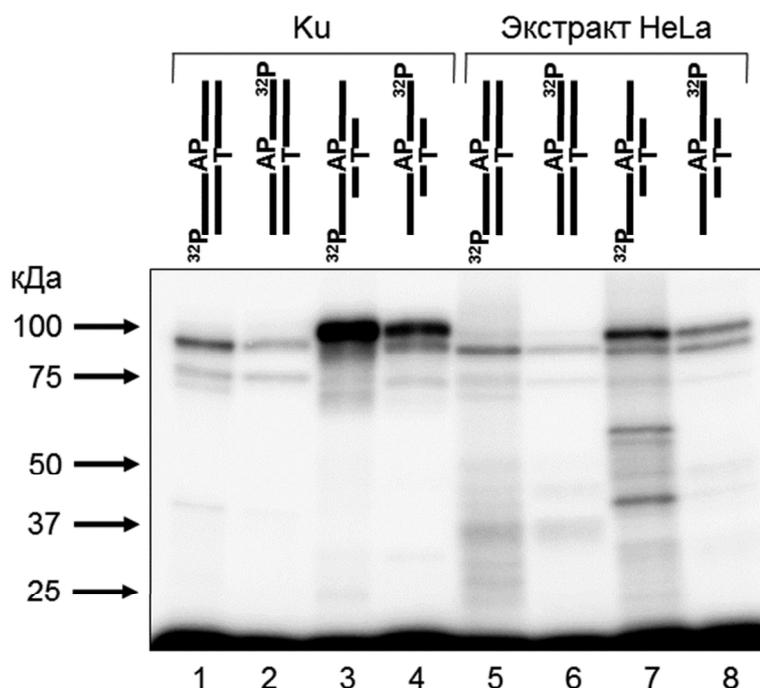


Рис. 3.17. Ku формирует аддукты с AP-ДНК, содержащими радиоактивную метку на 5'- или 3'-конце. Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли продуктов боргидрид-зависимой сшивки очищенного Ку (250 нМ) (дор. 1–4) и белков экстракта клеток HeLa (3 мг/мл) (дор. 5–8) с 500 нМ BE-AP-ДНК 32Т (дор. 1, 2 и 5, 6) и 500 нМ DDE-AP-ДНК 16Т (дор. 3, 4 и 7, 8), мечеными с 5'-конца (дор. 1, 3, 5, 7) или с 3'-конца (дор. 2, 4, 6, 8).

Аддукты белок–ДНК, содержащие 5'-концевую часть AP-сайт-содержащей цепи, если они существуют, «невидимы» в том случае, когда метка находится на 3'-конце цепи. Анализ данных, полученных с использованием DDE-AP-ДНК, показывает, что 95-кДа продукт, относящийся к Ku80, наблюдается в случае 3'-меченой ДНК (дор. 4); таким образом, можно утверждать, что аддукт содержит нерасщепленную цепь. Более низкий выход продуктов в случае 3'-меченых AP-ДНК может быть обусловлен менее эффективным связыванием Ку с такими ДНК из-за отсутствия 5'-концевого фосфата. Как было показано ранее, ДНК с AP-сайтами в составе 5'-концевого одноцепочечного участка с 5'-концевой фосфатной группой более эффективно расщепляются Ку по сравнению с аналогичными субстратами с 5'-концевой гидроксильной группой [115]. Анализ данных, полученных с использованием BE-AP-ДНК (дор. 1 и 2), также показывает, что аддукты, сформированные Ku80, содержат нерасщепленную цепь. Аналогичное распределение продуктов сшивки наблюдается для Ку в составе экстракта клеток HeLa (рис. 3.17, дор. 5–8). Интересно, что распределение продуктов сшивки, которые могут быть сформированы Ku70, зависит от расположения метки. В случае 3'-меченых AP-ДНК отсутствует полоса с более высокой электрофоретической подвижностью (сравните дор. 2 и 4 с дор. 1 и 3). Это позволяет предположить, что в случае 5'-меченых AP-ДНК продукты, относящиеся к

Ku70, содержат интактную цепь (верхняя полоса) и 5'-концевой фрагмент цепи (нижняя полоса).

3.2.3. Ku расщепляет AP-сайты по механизму β -элиминирования: репарация AP-сайтов в DDE-AP-ДНК, инициированная Ku

В клетках высших эукариот существует несколько механизмов расщепления AP-сайтов (разд. 1.1.1, рис. 1.1): гидролиз, катализируемый APE1, с формированием на 3'-конце цепи ДНК ОН-группы, а также β - и β,δ -элиминирование, катализируемое, в частности, бифункциональными ДНК-гликозилазами и опосредованное образованием основания Шиффа, с формированием на 3'-конце цепи ДНК 3'-PUA или 3'-фосфата соответственно [7].

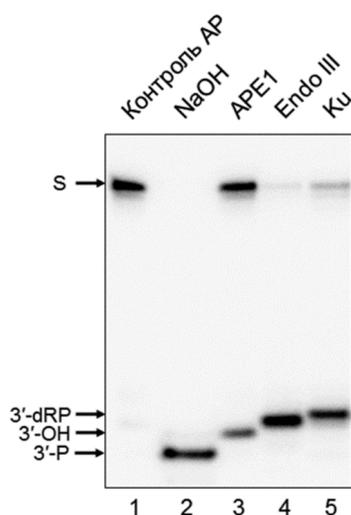


Рис. 3.18. Ku расщепляет DDE-AP-ДНК по механизму β -элиминирования.

Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной различных продуктов расщепления DDE-AP-ДНК 16С. Дор. 1 – 10 нМ AP-ДНК, инкубированная в течение 60 мин при 37 °С; дор. 2 – AP-ДНК, инкубированная в присутствии 100 мМ NaOH в течение 5 мин при 97 °С (условия β,δ -элиминирования); дор. 3 – AP-ДНК, инкубированная с 1 нМ APE1 в течение 10 мин; дор. 4 – AP-ДНК, инкубированная с 10 нМ Endo III в течение 10 мин; дор. 5 – AP-ДНК, инкубированная с 100 нМ Ku в течение 60 мин. Стрелками отмечены разные продукты реакций и исходный субстрат.

Ранее была показана способность Ku расщеплять AP-сайты в составе оц участков AP-ДНК-субстратов или в непосредственной близости от перехода оц ДНК в дц по механизму β -элиминирования [11, 115]. В то же время, Ku неактивен в расщеплении AP-сайтов, находящихся в глубине дц части ДНК, хотя формирует основание Шиффа с такими AP-сайтами [11, 14]. Обнаруженное в настоящей работе эффективное расщепление Ku-антигеном апуриновых сайтов в дц части DDE-AP-ДНК с формированием необычного 100-кДа аддукта (что позволяет предположить участие других первичных аминогрупп белка в формировании основания Шиффа) заново ставит вопрос о механизме расщепления AP-сайтов. Без детального электрофоретического анализа с высоким разрешением, который позволяет разделить олигонуклеотиды с различной структурой концов,

невозможно различить β - и β,δ -элиминирование. С этой целью был проведен сравнительный электрофоретический анализ продукта Ku-зависимого расщепления цепи ДНК по положению AP-сайта с аналогичными продуктами, для которых известна структура образующихся 3'-концевых групп: продукт β,δ -элиминирования (рис. 3.18, дор. 2), продукт гидролиза (дор. 3) и продукт β -элиминирования (дор. 4). В результате расщепления 10 нМ DDE-AP-ДНК 16С 100 нМ Ku в течение 60 мин при 37 °С образуется продукт (дор. 5), близкий по электрофоретической подвижности к 15-меру, который получается в результате β -элиминирования под действием Endo III и содержит 3'-PUA.

Тем не менее, продукты расщепления AP-сайта под действием Endo III и Ku немного отличаются друг от друга по электрофоретической подвижности. Продукт с меньшим выходом, точно соответствующий продукту, получающемуся под действием Endo III, регистрировали при более длительной экспозиции; такие дублеты наблюдаются на рис. 3.19А (дор. 1) и 3.19Б (дор. 1–3). Продукты β -элиминирования на электрофореграммах обычно представляют собой диффузные двойные полосы [215–217]. Дублет может образоваться в результате взаимодействия 3'-PUA с буферными компонентами, такими как 2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол (Трис) или тиолы, и/или О-метилгидроксиламин, используемым для стабилизации AP-сайтов. Более того, два продукта наблюдали даже в отсутствие тиолов, и в этом случае их считали результатом изомеризации 3'-PUA ([216, 217] и ссылки в данных работах).

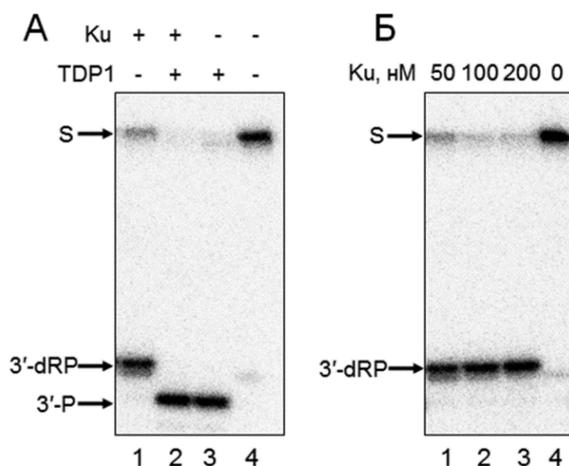


Рис. 3.19. (А) Добавление TDP1 после инкубации DDE-AP-ДНК с Ku приводит к удалению остатка 3'-PUA, в результате чего получается продукт с 3'-фосфатом.

Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной продуктов расщепления DDE-AP-ДНК Ku-антигеном и/или TDP1. Дор. 1 – 10 нМ AP-ДНК, инкубированная с 100 нМ Ku; дор. 2 – AP-ДНК, инкубированная последовательно с 100 нМ Ku и 100 нМ TDP1; дор. 3 – AP-ДНК, инкубированная с 100 нМ TDP1; дор. 4 – AP-ДНК, инкубированная в отсутствие белков в течение 60 мин при 37 °С.

(Б) Выход продукта расщепления DDE-AP-ДНК Ku-антигеном незначительно повышается с увеличением концентрации белка.

Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной продуктов расщепления DDE-AP-ДНК (10 нМ) Ku-антигеном (дор. 1 – 50 нМ; дор. 2 – 100 нМ; дор. 3 – 200 нМ); дор. 4 – AP-ДНК, инкубированная в отсутствие белков в течение 60 мин при 37 °С.

Чтобы доказать, что Ku расщепляет AP-сайты по механизму β -элиминирования, проводили последовательную инкубацию DDE-AP-ДНК с Ku в течение 60 мин и с TDP1 в течение 30 мин (рис. 3.19А). Как и ожидалось, после добавления TDP1 продукт, полученный в результате расщепления под действием Ku, превращается в продукт с фосфатом на 3'-конце (дор. 2). Увеличение концентрации Ku с 50 нМ до 200 нМ приводит к небольшому увеличению доли расщепленной ДНК, при этом других продуктов не появляется (рис. 3.19Б).

Наконец, была проанализирована репарация AP-сайта в минимальной реконструированной системе, состоящей из очищенных белков (рис. 3.20).

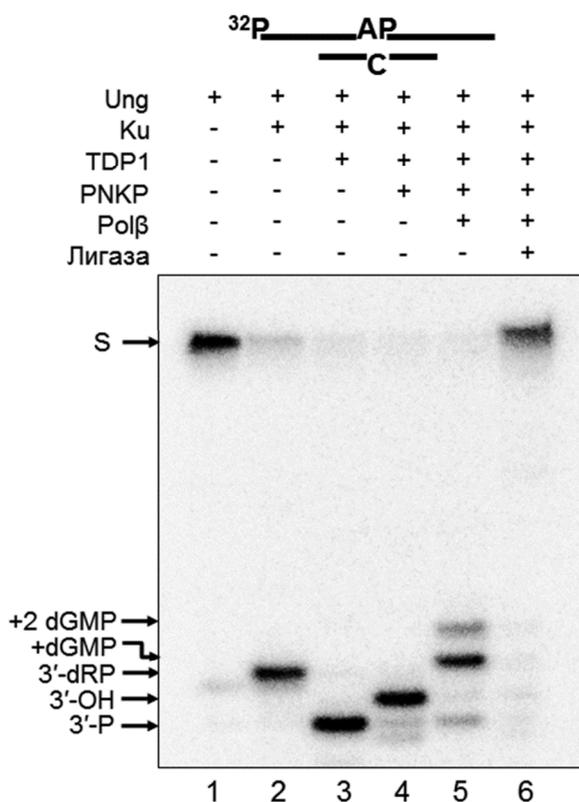


Рис. 3.20. Репарация AP-сайта, инициируемая Ku.

Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной продуктов, полученных при инкубации DDE-ДНК 16С (10 нМ) с различными комбинациями ферментов, осуществляющих последовательные этапы репарации AP-сайта. ДНК предварительно инкубировали сначала с Ung (дор. 1–6), затем с 100 нМ Ku (дор. 2–6). После этого добавляли различные комбинации 100 нМ TDP1 (дор. 3–6), 10 нМ PNKP (дор. 4–6), 100 нМ Pol β (дор. 5–6) и ДНК-лигазы T4 (5 ед. акт./мкл) (дор. 6). Сверху указаны компоненты, представленные в разных реакционных смесях.

DDE-ДНК 16С была предварительно обработана Ung в течение 30 мин при 37 °С для получения AP-сайтов. Затем AP-ДНК инкубировали с Ku в течение 60 мин при 37 °С, чтобы позволить Ku осуществить расщепление AP-сайта без участия TDP1. После этого в реакционные смеси добавляли различные комбинации TDP1, PNKP, Pol β и ДНК-лигазы T4 и инкубировали в течение 16 ч при 15 °С. Инкубацию проводили при пониженной температуре с целью сохранения дуплексной формы ДНК-субстрата,

поскольку после расщепления AP-сайта под действием Ku температура плавления получившейся ДНК-структуры резко снижается.

При инкубации в вышеописанных условиях под действием Ku получается продукт с 3'-PUA (дор. 2). Добавление TDP1 приводит к появлению 15-мерного продукта с фосфатом на 3'-конце (дор. 3). Затем PNKP удаляет 3'-фосфат, в результате чего на 3'-конце остается OH-группа (дор. 4), и Pol β заполняет брешь, используя dGTP в качестве субстрата. Праймер, удлинённый на один dGMP, имеет приблизительно такую же подвижность, как и продукт β -элиминирования с 3'-PUA. Интересно, что Pol β в отсутствие ДНК-лигазы может встраивать дополнительный нуклеотидный остаток (дор. 5). Наконец, ДНК-лигаза восстанавливает целостность сахарофосфатного остова ДНК (дор. 6). Таким образом, Ku может инициировать репарацию AP-сайта, которую продолжают ферменты, осуществляющие последующие стадии процессинга AP-сайта, создавая продукты ожидаемой структуры на каждой промежуточной стадии.

В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что Ku может инициировать репарацию AP-сайтов в составе определенных ДНК, структуры которых можно рассматривать как кластерные повреждения ДНК, содержащие AP-сайты и оц участки. Поскольку Ku предпочтительно расщепляет апуриновые сайты в составе таких структур, можно предположить, что апуриновые сайты подвергаются репарации по данному механизму более эффективно, чем апиридиновые.

Следует отметить, что при физиологических условиях уровень гидролиза *N*-гликозидной связи в пуриновых дезоксирибонуклеотидах на 1–2 порядка выше, чем в пиримидиновых [24–26]. *N*-гликозидная связь может быть ослаблена под действием химических модификаций, мишенью которых чаще становятся пуриновые основания [27]. Например, основным сайтом метилирования ДНК под действием темозоломида, химиотерапевтического алкилирующего агента, является позиция N7 гуанина (>70%), затем следуют позиции N3 аденина (9,2%) и O6 гуанина (5%) [218]. За репарацию первых двух повреждений отвечает система ЭРО; их репарация инициируется метилпурин-ДНК-гликозилазой, которая не обладает AP-лиазной активностью, оставляя нерасщепленные апуриновые сайты. Независимый от активности APE1 путь репарации AP-сайтов в составе сложных повреждений может реализовываться при дефиците AP-эндонуклеазной активности, в частности, при фармакологическом ингибировании активности APE1, которое в некоторых случаях используется для усиления действия темозоломида [219]. Кроме того, заслуживает внимания тот факт, что среди разных типов повреждений ДНК, которые присутствуют в пределах 8–10 пар оснований возле дц разрывов, вызванных ионизирующим излучением, чаще всего встречаются AP-сайты [10].

Безусловно, для определения физиологической роли этого типа взаимодействия Ku с AP-сайтами требуются дальнейшие исследования. Однако, учитывая данные свойства Ku, можно предположить, что он играет роль в репарации AP-сайтов в составе некоторых сложных повреждений ДНК, составной частью которых являются двухцепочечные разрывы с выступающими одноцепочечными участками. Возможность опосредованного Ku пути репарации AP-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.

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

3.3.1. GAPDH взаимодействует с ДНК, содержащими AP-сайты

Для детального изучения взаимодействия GAPDH с AP-ДНК данный белок был выделен из культивируемых клеток человека (HeLa) (см. разд. 2.1.4). Сначала была сопоставлена способность GAPDH из мышц кролика и GAPDH человека формировать аддукты с DDE-AP-ДНК (рис. 3.21А). Оба белка примерно с одинаковой эффективностью формируют по два боргидрид-зависимых аддукта: основной 45-кДа аддукт и минорный 50-кДа аддукт (дор. 2 и 4). Сравнивая подвижность белковых маркеров молекулярных масс и данных аддуктов белок–ДНК, невозможно точно определить молекулярные массы последних (однако можно определить их относительные массы). 45-кДа аддукты, возможно, формируются GAPDH с расщепленной AP-ДНК (которая имеет молекулярную массу около 5 кДа), тогда как 50-кДа аддукты, выход которых меньше, могут формироваться с участием интактной (нерасщепленной) AP-ДНК (молекулярная масса около 10 кДа). Интересно, что 45-кДа аддукты наблюдаются даже в тех случаях, когда в реакционные смеси не был добавлен боргидрид (дор. 1 и 3), хотя их выход меньше, чем выход 45-кДа аддуктов, сформированных в присутствии боргидрида (дор. 2 и 4). Около 30% формирующихся сшивок GAPDH–AP-ДНК являются боргидрид-независимыми. Эти данные свидетельствуют о том, что GAPDH (по крайней мере, частично) может ковалентно связываться с AP-сайтами по механизму, отличающемуся от формирования оснований Шиффа. AP-сайт-зависимое и боргидрид-независимое формирование сшивок между белком и ДНК было показано для нескольких белков, включая XRCC1 [18], ALKBH1 [19] и PARP1 [20].

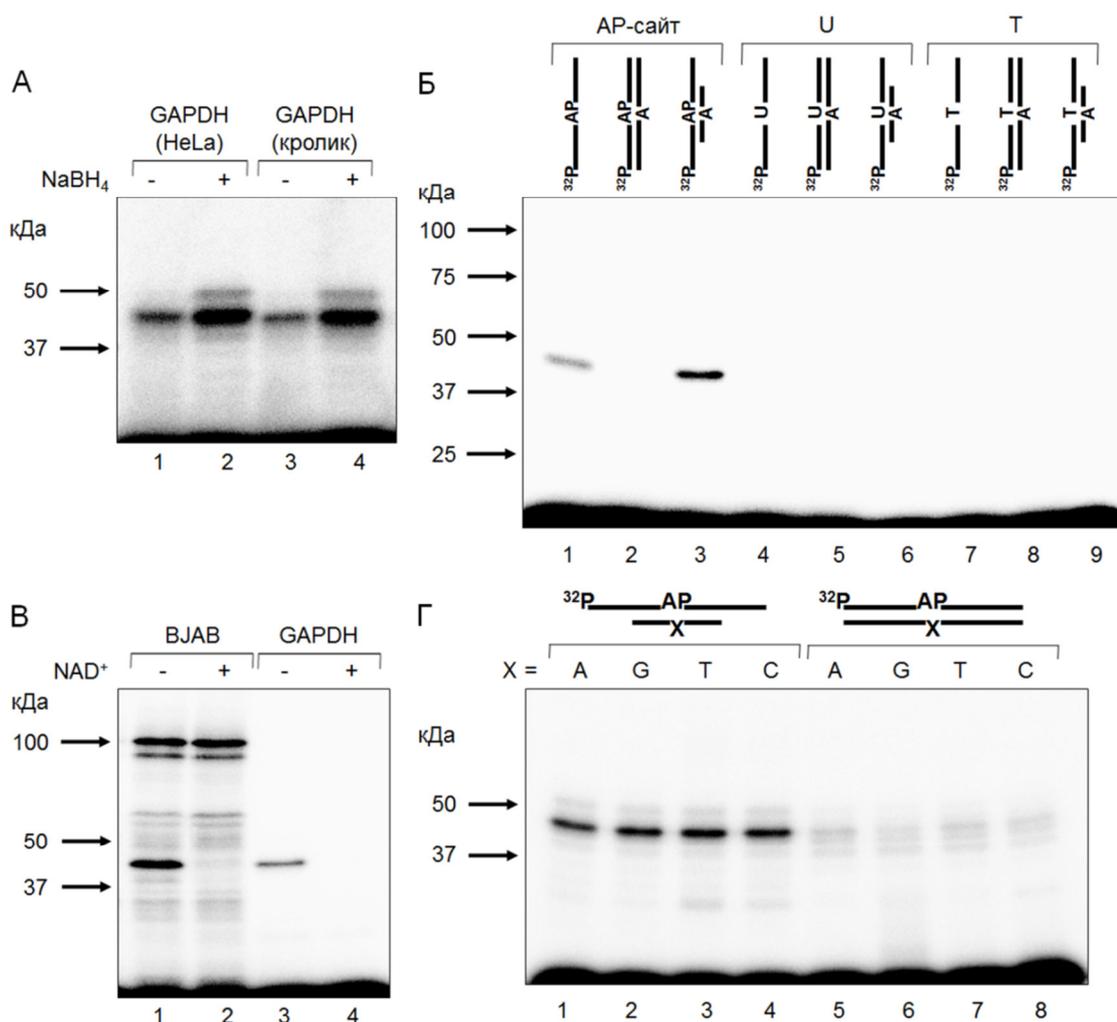


Рис. 3.21. Взаимодействие очищенной GAPDH с AP-ДНК.

(А) Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли аддуктов 2,5 мкМ GAPDH, выделенной из клеток HeLa (дор. 1 и 2) и мышц кролика (дор. 3 и 4), с 500 нМ DDE-AP-ДНК 16A. Реакционные смеси, представленные на дор. 2 и 4, перед электрофоретическим разделением обрабатывали NaBH_4 , в случае дор. 1 и 3 обработку не проводили.

(Б) Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли продуктов боргидрид-зависимой сшивки 2,5 мкМ GAPDH, выделенной из клеток HeLa, с разными типами 500 нМ ДНК. В реакциях использовали AP-ДНК (дор. 1 – оц; дор. 2 – BE-ДНК; дор. 3 – DDE-ДНК), урацил-содержащие ДНК (дор. 4 – оц; дор. 5 – BE-ДНК; дор. 6 – DDE-ДНК), тимин-содержащие ДНК (дор. 7 – оц; дор. 8 – BE-ДНК; дор. 9 – DDE-ДНК) и GAPDH, выделенную из клеток HeLa. Перед электрофоретическим разделением реакционные смеси обрабатывали NaBH_4 .

(В) Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли продуктов боргидрид-зависимой сшивки белков экстракта клеток BJAB (2 мг/мл) (дор. 1 и 2) и очищенной GAPDH (2,5 мкМ) (дор. 3 и 4) с 500 нМ DDE-AP-ДНК 16A в отсутствие NAD^+ (дор. 1 и 3) или в присутствии этого соединения (дор. 2 и 4).

(Г) Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли продуктов боргидрид-зависимой сшивки 2,5 мкМ GAPDH с 500 нМ DDE-AP-ДНК (дор. 1–4) и 500 нМ BE-AP-ДНК (дор. 5–8) с различными основаниями напротив AP-сайта.

Кроме того, была сопоставлена эффективность сшивки GAPDH, выделенной из клеток HeLa, с AP-ДНК и «обычной» ДНК, содержащей остаток U или T на месте AP-сайта (рис. 3.21Б). Выход аддуктов GAPDH немного больше для DDE-AP-ДНК, чем для оц AP-ДНК (сравните дор. 3 и 1), а в случае BE-AP-ДНК аддукты отсутствуют (дор. 2). Следует отметить, что ни урацил-содержащие (дор. 4–6), ни тимин-содержащие ДНК (дор. 7–9) не формируют сшивок с GAPDH, что свидетельствует о необходимости

присутствия в ДНК AP-сайта для формирования аддукта GAPDH–ДНК. Образование сшивок с урацил-содержащей ДНК можно было ожидать, исходя из литературных данных о наличии у GAPDH урацил-ДНК-гликозилазной активности [184].

Ранее было показано, что NAD^+ ингибирует связывание GAPDH с ДНК [161]. Анализ влияния NAD^+ на сшивку GAPDH с DDE-AP-ДНК продемонстрировал, что 1 мМ NAD^+ практически полностью ингибирует формирование 45-кДа аддукта очищенной GAPDH человека (рис. 3.21В, дор. 4); схожие данные были получены с использованием экстракта клеток ВJAB (для этого экстракта характерен большой выход относимого к GAPDH 45-кДа аддукта по сравнению с экстрактом клеток HeLa) (рис. 3.21В, дор. 2). Эти данные косвенно подтверждают то, что 45-кДа белковый продукт сшивки в клеточных экстрактах относится к GAPDH.

Данные анализа влияния структуры AP-ДНК и основания напротив AP-сайта на формирование боргидрид-зависимых аддуктов с GAPDH, выделенной из клеток HeLa, представлены на рис. 3.21Г. GAPDH эффективно формирует боргидрид-зависимые продукты с DDE-AP-ДНК (дор. 1–4) и несколько продуктов с низким выходом с BE-AP-ДНК (дор. 5–8) независимо от типа основания напротив AP-сайта. Аналогичное соотношение выхода продуктов сшивки GAPDH с DDE-AP-ДНК и BE-AP-ДНК характерно и для клеточных экстрактов (рис. 3.1). Следует отметить, что эффективность сшивки GAPDH с AP-ДНК, в отличие от сшивки Ku, не зависит от основания напротив AP-сайта.

С использованием DDE-AP-ДНК была оценена способность очищенной GAPDH расщеплять AP-сайты (рис. 3.22). Даже после инкубации с большим избытком белка в течение 1 ч отсутствуют продукты, соответствующие расщепленному олигонуклеотиду (дор. 4–8). Контрольный эксперимент (дор. 3) показывает расщепление AP-сайта ДНК-гликозилазой Endo III *E. coli*, подтверждая полное превращение исходной урацил-содержащей ДНК в AP-ДНК. GAPDH из мышц кролика также не обладает AP-лиазной активностью (данные не показаны). Таким образом, несмотря на формирование основания Шиффа, которое является характерным интермедиатом, формирующимся в процессе расщепления AP-сайта по механизму β -элиминирования, GAPDH не проявляет AP-лиазную активность. С использованием специфических субстратов была оценена способность GAPDH удалять 5'-dRP (5'-dRP-лиазная активность). Оказалось, что GAPDH не отщепляет 5'-dRP-группы ни в одноцепочечной ДНК 17-U(1) (разд. 2.1.6), ни в разрыве в двухцепочечной части DDE-AP-ДНК (данные не показаны).

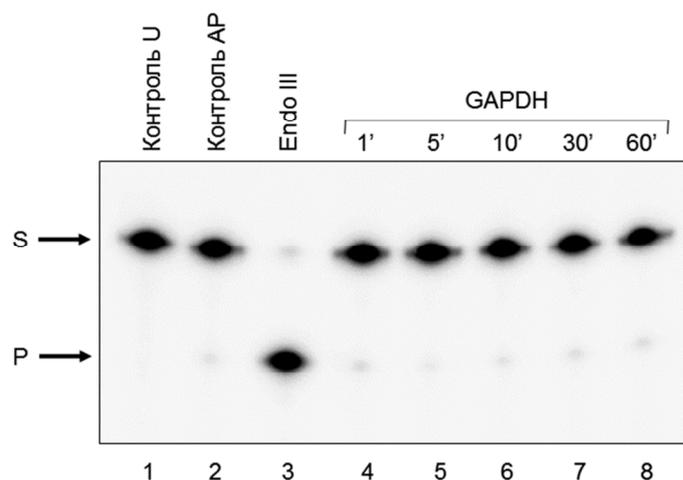


Рис. 3.22. GAPDH не проявляет AP-лиазную активность в отношении DDE-AP-ДНК.

Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной 100 нМ DDE-AP-ДНК 16A после ее инкубации с 2 мкМ GAPDH или 10 нМ Endo III. Дор. 1 – контрольная урацил-содержащая ДНК; дор. 2 – контрольная AP-ДНК; дор. 3 – AP-ДНК, инкубированная в присутствии Endo III; дор. 4–8 – AP-ДНК, инкубированная в присутствии GAPDH в течение 1, 5, 10, 30 и 60 мин соответственно. S – субстрат (нерасщепленная AP-ДНК); P – продукт β -элиминирования.

Ввиду отсутствия AP-лиазной активности у GAPDH можно предположить, что ДНК в составе ковалентного аддукта с GAPDH представляет собой нерасщепленный AP-сайт-содержащий олигонуклеотид. Следует отметить, что для бифункциональных ДНК-гликозилаз, расщепляющих AP-сайты по механизму β -элиминирования, удается зарегистрировать продукты боргидрид-зависимой сшивки как с полноразмерным AP-сайт-содержащим олигонуклеотидом, так и с его 5'-концевой частью, получающейся в результате β -элиминирования; данные два типа аддуктов имеют разную электрофоретическую подвижность, зависящую от длины ДНК в составе аддукта.

Для определения природы ДНК в составе аддукта с GAPDH использовали сшивку с оц AP-ДНК и DDE-AP-ДНК, содержащими радиоактивную метку на 5'- или 3'-конце, а также сшивку с DDE-AP-ДНК в присутствии ДНК-гликозилазы/AP-лиазы Endo III (рис. 3.23). Анализ продуктов сшивки показывает, что основной продукт сшивки GAPDH–AP-ДНК соответствует белковому аддукту с 5'-концевой частью AP-сайт-содержащего олигонуклеотида, поскольку AP-ДНК с меткой на 3'-конце не формирует радиоактивно меченых аддуктов (рис. 3.23А, дор. 2 и 4). В случае DDE-AP-ДНК (дор. 3) наблюдается небольшое количество продукта с более низкой электрофоретической подвижностью, который может соответствовать аддукту GAPDH с нерасщепленной AP-ДНК. Совпадение электрофоретической подвижности продуктов сшивки GAPDH с DDE-AP-ДНК, меченой по 5'-концу, в присутствии и в отсутствие ДНК-гликозилазы Endo III подтверждает это предположение (сравните дор. 2 и 1 на рис. 3.23Б). Эти данные также показывают, что GAPDH формирует продукт сшивки с расщепленным AP-сайтом намного эффективнее,

чем с интактным, поскольку выход аддукта GAPDH–AP–ДНК увеличивается в 16 раз, когда в реакционную смесь добавлена Endo III.

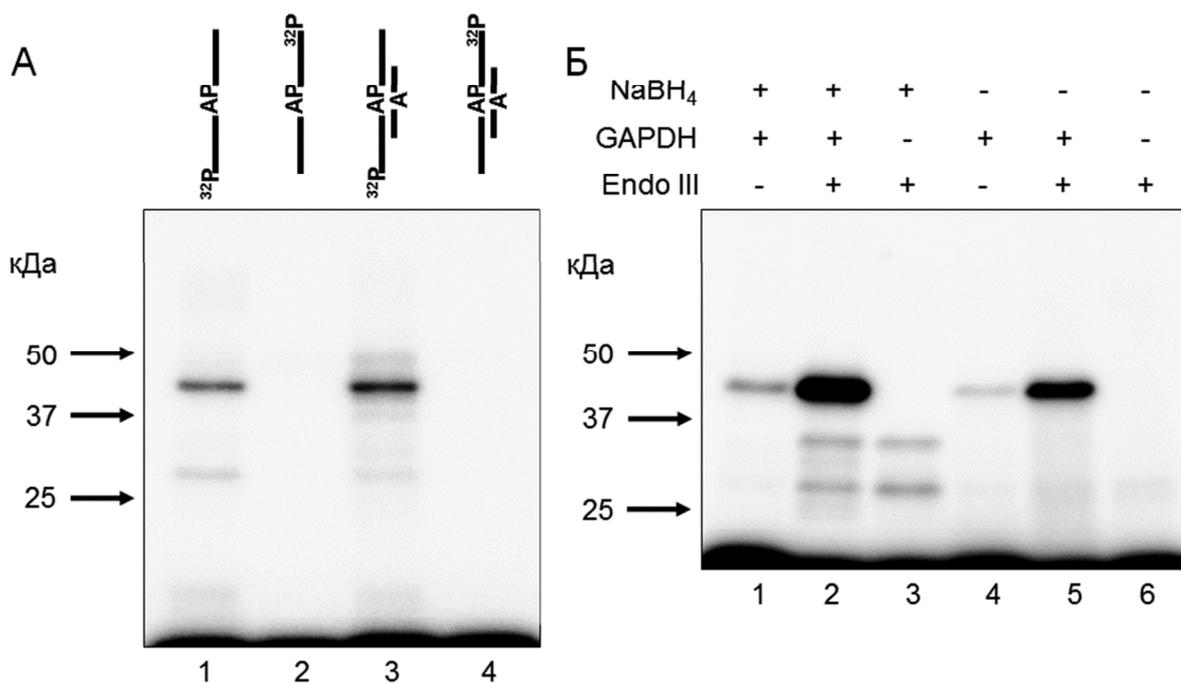


Рис. 3.23. (А) Боргидрид-зависимая сшивка GAPDH с AP-ДНК, содержащими радиоактивную метку на 5'- или 3'-конце.

Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли продуктов боргидрид-зависимой сшивки 2,5 мкМ GAPDH с 500 нМ оц AP-ДНК (дор. 1 и 2) и 500 нМ DDE-AP-ДНК 16А (дор. 3 и 4), мечеными с 5'-конца (дор. 1 и 3) или 3'-конца (дор. 2 и 4).

(Б) Взаимодействие GAPDH с AP-ДНК, расщепленной ДНК-гликозилазой Endo III по механизму β-элиминирования.

Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли аддуктов, образуемых 2,5 мкМ GAPDH и/или 10 нМ Endo III с 500 нМ DDE-AP-ДНК 16А, в присутствии (дор. 1–3) или в отсутствие боргидрида (дор. 4–6). Дор. 1 и 4 – GAPDH без Endo III; дор. 2 и 5 – GAPDH и Endo III; дор. 3 и 6 – Endo III без GAPDH.

Выход боргидрид-независимого аддукта GAPDH–AP–ДНК также значительно увеличивается (в 13 раз) после добавления Endo III (рис. 3.23Б, сравните дор. 5 и 4). Endo III (10 нМ) формирует боргидрид-зависимые аддукты (дор. 3), которые, с учетом их электрофоретической подвижности, могут быть отнесены к продуктам сшивки с интактной AP-ДНК (верхний) и расщепленной AP-ДНК (нижний). Следует отметить, что в отсутствие боргидрида продукты сшивки Endo III с AP-ДНК исчезают (дор. 6), поскольку они опосредованы формированием основания Шиффа, являющегося нестабильным интермедиатом.

На эффективность сшивки AP-ДНК с белками влияют несколько факторов, включая параметры связывания ДНК белком, реакционную способность группы, участвующей в сшивке, и расположение этой группы относительно целевой аминокислоты. Повышенная эффективность сшивки GAPDH с расщепленной AP-ДНК по сравнению с интактной может быть связана с тем, что 3'-PUA, образующийся под

действием Endo III, обладает более высокой реакционной способностью, чем альдегидная форма нерасщепленного AP-сайта. Подобное явление описано в работе [220], авторы которой проводили реакции зонда ARP (N-аминоксиметилкарбонилгидразино-D-биотин), содержащего алкоксиаминогруппу и специфично связывающегося с альдегидными группами, с олигонуклеотидами, содержащими AP-сайты. Было показано, что данный зонд более эффективно связывается с 3'-PUA, получающимся в результате расщепления AP-сайта бифункциональной ДНК-гликозилазой Pdg фага T4, чем с интактным AP-сайтом.

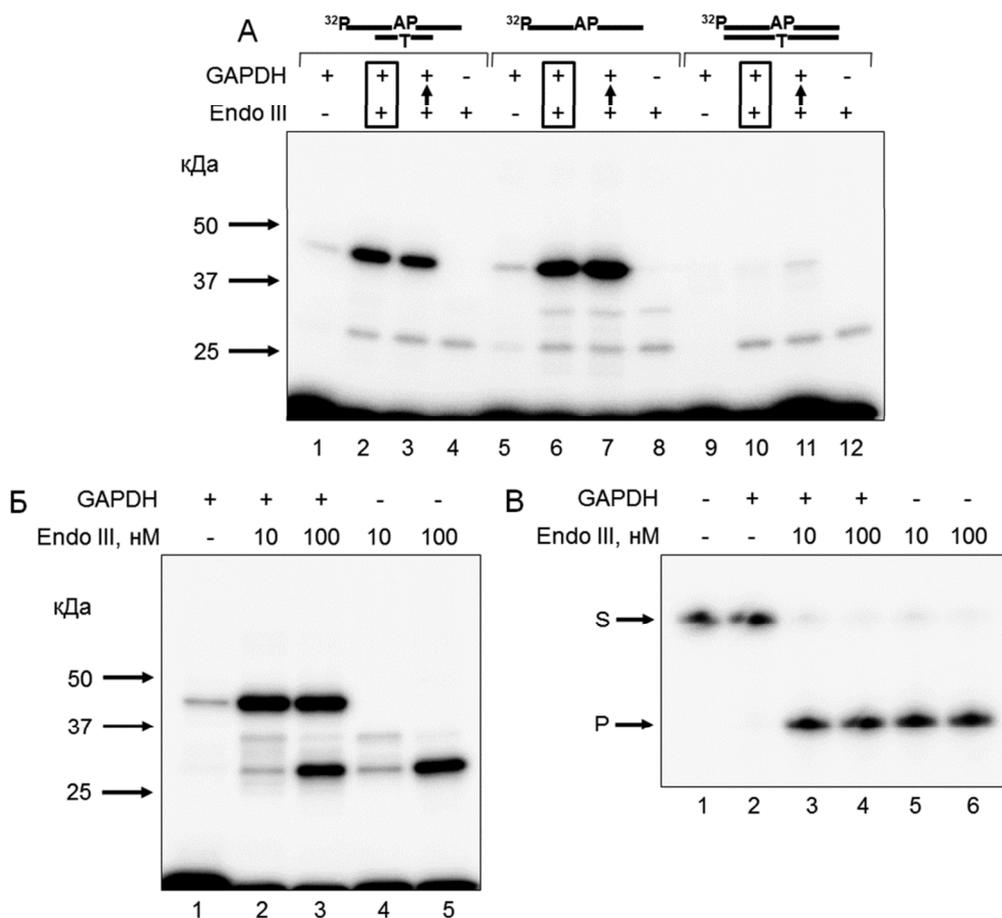


Рис. 3.24. (А) Боргидрид-зависимая сшивка GAPDH с AP-ДНК в присутствии Endo III, добавленной в реакционную смесь предварительно или одновременно с GAPDH.

Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли продуктов боргидрид-зависимой сшивки 2,5 мкМ GAPDH и/или 10 нМ Endo III с разными типами 500 нМ AP-ДНК: дор. 1–4 – DDE-AP-ДНК 16А; дор. 5–8 – оц AP-ДНК; дор. 9–12 – BE-AP-ДНК 32А. GAPDH (дор. 1, 5 и 9), GAPDH и Endo III, добавленные одновременно (дор. 2, 6 и 10), GAPDH, добавленная после 10-минутной инкубации Endo III с AP-ДНК (дор. 3, 7 и 11), Endo III без GAPDH (дор. 4, 8 и 12).

(Б) Влияние Endo III на эффективность сшивки GAPDH с DDE-AP-ДНК.

Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли продуктов боргидрид-зависимой сшивки 2,5 мкМ GAPDH и/или 10 или 100 нМ Endo III с 500 нМ DDE-AP-ДНК 16А. Дор. 1 – GAPDH без Endo III; дор. 2 – GAPDH и 10 нМ Endo III; дор. 3 – GAPDH и 100 нМ Endo III; дор. 4 – 10 нМ Endo III; дор. 5 – 100 нМ Endo III без GAPDH.

(В) Расщепление AP-сайта Endo III.

Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной 500 нМ DDE-AP-ДНК 16А, инкубированной с 2,5 мкМ GAPDH и/или 10 или 100 нМ Endo III (аликвоты из реакционных смесей на рис. Б).

После расщепления AP-ДНК гликозилазой Endo III их «геометрия» принципиально не меняется, но реакционная способность AP-сайтов может изменяться. В случае оц AP-ДНК и DDE-AP-ДНК, которые довольно эффективно образуют сшивки с GAPDH, когда AP-сайты в них интактные, повышенная реакционная способность 3'-PUA-группы, образующейся под действием Endo III, приводит к повышенному выходу продуктов сшивки (рис. 3.24А, дор. 2, 3 и 6, 7). В случае BE-AP-ДНК с интактным AP-сайтом, неэффективная сшивка, по-видимому, является результатом слабого связывания такой ДНК с GAPDH, и повышенная реакционная способность 3'-PUA не может компенсировать неэффективное связывание ДНК с GAPDH, чтобы обеспечить высокий выход продуктов (дор. 10 и 11). Хотя нельзя полностью исключить вероятность того, что неодинаковая эффективность сшивки GAPDH с DDE- и BE-AP-ДНК обусловлена разницей во взаимной ориентации AP-сайта и реагирующих групп белка. Таким образом, сшивка GAPDH с AP-ДНК, по-видимому, сильно зависит от наличия в ДНК оц частей. В целом, это объяснение согласуется с данными ранее опубликованных работ, где было показано, что GAPDH связывается с оц ДНК, но не связывается с дц ДНК [139–144].

Выход аддукта GAPDH с DDE-AP-ДНК схожим образом увеличивался в присутствии 10 нМ и 100 нМ Endo III, хотя выход аддукта Endo III с расщепленной ДНК в последнем случае увеличивался (рис. 3.24Б, сравните дор. 3 и 2). Из данных реакционных смесей отбирали аликвоты и анализировали их с помощью электрофореза нуклеиновых кислот (рис. 3.24В). Как и ожидалось, продукты расщепления отсутствуют в случае GAPDH без добавления Endo III (дор. 2), а Endo III даже в низкой концентрации полностью расщепляет AP-ДНК (дор. 3–6).

Таким образом, GAPDH, по-видимому, способна расщеплять ДНК и оставаться связанной с 5'-концевым продуктом β -элиминирования посредством образования основания Шиффа, аналогично ДНК-гликозилазам/AP-лиазам. Но в отличие от них, GAPDH формирует значительно более стабильные комплексы с продуктом β -элиминирования, вследствие чего, возможно, является неэффективной AP-лиазой. Чтобы подтвердить это предположение, была оценена стабильность боргидрид-зависимых и боридрид-независимых комплексов GAPDH–AP-ДНК (рис. 3.25) в присутствии или в отсутствие конкурентной ДНК. С этой целью GAPDH предварительно инкубировали с DDE-AP-ДНК, меченой с 5'-конца, чтобы получить аддукты белка с AP-сайтами, затем в реакционные смеси, за исключением контрольной, добавляли конкурентную ДНК (10-кратный молярный избыток оц ДНК относительно DDE-AP-ДНК) или буфер и инкубировали в течение определенных временных интервалов. Известно, что формирование основания Шиффа — обратимый процесс, и комплекс GAPDH–AP-ДНК

может диссоциировать после гидролиза основания Шиффа. Конкурентную ДНК добавляли, чтобы связать GAPDH, высвобожденную из комплекса с DDE-AP-ДНК, и уменьшить реассоциацию GAPDH с ДНК-зондом, которая привела бы к формированию аддуктов белок–ДНК. После инкубации основания Шиффа восстанавливали боргидридом натрия (рис. 3.25А) или не восстанавливали (рис. 3.25Б).

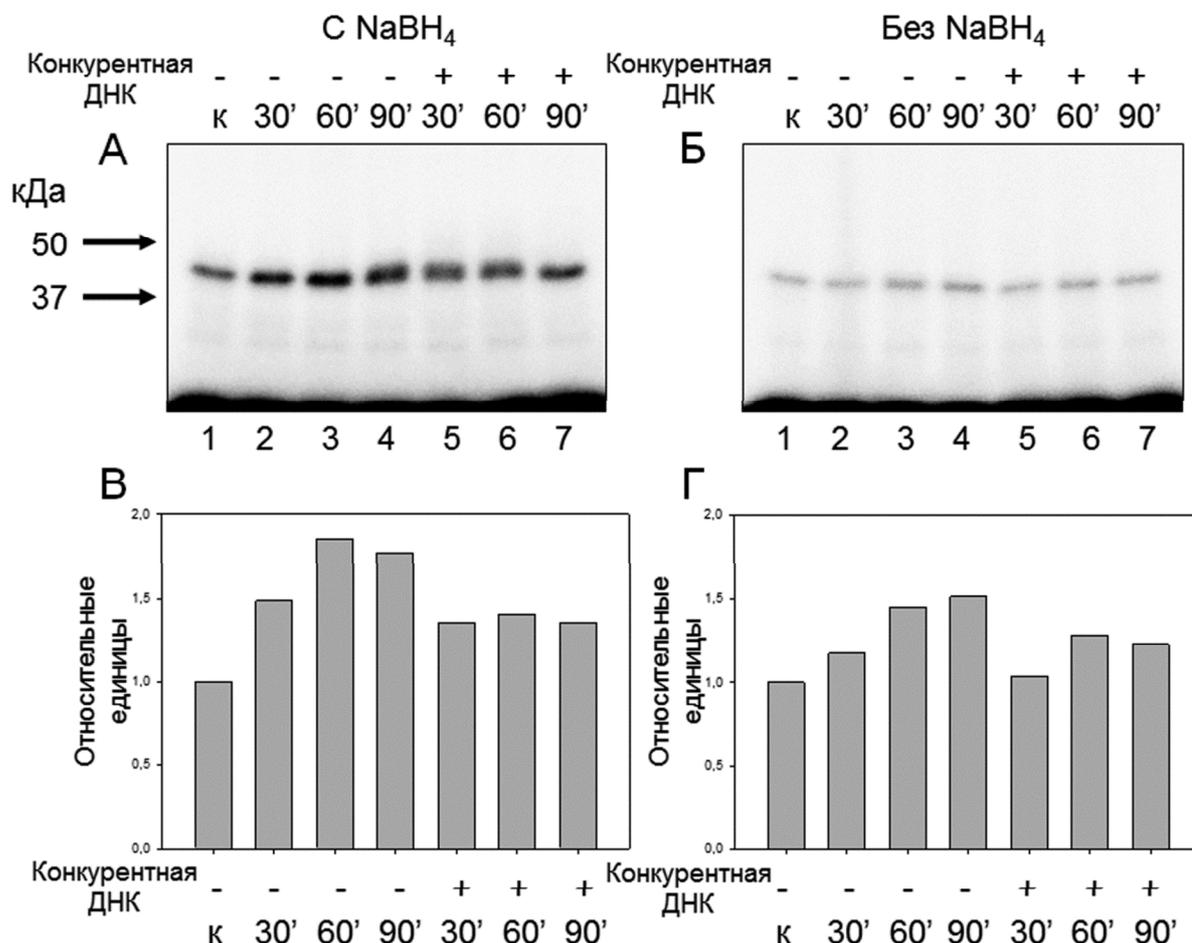


Рис. 3.25. Оценка стабильности комплексов GAPDH–AP–ДНК.

(А и Б) Радиоавтографы гелей после электрофоретического разделения в 12%-ных ПААГ по Лэммли аддуктов 2,5 мкМ GAPDH с 500 нМ DDE-AP-ДНК 16А. В случае (А) аликвоты, отобранные из реакционной смеси, перед электрофоретическим разделением обрабатывали NaBH₄, в случае (Б) обработку не проводили. Дор. 1 – контроль после предварительной инкубации GAPDH с AP-ДНК, показывающий исходный уровень сшивки; дор. 2–4 – дальнейшая инкубация GAPDH с AP-ДНК (без добавления конкурентной ДНК) в течение 30, 60 и 90 мин соответственно; дор. 5–7 – дальнейшая инкубация GAPDH с AP-ДНК и 10-кратным молярным избытком оц конкурентной ДНК Т(16) в течение 30, 60 и 90 мин соответственно.

(В и Г) Количественный анализ рис. А и Б соответственно. Выход продукта сшивок представлен в относительных единицах (выход аддукта GAPDH–AP–ДНК на дор. 1 принят за 1).

Оба типа аддуктов GAPDH–AP–ДНК (боргидрид-зависимый и независимый) не подвергались значительной диссоциации после инкубации с конкурентной ДНК в течение, по крайней мере, 90 мин (сравните дор. 4 и 7). Это сопоставимо со стабильностью боргидрид-зависимых аддуктов, формируемых Ku и PARP1 с BE-AP-ДНК [14, 17].

3.3.2. Возможное взаимодействие других дегидрогеназ с AP-ДНК

Согласно литературным данным, не только GAPDH, но и некоторые другие дегидрогеназы (лактатдегидрогеназа (LDH), малатдегидрогеназа (MDH) и алкогольдегидрогеназа (ADH)) могут находиться в ядре и взаимодействовать с оц ДНК [143, 144]. Поэтому необходимо было оценить возможный вклад этих дегидрогеназ в набор аддуктов, формирующийся при сшивке белков экстрактов с AP-ДНК. С этой целью была проанализирована информация о вышеупомянутых дегидрогеназах и проведены эксперименты, чтобы проверить, могут ли они формировать аддукты с AP-ДНК в клеточных экстрактах.

Многочисленные изоформы ADH человека имеют большие молекулярные массы, чем GAPDH (39,0–42,5 против 36,5 кДа), поэтому ее боргидрид-зависимый аддукт с AP-ДНК, если он существует, вероятно, имеет более низкую электрофоретическую подвижность, чем аддукт GAPDH. Кроме того, изоформы ADH экспрессируются главным образом в клетках печени и практически отсутствуют в культивируемых клетках человека.

Молекулярные массы двух других дегидрогеназ близки к молекулярной массе GAPDH (36,5 кДа для LDH и 36,4 кДа для MDH). Однако согласно to www.proteinatlas.org, уровни GAPDH и ее мРНК в клетках HeLa, HEK293 и MCF-7 значительно выше, чем соответствующие параметры для других дегидрогеназ. MDH представлена только полипептидном с «кислой» pI (код AAC16436, pI 6,91), тогда как субъединицы LDH, являющиеся продуктами двух разных генов, представлены как «основным», так и «кислым» полипептидами: LDHA (код AAN67223, pI 8,44) и LDHB (код CAA32033, pI 5,71). Изоформы LDH с разными pI могут формировать тетрамеры в разных комбинациях. GAPDH представлена только «основным» полипептидом (код P04406, pI 8,57).

Основываясь на информации о значениях pI, было проведено фракционирование экстракта клеток VJAB, который формирует 45-кДа аддукт с DDE-AP-ДНК с наибольшим выходом, с использованием сорбента “DEAE Support” (рис. 3.26А, описание метода приведено в разд. 2.2.10). Ожидали, что белки с «основными» pI (GAPDH и LDHA) не свяжутся с анионообменной смолой, в отличие от белков с «кислыми» pI (LDHB и MDH). Затем проводили сшивку белков из разных фракций с DDE-AP-ДНК (рис. 3.26В). Белки, элюированные с DEAE, не формировали 45-кДа аддукт (дор. 3), в отличие от белков, не связавшихся с сорбентом (дор. 1). Как и ожидалось, при электрофоретическом анализе белков, не связавшихся с DEAE, наблюдали довольно интенсивную полосу, которая по подвижности соответствовала очищенной GAPDH (сравните дор. 4 и 3 на рис. 3.26А).

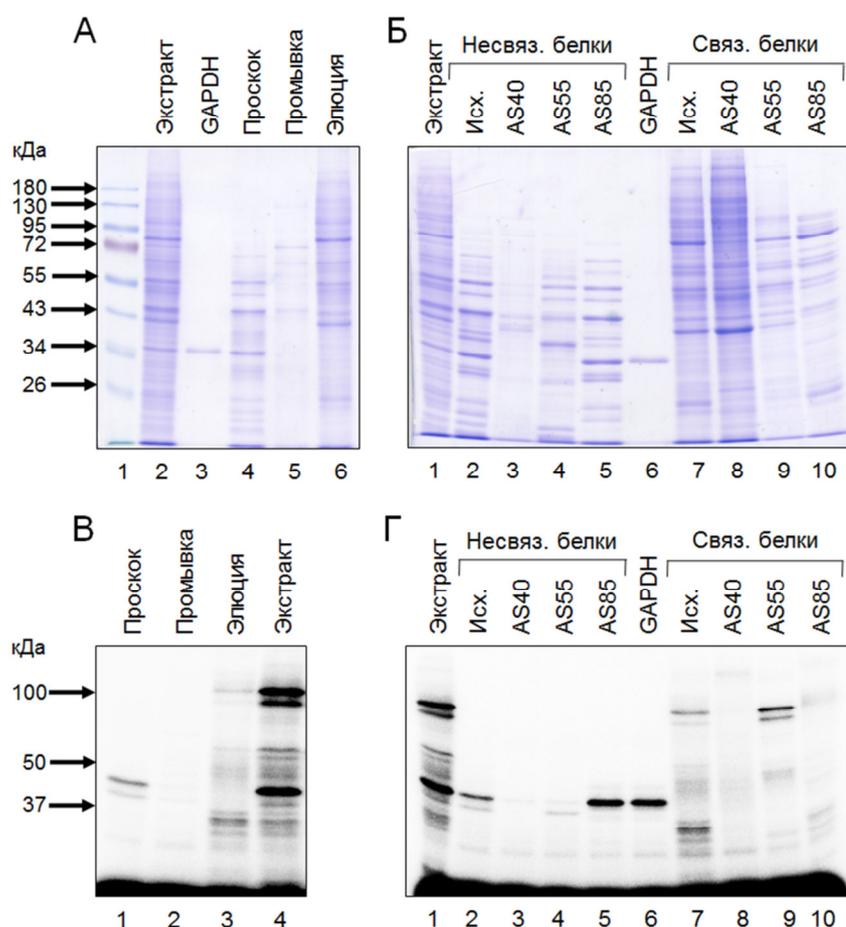


Рис. 3.26. Анализ фракционированных белков экстракта клеток ВЈАВ.

(А) Скан геля, окрашенного кумасси, после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли белков экстракта клеток ВЈАВ, фракционированных на сорбенте “DEAE Support”. Дор. 1 – маркеры молекулярной массы; дор. 2 – 12,5 мкг белков экстракта; дор. 3 – 0,7 мкг GAPDH; дор. 4 – просок (белки, не связавшиеся с “DEAE Support”, 3 мкл из 300 мкл); дор. 5 – промывка, 3 мкл из 300 мкл; дор. 6 – фракция, элюированная с сорбента (белки, связавшиеся с “DEAE Support”, 3 мкл из 300 мкл).

(Б) Скан геля, окрашенного кумасси, после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли белков экстракта клеток ВЈАВ, не связавшихся или связавшихся с “DEAE Support” и затем фракционированных осаждением сульфатом аммония. Дор. 1 – 12,5 мкг белков экстракта; дор. 2 – просок, 5 мкл из 300 мкл; дор. 3–5 – белки из просока (200 мкл), осажденные сульфатом аммония в диапазоне 0–40% (AS40), 40–55% (AS55) и 55–85% (AS85) от насыщения (осажденные белки растворяли в 50 мкл буфера А и алиquotы по 2 мкл анализировали с помощью электрофореза); дор. 6 – 1,5 мкг GAPDH; дор. 7–10 – аналогично дор. 2–5, но в качестве исходного материала использовали белки, связавшиеся с “DEAE Support”.

(В) Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли продуктов боргидрид-зависимой сшивки белков, фракционированных на “DEAE Support”, с 500 нМ DDE-AP-ДНК 16А. Дор. 1 – просок; дор. 2 – промывка; дор. 3 – элюированная фракция; дор. 4 – белки экстракта.

(Г) Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли продуктов боргидрид-зависимой сшивки белков, не связавшихся или связавшихся с “DEAE Support” и затем фракционированных осаждением сульфатом аммония, с 500 нМ DDE-AP-ДНК 16А. Дор. 1 – белки экстракта; дор. 2 – просок; дор. 3–5 – белки из просока, осажденные сульфатом аммония в диапазоне 0–40% (AS40), 40–55% (AS55) и 55–85% (AS85) от насыщения; дор. 6 – GAPDH; дор. 7–10 – аналогично дор. 2–5, но в качестве исходного материала использовали белки, связавшиеся с “DEAE Support”.

Чтобы различить аддукты, формируемые GAPDH и LDHA («основная» изоформа), было проведено сульфатаммонийное фракционирование белков, не связавшихся с DEAE, согласно [221]. В этой работе несколько ферментов гликолиза были выделены из мышц кролика с помощью комбинации сульфатаммонийного фракционирования и

хроматографии. Следует отметить, что в мышечных клетках LDH состоит только из субъединиц LDHA с «основной» pI (www.proteinatlas.org). Белки, не связавшиеся и связавшиеся с DEAE, осаждали сульфатом аммония в диапазоне 0–40%, 40–55% и 55–85% от насыщения. Эти фракции в дальнейшем обозначаются как AS40, AS55 и AS85 соответственно. Согласно [221], LDHA и GAPDH должны находиться во фракциях AS55 и AS85 соответственно. Данные по сшивке этих белков с DDE-AP-ДНК показаны на рис. 3.26Г. Действительно, выход 45-кДа аддукта, электрофоретическая подвижность которого соответствует подвижности аддукта, формируемого очищенной GAPDH, является наибольшим в случае фракции AS85 (сравните дор. 5 и 6). В других фракциях белков, не связавшихся с DEAE, наблюдаются только следовые количества 45-кДа аддукта. Во фракции AS55 преобладает аддукт с более высокой электрофоретической подвижностью (дор. 4), выход которого ниже, чем аддукта, формируемого GAPDH. Данные электрофоретического анализа белков сульфатаммонийных фракций (рис. 3.26Б, дор. 3–5) согласуются с распределением аддуктов GAPDH, поскольку полоса белка, соответствующего GAPDH по электрофоретической подвижности, имеет большую интенсивность во фракции AS85, чем во фракции AS55.

Аддукт с более высокой электрофоретической подвижностью, чем у аддукта GAPDH (рис. 3.26Г, дор. 2 и 4), возможно, формируется LDHA, поскольку, согласно работе [143], LDH (которая в данной работе называется SSB-35) имеет более высокую подвижность, чем GAPDH (SSB-37), несмотря на то, что молекулярные массы этих полипептидов отличаются менее чем на 500 Да, причем молекулярная масса GAPDH меньше. Принимая во внимание все данные, нельзя исключить сшивку «основной» изоформы LDHA с AP-ДНК, но аддукт LDHA вряд ли совпадает по подвижности с аддуктом GAPDH в экстрактах. «Кислые» изоформы LDH и MDH, по-видимому, не взаимодействуют с AP-ДНК, поскольку белки, задерживающиеся на DEAE, не формируют аддукты с соответствующей молекулярной массой (рис. 3.26Г, дор. 7–10). Таким образом, продукты сшивки с AP-ДНК дегидрогеназ LDH и MDH, содержащихся в клеточных экстрактах и близких по молекулярной массе к GAPDH, если такие продукты и существуют, вероятно, не совпадают по подвижности с 45-кДа аддуктом GAPDH–AP-ДНК и не вносят вклада в его выход.

3.3.3. GAPDH не проявляет урацил-ДНК-гликозилазную активность

В литературе GAPDH часто рассматривается как белок, ассоциированный с репарацией ДНК, однако такие данные ограничены и иногда противоречат друг другу.

Ярким примером спорной функции GAPDH в репарации является урацил-ДНК-гликозилазная активность, впервые показанная в работе [184] (разд. 1.3.2.1).

Поэтому представлялось важным проверить наличие UDG-активности в препарате очищенной GAPDH, полученном в настоящей работе. Для этого использовали два типа урацил-содержащей ДНК. Данные для урацил-содержащей DDE-ДНК показаны на рис. 3.27А. GAPDH, в отличие от Ung *E. coli* (дор. 3), не удаляет остаток урацила в данном субстрате (дор. 4–8). Кроме того, был синтезирован субстрат, аналогичный использованному в работе [184]: сначала получали дуплекс oligodT-праймера, меченого по 5'-концу, с поли(dA), затем с использованием данного дуплекса, ДНК-полимеразы и dUTP синтезировали поли(dU) (рис. 3.27Б). В данном случае GAPDH также не проявляла UDG-активность (сравните дор. 2 и 3).

Ранее было показано, что GAPDH локализуется в ядре в виде димера, но не в нативной тетрамерной форме [161]. Механизмы, обеспечивающие изменение олигомерного состояния GAPDH, остаются неизвестными. Отсутствие UDG-активности в нашем препарате GAPDH может быть связано с олигомерным состоянием белка.

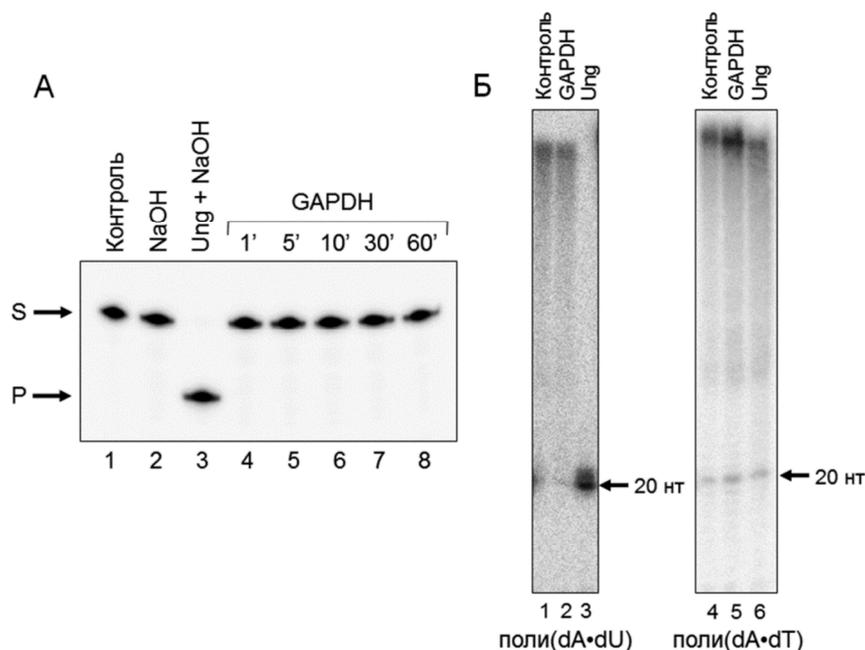


Рис. 3.27. GAPDH не проявляет UDG-активность.

(А) Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной 100 нМ урацил-содержащей DDE-ДНК 16А, инкубированной с 5 ед. акт. Ung *E. coli* или 2 мкМ GAPDH. Дор. 1 – контрольная урацил-содержащая DDE-ДНК; дор. 2 – урацил-содержащая DDE-ДНК, обработанная NaOH; дор. 3 – урацил-содержащая DDE-ДНК, инкубированная в присутствии Ung и затем обработанная NaOH; дор. 4–8 – урацил-содержащая DDE-ДНК, инкубированная в присутствии GAPDH в течение 1, 5, 10, 30 и 60 мин соответственно и затем обработанная NaOH. S – субстрат (нерасщепленная AP-ДНК); P – продукт β,δ-элиминирования.

(Б) Радиоавтографы гелей после электрофоретического разделения в 20%-ных ПААГ с 7 М мочевиной 100 нМ субстратов поли(dA•dU) и поли(dA•dT), инкубированных с 5,6 мкМ GAPDH или 18 ед. акт. Ung *E. coli*. Дор. 1 – контроль поли(dA•dU); дор. 2 – поли(dA•dU), инкубированный в присутствии GAPDH; дор. 3 – поли(dA•dU), инкубированный в присутствии Ung. Дор. 4 – контроль поли(dA•dT); дор. 5 – поли(dA•dT), инкубированный в присутствии GAPDH; дор. 6 – поли(dA•dT), инкубированный в присутствии Ung. Стрелкой отмечен исходный 5'-меченый oligodT₂₀-праймер.

В работе [190] GAPDH из эритроцитов человека не проявляла UDG-активности по отношению к субстрату поли(dA•[³H]dU). Результаты, полученные в ходе настоящей работы, согласуются с этими данными, с той разницей, что в данном случае использовалась GAPDH, выделенная из культивируемых клеток человека и мышц кролика, а также не только «искусственный» субстрат поли(dA•dU), но и DDE-ДНК, содержащая один остаток урацила.

3.3.4. Взаимодействие GAPDH с PARP1, APE1 и NEIL1

В литературе описано взаимодействие GAPDH с такими ферментами, участвующими в репарации ДНК, как PARP1 и APE1 (см. обзор литературы). Однако взаимодействие GAPDH с APE1 было показано только в одной работе 2008 г., а в нескольких работах, где *in vivo* было показано взаимодействие GAPDH с PARP1 в условиях окислительного стресса, не рассматривался вопрос о том, как при этом изменяется действие последнего в процессе репарации. Поэтому интересно было проверить способность нашего препарата очищенной GAPDH взаимодействовать с вышеуказанными ферментами.

Реакции поли(ADP-рибозил)ирования сначала проводили в присутствии очищенной PARP1 в буфере, содержащем активированную ДНК и ³²P-меченый NAD⁺ (рис. 3.28А). Продукт автополи(ADP-рибозил)ирования PARP1, останавливающийся на границе концентрирующего и разделяющего гелей системы Лэммли, наблюдается как в отсутствие GAPDH (дор. 1), так и в ее присутствии (дор. 2), причем большой избыток GAPDH не оказывает влияния на уровень автомодификации PARP1. Однако при этом не видно полос, соответствующих продуктам поли(ADP-рибозил)ирования GAPDH, которые должны иметь бóльшую электрофоретическую подвижность, чем продукт автополи(ADP-рибозил)ирования PARP1, поскольку молекулярные массы этих белков составляют около 36 кДа и 113 кДа соответственно (дор. 2).

Затем проводили реакции поли(ADP-рибозил)ирования белков экстракта клеток HeLa в присутствии (дор. 1) и в отсутствие (дор. 2) очищенной PARP1 (рис. 3.28Б); при этом использовали 500 мкМ NAD⁺ (соотношение ³²P-меченый : немеченый 1:19), а также немеченую DDE-ДНК (для активации PARP1). На дор. 2 виден продукт автомодификации PARP1, содержащегося в экстракте; выход данного продукта увеличивается при добавлении в реакционную смесь очищенного PARP1 (дор. 1). В отсутствие ДНК автомодификации PARP1 не происходит (дор. 3). При этом полосы, соответствующие продуктам поли(ADP-рибозил)ирования GAPDH, отсутствуют во всех случаях.

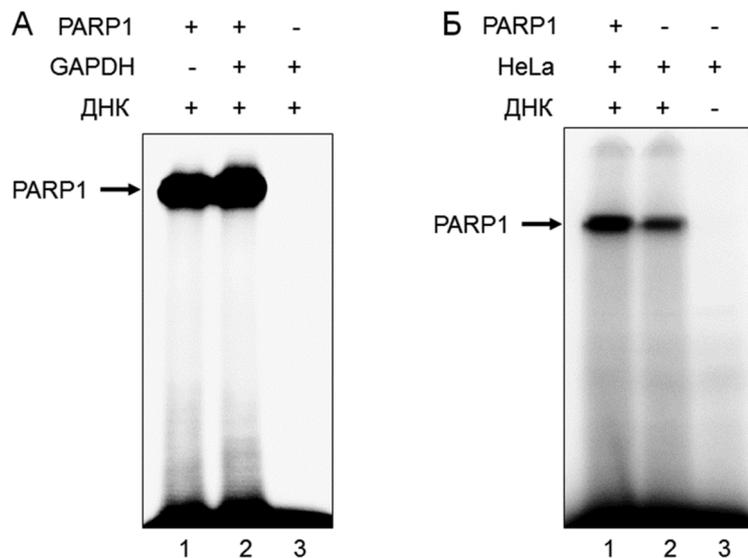


Рис. 3.28. GAPDH не подвергается поли(ADP-рибозил)ированию PARP1.

Радиоавтографы гелей после электрофоретического разделения в 12%-ных ПААГ по Лэммли продуктов, получающихся после инкубации белков в присутствии 50 мкМ ^{32}P -меченого NAD^+ . Реакционные смеси содержали: (А) 88 нМ PARP1 (дор. 1), 2 мкМ GAPDH в присутствии 88 нМ PARP1 (дор. 2) или без нее (дор. 3); (Б) белки экстракта клеток HeLa (2 мг/мл) в присутствии 50 нМ PARP1 (дор. 1) или без нее (дор. 2 и 3) (в случае дор. 3 реакционная смесь не содержала ДНК).

Также было проверено, влияет ли присутствие GAPDH в реакционной смеси на активность APE1. Для этого проводили расщепление AP-ДНК 1 нМ APE1 в отсутствие ионов Mg^{2+} в течение 30 мин, а также в их присутствии в течение 2 мин (рис. 3.29). Известно, что APE1 проявляет AP-эндонуклеазную активность только в присутствии ионов Mg^{2+} [28]. В данной работе APE1 в отсутствие ионов Mg^{2+} не гидролизовала AP-сайты ни сама по себе (дор. 1), ни в присутствии GAPDH (дор. 2–4). В присутствии данных ионов APE1 расщепляла около 20% AP-ДНК (дор. 8), и при добавлении в реакционную смесь GAPDH ее активность незначительно уменьшалась (до 12% при 100-кратном избытке GAPDH) (дор. 9–11).

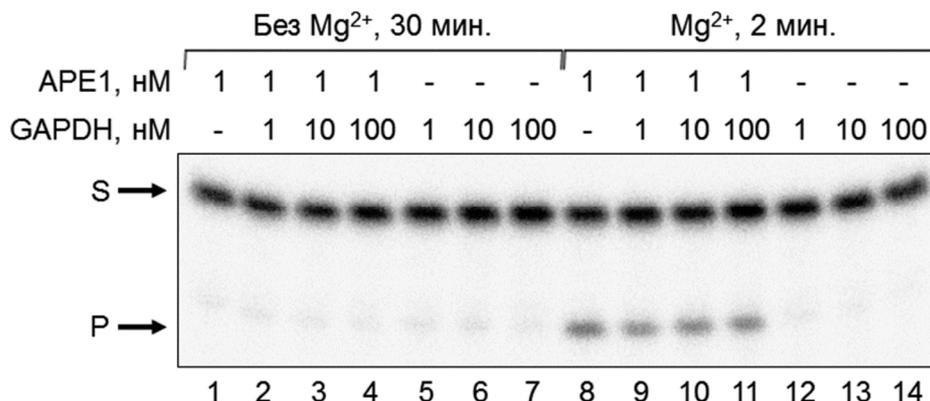


Рис. 3.29. GAPDH не влияет на активность APE1.

Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной 10 нМ DDE-AP-ДНК 16А, инкубированной с APE1 и/или GAPDH в отсутствие ионов Mg^{2+} (дор. 1–7) или в их присутствии (дор. 8–14). Дор. 1 и 8 – 1 нМ APE1; дор. 2 и 9 – 1 нМ GAPDH и 1 нМ APE1; дор. 3 и 10 – 10 нМ GAPDH и 1 нМ APE1; дор. 4 и 11 – 100 нМ GAPDH и 1 нМ APE1; дор. 5 и 12 – 1 нМ GAPDH; дор. 6 и 13 – 10 нМ GAPDH; дор. 7 и 14 – 100 нМ GAPDH.

Кроме того, было проверено, влияет ли GAPDH на активность ДНК-гликозилазы NEIL1 человека, удаляющей окисленные пиримидины и пурины из ДНК (преимущественно оц или транскрипционных «пузырей»). Сначала была подобрана концентрация NEIL1 (5 нМ), при которой расщеплялось примерно 50% 40 нМ AP-ДНК. Затем проводили реакцию расщепления оц AP-ДНК и DDE-AP-ДНК 5 нМ NEIL1 в отсутствие или в присутствии GAPDH (40, 80, 160, 240 или 320 нМ) (рис. 3.30). При этом реакционная смесь содержала BSA (0,125 мг/мл), чтобы исключить влияние увеличения общей концентрации белка в смеси на активность NEIL1. Уровень расщепления оц AP-ДНК NEIL1 в отсутствие GAPDH составляет около 60% (дор. 2) и не изменяется при добавлении GAPDH в концентрации до 160 нМ (дор. 3–5), и только в случае 240 нМ и 320 нМ GAPDH повышается до 80% (дор. 6 и 7). Уровень расщепления DDE-AP-ДНК NEIL1 в отсутствие GAPDH составляет около 40% (дор. 8), и поднимается лишь примерно до 50% в присутствии 240 нМ GAPDH (дор. 12).

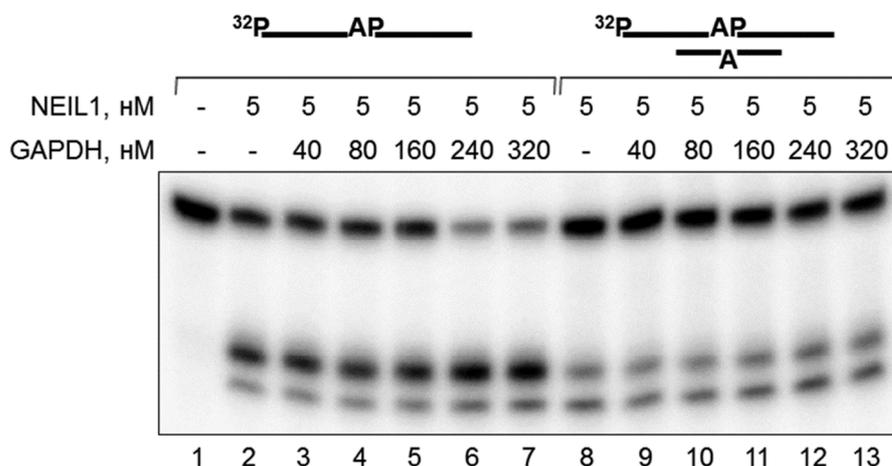


Рис. 3.30. GAPDH не оказывает значимого влияния на активность NEIL1.

Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной 40 нМ оц AP-ДНК (дор. 1–7) и 40 нМ DDE-AP-ДНК 16A (дор. 8–13), инкубированных с NEIL1 в отсутствие GAPDH или в ее присутствии. Во всех случаях, кроме дор. 1 (контрольная AP-ДНК), использовали 5 нМ NEIL1 и GAPDH в концентрации 40 нМ (дор. 3 и 9), 80 нМ (дор. 4 и 10), 160 нМ (дор. 5 и 11), 240 нМ (дор. 6 и 12) или 320 нМ (дор. 7 и 13).

Результаты, описанные в данном разделе, свидетельствуют о том, что GAPDH не оказывает значимого влияния на активность PARP1, APE1 и NEIL1. Также не удалось зарегистрировать поли(ADP-рибозил)ирование GAPDH в условиях *in vitro*. Однако в условиях окислительного стресса *in vivo* GAPDH подвергается различным модификациям, которые, возможно, способствуют ее взаимодействию с данными белками; этим могут объясняться поли(ADP-рибозил)ирование GAPDH и стимулирование ею активности APE1, описанные в литературе.

3.3.5. Использование AP-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-AP-ДНК [222]. В экстрактах клеток различных меланом была обнаружена положительная корреляция между количеством Ku, определенным методом дот-блота, и выходом продуктов сшивки Ku-AP-ДНК. Поэтому было интересно определить, можно ли использовать оц AP-ДНК и/или DDE-AP-ДНК в качестве специфичных зондов для детекции GAPDH в клеточных экстрактах. С этой целью была проведена сшивка оц AP-ДНК (рис. 3.31А) и DDE-AP-ДНК (рис. 3.31Б) 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), VJAB (В-клеточная лимфома Бёркитта) и Im9 (В-клеточная множественная миелома).

Оц AP-ДНК, по-видимому, является более селективным зондом для детекции GAPDH, чем DDE-AP-ДНК, поскольку она формирует меньше продуктов сшивки с другими белками экстрактов. Интересно, что по результатам эксперимента выход аддуктов GAPDH-AP-ДНК значительно выше в лимфоидных клетках (Jurkat, VJAB и Im9) (дор. 4, 6 и 7). Белковые аддукты с молекулярной массой около 100 кДа с DDE-AP-ДНК сформированы Ku80-субъединицей Ku-антигена, которая также специфично взаимодействует с данным типом AP-ДНК (разд. 3.1.2). Ранее в настоящей работе было показано, что GAPDH может формировать боргидрид-независимые аддукты с AP-ДНК (рис. 3.21А). Поэтому были проведены реакции белков экстрактов с обоими типами AP-ДНК без добавления боргидрида (рис. 3.31В и Г). В данном случае полоса, соответствующая аддукту GAPDH-AP-ДНК также имеет наибольшую интенсивность в случае экстрактов клеток Jurkat, VJAB и Im9, однако все полосы белковых аддуктов имеют значительно меньшую интенсивность.

Чтобы определить взаимосвязь между количеством GAPDH и выходом аддуктов GAPDH-AP-ДНК в экстрактах различных клеток, содержание GAPDH в вышеупомянутых экстрактах было оценено методом вестерн-блоттинга (рис. 3.33А). Сначала было определено оптимальное количество белков клеточных экстрактов, которое можно использовать для детекции GAPDH с помощью данного метода. На гель наносили по 2 мкг белков каждого экстракта и 0,1 мкг очищенной GAPDH для сравнения (дор. 1). Данные экспериментов по боргидридной сшивке (рис. 3.31А и Б) не полностью соответствуют данным вестерн-блоттинга.

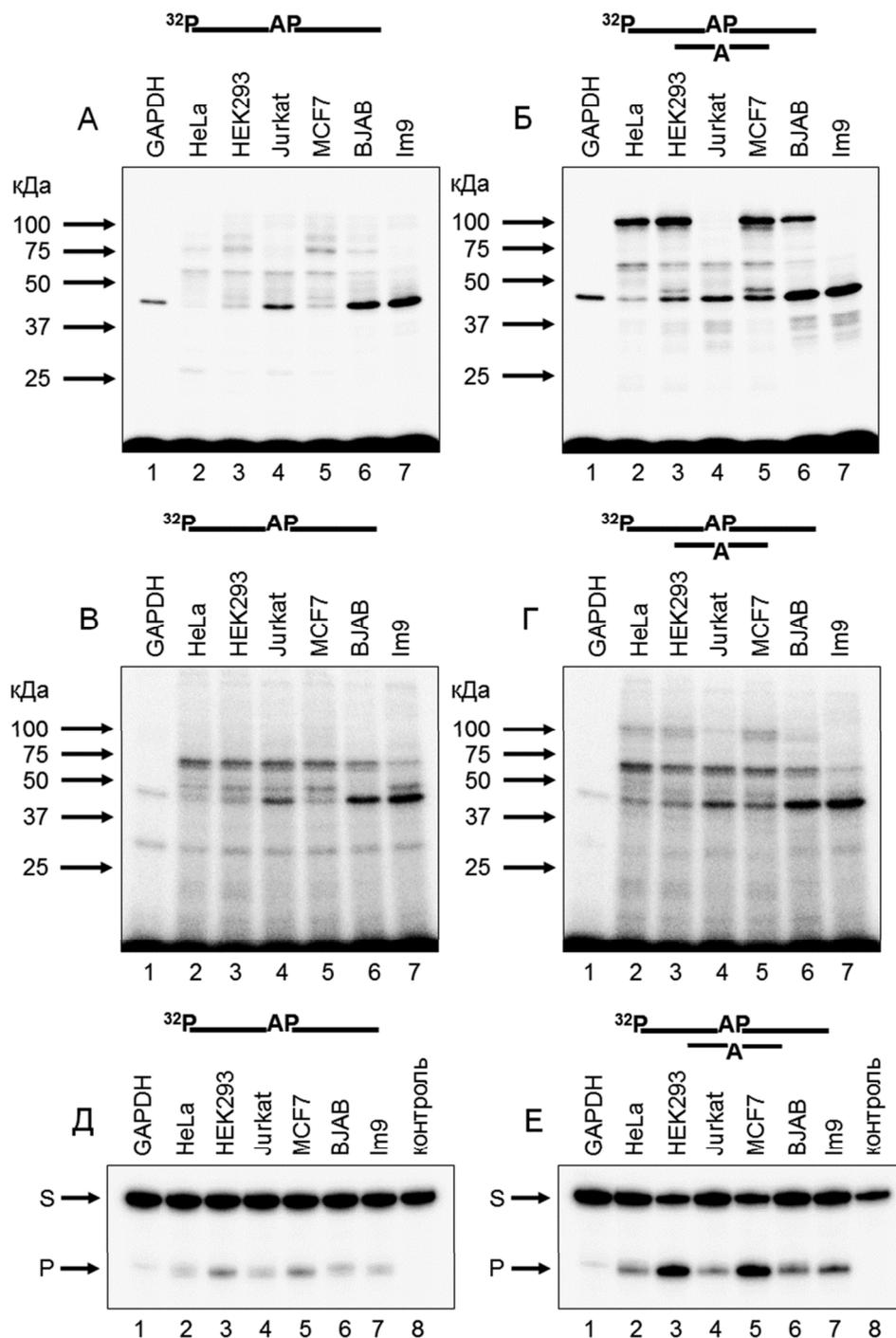


Рис. 3.31. AP-ДНК как специфичные зонды для детекции GAPDH в клеточных экстрактах.

(А и Б) Радиоавтографы гелей после электрофоретического разделения в 12%-ных ПААГ по Лэммли продуктов боргидрид-зависимой сшивки белков клеточных экстрактов (2 мг/мл) с 500 нМ оц AP-ДНК (А) и 500 нМ DDE-AP-ДНК 16А (Б). Дор. 1 – очищенная GAPDH; дор. 2–7 – клеточные экстракты (указаны названия клеточных линий).

(В и Г) Радиоавтографы гелей после электрофоретического разделения в 12%-ных ПААГ по Лэммли продуктов боргидрид-независимой сшивки белков клеточных экстрактов (2 мг/мл) с 500 нМ оц AP-ДНК (В) и 500 нМ DDE-AP-ДНК 16А (Г).

(Д и Е) Радиоавтографы гелей после электрофоретического разделения в 20%-ных ПААГ с 7 М мочевиной 500 нМ оц AP-ДНК (Д) и 500 нМ DDE-AP-ДНК 16А (Е), инкубированных с белками клеточных экстрактов (2 мг/мл). Аликвоты были отобраны из реакционных смесей, для которых анализ продуктов сшивки белок–ДНК приведен на рис. А и Б соответственно. S – субстрат (нерасщепленная AP-ДНК); P – продукт (расщепленная AP-ДНК).

GAPDH в экстрактах клеток VJAB и Im9 формирует аддукты с AP-ДНК с наибольшим выходом (рис. 3.31А и Б, дор. 6 и 7), при этом полосы GAPDH в данных экстрактах имеют наибольшую интенсивность при иммунодетекции (рис. 3.33А, дор. 6 и 7). Напротив, GAPDH в клетках HeLa формирует аддукт с AP-ДНК с наименьшим выходом (рис. 3.31А и Б, дор. 2), однако интенсивность полосы данного белка не является наименьшей в случае иммунодетекции (рис. 3.33А, дор. 2). При иммунодетекции полоса, соответствующая 0,1 мкг очищенной GAPDH, имеет более высокую интенсивность, чем полосы GAPDH, содержащейся в 2 мкг белков каждого из экстрактов (рис. 3.33А, дор. 1), однако в случае эксперимента с боргидридной сшивкой, где соотношение очищенной GAPDH и белков экстрактов такое же, выход ее аддукта с AP-ДНК меньше, чем выход аддуктов, формируемых GAPDH в экстрактах VJAB и Im9 (рис. 3.31Б, сравните дор. 1 с дор. 6 и 7). Чтобы понять причину таких различий, был проверен уровень расщепления AP-сайтов в данных экстрактах при 10-минутной инкубации с AP-ДНК (рис. 3.31Д для оц AP-ДНК и рис. 3.31Е для DDE-AP-ДНК). Уровень расщепления в целом выше для DDE-AP-ДНК. Интересно, что наивысший уровень расщепления AP-сайтов наблюдается в экстрактах клеток HEK293 и MCF-7 (рис. 3.31Е, дор. 3 и 5). Это может быть связано с тем, что по данным иммунодетекции в данных экстрактах наблюдается наименьшее содержание GAPDH (рис. 3.33А, дор. 3 и 5). В других экстрактах, где AP-лиазная активность низкая, а содержание GAPDH высокое, GAPDH может конкурировать с AP-лиазами за связывание с AP-ДНК.

Другой причиной несоответствия между уровнями сшивки белков с AP-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. Известно, что GAPDH чувствительна к окислительному стрессу [147]. Между Cys152 и Cys156 в условиях окисления может формироваться дисульфидная связь [158]. Кроме того, показано, что окисленная GAPDH связывается с ДНК более эффективно [161]. Следует отметить, что все экстракты были приготовлены одновременно по одному и тому же протоколу. В данном случае разница в окислительном состоянии SH-групп GAPDH в экстрактах, если она существует, по-видимому, определяется их состоянием в клетках.

Для восстановления потенциально формирующихся в GAPDH дисульфидных связей использовался *трис*(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР). Путем подбора условий эксперимента с использованием экстракта клеток Im9 было показано, что инкубации с 2 мМ ТСЕР в течение 30 мин во льду достаточно, чтобы практически полностью ингибировать формирование боргидрид-зависимого аддукта GAPDH–AP-ДНК (рис. 3.32,

дор. 1). ТСЕР также ингибирует формирование боргидрид-независимого аддукта GAPDH-АР-ДНК (рис. 3.32, дор. 6).

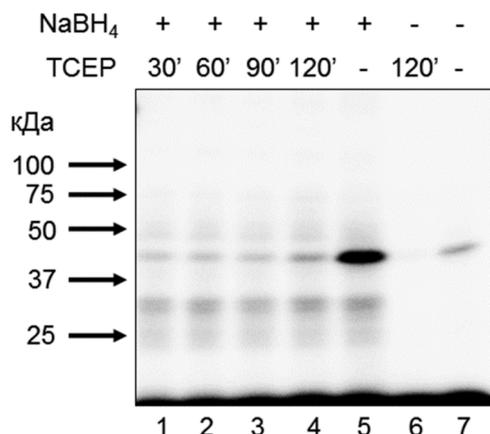


Рис. 3.32. Оптимизация времени обработки экстракта клеток Im9 ТСЕР.

Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли продуктов боргидрид-зависимой и боргидрид-независимой сшивки белков экстракта клеток Im9 (2 мг/мл) с 500 нМ DDE-АР-ДНК 16А в присутствии и в отсутствие 2 мМ ТСЕР. Время инкубации: дор. 1 – 30 мин; дор. 2 – 60 мин; дор. 3 – 90 мин; дор. 4 – 120 мин; дор. 6 – 120 мин – реакция без боргидрида. Контроли без ТСЕР: дор. 5 (с боргидридом) и дор. 7 (без боргидрида).

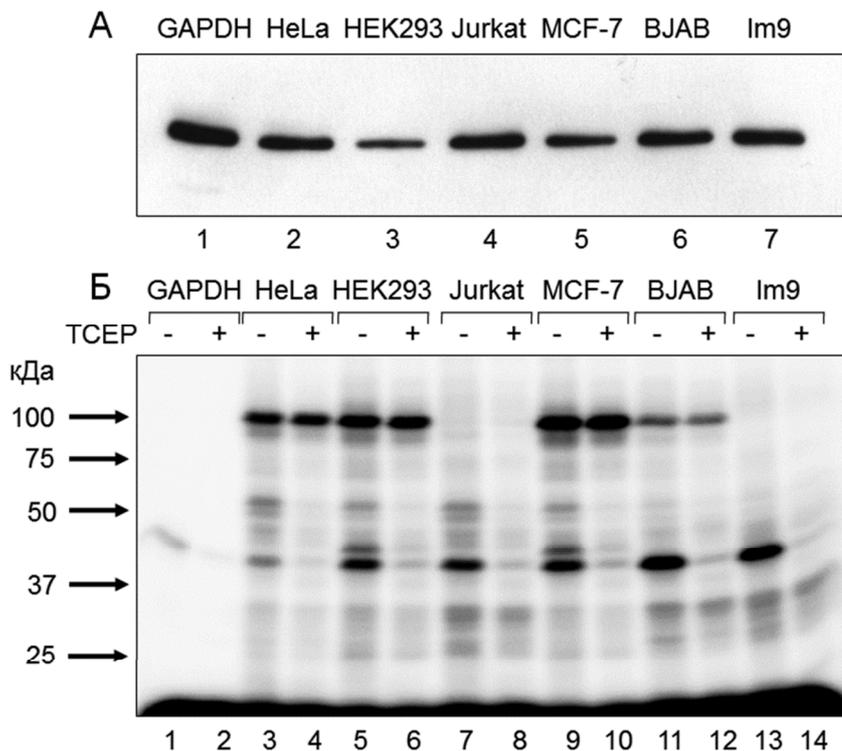


Рис. 3.33. Влияние восстановления дисульфидной связи в GAPDH на ее сшивку с АР-ДНК.

(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 (указаны названия клеточных линий).

(Б) Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ по Лэммли продуктов боргидрид-зависимой сшивки белков экстрактов клеток человека (2,3 мг/мл) и 2,5 мкМ GAPDH с 500 нМ DDE-АР-ДНК 16А после 30 мин предынкубации в присутствии 2 мМ ТСЕР или в его отсутствие. Дор. 2, 4, 6, 8, 10, 12 и 14 – GAPDH или белки клеточных экстрактов, предварительно инкубированные с ТСЕР в течение 30 мин; дор. 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 13 – белки были предварительно инкубированы без ТСЕР перед добавлением АР-ДНК.

Во всех вышеупомянутых экстрактах наблюдается схожее ингибирование формирования боргидрид-зависимых аддуктов GAPDH–AP-ДНК после предынкубации GAPDH с ТСЕР, независимо от выхода данных аддуктов в отсутствие ТСЕР (рис. 3.33Б). Кроме того, результаты данного эксперимента доказывают, что возможное связывание ТСЕР с AP-сайтами не может быть причиной ингибирования формирования аддукта GAPDH–AP-ДНК, поскольку выход 100-кДа аддукта, формируемого Ku, не изменяется в случае, если в реакционной смеси присутствует ТСЕР (сравните дор. 4 и 3, 6 и 5, 10 и 9, 12 и 11). Таким образом, восстановление дисульфидной связи в GAPDH приводит значительному уменьшению количества аддуктов с AP-ДНК. Это наблюдение косвенно подтверждает предположение о различиях в окислительном состоянии GAPDH в разных клеточных экстрактах. Таким образом, сшивка AP-ДНК с GAPDH (с обработкой ТСЕР 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.

Несмотря на то, что главная функция GAPDH не связана с узнаванием ДНК, было показано, что этот фермент взаимодействует с различными повреждениями ДНК, включая структурные аналоги азотистых оснований и нуклеозидов, используемые в противораковой терапии, такие как тиогуанин, меркаптопурин, цитозин-арабинозид и 5-фторурацил [185, 186]; ковалентные аддукты ДНК с алкилирующими агентами сафрамицином [171] и S23906-1 [187]; ковалентные аддукты ДНК с бис-электрофилами [192], что позволяет предположить участие GAPDH в репарации ДНК (см. разд. 1.3.2). Кроме того, было показано непосредственное взаимодействие GAPDH с некоторыми белками, участвующими в репарации ДНК [186, 193] (см. разд. 1.3.3). Взаимодействие GAPDH с AP-сайтами, ключевыми интермедиатами ЭРО, согласуется с этими данными. Однако взаимодействие белка с AP-сайтом с формированием основания Шиффа не всегда свидетельствует о способности белка расщеплять AP-сайты, и наличие AP-лиазной активности у белка должно быть доказано. Значительного расщепления GAPDH AP-сайта в составе оц и DDE-AP-ДНК не наблюдалось, однако нельзя исключать возможности того, что GAPDH способна расщеплять AP-сайты в составе каких-либо других ДНК-структур. Так, например, Ku не расщепляет AP-сайты, когда они находятся далеко от концов полного ДНК-дуплекса [14, 11], но эффективно расщепляет AP-сайты, находящиеся на выступающих оц концах дуплекса [11, 115] или в дуплексной части ДНК, окруженной оц концами (показано в настоящей работе).

В данной работе показано, что GAPDH формирует аддукты с 5'-концевой частью исходной цепи ДНК, содержащей AP-сайт, которая образуется в результате β -элиминирования. Включение GAPDH в стабильные комплексы с продуктом расщепления AP-сайта, по-видимому, обуславливает ее неэффективность как AP-лиазы. Более того, в настоящей работе показано, что аддукты GAPDH–AP–ДНК являются частично боргидрид-независимыми и стабильны в течение длительного времени. В то время как боргидрид-зависимые, обратимые комплексы GAPDH с AP–ДНК, опосредованные формированием основания Шиффа, могут участвовать во временной защите расщепленной ДНК от дальнейшего нежелательного расщепления нуклеазами, боргидрид-независимые аддукты белок–ДНК, по-видимому, токсичны для клетки. Способность формировать стабильные боргидрид-независимые аддукты белок–ДНК с 5'-концевой частью цепи ДНК, содержащей AP-сайт, была показана ранее для таких белков, как XRCC1 [18], ALKBH1 [19] и для PARP1 [20] (разд. 1.1.3.). Ни в одном из случаев «точки пришивки» не были идентифицированы, однако авторы данных работ предполагали участие нуклеофильных групп данных белков в формировании боргидрид-независимых аддуктов. В работе [20] было высказано предположение о «суицидальной» природе боргидрид-независимой сшивки PARP1 с AP-сайтами.

В случае GAPDH восстановленные SH-группы белка не являются необходимыми для формирования боргидрид-независимых аддуктов; более того, в данной работе показано, что уровень формирования аддуктов снижался после восстановления дисульфидной связи при помощи TCEP. Это можно объяснить тем, что восстановленная форма GAPDH взаимодействует с ДНК менее эффективно, что полностью согласуется с тем фактом, что окисление GAPDH перекисью водорода повышает уровень ее связывания с ДНК [161].

Таким образом, на основе вышеописанного в клетках возможен следующий сценарий (рис. 3.34). В условиях окислительного стресса Cys152 в активном центре GAPDH подвергается окислению, что повышает ее способность связываться с ДНК [161]. Также в данных условиях может происходить нитрозилирование того же остатка, способствующее перемещению GAPDH в комплексе с E3 убиквитин-лигазой Siah1 в ядро [151], где она, вероятно, присутствует в форме мономера или димера [161]. При окислительном стрессе повреждается ДНК и активируется PARP1, синтезирующая поли(ADP-рибозу) с использованием NAD^+ . Кроме того, GAPDH, переместившаяся в ядро, способна связываться с PARP1 и активировать ее [199]. 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 AP-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.

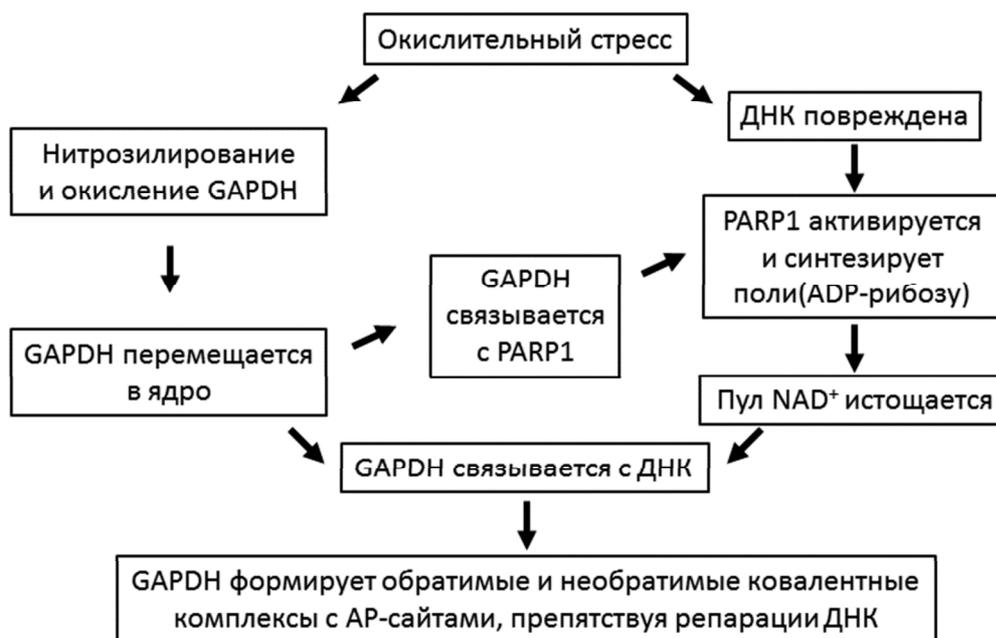


Рис. 3.34. Схема взаимосвязи процессов, происходящих в клетках в условиях окислительного стресса и приводящих к формированию аддуктов GAPDH с AP-сайтами. Пояснения см. в тексте.

Заключение

В данной работе при поиске белков клеточных экстрактов, взаимодействующих с AP-сайтами, Ku80-субъединица Ku-антигена и GAPDH были идентифицированы как белки, формирующие боргидрид-зависимые аддукты с AP-сайтами в составе ДНК-дуплекса с 5'- и 3'-выступающими оц концами. Затем эти белки были выделены из культивируемых клеток человека, и было подробно исследовано их взаимодействие с различными ДНК, содержащими AP-сайты.

Способность Ku взаимодействовать с AP-сайтами была известна ранее; при этом считалось, что существует два типа данного взаимодействия: в случае, если AP-сайт находится в дц ДНК далеко от ее концов, Ku связывается с ним, не расщепляя его, и защищает его от расщепления другими белками. Если же AP-сайт находится на выступающих оц концах ДНК или вблизи от них, Ku расщепляет его, подготавливая «грязные» концы дц разрыва к лигированию. Данная работа представляет собой

логическое продолжение предыдущих исследований взаимодействия Ku с AP-сайтами. Так, была детально изучена способность Ku формировать боргидрид-зависимые аддукты с AP-ДНК, различающимися длиной выступающих концов, основанием напротив AP-сайта и положением AP-сайта в цепи. Кроме того, было впервые показано, что Ku способен расщеплять AP-сайты, находящиеся в дц части ДНК, далеко от ее концов; однако для этого ДНК должна содержать длинные оц концы. Такой тип 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 AP-сайты, и показано, что Ku проявляет специфичность, предпочитительно расщепляя апуриновые сайты в такой ДНК. Таким образом, Ku способен инициировать альтернативный путь репарации AP-сайтов, находящихся в составе кластерных повреждений определенного типа. Данный путь может реализовываться в клетках человека, когда подавлена активность APE1 — основного фермента, отвечающего за репарацию AP-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 AP-сайтами была обнаружена в данной работе впервые. На первый взгляд эта способность кажется неожиданной, однако 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 AP-сайтами: боргидрид-зависимый (опосредованный образованием основания Шиффа) и боргидрид-независимый, механизм образования которого неизвестен. Однако поскольку GAPDH теряет способность образовывать аддукты с AP-ДНК после восстановления дисульфидных связей в ней, в формировании боргидрид-независимых аддуктов, вероятно, принимают участие какие-то другие нуклеофильные группы белка. Также представляется значимым тот факт, что GAPDH не обладает способностью расщеплять AP-сайты, однако предпочитительно формирует аддукты с AP-ДНК, расщепленной по определенному механизму. В разных работах, посвященных функциям GAPDH в репарации, ей приписывалась как «положительная» [184–186, 191, 193, 194], так и «отрицательная» [171, 187] роль в этом процессе. Также разными авторами получены данные как о проапоптотическом [151, 171, 174], так и об антиапоптотическом [194] 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 AP-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. Однако учитывая неэффективное образование аддуктов GAPDH с AP-сайтами в составе двухцепочечной ДНК, едва ли GAPDH, несмотря на ее высокую копияность, может оказывать значительный токсический эффект в нормальных физиологических условиях.

В целом, данная работа показывает, что идентификация белков, взаимодействующих с AP-сайтами, помогает выявить ранее неизвестные дополнительные функции таких белков. Значение этих функций *in vivo* предстоит доказать в ходе дальнейших исследований.

Выводы

1. Поиск белков клеток человека, взаимодействующих с апуриновыми/апиримидиновыми (AP) сайтами в ДНК с образованием основания Шиффа, выявил, что AP-ДНК-дуплекс с выступающими одноцепочечными участками (DDE-AP-ДНК) эффективно образует боргидрид-зависимые аддукты с кажущимися молекулярными массами около 100 кДа и 45 кДа, которые характерны только для AP-ДНК такой структуры.
2. Сочетанием аффинной хроматографии и масс-спектрометрического анализа проведена идентификация белков в составе указанных аддуктов с AP-ДНК. Установлено, что:
 - белок в составе 100-кДа аддукта представлен Ku80-субъединицей Ku-антигена;
 - в состав 45-кДа аддукта входит глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (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-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 путь репарации AP-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-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^+ ; GAPDH теряет способность образовывать аддукты с AP-ДНК после восстановления дисульфидных мостиков в составе белка.

Список литературы

1. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature*. – 1993. – V. 362 (6422) – P. 709–715.
2. Wilson D.M., 3rd, Thompson L.H. Life without DNA repair // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1997. – V. 94 (24) – P. 12754–12757.
3. McCullough A.K., Dodson M.L., Lloyd R.S. Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures // *Annu. Rev. Biochem.* – 1999. – V. 68 – P. 255–285.
4. Atamna H., Cheung I., Ames B.N. A method for detecting abasic sites in living cells: Age-dependent changes in base excision repair // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2000. – V. 97 (2) – P. 686–691.
5. Sokhansanj B.A., Wilson D.M., 3rd. Oxidative DNA damage background estimated by a system model of base excision repair // *Free Radic. Biol. Med.* – 2004. – V. 37 (3) – P. 422–427.
6. Asaeda A., Ide H., Tano K., Takamori Y., Kubo K. Repair kinetics of abasic sites in mammalian cells selectively monitored by the aldehyde reactive probe (ARP) // *Nucleosides Nucleotides*. – 1998. – V. 17 (1–3) – P. 503–513.
7. Krokan H.E., Nilsen H., Skorpen F., Otterlei M., Slupphaug G. Base excision repair of DNA in mammalian cells // *FEBS Lett.* – 2000. – V. 476 (1–2) – P. 73–77.
8. Georgakilas A.G., O'Neill P., Stewart R.D. Induction and repair of clustered DNA lesions: what do we know so far? // *Radiat. Res.* – 2013. – V. 180 (1) – P. 100–109.
9. Ward J.F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 1988. – V. 35 – P. 95–125.
10. Datta K., Neumann R.D., Winters T.A. Characterization of complex apurinic/apyrimidinic-site clustering associated with an authentic site-specific radiation-induced DNA double-strand break // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2005. – V. 102 (30) – P. 10569–10574.
11. Roberts S.A., Strande N., Burkhalter M.D., Strom C., Havener J.M., Hasty P., Ramsden D.A. Ku is a 5'-dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends // *Nature*. – 2010. – V. 464 (7292) – P. 1214–1217.
12. Ходырева С.Н., Лаврик О.И. Аффинная модификация в протеомном исследовании ансамблей репарации ДНК // *Биоорг. химия*. – 2011. – Т. 37 (1) – С. 91–107.
13. Левина Е.С., Бавыкин С.Г., Шик В.В., Мирзабеков А.Д. Взаимодействие гистонов с ДНК в хроматине. Новый метод ковалентного связывания гистонов с ДНК, удобный для их локализации на ДНК // *Биохимия*. – 1980. – Т. 45 (6) – С. 1133–1145.

14. Ilina E.S., Lavrik O.I., Khodyreva S.N. Ku antigen interacts with abasic sites // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – V. 1784 (11) – P. 1777–1785.
15. Ильина Е.С., Лаврик О.И., Ходырева С.Н. Идентификация Ku80 субъединицы Ku-антигена как белка, взаимодействующего с апуриновыми/апиримидиновыми сайтами // *Докл. АН.* – 2009. – Т. 424 (3) – С. 411–414.
16. Ходырева С.Н., Ильина Е.С., Кутузов М.М., Суханова М.В., Лаврик О.И. Взаимодействие поли(ADP-рибозо)полимеразы 1 с апуриновыми/ апиримидиновыми сайтами // *Докл. АН.* – 2010. – Т. 431 (1) – С. 132–135.
17. Khodyreva S.N., Prasad R., Ilina E.S., Sukhanova M.V., Kutuzov M.M., Liu Y., Hou E.W., Wilson S.H., Lavrik O.I. Apurinic/apyrimidinic (AP) site recognition by the 5'-dRP/AP lyase in poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2010. – V. 107 (51) – P. 22090–22095.
18. Nazarkina Z.K., Khodyreva S.N., Marsin S., Lavrik O.I., Radicella J.P. XRCC1 interactions with base excision repair DNA intermediates // *DNA Repair (Amst.)*. – 2007. – V. 6 (2) – P. 254–264.
19. Müller T.A., Andrzejak M.M., Hausinger R.P. A covalent protein-DNA 5'-product adduct is generated following AP lyase activity of human ALKBH1 (AlkB homologue 1) // *Biochem. J.* – 2013. – V. 452 (3) – P. 509–518.
20. Prasad R., Horton J.K., Chastain P.D. 2nd, Gassman N.R., Freudenthal B.D., Hou E.W., Wilson S.H. Suicidal cross-linking of PARP-1 to AP site intermediates in cells undergoing base excision repair // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – V. 42 (10) – P. 6337–6351.
21. Lindahl T., Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid // *Biochemistry.* – 1972. – V. 11 (19) – P. 3610–3618.
22. Greer S., Zamenhof S. Studies on depurination of DNA by heat // *J. Mol. Biol.* – 1962. – V. 4 – P. 123–141.
23. Lindahl T., Andersson A. Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid // *Biochemistry.* – 1972. – V. 11 (19) – P. 3618–3623.
24. Zoltewicz J.A., Clark D.F., Sharpless T.W., Grahe G. Kinetics and mechanism of the acid-catalyzed hydrolysis of some purine nucleosides // *J. Am. Chem. Soc.* – 1970. – V. 92 (6) – P. 1741–1749.
25. Garrett E.R., Mehta P.J. Solvolysis of adenine nucleosides. I. Effects of sugars and adenine substituents on acid solvolyses // *J. Am. Chem. Soc.* – 1972. – V. 94 (24) – P. 8532–8541.
26. Shapiro R., Danzig M. Acidic hydrolysis of deoxycytidine and deoxyuridine derivatives: General mechanism of deoxyribonucleoside hydrolysis // *Biochemistry.* – 1972. – V. 11 (1) – P. 23–29.

27. Loeb L. A., Preston B. D. Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites // *Annu. Rev. Genet.* – 1986. – V. 20 – P. 201–230.
28. Demple B., Herman T., Chen D.S. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1991. – V. 88 (24) – P. 11450–11454.
29. Robson C.N., Hickson I.D. Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/apyrimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in *E. coli* xth (exonuclease III) mutants // *Nucl. Acids Res.* – 1991. – V. 19 (20) – P. 5519–5523.
30. Lebedeva N.A., Rechkunova N.I., Ishchenko A.A., Saparbaev M, Lavrik O.I. The mechanism of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 in the cleavage of AP site and its synthetic analogs // *DNA Repair (Amst).* – 2013. – V. 12 (12) – P. 1037–1042.
31. Loeb L.A. Apurinic sites as mutagenic intermediates // *Cell.* – 1985. – V. 40 (3) – P. 483–484.
32. Viswesh V., Gates K., Sun D. Characterization of DNA damage induced by a natural product antitumor antibiotic leinamycin in human cancer cells // *Chem. Res. Toxicol.* – 2010. – V. 23 (1) – P. 99–107.
33. McNeill D.R., Lam W., DeWeese T.L., Cheng Y.-C., Wilson D.M. Impairment of ape1 function enhances cellular sensitivity to clinically relevant alkylators and antimetabolites // *Mol. Cancer Res.* – 2009. – V. 7 (6) – P. 897–906.
34. Di Noia J.M., Williams G.T., Chan D.T., Buerstedde J.M., Baldwin G.S., Neuberger M.S. Dependence of antibody gene diversification on uracil excision // *J. Exp. Med.* – 2007. – V. 204 (13) – P. 3209–3219.
35. Rada C., Di Noia J.M., Neuberger M.S. Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation // *Mol. Cell.* – 2004. – V. 16 (2) – P. 163–171.
36. Yu S.-L., Lee S.-K., Johnson R.E., Prakash L., Prakash S. The stalling of transcription at abasic sites is highly mutagenic // *Mol. Cell. Biol.* – 2003. – V. 23 (1) – P. 382–388.
37. Chen Y.-H., Bogenhagen D.F. Effects of DNA lesions on transcription elongation by T7 RNA polymerase // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268 (8) – P. 5849–5855.
38. Paz-Elizur T., Takeshita M., Goodman M., O'Donnell M., Livneh Z. Mechanism of translesion DNA synthesis by DNA polymerase II. Comparison to DNA polymerases I and III core // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271 (40) – P. 24662–24669.
39. Paz-Elizur T., Takeshita M., Livneh Z. Mechanism of bypass synthesis through an abasic site analog by DNA polymerase I // *Biochemistry.* – 1997. – V. 36 (7) – P. 1766–1773.

40. Goodman M.F., Cai H., Bloom L.B., Eritja R. Nucleotide insertion and primer extension at abasic template sites in different sequence contexts // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1994. – V. 726 – P. 132–142.
41. Taylor J.-S. New structural and mechanistic insight into the A-rule and the instructional and non-instructional behavior of DNA photoproducts and other lesions // *Mutat. Res.* – 2002. – V. 510 (1–2) – P. 55–70.
42. Avkin S., Adar S., Blander G., Livneh Z. Quantitative measurement of translesion replication in human cells: Evidence for bypass of abasic sites by a replicative DNA polymerase // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* – 2002. – V. 99 (6) – P. 3764–3769.
43. Fleck O., Schär P. Translesion DNA synthesis: Little fingers teach tolerance // *Curr. Biol.* – 2004. – V. 14 (10) – P. R389–R391.
44. Cai H., Bloom L.B., Eritja R., Goodman M.F. Kinetics of deoxyribonucleotide insertion and extension at abasic template lesions in different sequence contexts using HIV-1 reverse transcriptase // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268 (31) – P. 23567–23572.
45. Haracska L., Unk I., Johnson R.E., Johansson E., Burgers P.M.J., Prakash S., Prakash L. Roles of yeast DNA polymerases δ and ζ and of Rev1 in the bypass of abasic sites // *Genes Dev.* – 2001. – V. 15 (8) – P. 945–954.
46. Daube S.S., Tomer G., Livneh Z. Translesion replication by DNA polymerase δ depends on processivity accessory proteins and differs in specificity from DNA polymerase β // *Biochemistry.* – 2000. – V. 39 (2) – P. 348–355.
47. Chaudhry M.A., Weinfeld M. Reactivity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease and *Escherichia coli* exonuclease III with bistranded abasic sites in DNA // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272 (25) – P. 15650–15655.
48. Paap B., Wilson 3rd D.M., Sutherland B.M. Human abasic endonuclease action on multilesion abasic clusters: implications for radiation-induced biological damage // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – V. 36 (8) – P. 2717–2727.
49. Eccles L.J., Lomax M.E., O'Neill P. Hierarchy of lesion processing governs the repair, double-strand break formation and mutability of three-lesion clustered DNA damage // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – V. 38 (4) – P. 1123–1134.
50. McKenzie J.A., Strauss P.R. Oligonucleotides with bistranded abasic sites interfere with substrate binding and catalysis by human apurinic/apyrimidinic endonuclease // *Biochemistry* – 2001. – V. 40 (44) – P. 13254–13261.
51. David-Cordonnier M.H., Cunniffe S.M., Hickson I.D., O'Neill P. Efficiency of incision of an AP site within clustered DNA damage by the major human AP endonuclease // *Biochemistry* – 2002. – V. 41 (2) – P. 634–642.

52. Lomax M.E., Cunniffe S., O'Neill P. Efficiency of repair of an abasic site within DNA clustered damage sites by mammalian cell nuclear extracts // *Biochemistry* – 2004. – V. 43 (34) – P. 11017–11026.
53. Ilina E.S., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Unusual interaction of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) with abasic sites via the Schiff-base-dependent mechanism // *Biochimie* (в печати)
54. Georgakilas A.G., Bennett P.V., Wilson D.M., Sutherland B.M. Processing of bistranded abasic DNA clusters in γ -irradiated human hematopoietic cells // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32 (18) – P. 5609–5620.
55. Dodson M.L., Michaels M.L., Lloyd R.S. Unified catalytic mechanism for DNA glycosylases // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269 (52) – P. 32709–32712.
56. Zharkov D.O., Grollman A.P. MutY DNA glycosylase: base release and intermediate complex formation // *Biochemistry.* – 1998. – V. 37 (36) – P. 12384–12394.
57. Dodson M.L., Schrock R.D. 3rd, Lloyd R.S. Evidence for an imino intermediate in the T4 endonuclease V reaction // *Biochemistry.* – 1993. – V. 32 (32) – P. 8284–8290.
58. Sun B., Latham K.A., Dodson M.L., Lloyd R.S. Studies on the catalytic mechanism of five DNA glycosylases. Probing for enzyme-DNA imino intermediates // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270 (33) – P. 19501–19508.
59. Zharkov D.O., Rieger R.A., Iden C.R., Grollman A.P. NH₂-terminal proline acts as a nucleophile in the glycosylase/AP-lyase reaction catalyzed by *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) protein // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272 (8) – P. 5335–5341.
60. Nash H. M., Lu R., Lane W. S., Verdine G. L. The critical active-site amine of the human 8-oxoguanine DNA glycosylase, hOgg1: direct identification, ablation and chemical reconstitution // *Chem. Biol.* – 1997. – V. 4 (9) – P. 693–702.
61. Rieger R.A., McTigue M.M., Kycia J.H., Gerchman S.E., Grollman A.P., Iden C.R. Characterization of a cross-linked DNA-endonuclease VIII repair complex by electrospray ionization mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* – 2000. – V. 11 (6) – P. 505–515.
62. Ikeda S., Biswas T., Roy R., Izumi T., Boldogh I., Kurosky A., Sarker A.H., Seki S., Mitra S. Purification and characterization of human NTH1, a homolog of *Escherichia coli* endonuclease III. Direct identification of Lys-212 as the active nucleophilic residue // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273 (34) – P. 21585–21593.
63. Matsumoto Y., Kim K. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair // *Science.* – 1995. – V. 269 (5224) – P. 699–702.

64. Longley M.J., Prasad R., Srivastava D.K., Wilson S.H., Copeland W.C. Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – V. 95 (21) – P. 12244–12248.
65. Bebenek K., Tissier A., Frank E.G., McDonald J.P., Prasad R., Wilson S.H., Woodgate R., Kunkel T.A. 5'-Deoxyribose phosphate lyase activity of human DNA polymerase iota in vitro // *Science.* – 2001. – V. 291 (5511) – P. 2156–2159.
66. Prasad R., Bebenek K., Hou E., Shock D.D., Beard W.A., Woodgate R., Kunkel T.A., Wilson S.H. Localization of the deoxyribose phosphate lyase active site in human DNA polymerase iota by controlled proteolysis // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278 (32) – P. 29649–29654.
67. Prasad R., Longley M.J., Sharief F.S., Hou E.W., Copeland W.C., Wilson S.H. Human DNA polymerase theta possesses 5'-dRP lyase activity and functions in single-nucleotide base excision repair in vitro // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – V. 37 (6) – P. 1868–1877.
68. Haracska L., Prakash L., Prakash S. A mechanism for the exclusion of low-fidelity human Y-family DNA polymerases from base excision repair // *Genes Dev.* – 2003. – V. 17 (22) – P. 2777–2785.
69. Bogenhagen D.F., Pinz K.G. The action of DNA ligase at abasic sites in DNA // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273 (14) – P. 7888–7893.
70. Mazumder A., Neamati N., Pilon A.A., Sunder S., Pommier Y. Chemical trapping of ternary complexes of human immunodeficiency virus type 1 integrase, divalent metal, and DNA substrates containing an abasic site. Implications for the role of lysine 136 in DNA binding // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271 (44) – P. 27330–27338.
71. Yacoub A., Augeri L., Kelley M.R., Doetsch P.W., Deutsch W.A. A Drosophila ribosomal protein contains 8-oxoguanine and abasic site DNA repair activities // *EMBO J.* – 1996. – V. 15 (9) – P. 2306–2312.
72. Hegde V., Wang M., Deutsch W.A. Characterization of human ribosomal protein S3 binding to 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites by surface plasmon resonance // *DNA Repair.* – 2004. – V. 3 (2) – P. 121–126.
73. Балуева К.Э., Малыгин А.А., Карпова Г.Г., Невинский Г.А., Жарков Д.О. Взаимодействие рибосомного белка S3 человека с неповрежденной и поврежденной ДНК // *Молекуляр. биология.* – 2008. – Т. 42 (2) – С. 314–322.
74. Postel E.H., Abramczyk B.M., Levit M.N., Kyin S. Catalysis of DNA cleavage and nucleoside triphosphate synthesis by NM23-H2/NDP kinase share an active site that implies

- a DNA repair function // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2000. – V. 97 (26) – P. 14194–14199.
75. Prasad R., Liu Y., Deterding L.J., Poltoratsky V.P., Kedar P.S., Horton J.K., Kanno S., Asagoshi K., Hou E.W., Khodyreva S.N., Lavrik O.I., Tomer K.B., Yasui A., Wilson S.H. HMGB1 is a cofactor in mammalian base excision repair // *Mol. Cell.* – 2007. – V. 27 (5) – P. 829–841.
 76. Rieger R.A., Zaika V., Xie W., Johnson F., Grollman A.P., Iden C.R., Zharkov D.O. Proteomic approach to identification of proteins reactive for abasic sites in DNA // *Mol. Cell. Proteomics.* – 2006. – V. 5 (5) – P. 858–867.
 77. Mladenov E., Iliakis G. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways // *Mutat. Res.* – 2011. – V. 711 (1–2) – P. 61–72.
 78. Davis A.J., Chen D.J. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining // *Transl. Cancer Res.* – 2013. – V. 2 (3) – P. 130–143.
 79. Fell V.L., Schild-Poulter C. The Ku heterodimer: function in DNA repair and beyond // *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* – 2015. – V. 763 – P. 15–29.
 80. Ceccaldi R., Rondinelli B., D'Andrea A.D. Repair pathway choices and consequences at the double-strand break // *Trends Cell. Biol.* – 2016. – V. 26 (1) – P. 52–64.
 81. Gu Y., Jin S., Gao Y., Weaver D.T., Alt F.W. Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1997. – V. 94 (15) – P. 8076–8081.
 82. Nussenzweig A., Sokol K., Burgman P., Li L., Li G.C. Hypersensitivity of Ku80-deficient cell lines and mice to DNA damage: the effects of ionizing radiation on growth, survival, and development // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1997. – V. 94 (25) – P. 13588–13593.
 83. Difilippantonio M.J., Zhu J., Chen H.T., Meffre E., Nussenzweig M.C., Max E.E., Ried T., Nussenzweig A. DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation // *Nature.* – 2000. – V. 404 (6777) – P. 510–514.
 84. Chen S., Inamdar K.V., Pfeiffer P., Feldmann E., Hannah M.F., Yu Y., Lee J.W., Zhou T., Lees-Miller S.P., Povirk L.F. Accurate in vitro end joining of a DNA double strand break with partially cohesive 3'-overhangs and 3'-phosphoglycolate termini: effect of Ku on repair fidelity // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276 (26) – P. 24323–24330.
 85. Walker J.R., Corpina R.A., Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair // *Nature.* – 2001. – V. 412 (6847) – P. 607–614.

86. Mimori T., Akizuki M., Yamagata H., Inada S., Yoshida S., Homma M. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap // *J. Clin. Invest.* – 1981. – V. 68 (3) – P. 611–620.
87. Cavazzana I., Ceribelli A., Quinzanini M., Scarsi M., Airò P., Cattaneo R., Franceschini F. Prevalence and clinical associations of anti-Ku antibodies in systemic autoimmune diseases // *Lupus.* – 2008. – V. 17 (8) – P. 727–732.
88. Schild-Poulter C., Su A., Shih A., Kelly O.P., Fritzler M.J., Goldstein R., Haché R.J. Association of autoantibodies with Ku and DNA repair proteins in connective tissue diseases // *Rheumatology (Oxford).* – 2008. – V. 47 (2) – P. 165–171.
89. Downs J.A., Jackson S.P. A means to a DNA end: the many roles of Ku // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2004. – V. 5 (5) – P. 367–378.
90. Gullo C., Au M., Feng G., Teoh G. The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – V. 1765 (2) – P. 223–234.
91. Woodbine L., Gennery A.R., Jeggo P.A. The clinical impact of deficiency in DNA non-homologous end-joining // *DNA Repair (Amst).* – 2014. – V. 16 – P. 84–96.
92. Matheos D., Ruiz M.T., Price G.B., Zannis-Hadjopoulos M. Ku antigen, an origin-specific binding protein that associates with replication proteins, is required for mammalian DNA replication // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2002. – V. 1578 (1–3) – P. 59–72.
93. Galande S., Kohwi-Shigematsu T. Poly(ADP-ribose) polymerase and Ku autoantigen form a complex and synergistically bind to matrix attachment sequences // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274 (29) – P. 20521–20528.
94. Liu E.S., Lee A.S. Common sets of nuclear factors binding to the conserved promoter sequence motif of two coordinately regulated ER protein genes, GRP78 and GRP94 // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – V. 19 (19) – P. 5425–5431.
95. Li G.C., Yang S.H., Kim D., Nussenzweig A., Ouyang H., Wei J., Burgman P., Li L. Suppression of heat-induced hsp70 expression by the 70-kDa subunit of the human Ku autoantigen // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1995. – V. 92 (10) – P. 4512–4516.
96. Giffin W., Torrance H., Rodda D.J., Prefontaine G.G., Pope L., Hache R.J. Sequence-specific DNA binding by Ku autoantigen and its effects on transcription // *Nature.* – 1996. – V. 380 (6571) – P. 265–268.
97. Mo X., Dynan W.S. Subnuclear localization of Ku protein: functional association with RNA polymerase II elongation sites // *Mol. Cell. Biol.* – 2002. – V. 22 (22) – P. 8088–8099.

98. Porter S.E., Greenwell P.W., Ritchie K.B., Petes T.D. The DNA-binding protein Hdf1p (a putative Ku homologue) is required for maintaining normal telomere length in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – V. 24 (4) – P. 582–585.
99. Boulton S.J., Jackson S.P. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – V. 24 (23) – P. 4639–4648.
100. Polotnianka R.M., Li J., Lustig A.J. The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities // *Curr. Biol.* – 1998. – V. 8 (14) – P. 831–834.
101. d'Adda di Fagagna F., Hande M.P., Tong W.M., Roth D., Lansdorp P.M., Wang Z.Q., Jackson S.P. Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells // *Curr. Biol.* – 2001. – V. 11 (15) – P. 1192–1196.
102. Hsu H.L., Gilley D., Blackburn E.H., Chen D.J. Ku is associated with the telomere in mammals // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1999. – V. 96 (22) – P. 12454–12458.
103. Hsu H.L., Gilley D., Galande S.A., Hande M.P., Allen B., Kim S.H., Li G.C., Campisi J., Kohwi-Shigematsu T., Chen D.J. Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining // *Genes Dev.* – 2000. – V. 14 (22) – P. 2807–2812.
104. Song K., Jung D., Jung Y., Lee S.G., Lee I. Interaction of human Ku70 with TRF2 // *FEBS Lett.* – 2000. – V. 481 (1) – P. 81–85.
105. Bianchi A., de Lange T. Ku binds telomeric DNA in vitro // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274 (30) – P. 21223–21227.
106. Chai W., Ford L.P., Lenertz L., Wright W.E., Shay J.W. Human Ku70/80 associates physically with telomerase through interaction with hTERT // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277 (49) – P. 47242–47247.
107. Ting N.S., Yu Y., Pohorelic B., Lees-Miller S.P., Beattie T.L. Human Ku70/80 interacts directly with hTR, the RNA component of human telomerase // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – V. 33 (7) – P. 2090–2098.
108. Bailey S.M., Meyne J., Chen D.J., Kurimasa A., Li G.C., Lehnert B.E., Goodwin E.H. DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1999. – V. 96 (26) – P. 14899–14904.
109. Samper E., Goytisolo F.A., Slijepcevic P., van Buul P.P., Blasco M.A. Mammalian Ku80 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang // *EMBO Rep.* – 2000. – V. 1 (3) – P. 244–252.

110. Cohen H.Y., Lavu S, Bitterman K.J., Hekking B., Imahiyerobo T.A., Miller C., Frye R., Ploegh H., Kessler B.M., Sinclair D.A. Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis // *Mol. Cell.* – 2004. – V. 13 (5) – P. 627–638.
111. Amsel A.D., Rathaus M., Kronman N., Cohen H.Y. Regulation of the proapoptotic factor Bax by Ku70-dependent deubiquitylation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2008. – V. 105 (13) – P. 5117–5122.
112. Martinez J.J., Seveau S., Veiga E., Matsuyama S., Cossart P. Ku70, a component of DNA-dependent protein kinase, is a mammalian receptor for *Rickettsia conorii* // *Cell.* – 2005. – V. 123 (6) – P. 1013–1023.
113. Munakata Y., Saito-Ito T., Kumura-Ishii K., Huang J., Kodera T., Ishii T., Hirabayashi Y., Koyanagi Y., Sasaki T. Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection // *Blood.* – 2005. – V. 106 (10) – P. 3449–3456.
114. Muller C., Paupert J., Monferran S., Salles B. The double life of the Ku protein: facing the DNA breaks and the extracellular environment // *Cell Cycle.* – 2005. – V. 4 (3) – P. 438–441.
115. Strande N., Roberts S.A., Oh S., Hendrickson E.A., Ramsden D.A. Specificity of the dRP/AP lyase of Ku promotes nonhomologous end joining (NHEJ) fidelity at damaged ends // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287 (17) – P. 13686–13693.
116. Strande N.T., Carvajal-Garcia J., Hallett R.A., Waters C.A., Roberts S.A., Strom C., Kuhlman B., Ramsden D.A. Requirements for 5'dRP/AP lyase activity in Ku // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – V. 42 (17) – P. 11136–11143.
117. Wang J., Dong X., Myung K., Hendrickson E.A., Reeves W.H. Identification of two domains of the p70 Ku protein mediating dimerization with p80 and DNA binding // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273 (2) – P. 842–848.
118. Li H., Choi Y.J., Hanes M.A., Marple T., Vogel H., Hasty P. Deleting Ku70 is milder than deleting Ku80 in p53-mutant mice and cells // *Oncogene.* – 2009. – V. 28 (16) – P. 1875–1878.
119. Li H., Marple T., Hasty P. Ku80-deleted cells are defective at base excision repair // *Mutat. Res.* – 2013. – V. 745–746 – P. 16–25.
120. Choi Y.J., Li H., Son M.Y., Wang X.H., Fornsgaglio J.L., Sobol R.W., Lee M., Vijg J., Imholz S., Dollé M.E., van Steeg H., Reiling E., Hasty P. Deletion of individual Ku subunits in mice causes an NHEJ-independent phenotype potentially by altering apurinic/aprimidinic site repair // *PLoS One.* – 2014. – V. 9 (1) – P. e86358.
121. Ju Y.J., Lee K.H., Park J.E., Yi Y.S., Yun M.Y., Ham Y.H., Kim T.J., Choi H.M., Han G.J., Lee J.H., Lee J., Han J.S., Lee K.M., Park G.H. Decreased expression of DNA repair

- proteins Ku70 and Mre11 is associated with aging and may contribute to the cellular senescence // *Exp. Mol. Med.* – 2006. – V. 38 (6) – P. 686–693.
122. Yoo S., Kimzey A., Dynan W.S. Photocross-linking of an oriented DNA repair complex. Ku bound at a single DNA end // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274 (28) – P. 20034–20039.
 123. Rivera-Calzada A., Spagnolo L., Pearl L.H., Llorca O. Structural model of full-length human Ku70-Ku80 heterodimer and its recognition of DNA and DNA-PKcs // *EMBO Rep.* – 2007. – V. 8 (1) – P. 56–62.
 124. Harris J.I., Waters M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // *The Enzymes* / Ed. P.D. Boyer. – New York: Academic Press, 1976. – P. 1–49.
 125. Skarzynski T., Moody P.C., Wonacott A.J. Structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilis* at 1.8 Å resolution // *J. Mol. Biol.* – 1987. – V. 193 (1) – P. 171–187.
 126. Jeffery C.J. Moonlighting proteins // *Trends Biochem. Sci.* – 1999. – V. 24 (1) – P. 8–11.
 127. Huberts D.H., van der Klei I.J. Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – V. 1803 (4) – P. 520–525.
 128. Bruns G.A.P., Gerald P.S. Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in man-rodent somatic cell hybrids // *Science.* – 1976. – V. 192 (4234) – P. 54–56.
 129. Mezquita J., Pau M., Mezquita C. Several novel transcripts of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expressed in adult chicken testis // *J. Cell Biochem.* – 1998. – V. 71 (1) – P. 127–139.
 130. Seidler N. W. GAPDH: biological properties and diversity // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2013. – V. 985 – P. 1–291.
 131. Sirover M.A. Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology // *J. Cell. Biochem.* – 1997. – V. 66 (2) – P. 133–140.
 132. Sirover M.A. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – V. 1432 (2) – P. 159–184.
 133. Sirover M.A. New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells // *J. Cell Biochem.* – 2005. – V. 95 (1) – P. 45–52.
 134. Sirover M.A. On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – V. 1810 (8) – P. 741–751.
 135. Sirover M.A. Subcellular dynamics of multifunctional protein regulation: mechanisms of GAPDH intracellular translocation // *J. Cell Biochem.* – 2012. – V. 113 (7) – P. 2193–2200.

136. Sirover M.A. Structural analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase functional diversity // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2014. – V. 57 – P. 20–26.
137. Ryazanov A.G., Ashmarina L.I., Muronetz V.I. Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with mono- and polyribosomes of rabbit reticulocytes // *Eur. J. Biochem.* – 1988. – V. 171 (1–2) – P. 301–305.
138. White M.R., Garcin E.D. The sweet side of RNA regulation: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a noncanonical RNA-binding protein // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* – 2016. – V. 7 (1) – P. 53–70.
139. Tsai R., Green H. Studies on a mammalian cell protein (P8) with affinity for DNA in vitro // *J. Mol. Biol.* – 1973. – V. 73 (3) – P. 307–316.
140. Melero J.A., Salas M.L., Salas J., Macpherson I.A. Deoxyribonucleic acid-binding proteins in virus-transformed cell lines // *J. Biol. Chem.* – 1975. – V. 250 (10) – P. 3683–3689.
141. Perucho M., Salas J., Salas M.L. Identification of the mammalian DNA-binding protein P8 as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // *Eur. J. Biochem.* – 1977. – V. 81 (3) – P. 557–562.
142. Morgenegg G., Winkler G.C., Hübscher U., Heizmann C.W., Mous J., Kuenzle C.C. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a nonhistone protein and a possible activator of transcription in neurons // *J. Neurochem.* – 1986. – V. 47 (1) – P. 54–62.
143. Grosse F., Nasheuer H.-P., Scholtissek S., Schomburg U. Lactate dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase are single-stranded DNA-binding proteins that affect the DNA-polymerase- α -primase complex // *Eur. J. Biochem.* – 1986. – V. 160 (3) – P. 459–467.
144. Ronai Z. Glycolytic enzymes as DNA binding proteins // *Int. J. Biochem.* – 1993. – V. 25 (7) – P. 1073–1076.
145. Sawa A., Khan A.A., Hester L.D., Snyder S.H. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – V. 94 (21) – P. 11669–11674.
146. Jindal H.K., Vishwanatha J.K. Purification and characterization of primer recognition proteins from HeLa cells // *Biochemistry.* – 1990. – V. 29 (20) – P. 4767–4773.
147. Baty J.W., Hampton M.B., Winterbourn C.C. Proteomic detection of hydrogen peroxide-sensitive thiol proteins in Jurkat cells // *Biochem. J.* – 2005. – V. 389 (3) – P. 785–795.
148. Ventura M., Mateo F., Serratos J., Salaet I., Carujo S., Bachs O., Pujol M.J. Nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is regulated by acetylation // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2010. – V. 42 (10) – P. 1672–1680.

149. Cahuana G.M., Tejedo J.R., Jiménez J., Ramírez R., Sobrino F., Bedoya F.J. Nitric oxide-induced carbonylation of Bcl-2, GAPDH and ANT precedes apoptotic events in insulin-secreting RINm5F cells // *Exp. Cell Res.* – 2004. – V. 293 (1) – P. 22–30.
150. Huang Q., Lan F., Zheng Z., Xie F., Han J., Dong L., Xie Y., Zheng F. Akt2 kinase suppresses glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)-mediated apoptosis in ovarian cancer cells via phosphorylating GAPDH at threonine 237 and decreasing its nuclear translocation // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286 (49) – P. 42211–42220.
151. Hara M. R., Agrawal N., Kim S. F., Cascio M. B., Fujimuro M., Ozeki Y., Takahashi M., Cheah J. H., Tankou S. K., Hester L. D., Ferris C. D., Hayward S. D., Snyder S. H., Sawa A. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding // *Nat. Cell Biol.* – 2005. – V. 7 (7) – P. 665–674.
152. Hara M.R., Snyder S.H. Nitric oxide-GAPDH-Siah: a novel cell death cascade // *Cell Mol. Neurobiol.* – 2006. – V. 26 (4–6) – P. 527–538.
153. Joo H.Y., Woo S.R., Shen Y.N., Yun M.Y., Shin H.J., Park E.R., Kim S.H., Park J.E., Ju Y.J., Hong S.H., Hwang S.G., Cho M.H., Kim J., Lee K.H. SIRT1 interacts with and protects glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from nuclear translocation: implications for cell survival after irradiation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2012. – V. 424 (4) – P. 681–686.
154. Kornberg M.D., Sen N., Hara M.R., Juluri K.R., Nguyen J.V., Snowman A.M., Law L., Hester L.D., Snyder S.H. GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins // *Nat. Cell Biol.* – 2010. – V. 12 (11) – P. 1094–1100.
155. Park J., Han D., Kim K., Kang Y., Kim Y. O-GlcNAcylation disrupts glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homo-tetramer formation and mediates its nuclear translocation // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – V. 1794 (2) – P. 254–262.
156. Jans D.A. Nuclear signaling pathways for polypeptide ligands and their membrane receptors? // *FASEB J.* – 1994. – V. 8 (11) – P. 841–847.
157. Brown V.M., Krynetski E.Y., Krynetskaia N.F., Grieger D., Mukatira S.T., Murti K.G., Slaughter C.A., Park H.W., Evans W.E. A novel CRM1-mediated nuclear export signal governs nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase following genotoxic stress // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279 (7) – P. 5984–5992.
158. Hwang N. R., Yim S. H., Kim Y. M., Jeong J., Song E. J., Lee Y., Lee J. H., Choi S., Lee K. J. Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular functions // *Biochem. J.* – 2009. – V. 423 (2) – P. 253–264.

159. Peralta D., Bronowska A.K., Morgan B., Dóka É., Van Laer K., Nagy P., Gräter F., Dick T.P. A proton relay enhances H₂O₂ sensitivity of GAPDH to facilitate metabolic adaptation // *Nat. Chem. Biol.* – 2015. – V. 11 (2) – P. 156–163.
160. Hildebrandt T., Knuesting J., Berndt C., Morgan B., Scheibe R. Cytosolic thiol switches regulating basic cellular functions: GAPDH as an information hub? // *Biol. Chem.* – 2015. – V. 396 (5) – P. 523–537.
161. Arutyunova E.I., Danshina P.V., Domnina L.V., Pleten A.P., Muronetz V.I. Oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances its binding to nucleic acids // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – V. 307 (3) – P. 547–552.
162. Demarse N.A., Ponnusamy S., Spicer E. K., Apohan E., Baatz J.E., Ogretmen B., Davies C. Direct binding of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase to telomeric DNA protects telomeres against chemotherapy-induced rapid degradation // *J. Mol. Biol.* – 2009. – V. 394 (4) – P. 789–803.
163. Cool B.L., Sirover M.A. Immunocytochemical localization of the base excision repair enzyme uracil DNA glycosylase in quiescent and proliferating normal human cells // *Cancer Res.* – 1989. – V. 49 (11) – P. 3029–3036.
164. Grigorieva J., Dainiak M., Katrukha A.G., Muronetz V.I. Antibodies to the nonnative forms of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: identification, purification, and influence on the renaturation of the enzyme // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1999. – V. 369 (2) – P. 252–260.
165. Barbini L., Rodríguez J., Dominguez F., Vega F. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase exerts different biologic activities in apoptotic and proliferating hepatocytes according to its subcellular localization // *Mol. Cell. Biochem.* – 2007. – V. 300 (1–2) – P. 19–28.
166. Saunders P.A., Chalecka-Franaszek E., Chuang D.M. Subcellular distribution of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cerebellar granule cells undergoing cytosine arabinoside-induced apoptosis // *J. Neurochem.* – 1997. – V. 69 (5) – P. 1820–1828.
167. Ishitani R., Tanaka M., Sunaga K., Katsube N., Chuang D.M. Nuclear localization of overexpressed glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cultured cerebellar neurons undergoing apoptosis // *Mol. Pharmacol.* – 1998. – V. 53 (4) – P. 701–707.
168. Saunders P.A., Chen R.W., Chuang D.M. Nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms during neuronal apoptosis // *J. Neurochem.* – 1999. – V. 72 (3) – P. 925–932.

169. Shashidharan P., Chalmers-Redman R.M., Carlile G.W., Rodic V., Gurvich N., Yuen T., Tatton W.G., Sealfon S.C. Nuclear translocation of GAPDH-GFP fusion protein during apoptosis // *Neuroreport* – 1999. – V. 10 (5) – P. 1149–1153.
170. Dastoor Z., Dreyer J.L. Potential role of nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress // *J. Cell Sci.* – 2001. – V. 114 (9) – P. 1643–1653.
171. Xing C., La Porte J. R., Barbay J. K., Myers A. G. Identification of GAPDH as a protein target of the saframycin antiproliferative agents // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2004. – V. 101 (16) – P. 5862–5866.
172. Sen N., Hara M.R., Ahmad A.S., Cascio M.B., Kamiya A., Ehmsen J.T., Aggrawal N., Hester L., Dore S., Snyder S.H., Sawa A. GOSPEL: a neuroprotective protein that binds to GAPDH upon s-nitrosylation // *Neuron*. – 2009. – V. 63 (1) – P. 81–91.
173. Lee S.Y., Kim J.H., Jung H., Chi S.W., Chung S.J., Lee C.K., Park B.C., Bae K.H., Park S.G. Glyceraldehyde-3-phosphate, a glycolytic intermediate, prevents cells from apoptosis by lowering S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – V. 22 (4) – P. 571–573.
174. Sen N., Hara M. R., Kornberg M. D., Cascio M. B., Bae B.I., Shahani N., Thomas B., Dawson T. M., Dawson V. L., Snyder S. H., Sawa A. Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis // *Nat. Cell Biol.* – 2008. – V. 10 (7) – P. 866–873.
175. Carlile G.W., Chalmers-Redman R.M., Tatton N.A., Pong A., Borden K.E., Tatton W.G. Reduced apoptosis after nerve growth factor and serum withdrawal: conversion of tetrameric glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to a dimer // *Mol. Pharmacol.* – 2000. – V. 57 (1) – P. 2–12.
176. Zheng L., Roeder R.G., Luo Y. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component // *Cell*. – 2003. – V. 114 (2) – P. 255–266.
177. Kim S., Lee J., Kim J. Regulation of oncogenic transcription factor hTAF(II)68-TEC activity by human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) // *Biochem. J.* – 2007. – V. 404 (2) – P. 197–206.
178. Harada N., Yasunaga R., Higashimura Y., Yamaji R., Fujimoto K., Moss J., Inui H., Nakano Y. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances transcriptional activity of androgen receptor in prostate cancer cells // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282 (31) – P. 22651–22661.

179. Kimura M., Suzuki H., Ishihama A. Formation of a carboxy-terminal domain phosphatase (Fcp1)/TFIIF/RNA polymerase II (pol II) complex in *Schizosaccharomyces pombe* involves direct interaction between Fcp1 and the Rpb4 subunit of pol II // *Mol. Cell. Biol.* – 2002. – V. 22 (5) – P. 1577–1588.
180. Mitsuzawa H., Kimura M., Kanda E., Ishihama A. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and actin associate with RNA polymerase II and interact with its Rpb7 subunit // *FEBS Lett.* – 2005. – V. 579 (1) – P. 48–52.
181. Carlile G. W., Tatton W. G., Borden K. L. Demonstration of a RNA-dependent nuclear interaction between the promyelocytic leukaemia protein and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // *Biochem. J.* – 1998. – V. 335 (3) – P. 691–696.
182. Sundararaj K. P., Wood R. E., Ponnusamy S., Salas A. M., Szulc Z., Bielawska A., Obeid L. M., Hannun Y. A., Ogretmen B. Rapid shortening of telomere length in response to ceramide involves the inhibition of telomere binding activity of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279 (7) – P. 6152–6162.
183. Nicholls C., Pinto A.R., Li H., Li L., Wang L., Simpson R., Liu J.P. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) induces cancer cell senescence by interacting with telomerase RNA component // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – V. 109 (33) – P. 13308–13313.
184. Meyer-Siegler K., Mauro D.J., Seal G., Wurzer J., Deriel J.K., Sirover M.A. A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – V. 88 (19) – P. 8460–8464.
185. Krynetski E.Y., Krynetskaia N.F., Gallo A.E., Murti K.G., Evans W.E. A novel protein complex distinct from mismatch repair binds thioguanylated DNA // *Mol. Pharm.* – 2001. – V. 59 (2) – P. 367–374.
186. Krynetski E.Y., Krynetskaia N.F., Bianchi M.E., Evans W.E. A nuclear protein complex containing high mobility group proteins B1 and B2, heat shock cognate protein 70, ERp60, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in the cytotoxic response to DNA modified by incorporation of anticancer nucleoside analogues // *Cancer Res.* – 2003. – V. 63 (1) – P. 100–106.
187. Lenglet G., Depauw S., Mendy D., David-Cordonnier M.H. Protein recognition of the S23906-1/DNA adduct by nuclear proteins: Direct involvement of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) // *Biochem. J.* – 2013. – V. 452 (1) – P. 147–159.
188. Baxi M.D., Vishwanatha J.K. Uracil DNA glycosylase/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is an $A_{p4}A$ binding protein // *Biochemistry.* – 1995. – V. 34 (30) – P. 9700–9707.

189. Sirover M.A. Induction of the DNA repair enzyme uracil-DNA glycosylase in stimulated human lymphocytes // *Cancer Res.* – 1979. – V. 39 (6) – P. 2090–2095.
190. Caradonna S., Ladner R., Hansbury M., Kosciuk M., Lynch F., Muller S. Affinity purification and comparative analysis of two distinct human uracil-DNA glycosylases // *Exp. Cell Res.* – 1996. – V. 222 (2) – P. 345–359.
191. Ferreira E., Giménez R., Cañas M.A., Aguilera L., Aguilar J., Badia J., Baldomà L. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is required for efficient repair of cytotoxic DNA lesions in *Escherichia coli* // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2015. – V. 60 – P. 202–212.
192. Loecken E. M., Guengerich F. P. Reactions of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase sulfhydryl groups with bis-electrophiles produce DNA-protein cross-links but not mutations // *Chem. Res. Toxicol.* – 2008. – V. 21 (2) – P. 453–458.
193. Azam S., Jouvét N., Jilani A., Vongsamphanh R., Yang X., Yang S., Ramotar D. Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase plays a direct role in reactivating oxidized forms of the DNA repair enzyme APE1 // *J. Biol. Chem.* – 2008. – V. 283 (45) – P. 30632–30641.
194. Hou X., Snarski P., Higashi Y., Yoshida T., Jurkevich A., Delafontaine P., Sukhanov S. Nuclear complex of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and DNA repair enzyme apurinic/apyrimidinic endonuclease I protect smooth muscle cells against oxidant-induced cell death // *FASEB J.* – 2017. – V. 31 (7) – P. 3179–3192.
195. D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G.G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions // *Biochem. J.* – 1999. – V. 342 (2) – P. 249–268.
196. Du X., Matsumura T., Edelstein D., Rossetti L., Zsengellér Z., Szabó C., Brownlee M. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells // *J. Clin. Invest.* – 2003. – V. 112 (7) – P. 1049–1057.
197. Devalaraja-Narashimha K., Padanilam B.J. PARP-1 inhibits glycolysis in ischemic kidneys // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2009 – V. 20 (1) – P. 95–103.
198. Long C.A., Boulom V., Albadawi H., Tsai S., Yoo H.J., Oklu R., Goldman M.H., Watkins M.T. Poly-ADP-ribose-polymerase inhibition ameliorates hind limb ischemia reperfusion injury in a murine model of type 2 diabetes // *Ann. Surg.* – 2013. – V. 258 (6) – P. 1087–1095.
199. Nakajima H., Kubo T., Ihara H., Hikida T., Danjo T., Nakatsuji M., Shahani N., Itakura M., Ono Y., Azuma Y.T., Inui T., Kamiya A., Sawa A., Takeuchi T. Nuclear-translocated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes poly(ADP-ribose) polymerase-1

- activation during oxidative/nitrosative stress in stroke // *J. Biol. Chem.* – 2015. – V. 290 (23) – P. 14493–14503.
- 200.Ferreira E., Giménez R., Aguilera L., Guzmán K., Aguilar J., Badia J., Baldomà L. Protein interaction studies point to new functions for *Escherichia coli* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // *Res. Microbiol.* – 2013. – V. 164 (2) – P. 145–154.
- 201.Ringel A.E., Ryznar R., Picariello H., Huang K.L., Lazarus A.G., Holmes S.G. Yeast Tdh3 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) is a Sir2-interacting factor that regulates transcriptional silencing and rDNA recombination // *PLoS Genet.* – 2013. – V. 9 (10) – P. e1003871.
- 202.Holtgreffe S., Gohlke J., Starmann J., Druce S., Klocke S., Altmann B., Wojtera J., Lindermayr C., Scheibe R. Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications // *Physiol. Plant.* – 2008. – V. 133 (2) – P. 211–228.
- 203.Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – V. 72 – P. 248–254.
- 204.Yasumitsu H., Ozeki Y., Kawsar S.M., Fujii Y., Sakagami M., Matuo Y., Toda T., Katsuno H. RAMA stain: a fast, sensitive and less protein-modifying CBB R250 stain // *Electrophoresis.* – 2010. – V. 31 (12) – P. 1913–1917.
- 205.Biade S., Sobol R., Wilson S., Matsumoto Y. Impairment of proliferating cell nuclear antigen-dependent apurinic/apyrimidinic site repair on linear DNA // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273 (2) – P. 898–902.
- 206.Koike M., Yutoku Y., Koike A. KARP-1 works as a heterodimer with Ku70, but the function of KARP-1 cannot perfectly replace that of Ku80 in DSB repair // *Exp. Cell. Res.* – 2011. – V. 317 (16) – P. 2267–2275.
- 207.Fransson J., Borrebaeck C.A. The nuclear DNA repair protein Ku70/80 is a tumor-associated antigen displaying rapid receptor mediated endocytosis // *Int. J. Cancer.* – 2006. – V. 119 (10) – P. 2492–2496.
- 208.Damodaran S., Wood T.D., Nagarajan P., Rabin R.A. Evaluating peptide mass fingerprinting-based protein identification // *Genomics Proteomics Bioinformatics.* – 2007. – V. 5 (3–4) – P. 152–157.
- 209.Mountassif D., Baibai T., Fourrat L., Moutaouakkil A., Iddar A., El Kebbaj M.S., Soukri A. Immunoaffinity purification and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes // *Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai).* – 2009. – V. 41 (5) – P. 399–406.

210. Yakubov L., Khaled Z., Zhang L.M., Trunch A., Vlassov V., Stein C.A. Oligodeoxynucleotides interact with recombinant CD4 at multiple sites // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268 (25) – P. 18818–18823.
211. Summer H., Li O., Bao Q., Zhan L., Peter S., Sathiyathan P., Henderson D., Klonisch T., Goodman S.D., Dröge P. HMGA2 exhibits dRP/AP site cleavage activity and protects cancer cells from DNA-damage-induced cytotoxicity during chemotherapy // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – V. 37 (13) – P. 4371–4384.
212. Sczepanski J.T., Wong R.S., McKnight J.N., Bowman G.D., Greenberg M.M. Rapid DNA-protein cross-linking and strand scission by an abasic site in a nucleosome core particle // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2010. – V. 107 (52) – P. 22475–22480.
213. Kutuzov M.M., Khodyreva S.N., Ilina E.S., Sukhanova M.V., Amé J.C., Lavrik O.I. Interaction of PARP-2 with AP site containing DNA // *Biochimie.* – 2015. – V. 112 – P. 10–19.
214. Constant J.-F., Demeunynck M. Design and studies of abasic site targeting drugs: New strategies for cancer chemotherapy, In: *Small molecule DNA and RNA binders. From synthesis to nucleic acid complexes* / Wiley-VCH, Verlag GmbH, Weinheim, 2003, Eds: Demeunynck M., Baily C. and Wilson W.D. – V. I. – P. 247–277.
215. Bailly V., Verly W.G. Possible roles of beta-elimination and delta-elimination reactions in the repair of DNA containing AP (apurinic/aprimidinic) sites in mammalian cell // *Biochem. J.* – 1988. – V. 253 (2) – P. 553–559.
216. Bailly V., Verly W.G. Importance of thiols in the repair mechanisms of DNA containing AP (apurinic or apyrimidinic) sites // *Nucleic Acid. Res.* – 1988. – V. 16 (20) – P. 9489–9496.
217. Lhomme J., Constant J.F., Demeunynck M. Abasic DNA structure, reactivity, and recognition // *Biopolymers.* – 1999. – V. 52 (2) – P. 65–83.
218. Sobol R.W. Temozolomide // *Encyclopedia of Cancer* / Ed. M. Schwab. – Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2009.
219. Zhang J., Stevens M.F., Bradshaw T.D. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance // *Curr. Mol. Pharmacol.* – 2012. – V. 5 (1) – P. 102–114.
220. Bennett S.E., Kitner J. Characterization of the aldehyde reactive probe reaction with AP-sites in DNA: influence of AP-lyase on adduct stability // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* – 2006. – V. 25 (7) – P. 823–842.
221. Scopes R.K., Stoter A. Purification of all glycolytic enzymes from one muscle extract // *Methods Enzymol.* – 1982. – V. 90 – P. 479–490.

222. Ilina E.S., Khodyreva S.N., Berezhnoy A.E., Larin S.S., Lavrik O.I. Tracking Ku antigen levels in cell extracts with DNA containing abasic sites // *Mutat. Res.* – 2010. – V. 685 (1–2) – P. 90–96.

Приложение 1. Идентификация Ku80 и Ku70

Образец №1

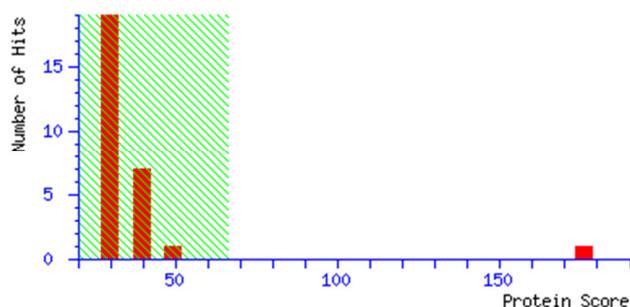
База данных: NCBI nr 20130503 (25052984 последовательностей; 8638475353 а.о.)

Таксономия: Homo sapiens (248458 последовательностей)

Максимальная оценка: 176 для [gi|10863945](#), XRCC5 (Ku80) Homo sapiens

Гистограмма Mascot Score

Значения Mascot Score выше 66 являются значимыми ($p < 0.05$).



- | | | | | |
|---|--------------------|-------------------|------------------------|--------------------|
| gi 10863945 | Mass: 82652 | Score: 176 | Expect: 6.2e-13 | Matches: 19 |
| X-ray repair cross-complementing protein 5 [Homo sapiens] | | | | |
| gi 158254916 | Mass: 82612 | Score: 176 | Expect: 6.2e-13 | Matches: 19 |
| unnamed protein product [Homo sapiens] | | | | |
| gi 119590969 | Mass: 93464 | Score: 171 | Expect: 2e-12 | Matches: 19 |
| X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining; Ku autoantigen, 80kDa), isoform CRA_b [Homo sapiens] | | | | |
| gi 62896765 | Mass: 82569 | Score: 161 | Expect: 2e-11 | Matches: 18 |
| ATP-dependent DNA helicase II variant [Homo sapiens] | | | | |
| gi 15825665 | Mass: 64064 | Score: 151 | Expect: 2e-10 | Matches: 17 |
| Chain B, Crystal Structure Of The Ku Heterodimer | | | | |
| gi 35038 | Mass: 71135 | Score: 138 | Expect: 3.9e-09 | Matches: 14 |
| nuclear factor IV [Homo sapiens] | | | | |
| gi 62988844 | Mass: 64203 | Score: 127 | Expect: 5e-08 | Matches: 13 |
| unknown [Homo sapiens] | | | | |
| gi 62822090 | Mass: 18320 | Score: 50 | Expect: 2.3 | Matches: 6 |
| unknown [Homo sapiens] | | | | |
| gi 327555161 | Mass: 8772 | Score: 30 | Expect: 2.4e+02 | Matches: 2 |
| FAM83H variant 1 [Homo sapiens] | | | | |

- | | | | | |
|--|--------------------|------------------|--------------------|-------------------|
| gi 31183 | Mass: 79491 | Score: 45 | Expect: 8 | Matches: 6 |
| eosinophil preperoxidase (AA -127 to 575) [Homo sapiens] | | | | |
| gi 4503595 | Mass: 80989 | Score: 45 | Expect: 8.6 | Matches: 6 |
| eosinophil peroxidase preproprotein [Homo sapiens] | | | | |
| gi 119614885 | Mass: 74199 | Score: 39 | Expect: 31 | Matches: 5 |
| eosinophil peroxidase, isoform CRA_a [Homo sapiens] | | | | |

Параметры поиска

Тип поиска: пептидное картирование

Фермент: трипсин

Возможные модификации: окисление Met

Значения масс: моноизотопные

Мол. масса белка: не ограничена

Возможное отклонение массы пептида: ± 50 ppm

Заряд пептида: 1+

Максимальное количество пропущенных участков расщепления: 0

Количество запросов: 55

Выбрано для оценки: 40

Образец №2

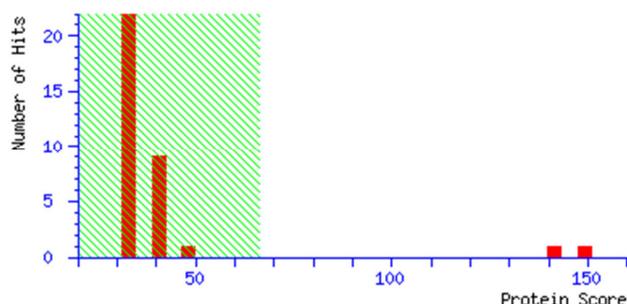
База данных: NCBI nr 20130503 (25052984 последовательностей; 8638475353 a.o.)

Таксономия: Homo sapiens (248458 последовательностей)

Максимальная оценка: 149 для [gi|10863945](#), XRCC5 (Ku80) Homo sapiens

Гистограмма Mascot Score

Значения Mascot Score выше 66 являются значимыми ($p < 0.05$).



- | | | | | |
|---|--------------------|-------------------|------------------------|--------------------|
| gi 10863945 | Mass: 82652 | Score: 149 | Expect: 3.1e-10 | Matches: 33 |
| X-ray repair cross-complementing protein 5 [Homo sapiens] | | | | |
| gi 158254916 | Mass: 82612 | Score: 149 | Expect: 3.1e-10 | Matches: 33 |
| unnamed protein product [Homo sapiens] | | | | |
| gi 15825665 | Mass: 64064 | Score: 124 | Expect: 9.9e-08 | Matches: 27 |
| Chain B, Crystal Structure Of The Ku Heterodimer | | | | |
| gi 35038 | Mass: 71135 | Score: 123 | Expect: 1.2e-07 | Matches: 26 |
| nuclear factor IV [Homo sapiens] | | | | |
| gi 62896765 | Mass: 82569 | Score: 122 | Expect: 1.6e-07 | Matches: 30 |
| ATP-dependent DNA helicase II variant [Homo sapiens] | | | | |
| gi 62988844 | Mass: 64203 | Score: 107 | Expect: 5e-06 | Matches: 24 |
| unknown [Homo sapiens] | | | | |
| gi 62822090 | Mass: 18320 | Score: 42 | Expect: 16 | Matches: 9 |
| unknown [Homo sapiens] | | | | |
| gi 187384828 | Mass: 1394 | Score: 40 | Expect: 27 | Matches: 3 |

anaplastic lymphoma kinase [Homo sapiens]

-
2. [gi|119590969](#) **Mass:** 93464 **Score:** 142 **Expect:** 1.6e-09 **Matches:** 35
X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5
(double-strand-break rejoining; Ku autoantigen, 80kDa),
isoform CRA_b [Homo sapiens]
-
3. [gi|343781130](#) **Mass:** 51894 **Score:** 50 **Expect:** 2.5 **Matches:** 12
Chain A, Crystal Structure Of Nadph-Cytochrome P450 Reductase
(FadNADPH Domain)
[gi|194375578](#) **Mass:** 47400 **Score:** 43 **Expect:** 13 **Matches:** 10
unnamed protein product [Homo sapiens]
[gi|343781131](#) **Mass:** 51875 **Score:** 42 **Expect:** 15 **Matches:** 11
Chain A, Crystal Structure Of Nadph-Cytochrome P450 Reductase
(FadNADPH DOMAIN And R457h Mutant)

Параметры поиска

Тип поиска: пептидное картирование

Фермент: трипсин

Возможные модификации: окисление Met

Значения масс: моноизотопные

Мол. масса белка: не ограничена

Возможное отклонение массы пептида: ± 50 ppm

Заряд пептида: 1+

Максимальное количество пропущенных участков расщепления: 1

Количество запросов: 150

Выбрано для оценки: 90

Образец №3

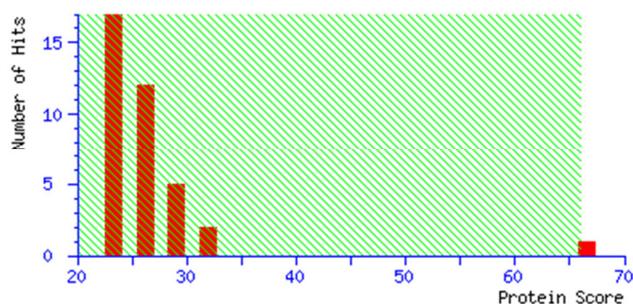
База данных: NCBI nr 20130503 (25052984 последовательностей; 8638475353 a.o.)

Таксономия: Homo sapiens (248458 последовательностей)

Максимальная оценка: 67 для [gi|10863945](#), XRCC5 (Ku80) Homo sapiens

Гистограмма Mascot Score

Значения Mascot Score выше 66 являются значимыми ($p < 0.05$).



1. [gi|10863945](#) **Mass:** 82652 **Score:** 67 **Expect:** 0.054 **Matches:** 13
X-ray repair cross-complementing protein 5 [Homo sapiens]
- [gi|158254916](#) **Mass:** 82612 **Score:** 67 **Expect:** 0.054 **Matches:** 13
unnamed protein product [Homo sapiens]
- [gi|119590969](#) **Mass:** 93464 **Score:** 62 **Expect:** 0.15 **Matches:** 13
X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5
(double-strand-break rejoining; Ku autoantigen, 80kDa),
isoform CRA_b [Homo sapiens]
- [gi|62896765](#) **Mass:** 82569 **Score:** 58 **Expect:** 0.4 **Matches:** 12
ATP-dependent DNA helicase II variant [Homo sapiens]
- [gi|15825665](#) **Mass:** 64064 **Score:** 56 **Expect:** 0.65 **Matches:** 12
Chain B, Crystal Structure Of The Ku Heterodimer
- [gi|62988844](#) **Mass:** 64203 **Score:** 46 **Expect:** 6.1 **Matches:** 8
unknown [Homo sapiens]
- [gi|35038](#) **Mass:** 71135 **Score:** 46 **Expect:** 6.5 **Matches:** 8
nuclear factor IV [Homo sapiens]
- [gi|62822090](#) **Mass:** 18320 **Score:** 26 **Expect:** 5.8e+02 **Matches:** 5
unknown [Homo sapiens]
-
2. [gi|304562435](#) **Mass:** 13641 **Score:** 33 **Expect:** 1.3e+02 **Matches:** 3
immunoglobulin gamma 2 heavy chain variable region [Homo sapiens]

Параметры поиска

Тип поиска: пептидное картирование

Фермент: трипсин

Возможные модификации: окисление Met

Значения масс: моноизотопные

Мол. масса белка: не ограничена

Возможное отклонение массы пептида: ± 25 ppm

Заряд пептида: 1+

Максимальное количество пропущенных участков расщепления: 0

Количество запросов: 113

Выбрано для оценки: 80

Образец №4

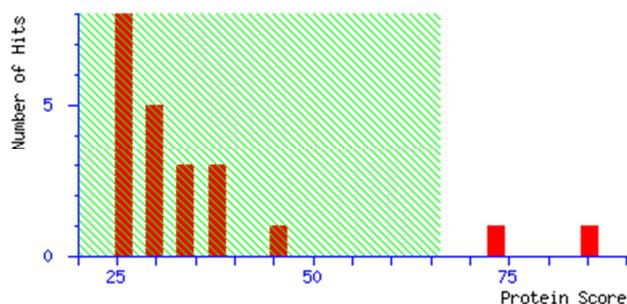
База данных: NCBIInr 20130503 (25052984 последовательностей; 8638475353 а.о.)

Таксономия: Homo sapiens (248458 последовательностей)

Максимальная оценка: 85 для [gi|15825665](#), полипептидная цепь B, кристаллическая структура гетеродимера Ku (N-концевой протеолитический фрагмент Ku80)

Гистограмма Mascot Score

Значения Mascot Score выше 66 являются значимыми ($p < 0.05$).



- [gi|15825665](#) **Mass:** 64064 **Score:** 85 **Expect:** 0.00075 **Matches:** 19
Chain B, Crystal Structure Of The Ku Heterodimer

[gi|62822090](#) **Mass:** 18320 **Score:** 44 **Expect:** 8.8 **Matches:** 8
unknown [Homo sapiens]

[gi|187384826](#) **Mass:** 1337 **Score:** 29 **Expect:** 3.4e+02 **Matches:** 2
anaplastic lymphoma kinase [Homo sapiens]

[gi|187384828](#) **Mass:** 1394 **Score:** 28 **Expect:** 3.8e+02 **Matches:** 2
anaplastic lymphoma kinase [Homo sapiens]

- [gi|10863945](#) **Mass:** 82652 **Score:** 74 **Expect:** 0.011 **Matches:** 20
X-ray repair cross-complementing protein 5 [Homo sapiens]

[gi|158254916](#) **Mass:** 82612 **Score:** 74 **Expect:** 0.011 **Matches:** 20
unnamed protein product [Homo sapiens]

[gi|119590969](#) **Mass:** 93464 **Score:** 68 **Expect:** 0.038 **Matches:** 20
X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining; Ku autoantigen, 80kDa), isoform CRA_b [Homo sapiens]

[gi|62896765](#) **Mass:** 82569 **Score:** 57 **Expect:** 0.54 **Matches:** 18
ATP-dependent DNA helicase II variant [Homo sapiens]

[gi|35038](#) **Mass:** 71135 **Score:** 43 **Expect:** 13 **Matches:** 13
nuclear factor IV [Homo sapiens]

[gi|62988844](#) **Mass:** 64203 **Score:** 37 **Expect:** 54 **Matches:** 12
unknown [Homo sapiens]

- [gi|32967260](#) **Mass:** 63956 **Score:** 45 **Expect:** 7.9 **Matches:** 11
merlin isoform 5 [Homo sapiens]

[gi|119580223](#) **Mass:** 60036 **Score:** 30 **Expect:** 2.2e+02 **Matches:** 8
neurofibromin 2 (bilateral acoustic neuroma), isoform CRA_f [Homo sapiens]

[gi|119580230](#) **Mass:** 64754 **Score:** 28 **Expect:** 4.2e+02 **Matches:** 8
neurofibromin 2 (bilateral acoustic neuroma), isoform CRA_j [Homo sapiens]

[gi|119580219](#) **Mass:** 65913 **Score:** 27 **Expect:** 5.2e+02 **Matches:** 8
neurofibromin 2 (bilateral acoustic neuroma), isoform CRA_b [Homo sapiens]

Параметры поиска

Тип поиска: пептидное картирование

Фермент: трипсин

Возможные модификации: окисление Met

Значения масс: моноизотопные

Мол. масса белка: не ограничена

Возможное отклонение массы пептида: ± 30 ppm

Заряд пептида: 1+

Максимальное количество пропущенных участков расщепления: 1

Количество запросов: 100

Выбрано для оценки: 50

Образец №5

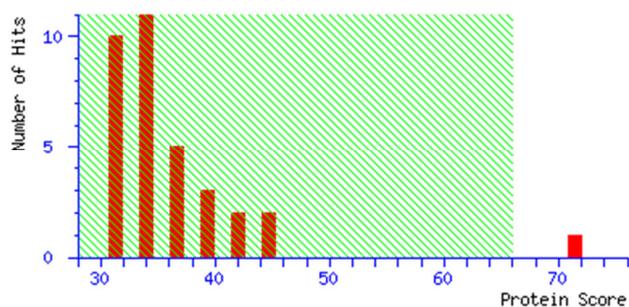
База данных: NCBI nr 20130503 (25052984 последовательностей; 8638475353 а.о.)

Таксономия: Homo sapiens (248458 последовательностей)

Максимальная оценка: 71 для [gi|4503841](#), XRCC6 (Ku70) Homo sapiens

Гистограмма Mascot Score

Значения Mascot Score выше 66 являются значимыми ($p < 0.05$).



- | | | | | |
|--|--------------------|------------------|----------------------|--------------------|
| gi 4503841 | Mass: 69799 | Score: 71 | Expect: 0.018 | Matches: 16 |
| X-ray repair cross-complementing protein 6 [Homo sapiens] | | | | |
| gi 194385986 | Mass: 54418 | Score: 67 | Expect: 0.05 | Matches: 14 |
| unnamed protein product [Homo sapiens] | | | | |
| gi 189055002 | Mass: 69741 | Score: 64 | Expect: 0.11 | Matches: 15 |
| unnamed protein product [Homo sapiens] | | | | |
| gi 49457432 | Mass: 69829 | Score: 63 | Expect: 0.13 | Matches: 15 |
| G22P1 [Homo sapiens] | | | | |
| gi 119580852 | Mass: 65108 | Score: 62 | Expect: 0.16 | Matches: 15 |
| X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6 (Ku autoantigen, 70kDa), isoform CRA_b [Homo sapiens] | | | | |
| gi 194373695 | Mass: 64200 | Score: 56 | Expect: 0.65 | Matches: 14 |
| unnamed protein product [Homo sapiens] | | | | |

- | | | | | |
|--------------------------------------|--------------------|------------------|--------------------|-------------------|
| gi 1777453 | Mass: 10070 | Score: 45 | Expect: 8.6 | Matches: 7 |
| hexokinase 1, partial [Homo sapiens] | | | | |

Параметры поиска

Тип поиска: пептидное картирование

Фермент: трипсин

Возможные модификации: окисление Met

Значения масс: моноизотопные

Мол. масса белка: не ограничена

Возможное отклонение массы пептида: ± 50 ppm

Заряд пептида: 1+

Максимальное количество пропущенных участков расщепления: 1

Количество запросов: 106

Выбрано для оценки: 96

Приложение 2. Идентификация GAPDH

Образец №1

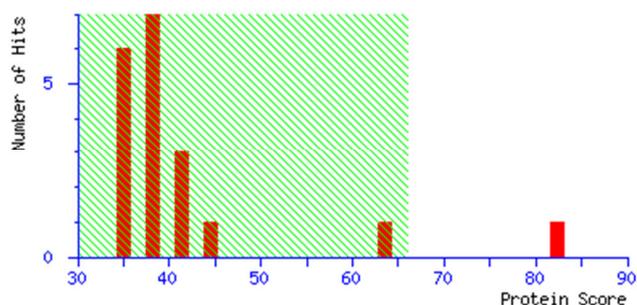
База данных: NCBI nr 20130407 (24070523 последовательностей; 8281664780 а.о.)

Таксономия: Homo sapiens (247613 последовательностей)

Максимальная оценка: 82 для [gi|35053](#), “UDG” (изоформа GAPDH) Homo sapiens

Гистограмма Mascot Score

Значения Mascot Score выше 66 являются значимыми ($p < 0.05$).



- | | | | | |
|--|--------------------|------------------|-----------------------|--------------------|
| gi 35053 | Mass: 35470 | Score: 82 | Expect: 0.0014 | Matches: 10 |
| uracil DNA glycosylase [Homo sapiens] | | | | |
| gi 67464043 | Mass: 36312 | Score: 66 | Expect: 0.062 | Matches: 9 |
| Chain O, Crsytal Structure Of Human Liver Gapdh | | | | |
| gi 7669492 | Mass: 36030 | Score: 65 | Expect: 0.071 | Matches: 9 |
| glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform 1 [Homo sapiens] | | | | |
| gi 378404908 | Mass: 31528 | Score: 57 | Expect: 0.46 | Matches: 8 |
| glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform 2 [Homo sapiens] | | | | |
| gi 31645 | Mass: 36031 | Score: 55 | Expect: 0.82 | Matches: 8 |
| glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens] | | | | |
| gi 119609192 | Mass: 35138 | Score: 54 | Expect: 0.92 | Matches: 8 |
| glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isoform CRA_a [Homo sapiens] | | | | |
| gi 89573929 | Mass: 24605 | Score: 51 | Expect: 2.1 | Matches: 7 |
| glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens] | | | | |
| gi 194388808 | Mass: 23240 | Score: 40 | Expect: 23 | Matches: 5 |
| unnamed protein product [Homo sapiens] | | | | |

2. [gi|54303910](#) **Mass:** 36026 **Score:** 65 **Expect:** 0.08 **Matches:** 8
aging-associated gene 9 protein [Homo sapiens]

Параметры поиска

Тип поиска: пептидное картирование

Фермент: трипсин

Возможные модификации: окисление Met

Значения масс: моноизотопные

Мол. масса белка: не ограничена

Возможное отклонение массы пептида: ± 50 ppm

Заряд пептида: 1+

Максимальное количество пропущенных участков расщепления: 0

Количество запросов: 90

Выбрано для оценки: 72

Образец №2

База данных: NCBI nr 20130407 (24070523 последовательностей; 8281664780 а.о.)

Таксономия: Homo sapiens (247613 последовательностей)

Максимальная оценка: 68 для [gi|31645](#), GAPDH Homo sapiens

1. [gi|31645](#) **Mass:** 36031 **Score:** **68** **Expect:** 0.038 **Matches:** 5
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]
[gi|378404908](#) **Mass:** 31528 **Score:** 55 **Expect:** 0.84 **Matches:** 4
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform 2 [Homo sapiens]
[gi|35053](#) **Mass:** 35470 **Score:** 54 **Expect:** 0.99 **Matches:** 4
uracil DNA glycosylase [Homo sapiens]
[gi|67464043](#) **Mass:** 36312 **Score:** 53 **Expect:** 1.2 **Matches:** 4
Chain O, Crsytal Structure Of Human Liver Gapdh
[gi|7669492](#) **Mass:** 36030 **Score:** 53 **Expect:** 1.3 **Matches:** 4
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform 1 [Homo sapiens]
[gi|89573929](#) **Mass:** 24605 **Score:** 42 **Expect:** 17 **Matches:** 3
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]
[gi|119609192](#) **Mass:** 35138 **Score:** 38 **Expect:** 41 **Matches:** 3
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isoform CRA_a [Homo sapiens]
[gi|242381063](#) **Mass:** 3795 **Score:** 36 **Expect:** 61 **Matches:** 2
hypothetical protein [Homo sapiens]
[gi|119597749](#) **Mass:** 6167 **Score:** 35 **Expect:** 78 **Matches:** 2
hCG2045345 [Homo sapiens]
[gi|54303910](#) **Mass:** 36026 **Score:** 34 **Expect:** 94 **Matches:** 3
aging-associated gene 9 protein [Homo sapiens]
[gi|18087821](#) **Mass:** 13187 **Score:** 32 **Expect:** 1.4e+02 **Matches:** 2
CDKN2AIP N-terminal-like protein [Homo sapiens]

2. [gi|56378007](#) **Mass:** 19900 **Score:** 45 **Expect:** 7.3 **Matches:** 3
tumor suppressor patched short isoform [Homo sapiens]

Параметры поиска

Тип поиска: пептидное картирование

Фермент: трипсин

Возможные модификации: окисление Met

Значения масс: моноизотопные

Мол. масса белка: не ограничена

Возможное отклонение массы пептида: ± 50 ppm

Заряд пептида: 1+

Максимальное количество пропущенных участков расщепления: 0

Количество запросов: 44

Выбрано для оценки: 20

Образец №3

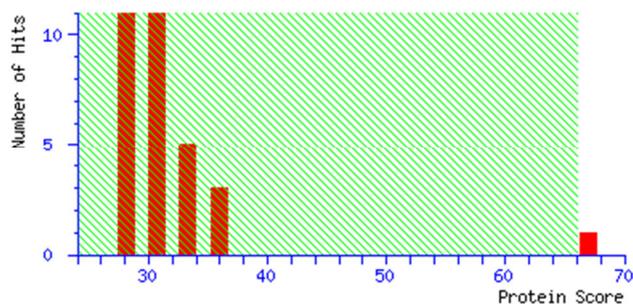
База данных: NCBI nr 20130407 (24070523 последовательностей; 8281664780 а.о.)

Таксономия: Homo sapiens (247613 последовательностей)

Максимальная оценка: 67 для [gi|31645](#), GAPDH Homo sapiens

Гистограмма Mascot Score

Значения Mascot Score выше 66 являются значимыми ($p < 0.05$).



- [gi|31645](#) **Mass:** 36031 **Score:** 67 **Expect:** 0.049 **Matches:** 13
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]
- [gi|67464043](#) **Mass:** 36312 **Score:** 59 **Expect:** 0.32 **Matches:** 12
Chain O, Crsytal Structure Of Human Liver Gapdh
- [gi|7669492](#) **Mass:** 36030 **Score:** 58 **Expect:** 0.37 **Matches:** 12
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform 1 [Homo sapiens]
- [gi|378404908](#) **Mass:** 31528 **Score:** 54 **Expect:** 1.1 **Matches:** 10
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform 2 [Homo sapiens]
- [gi|35053](#) **Mass:** 35470 **Score:** 52 **Expect:** 1.7 **Matches:** 11
uracil DNA glycosylase [Homo sapiens]
- [gi|119609192](#) **Mass:** 35138 **Score:** 50 **Expect:** 2.4 **Matches:** 11
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isoform CRA_a [Homo sapiens]
- [gi|54303910](#) **Mass:** 36026 **Score:** 45 **Expect:** 7.1 **Matches:** 10
aging-associated gene 9 protein [Homo sapiens]
- [gi|89573929](#) **Mass:** 24605 **Score:** 44 **Expect:** 11 **Matches:** 8

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]
[gi|194388808](#) **Mass:** 23240 **Score:** 34 **Expect:** 88 **Matches:** 7
 unnamed protein product [Homo sapiens]

2. [gi|194387324](#) **Mass:** 14513 **Score:** 36 **Expect:** 58 **Matches:** 5
 unnamed protein product [Homo sapiens]
[gi|10436946](#) **Mass:** 17701 **Score:** 32 **Expect:** 1.4e+02 **Matches:** 5
 unnamed protein product [Homo sapiens]
[gi|38176285](#) **Mass:** 17829 **Score:** 31 **Expect:** 1.9e+02 **Matches:** 5
 ribonuclease H2 subunit C [Homo sapiens]
[gi|119594839](#) **Mass:** 18563 **Score:** 31 **Expect:** 2e+02 **Matches:** 5
 AYP1 protein, isoform CRA_a [Homo sapiens]

Параметры поиска

Тип поиска: пептидное картирование

Фермент: трипсин

Возможные модификации: окисление Met

Значения масс: моноизотопные

Мол. масса белка: не ограничена

Возможное отклонение массы пептида: ± 70 ppm

Заряд пептида: 1+

Максимальное количество пропущенных участков расщепления: 0

Количество запросов: 242

Выбрано для оценки: 146

Приложение 3. Параметры пептидов, определенных методом MALDI-TOF-MS, которые соответствуют теоретическим пептидам гидролиза Ku80 и Ku70 трипсином

Образец №1

Положение пептида	(M+H) ⁺ _{obs} *	(M+H) ⁺ _{calc} *	Пептиды
37–44	993.5544	992.5477	K.VITMFVQR.Q
37–44	1009.5442	1008.5426	K.VITMFVQR.Q + Oxidation (M)
82–97	1914.9439	1913.9444	R.HLMLPDFDLLEDIESK.I
82–97	1930.9707	1929.9394	R.HLMLPDFDLLEDIESK.I + Oxidation (M)
131–141	1317.6786	1316.6725	R.HIEIFTDLSSR.F
145–155	1266.7332	1265.7343	K.SQLDIIIHSLK.K
185–195	1109.6030	1108.6029	R.LGGHGPSFPLK.G

243–250	1035.4896	1034.4868	R.HSIHWPCR.L
251–260	1073.6282	1072.6240	R.LTIGSNLSIR.I
266–271	745.4070	744.4130	K.SILQER.V
308–315	977.5023	976.4978	K.EDIIQGFR.Y
355–363	1083.5626	1082.5583	R.FFMGNQVLK.V
355–363	1099.5442	1098.5532	R.FFMGNQVLK.V + Oxidation (M)
401–413	1377.7583	1376.7565	R.ANPQVGVAFPHIK.H
444–465	2321.1723	2320.1620	K.YAPTEAQLNAVDALIDSMSLAK.K
470–481	1380.7484	1379.6820	K.TDTLEDLFPTTK.I
546–565	2243.0201	2242.0138	K.DQVTAQEIFQDNHEDGPTAK.K
569–599	3121.5137	3120.4749	K.TEQGGAHFSVSSLAEGSVTSVGSVNPAENFR.V
649–654	795.3550	794.3559	K.FSEEQR.F

* $(M+H)^+_{obs}$ и $(M+H)^+_{calc}$ – определенное и расчетное значение масса/заряд соответственно.

Данные пептиды покрывают 27% последовательности Ку80-полипептида.

Совпадающие пептиды подчеркнуты:

1 MVRSGNKA AV VLCMDVGFTM SNSIPGIESP FEQAKK**VITM** **FVQR**QVFAEN
51 KDEIALV LFG TDGTDNPLSG GDQYQNITVH R**HLMLPDFDL** **LEDIESK**IQP
101 GSQQADFLDA LIVSMDVIQH ETIGKKFEKR **HIEIFDLS** **RFSKSQLDII**
151 **IHSLK**KCDIS LQFFLPFSLG KEDGSGDRGD GPFR**LGGHGP** **SFPLK**GITEQ
201 QKEGLEIVKM VMISLEGEDG LDEIYSFSES LRKLCVFKKI ER**HSIHWPCR**
251 **LTIGSNLSIR** IAAYK**SILQE** **RVKKT**TWTVVD AKTLKKEDIQ KETVYCLNDD
301 DETEVLK**EDI** **IQGF**YGS DI VPFSKVDEEQ MKYKSEGKCF SVLGFCCKSSQ
351 VQRR**FFMGNO** **VLK**VFAARD EAAVALSSL IHALDDLDMV AIVRYAYDKR
401 **ANPQGVAFP** **HIK**HNYECLV YVQLPFMEDL RQYMFSSLKN SKK**YAPTEAQ**
451 **LNAVDALIDS** **MSLAK**KDEKT **DTLEDLFPTT** **KIPN**RFQRL FQCLLHRAH
501 PREPLPIQQ HIWNMLNPPA EVTTKSQIPL SKIKTLFPLI EAKKK**DQVTA**
551 **QEIFQDNHED** **GPTAK**KLK**TE** **QGGAHFSVSS** **LAEGSVTSVG** **SVNPAENFRV**
601 LVKQKKASFE EASNQLINHI EQFLDTNETP YFMKSIDCIR AFREEAIK**FS**
651 **EEQR**FNNFLK ALQEKVEIKQ LNHFWEIVVQ DGITLITKEE ASGSSVTAE
701 AKKFLAPKDK PSGDTAAVFE EGGDVDDLLD MI

Образец №2

Положение пептида	$(M+H)^+_{obs}$ *	$(M+H)^+_{calc}$ *	Пептиды
36–44	1121.6644	1120.6427	K.KVITMFVQR.Q
36–44	1137.6394	1136.6376	K.KVITMFVQR.Q + Oxidation (M)
37–44	993.5666	992.5477	K.VITMFVQR.Q
37–44	1009.5614	1008.5426	K.VITMFVQR.Q + Oxidation (M)
82–97	1914.9549	1913.9444	R.HLMLPDFDLLEDIESK.I
82–97	1930.9043	1929.9394	R.HLMLPDFDLLEDIESK.I + Oxidation (M)
130–141	1473.7869	1472.7736	K.RHIEIFDLSR.F
131–141	1317.6836	1316.6725	R.HIEIFDLSR.F
145–155	1266.7238	1265.7343	K.SQLDIIHSLK.K
172–184	1364.5831	1363.5753	K.EDGSGDRGDGPFR.L

185–195	1109.6126	1108.6029	R.LGGHGPSFPLK.G
243–250	1035.5178	1034.4868	R.HSIHWPCR.L
251–260	1073.6463	1072.6240	R.LTIGSNLSIR.I
266–271	745.4281	744.4130	K.SILQER.V
287–307	2499.2487	2498.1370	K.EDIQKETVYCLNDDDETEVLK.E
308–315	977.5221	976.4978	K.EDIIQGFR.Y
354–363	1239.6748	1238.6594	R.RFFMGNQVLK.V
354–363	1255.6624	1254.6543	R.RFFMGNQVLK.V + Oxidation (M)
355–363	1083.5763	1082.5583	R.FFMGNQVLK.V
355–363	1099.5703	1098.5532	R.FFMGNQVLK.V + Oxidation (M)
395–400	815.4125	814.3973	R.YAYDKR.A
400–413	1533.8197	1532.8576	K.RANPQVGVAFPHIK.H
401–413	1377.7607	1376.7565	R.ANPQVGVAFPHIK.H
432–442	1332.6950	1331.6543	R.QYMFSSLKNSK.K
470–481	1380.7403	1379.6820	K.TDTLEDLFPTTK.I
490–497	1029.5931	1028.5589	R.LFQCLLHR.A
546–565	2243.0301	2242.0138	K.DQVTAQEIQDNHEDGPTAK.K
569–599	3121.5206	3120.4749	K.TEQGGAHFSVSSLAEGSVTSVGSVNPAENFR.V
641–648	963.5393	962.5185	R.AFREEAIK.F
649–654	795.3874	794.3559	K.FSEEQR.F
655–660	782.4206	781.4123	R.FNNFLK.A
661–669	1057.6235	1056.6179	K.ALQEKVEIK.Q
689–703	1522.7065	1521.7158	K.EEASGSSVTAEAKK.F

Данные пептиды покрывают 38% последовательности Ку80-полипептида.

Совпадающие пептиды подчеркнуты:

1	MVRSGNKA	AV	VLCMDVGF	TM	SNSIPGIESP	FEQAK	<u>KVITM</u>	<u>FVQR</u>	QVFAEN	
51	KDEIALV	LF	TDGTDNPL	SG	GDQYQNITVH	R	<u>HLM</u>	<u>LPDFDL</u>	<u>LEDIESK</u>	IQP
101	GSQQAD	FLDA	LIVSMDVI	QH	ETIGKKFEK	R	<u>HIEIFTDLSS</u>	<u>RFSK</u>	<u>SQLDII</u>	
151	<u>IHSLK</u>	KCDIS	LQFFLPF	SLG	K	<u>EDGSGDRGD</u>	<u>GPFR</u>	<u>LGGHGP</u>	<u>SFPLK</u>	GITEQ
201	QKEGLE	IVKM	VMISLEG	EDG	LDEIYSFSES	LRKLCVFKKI	ER	<u>HSIHWPCR</u>		
251	<u>LTIGSNLSIR</u>	IAAYK	<u>SILQE</u>		<u>RVKKTWT</u>	VVD	AKTLKK	<u>EDIQ</u>	<u>KETVYCLNDD</u>	
301	<u>DETEVLKEDI</u>		<u>IQGFR</u>	YGSDI	VPFSKVDEEQ	MKYKSEGKCF	SVLGFCKSSQ			
351	VQR	<u>RFFMGNQ</u>	<u>VLK</u>	VFAARD	EAAVALSSL	IHALDDLDMV	AIVR	<u>YAYDKR</u>		
401	<u>ANPQVGVAFP</u>		<u>HIK</u>	HNYECLV	YVQLPFMEDL	R	<u>QYMFSSLKN</u>	<u>SK</u>	KYAPTEAQ	
451	LNAVDALIDS	MSLAKKDEK	<u>T</u>	<u>DTLEDLFPTT</u>		<u>KIPNPRFQRL</u>	<u>FQCLLHR</u>	ALH		
501	PREPLPPIQQ	HIWNMLNPPA	EVT	TKSQIPL	SKIKT	LFPLI	EAKKK	<u>DQVTA</u>		
551	<u>QEIQDNHED</u>		<u>GPTAK</u>	KLK	<u>TE</u>	<u>QGGAHFSVSS</u>	<u>LAEGSVTSVG</u>	<u>SVNPAENFRV</u>		
601	LVKQKKASFE	EASNQLINHI	EQFLDTNETP	YFMKSIDCIR			<u>AFREEAIKFS</u>			
651	<u>EEQRFNNFLK</u>		<u>ALQEKVEIKQ</u>	LNHFWEIVVQ	DGITLITK	<u>EE</u>	<u>ASGSSVTAE</u>			
701	<u>AKK</u>	FLAPKDK	PSGD	TAAVFE	EGGDVDDLLD	MI				

Образец №3

Положение пептида	(M+H) ⁺ _{obs} *	(M+H) ⁺ _{clc} *	Пептиды
37–44	993.5582	992.5477	K.VITMFVQR.Q
37–44	1009.5410	1008.5426	K.VITMFVQR.Q + Oxidation (M)
82–97	1914.9605	1913.9444	R.HLMLPDFDLLEDIESK.I
82–97	1930.9177	1929.9394	R.HLMLPDFDLLEDIESK.I + Oxidation (M)
131–141	1317.6896	1316.6725	R.HIEIFDLSSR.F
185–195	1109.5989	1108.6029	R.LGGHGPSFPLK.G
251–260	1073.6346	1072.6240	R.LTIGSNLSIR.I
308–315	977.5096	976.4978	K.EDIQGFY.Y
355–363	1083.5458	1082.5583	R.FFMGNQVLK.V
355–363	1099.5766	1098.5532	R.FFMGNQVLK.V + Oxidation (M)
401–413	1377.7644	1376.7565	R.ANPQGVAFPHIK.H
490–497	1029.5852	1028.5589	R.LFQCLLHR.A
569–599	3121.4125	3120.4749	K.TEQGGAHFSVSSLAEGSVTSVGSVNPANFR.V

Данные пептиды покрывают 17% последовательности Ку80-полипептида.

Совпадающие пептиды подчеркнуты:

1	MVRSGNKA	AV	VLCMDVGF	TM	SNSIPGIESP	FEQAKK	VITM	FVQR	QVFAEN		
51	KDEIALV	LF	TDGTDNPL	SG	GDQYQNIT	VH	RHLMLPDFDL	LEDIESK	IQP		
101	GSQQAD	FLDA	LIVSMDVI	QH	ETIGKKFE	KR	HIEIFDLSS	RFSKSQLDII			
151	IHSLKK	CDIS	LQFFLPF	SLG	KEDGSGDR	GD	GPFR	LGGHGP	SFPLK	GITEQ	
201	QKEGLE	IVKM	VMISLEGE	DG	LDEIYSF	SES	LRKLCV	FKKI	ERHSIHW	PCR	
251	LTIGSNLSIR		IAAYKSIL	QE	RVKKTWT	VVD	AKTLKKE	DIQ	KETVYCL	NDD	
301	DETEVLK	EDI	IQGF	YGS	DI	VPFSKV	DEEQ	MKYKSE	GKCF	SVLGFCK	SSQ
351	VQRR	FFMGNQ	VLK	VFA	ARD	EAAVAL	SSL	IHALDDL	DMV	AIVRYAY	DKR
401	ANPQGVAFP		HIK	HNYE	CLV	YVQLP	FMEDL	RQYMF	SSLKN	SKKYAP	TEAQ
451	LNAVDAL	IDS	MSLAKK	DEKT	DTLEDL	FPTT	KIPNPR	FQCLLHR	ALH		
501	PREPLP	PIQQ	HIWNML	NPPA	EVTTKS	QIPL	SKIKT	LFPLI	EAKKQ	DQVTA	
551	QEIFQDN	HED	GPTAKK	KLK	TE	QGGAHFSVSS	LAEGSVTSVG	SVNPAENFR	V		
601	LVKQK	KASFE	EASNQL	INHI	EQFLDT	NETP	YFMK	SIDCIR	AFREEA	IKFS	
651	EEQRF	NNFLK	ALQEK	VEIKQ	LNHFWE	IVVQ	DGITL	LITKEE	ASGSS	VTAAE	
701	AKKFLAP	KDK	PSGD	TAAVFE	EGGDV	DDLLD	MI				

Образец №4

Положение пептида	(M+H) ⁺ _{obs} *	(M+H) ⁺ _{clc} *	Пептиды
36–44	1121.6487	1120.6427	K.KVITMFVQR.Q
36–44	1137.6138	1136.6376	K.KVITMFVQR.Q + Oxidation (M)
37–44	993.5613	992.5477	K.VITMFVQR.Q
37–44	1009.5581	1008.5426	K.VITMFVQR.Q + Oxidation (M)
82–97	1914.8987	1913.9444	R.HLMLPDFDLLEDIESK.I
82–97	1930.9146	1929.9394	R.HLMLPDFDLLEDIESK.I + Oxidation (M)

131–141	1317.6766	1316.6725	R.HIEIFTDLSSR.F
145–155	1266.7123	1265.7343	K.SQLDIIIHSLK.K
172–184	1364.5742	1363.5753	K.EDGSGDRGDGPFR.L
185–195	1109.6045	1108.6029	R.LGGHGSPFPLK.G
251–260	1073.6280	1072.6240	R.LTIGSNLSIR.I
308–315	977.5101	976.4978	K.EDIQGFY
354–363	1239.6638	1238.6594	R.RFFMGNQVLK.V
354–363	1255.6501	1254.6543	R.RFFMGNQVLK.V + Oxidation (M)
355–363	1083.5634	1082.5583	R.FFMGNQVLK.V
355–363	1099.5548	1098.5532	R.FFMGNQVLK.V + Oxidation (M)
395–400	815.4102	814.3973	R.YAYDKR.A
401–413	1377.7546	1376.7565	R.ANPQVGVAFPHIK.H
490–497	1029.5770	1028.5589	R.LFQCLLHR.A

Данные пептиды покрывают 22% последовательности N-концевого фрагмента Ku80-полипептида.

Совпадающие пептиды подчеркнуты:

1 MVRSGNKA AV V L C M D V G F T M S N S I P G I E S P F E Q A K **KVITM** **FVQR** Q V F A E N
51 K D E I A L V L F G T D G T D N P L S G G D Q Y Q N I T V H **RHLMLPDFDL** **LEDIESK** I Q P
101 G S Q Q A D F L D A L I V S M D V I Q H E T I G K K F E K R **HIEIFTDLSS** **RFSKSQLDII**
151 **IHSLK** K C D I S L Q F F L P F S L G K **EDGSGDRGD** **GPFR** L G G H G P **SFPLK** G I T E Q
201 Q K E G L E I V K M V M I S L E G E D G L D E I Y S F S E S L R K L C V F K K I E R H S I H W P C R
251 **LTIGSNLSIR** I A A Y K S I L Q E R V K K T W T V V D A K T L K K E D I Q K E T V Y C L N D D
301 D E T E V L K **EDI** **IQGF** R Y G S D I V P F S K V D E E Q M K Y K S E G K C F S V L G F C K S S Q
351 V Q R **RFFMGNQ** **VLK** V F A A R D D E A A A V A L S S L I H A L D D L D M V A I V R **YAYDKR**
401 **ANPQVGVAFP** **HIK** H N Y E C L V Y V Q L P F M E D L R Q Y M F S S L K N S K K Y A P T E A Q
451 L N A V D A L I D S M S L A K K D E K T D T L E D L F P T T K I P N P R F Q R L **FQCLLHR** A L H
501 P R E P L P P I Q Q H I W N M L N P P A E V T T K S Q I P L S K I K T L F P L I E A K K K D Q V T A
551 Q E I F Q D N H E D G P T A K

Образец №5

Положение пептида	(M+H) ⁺ _{obs} *	(M+H) ⁺ _{clc} *	Пептиды
36–46	1207.6629	1206.6496	R.DSLIFLVDASK.A
75–92	2026.0791	2025.0782	K.ISSDRDLLAVVFGTEK.D
166–182	1902.8457	1901.8578	R.IMLFTNEDNPHGNDSAK.A
207–218	1399.7344	1398.7296	K.KPGGFDISLFYR.D
219–230	1388.6868	1387.6831	R.DIISIAEDEDLR.V
231–244	1701.8718	1700.8733	R.VHFEESKLEDLLR.K
280–287	863.5495	862.5640	K.ALKPPPIK.L
291–299	1045.6021	1044.5451	R.ETNEPVKTK.T
332–339	1033.5055	1032.5087	K.EETEELKR.F
340–357	2034.0804	2033.1094	R.FDDPGLMLMGFKPLVLLK.K
404–424	2500.3539	2499.2645	R.RNIPPYFVALVPQEEELDDQK.I

425–444	2288.2585	2287.2365	K.IQVTPPGFQLVFLPFADDKR.K
446–461	1838.9167	1837.8954	K.MPFTEKIMATPEQVGK.M + 2 Oxidation (M)
475–488	1703.7942	1702.8063	R.SDSFENPVLQQHFR.N
517–526	1163.6534	1162.6346	K.RLGSLVDEFK.E
597–605	1044.5961	1043.5862	K.QELLEALTK.H

Данные пептиды покрывают 35% последовательности Ku70-полипептида.

Совпадающие пептиды подчеркнуты:

1	MSGWESYYKT	EGDEEAEEEQ	EENLEASGDY	KYSGR <u>DSLIF</u>	<u>LVDASK</u> AMFE
51	SQSEDELTPF	DMSIQCIQSV	YISK <u>IISSDR</u>	<u>DL LAVVFGT</u>	<u>EK</u> DKNSVNFK
101	NIYVLQELDN	PGAKRILELD	QFKGQQGQKR	FQDMMGHGSD	YSLSEVLWVC
151	ANLFSVDVQFK	MSHKR <u>IMLFT</u>	<u>NEDNPHGNDS</u>	<u>AK</u> ASRARTKA	GDLRDTGIFL
201	DLMHLK <u>KPGG</u>	<u>FDISLFYRDI</u>	<u>ISIAEEDLR</u>	<u>VHFEESKLE</u>	<u>DLLR</u> KVRAKE
251	TRKRALSRLK	LKLNKDIVIS	VGIYNLVQKA	<u>LKPPPIKLYR</u>	<u>ETNEPVKTKT</u>
301	RTFNTSTGGL	LLPSDTKRSQ	IYGSRQIILE	<u>KEETEELKRF</u>	<u>DDPGLMLMGF</u>
351	<u>KPLVLLK</u> KHH	YLRPSLFVYP	EESLVIGSST	LFSALLIKCL	EKEVAALCRY
401	TPR <u>RNIIPPYF</u>	<u>VALVPQEEEL</u>	<u>DDQKIQVTPP</u>	<u>GFQLVFLPFA</u>	<u>DDKR</u> <u>KMPFTE</u>
451	<u>KIMATPEQVG</u>	<u>KMKAIVEKLR</u>	FTYR <u>SDSFEN</u>	<u>PVLOQHFR</u> NL	EALALDLMEP
501	EQAVDLTLPK	VEAMNK <u>RLGS</u>	<u>LVDEFK</u> ELVY	PPDYNPEGKV	TKRKHDNEGS
551	GSKRPKVEYS	EEELKTHISK	GTLGKFTVPM	LKEACRAYGL	KSGLKK <u>QELL</u>
601	<u>EALTK</u> HFQD				

Приложение 4. Параметры пептидов, определенных методом MALDI-TOF-MS, которые соответствуют теоретическим пептидам гидролиза GAPDH трипсином

Образец №1

Положение пептида	(M+H) ⁺ _{obs} *	(M+H) ⁺ _{calc} *	Пептиды
6–13	805.4208	804.4243	K.VGVNGFGR.I
67–80	1613.8991	1612.8937	K.LVINGNPITIFQER.D
87–107	2277.0723	2276.0307	K.WGDAGAEYVVESTGVFTTMEK.A
119–139	2213.1024	2212.1020	R.VIISAPSADAPMFVMGVNHEK.Y
119–139	2229.1551	2228.0970	R.VIISAPSADAPMFVMGVNHEK.Y + Oxidation (M)
187–204	1707.7859	1706.7716	K.TVDGPGSGNCGVMAAGLSR.T + Oxidation (M)
219–226	869.4874	868.5018	K.VIPELNGK.L
227–233	795.4097	794.4109	K.LTGMAFR.V
227–233	811.4057	810.4058	K.LTGMAFR.V + Oxidation (M)
309–322	1763.8054	1762.7951	K.LISWYDNEFGYSNR.V

Данные пептиды покрывают 33% последовательности “UDG” (изоформы GAPDH).

Совпадающие пептиды подчеркнуты:

1 MGKVK**VG**VNG **FGR**IGRLVTR AAFNSGKVDI VAINDPFIDL NYMVYMFQYD
 51 STHGK**FH**GTV KAENGK**LVIN** **GNPITIFQER** DPSKIK**WGDA** **GAEYVVESTG**
 101 **VFTTMEK**AGA HLQGGAKR**VI** **ISAPSADAPM** **FVMGVNHEK**Y DNSLKIISNA
 151 SCTTNCLAPL AKVIHDN**FGI** VEGLM**TTVHA** ITATQK**TV**DG **PSGNCGVMAA**
 201 **GLSR**TSSLPL LALKAVGK**VI** **PELNGKLTGM** **AFR**VPTANVS VVDLTCRLEK
 251 PAKYDDIKKV VKQASEG**PLK** GILGYTEHQV VSSDFNSDTH SSTFDAGAGI
 301 ALNDHFVK**LI** **SWYDNEFGYS** **NR**VVDLMAK E

Образец №2

Положение пептида	(M+H) ⁺ _{obs} *	(M+H) ⁺ _{clc} *	Пептиды
67–80	1613.8972	1612.8937	K.LVINGNPITIFQER.D
119–139	2213.0787	2212.1020	R.VIISAPSADAPMFVMGVNHEK.Y
220–227	870.5310	869.4858	K.VIPELDGK.L
228–234	795.4004	794.4109	K.LTGMAFR.V
310–323	1763.7979	1762.7951	K.LISWYDNEFGYSNR.V

Данные пептиды покрывают 19% последовательности GAPDH.

Совпадающие пептиды подчеркнуты:

1 MGKVKVG**VNG** **FGR**IGRLVTR AAFNSGKVDI VAINDPFIDL NYMVYMFQYD
 51 STHGK**FH**GTV KAENGK**LVIN** **GNPITIFQER** DPSKIK**WGDA** **GAEYVVESTG**
 101 **VFTTMEK**AGA HLQGGAKR**VI** **ISAPSADAPM** **FVMGVNHEK**Y DNSLKIISNA
 151 SCTTNCLAPL AKVIHDN**FGI** VEGLM**TTVHA** ITATQK**TV**DG **PSGKLWRDGR**
 201 GALQNIIPAS TGA**AKAVGKV** **IPELDGKLTG** **MAFR**VPTANV SVVDLTCRLE
 251 KPAKYDDIKK VVKQASEG**PL** KGILGYTEHQ VVSSDFNSDT HSSTFDAGAG
 301 IALNDHFVK**L** **ISWYDNEFGY** **SNR**VVDLMAH MASKE

Образец №3

Положение пептида	(M+H) ⁺ _{obs} *	(M+H) ⁺ _{clc} *	Пептиды
6–13	805.4433	804.4243	K.VGVNGFGR.I
21–27	694.3479	693.3446	R.AAFNSGK.V
62–66	518.2754	517.2496	K.AENGK.L
67–80	1613.8792	1612.8937	K.LVINGNPITIFQER.D
87–107	2277.1496	2276.0307	K.WGDAGAEYVVESTGVFTTMEK.A
119–139	2213.2007	2212.1020	R.VIISAPSADAPMFVMGVNHEK.Y
119–139	2229.2528	2228.0970	R.VIISAPSADAPMFVMGVNHEK.Y + Oxidation (M)
187–194	760.3969	759.3763	K.TVDGPSGK.L
220–227	870.5386	869.4858	K.VIPELDGK.L
228–234	795.4233	794.4109	K.LTGMAFR.V
228–234	811.4216	810.4058	K.LTGMAFR.V + Oxidation (M)
255–259	653.3033	652.3068	K.YDDIK.K
310–323	1763.8173	1762.7951	K.LISWYDNEFGYSNR.V

Данные пептиды покрывают 35% последовательности GAPDH.

Совпадающие пептиды подчеркнуты:

1	MGKVK <u>VG</u> VNG	<u>FGR</u> IGRLVTR	<u>AAFNSGK</u> VDI	VAINDPFIDL	NYMVYMFQYD
51	STHGKFGHTV	K <u>AE</u> NGKLVIN	<u>GNPITIFQER</u>	DPSKIK <u>WGDA</u>	<u>GA</u> EYVVESTG
101	<u>VFTTMEK</u> AGA	HLQGGAKR <u>VI</u>	<u>ISAPSADAPM</u>	<u>FVMGVNHEKY</u>	DNSLKIISNA
151	SCTTNCLAPL	AKVIHDNFGI	VEGLMTTVHA	ITATQK <u>TV</u> VDG	<u>PSGK</u> LWRDGR
201	GALQNIIPAS	TGAAKAVGK <u>V</u>	<u>IPELDGKLTG</u>	<u>MAFR</u> VPTANV	SVVDLTCRLE
251	KPAK <u>YDDIK</u> K	VVKQASEGPL	KGILGYTEHQ	VVSSDFNSDT	HSSTFDAGAG
301	IALNDHFVK <u>L</u>	<u>ISWYDNEFGY</u>	<u>SNR</u> VVDLMAH	MASKE	