Федеральное агентство научных организаций Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

На правах рукописи

Кузнецов Никита Александрович

Молекулярно-кинетические механизмы узнавания и удаления повреждений ДНК в процессе эксцизионной репарации оснований

03.01.04 - биохимия

Диссертация на соискание ученой степени доктора химических наук

Новосибирск – 2018

Содержание

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Основные пути химической модификации ДНК в клетках	10
1.2. Эксцизионная репарация оснований	12
1.3. Классификация ДНК-гликозилаз	14
1.3.1. Семейство HhH-GPD	22
1.3.2. Семейство H2tH	26
1.3.3. Суперсемейство UDG	27
1.3.3.1. Класс І	28
1.3.3.2. Класс II	32
1.3.3.3. Класс III	34
1.3.4. Семейство Т4 Endo V	35
1.3.5. Семейство ААС	37
1.3.6. Семейство АLК	40
1.4. Классификация АР-эндонуклеаз	40
1.5. Заключение	44
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	46
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	
Кинетические и термодинамические особенности механизмов узнавания и	61
удаления повреждений ДНК про- и эукариотическими ДНК-	01
гликозилазами и АР-эндонуклеазами	
3.1. Принципы исследования конформационной динамики в процессах	
белково-нуклеиновых взаимодействий, особенности и ограничения	61
методов	
3.2. Конформационные изменения ДНК-гликозилаз структурного	66
семейства HhH-GPD и ДНК в процессе их взаимодействия	00
3.2.1. 8-Оксогуанин-ДНК-гликозилаза человека hOGG1	66
3.2.1.1. Конформационные изменения мутантных форм hOGG1 и	68
ДНК	00
Каталитическая активность мутантных форм фермента hOGG1	70
Взаимодействие с неповрежденной ДНК	71

2

Взаимодействие с ДНК, содержащей АР-сайт	73
Взаимодействие с ДНК, содержащей охоG	75
3.2.1.2. FRET анализ процессов изгибания ДНК	87
3.2.1.3. Масс-спектрометрический анализ интермедиатов	80
ферментативного процесса	89
3.2.1.4. Термодинамические параметры ферментативного процесса	90
3.2.2. Эндонуклеаза III Nth из <i>E. coli</i>	101
3.2.2.1. Конформационные изменения поврежденной цепи ДНК	104
3.2.2.2. Конформационные изменения комплементарной цепи ДНК	107
3.2.3. Метилцитозин-связывающий домен 4 человека MBD4	114
3.2.3.1. Конформационные изменения MBD4 ^{cat} при взаимодействии с	115
ДНК-субстратами разной длины	115
Взаимодействие MBD4 ^{cat} с 28-звенным ДНК-дуплексом	115
Взаимодействие MBD4 ^{cat} с 17-звенным ДНК-дуплексом	118
Взаимодействие MBD4 ^{cat} с 12-звенным ДНК-дуплексом	120
Взаимодействие MBD4 ^{cat} с аналогом продукта	122
3.2.3.2. Сравнительный анализ конформационных изменений MBD4 ^{cat}	123
и ДНК	123
3.2.4. Аденин-ДНК-гликозилаза MutY из E. coli	127
3.2.4.1. Сравнительный анализ конформационных изменений MutY и	130
ДНК	150
Взаимодействие MutY с ДНК, содержащей пару охоG/A	130
Взаимодействие MutY с ДНК, содержащей пару G/A	134
Взаимодействие MutY с ДНК, содержащей пару охоG/С	136
Взаимодействие MutY с ДНК, содержащей пару F/G	137
3.3. Конформационные изменения ДНК-гликозилаз структурного	130
семейства H2tH и ДНК в процессе их взаимодействия	157
3.3.1. Эндонуклеаза VIII Nei из <i>E. coli</i>	139
3.3.1.1. Конформационные изменения ДНК	142
3.3.1.2. Конформационные изменения мутантных форм Nei при	150
взаимодействии с ДНК	150
3.3.2. Формамидопиримидин-ДНК-гликозилаза Fpg из <i>E. coli</i>	162
3.3.2.1. PELDOR анализ процессов изгибания ДНК	164

3

3.3.2.2. Анализ накопления продуктов реакции в миллисекундном и	166
секундном диапазонах времени методом «прерывания реакции»	100
3.3.2.3. Масс-спектрометрический анализ интермедиатов	170
ферментативного процесса	170
3.3.2.4. Термодинамические параметры ферментативного процесса	174
3.3.3. Эндонуклеаза VIII человека NEIL1	184
3.3.3.1. Конформационные изменения NEIL1 при взаимодействии с	106
ДНК	180
3.3.3.2. Конформационные изменения ДНК	191
3.3.3.3. Сравнительный анализ конформационных изменений	104
фермента и ДНК	194
3.4. АР-эндонуклеаза человека АРЕ1	197
3.4.1. Влияние ионов Mg ²⁺ на связывание ДНК и катализ	200
3.4.2. Влияние ионов К ⁺ на связывание ДНК и катализ	204
3.4.3. Влияние природы металла на связывание ДНК и катализ	205
Анализ конформационных изменений АРЕ1	205
Анализ конформационных изменений ДНК	210
3.4.4. Активация APE1 ионом Mg ²⁺ в составе комплекса с ДНК	213
3.4.5. Влияние ионов металлов на структуру АРЕ1 и ДНК-	214
субстрата	214
3.4.6. Влияние рН на связывание ДНК и катализ	216
3.4.7. Взаимодействие мутантных форм АРЕ1 с ДНК	218
3.4.8. Экзонуклеазная каталитическая активность АРЕ1	219
3.4.9. Термодинамические параметры ферментативного процесса	226
3.5 Практическое применение данных о молекулярно-кинетических	021
механизмах ферментов репарации	231
3.5.1. Определение активности ферментов репарации	231
3.5.2. Поиск и разработка соединений, оказывающих влияние на	226
активность ферментов репарации	230
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	239
выводы	244
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	246

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

aPu –	2-аминопурин;			
AAG –	алкиладенин-ДНК-гликозилаза;			
АР-сайт –	апуриновый-апиримидиновый сайт;			
APE1 –	АР-эндонуклеаза человека;			
BER –	эксцизионная репарация оснований;			
Cy3 –	цианиновый флуоресцентный краситель;			
Cy5 –	цианиновый флуоресцентный краситель;			
C^{Py}	пироллоцитозин;			
Dab –	дабцил;			
DHU –	5,6-дигидроурацил;			
HEPES –	4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота;			
F-сайт –	2-гидроксиметил-3-гидрокситетрагидрофуран;			
Fapy –	2,6-диамино-4-окси-формамидопиримидин;			
FAM –	6-карбоксифлуоресцеин;			
Fpg –	формамидопиримидин-ДНК-гликозилаза Escherichia coli;			
FRET –	резонансный перенос энергии флуоресценции;			
HhH-GPD –	аминокислотная последовательность, образующая			
	структуру «спираль-шпилька-спираль»;			
H2tH –	аминокислотная последовательность, образующая			
	структуру «спираль-двойной поворот-спираль»;			
hOGG1 -	8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза человека;			
MutY	аденин-ДНК-гликозилаза Escherichia coli;			
MBD4 –	метилцитозин-связывающий домен 4 человека;			
NTP –	нуклеозид-трифосфат;			
Nth –	эндонуклеаза III Escherichia coli;			
Nei –	эндонуклеаза VIII Escherichia coli;			
NEIL1 –	эндонуклеаза VIII человека;			
oxoGua –	7,8-дигидро-8-оксогуанин;			
PDB ID –	идентификационный номер в банке данных			
	кристаллических структур;			
Tris –	трис-(гидроксиметил)аминометан;			

- tC⁰ 1,3-диаза-2-оксофеноксазин;
- WT фермент дикого типа;
- EDTА этилендиаминтетраацетат;
- ПААГ полиакриламидный гель;
- ЗНС З-гидроксихромон.

введение

Окисление, алкилирование, дезаминирование, апуринизация/апиримидизация, образование разрывов цепей ДНК – это неполный спектр процессов, которые приводят к повреждению структуры ДНК [1]. Известно, что в геноме одной клетки человека спонтанно возникает более 20 000 повреждений в день. Для противостояния процессам повреждения ДНК каждый живой организм имеет специализированную систему защиты геномной ДНК от повреждений – систему репарации ДНК, которая состоит из десятков ферментов, обладающих уникальной специфичностью к различным повреждениям ДНК [2]. Таким образом, система защиты клетки от повреждений выполняет функцию сохранения генетической информации и стабильного поддержания жизнедеятельности организма. Выделяют несколько путей репарации ДНК: эксцизионная репарация оснований отвечает за поиск в ДНК, распознавание и удаление необъемных повреждений азотистых оснований, например, окисленные и алкилированные азотистые основания, урацил в ДНК, АР-сайты [3]; эксцизионная репарация нуклеотидов отвечает за репарацию объемных повреждений ДНК, таких как пиримидиновые димеры, аддукты азотистых оснований с ароматическими соединениями [4]; репарация мисматчей распознает и удаляет неправильно спаренные азотистые основания [5]; гомологичная рекомбинация и негомологичное соединение концов отвечает за удаление двойных разрывов ДНК [6].

Считается, что по пути эксцизионной репарации оснований ДНК удаляется большинство необъемных повреждений азотистых оснований и АР-сайты [7-9]. Удаление одного повреждения требует действия как минимум 4 ферментов: специфической ДНКгликозилазы, АР-эндонуклеазы, репарационной ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы [10, 11]. Ключевыми ферментами в этом цикле являются ДНК-гликозилазы – их задача быстро и точно определить местоположение модифицированного основания среди огромного количества неповрежденных оснований и инициировать процесс репарации. Несмотря на большой интерес к исследованию механизмов и выяснению природы высокой специфичности ферментов репарации, непонятным остается вопрос, каким образом они осуществляют поиск и узнавание поврежденных оснований в ДНК.

Задача осложняется тем, что каждый организм имеет несколько ДНК-гликозилаз, которые специализируются на узнавании и удалении одного или нескольких поврежденных оснований. Например, у *E.coli* обнаружено восемь ДНК-гликозилаз, у человека – одиннадцать. В последние годы получено большое число данных о структурах ДНК-гликозилаз, их комплексов с интермедиатами и субстратами (см. обзоры [12-17]). Однако, несмотря на достигнутые успехи в области структурных и биохимических

исследований некоторых ДНК-гликозилаз, существующих данных недостаточно для детального представления о механизмах поиска ферментами поврежденных оснований и их последующего удаления из ДНК. Существенный вклад в понимание этих механизмов могут внести исследования предстационарной кинетики процесса с регистрацией конформационных переходов ферментов и ДНК-субстратов.

Таким образом, **основной целью** данной работы являлось определение молекулярно-кинетических механизмов конформационных изменений фермента и ДНК в ходе специфического узнавания повреждений в процессах, катализируемых про- и эукариотическими ДНК-гликозилазами и АР-эндонуклеазами и выявление общих закономерностей образования каталитически активных комплексов ферментами, принадлежащими к разным структурным семействам.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- Разработать комплексную методологию изучения молекулярно-кинетических механизмов в ходе узнавания повреждений про- и эукариотическими ферментами эксцизионной репарации оснований ДНК, основанную на предстационарном кинетическом, термодинамическом и мутационном анализах конформационных изменений ферментов и ДНК-субстратов.
- Провести систематическое исследование широкого круга ферментов репарации ДНК человека и *E. coli*, – ДНК-гликозилаз, принадлежащих к двум разным структурным семействам HhH-GDP и H2tH, и AP-эндонуклеазы в ходе полного ферментативного цикла взаимодействия с ДНК-субстратами разной степени специфичности. Для этого провести анализ конформационной динамики ферментов по изменению интенсивности флуоресценции остатков Trp белков дикого типа, а также мутантных форм ферментов, содержащих дополнительные остатки Trp, введенные методом сайт-направленного мутагенеза. Использовать для выяснения природы конформационных переходов в молекуле ДНК модельные системы ДНКсубстратов, содержащие флуоресцентные аналоги азотистых оснований, в том числе новые, а также FRET-красители.
- Проанализировать механизмы конформационной подстройки активных центров ферментов, входящих в одно структурное семейство; установить ключевые стадии ферментативных процессов, обеспечивающие высокую субстратную специфичность и ответственные за узнавание поврежденных нуклеотидов в ДНК, определить и детализировать функциональную роль отдельных аминокислотных остатков, входящих в активные центры и участки связывания субстратов.

- Установить кинетические особенности узнавания повреждений ДНК ферментами, принадлежащими к разным структурным семействам.
- Применить методологию получения термодинамических параметров из кинетических данных к процессам с участием короткоживущих ферментсубстратных комплексов; выявить термодинамические особенности трансформации фермент-субстратных комплексов.
- Разработать и апробировать тест-систему для определения активности ключевых ферментов эксцизионной репарации оснований и провести скрининг потенциальных ингибиторов ферментов.

Сопоставление конформационных изменений ряда ферментов и ДНК-субстратов с данными о структурах свободных ферментов, их комплексов с субстратами и интермедиатами позволило построить молекулярно-кинетические модели процесса взаимодействия ферментов репарации ДНК с ДНК-субстратами. Полученные модели позволили соотнести конформационные переходы взаимодействующих молекул с элементарными актами ферментативного процесса и установить стадии, которые вносят наибольший вклад в обеспечение специфичности фермента к ДНК-субстратам. Полученные внесли значительный вклад в понимание структурно-динамических принципов, лежащих в основе протекания ферментативных процессов, обеспечивающих высокоэффективное функционирование системы репарационно-защитного комплекса живых организмов и поддержание целостности ДНК.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Основные пути химической модификации ДНК в клетках

Клеточная ДНК в процессе своего функционирования постоянно подвергается воздействию различных экзо- и эндогенных факторов, среди которых можно выделить высокореакционные клеточные метаболиты, алкилирующие соединения, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение и т.д., которые могут приводить к химической модификации нуклеотидов (далее повреждения ДНК) (рис. 1) [18-21].

Одними из наиболее часто встречающихся повреждений ДНК являются продукты, образующиеся при действии активных форм кислорода (АФК), таких как O₂-, H₂O₂ и ОН. АФК образуются в живых организмах в процессе клеточного дыхания, кроме того, они могут возникать при воздействии на клетки ультрафиолетового или ионизирующего излучения, различных химических агентов, например органических и неорганических перекисей, свободных радикалов и ионов кислорода, оксокомплексов металлов в высоких валентных состояниях и других [22]. Известно, что с возрастом происходит увеличение внутриклеточной концентрации активных форм кислорода, что приводит к повышенному окислению всех макромолекул клетки, включая ДНК [23-25]. В результате окисления ДНК создается более ста различных форм повреждений как углеводного скелета молекулы, так и азотистых оснований. Среди азотистых оснований окислению преимущественно подвержен гуанин (Gua), поскольку он обладает наименьшим окислительно-восстановительным потенциалом [26-31]. Установлено более чем 20 продуктов окисления гуанина [32, 33], при этом основными продуктами модификации являются 7,8-дигидро-8-оксогуанин (8-оксогуанин, охоGua) и 2,6-диамино-4-окси-5формамидопиримидин (FapyG) [34-37]. В ДНК охоGua имеет син-конформацию в отличие от гуанина, который находится в анти-конформации [38]. Как следствие, охоGua способен образовывать не только Уотсон-Криковскую пару с цитозином (Cyt), но и Хугстеновскую пару с аденином (Ade), что в процессе репликации приводит к образованию мутации в неповрежденной цепи (пара oxoGua/Ade). Последующая репликация приводит к мутации $G/C \rightarrow T/A$ [39-41]. Данное свойство, вместе с большим количеством образуемого охоGua объясняет высокий мутагенный потенциал этого повреждения, что обуславливает наличие развитого механизма (GO-система) по удалению охоGua у всех видов живых существ [42-44].



Рис. 1. Примеры повреждений ДНК. Окисленные азотистые основания: 8-OHG – 7,8-дигидро-8гидроксигуанин; охоGua – 7,8-дигидро-8-оксо-гуанин; FapyGua – 2,6-диамино-4-гидрокси-5формамидопиримидин; mFapyGua – N7-метил-FapyGua; Tg – тиминовый гликоль; Sp – спироиминодигидантоин; Gh – гуанидиногидантоин; Ia – иминоалантион; 5-OHU – 5гидроксиурацил; DHU – 5,6-дигидроурацил; 5-OHC – 5-гидроксицитозин; DHT – 5,6дигидротимин. Алкилированные азотистые основания: єA – 1,N6-этеноаденин; єC – 3,N4этеноцитозин; 3mAde – N3-метиладенин; 3mGua – N3-метилгуанин; 7mGua – N7-метилгуанин; Hx – гипоксантин. Азотистые основания, являющиеся субстратами суперсемейства урацил-ДНКгликозилаз: Ura – урацил; T – тимин; 5mCyt – 5-метилцитозин; 5hmCyt – 5-гидроксиметилцитозин; 5fCyt – 5-формилцитозин; 5caCyt – 5-карбоксицитозин.

Еще одним источником повреждений ДНК является спонтанный гидролиз Nгликозидных связей, который приводит к образованию в каждой клетке человека в день ~10 000 апуриновых/апиримидиновых (AP) сайтов, имеющих как мутагенный потенциал вследствие отсутствия кодирующего азотистого основания, так и ведущих к образованию одноцепочечных разрывов [45-47]. Кроме того, со скоростью 100-500 случаев в день в каждой клетке происходит дезаминирование экзоциклических аминогрупп Суt, Ade и Gua, что приводит к образованию урацила (Ura), гипоксантина (Hx) и ксантина (Xt) соответственно [48-50]. Известно, что действие алкилирующих агентов на ДНК приводит к алкилированию азотистых оснований [51]. При этом, более 80% образовавшихся аддуктов составляют метилированные по N7 гуанин (N7mGua) и по N3 аденин (N3mAde) [52]. Данные повреждения блокируют репликацию ДНК и поэтому летальны для клетки [53].

Дополнительным путем возникновения повреждений в ДНК является их целенаправленное введение в процессах химио- и лучевой терапии. Так, в настоящее время для цитотоксической химиотерапии опухолевых заболеваний используется ряд лекарственных препаратов, действующими веществами в которых, как правило, являются химические соединения, приводящие к повреждению ДНК. Наиболее часто используемой группой химиотерапевтических препаратов являются алкилирующие агенты. В основе их цитотоксического эффекта лежит формирование алкилированных оснований ДНК. В то же время повреждения ДНК, образующиеся при лучевой терапии, являются, как правило, продуктами, образующимися при действии АФК.

Известно, что повреждения генетического аппарата способны приводить к развитию сердечнососудистых, нейродегенеративных и онкологических заболеваний [36, 54-57]. Кроме того, показано, что окислительный стресс, вызывающий накопление окислительных повреждений ДНК, приводит к ускоренному развитию дегенеративных процессов организма [58-61].

1.2. Эксцизионная репарация оснований

Узнавание и удаление необъемных повреждений азотистых оснований происходит по пути эксцизионной репарации оснований (BER), который инициируется ДНКгликозилазами (рис. 2). Существует два каталитических типа данных ферментов: моно- и бифункциональные. Монофункциональные ДНК-гликозилазы расщепляют Nгликозидную связь с модифицированным основанием и приводят к образованию AP-сайта (рис. 2, путь 1) [62, 63]. Бифункциональные ДНК-гликозилазы кроме расщепления Nгликозидной связи с модифицированным основанием способны удалять 3'-фосфатную группу путем β-элиминирования, образуя в ДНК одноцепочечный разрыв (рис. 2, путь 2). Кроме того, некоторые бифункциональные ДНК-гликозилазы способны осуществить вторую реакцию β-элиминирования, приводящую к разрыву связи с 5'-фосфатной группой (рис. 2, путь 3).





Рис. 2. Схема эксцизионной репарации оснований [64].

Все три варианта продуктов ДНК-гликозилаз являются субстратами апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы, которая путем гидролиза фосфодиэфирной связи, расположенной с 5'-стороны от АР-сайта, вносит разрыв в рибозофосфатный остов, (рис. 2, путь 1), либо удаляет оставшийся дезоксирибофосфатный остаток (рис. 2, путь 2), или фосфатную группу (рис. 2, путь 3). В результате действия АР-эндонуклеазы на 3'-конце разрыва образуется гидроксильная группа [9, 65]. На следующих этапах по этому 3'-концу происходит присоединение комплементарного нуклеотида репарационными ДНК-полимеразами, и, затем, ДНК-лигаза заканчивает процесс, восстанавливая целостность дезоксирибофосфатного остова.

Известно, что нарушения работы ферментов репарации ДНК вызывают тяжелые последствия в организме человека и часто ведут к возникновению рака и преждевременному старению [66-69]. Показано, что клетки и нокаутированные животные, лишенные различных ДНК-гликозилаз, становятся более чувствительными к воздействию факторов, приводящих к повреждению ДНК [70-73]. В то же время генно-инженерное

удаление из клеток АР-эндонуклеазы приводит к их гибели, что свидетельствует о критической роли этого фермента в процессе восстановления неповрежденной структуры ДНК [74].

1.3. Классификация ДНК-гликозилаз

ДНК-гликозилазы можно классифицировать на основании их субстратной специфичности к различным типам повреждений (дезаминирование, окисление и алкилирование), по типу каталитической активности (моно- и бифункциональные) или на основании гомологичности структурных доменов (таблица 1). Нужно отметить, что субстратная специфичность и тип каталитической активности фермента не зависит от принадлежности к определенному структурному семейству. Можно предположить, что процессы узнавания поврежденного основания в ДНК ферментами одного структурного семейства имеют общие закономерности и особенности, поэтому рассмотрим классификацию ДНК-гликозилаз по структурной гомологии.

Сравнение множества структур ДНК-гликозилаз дает возможность выделить шесть структурных семейств, имеющих общие архитектурные домены: HhH-GPD, H2tH, UDG, AAG, ALK и T4 Endo V (таблица 1) [15]. Отличительной особенностью семейства HhH-GPD является последовательность, образующая структуру «спираль-шпилька-спираль» (helix-hairpin-helix, HhH), за которой следует петля, содержащая остатки Gly, Pro и Asp (GPD) [75, 76]. Семейство H2tH также содержит характерный мотив, содержащий структуру «спираль-два поворота-спираль». На основании гомологии последовательности, структурного соответствия и субстратной специфичности выделяют суперсемейство урацил-ДНК-гликозилаз UDG [14, 50, 77]. Семейства AAG, ALK и T4 Endo V называются в соответствии со структурным подобием эукариотической алкиладенин-ДНК-гликозилазе AAG, прокариотической алкилпурин-ДНК-гликозилазе AlkD и ДНК-гликозилазе T4 Endo V, отвечающей за удаление циклобутановых пиримидиновых димеров [12, 15, 78].

Габлица 1. Структурные семейства ДНК-гликозилаз

Структурное	Структура представителя (номер в базе данных PDB)*	Тип повреждений	Каталитическая	Субстратная
семейство			активность	специфичность
HhH-GDP		Алкилирование,	Гидролиз N-	AlkA : 3mA, 3mG, 7mG,
		окисление	гликозидной связи	εA, Hx, Xa
		пуринов и		MutY: A/oxoG, A/G
		пиримидинов,		MBD4 : T/G, U/G, ε C,
	WA DEC	основание Ade в		5hmU
	the second se	мисматчах		
	COLOR CARA	A/oxoG и A/G		
	C C C C C C C C C C C C C C C C C C C			
	(3G0Q)			
			Гидролиз N-	OGG1: oxoG, FapyG,
	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A		гликозидной	FapyA
			связи,	Nth: Tg, Ug, DHU, 5-
			реакция β-	OHU, 5-OHC, urea
			элиминирования	
			3'-фосфатной	
			группы	
	the start			
	(1P59)			

H2tH		Окисление	Гидролиз N-	Fpg : oxoG, Fapy,
		пуринов	гликозидной	7mFapyG, Sp, Gh, Tg,
		пиримидинов	связи,	Ug, DHT, DHU, 5-OHU,
	SALLA		Реакция β-	5-OHC, FU, urea
			элиминирования	NEIL1: Tg, DHT, DHU,
			3'- и 5'-фосфатных	5-OHU, 5-OHC, 5fU,
			групп	5hmU, FapyG, FapyA,
				urea, oxoA, Gh, Sp, Ia
				Nei: Tg, DHT, DHU, 5-
	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1			OHU, 5-OHC, 5fU,
				5hmU Ug, oxoG,
				7mFapyG, 5,6dhC, 5-
	(1R2Y)			OHT

UDG, класс I		Дезаминирование	Гидролиз N-	hUNG, Udg E. coli: ssU,
	(1ЕМН)	Cyt	гликозидной связи	U/G, U/A
UDG, класс II		Дезаминирование	Гидролиз N-	TDG, MUG: T/G, U/G,
	(5НF7)	Суt, основание Тhy и продукты эпигениетических маркеров 5fC, 5caC, 5hmU в мисматче с основанием Gua	гликозидной связи	U/A, 5fC, 5caC, 5hmU, 5- OHU

UDG,	класс		Дезаминирование	Гидролиз N-	hSMUG1: ssU, U/G, U/A,
III			Cyt,	гликозидной связи	5hmU, 5-OHU, 5fU
			продукты		
			эпигениетических		
			маркеров 5fU,		
			5hmU		
		- (IOE5)[79]			







* Нуклеотид, удаляемый в ходе ферментативного процесса, окрашен в синий цвет, нуклеотид, расположенный в комплементарной

цепи напротив удаляемого, окрашен в черный цвет.

1.3.1. Семейство HhH-GPD

Структурное семейство включает в себя ДНК-гликозилазы, общей особенностью которых является характерный структурный мотив «спираль-шпилька-спираль» (helixhairpin-helix, HhH), за которым следует петля, содержащая остатки Gly, Pro и консервативный для всего семейства остаток Asp [64, 80, 81]. Несмотря на объединяющий структурный мотив, ферменты, входящие в это семейство, имеют значительные отличия в субстратной специфичности. По этому принципу выделяют несколько характерных ферментов: эукариотическая 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза OGG1 (удаление охоG), прои эукариотическая эндонуклеаза III (Endo III или Nth) и NTH1 (удаление окисленных пиримидиновых оснований), про- и эукариотическая аденин-ДНК-гликозилаза MutY и МҮН (удаление основания Ade, расположенного напротив охоG), прокариотическая 3метиладенин-ДНК-гликозилаза AlkA (удаление алкилированных оснований), эукариотический метил-СрG-связывающий фермент MBD4 (удаление оснований Ura и Thy в паре U/G и T/G). Эти белки не обладают высокой гомологичностью аминокислотных последовательностей кроме области с HhH-мотивом, однако имеют очень похожую трехмерную структуру и консервативный для всех каталитически важный остаток Аѕр.

Несмотря на консервативный каталитический Asp, представители семейства HhH-GPD отличаются по типу каталитической активности. Так, ДНК-гликозилазы AlkA [82] и MBD4 [83. 841 обладают только N-гликозилазной активность И являются монофункциональными ферментами. MutY долгое время не могли однозначно отнести к классу моно- или бифункциональных ДНК-гликозилаз [85-88]. В настоящее время предложен механизм ферментативной реакции, в котором N-гликозидная связь разрывается при атаке молекулой воды (монофункциональный тип ДНК-гликозилаз) [89-91]. ДНК-гликозилазы OGG1 и Endo III катализируют как гидролиз N-гликозидной связи, так и реакцию β-элиминирования З'-фосфатной группы (АР-лиазная активность) и являются бифункциональными ферментами [92, 93]. Интересно отметить, что все члены структурного семейства HhH-GPD имеют схожую архитектуру активного центра, что свидетельствует об общих закономерностях протекания каталитической реакции. При этом появление АР-лиазной активности обусловлено присутствием в активном центре бифункциональных ДНК-гликозилаз остатка Lys. Более того, показано, что сайтнаправленное введение остатка Lys (S120K) в активный центр монофункциональной аденин-ДНК-гликозилазы MutY превращает фермент в бифункциональную гликозилазу [94].

Первый член семейства HhH-GPD Nth был обнаружен, как фермент *E. coli*, имеющий эндонуклеазную активность [95], однако позже было показано, что это бифункциональная ДНК-гликозилаза, обладающая N-гликозилазной и AP-лиазной активностями [75]. Практически во всех живых организмах обнаружены гомологи Nth, основная функция которых заключается в удалении из ДНК фрагментированных остатков пуриновых оснований, окисленных или восстановленных пиримидиновых оснований, таких как тимингликоль, урацилгликоль, 5,6-дигидроурацил, 5,6-дигидротимин, 5-гидрокси-5,6-дигидроурацил, 5-гидроксиурацил, 5-гидроксицитозин, аллоксан, мочевину, 6-гидрокси-5-гидроурацил, 5,6-дигидроксицитозин, 6-гидрокси-5-гидроурацил, таких как пороцитозин и продукты фрагментации этих повреждений [96-102]. Функции Nth в клетке могут быть компенсированы ДНК-гликозилазой Nei, что было подтверждено при использовании мышей, нокаутированных по гену *Nth1* [103, 104].

Удаление остатков охоС из ДНК эукариот осуществляет фермент 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза (OGG1). В клетках человека в процессе транскрипции гена Ogg1 образуется две формы мРНК, которые кодируют белки, состоящие из 345 (α-форма) и 424 (β-форма) аминокислот [105-109]. Причем у обеих форм hOGG1 совпадают N-концевые 316 аминокислот [110]. Анализ локализации в клетке этих форм фермента OGG1 показал, что α-hOGG1 находится в ядрах, а β-hOGG1 – в митохондриях [110]. Наиболее изученная ядерная форма OGG1 высоко консервативна и охарактеризована в клетках человека, дрожжах Saccharomyces cerevisiae, растениях Arabidopsis thaliana, дрозофиле Drosophila melanogaster и других [111]. Фермент OGG1 так же, как и Nth, является бифункциональной ДНК-гликозилазой [109, 112-114]. Установлено, что N-гликозилазная реакция (удаление oxoG) и последующая реакция β-элиминирования (разрыв фосфодиэфирной связи с 3'-стороны от образовавшегося АР-сайта), протекают со скоростями, отличающимися друг от друга в несколько раз [115-117]. При этом лимитирующей стадией всего ферментативного процесса является реакция Вэлиминирования. Установлено, что OGG1 сканирует ДНК в поиске поврежденного основания, при этом сильно изгибая остов молекулы ДНК [118]. Фермент OGG1 способен высокоэффективно дискриминировать ДНК-субстраты, содержащие напротив охоGua различные азотистые основания и наиболее специфичен к охоG/C-паре [119, 120]. Мутации по аминокислотным остаткам, узнающим Cyt напротив охоGua, не уменьшают активность фермента на паре охо G/C и приводят к значительному увеличению активности фермента на парах охоG/A, охоG/T и охоG/G нуклеотидов [121]. Кроме того, было показано [113, 117, 120], что остаток охоG, образующийся в N-гликозилазной реакции,

выступает как кофактор реакции β -элиминирования, осуществляемой OGG1. После разрыва N-гликозидной связи по механизму S_N1 атом N9 остатка охоG остается в форме аниона и присоединяет к себе протон от C2'-атома, инициируя тем самым реакцию β -элиминирования.

Аденин-ДНК-гликозилаза MutY была впервые идентифицирована в *E.coli* в качестве фермента, удаляющего аденин из пары A/G [122]. Гомологи MutY широко распространены в бактериях, однако у эукариот встречаются значительно реже [75]. Показано, что MutY входит в GO-систему, которая противодействует накоплению и мутагенному влиянию охоG в ДНК [42, 123, 124]. Основная биологическая функция прои эукариотических аденин-ДНК-гликозилаз заключается в удалении аденина, расположенного напротив охоG [22, 125-127].

Метиладенин-ДНК-гликозилаза AlkA специфически удаляет такие повреждения как 3mA и 7mG, а также, в гораздо меньшей степени, Нх и єА [128-131]. Кроме того, AlkA узнает алкилированные по кислороду О2-метилцитозин (2(О)mC) и О2-метилтимин окисленные производные тимина, (O(2)mT)[132], а также такие как 5гидроксиметилурация (5hmU) и 5-формилурация (5fU) [133]. В более поздней работе [134] было показано, что 5fU репарируется AlkA с такой же эффективностью, как и 7mG, являющимся одним из основных субстратов этого фермента, а 5hmU был исключен из списка субстратов. AlkA также удаляет из ДНК 8-метилгуанин (8mG), который является достаточно нестабильным алкилированным производным. В ходе исследований было выяснено, что эффективность репарации 8mG сравнима с эффективностью репарации 7mG и зависит от типа основания, расположенного напротив повреждения [135]. Карман активного центра имеет форму туннеля, образованного ароматическими боковыми радикалами Phe18, Trp218, Tyr222, Tyr239, Trp272 и Tyr273. Предполагают, что AlkA имеет широкую субстратную специфичность за счет *п*-донорно-акцепторных взаимодействий этих аминокислотных остатков с поврежденными основаниями. Этот стерически нечувствительный метод узнавания повреждений позволяет AlkA располагать в активном центре алкилированные пиримидины и пурины [136, 137]. Эффективность удаления поврежденных оснований коррелирует с химической лабильностью N-гликозидной связи в дестабилизированных алкилированных основаниях, а не селективного узнавания и связывания субстратов. Считается, что AlkA может связывать поврежденные и неповрежденные основания похожим образом, но только нуклеотиды с ослабленной Nгликозидной связью эффективно удаляются [138, 139]. Действительно, алкилированные основания, как 3,N4-этеноцитозин (єС) и 1,N6-этеноаденин (єА), которые не являются электронно-дефицитными и имеют стабильную гликозидную связь, удаляются AlkA очень неэффективно [140, 141]. Кроме того, дополнительным фактором, увеличивающим эффективность AlkA к заряженным алкилированным повреждениям, является химический механизм ферментативной реакции. Гидролиз N-гликозидной связи происходит по механизму S_N1 с образованием промежуточного карбокатиона остатка 2'-десоксирибозы и аниона основания, при этом каталитический остаток Asp238 стабилизирует карбокатион, а положительно заряженное поврежденное основание (например, 7mG) стабилизирует переходное состояние, повышая эффективность каталитической стадии [82, 142].

Еще одним ферментом, относящимся к HhH-GPD семейству ДНК-гликозилаз, является метилцитозин-связывающий домен 4 человека MBD4. MBD4 содержит два домена – метилцитозинсвязывающий и гликозилазный. Основная субстратная специфичность по отношению к U/G паре позволяет отнести MBD4 к урацил-ДНК-гликозилазам. Однако фермент обладает активностью по отношению к Thy в паре с Gua, 5-гидроксиметилурацилу (5hmU), $3,N^4$ -этеноцитозину (єС) и ряду галоген-замещенных производных Ura [143, 144]. Присутствие метилцитозинсвязывающего домена в совокупности с активностью по отношению к продукту дезаминирования 5mC свидетельствуют об участии MBD4 в процессах активного деметилирования ДНК, имеющего большое значение в эпигенетической регуляции экспрессии генов. Как и в случае других ДНК-гликозилаз, гидролиз N-гликозидной связи происходит по механизму S_N1 [83], в активном центре MBD4 оксокарбениевый интермедиат стабилизирован каталитическим остатком Asp534.

Некоторые члены семейства HhH-GPD (Nth и MutY) содержат железосерный кластер типа $[4Fe-4S]^{2+}$. Исследование свойств этого домена в ферментах репарации показало, что в белках данного класса он устойчив к окислению и восстановлению и осуществляет структурные функции, в отличие от железосерного кластера в электронпереносящих ферментах [145-148]. Nth содержит последовательность Cys-X₆-Cys-X₂-Cys-X₅-Cys, которая формирует железосерный кластер. Белок MutY содержит последовательность Cys-X₆-Cys-X₂-Cys-X₇-Cys, образующую железосерный домен, который является необходимым как для специфического распознавания субстрата, так и для каталитической активности фермента [146, 148-150]. Интересным оказалось то, что денатурированный белок, не содержащий железа, может ренатурировать при добавлении ионов железа с образованием активного фермента. Фермент, не содержащий железосерный домен, теряет каталитическую активность. Более того, он не связывается специфически с субстратом и

способен только к слабому узнаванию ДНК. Это говорит о критической роли этого домена для специфического узнавания поврежденной пары нуклеотидов.

1.3.2. Семейство Н2tН

Семейство H2tH ДНК-гликозилаз содержит группу гомологичных ферментов, имеющих структурное и функциональное сходство с формамидопиримидин-ДНКгликозилазой (Fpg или MutM) и эндонуклеазой VIII (Endo VIII или Nei) [13, 64, 151]. Fpg способен удалять широкий спектр модифицированных пуринов и имеет высокую специфичность к охоG и Fapy производным Gua и Ade [152, 153]. Кроме того, Fpg удаляет различные окисленные пиримидины, такие как 5-оксицитозин и 5-оксиурацил, продукты кольцевой фрагментации тимина, тимингликоль и 5,6-дигидротимин. В то же время Nei обладает субстратной специфичностью, аналогичной Nth семейства HhH-GPD, и удаляет из ДНК окисленные пиримидины [154]. Известны три эукариотических ДНКгликозилазы этого семейства: NEIL1, NEIL2 и NEIL3 [103, 155-159]. NEIL1 узнает широкий спектр поврежденных оснований, включающий Gh, Sp, Tg, 5-OHU, DHU, Fapy, DHT, 5fU, 5hmU, 5-OHC, остаток мочевины и AP-сайты [96, 160-169]. NEIL2 эффективно удаляет окисленные производные Cyt, 5-OHU, Gh и Ia, но не способен удалять Tg или охоG [159, 163, 170, 171]. NEIL3 предпочитает различные окисленные пурины и пиримидины в одноцепочечной ДНК и ДНК, содержащей выпетливание [172-174].

ДНК-гликозилазы семейства H2tH являются бифункциональными ферментами и способны гидролизовать N-гликозидную связь поврежденного основания И катализировать последовательное расщепление фосфодиэфирных связей со стороны 3'- и 5'-атомов углерода остатка 2'-дезоксирибозы путем β-элиминирования (АР-лиазная активность), что приводит к удалению остатка рибозы в форме 4-оксо-2-пентеналя и образованию однонуклеотидного пробела с остатками фосфатных групп на 3'- и 5'-концах ДНК [13, 175-178]. В качестве каталитически активного нуклеофила все ДНК-гликозилазы семейства H2tH используют N-концевой аминокислотный остаток Pro1, исключение составляет NEIL3, использующий Val1 [159, 175, 179, 180]. Показано, что ферменты состоят из двух доменов, соединенных гибким линкером [13, 151]. При этом N-концевой домен содержит характерный антипаралелльный β-слой, а С-концевой домен образован четырьмя α-спиралями, две из которых входят в состав домена «спираль-два поворотаспираль» (H2tH), а также две β-складки, формирующие цинковый палец. ДНК связывается в положительно заряженной бороздке, расположенной на стыке двух доменов, что сопровождается «закрытием» доменов белка. При этом рибозо-фосфатный остов ДНК изгибается в месте повреждения, а поврежденное основание выворачивается из дуплекса в активный центр фермента. Молекула белка претерпевает структурные изменения, связанные с перемещением некоторых аминокислотных остатков (Phe110, Arg108 и Met73, нумерация для Fpg из *B. stearothermophilus*) в полость дуплекса, образующуюся после выворачивания поврежденного основания. Узнавание поврежденного основания происходит за счет множественных взаимодействий между аминокислотными остатками, расположенными в ДНК-связывающей бороздке и активном центре, с рибозо-фосфатным остовом ДНК.

1.3.3. Суперсемейство UDG

Основными источниками урацила в ДНК являются процессы дезаминирования цитозина, в результате которого образуется пара G/U, и включения dUMP во время репликации ДНК. Репликация ДНК, содержащей урацил, приводит к мутации G/C \rightarrow A/T. Оценка скорости спонтанного дезаминирования позволила оценить, что в геноме одной клетки человека, содержащей примерно 10^{10} пар оснований, ежедневно возникает несколько сотен оснований урацила [14]. Репарация урацила в ДНК проходит по пути эксцизионной репарации оснований, инициатором которого являются монофункциональные урацил-ДНК-гликозилазы [50, 80, 181, 182]. Урацил-ДНК-гликозилазы были обнаружены практически во всех живых организмах: археях, бактериях, эукариотах и больших ДНК-вирусах.

Суперсемейство характеризуется наличием консервативных структурных мотивов (N-концевой мотив A и C-концевой мотив B), которые присутствуют в большинстве этих ферментов [77]. Однако отличия в этих структурных элементах у ряда ферментов позволяет разделить суперсемейство на шесть структурных классов. Так, для классов I-V характерны отличия в консервативных участках, соответствующих каталитической петле (мотив A) и интеркалирующей петле (мотив B), содержащей специфический аминокислотный остаток Leu. Ферменты, входящие в классы IV-VI имеют четыре консервативных цистеиновых остатка, которые формируют железо-серный кластер [4Fe-4S]. При этом в классе VI мотив A представлен HhH-доменом, а интеркалирующая петля отсутствует и мотив B представлен только [4Fe-4S] кластером.

Нужно отметить, что в эукариотах представлены урацил-ДНК-гликозилазы классов I, II и III. Остальные три класса (IV-VI) найдены в термофильных и гипертермофильных эубактериях и археях. Эти ферменты могут удалять Ura из U/G мисматча, кроме того, члены классов IV и VI, но не класса V могут удалять Ura из одноцепочечной ДНК. Кроме

того, на сегодняшний день наиболее изученными урацил-ДНК-гликозилазами являются ферменты классов I, II и III. При этом совокупность структурных и биохимических данных, полученных для ферментов этих классов, позволила выявить общие особенности узнавания поврежденного нуклеотида и протекания каталитической стадии для всего суперсемейства UDG.

1.3.3.1. Класс I

Типичными представителями класса I являются про- и эукариотические ДНКгликозилазы Udg и UNG. Эти ферменты включают высоко консервативную аминокислотную последовательность, достигающую 40,3% между белками дрожжей и человека [183]. Нужно отметить, что за счет альтернативного сплайсинга и двух различных мест старта транскрипции в клетках высших эукариот выделяют митохондриальную UNG1 и ядерную UNG2 изоформы белка [184]. Основная биологическая функция членов класса I заключается в высокоспецифичном и селективном удалении основания Ura из ДНК, при этом эффективность удаления уменьшается в ряду ssU > U/G > U/A [185].

У членов класса I можно выделить пять консервативных мотивов: (1) каталитическая петля (мотив A); (2) Рго-богатая петля, которая отвечает за сжатие рибозофосфатного остова с 5'-стороны от повреждения; (3) Ura-специфический мотив; (4) петля Gly-Ser, которая сжимает рибозофосфатного остова с 3'-стороны от повреждения; (5) интеркалирующая петля, содержащая специфический аминокислотный остаток Leu, который встраивается в ДНК со стороны малой бороздки (мотив B). Для сравнения в таблице 2 приведена последовательность мотивов для урацил-ДНК-гликозилаз человека, *E. coli* и вируса коровьей оспы.

Все ДНК-гликозилазы класса I эффективно удаляют основание Ura из одноцепочечной и двухцепочечной ДНК независимо от основания, расположенного напротив Ura в комплементарной цепи. Ферменты обладают высокой специфичностью по отношению к Ura и имеют незначительную активность по отношению к другим природным пиримидиновым основаниям ДНК (Cyt и Thy), а также к основанию Ura в РНК. Данные о структуре свободных ферментов и их комплексов с ДНК позволили определить строение кармана активного центра, в котором располагается поврежденное основание, и установить причины высокой селективности ферментов к основанию Ura [186-191].

Таблица 2. Консервативные мотивы урацил-ДНК-гликозилаз *E. coli*, человека и вируса коровьей оспы, принадлежащих классу I*

	Udg из E. coli	hUNG	vUNG
Каталитическая	62-GQDPYH-67	143-GQDPYH-148	66-GIDPYP-71
петля			
Pro-богатая петля	84-AIPPS-88	165-PPPPS-169	84-FTKKS-88
Ura-	120-LLLN-123	201-LLLN-204	117-IPWN-120
специфический			
мотив			
Петля Gly-Ser	165-GS-166	246-GS-247	160-KT-161
Интеркалирующая	187-HPSPLSAHR-195	268-HPSPLSVYR-276	181-HPAARDR-187
петля			
Аминокислотные	D64, Y66, F77, N123,	D145, Y147, F158,	D68, Y70, F79,
остатки, входящие	H187, L191	N204, H268, L272	N120, H181, R185
в активный центр			

* Согласно кристаллическим структурам PDB ID 2EUG, 1AKZ и 4DOF для Udg из *E. coli*, hUNG и vUNG соответственно.

Ura-связывающий карман активного центра состоит из аминокислотных остатков, входящих в разные консервативные мотивы фермента. Например, у Udg из *E. coli* Uraсвязывающий карман образован остатками Gln63, Asp64 и Tyr66 (каталитическая петля), Phe77 (активный центр), Ser88 (Pro-богатая петля), Asn123 (Ura-специфический мотив) и His187 (интеркалирующая петля) (рис. 3).

Ura-связывающий карман не способен разместить большие пуриновые основания изза его компактного размера, что способствует повышению специфической селективности фермента. Дискриминация Thy и других C5-замещенных пиримидиновых оснований достигается за счет консервативного остатка Тугбб (Udg из *E. coli*), который расположен рядом с C5 положением пиримидинового нуклеотида. Расстояние между атомом Cδ1 Тугбб и C5 Ura составляет 3,5 Å (PDB ID 2EUG), поэтому присутствие метильной группы или другого объемного заместителя в этом положении приводит к значительным стерическим затруднениям. Действительно, замена Y147A у hUNG (аналог Tyr66 у Udg из *E. coli*) приводит уменьшению селективности по отношению к Ura и появлению способности удалять Thy [192, 193]. Дискриминация Суt основана на образовании сети специфических водородных связей, которые образуются с атомами O2, N3 и O4 основания Ura, но не с основанием Cyt. Основную роль в данном случае играет остаток Asn123 (Udg из *E. coli*), боковая амидная группа которого образует контакты с N3 и O4 основания Ura. Введение замены N204D у hUNG (аналог Asn123 у Udg из *E. coli*) приводит к появлению активности по отношению к основанию Cyt [192, 193].



Рис. 3. Структура Ura-связывающего кармана Udg из *E. coli* (PDB ID 2EUG). Водородные связи и ван-дер-ваальсовые контакты аминокислотных остатков и Ura показаны пунктирной линией (расстояния приведены в Å).

Таким образом, высокая селективность ферментов класса I к основанию Ura достигается за счет множественных специфических контактов в кармане активного центра фермента. Поэтому, можно предположить, что специфический поиск Ura в ДНК должен включать тестовое выворачивание нуклеотидов в активный центр.

Данные, полученные на основе Рамановской спектроскопии, показывают, что неспецифическое связывание неповрежденной ДНК приводит к компрессии дуплекса за счет уплотнения стэкинга между азотистыми основаниями [194]. Компрессия дуплекса вызвана взаимодействием Рго-богатой петли с цепью дуплекса, расположенной с 5'стороны от уридина, и «встречным» взаимодействием интеркалирующей и Gly-Ser петель с цепью дуплекса, расположенной с 3'-стороны от уридина [189]. При этом гидроксильные боковые группы трех консервативных остатков Ser169, Ser247 и Ser270 (hUNG), по одному в каждом из перечисленных мотивов участвуют в формировании полярных контактов с рибозофосфатным остовом поврежденной цепи дуплекса. В комплексе фермент-ДНК также образуются гидрофобные контакты с остатками Pro167, Pro168, Pro271 и Ser273 (hUNG).

Показано [195, 196], что при связывании ДНК, содержащей Ura, также наблюдается эффект сжатия ДНК, который вызван взаимодействием остатков Ser88 и Ser189 (Udg из E. coli) с фосфатными группами с 5'- и 3'-стороны от уридина. Показано, что замена остатков Ser88, Ser189 и Ser192 приводит к значительной потере каталитической активности, что свидетельствует об их роли в процессе узнавания поврежденного нуклеотида [197]. При этом остатки Asn123 и His187 образуют сеть водородных связей с урацилом и ответственны за «вытягивание» основания из дуплекса ДНК. Замена этих аминокислот на глицин (особенно остаток Asn123) приводила к замедлению стадии выворачивания урацила [198]. Роль остатка Leu191, находящегося на месте вывернутого урацила в дуплексе ДНК, подверглась особому анализу, поскольку существует несколько возможных вариантов действия этой аминокислоты [182, 188]. С одной стороны, Leu191 может вытеснять урацил из двойной спирали, с другой – встраиваться в дуплекс уже после выворачивания урацила и тем самым стабилизировать внеспиральное положение основания. Замены L191A и L191G приводили к резкому уменьшению скорости выворачивания основания Ura из дуплекса, что свидетельствует об активном участии Leu191 в выворачивании поврежденного нуклеотида.

На основании данных [199] был предложен механизм специфического узнавания повреждения, который включает неспецифическое связывание ферментом ДНК-субстрата. Следует отметить, что ДНК-связывающий центр ферментов UNG образует контакты преимущественно с рибозо-фосфатным остовом цепи ДНК, содержащей основание Ura. В этом комплексе происходит локальное сжатие фосфатных групп одной из цепей ДНК. Встраивание остатка Leu191 (Udg из *E. coli*) со стороны малой бороздки ДНК приводит к выворачиванию Ura из двойной спирали в активный центр фермента, в котором происходит верификация повреждения путем образования сети контактов между аминокислотными остатками Ura-связывающего кармана и азотистым основанием. Образование каталитически компетентного состояния приводит к расщеплению Nгликозидной связи с образованием промежуточных интермедиатов: катиона оксокарбения и аниона основания Ura. При этом отрицательный заряд аниона Ura стабилизируется водородной связью с His187 (Udg из E. coli). Последующая атака молекулой воды, активированной остатком Asp64 (Udg из E. coli) за счет оттягивания протона и формирования гидроксильного иона, приводит к образованию АР-сайта и свободного основания Ura.

1.3.3.2. Класс II

В качестве представителей класса II можно выделить мисматч-специфическую урацил-ДНК-гликозилазу MUG из E. coli и тимин-ДНК-гликозилазу человека TDG. Эти ферменты активны по отношению к U/G и T/G мисматчам, но практически неактивны по отношению к паре U/A [200, 201]. Нужно отметить, что биологической функцией TDG помимо удаления оснований Ura и Thy из мисматчей и защиты от возникновения мутаций является регуляция экспрессии генов за счет активного деметилирования ДНК [202-204]. образующийся Известно, 5-метилцитозин (5mCyt), при специфическом что метилировании ДНК высших эукариот [205], является важным маркером экспрессии генов, инактивации Х-хромосом и подавления транспозонов и ряда других процессов развития организма [206-208]. В клетках млекопитающих деметилирование 5mCyt происходит либо путем его дезаминирования ферментами AID/APOBEC с образованием мисматча Т/G [202, 209, 210], либо путем специфического окисления метильной группы 5mCyt ферментами ТЕТ с образованием 5-гидроксиметицитозина (5hmCyt), 5формилцитозина (5fCyt) и 5-карбоксицитозина (5caCyt) [211-214]. Было показано, что TDG удаляет основания Thy, 5fCyt, 5caCyt, расположенные напротив Gua примерно с одинаковой эффективностью [215, 216].

Ферменты, принадлежащие классу II, имеют структурное сходство с ферментами класса I. Однако представители этих классов имеют низкую степень гомологии аминокислотной последовательности и используют различные механизмы узнавания поврежденного нуклеотида [200, 217-221].

Нужно отметить, что консервативная для класса I каталитическая петля (-GQDP<u>Y</u>-) отличается для ферментов класса II (-GINP<u>G</u>-). Замена остатка Туг, который обеспечивает селективность ферментов класса I к основанию Ura за счет стерических затруднений с заместителями в C5-положении, на остаток Gly у ферментов класса II приводит к появлению активности в отношении основания Thy [200]. Дискриминация основания Cyt в активном центре происходит благораря образованию водородных связей с остатком Asn191 (TDG), также как у ферментов класса I.

Замена консервативного каталитического остатка Asp у ферментов класса I на остаток Asn в классе II (-GI<u>N</u>PG- вместо -GQ<u>D</u>PY-) свидетельствует об изменении каталитического механизма. Роль карбоксильной группы Asp у ферментов класса I заключается в связывании и активации молекулы воды. В то же время амидная группа Asn у ферментов класса II может координировать молекулу воды, но не способна ее активировать [188]. Кроме того, замена N140D (TDG) приводит к уменьшению

каталитической активности, хотя отрицательно заряженный Asp должен стабилизировать промежуточный карбокатион, как это показано для ферментов класса I. Поэтому можно предположить, что ферменты класса II катализируют гидролиз N-гликозидной связи по механизму S_N2 [222].

В каталитическом механизме, установленном для ферментов класса I, консервативный остаток His268 (hUNG) интеркалирующей петли (-<u>H</u>PSPLSVYR-) стабилизирует отрицательный заряд промежуточного аниона основания Ura за счет образования водородной связи с атомом O2 Ura [62, 186]. У ферментов класса II остаток His заменен на Met (прокариотические ДНК-гликозилазы MUG) или Asn (ДНК-гликозилазы млекопитающих TDG) [200].

Кроме того, представители класса II, в отличие от класса I, взаимодействуют с комплементарной цепью ДНК, более того эти ферменты проявляют активность только на двухцепочечной ДНК. Такие дополнительные взаимодействия с комплементарной цепью обеспечивают специфичность по отношению к основанию, расположенному напротив поврежденного нуклеотида и увеличивают селективность ферментов по отношению к мисматчам U/G и T/G [204]. Было показано, что три аминокислотных остатка интеркалирующей петли Gly143, Leu144 и Arg146 (MUG из *E. coli*) встраиваются в дуплекс ДНК со стороны малой бороздки и выступают в роли клина, выталкивающего основание Ura в активный центр фермента [200]. За счет образования специфических водородных связей между остатками Gly143 и Ser145 (MUG из *E. coli*) и основанием Gua происходит имитация Уотсок-Криковских контактов в фермент-субстратном комплексе. Однако в случае TDG в роли клина выступает остаток Arg275, замена которого на Ala или Leu приводит к значительному снижению каталитической активности TDG [223, 224].

В работе [225] был предложен механизм действия TDG, включающий образование неспецифического первичного комплекса. По-видимому, в этом комплексе, как и в случае ферментов класса I, происходит образование контактов между ДНК-связывающим центром фермента и рибозофосфатным остовом, которые способствуют локальному нарушению структуры дуплекса. В случае присутствия основания Ura под действием интеркалирующих аминокислотных остатков происходит его выворачивание в активный центр фермента. При этом в кармане активного центра происходит специфическое узнавание основания Ura, а встраивание в дуплекс аминокислотных остатков, взаимодействующих с основанием, расположенным в комплементарной цепи, обеспечивает высокую селективность к паре U/G.

Несмотря на описанные отличия активных центров ферментов, принадлежащих классу I и II, которые приводят к значительным отличиям как механизма специфического узнавания повреждения, так и каталитической эффективности этих ферментов, их общей особенностью является выворачивание удаляемого основания Ura (а также Thy и других в случае TDG) в активный центр.

1.3.3.3. Класс III

Еще один класс урацил-ДНК-гликозилаз, отличающийся от класса I, включает ферменты SMUG (Single-strand specific Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase) [226-228]. Представители урацил-ДНК-гликозилаз класса III найдены только в высших эукариотах [79, 229]. Первоначально было установлено, что члены этого класса высокоселективны по отношению к одноцепочечной ДНК [228], но позже было обнаружено, что они обладают высокой активностью в отношении двухцепочечных ДНК-субстратов, содержащих U/G и U/A 229]. Ферменты также способны удалять окисленный 5пары [79, гидроксиметилурация (5hmUra), 5-формилурация (5fUra) и 5-гидроксиурация (5hoUra), но в отличие от ферментов класса II неактивны по отношению к Thy (5-метилурация) [226, 230-233].

Интересно отметить (рис. 4*a*), что выравнивание консервативных мотивов A и B для классов I, II и III показало, что интеркалирующая петля у класса III содержит консервативный для класса I остаток His239 (hSMUG1). В то время как каталитическая петля содержит остаток Asn85 (hSMUG1), координирующий молекулы воды, который консервативен в классе II (рис. 4*б*) [14, 50, 77]. Мутационный и структурный анализ показали, что в hSMUG1 Asn85 и His239 принимают участие в каталитической реакции гидролиза N-гликозидной связи.

Высокая селективность по отношению к основанию достигается за счет образования множественных контактов с аминокислотными остатками, формирующими карман активного центра. В hSMUG1 последовательность 239–249 служит клином, проникающим в двойную спираль ДНК [79, 232, 234]. Рhe98 образует стэкинг с вывернутым пиримидиновым основанием и стабилизирует его расположение в кармане активного центра. При этом происходит образование водородных связей между остатком Asn163 и основанием, которое отвечает за дискриминацию Ura и Cyt. Область Gly87-Met91 отвечает за узнавание заместителя в C5-положении пиримидина либо через образование водного мостика (в случае Ura), либо через образование прямых водородных связей (в случае 5hoUra, 5hmUra и 5fUra) (рис. 46) [232].

Образование каталитического комплекса приводит к расщеплению N-гликозидной связи поврежденного основания по диссоциативному S_N1 механизму, аналогично ферментам класса I [232, 235].



Рис. 4. (*a*) Выравнивание последовательности каталитической и интеркалирующей петель для представителей I, II и III классов (номера соответствуют аминокислотным остаткам hSMUG1). (δ) Взаимодействия функционально важных остатков в кармане активного центра hSMUG1, консервативные области класса I и II показаны квадратными скобками. Водородные связи Asn85, Asn163 и His239 с основанием Ura и молекулой воды обозначены пунктирными линиями. Phe98 образует стэкинг с основанием Ura. В области C5-положения Ura расположен остаток Gly87.

1.3.4. Семейство Endo V

Ультрафиолетовый свет приводит к повреждению оснований ДНК по нескольким механизмам, включая как генерирование АФК, которые приводят к окислительному повреждению оснований, так и образование продуктов фотолиза, наиболее часто приводящих к образованию циклобутановых пиримидиновых димеров. Пиримидиновые димеры в ДНК удаляются ДНК-фотолиазой, которая восстанавливает циклобутановое кольцо, используя энергию видимого света [236]. Однако у бактериофагов семейств *Мyoviridae* (T4, RB69, RB70, 44RR2.8t, KVP40) и *Phycodnaviridae* (Chlorella virus) обнаружена ДНК-гликозилаза (T4 Endo V), обладающая специфичностью к пиримидиновым димерам и инициирующая их удаление по пути эксцизионной репарации

оснований [237-241]. Нужно отметить, что подобная последовательность, кодирующая белок, была также обнаружена в геноме ряда бактерий *Brucella*, *Prochlorococcus*, *Bordetella*, *Haemophilus*, *Pasteurella* [242-244]. Кроме того, фермент, обладающий специфичностью к пиримидиновым димерам, обнаружен у *Micrococcus luteus* [245-247], *Bacillus sphaericus* [248], *Neisseria mucosa* [249] и *Paramecium bursaria* chlorella virus-1 [250-253].

Установлено, что T4 Endo V гидролизует N-гликозидную связь 5'-пиримидинового остатка в димере. Между образовавшимся AP-сайтом и N-концевым остатком Thr2 формируется основание Шиффа, которое приводит к удалению 3'-фосфатной группы по реакции β-элиминирования [254, 255]. Показано, что Glu23 является донором протона в процессе каталитической реакции, а остатки Arg3, Arg22 и Arg26 обеспечивают электростатическую стабилизацию каталитического комплекса [256-258].

Установлены кристаллические структуры свободного фермента Т4 Endo V [259, 260], комплекса неактивной мутантной формы с ДНК, содержащей пиримидиновый димер [261] и ковалентного комплекса фермента с ДНК, содержащей АР-сайт [262]. Показано, что фермент, состоящий из 138 аминокислотных остатков, содержит три α спирали, которые располагаются параллельно двойной спирали ДНК в фермент-субстратном комплексе. Фермент образует множественные контакты с рибозофосфатным остовом ДНК. Причем с 3'-стороны от повреждения образуются контакты с поврежденной цепью дуплекса, в то время как с 5'-стороны от повреждения фермент взаимодействует с комплементарной цепью, что приводит к изгибу ДНК-дуплекса в области повреждения примерно на 60°. В каталитическом комплексе фермент выворачивает аденозин, расположенный напротив тиминового димера, для того, чтобы обеспечить доступ каталитического аминокислотного остатка Thr2 к C1'-атому 5'-Thy в димере. Вывернутое основание Ade располагается в гидрофобном кармане фермента, при этом фермент не образует специфических контактов ни с основанием Ade, ни с 3'-Thy в димере. Следует отметить, что выворачивание основания в случае данного структурного семейства обеспечивает доступ каталитических аминокислотных остатков к поврежденному нуклеотиду, но не служит для специфического узнавания повреждения, как было показано для других структурных семейств [263].

Поиск и узнавание повреждения, скорее всего, происходит в ходе 1D-диффузии фермента вдоль двойной спирали ДНК с образованием контактов между заряженными аминокислотными остатками на поверхности белка и рибозофосфатным остовом [264, 265]. Известно, что образование примидинового димера приводит к нарушению стэкинга
между комплементарными основаниями Ade и небольшому изгибу ДНК примерно на 10°, а в фермент-субстратном комплексе изгиб достигает 60° [266-268]. Специфичность к данному повреждению, вероятно, достигается за счет того, что поврежденная ДНК способна принимать фермент-индуцированный изгиб. При этом T4 Endo V также связывает ДНК, содержащую AP-сайты, что свидетельствует о том, что встраивание каталитического аминокислотного остатка Thr в дуплекс также играет важную роль в процессе специфического узнавания поврежденного нуклеотида [269].

1.3.5. Семейство AAG

В настоящее время известно большое число алкилированных аддуктов ДНК, которые возникают как в ходе клеточного метаболизма, так и при химиотерапии [270-272]. Атомы N7 и N3 пуриновых оснований, расположенные в большой и малой бороздках двойной спирали, наиболее часто вступают в реакцию с электрофилами, приводящими к алкилированию азотистых оснований. Причем N7-положение гуанина является наиболее нуклеофильным [273]. Нужно отметить, что N7-алкилирование гуанина приводит к появлению положительного заряда и дестабилизации N-гликозидной связи. В результате этого происходит спонтанная апуринизация или раскрытие пуриноваго кольца с образованием например, 5-N-метил-2,6-диамино-4-гидроксиформамидопиримидина (mFapyG). N-Гликозидная связь N3-метиладенина (3mAde) также неустойчива и имеет период полураспада примерно 24 ч при 37°С [274]. Активные формы альдегидов и эпоксидов, образующиеся в результате перекисного окисления липидов, приводят к образованию этеноаддуктов азотистых оснований, таких как 1,N6-этеноаденин (єА), 1,N2и N2,3-этеногуанин (1,N2-єG и N2,3-єG) и 3,N4-этеноцитозин (єС) [275, 276]. В целом, алкилированные повреждения ДНК вызывают геномную нестабильность вследствие мутаций и разрывов цепей ДНК. Кроме того, цитотоксический эффект 3mAde вызван нарушением контактов между ДНК-полимеразой и N3-положением Ade в малой бороздке [277, 278].

ДНК-гликозилазы, специфичные к алкилированным повреждениям ДНК, были обнаружены во всех живых организмах от архей и бактерий до высших эукариот. Структурное строение алкилпурин-ДНК-гликозилаз позволяет разделить эти ферменты на три структурных семейства: 1) семейство ААG, включающее алкиладенин-ДНК-гликозилазу человека, 2) семейство ALK, включая прокариотические ДНК-гликозилазы AlkC и AlkD и 3) семейство HhH-GPD, содержащее все остальные алкиладенин-ДНК-гликозилазы [82, 142, 279, 280]. Несмотря на разную архитектуру, ААG и ферменты

семейства HhH-GPD имеют структурно подобные активные центры, содержащие функционально гомологичные аминокислотные остатки, взаимодействующие с вывернутым азотистым основанием. Тогда как ферменты семейства ALK значительно отличаются как по структуре, так и по механизму узнавания повреждения (см раздел Семейство ALK) [281].

Алкиладенин-ДНК-гликозилаза человека (AAG) узнает в ДНК алкилированные основания, такие как 3mAde и 7mGua, циклические аддукты єA и єG, а также дезаминированный гуанин (гипоксантин, Hx) и деазотированное производное гуанина (оксанин Oxa), и удаляет их путем гидролиза N-гликозидной связи [141, 282-289]. Одним из нерешенных в настоящее время вопросов является природа механизма, обеспечивающего специфическое узнавание широкого спектра поврежденных оснований [290-292].

Анализ кристаллических структур комплексов AAG с ДНК [280, 290] показал, что в процессе образования каталитически активного фермент-субстратного интермедиата происходит ряд конформационных перестроек фермента и ДНК-субстрата, результатом которых может являться специфическая дискриминация между поврежденными и неповрежденными основаниями. Установлено, что ДНК-связывающий центр фермента состоит из основных аминокислотных остатков, боковые цепи которых образуют электростатические контакты с рибозофосфатным остовом с каждой из сторон относительно поврежденного нуклеотида. В каталитическом комплексе основание єА вывернуто из двойной спирали и расположено в кармане активного центра между остатками Тут127 и Тут159, с которыми образует стэкинг. Кроме того, образуется водородная связь между атомом N амидной связи основной цепи His136 и атомами N6 или O6 в єА и Hx соответственно [290]. При этом остаток Тут162 встраивается в ДНК-дуплекс со стороны малой бороздки и стабилизирует внеспиральное положение поврежденного основания.

Нужно отметить, что эффективность образования фермент-субстратного комплекса значительно отличается для ДНК, содержащей различные типы повреждений [284, 293-295]. Так, например, основания є и Нх образуют одинаковые специфические контакты в активном центре фермента. Тем не менее, площадь ван-дер-ваальсовых взаимодействий є с «сэндвичем» из остатков Туг127 и Туг159 должна быть больше, чем в случае Нх. Это приводит к тому, что AAG более эффективно связывает ДНК, содержащую є ло сравнению с ДНК, содержащей Нх.

Кроме того, скорость гидролиза N-гликозидной связи у разных повреждений также значительно отличается. Одним из факторов высокой ферментативной активности AAG по отношению к алкилированным субстратам по сравнению с неалкилированными является результатом повышенной лабильности гликозидной связи в некоторых поврежденных основаниях [296, 297]. Так, заряженные основания, например 7mGua и 3mAde, удаляются AAG с большей эффективностью, чем незаряженные основания, например, ϵ A и Hx [284, 298, 299]. Было показано [300, 301], что гидролиз N-гликозидной связи происходит по механизму S_N1 и включает образование катиона оксокарбения и аниона основания. Поэтому в случае положительно заряженных оснований 7mGua и 3mAde сразу происходит образование нейтрального основания, что стабилизирует переходное состояние и увеличивает скорость гидролиза.

Показано [284, 287, 298, 302], что эффективность удаления повреждений значительно зависит как от типа основания, расположенного напротив повреждения, так и от природы оснований, расположенных с 3'- и 5'-стороны от повреждения. Однако для разных повреждений и по данным из разных источников эта зависимость значительно отличается. Так, например, для Нх эффективность его удаления в зависимости от типа основания, расположенного напротив, уменьшается в ряду T>C>A>G [284] или T>G>C>A [287, 298], в то время как для є Aполучен ряд A>C>G>T [284] или C>A>T>G [298].

Поскольку каталитическая стадия происходит после выворачивания поврежденного основания из ДНК, необходимо принимать во внимание соотношение между стабильностями пар в случае различных оснований, расположенных напротив повреждения. Известно [303], что Нх образует по две водородные связи со всеми природными основаниями. Однако термическая стабильность модельных дуплексов [303], содержащих различные основания напротив Hx, увеличивалась в ряду: G>T>A>C. Необходимо отметить, что ферментативная активность ААG по отношению к Нх уменьшается в ряду T>G>C>A. Таким образом, на эффективность действия фермента, помимо стабильности модифицированных пар нуклеотидов, должны оказывать влияние дополнительные факторы. Среди них можно отметить тот факт, что, хотя фермент не образует прямые контакты с Thy, расположенным напротив повреждения, но атом О карбонильной группы Туг162 находится в непосредственной близости от атома О2 Тhy (2.4 Å (1F6O, [280]) и 2.5 Å (1EWN, [290])). Поэтому, скорее всего, стерические контакты между остатком Tyr162 и основаниями, расположенными напротив повреждения, также являются дополнительным фактором дискриминации. Кроме того, недавно была получена структура AAG с одноцепочечным олигонуклеотидом, содержащим 3,N4-этеноцитозин [292]. Авторы предположили, что на начальных стадиях узнавания Tyr162 может образовывать стэкинг с основанием, расположенным в комплементарной цепи. Совокупность перечисленных взаимодействий, скорее всего, обеспечивает дискриминацию различных оснований, расположенных напротив повреждения.

1.3.6. Семейство ALK

Недавно в *В. cereus* были идентифицированы две алкилпурин-ДНК-гликозилазы AlkC и AlkD, которые проявляли высокою специфичность к 3mA и 7mG, и представляли новое структурное семейство ДНК-гликозилаз [304-306]. Белок AlkD полностью состоит из повторов НЕАТ – параллельных пар коротких α-спиралей, которые обычно участвуют во взаимодействиях с белками, а не нуклеиновыми кислотами. AlkD является первым белком, имеющим подобное строение, взаимодействующим с ДНК и имеющим ферментативную активность [281]. Кристаллические структуры AlkD в комплексе с ДНК показали, что ДНК связывается в положительно заряженном канале фермента, при этом цепь дуплекса, содержащая поврежденный нуклеотид, расположена с противоположной стороны от поверхности ДНК-связывающего центра [307-309]. Три аминокислотных остатка активного центра Asp113, Trp109 и Trp187 взаимодействуют с остатком 2'дезоксирибозы нуклеотида, комплементарного повреждению. Индольные кольца обеих боковых цепей Тгр образуют серию С-Н/л-взаимодействий с остатком 2'-дезоксирибозы неповрежденного нуклеотида, что приводит к потере комплементарных взаимодействий с повреждением и локальному плавлению цепей дуплекса. Было показано, что в ходе реакции поврежденное основание сохраняет стэкинг в дуплексе, не выворачивается и не образует прямых контактов с белком. Таким образом, для узнавания поврежденного нуклеотида AlkD не использует специфические контакты с самим повреждением, а реакция гидролиза N-гликозидной связи происходит спонтанно [309].

1.4. Классификация АР-эндонуклеаз

AP-эндонуклеазы гораздо менее многочисленны, чем ДНК-гликозилазы и делятся на два структурных семейства на основании сходства с прокариотическими ферментами: экзонуклеазой III (Exo III или Xth) и эндонуклеазой IV (Endo IV или Nfo) (таблица 3) [9]. Члены семейства Xth в основе структуры имеют двухслойный β-лист, фланкированный αспиралями, и являются Mg²⁺-зависимыми ферментами [310]. Члены семейства Nfo содержат структурное ядро в виде β-бочонка, окруженное α-спиралями и имеют в активном центре три иона металла [311]. Впервые Xth был описан как $3' \rightarrow 5'$ экзонуклеза, позже было установлено, что Xth обладает AP-эндонуклеазной, 3'-фосфатазной, 3'-фосфодиэстеразной активностями [312]. Xth способен узнавать в ДНК не только AP-сайт, но и ряд его структурных аналогов, таких как восстановленный или окисленный AP-сайт или мочевинодезоксирибонуклеотидов, а также некоторые поврежденные азотистые основания [313, 314].

Nfo также является металлоферментом, но, в отличие от Xth, в качестве кофактора содержит три иона Zn^{2+} , прочно связанных в активном центре фермента [315]. Однако Nfo не имеет экзонуклеазной активности, но имеет специфичность к ряду поврежденных азотистых оснований [171, 316, 317].

Все живые организмы имеют одну или две АР-эндонуклеазы, являющиеся гомологами Nfo или Xth. Так, например, установлено, что в дрожжах в качестве основной AP-эндонуклеазы выступает гомолог Nfo (Apn1p), тогда как гомолог Xth (Apn2p) является дополнительным ферментом [21, 318]. У млекопитающих обнаружены две AP-эндонуклеазы APE1 и APE2, которые являются гомологами фермента Xth [313, 315, 319]. APE1 обладает высокой AP-эндонуклеазной активностью, однако $3' \rightarrow 5'$ экзонуклезная активность APE1 значительно ниже, чем у Xth [7, 9, 313, 320-322]. Кроме AP-сайтов APE1 также узнает в ДНК некоторые поврежденные азотистые основания, такие как DHU, DHT, 5hoU, U, ϵ A, α A, α C, α T, 5-гидроксигидантоин, 5-гидрокси-5-метилгидантоин и другие [171, 323, 324]. Установлено, что $3' \rightarrow 5'$ экзонуклезная активность APE2 выше, чем его AP-эндонуклеазная активность и может представлять собой основную биологическую функцию этого фермента [325].

Необходимо отметить, что каталитический механизм гидролиза 5'-фосфодиэфирной связи установлен для представителей как семейства Xth [315, 326, 327], так и семейства Nfo [311, 328, 329]. Показано, что реакция гидролиза 5'-фосфодиэфирной связи начинается с нуклеофильной атаки фосфатной группы атомом кислорода воды, что сопровождается образованием переходного комплекса, содержащего атом фосфора, связанный с пятью атомами кислорода. Последующий разрыв связи P-O3' приводит к образованию гидроксильной и фосфатной групп на 3'- и 5'-концах разрыва.

Несмотря на то, что AP-эндонуклеазы семейств Xth и Nfo имеют близкую субстратную специфичность, они значительно отличаются механизмами узнавания повреждений ДНК. Согласно рентгеноструктурным данным [311, 328], в комплексе Nfo с ДНК, содержащей F-сайт, рибозофосфатный остов дуплекса изогнут примерно на 90°, а поврежденный нуклеотид вывернут в активный центр фермента. Кроме того, нуклеотид,

расположенный напротив повреждения, также вывернут из двойной спирали. Карман активного центра Nfo стерически исключает связывание нормальных нуклеотидов в β-конфигурации, но не α-аномерных нуклеотидов. Напротив, в комплексе APE1 с ДНК угол изгиба рибозофосфатного остова составляет только ~35°. При этом также происходит выворачивание поврежденного нуклеотида в активный центр, а нуклеотид, расположенный напротив повреждения, сохраняет стэкинг с соседними основаниями в дуплексе ДНК [327].





* Нуклеотид, удаляемый в ходе ферментативного процесса, окрашен в синий цвет, нуклеотид, расположенный в комплементарной цепи напротив удаляемого, окрашен в черный цвет.

1.5. Заключение

Общий механизм эксцизионной репарации оснований включает в себя удаление поврежденного азотистого основания ДНК-гликозилазами. Безусловно, ДНК-гликозилазы, узнающие различные модифицированные и неправильно спаренные основания и инициирующие ферментативный цикл восстановления повреждения, играют важную роль в сохранении целостности ДНК. После действия гликозилаз, АР-эндонуклеаза гидролизует фосфодиэфирную связь с 5'-стороны от АР-сайта с образованием 3'гидроксильной группы. Кроме того, способность АР-эндонуклеазы узнавать не только АРсайт, но и ряд поврежденных азотистых оснований позволяет рассматривать и сравнивать функциональные особенности ДНК-гликозилаз и АР-эндонуклеаз как ферментов, обладающих специфическими механизмами узнавания повреждений в ДНК. Основная задача этих ферментов состоит в том, чтобы быстро и точно определить местоположение модифицированного основания или АР-сайта и инициировать процесс репарации.

В ходе последних трех десятилетий проводились исследования различных представителей ферментов репарации ДНК, направленные на понимание того, каким образом происходит поиск и узнавание единичных повреждений азотистых оснований ДНК среди огромного числа немодифицированных оснований, какую роль играют конформационные изменения в ферменте и ДНК в узнавании и превращении субстрата. Однако до настоящего времени одной из актуальных проблем в области репарации ДНК остается выяснение механизмов, обеспечивающих высокоточное узнавание поврежденных оснований.

В обзоре литературы представлена структурная классификация ДНК-гликозилаз и АР-эндонуклеаз, которая направлена на выяснение общих закономерностей узнавания повреждений этими ферментами. Несмотря на то, что ДНК-гликозилазы и АРэндонуклеазы разных семейств имеют совершенно разную структуру ДНК-связывающего активного центра и функциональных групп аминокислотных остатков, центра, участвующих в специфическом узнавании поврежденного нуклеотида и катализе, практически все они обладают общими особенностями при взаимодействии с субстратами. Например, все ДНК-гликозилазы (за исключение недавно открытого семейства ALK) и AP-эндонуклеазы, для которых в настоящее время установлена структура, изгибают ДНК и выворачивают поврежденный нуклеотид либо комплементарный к нему из двойной спирали ДНК. При этом, как правило, поврежденный нуклеотид располагается в кармане активного центра фермента, где происходит его окончательная верификация. В образовавшуюся полость в дуплексе ДНК встраиваются некоторые аминокислотные остатки фермента, которые могут выступать как в роли специфического «клина», выталкивающего поврежденный нуклеотид, так и в качестве неспецифических остатков, стабилизирующих внеспиральное положение нуклеотида.

Значительные конформационные перестройки фермента и ДНК, скорее всего, конформацию обусловлены необходимостью адаптировать активного центра К специфическому для данного фермента повреждению и хорошо согласуются с моделью индуцированного соответствия, подразумевающей последовательные конформационные изменения фермента и субстрата, которые приводят к образованию каталитически компетентного состояния и протеканию каталитических стадий. Поэтому существенный вклад в понимание механизмов специфического фермент-субстратного взаимодействия предстационарной могут внести исследования кинетики И термодинамики процесса ферментативного с регистрацией конформационных превращений взаимодействующих молекул в режиме реального времени.

В связи с этим в рамках диссертационной работы разработана комплексная методология изучения механизмов узнавания повреждений ферментами эксцизионной репарации оснований ДНК, основанная на кинетическом, термодинамическом и мутационном анализе изменений конформации ферментов и ДНК и впервые проведено систематическое исследование молекулярно-кинетических механизмов процессов, катализируемых рядом про- и эукариотических ферментов эксцизионной репарации оснований ДНК.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы: акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, мочевина, трисоксиметиламинометан (Tris), дитиотреит (DTT), глицерин, персульфат аммония, тетраборат натрия, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), имидазол одно- и двузамещенный фосфат натрия, одно- и двузамещенный фосфат калия, хлорид натрия, хлорид кальция, хлорид марганца, хлорид цинка, хлорид масния, хлорид кальция, хлорид марганца, хлорид цинка, хлорид меди, сульфат никеля (Sigma, США); агар, пептон, триптон, дрожжевой экстракт (BD, США); изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (Thermo Fisher Scientific, США); ацетонитрил, уксусная кислота (Panreac, США). Также были использованы отечественные реактивы степени чистоты ос.ч. Все растворы готовили на дважды дистиллированной воде.

Олигонуклеотиды были синтезированы в Лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Новосибирск, Россия) с использованием коммерческих амидофосфитов 2'дезоксирибонуклеозидов и CPG-носителей (GlenResearch, CША) (таблица 4). Структуры всех модифицированных нуклеотидов приведены на рис. 5. Синтезированные олигонуклеотиды очищали с помощью ВЭЖХ на ионнообменной колонке (PRP-X500 Hamilton Company (12-30 мкм) 3.9×300 мм) и последующей обращенно-фазовой хроматографией (Bondapak C18 (15–20 мкм) 3.9×300 мм, Waters, Ирландия). Гомогенность олигонуклеотидов проверяли с помощью денатурирующего электрофореза в 20% ПААГ. Концентрацию олигонуклеотидов измеряли по оптической плотности растворов при длине волны 260 нм в электронных спектрах поглощения и рассчитывали по закону Бугера-Ламберта-Бера, исходя из коэффициентов молярной экстинкции, рассчитанных в приближении метода ближайших соседей [330].

Олигонуклеотиды, содержащие апуриновый/апиримидиновый сайт, были получены согласно [331]. Для этого олигонуклеотиды, содержащие уридин (0,1 мкмоль) обрабатывали урацил-ДНК-гликозилазой Udg из *E. coli* (15 ед. акт.) (СибЭнзим, Россия) в 150 мкл буфера (20 мМ Tris-HCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 0,1 мг/мл BSA, pH 8,0). Реакционную смесь выдерживали 14 ч при 37°С. Для выделения продукта реакции, содержащего АР-сайт, использовали обращенно-фазовую хроматографию (Nucleosil 100-10 C_{18}) в буферном растворе 0,1 М ТЕА-Ас, pH 7,0 и линейном градиенте 0–20% ацетонитрила. Присутствие АР-сайта в выделенном продукте и его чистоту проверяли методом гель-электрофореза. Для проверки количественного образования АР-сайта, образец олигонуклеотида (0,1 о.е.) обрабатывали 10 % пиперидином в воде при 95°С и

проводили разделение продуктов реакции в 20% ПААГ. Во всех случаях исходный олигонуклеотид был количественно расщеплен по АР-сайту.

Субстраты и лиганды ферментов представляли собой ДНК-дуплексы, состоящие из олигонуклеотидов (таблица 4). ДНК-субстратом называется ДНК-дуплекс, который после связывания в активном центре фермента претерпевает химические превращения. ДНКлигандом называется ДНК-дуплекс, который может связаться в активном центре фермента, но не претерпевает химических превращений. Сокращенное название ДНКсубстратов и ДНК-лигандов представлено в виде X^{Y}/N_{Z} , где X – это модифицированный или неправильно спаренный нуклеотид, на который направлено действие фермента и который может претерпевать химические изменения в ходе ферментативного процесса. N - это нуклеотид, расположенный в комплементарной цепи напротив X. Индекс ^Y обозначает флуорофор, используемый для регистрации протекания ферментативного процесса, например индекс ^{аРи} обозначает, что регистрацию взаимодействия фермента с данным ДНК-субстратом проводили по изменению интенсивности флуоресценции остатка aPu, индекс FAM/BHQ1 обозначает, что регистрацию взаимодействия фермента с данным ДНК-субстратом проводили по изменению FRET-сигнала между флуорофором FAM и тушителем BHQ1. В случае использования ДНК-дуплексов, содержащих флуорофор в положении N, а также при регистрации интенсивности флуоресценции остатков Тгр фермента в сокращенном названии ДНК-дуплекса индекс ^У отсутствует. Индекс z обозначает число нуклеотидных звеньев, входящих в ДНК-дуплекс. Для изучения экзонуклеазной активности АР-эндонуклеазы АРЕ1 использовали ДНК-дуплекс, состоящий из 28-ми и 15-ти звенных олигонуклеотидов, и содержащий одноцепочечный участок со стороны 5'-конца длинной цепи (таблица 4).

Сокрашенное назрание			
\mathbf{X}_{112}	3' = CACACNCCAACC = 5'		
$\mathbf{A} = 0\mathbf{X}0\mathbf{G}, \mathbf{D}\mathbf{H}0, 0, \mathbf{A}1, \mathbf{F}, \mathbf{G}$	J GAGAGAGGAAGG J		
$\mathbf{N} = \mathbf{C}, \mathbf{G}, \mathbf{A}$			
$\begin{array}{c} \mathbf{A} & /\mathbf{N}_{12} \\ \mathbf{N} & \mathbf{C} & \mathbf{A} \mathbf{D} & \mathbf{F} & \mathbf{C} \end{array}$	3 - CICICA(aru) CIICC - 3		
$\mathbf{X} = 0\mathbf{X}0\mathbf{G}, \mathbf{AP}, \mathbf{F}, \mathbf{G}$	3'-GAGAGN C GAAGG-5'		
N = C, G			
$\mathbf{X}/\mathbf{C}_{12}$	5'-CTCT (aPu) XCCTTCC-3'		
X = 0x0G, G	3'-GAGA C CGGAAGG-5'		
$X^{\text{FAM/Dab}}/C_{12}$	5'-FAM-CTCTC X CCTTCC-3'		
X = F, G	3'-Dab-GAGAG C GGAAGG-5'		
X^{FAM}/N_{12}	5'-FAM-CTCTC X CCTTCC-3'		
$\mathbf{X} = \mathbf{oxoG}, \mathbf{G}, \mathbf{F}$	3'-GAGAGNGGAAGG-5'		
N = A, G, C			
$0x0G^{Cy3/Cy5}/C_{12}$	5'-Cy3-CTCTC (oxoG) CCTTCC-3'		
	3'-Cy5-GAGAG C GGAAGG-5'		
X/N ₁₃ ,	5'-TCTCTC X CCTTCC-3'		
X = DHU, AP, F, G	3'-AGAGAGNGGAAGG-5'		
$N = A, G, C, T, tC^{O}$			
X^{aPu}/N_{13}	5'-TCTCTC X (aPu)CTTCC-3'		
X = DHU, AP, F, G	3'-AGAGAGN C GAAGG-5'		
N = A, G, C, T			
U/G ₁₇	5'-GCTCA U GTACAGAGCTG-3'		
	3'-CGAGT G CATGTCTCGAC-5'		
U^{aPu}/G_{17}	5'-GCTCA U (aPu)TACAGAGCTG-3'		
	3'-CGAGTG C ATGTCTCGAC-5'		
X ^{FAM/BHQ1} /G17	5'-FAM -GCTCAXGTACAGAGCTG-3'		
X = DHU, U, AP, F, G	3'-BHO1-CGAGTGCATGTCTCGAC-5'		
X/C^{Py} 17	5'-TCTCTCTC X CCTTCCTT-3'		
$\mathbf{X} = 0\mathbf{X}\mathbf{G}$, \mathbf{G} , \mathbf{F}	3'-AGAGAGAG (C^{Py}) GGAAGGAA-5'		
F/G ₁₇	5' - TCTCTCTCTCTCTT - 3'		
	3'-AGAGAGAG G GGAAGGAA-5'		
U/Gae	5'-GTGTCACCACTGCTCA U GTACAGAGCTG-3'		
	3'-CACAGTGGTGACGAGT G CATGTCTCGAC-5'		
Exo-A/T	5'-CAGCTCTGTACGTG A -3'		
	3'-GTCGAGACATGCACTCGTCACCACTGTG-5'		
$E_{XO}-aPu^{1}/N$	5'-CAGCTCTGTACGTG (aPu) -3'		
$\mathbf{N} = \mathbf{A}_{1} \mathbf{G}_{1} \mathbf{C}_{1} \mathbf{T}$	3'-GTCGAGACATGCAC N CGTCACCACTGTG-5'		
$\frac{1}{1} = \frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \frac{3}{2}, \frac{3}{2}$	5'-CAGCTCTGTACGT (aPu) A-3'		
	3'-GTCGAGACATGCA C TCGTCACCACTGTG-5'		
Exo-aPu ⁴ /T	5'-CACCTCTCTAC(aPu) TCA-3'		
12AV-a1 u / 1	$3' - GTCGAGACATG C ACTCACCACTCTC_5'$		
Exo-aPu ⁶ /T	5' - CACCTCTCT (aDu) CCTCA-3'		
12AU-al u / l	$3' = CTCCACACA T CCACTCACACACTCTC_5'$		
$\mathbf{E}_{\mathbf{X}\mathbf{O}} = \mathbf{D}\mathbf{u}^2 \mathbf{V} / \mathbf{N}$	5 5 $ 2$ $ 2$ $ -$		
$\begin{bmatrix} \mathbf{L} \mathbf{A} \mathbf{U} - \mathbf{A} \mathbf{\Gamma} \mathbf{U} & -\mathbf{A} \mathbf{A} \mathbf{U} \\ \mathbf{N} = \mathbf{A} \mathbf{C} \mathbf{C} \mathbf{T} \end{bmatrix}$	31-CHCCACAHCCA C NCCHCACCACHCHC 51		
$\mathbf{N} = \mathbf{A}, \mathbf{G}, \mathbf{C}, \mathbf{I}$	S GIUGAGACAIGCA C NCGICACCACIGIG-5		
$\mathbf{A} = \mathbf{F}, \mathbf{G}, \mathbf{U}, \mathbf{I}, 0\mathbf{X}0\mathbf{G},$			
U, 5mC, p, αA			

Таблица 4. ДНК-субстраты и ДНК-лиганды, использованные в работе





а





3HC



aPu



٥ ۲

C^{py}





Рис. 5. Структуры использованных в работе нуклеотидов. (а) Поврежденные нуклеотиды и уридин, (б) флуоресцирующие аналоги азотистых оснований и (в) объемные красители, использованные для образования FRET-пар.

49

Для получения препаратов ферментов hOGG1 и MutY использовали плазмидный вектор рЕТ-28с, содержащий вставку гена соответствующего фермента. Продуктом экспрессии был полноразмерный белок, содержащий последовательность (His)₆ на N-Ферменты были выделены из линии клеток E. coli Rosetta II (DE3), конце. трансформированных плазмидой, несущей вставку соответствующего фермента. Культуру клеток E. coli Rosetta II (DE3) выращивали в среде LB (1 л), содержащей 25 мкг/мл канамицина, при 37°C до оптической плотности среды 0,6–0,7 при длине волны 600 нм. После этого температуру понижали до 25°С (комнатной) и индуцировали транскрипцию вставки добавлением изопропил-β-D-тиогалактопиранозида до 0,2 мМ. После индукции культуру инкубировали в течение 16 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием (10 мин при 12 000 об./мин) и готовили суспензию клеток в 30 мл лизис-буфера (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,8, 40 мМ NaCl). Клетки лизировали при помощи френч-пресса (French Press Cell, Thermo Fisher Scientific, США). Все последующие процедуры проводили при 4°С. Клеточный лизат центрифугировали (40 мин при 30000 об./мин), супернатант наносили на колонку I (Q-Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences, Швеция) и промывали буферным раствором 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,8, 200 мМ NaCl. Фракции, содержащие белок, собирали и наносили на колонку II (HiTrap-Helating[™], Amersham Biosciences, Швеция) в буферном растворе 20 мМ НЕРЕS-NaOH, pH 7,8, 500 мМ NaCl и 20 мМ имидазол. Хроматографию проводили в линейном градиенте 20 → 500 мМ имидазола. Оптическую плотность раствора регистрировали при длине волны 280 нм. Чистоту белка определяли с помощью гель-электрофореза. Фракции, содержащие целевой белок, диализовали в буфере (20 мМ НЕРЕЗ-NaOH, pH 7,5, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 250 мМ NaCl, 50% глицерин) и хранили при –20°С.

Каталитический домен ДНК-гликозилазы человека MBD4^{cat} (аминокислотные остатки 426–580) был выделен из клеток *E. coli* Rosetta II (DE3), трансформированных плазмидой pET29b-MBD4^{cat} как описано ранее [84, 332]. Плазмида pET29b-MBD4^{cat}, содержащая ген MBD4^{cat}, была любезно предоставлена М.К. Сапарбаевым (Groupe «Réparation de l'ADN», Université Paris-Sud XI, Institut Gustave Roussy, Франция). Культуру клеток *E. coli* Rosetta II (DE3) выращивали в среде LB (1 л), содержащей 50 мкг/мл канамицина, при температуре 37°C до оптической плотности 0,6–0,7 при длине волны 600 нм. После этого температуру понижали до 20°C и индуцировали транскрипцию, добавляя изопропил- β -*D*-тиогалактопиранозид до 0,2 мМ. После индукции клетки инкубировали в течение 16 ч, затем осаждали центрифугированием (10 мин при 12000 об./мин) и готовили суспензию клеток в 30 мл буферного раствора 20 мМ НЕРЕS-NaOH, pH 7,8, 50 мМ КСІ.

Клетки лизировали при помощи френч-пресса (French Press Cell, Thermo Fisher Scientific, США). Все последующие процедуры проводили при 4°С. Клеточный лизат центрифугировали (40 мин при 30000 об./мин), супернатант наносили на колонку I (Q-Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences, Швеция) и промывали буферным раствором 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,8, 50 мМ KCl. Фракции, содержащие белок, собирали и наносили на колонку II (HiTrap-HelatingTM, Amersham Biosciences, Швеция) в буферном растворе 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.8, 500 мМ NaCl и 20 мМ имидазол. Хроматографию проводили в линейном градиенте $20 \rightarrow 500$ мМ имидазола. Оптическую плотность раствора регистрировали при длине волны 280 нм. Чистоту белка определяли с помощью гельэлектрофореза. Фракции, содержащие белок MBD4^{cat}, диализовали в буфере (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 250 мМ NaCl, 50% глицерин) и хранили при –20°С.

ДНК-гликозилаза Nth была выделена ИЗ линии клеток *E. coli* JM105. трансформированных плазмидой pNth10 [101, 333]. Культуру клеток E. coli JM105 выращивали в среде 2×YT (1 л), содержащей 50 мкг/мл ампициллина, при температуре 37°С до оптической плотности 0,6–0,8 при длине волны 600 нм. После этого температуру понижали до 30°C и индуцировали транскрипцию добавлением изопропил-β-Dтиогалактопиранозида до 0,1 мМ. После индукции культуру клеток инкубировали в течение 16 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием (10 мин, 12000 об/мин) и готовили суспензию клеток в 30 мл буферного раствора 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,8, 40 мМ NaCl. Клетки лизировали при помощи френч-пресса (French Press Cell, Thermo Fisher Scientific, США). Все последующие процедуры проводили при 4°С. Лизат клеток центрифугировали (40 мин при 30 000 об/мин), супернатант наносили на колонку I (Q-Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences, Швеция) и промывали буферным раствором 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,8, 250 мМ NaCl. Фракции, содержащие белок, собирали, разбавляли в два раза буферным раствором и наносили на колонку II (HiTrap-HeparinTM, Amersham Biosciences, Швеция). Хроматографию проводили в линейном градиенте $100 \rightarrow 1500 \text{ мM}$ NaCl, оптическую плотность раствора регистрировали при длине волны 280 нм. Степень чистоты белка определяли с помощью гель-электрофореза. Фракции, содержащие Nth, диализовали в буфере 20 мМ НЕРЕS-NaOH, pH 7.5, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреитол, 250 мМ NaCl, 50% глицерин и хранили при –20°С.

Фермент Fpg был выделен из линии клеток E. coli B834(DE3), трансформированных плазмидой pET-13a, несущей ген фермента Fpg. Культуру клеток E. coli B834(DE3) выращивали в среде 2×YT (1 л), содержащей 25 мкг/мл канамицина, при 37°C до

оптической плотности среды 0,6-0,7 при длине волны 600 нм. После добавления изопропил-β-D-тиогалактопиранозида до 50 мкМ культуру инкубировали в течение 6 ч при 37°С. Затем клетки осаждали центрифугированием (10 мин, 12000 об/мин) и готовили суспензию клеток в 40 мл лизис-буфера (100 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 1 мМ EDTA). К суспензии добавляли фенилметилсульфонилфторид (1 мМ) и инкубировали с лизоцимом (0,5 мг/мл) в течение 30 мин при комнатной температуре. После этого добавляли NaCl (до 1 М) и инкубировали 30 мин при перемешивании на магнитной мешалке. Для количественного лизиса клеток полученную суспензию обрабатывали ультразвуком (10 импульсов по 30 с, 22 ГГц). После каждого импульса суспензию клеток охлаждали в ванне со льдом в течение 90 с. Полученную после лизиса суспензию центрифугировали (20 мин 12 000 об./мин, 4°С), супернатант собирали и инкубировали с 0,01 % при полиэтиленимином в течение 20 мин на льду. Суспензию центрифугировали (20 мин при 12 000 об./мин, 4 °C), супернатант разбавляли в 4 раза буферным раствором 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит. Полученный раствор наносили на катионообменную колонку I (50 мл, Fractogel EMD SO⁻₃, Merck), затем колонку промывали 100 мл буферного раствора. После этого фермент элюировали с колонки 100 мл буферного раствора содержащим, 1 М NaCl. Собранную фракцию разбавляли в 5 раз и наносили на катионообменную колонку II (HiTrap-Heparin[™], Amersham Biosciences, Швеция). Хроматографию проводили в линейном градиенте $200 \rightarrow 800$ мM NaCl, оптическую плотность раствора регистрировали при длине волны 280 нм. Степень чистоты белка Fpg определяли с помощью гель-электрофореза. Фракции, содержащие белок Fpg, диализовали в буфере 20 мМ НЕРЕS-NaOH, pH 7,5, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 250 мМ NaCl, 50 % глицерин и хранили при -20°С.

ДНК-гликозилаза Nei была выделена из линии клеток E. coli Rosetta II (DE3), трансформированных плазмидой pET-24b, несущей ген фермента. Культуру клеток E. coli Rosetta II (DE3) наращивали в среде LB (1 л), содержащей 50 мкг/мл ампициллина, при температуре 37°C до оптической плотности 0,6–0,7 при длине волны 600 нм. После этого температуру понижали до 30°C и индуцировали транскрипцию добавлением изопропил- β -D-тиогалактопиранозида до 0,2 мМ. После индукции культуру клеток инкубировали в течение 8 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием (10 мин, 12000 об/мин) и готовили суспензию клеток в 30 мл буферного раствора 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,8, 40 мМ NaCl. Клетки лизировали при помощи френч-пресса (French Press Cell, Thermo Fisher Scientific, США). Все последующие процедуры проводили при 4°C. Лизат клеток центрифугировали (40 мин при 30 000 об/мин), супернатант наносили на колонку I (Q- Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences, Швеция) и промывали буферным раствором 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,8, 40 мМ NaCl. Фракции, содержащие белок, собирали и наносили на колонку II (HiTrap-HeparinTM, Amersham Biosciences, Швеция). Хроматографию проводили в линейном градиенте $40 \rightarrow 1500$ мМ NaCl, оптическую плотность раствора регистрировали при длине волны 280 нм. Степень чистоты белка определяли с помощью гель-электрофореза. Фракции, содержащие белок Nei, диализовали в буфере 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреитол, 250 мМ NaCl, 50% глицерин и хранили при -20° C.

ДНК-гликозилаза NEIL1 была выделена из линии клеток E. coli Rosetta II (DE3), трансформированных плазмидой pET-22b, несущей ген фермента. Культуру клеток E. coli Rosetta II (DE3), выращивали в среде LB (1 л), содержащей 50 мкг/мл ампицилина, при 37°С до оптической плотности среды 0,6–0,7 при длине волны 600 нм. После добавления изопропил-β-D-тиогалактопиранозида до 0,1 мМ культуру инкубировали в течение 16 ч при 20°С. Затем клетки осаждали центрифугированием (10 мин, 12000 об/мин) и готовили суспензию клеток в 30 мл буферного раствора 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,8, 40 мМ NaCl. Клетки лизировали при помощи френч-пресса (French Press Cell, Thermo Fisher Scientific, США). Все последующие процедуры проводили при 4°С. Лизат клеток центрифугировали (40 мин при 30 000 об/мин), супернатант, содержащий 100 мМ NaCl, наносили на колонку I (Q-Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences, Швеция) и промывали буферным раствором 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,8, 100 мМ NaCl. После этого фермент элюировали с колонки 100 мл буферного раствора содержащим, 0,5 M KCl. Собранную фракцию разбавляли в 2 раза и наносили на колонку II (HiTrap-Heparin[™], Amersham Biosciences, Швеция). Хроматографию проводили в линейном градиенте 200 → 1500 мM NaCl, оптическую плотность раствора регистрировали при длине волны 280 нм. Степень чистоты белка определяли с помощью гель-электрофореза. Фракции, содержащие белок NEIL1, диализовали в буфере 20 мМ НЕРЕЗ-NaOH, pH 7,5, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреитол, 250 мМ NaCl, 50% глицерин и хранили при -20°С.

АР-эндонуклеаза APE1 была выделена из линии клеток *E. coli* Rosetta II (DE3), трансформированных плазмидой pET-11a, несущей ген AP-эндонуклеазы человека. Культуру клеток *E. coli* Rosetta II (DE3) выращивали в среде LB (1 л), содержащей 50 мкг/мл ампициллина, при температуре 37° C до оптической плотности 0,6–0,7 при длине волны 600 нм. После этого температуру понижали до 20°C и индуцировали транскрипцию добавлением изопропил- β -*D*-тиогалактопиранозида до 0,2 мМ. После индукции культуру клеток инкубировали в течение 16 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием (10

мин, 12000 об/мин) и готовили суспензию клеток в 30 мл буферного раствора I (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,8), содержащего 40 мМ NaCl. Клетки лизировали при помощи френчпресса (French Press Cell, Thermo Fisher Scientific, CША). Все последующие процедуры проводили при 4°C. Лизат клеток центрифугировали (40 мин при 30 000 об/мин), супернатант наносили на колонку I (Q-Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences, Швеция) и промывали буферным раствором I (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,8), содержащим 40 мМ NaCl. Фракции, содержащие белок APE1, собирали и наносили на колонку II (HiTrap-HeparinTM, Amersham Biosciences, Швеция). Хроматографию проводили в буферном растворе I и линейном градиенте 40 \rightarrow 600 мМ NaCl, оптическую плотность раствора регистрировали при длине волны 280 нм. Степень чистоты белка APE1 определяли с помощью гель-электрофореза. Фракции, содержащие белок APE1, 1 мМ дитиотреитол, 250 мМ NaCl, 50% глицерин и хранили при -20° C.

Концентрацию ферментов измеряли по оптической плотности растворов при длине волны 280 нм в электронных спектрах поглощения и рассчитывали по закону Бугера-Ламберта-Бера, исходя из коэффициентов молярной экстинкции (таблица 5).

Фермент	Коэффициент молярной	
	экстинкции, М ⁻¹ ×см ⁻¹	
hOGG1	68420	
Nth	18888	
MutY	77328	
MBD4 ^{cat}	54493	
Fpg	32100	
Nei	32680	
NEIL1	32930	
APE1	56818	

Таблица 5. Коэффициенты молярной экстинкции ферментов при длине волны 280 нм [334]

Долю активного фермента в препаратах бифункциональных ДНК-гликозилаз определяли с помощью метода боргидридного восстановления основания Шиффа [120, 335-338], образующегося между 1'-атомом углерода поврежденного нуклеотида и каталитической группой в активном центре фермента, например аминогруппа лизина Lys у ферментов структурного семейства HhH-GPD и иминогруппа пролина Pro1 у ферментов

структурного семейства H2tH). Для этого реакционную смесь (10 мкл), содержащую 2 мкМ фермента и различные концентрации специфического ДНК-субстрата (0–5 мкМ) в буфере (25 мМ фосфат калия, pH 6,8, 100 мМ NaCl, 100 мМ NaBH₄) выдерживали в течение 1 ч при 25°С. После этого реакционную смесь разделяли в 12 % ПААГ. Гель окрашивали красителем «coomassie brilliant blue» (Merck, Германия). Для ДНК-гликозилаз человека OGG1 и NEIL1 доля активного белка составляла 65-80%, для бактериальных ДНК-гликозилаз Fpg, Nei и Nth доля активного белка составляла 80-90 %. Во всех экспериментах использовали концентрацию активного белка.

Введение метки ³² P по 5'-концу олигонуклеотидов проводили согласно [339]. Для этого 30 пмоль олигонуклеотида в 30 мкл буферного раствора 50 мМ Tris-HCl, pH 7,6, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит, 30 пмоль [γ-³²P]-АТР (уд. акт. 3,3 мкКи/пмоль) выдерживали 60 мин с 10–20 ед. акт. полинуклеотидкиназы фага Т4 при 37°С. Реакционную смесь осаждали 10-кратным объемом 2% LiClO₄ в ацетоне. Меченый олигонуклеотид выделяли электрофорезом В денатурирующем 20% ΠΑΑΓ, радиоактивную полосу выявляли радиоавтографией и вырезали из геля. Далее олигонуклеотид переносили электроэлюцией на бумажный фильтр DE-81 (Whatman, Великобритания), откуда смывали нагретым до 56°С раствором 3 М LiClO₄ и осаждали 2 %-ным раствором LiClO₄ в ацетоне. Осадок трижды промывали 200 мкл ацетона, высушивали в вакууме и растворяли в 100 мкл дважды дистиллированной воды. Концентрация полученного раствора меченого олигонуклеотида не превышала 2.5×10^{-7} М.

Для получения кинетических зависимостей степени расщепления субстрата от времени использовали следующую методику. К 10 мкл буферного раствора, содержащего 32 P-меченый субстрат и эквимолярное количество комплементарной цепи, добавляли 10 мкл 2,0–4,0 мкМ фермента в том же буферном растворе. После быстрого перемешивания реакционной смеси из нее отбирали аликвоты объемом 2 мкл, которые помещали в предварительно подготовленные пробирки, содержащие 3 мкл раствора 7 М мочевины, 0,1 % бромфенолового синего и 0,1 % ксиленцианола (и 100 мМ ЭДТА в случае APE1). Все эксперименты с участием белков были выполнены в буферном растворе 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 50 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреит, 7 % глицерин (и 5 мМ MgCl₂ в случае APE1).

Эксперименты, в которых продукты реакции подвергали щелочной обработке, были выполнены по описанной выше методике. В этом случае после отбора проб, их разделяли на две части. Одну из них обрабатывали 0,2 М NaOH при 37°C в течение 15 мин. Раствор нейтрализовали эквивалентным количеством соляной кислоты и наносили на ПААГ.

Для анализа накопления продуктов реакции в миллисекундном и секундном диапазонах времени *методом «прерывания реакции»* использовался микрообъемный прибор «quench-flow» RQF-3 (KinTek Corp., Austin, TX, CША). Для остановки реакции в качестве тушителя использовали раствор 7 М мочевины. После смешения с тушителем образцы собирали и осаждали путем добавления 10 объемов 2% раствора LiClO4 в ацетоне. Осадок дважды промывали 100 мл ацетона, сушили, растворяли в 3 мкл раствора 7 М мочевины, 0,1 % бромфенолового синего и 0,1 % ксиленцианола.

Электрофорез в ПААГ проводили при напряжении 50 В/см. Количество образующегося продукта определяли путем радиографии геля на рентгеновскую пленку Agfa CP-BU New (Agfa-Geveart, Бельгия) в течение 10–20 ч при температуре -10°С или сканирования радиоавтографа на приборе Molecular Imager FX phosphorimager (Bio-Rad, CIIIA).

Степень расщепления субстрата определяли, обрабатывая радиоавтограф, предварительно переведенный в цифровую форму, в программном пакете Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, США). Степень накопления продуктов рассчитывали как отношение площадей пиков продуктов к сумме площадей пиков продуктов и пика исходного олигонуклеотида. Ошибка определения, как правило, не превышала 20%.

Наблюдаемую константу скорости накопления продуктов реакции k_{cat} рассчитывали путем обработки кинетических кривых по уравнению (1).

 $[\Pi \text{родукт}] = \mathbf{A} \times [1 - \exp(-k_{\text{cat}} \times \mathbf{t})], \qquad (1)$

где А - амплитуда, k_{cat} – наблюдаемая константа скорости накопления продукта.

Флуоресцентные кинетические кривые были зарегистрированы на спектрофотометрах остановленной струи SX.18MV и SX20 (Applied Photophysics, Великобритания). В качестве источника возбуждения использовалась катодная ксеноновая лампа. Мертвое время приборов составляло 1,38 мс и 1,0 мс соответственно для SX.18MV и SX20. Каждую кинетическую кривую получали, усредняя, как минимум, три экспериментальные кривые.

В таблице 6 приведены длины волн возбуждения и испускания флуоресценции всех использованных в работе флуорофоров, а также длины волн в максимуме спектра оптического поглощения тушителей. Поскольку в качестве детектора интегральной интенсивности флуоресценции использовался ФЭУ с установленным светофильтром (Schott filter и Corion filter). Светофильтр подбирали таким образом, чтобы он имел

поглощение при длине волны возбуждающего света и пропускание в области максимума испускания флуоресценции данного флуорофора (таблица 6).

Необходимо отметить, что собственная флуоресценция белков обусловлена присутствием остатков аминокислот триптофана и тирозина. При возбуждении при длине волны 290 нм основной вклад (> 90%) в флуоресценцию белка обеспечивают остатки Trp.

Длина волны максимумов в спектрах возбуждения флуоресценции остатков Trp и аРи отличается на 20 нм, что приводит к незначительному возбуждению остатков Trp при облучении при длине волны возбуждения аРи (310 нм) и вкладу флуоресценции Trp в интегральный сигнал, регистрируемый ФЭУ. Для того чтобы уменьшить вклад флуоресценции Trp в случае регистрации флуоресценции остатков аРи перед ФЭУ устанавливали светофильтр LG-370, пропускающий свет с длинной волны более 370 нм и отрезающий испускание остатков Trp с максимумом в области 345 нм.

Таблица 6. Длины волн возбуждения и испускания флуоресценции для флуорофоров, использованных в работе*

Флуорофор/тушитель	Длина волны	Длина волны в	Светофильтр
	возбуждения, нм	максимуме	
		испускания, нм	
Trp	290	345	WG-320
aPu	310	360	LG-370
C ^{py}	344	450	LG-370
tC ^O	360	460	GG-395
ЗНС	375	420 и 530	GG-395
FAM	494	525	OG-515
Cy3	550	570	OG-570
Cy5	645	670	RG-645
BHQ1	534		
Dab	453		

* Для тушителей флуоресценции BHQ1 и Dab приведена длина волны в максимуме спектра оптического поглощения.

При регистрации собственной флуоресценции белков увеличение концентрации субстрата приводило к эффекту внутреннего поглощения, связанному с поглощением света азотистыми основаниями олигонуклеотидов при длине волны возбуждающего света

(290 нм). Этот эффект сопровождался понижением интенсивности флуоресценции при увеличении концентрации олигонуклеотидов в растворе. При обработке полученных данных проводили коррекцию эффекта внутреннего поглощения по уравнению (2):

$$\mathbf{F} = \mathbf{F}_{\mathsf{2KCII}} \times 10^{0.5 \times \mathrm{A}} \,, \tag{2}$$

где F – интенсивность флуоресценции с учетом эффекта внутреннего поглощения, F_{эксп} – экспериментальное значение флуоресценции, A – оптическая плотность субстрата/лиганда при длине волны 290 нм.

При облучении белков ультрафиолетовым светом происходит деградация остатков триптофана, которая сопровождается уменьшением интенсивности флуоресценции (бличинг). Для коррекции кинетических кривых использовали уравнение (3):

$$\mathbf{F} = ((\mathbf{F}_{\mathsf{_{3KC\Pi}}} - \mathbf{F}_0) \times \mathbf{e}^{(\mathsf{k}_{\mathsf{bleach}} \times \mathbf{t})}) + \mathbf{F}_0 , \qquad (3)$$

где F – интенсивность флуоресценции с учетом бличинга, F_{эксп} – экспериментальное значение флуоресценции, F₀ – значение фоновой флуоресценции, k_{bleach} – константа бличинга.

Количественную обработку результатов экспериментов проводили путем оптимизации параметров, входящих в кинетические схемы. Для этого использовали метод нелинейной регрессии, включающий численное интегрирование дифференциальных уравнений, описывающих кинетику процесса (Origin 7.0 (OriginLab, CША) и DynaFit (BioKin, CША)) [340].

Для расчета наблюдаемых констант скорости, характеризующих изменение интенсивности флуоресценции, использовали уравнение (4):

$$F_c = F_b + \sum_{i=0}^{N} A_i \times exp(-k_i \times t)$$
(4)

где *i* – номер стадии, A_i – амплитуда изменения сигнала, k_i – наблюдаемая константа скорости.

Для расчета констант скорости конформационных переходов получали набор кинетических кривых для разных концентраций субстрата при разных температурах. Регистрацию проводили в условиях, близких к одному обороту фермента, то есть при концентрациях фермента и субстрата одного порядка. При регистрации флуоресценции

Тгр концентрация ферментов, как правило, была равна 1,0–2,0 мкМ, а концентрация ДНК варьировалась в диапазоне 0,5–4,0 мкМ. При регистрации флуоресценции аналогов оснований и FRET-красителей концентрация ДНК-дуплексов была равна 1,0 мкМ, а концентрация ферментов варьировалась в диапазоне 0,5–4,0 мкМ.

Для определения минимальной кинетической схемы, описывающей взаимодействие фермента с субстратом, и расчета констант скорости всех элементарных стадий данной схемы использовали программу DynaFit (BioKin, CША) [340]. Количественную обработку результатов экспериментов проводили путем оптимизации значений параметров, входящих в кинетические схемы. Эффективность и точность определения параметров для исследуемого процесса зависела от числа параметров граничных условий. Кинетические кривые разбивали на несколько временных диапазонов таким образом, что каждый следующий диапазон полностью включал предыдущий, например от 2 мс до 1, 10, 100 с и так далее. Это давало возможность постепенно усложнять и оптимизировать модель взаимодействия фермента с субстратом. Начальный диапазон кривых, как правило, отражал стадии связывания и давал возможность определить их константы скорости. При обработке следующего временного диапазона ранее использованный механизм усложняли, например, к нему добавляли еще одну равновесную или неравновесную стадию, при этом фиксировали константы, определенные для начальных стадий. После расчета констант скорости добавленных стадий осуществляли общую коррекцию значений констант скорости путем одновременной оптимизации всех параметров системы. Такой пошаговый подход позволил дискриминировать различные схемы фермент-субстратного взаимодействия и определить константы скорости и константы равновесия элементарных стадий, входящих в эти схемы.

При проведении термодинамического анализа для каждой температуры были определены значения индивидуальных констант скорости прямых и обратных реакций равновесных и неравновесных стадий (k_i и k_{-i} , где i – номер стадии), и получены константы равновесия отдельных стадий многостадийного процесса образования фермент-субстратных промежуточных комплексов K_i (k_i/k_{-i}), сопровождающихся конформационными перестройками в ферменте и ДНК.

Для каждой *i*-ой равновесной стадии были получены зависимости между термодинамической константой равновесия (*K_i*) и температурой. Стандартные термодинамические параметры *i*-й равновесной стадии определяли с помощью уравнения Вант–Гоффа (5) [341, 342]:

59

 $\ln(K_i) = -\Delta G_i^{\circ} / RT = -\Delta H_i^{\circ} / RT + \Delta S_i^{\circ} / R , \qquad (5)$

где ΔG_i° – стандартная свободная энергия Гиббса, ΔH_i° – стандартная энтальпия и ΔS_i° – стандартная энтропия.

Из зависимости величины константы скорости необратимой химической стадии k_i от температуры, описываемой с помощью уравнения Эйринга (6) теории переходного состояния [341], рассчитаны значения стандартной энтальпии активации ($\Delta H^{\circ,\ddagger}$) и стандартной энтропии активации ($\Delta S^{\circ,\ddagger}$):

$$\ln(k_{\rm i}/{\rm T}) = \ln(k_{\rm B}/h) + \Delta S^{\circ,\ddagger}/{\rm R} - \Delta H^{\circ,\ddagger}/{\rm R}{\rm T} , \qquad (6)$$

где *k*_B и *h* – постоянные Больцмана и Планка соответственно, *R* – газовая постоянная, *T* – абсолютная температура в градусах Кельвина, *k*_i – константа скорости химической стадии.

Масс-спектрометрический анализ реакционных смесей проводили с помощью микропоточной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором ESI/MS LC/MSD Trap XCT (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Для этого готовили реакционную смесь (10 мкл), содержащую 2 мкМ фермента и 2-4 мкМ специфического ДНК-субстрата в буфере 25 мМ фосфат калия, pH 6,8, 100 мМ NaCl. После начала реакции через определенное время в реакционную смесь добавляли концентрированный раствор NaBH₄ до конечной концентрации 100 мМ и выдерживали в течение 1 ч при 25°С для восстановления основания Шиффа [120, 335-338], образующегося между 1'-атомом углерода поврежденного нуклеотида и каталитической группой в активном центре фермента (Lys249 у hOGG1 и Pro1 у Fpg). Затем образцы (3 мкл) реакционных смесей наносили на колонку Zorbax 300SB-C18 0,3×150 мм (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) и проводили хроматографию в линейном градиенте ацетонитрила от 2% до 50%, содержащего 0,05% муравьиной кислоты. Хроматографию проводили в течение 20 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Массовый анализ проводили в режиме сканирования в течение 1 с в массовом диапазоне m/z 350-2200. Масс-спектрометр работал в режиме регистрации положительных ионов. Азот использовался в качестве осушающего газа (4 л/мин), гелий использовался в качестве распыляющего газа (10,0 psi), температура сушки составляла 300°С. Молекулярные массы интермедиатов рассчитывали, используя наборы экспериментальных m/z величин, определенные для каждого анализируемого образца.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетические и термодинамические особенности механизмов узнавания и удаления повреждений ДНК про- и эукариотическими ДНК-гликозилазами и АРэндонуклеазами

3.1 Принципы исследования конформационной динамики в процессах белковонуклеиновых взаимодействий, особенности и ограничения методов

Протекание любого ферментативного процесса происходит при образовании фермент-субстратного комплекса, в котором формируются специфические контакты между взаимодействующими молекулами, необходимые для протекания каталитической реакции. Согласно модели индуцированного соответствия Кошланда [343, 344], для образования специфических контактов происходят последовательные конформационные преобразования фермента и субстрата, которые приводят к формированию каталитически активного комплекса. Таким образом, взаимодействие фермента с субстратом можно схематически разделить на ряд последовательных превращений. При столкновении молекул фермента и субстрата происходит образование первичного комплекса, затем путем взаимной конформационной подстройки фермента и субстрата образуется каталитически активный комплекс, в котором осуществляется каталитическая стадия. После этого происходит диссоциация комплекса фермента с образовавшимся продуктом реакции и фермент может участвовать в следующем ферментативном цикле.

В настоящее время понимание механизмов ферментативных реакций в основном базируется на статических структурных данных, получаемых из рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии, данных стационарной кинетики, позволяющих сравнить специфичность фермента к субстратам и скорость их превращения и анализа строения интермедиатов и продуктов превращения субстратов.

Несомненно, структурные методы вносят большой вклад в понимание природы ферментативного катализа, но они могут дать информацию лишь об определенном, фиксированном состоянии фермента и субстрата в определенной точке ферментативного процесса, например в каталитическом комплексе. Для каталитически активных ферментов удается получить только кристалл свободного фермента и кристалл комплекса фермента с продуктом реакции. Направленная замена каталитически активных аминокислотных остатков фермента позволяет значительно углубить исследование и закристаллизовать каталитически активный комплекс, то есть момент реакции, когда структуры фермента и субстрата полностью подготовлены для каталитического акта, однако катализ не может свершиться, поскольку отсутствует функционально важный аминокислотный остаток. Существует еще ряд способов получить кристаллы «промежуточных» комплексов фермента и субстрата, например, внести модификацию в субстрат, которая не повлияет на связывание с ферментом, но предотвратит протекание каталитической реакции. В последнее время также большое развитие получил «бескристальный» метод определения структуры – ядерный магнитный резонанс на атомах ¹⁵N, ¹³C и ²H. Но использование ЯМР, как правило, ограничивается небольшими молекулами (до 20 кДа) в силу сложной интерпретации данных.

Существенным недостатком статических структурных данных является ограниченное число возможных состояний фермент-субстратного комплекса, которые удается зарегистрировать этими методами. Кроме того, рентгеноструктурные данные не всегда подтверждаются в равновесных условиях в растворе, особенно когда для получения кристаллов комплексов используют ковалентные сшивки между компонентами комплекса. Но более того, зная совокупность процессов, которые должны произойти для образования каталитического комплекса, остается непонятной последовательность этих событий, какова природа взаимодействий на начальных стадиях узнавания субстрата, образование каких контактов приводит к дискриминации субстрата и «не субстрата», какие взаимодействия обеспечивают специфичность фермента.

Для ответов на эти вопросы необходимо понимание конформационной динамики в процессе взаимодействия. Действительно, существенный вклад в понимание механизмов специфического фермент-субстратного взаимодействия могут внести исследования предстационарной кинетики и термодинамики ферментативного процесса с регистрацией конформационных превращений взаимодействующих молекул. Таким образом, анализ конформационной динамики является связующим звеном всех подходов к изучению механизма действия ферментов.

Анализ конформационной подвижности структуры фермента и субстрата при их взаимодействии представляет собой трудную и нетривиальную задачу, требующую применения широкого спектра методов исследования и использования различных подходов.

Флуоресцентная спектроскопия широко применяется для изучения ферментсубстратных взаимодействий [345, 346]. Конформационные превращения белков регистрируются по изменению их собственной флуоресценции, возникающей за счет остатков аминокислот триптофана и тирозина [347]. Если в белке содержание этих аминокислот примерно одинаково, то флуоресценция белка обусловлена, в основном,

остатками триптофана. Тирозин дает вклад в спектр испускания только тогда, когда он находится в белке в большом избытке по отношению к триптофану. Флуоресценция триптофана очень чувствительна к полярности окружающей среды, а также тушится различными молекулами, включая ДНК. Максимумы испускания флуоресценции белков зависят от локального окружения остатков триптофана в молекуле полипептида. сдвиг в коротковолновую Например, область интерпретируют как результат экранирования триптофановых остатков от водной фазы. В то же время процесс денатурации приводит к длинноволновому сдвигу в спектре испускания флуоресценции и, приблизительно, к одной и той же величине максимума в спектре испускания всех белков. Положение максимума в спектре флуоресценции изменяется, если остатки триптофана вовлечены во взаимодействие, что позволяет следить за процессом связывания белком ДНК [199, 348-350]. Однако необходимо иметь в виду, что большинство белков содержит несколько остатков Trp, находящихся в различном окружении, поэтому спектральные свойства каждого из них могут различаться. Таким образом, данные, полученные при регистрации изменений интенсивности остатков Trp, в общем случае, позволяют сделать заключение лишь об общей конформационной динамике фермента.

В нуклеиновых кислотах конформационные переходы можно регистрировать с помощью флуоресцентных аналогов гетероциклических оснований [351-358]. Флуоресценция большинства из этих аналогов тушится соседними основаниями, причем эффективность тушения зависит от природы соседних оснований и конформации ДНК. Для исследования фермент-субстратных взаимодействий наиболее широкое применение нашел 2-аминопурин (aPu) [120, 199, 337, 349, 359-361]. 2-Аминопурин образует стабильную пару с тимином и менее стабильную – с цитозином [362-364]. По сравнению со свободным нуклеотидом интенсивность флуоресценции aPu в составе ДНК снижается из-за стэкинга с соседними основаниями [365, 366]. Помимо aPu достаточно широко используются аналоги цитозина, например пирролоцитозин (СРу) [367-370] и 1,3-диаза-2оксофеноксазин (tC^O) [371-377]. Флуоресценция пирролоцитозина тушится в составе двуцепочечной ДНК по сравнению с одноцепочечной структурой [378, 379]. Таким образом, использование субстратов, содержащих флуоресцирующие аналоги азотистых оснований, позволяет зарегистрировать конформационные изменения ДНК-субстратов в процессе образования фермент-субстратного комплекса. Неотъемлемой частью этого этапа является выбор наиболее чувствительной модельной системы ДНК-субстратов, в которой флуоресцентная группа может быть расположена с 5'-, 3'-стороны от повреждения либо в комплементарной цепи напротив повреждения. На основании экспериментального сравнительно анализа таких модельных субстратов для регистрации протекания ферментативного процесса выбирается вариант, обладающий максимальной чувствительностью к конформационным изменениям в ДНК.

Еще конформационных ДНК, одним способом изучения переходов В использованным в работе, является метод резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET), позволяющий регистрировать изменение расстояния между остатками донора и акцептора флуоресценции, расположенными в разных частях молекулы. При этом пары флуоресцентных красителей могут быть расположены как на разных концах, так и с одной стороны ДНК-субстратов, что позволяет эффективно зарегистрировать процессы, приводящие к изменению расстояния между красителями. При этом первый вариант позволяет эффективно регистрировать изгибание ДНК при образовании комплекса с ферментом, в то время как второй вариант расположения красителей более чувствителен к каталитической стадии и последующей диссоциации комплекса фермент-продукт, приводящей к удалению донора и акцептора флуоресценции [380-384].

Поскольку стадии узнавания ферментом субстрата протекают на малых временах, то их изучение требует специальных методов. При изучении кинетики ферментативных процессов наибольшее распространение нашли струевые методы, позволяющие регистрировать быстропротекающие стадии. Комбинация метода остановленной струи с флуориметрией позволяет получать подробную информацию о механизмах белковонуклеинового узнавания. При этом можно не только проводить анализ кинетических особенностей образования специфических белково-нуклеиновых комплексов и определять кинетические схемы, описывающие процессы взаимодействия. Изучение поведения самих сигналов флуоресценции во времени позволяет делать выводы о природе каждого конформационного перехода на пути ферментативной реакции, начиная от стадий узнавания и связывания субстрата, заканчивая образованием продуктов реакции [385, 386].

Для исследования различных стадий ферментативного процесса развит и использован подход постадийного усложнения субстрата, разработанный ранее в работах работах д.х.н. Г.А. Невинского [387-389]. В качестве специфического субстрата используется дуплекс, содержащий в одной из цепей поврежденный нуклеотид, обеспечивающий формирование всех возможных контактов и специфических связей между ферментом и поврежденной ДНК. В случае ДНК-гликозилаз специфическими субстратами служат олигонуклеотиды, несущие поврежденное основание, например 8-оксогуанин, 5,6-дигидроурацил, гипоксантин, 1,N6-этеноаденин, урацил и др. Для АР-

эндонуклеаз таким субстратами являются дуплексы, несущие АР-сайт или его аналоги, например остаток 2-оксиметил-3-окси-тетрагидрофурана (F-сайт). Нужно отметить, что для ДНК-гликозилаз дуплексы, содержащие АР-сайт, который является промежуточным продуктом реакции, используются как упрощенная модель взаимодействия с субстратом, в которой отсутствуют стадии специфического узнавания поврежденного основания. Однако, такие дуплексы используются для понимания кинетических особенностей протекания реакции β-элиминирования, катализируемой некоторыми ДНК-гликозилазами. В то же время использование нереакционноспособного аналога АР-сайта, содержащего 2'-дезоксирибозы остаток 2-оксиметил-3-окси-тетрагидрофурана, позволяет вместо охарактеризовать только стадии связывания ДНК-гликозилаз с поврежденной ДНК. Дуплекс, несущий F-сайт, имеет все особенности АР-сайта, но не способен расщепляться под действием ДНК-гликозилаз, поскольку не содержит в 1'-положении гидроксильную В неспецифического субстрата группу. качестве используются дуплексы олигонуклеотидов, не содержащих модифицированных нуклеозидов.

Переход от неспецифического дуплекса ДНК (наиболее простые неспецифические взаимодействия) к дуплексу, содержащему F-сайт (специфическое связывание, аналог продукта ДНК-гликозилаз, субстрат для АР-эндонуклеаз) или АР-сайт для (специфическое связывание, реакция β-элиминирования, катализируемая некоторыми ДНК-гликозилазами или гидролиз фосфодиэфирной связи, катализируемый АРэндонуклеазами), а затем специфическому ДНК-субстрату, содержащему поврежденное основание (полный ферментативный цикл реакций, катализируемый ДНК-гликозилазами) приводит к дополнительным взаимодействиям между реагирующими молекулами и, как следствие этого, к дополнительным конформационным изменениям как в молекуле фермента, так И В молекуле субстрата. Этот подход позволяет соотнести конформационные изменения в биополимерах с взаимодействиями конкретных остатков в процессе образования специфического фермент-субстратного комплекса.

Кроме того, использование мутантных форм ферментов, содержащих замены аминокислотных остатков, входящих в активный центр фермента, позволяет определить функциональную роль этих остатков на различных стадиях превращения ферментсубстратного комплекса.

Рассмотрим данные, полученные для ряда ДНК-гликозилаз и АР-эндонуклеаз человека и *E. coli*, относящихся к различным структурным семействам.

3.2. Конформационные изменения ДНК-гликозилаз структурного семейства НhH-GPD и ДНК в процессе их взаимодействия

3.2.1. 8-Оксогуанин-ДНК-гликозилаза человека hOGG1

8-Оксогуанин-ДНК-гликозилаза человека hOGG1, как и эндонуклеаза III, принадлежит структурному семейству HhH [121]. Фермент обладает очень высокой специфичностью по отношению к 8-оксогуанину и эффективно отличает его от гуанина, несмотря на то, что 8-оксогуанин имеет лишь два дополнительных атома [109, 390]. В случае окисленного основания hOGG1 катализирует реакцию разрыва N-гликозидной связи и реакцию β-элиминирования (рис. 6) [112, 113, 115, 116]. В роли каталитических аминокислот выступают Lys249 и Asp268 [391, 392]. Замещение Lys249 на Gln приводит к полному исчезновению у hOGG1 N-гликозилазной и AP-лиазной активностей. Тем не менее, мутант K249Q сохраняет способность распознавать охоGua- и AP-сайты и прочно с ними связываться [391, 393, 394].



Рис. 6. Химические стадии процесса катализа hOGG1 (стадия 1: гидролиз N-гликозидной связи и удаление поврежденного основания с образованием AP-сайта; стадия 2: β-элиминирование 3'- фосфатной группы).

Согласно данным о структуре свободного фермента и его комплексов с ДНК, в фермент-субстратном комплексе рибозофосфатный остов ДНК изогнут примерно на 70° в месте поврежденного нуклеотида (рис. 7) [121, 395-398]. Поврежденный нуклеотид вывернут из спирали ДНК и основание охоGua располагается в активном центре фермента. При этом аминокислоты Arg154 и Arg204 встраиваются в цепь ДНК и образуют водородные связи со стоящим напротив охоGua основанием Суt. Дополнительно аминокислоты Asn149 и Tyr203 встраиваются в цепь на место вывернутого основания охоGua [121]. В каталитически активном комплексе ароматическое кольцо Tyr203 расположено в пространстве между основанием Суt, находящимся напротив охоGua в комплементарной цепи, и основанием с его 5'-стороны. Это приводит к нарушению

стэкинга между данными основаниями и стабилизирует изогнутое состояние ДНК. Структурные данные показывают, что ДНК связывается в канале фермента, имеющем единственный положительно заряженный остаток His270, который образует водородную связь с 5'-фосфатной группой поврежденного нуклеотида [391].

Неспецифическое связывание hOGG1 с неповрежденной ДНК также приводит к изгибанию рибозофосфатного остова и выворачиванию неповрежденного нуклеотида. Согласно структуре неспецифического комплекса (PDB ID 1YQK), неповрежденный нуклеотид частично выворачивается из дуплекса в экзо-сайт фермента [396]. В данном случае остаток His270 и основание ДНК образуют π - π -контакт между плоскостями ароматических остатков. Однако позже была получена структура неспецифического комплекса фермента с ДНК (PDB ID 3IH7), в которой неповрежденный нуклеотид находится в активном центре фермента, а остаток His270, как и в случае с поврежденным основанием, образует водородную связь с 5'-фосфатной группой [398]. Несмотря на формирование такого комплекса, hOGG1 не способен катализировать реакцию гидролиза N-гликозидной связи, приводящей к удалению неповрежденного основания, что свидетельствует о высокой селективности фермента.



Рис. 7. Схематическое изображение пространственной структуры комплекса hOGG1 с ДНК. (*a*) Структура комплекса фермента hOGG1 с дуплексом ДНК, содержащим охоG (PDB ID 1EBM) [121]. (*б*) Функционально важные аминокислотные остатки, участвующие в образовании специфических контактов между ферментом и ДНК.

Ранее в работах [117, 120] методом «остановленной струи» с регистрацией флуоресценции остатков Trp белка и остатков 2-аминопурина, встроенных в ДНК, было показано, что взаимодействие hOGG1 с ДНК, содержащей охоG, сопровождается взаимными конформационными изменениями фермента и ДНК. Было показано, что субстратная специфичность hOGG1 достигается за счет многоступенчатого механизма узнавания специфического сайта, каждая стадия которого сопровождается изменением конформации и в молекуле фермента, и в ДНК-субстратах (схема 1). Было показано, что образование первичного комплекса приводит к «разрыхлению» двойной спирали ДНК-дуплекса и быстрому выворачиванию поврежденного основания. Вторая и третья стадии процесса связывания субстрата отражают встраивание аминокислотных остатков Asn149, Туг203, Arg154 и Arg204 в полость дуплекса. На третьей стадии формируется каталитически активный комплекс, в котором последовательно происходят химические стадии ферментативного процесса. Завершает ферментативный цикл равновесная стадия диссоциации комплекса фермент-продукт.

Схема 1

$$E + OG \xrightarrow{k_1} (E \circ OG)_1 \xrightarrow{k_2} (E \circ OG)_2 \xrightarrow{k_3} (E \circ OG)_3 \xrightarrow{k_4} (E \circ AP) \xrightarrow{k_5} (E \circ P \xrightarrow{K_p} E + P)$$

где E – hOGG1; OG – охоG-субстрат; $(E \cdot OG)_n$ – различные фермент-субстратные комплексы, образующиеся в ходе узнавания 8-оксогуанина; $E \cdot AP$ – комплекс E с AP-сайтом, образующимся в результате N-гликозилазной реакции; $E \cdot P$ – комплекс E с продуктом реакции P, образующимся в результате AP-лиазной реакции; k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакций отдельных стадий.

3.2.1.1. Конформационные изменения мутантных форм hOGG1 и ДНК

Для выяснения роли некоторых аминокислотных остатков фермента и более точного определения молекулярной природы процессов, происходящих на стадиях связывания ДНК, узнавания повреждения и каталитической реакции использовали мутантные формы фермента. Для этого был выбран ряд аминокислотных остатков (Phe45, Arg154, Tyr203, Arg204, Lys249, Asp268, His270 и Phe319), которые согласно рентгеноструктурным данным участвуют в образовании специфических связей как с поврежденной, так и с неповрежденной ДНК, и могут выполнять ключевую роль в процессах узнавания повреждения [121, 396-398].

Так, в активном центре фермента ароматическое кольцо остатка Phe319 образует стэкинг с плоскостью охоGua, однако в комплексе с неповрежденным дуплексом, когда основание Gua находится в экзо-сайте, плоскости Phe319 и Gua перпендикулярны (рис. 8*a* и *б*). Ранее было показано [399], что замена Phe319Ala приводит к полной инактивации hOGG1, что свидетельствует о важной роли Phe319 в процессе образования каталитически активного комплекса.

Другая аминокислота активного центра Phe45 находится вблизи вывернутого основания охоGua. Расстояние между ароматическим кольцом Phe45 и плоскостью охоGua почти в 2 раза меньше, чем в комплексе с неповрежденным основанием Gua, расположенным в экзо-сайте [121, 396].

Остаток His270 взаимодействует с 5'-фосфатной группой вывернутого в активный центр основания охоGua (рис. 8*a*). При этом His270 образует стэкинг с основанием, расположенным в экзо-сайте (рис. 8*б*). Структурные исследования подтверждают [397], что мутация His270Ala приводит к уменьшению степени связывания ДНК за счет дестабилизации фермент-субстратного комплекса. Показано [399], что мутация His270Ala полностью инактивирует фермент по отношению к охоG-субстрату. Однако активность по отношению к AP-субстрату остается сравнимой с ферментом дикого типа.

Предполагается, что удерживание вывернутого азотистого основания охоGua в активном центре происходит за счет образования водородной связи между карбонильной группой Gly42 и атомом водорода при N7 основания [121, 396], которого нет в случае Gua (рис. 8*a*). Это взаимодействие обеспечивает дискриминацию немодифицированного и модифицированного основания ферментом hOGG1.

Туг-203 является одним из четырех аминокислотных остатков hOGG1 (Туг203, Asn149, Arg154 и Arg204), который встраивается в ДНК после выворачивания поврежденного основания [121]. В каталитически активном комплексе ароматическое кольцо Туг203 встроено между двумя азотистыми основаниями в комплементарной цепи, что приводит к нарушению стэкинга и изгибу цепи ДНК (рис. 86). Аминокислотные остатки Arg154 и Arg204 образуют водородные связи с основанием Суt, расположенным напротив охоGua.

Известно, что Lys249 и Asp268 являются абсолютно консервативными аминокислотными остатками у бифункциональных ДНК-гликозилаз структурного семейства HhH и выполняют каталитические функции [115, 393]. Было показано, что замена этих остатков инактивирует N-гликозилазную и AP-лиазную активность фермента [391, 393, 394].

Для определения и уточнения функциональной роли аминокислотных остатков Phe45, Arg154, Tyr203, Arg204, Lys249, Asp268, His270 и Phe319 были использованы девять мутантных форм, содержащих замены этих аминокислотных остатков Phe45Trp, Arg154Ala, Tyr203Ala, Tyr203Trp, Arg204Ala, Lys249Gln, Asp268Ala, His270Trp и Phe319Trp [400, 401].



Рис. 8. Специфические контакты, обеспечивающие узнавание поврежденного основания в активном центре hOGG1. (*a*) Комплекс hOGG1 с ДНК-дуплексом, содержащим охоGua, основание охоGua расположено в активном центре, показано расположение аминокислотных остатков Gly42, Phe45, His270, Phe319, формирующих карман активного центра, и каталитических остатков Asp-268 и Gln-249 (Lys-249) (PDB ID: 1YQR, [396]). (*б*) Комплекс hOGG1 с неповрежденным ДНК-дуплексом, основание Gua расположено в экзо-сайте, показано расположение аминокислотных остатков Phe45, His270, Phe319 и каталитических остатков Asp-268 и Lys-249 (PDB ID: 1YQR, [396]). (*в*) Комплекс hOGG1 с ДНК-дуплексом, содержащим охоGua, показаны аминокислотные остатки Asn149, Arg154, Tyr203 и Arg204 (PDB ID: 1EBM, [121]).

Каталитическая активность мутантных форм фермента hOGG1

Относительная каталитическая активность мутантных форм фермента при взаимодействии с **охоG/C**₁₂-субстратом была определена прямым анализом накопления продуктов реакции методом гель-электрофореза (рис. 9*a*). Замена каталитических аминокислотных остатков Lys249 и Asp268 приводит к полной потере N-гликозилазной и AP-лиазной активности. Кроме того, замены аминокислотных остатков, встраивающихся в ДНК-дуплекс (Tyr203Ala, Arg154Ala и Arg204Ala), а также His270Trp приводят к значительному снижению каталитической активности. В то же время замены Tyr203 на остаток Trp, а также ароматических аминокислотных остатков Phe45 и Phe319, формирующих карман активного центра, значительно меньше влияют на ферментативную активность. Для этих мутантных форм (Tyr203Trp, Phe45Trp и Phe319Trp) были получены кинетические зависимости накопления продуктов N-гликозилазной реакции и реакции β-

элиминирования (рис. 96 и в). Для выяснения механизмов влияния перечисленных выше мутаций на аффинность к ДНКсубстратам и скорость каталитической стадии была исследована конформационная динамика мутантных форм hOGG1 и ДНК-субстратов в ходе их взаимодействия.



Рис. 9. Относительная активность hOGG1 WT и мутантных форм фермента. Анализ продуктов Nгликозилазной реакции и реакции β -элиминирования через 15 мин при взаимодействии hOGG1 WT и мутантных форм фермента с охоG/C₁₂-субстратом (*a*). Зависимость концентрации продуктов N-гликозилазной реакции (*б*) и реакции β -элиминирования (*в*) от времени при взаимодействии hOGG1 WT и мутантных форм фермента с **охоG/C₁₂-**субстратом. Концентрации фермента и ДНКсубстрата составляли 2,0 мкМ и 1,0 мкМ соответственно.

Взаимодействие с неповрежденной ДНК

Изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp в процессе связывания фермента hOGG1 дикого типа и мутантных форм с неповрежденным ДНК-дуплексом G/C₁₂ даже в случаях введения новых остатков триптофана были слишком слабыми для их

корректного количественного анализа (рис. 10*a*). Это свидетельствует о том, что молекула фермента не претерпевает значительных конформационных перегруппировок при образовании первичного неспецифического комплекса с G/C_{12} . В то же время, значительный рост интенсивности флуоресценции aPu, зарегистрированный при использовании G^{aPu}/C_{12} дуплекса, однозначно указывает на нарушение Уотсон-Криковских связей и/или стэкинга при образовании неспецифического комплекса фермент/ДНК (рис. 10*b*). Кроме того, согласно ранее полученным данным [120], в этот момент времени может происходить частичное выворачивание основания Gua из двойной спирали и встраивание в экзо-сайт фермента.



Рис. 10. Конформационные изменения фермента и ДНК при образовании первичного неспецифического комплекса. Изменения интенсивности флуоресценции Trp (*a*) и aPu (δ) в процессе взаимодействия hOGG1 дикого типа и мутантных форм с неповрежденными ДНК дуплексами G/C₁₂ и G^{aPu}/C₁₂. Концентрации hOGG1 и ДНК-лигандов составляли 2,0 мкМ и 1,0 мкМ соответственно.

Кинетика изменения интенсивности флуоресценции aPu была описана с использованием уравнения (4), где i = 2. Константы скорости первой и второй фаз изменения интенсивности флуоресценции aPu были определены для hOGG1 WT и всех мутантных форм (таблица 7). Разницу в величине интенсивности флуоресценции aPu для hOGG1 WT и мутантных форм можно объяснить различием способности связывать неповрежденную ДНК, а также разной степенью нарушения структуры двойной спирали в комплексе с ферментом.
Таблица 7. Наблюдаемые константы скорости, характеризующие конформационные изменения G^{aPu}/C₁₂-лиганда в процессе его взаимодействия с ферментом дикого типа и мутантными формами hOGG1.

Фермент	$k_1^{\rm obs}, {\rm s}^{-1}$	$k_2^{\rm obs}, {\rm s}^{-1}$
WT	436 ± 3	26.6 ± 0.7
H270W	630 ± 25	25.5 ± 1.4
Y203W	436 ± 5	18.0 ± 0.5
Y203A	-	-
K249Q	142 ± 2	38.9 ± 0.4
F45W	320 ± 8	17.2 ± 0.1
F319W	246 ± 9	3.7 ± 0.1

Взаимодействие с ДНК, содержащей АР-сайт

При взаимодействии с **AP**/**C**₁₂-субстратом интенсивность флуоресценции Trp мутантных форм hOGG1 медленно уменьшалась в течение 10 с (рис. 11*a*). Поскольку hOGG1 катализирует реакцию β -элиминирования (AP-лиазная активность) с очень низкой эффективностью, то такое уменьшение флуоресценции Trp должно отражать только этап связывания ДНК. Наблюдаемые константы скорости изменения интенсивности Trp флуоресценции были получены с использованием уравнения (4), где *i* = 1 (таблица 8). Как видно из таблицы 8 значения наблюдаемой константы скорости примерно одинаковы для hOGG1 WT и всех мутантов, за исключением hOGG1 His270Trp (спад Trp флуоресценции отсутствует) и hOGG1 Lys249Gln (константа скорости в 1,7 раза меньше, чем у WT).



Рис. 11. Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения фермента (*a*) и ДНК-субстрата (*б*) в процессе взаимодействия hOGG1 дикого типа и мутантных форм с ДНК дуплексами AP/C_{12} и AP^{aPu}/C_{12} , содержащими AP-сайт. Концентрации hOGG1 и ДНК-субстратов составляли 2,0 мкМ и 1,0 мкМ соответственно.

Фермент	Флуоресценция Trp,	Флуоресценция aPu,	Флуоресценция aPu,
-	$k^{\text{obs}}, \mathrm{s}^{-1}$	$k_1^{\text{obs}}, \mathrm{s}^{-1}$	$k_2^{\text{obs}}, \text{ s}^{-1}$
WT	$1,50 \pm 0,01$	$15,6 \pm 0,3$	$0,75 \pm 0,02$
H270W	-	$21,8 \pm 0,6$	$0,96 \pm 0,02$
Y203W	$1,18 \pm 0,01$	$9,6 \pm 0,1$	$0,12 \pm 0,01$
Y203A	$1,69 \pm 0,02$	$14,3 \pm 0,3$	-
K249Q	$0,86 \pm 0,01$	$14,5 \pm 0,3$	$0,74 \pm 0,01$
F45W	$1,31 \pm 0,01$	$15,3 \pm 0,5$	$1,03 \pm 0,02$
F319W	$1,17 \pm 0,01$	$16,1 \pm 0,2$	$0,75 \pm 0,02$

Таблица 8. Наблюдаемые константы скорости, характеризующие конформационные изменения фермента hOGG1 и ДНК-субстратов в процессе их взаимодействия

Связывание **АР**^{аРи}/**С**₁₂-субстрата и встраивание аминокислотных остатков hOGG1 в ДНК-дуплекс приводит к хорошо выраженным изменениям флуоресценции аРи, характеризующим конформационные переходы ДНК (рис. 11*б*). Небольшое увеличение интенсивности флуоресценции аРи (до 100 мс) для hOGG1 WT и всех мутантов должно быть связано с увеличением гидрофильности среды вокруг остатка аРи. Этот рост, скорее всего, связан с частичным плавлением дуплекса и/или взаимодействием с гидрофильными аминокислотами Arg154, Arg204 и Asn149. Следует отметить, что, согласно рентгеноструктурным данным [402], в комплексе hOGG1 с ДНК, содержащей F-сайт, остаток Asn149 находится на расстоянии 3,5 Å от основания аРи. Кроме того, встраивание остатка Туг203 в дуплекс приводит к смещению основания, которое находится в комплементарной цепи напротив основания аРи.

Обработку кинетических кривых, характеризующих изменение интенсивности флуоресценции aPu, проводили с использованием уравнения (1) с i = 2. Как видно из таблицы 8 наблюдаемые константы скорости первой ступени увеличения сигнала k_1^{obs} изменяются в довольно узком диапазоне от 9,6 с⁻¹ до 21,8 с⁻¹ для всех белков.

Второй зарегистрированный процесс, который приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции, связан с переходом остатка aPu в более гидрофобное окружение. Наблюдаемые константы скорости k_2^{obs} этой стадии для мутантов hOGG1 WT и His270Trp, Phe45Trp, Phe319Trp, Lys249Gln лежат в диапазоне от 0,74 c⁻¹ до 1,03 c⁻¹, тогда как для мутантной формы Tyr203Trp это значение в шесть раз ниже, чем у WT, и равно 0,12 c⁻¹. Более того, на рис. 11*б* видно, что при удалении бокового радикала Tyr в случае замены Tyr203Ala не проитекает вторая стадия связывания **AP^{aPu}/C₁₂-**субстрата. Полученные данные свидетельствуют о том, что вторая фаза связывания **AP^{aPu}/C₁₂-**

субстрата, приводящая к уменьшению интенсивности флуоресценции aPu, характеризует процесс полного встраивания Туг203 в спираль ДНК.

Взаимодействие с ДНК, содержащей охоG

Взаимодействие между hOGG1 WT и ДНК-дуплексом охоG/C₁₂ приводит к снижению сигнала Trp флуоресценции в течение 10 с (рис. 12*a*). В наших предыдущих исследованиях [117] было показано, что эта фаза состоит из трех этапов, которые были связаны с образованием каталитического комплекса фермент-ДНК. Последующее увеличение интенсивности Тгр связано с химическими стадиями ферментативного процесса и диссоциацией комплекса фермент-продукт. При взаимодействии hOGG1 WT и $0 \times 0 G^{aPu} / C_{12}$ ДНК-дуплексом было зарегистрировано увеличение интенсивности флуоресценции aPu в течение первых 20 мс (рис. 126). Согласно [120], в этом интервале времени основание охоGua выворачивается из дуплекса в активный центр фермента, оставляя в дуплексе свободное пространство. На следующем этапе, в течение 20 мс-100 с, флуоресценции aPu, происходит двухступенчатое снижение характеризующее последовательное встраивание аминокислотных остатков Tyr203, Asn149, Arg154 и Arg204 в это свободное пространство ДНК. Каталитические стадии и диссоциация комплекса фермент-продукт приводят к увеличению интенсивности флуоресценции aPu на временах более 100 с.



Рис. 12. Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения фермента (*a*) и ДНК-субстрата (*б*) в процессе взаимодействия hOGG1 дикого типа и мутантных форм с ДНК дуплексами **охоG/C**₁₂ и **охоG**^{aPu}/C₁₂. Концентрации hOGG1 и ДНК-субстратов составляли 2,0 мкМ и 1,0 мкМ соответственно.

Для уточнения роли отдельных аминокислотных остатков в каталитичесом процессе было исследовано поведение кинетических кривых изменения флуоресценции Trp и aPu при различных концентрациях мутантных форм фермента и ДНК и рассчитаны кинетические параметры отдельных стадий.

Туг203. Из рис. 6*а* видно, что замена Туг203Ala приводила к почти полной потере Nгликозилазной и AP-лиазной активностей. Зарегистрированные изменения интенсивности флуоресценции Trp (рис. 13*a*), по-видимому, отражают "попытку" образования ферментсубстратного комплекса. При этом незначительный рост интенсивности флуоресценции aPu на временах < 10 мс (рис. 13*б*) свидетельствует о том, что отсутствие Туг203 приводит к потере способности эффективно распознавать поврежденное основание и индуцировать как начальное плавление дуплекса ДНК, так и последующее выворачивание основания охоGua.



Рис. 13. Экспериментальные кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения фермента (*a*) и ДНК-субстрата (б) в процессе взаимодействия hOGG1 Tyr203Ala с ДНК дуплексами **охоG/C**₁₂ и **охоG**^{аPu}/C₁₂.

Кинетические кривые, полученные для взаимодействия hOGG1 Tyr203Trp с охоG/C₁₂-субстратом, характеризуются дополнительным уменьшением интенсивности флуоресценции Trp в интервале времени 1–20 с по сравнению с hOGG1 WT, что свидетельствует о том, что именно остаток Trp203 отвечает за это изменение (рис. 14*a*). Можно предположить, что Trp203 участвует в распознавании основания охоGua, и его встраивание в дуплекс ДНК происходит в интервале времени от 1 до 20 с. Такое поведение флуоресценции Trp позволяет заключить, что аминокислоты Asn149, Arg154, Arg204 и Tyr203 последовательно встраиваются в дуплекс ДНК и последняя аминокислота – это Tyr203.

Сравнение изменений интенсивности флуоресценции aPu (рис. 146) и накопления продуктов реакции (рис. 9), полученные для hOGG1 Tyr203Trp, указывает на наличие корреляции между временами протекания конформационных переходов ДНК и каталитических стадий.

Кинетика флуоресценции Trp и aPu (рис. 14) в процессе, катализируемом hOGG1 Tyr203Trp, описывается такой же кинетической схемой (схема 1), что и для фермента дикого типа. Константы скорости, соответствующие этой кинетической схеме, представлены в таблице 9. Сравнение значений констант равновесия K_1 , K_2 и K_3 , а также констант скорости каталитических стадий (k_4 и k_5), полученных как по регистрации флуоресценции Trp, так и aPu, указывают на небольшое снижение эффективности образования комплекса фермент-субстрат. В совокупности, эти данные свидетельствуют о том, что Tyr203 важен как для распознавания поврежденного нуклеотида, так и для формирования каталитического компетентного состояния.



Рис. 14. Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения фермента (*a*) и ДНК-субстрата (*б*) в процессе взаимодействия hOGG1 Tyr203Trp с ДНК дуплексами **охоG/C**₁₂ и **охоG**^{аPu}/C₁₂.

	oxoG/C ₁₂			oxoG ^{aPu} /C ₁₂						
Константы	WT ^a	K249Q	Y203W	F319W	F45W	WT ^a	K249Q	Y203W	F319W	F45W
$k_1 \times 10^{-8}, \mathrm{M}^{-1}\mathrm{c}^{-1}$	2,6 ± 0,1	$1,7 \pm 0,4$	5,4 ± 1,0	2,2 ± 0,1	6,9 ± 1,8	$1,2 \pm 0,1$	0,3 ± 0,1	0,66 ± 0,04	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1
k_{-1}, c^{-1}	130 ± 1	290 ± 60	520 ± 110	240 ± 10	500 ± 45	120 ± 10	62 ± 12	130 ± 7	260 ± 40	103 ± 9
K_1^{b}, M^{-1}	2,0×10 ⁶	0,6×10 ⁶	1,0×10 ⁶	0,9×10 ⁶	$1,4 \times 10^{6}$	$1,0 \times 10^{6}$	$0,5 \times 10^{6}$	$0,5 \times 10^{6}$	$0,2 \times 10^{6}$	$0,5 \times 10^{6}$
k_2, c^{-1}	$13,3 \pm 0,2$	5,0 ± 0,5	7,4±1,0	$31,9 \pm 1,2$	$12,1 \pm 2,0$	$1,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	0,3 ± 0,1	$4,1 \pm 1,5$	$1,4 \pm 0,1$
k_{-2}, c^{-1}	1,16 ± 0,02	$2,8 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,2$	0,5 ± 0,1	2,3 ± 0,6	$1,5 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,2$	1,3 ± 0,3	$2,5 \pm 0,8$	$1,4 \pm 0,2$
<i>K</i> ₂	11,5	1,8	6,2	63,8	5,3	0,9	1,3	0,2	1,6	1,0
k_3, c^{-1}	$0,012 \pm 0,001$	$0,26 \pm 0,01$	$0,010 \pm 0,001$	$0,08 \pm 0,01$	$0,009 \pm 0,001$	$0,10 \pm 0,01$	5,4 ± 1,1	$0,28 \pm 0,04$	$0,9 \pm 0,2$	$0,\!48 \pm 0,\!09$
k_{-3}, c^{-1}	$0,07 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$	0,8 ± 0,1	$0,4 \pm 0,1$	$0,013 \pm 0,002$	$0,8 \pm 0,1$	$0,022 \pm 0,008$	$0,5 \pm 0,2$	$0,38 \pm 0,04$
<i>K</i> ₃	0,17	0,5	0,08	0,1	0,02	7,7	6,7	12,7	1,8	1,3
k_4, c^{-1}	$0,06 \pm 0,02$	-	$0,03 \pm 0,01$	$0,018 \pm 0,002$	$0,05 \pm 0,01$	$0,029 \pm 0,001$	-	$0,015 \pm 0,004$	$0,015 \pm 0,004$	$0,034 \pm 0,002$
$k_5 \times 10^3$, c ⁻¹	$6,4 \pm 0,7$	-	$4,2 \pm 0,9$	$1,8 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	3,6 ± 0,2	-	3,0 ± 0,7	$1,9 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,1$
$K_{\rm EP},\mu{ m M}$	0,88	-	0,3 ± 0,1	$1,1 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,4$	7,0 ± 1,1	-	$1,0 \pm 0,2$	-	-
$K_{\text{bind}}^{\text{c}}, \text{M}^{-1}$	2,9×10 ⁷	$2,2 \times 10^{6}$	8,0×10 ⁶	6,5×10 ⁷	8,8×10 ⁶	9,2×10 ⁶	5,3×10 ⁶	$2,1 \times 10^{6}$	1,3×10 ⁶	1,6×10 ⁶
$K_1 \times K_2 \times K_3$	3,9×10 ⁶	$0,54 \times 10^{6}$	$0,50 \times 10^{6}$	6,1×10 ⁶	0,15×10 ⁶	6,9×10 ⁶	4,3×10 ⁶	$1,3 \times 10^{6}$	$0,58 \times 10^{6}$	$0,65 \times 10^{6}$

Таблица 9. Константы скорости и равновесия, характеризующие взаимодействие hOGG1 дикого типа и мутантных форм с ДНК-субстратом, содержащим охоG, полученными на основе анализа изменений интенсивности флуоресценции Trp и aPu

^а Данные работ [117] и [120].

^b $K_i = k_i/k_{-i}$.

^c $K_{\text{bind}} = K_1 + K_1 \times K_2 + K_1 \times K_2 \times K_3$

His270. Согласно данным работ [121, 397, 399], остаток His270 играет важную роль в формировании каталитически активного комплекса с ДНК, содержащей охоС, за счет образования водородных связей между остатком имидазола и 5'-фосфатной группой поврежденного нуклеотида. Кроме того, специфическое взаимодействие между His270 и Asp322 открывает карман активного центра и облегчает процесс встраивания поврежденного основания в активный центр. Как видно из рис. 9, hOGG1 His270Trp полностью потерял каталитическую активность в отношении ДНК, содержащей охоG. При этом изменения интенсивности флуоресценции Тгр аналогичны изменениям, полученным для hOGG1 Tyr203Ala, что свидетельствует об одинаковой природе конформационных перестроек, происходящих при «попытке» этих мутантных форм вывернуть поврежденное основание. Такие изменения флуоресценции Тгр подтверждают предположение, что hOGG1 His270Trp не способен специфически связывать ДНК, содержащую охоG, и образовывать каталитический комплекс (рис. 15а). Кроме того, небольшой рост интенсивности флуоресценции aPu на начальном участке кинетических кривых (рис. 156) также свидетельствует о том, что отсутствие His270 приводит к потере специфических взаимодействий между ароматическими плоскостями остатка His270 и поврежденного основания и, как следствие этого, к потере способности эффективно выворачивать повреждение из дуплекса ДНК.



Рис. 15. Экспериментальные кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения фермента (*a*) и ДНК-субстрата (б) в процессе взаимодействия hOGG1 His270Trp с ДНК дуплексами **охоG/C**₁₂ и **охоG**^{аPu}/C₁₂.

Phe 319. В активном центре hOGG1 ароматический остаток Phe319 находится в стэкинге с His270 [395]. Однако при образовании каталитического комплекса с ДНК ароматическое кольцо Phe319 образует стэкинг с основанием охоGua [121].

Как следует из анализа кинетики накопления продуктов реакции (рис. 9), hOGG1 Phe319Trp обладает сниженной примерно в 2 раза N-гликозилазной и AP-лиазой активностями по сравнению с ферментом дикого типа. Действительно, при взаимодействии с **охоG/C₁₂-субстратом** интенсивность флуоресценции Trp для hOGG1 Phe319Trp уменьшается более медленно, чем в случае hOGG1 WT (рис. 16a). Возможно, процесс образования стэкинга между основанием охоGua и остатком Trp319 в hOGG1 Phe319Trp является не столь эффективным, как в случае Phe319 в hOGG1 WT, и это наблюдаемому уменьшению приводит к амплитуды изменений интенсивности флуоресценции. Кинетические кривые хорошо описываются схемой 1. Сравнение полученных констант скорости (таблица 9) показывает, что hOGG1 Phe319Trp более эффективно образует комплекс с охо G/C_{12} -субстратом (K_{bind} и $K_1 \times K_2 \times K_3$), но каталитически он менее активен (k₄ и k₅), чем фермент дикого типа. Основной эффект замещения Phe319Trp наблюдается на второй и третьей стадиях связывания. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что взаимодействие с остатком Phe319 происходит на этих равновесных стадиях образования каталитически компетентного ферментсубстратного коиплекса.



Рис. 16. Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения фермента (*a*) и ДНК-субстрата (*б*) в процессе взаимодействия hOGG1 Phe319Trp с ДНК дуплексами **охоG**/ C_{12} и **охоG**^{*a*Pu}/ C_{12} .

При взаимодействии hOGG1 Phe319Trp с $0x0G^{a^{Pu}/C_{12}}$ -субстратом на начальном участке кинетических кривых до 10 мс происходило лишь небольшое увеличение интенсивности флуоресценции aPu (рис. 166), что указывает на низкую эффективность процесса выворачивания поврежденного основания. В интервале времени 10–100 мс интенсивность флуоресценции aPu не изменяется, затем происходит медленной спад в диапазоне 100 мс–100 с. Медленное уменьшение интенсивности флуоресценции aPu на этих временах может быть связано с низкой скоростью встраивания остатков Arg154, Arg204, Tyr203 и Asn149 и медленным образованием каталитически активного комплекса. Следует отметить, что константы прямой и обратной скорости второй и третьей стадий связывания больше, чем константы скорости для фермента WT, что свидетельствует о неустойчивости промежуточных фермент-субстратных комплексов.

Lys249. Замена функциональной группы каталитической аминокислоты Lys249Gln приводит к полной потере N-гликозилазной и AP-лиазной активности (рис. 9). Формы флуоресцентных кинетических кривых, характеризующих конформационные изменения hOGG1 Lys249Gln (рис. 17*a*) и ДНК-субстрата (рис. 17 δ) в ходе их взаимодействия, значительно отличаются от форм, полученных для фермента дикого типа. Образование специфического комплекса с hOGG1 Lys249Gln, зарегистрированное по изменению интенсивности флуоресценциеи Trp, происходит значительно медленнее (~10 c), чем в случае hOGG1 WT (~1 с). При этом увеличение флуоресценции aPu, соответствующее локальному плавлению дуплекса и выворачиванию из двойной спирали основания охоGua, происходит также медленнее и занимает около 100 мс вместо 20 мс для фермента WT. Минимальная кинетическая схема, описывающая наблюдаемые изменения интенсивности флуоресценции Trp и aPu, содержала только стадии связывания, входящие в предложенную ранее схему 1. Полученные значения констант скорости представлены в таблице 9. Как видно из таблицы 9, образование первичного комплекса (k_1) , зарегистрированное по изменению интенсивности флуоресценции аРи, происходит в 4 раза медленнее, чем для hOGG1 WT. При этом следующая стадия, характеризующаяся флуоресценции aPu уменьшением интенсивности В процессе встраивания аминокислотных остатков Tyr203, Asn149, Arg154 и Arg204 в ДНК, протекает с той же скоростью, как в случае hOGG1 WT и завершается за время менее 10 с (k_3 в 54 раза больше для hOGG1 Lys249Gln, чем для WT). Тем не менее, равновесная константа образования каталитического комплекса (E•OG)₃ ($K_1 \times K_2 \times K_3$) в 7 раз меньше по сравнению с ферментом WT.

Эти результаты свидетельствуют о том, что конформация фермента, содержащего замену Lys249Gln, не является оптимальной для связывания специфического ДНКсубстрата, и процесс распознавания специфического сайта протекает менее эффективно, чем в случае фермента WT. Более того, полученные данные позволяют предположить, что замена Lys249Gln затрудняет полную подстройку структуры активного центра к каталитически активной форме.



Рис. 17. Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения фермента (*a*) и ДНК-субстрата (*б*) в процессе взаимодействия hOGG1 Lys249Gln с ДНК дуплексами **охоG**/ C_{12} и **охоG**^{аPu}/ C_{12} .

Phe45. Замена Phe45 на Trp приводит к уменьшению каталитической активности фермента (рис. 9). Изменения интенсивности флуоресценции Trp и aPu свидетельствуют о замедлении стадий связывания ДНК до 30–40 с (рис. 18). Тем не менее, кинетические кривые описывались схемой 1, что позволило рассчитать значения констант скорости, входящих в эту схему (таблица 9). Сравнение данных, представленных в таблице 9, показывает, что замена Phe45Trp приводит к значительному изменению константы равновесия K_3 третьей стадии связывания (0,02 и 0,17 для Trp и 1,3 и 7,7 для aPu соответственно), которая отвечает за окончательную подстройку структуры комплекса фермент-субстрат, необходимую для достижения каталитически активного состояния. Эти изменения могут быть результатом локального нарушения строения кармана активного сайта из-за замены остатка Phe на более объемный остаток Trp. Teм не менее, константы скорости k_4 , характеризующие 1-ую каталитическую стадию hOGG1 Phe45Trp и hOGG1

WT, имели близкие значения, тогда как константа скорости 2-ой каталитической стадии *k*₅ была выше для hOGG1 WT.



Рис. 18. Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения фермента (*a*) и ДНК-субстрата (*б*) в процессе взаимодействия hOGG1 Phe45Trp с ДНК дуплексами **охоG/C**₁₂ и **охоG**^{аPu}/C₁₂.

Таким образом, на основании кинетического анализа каталитической ативности мутантных форм фермента, а также их конформационной динамики можно сделать вывод субстратной специфичности hOGG1 что контроля использует 0 TOM, для многоступенчатый механизм распознавания специфического сайта, сопровождающийся изменениями конформации как фермента, так и ДНК-субстрата. Данный механизм схематически изображен на рис. 19. Первая стадия процесса связывания ДНК, соответствующая образованию комплекса (E•OG)₁ и протекающая до 20 мс, представляет собой неспецифическое связывание. Данные, полученные как для hOGG1 Tyr203Ala, так и для Tyr203Trp, показывают, что локальное нарушение структуры ДНК происходит при непосредственном участии Туг203. В то же время мутация Туг203Trp показывает, что полная вставка остатка Тгр203 в ДНК происходит на более поздней стадии процесса взаимодействия (t > 1 c). Эти данные свидетельствуют о том, что снижение флуоресценции Trp на временах менее 1 с не связаны с встраиванием остатка Trp203 в ДНК. Поэтому, можно предположить, что уменьшение интенсивности флуоресценции Тгр на временах до 1 с связано с образованием водородных связей между аминокислотными остатками Arg154 и Arg204 и основанием Cyt, расположенным напротив основания охоGua. Это предположение подтверждается тем, что обе замены Arg154Ala и Arg204Ala приводят к значительному снижению активности фермента (рис. 9) за счет потери способности нарушать локальную структуру дуплекса (рис. 12a). Взаимодействие с Arg154 и Arg204 «вытягивают» основание Cyt в сторону малой бороздки ДНК и приводят к дестабилизации водородных связей между основаниями Cyt и охоGua. Существенная зависимость активности фермента от природы основания, расположенного напротив повреждения, также является подтверждением важности Arg154 и Arg204 в специфическом узнавании пары охоGua/Cyt. Цитозин является предпочтительным противоположным основанием по сравнению с A, G или T, поскольку только основание Cyt способно образовывать водородные связи с боковыми цепями Arg154 и Arg204 [7, 23]. Более того, замена Arg154His [403] в hOGG1 или присутствие остатка Met в этом структурном положении у CacOgg [404] приводит к потере селективности к основанию, расположенному напротив повреждения.

В случае мутантной формы Tyr203Ala на первом участке кинетических кривых не происходит рост интенсивности флуоресценции aPu, что свидетельствует о том, что остаток Tyr203 необходим на этом этапе и служит «клином», встраивающимся в дестабилизированный остатками Arg154 и Arg204 дуплекс ДНК. Эти данные свидетельствуют о функции остатка Tyr203, как аминокислоты, выступающей в роли детектора поврежденного основания.

Встраивание Туг203 в дуплекс также зависит от контактов, формируемых остатком His270, который также участвует в локальном нарушении структуры дуплекса. Замена His270Trp приводит лишь к небольшому увеличению интенсивности флуоресценции aPu до 10 мс. Локальное плавление дуплекса, происходящее с участием His270, способствует частичной вставке Tyr203 и последующему выворачиванию охоGua из цепи ДНК в экзосайт. Кроме того, данные, полученные для hOGG1 Lys249Gln показывают, что остаток Lys249 важен на начальной стадии образования первичного комплекса hOGG1, что хорошо согласуется со структурными данными [392], которые показывают, что Lys249 участвует в специфическом узнавании цепи ДНК-дуплекса, содержащей повреждение.

Вторая стадия связывания поврежденной ДНК на рис. 19 соответствует образованию комплекса (E•OG)₂ и временному диапазону от ~ 20 мс до 1 с. Во время этой стадии основание охоGua выворачивается в карман активного центра фермента, где образует стэкинг с ароматическим кольцом Phe319. Этот вывод основан на изменениях флуоресценции aPu, зарегистрированных для hOGG1 Phe319Trp (рис. 12 и 16). Анализ структурных данных [397] показал, что помимо Phe319 в специфическом взаимодействии с охоG в кармане активного центра участвуют аминокислотные остатки His270 и Gln315.

Отсутствие водородных связей His270 с 5'-фосфатной группой поврежденного нуклеотида приводит к уменьшению ДНК-связывающей способности фермента и, как следствие, этого значительной потере ферментативной активности (рис. 9 и [399]). После полного выворачивания основания охоGua из спирали ДНК происходит полное встраивание аминокислотных остатков Arg154, Arg204 и Asn149 и формирование контактов с основанием Суt.



Рис. 19. Схематический механизм структурных перестроек в процессе взаимодействия hOGG1 и поврежденной ДНК.

Стадия 1: вытягивание основания Cyt остатками Arg154 и Arg204, «вклинивание» остатка Tyr203 в ДНК-спираль, электростатическое взаимодействие между Lys249 и фосфатной группой поврежденного нуклеотида, выворачивание основания охоGua в экзо-сайт фермента и взаимодействие His270 с частично вывернутым основанием охоGua.

Стадия 2: выворачивание основания охоGua в активный центр, образование стэкинга между основанием охоGua и ароматическим кольцом Phe319, взаимодействие His270 с фосфатной группой вывернутого поврежденного нуклеотида, образование водородных связей между Arg154, Arg204, Asn149 и основанием Cyt.

Стадия 3: полное встраивание Туг203 в ДНК, взаимодействие охоGua с Gly42.

Стадия 4: гидролиз N-гликозидной связи, катализируемый остатком Asp268.

Стадия 5: реакция β-элиминирования, катализируемая остатком Lys249.

Стадия 6: диссоциация комплекса фермент-продукт.

Третья стадия связывания ДНК, соответствующая образованию комплекса (E•OG)₃, протекает во временном интервале 1–20 с. Как следует из данных для hOGG1 Tyr203Trp, в этот момент времени происходит полное встраивание Tyr203 в дуплекс (рис. 14). Кинетические данные, полученные в этом исследовании для мутанта hOGG1 Phe45Trp, показывают, что третья стадия связывания главным образом связана с окончательной подстройкой комплекса фермент-субстрат, необходимой для достижения каталитически активного состояния.

Полученные кинетические данные позволили уточнить роль остатков Lys249 и Asp268 в каталитической активности hOGG1. Общепринятая догма химического механизма hOGG1 заключается в том, что аминогруппа боковой цепи Lys249 принимает непосредственное участие как в расщеплении N-гликозидной связи, так и в реакции βэлиминирования. Это предположение основано на том, что Lys249 образует основание Шиффа с С1'-атомом рибозы. Однако полученные нами данные свидетельствуют о том, что остаток Lys249 непосредственно участвует в процессе локального нарушения структуры ДНК и выворачивания основания охоGua за счет электростатических взаимодействий с ДНК-фосфатными группами на начальном этапе взаимодействия в течение первых 20 мс. Более того, существование таких взаимодействий подтверждается как рентгеноструктурными данными для комплекса hOGG1 с неповрежденной ДНК (рис. 86) [396], так и результатами химической модификации [405]. Потеря электростатических взаимодействий между Lys249 и фосфатной группой, расположенной с 3'-стороны от основания охоGua, у мутантной формы Lys249Gln приводит к нарушению специфических контактов в активном центре фермента и, как следствие этого, нарушению оптимальной конформации, необходимой для протекания каталитической реакции.

Недавно с использованием двойной мутантной формы Lys249Cys Cys253Lys hOGG1 было показано [392], что именно остаток Asp268 является каталитической аминокислотой в реакции гидролиза N-гликозидной связи поврежденного основания. Согласно этим данным, образование основания Шиффа между Lys249 и C1'-дезоксирибозой поврежденного нуклеотида должно происходить после расщепления N-гликозидной связи с поврежденным основанием, как это было показано для другого члена структурного семейства HhH-GPD аденин-ДНК-гликозилазы MutY [87, 406]. Таким образом, основываясь на литературных данных и данных настоящей работы, можно сделать вывод о том, что мутация Lys249Gln приводит к потере ферментативной активности из-за нарушения локальной структуры активного центра фермента, а не вследствие потери функциональной нуклеофильной аминогруппы Lys249.

3.2.1.2. FRET анализ процессов изгибания ДНК

Для более детального исследования процесса узнавания и связывания ДНКсубстратов ферментом hOGG1 в данной работе применен метод резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) [380]. Для этого на разные концы дуплекса олигонуклеотидов были введены пары флуоресцентных красителей Су3/Су5 и FAM/Dab.

В работе использовали два типа FRET-субстратов: первый тип содержал пару донор-тушитель ($G^{FAM/Dab}/C_{12}$ - и $F^{FAM/Dab}/C_{12}$ -лиганды), второй тип — пару донор-акцептор (**охоG**^{Cy3/Cy5}/C₁₂-субстрат). Из представленных на рис. 20*a* и *б* спектров FRET-субстратов, видно, что образование дуплексов $G^{FAM/Dab}/C_{12}$ и $F^{FAM/Dab}/C_{12}$ приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции FAM по сравнению с одноцепочечными олигонуклеотидами FAM-G и FAM-F соответственно. Такое уменьшение интенсивности флуоресценции связано с эффектом тушения флуоресценции FAM остатком Dab. Добавление к дуплексам $G^{FAM/Dab}/C_{12}$ и $F^{FAM/Dab}/C_{12}$ фермента hOGG1 приводит к дальнейшему уменьшению интенсивности флуоресценции FAM. Такой эффект, вероятнее всего, обусловлен изгибанием дуплекса, вследствие чего происходит дополнительное сближение остатков флуорофора и тушителя.



Рис. 20. Спектры флуоресценции (*a*) $\mathbf{G}^{\text{FAM/Dab}}/\mathbf{C}_{12}$ - и (б) $\mathbf{F}^{\text{FAM/Dab}}/\mathbf{C}_{12}$ -лигандов. Представлены спектры испускания флуоресценции олигонуклеотида, содержащего FAM (FAM-G и FAM-F), их дуплексов с комплементарной цепью, содержащей тушитель флуоресценции Dab, и комплексов с hOGG1. Кинетика изменения интенсивности флуоресценции FAM при взаимодействии дуплексов $\mathbf{G}^{\text{FAM/Dab}}/\mathbf{C}_{12}$ (*b*) и $\mathbf{F}^{\text{FAM/Dab}}/\mathbf{C}_{12}$ (*c*) с ферментом hOGG1.

Кинетика изменения FRET-сигнала для дуплекса $G^{FAM/Dab}/C_{12}$, представленная на рис. 20*в*, свидетельствует о том, что вслед за быстрым (0,02 с) разрыхлением ДНК, приводящим к небольшому росту сигнала флуоресценции и зарегистрированным ранее по флуоресценции аPu [120], происходит медленное падение сигнала ($\tau_{1/2} \approx 5$ с), вероятно, связанное с изгибанием спирали ДНК. По-видимому, эти структурные изменения в ДНК свидетельствуют о процессах, в результате которых распознается поврежденное основание.

Анализ кинетической кривой для дуплекса $\mathbf{F}^{\text{FAM/Dab}}/\mathbf{C}_{12}$ показал, что изгибание дуплекса, в котором отсутствует азотистое основание, проходит быстрее ($\tau_{1/2} \approx 2$ с), чем в случае неспецифической ДНК. Сопоставляя данные, полученные для $\mathbf{F}^{aPu}/\mathbf{C}_{12}$ -лиганда [120], с кинетикой изгибания $\mathbf{F}^{\text{FAM/Dab}}/\mathbf{C}_{12}$ (рис. 20*г*), можно заключить, что процессы встраивания аминокислотных остатков и изгибания дуплекса протекают одновременно.

Использование расщепляемого субстрата **охоG**^{Cy3/Cy5}/C₁₂ также позволило зарегистрировать стадию изгибания дуплекса (рис. 21). Однако в данном случае, в отличие от дуплекса $\mathbf{F}^{FAM/Dab}/C_{12}$, изгибание дуплекса **охоG**^{Cy3/Cy5}/C₁₂ не приводило к значительным изменениям интенсивности флуоресценции Cy5. Как видно из кинетических кривых (рис. 21, вставка), в течение первых 10 с реакции происходило слабое увеличение интенсивности флуоресценции, что, согласно данным [117, 120], обусловлено образованием каталитически активного комплекса. Падение интенсивности сигнала Су5 на временах более 400 секунд вызвано распадом комплекса фермент-продукт.



Рис. 21. Процесс взаимодействия hOGG1 с дуплексом **охоG^{Cy3/Cy5}/C**₁₂ и кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции.

3.2.1.3. Масс-спектрометрический анализ интермедиатов ферментативного процесса

Механизм расщепления поврежденной ДНК включает последовательное образование ковалентных промежуточных комплексов фермента и ДНК в виде основания Шиффа (рис. 22). Как видно из рис. 22, в ходе взаимодействия hOGG1 с **охоG/C₁₂**-субстратом возможно образование двух стабильных ковалентных аддуктов. Чтобы определить характерные времена образования и исчезновения этих промежуточных продуктов, проводился MS/ESI масс-спектрометрический анализ реакционной смеси через определенные промежутки времени (рис. 23) при двукратном избытке **охоG/C₁₂**-субстрата над ферментом, при этом в реакционную смесь добавляли NaBH₄ через 0–1000 с после начала реакции [380].



Рис. 22. Основные стадии реакции, катализируемые hOGG1: стадия 1 – удаление поврежденного основания (реакция гидролиза N-гликозидной связи), стадия 2 – реакция β-элиминирования З'-фосфатной группы, стадия 3 – регенерация свободного фермента. Показаны стабильные ковалентные аддукты, образующиеся после восстановления основания Шиффа NaBH4.

Масс-спектр MS-ESI свободного фермента hOGG1 содержал набор положительно заряженных ионных пиков, которые соответствовали молекулярному весу немодифицированного белка (42340 Да) (рис. 23*a*). Как видно из рис. 23*6*, в течение первых 30 с протекает N-гликозилазная реакция и образуется ковалентный ферментсубстратный комплекс, в котором аминогруппа Lys249 формирует основание Шиффа с остатком 2'-дезоксирибозы. Молекулярный вес восстановленного аддукта I равен 45697. Вторая каталитическая реакция – β-элиминирование – протекает медленно и заканчивается лишь к 1000 с. В ходе проведенного анализа не удалось зарегистрировать аддукт II, соответствующий ковалентному комплексу с ДНК после реакции βэлиминирования З'-фосфатной группы (рис. 22). Полученные данные подтверждают результаты [113, 117, 119, 393], свидетельствующие о том, что скорость-лимитирующей стадией процесса, катализируемого hOGG1, является реакция β-элиминирования.



Рис. 23. MS/ESI-спектры интермедиатов, образующихся в процессе взаимодействия фермента hOGG1 и **охоG/C**₁₂-субстрата при t = 0, 30, 600 и 1000 с (a - c соответственно).

3.2.1.4. Термодинамические параметры ферментативного процесса

Термодинамические параметры взаимодействия hOGG1 WT с ДНК, содержащей охоG, предоставили очень важную информацию для понимания и идентификации ключевых этапов процесса поиска повреждений в ДНК и распознавания охоG [407]. Термодинамический анализ процесса взаимодействия 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека hOGG1 с поврежденной и неповрежденной ДНК проведен на основе кинетических данных, полученных при разных температурах. Для регистрации конформационных изменений фермента и ДНК-субстрата использовали разные типы и

расположение флуорофоров. По изменению интенсивности флуоресценции остатка aPu, расположенного с 3'-стороны от основания охоGua зарегистрированы конформационные изменения поврежденной цепи ДНК-дуплекса. Кроме того, для регистрации конформационных изменений комплементарной цепи ДНК-дуплекса использовали флуоресцентный аналог цитозина tC⁰, расположенный напротив основания oxoGua. Методом гель-электрофореза с использованием радиоактивно-меченого субстрата были получены данные о скорости накопления продуктов при разных температурах. Для каждого из этих вариантов регистрации процесса взаимодействия фермента и ДНК были получены кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения ДНКсубстрата при каждой температуре. На рис. 24 для каждого типа регистрации приведена концентрационная серия характерных кинетических кривых и их зависимость от температуры.

Кинетические кривые, полученные при регистрации интенсивности флуоресценции aPu, для каждой из температур описывали схемой 1, что позволило рассчитать значения констант скорости (таблица 10). Характерные времена накопления продуктов Nгликозилазной реакции и реакции β-элиминирования совпадают с характерными временами увеличения флуоресценции aPu в интервале 30–1000 с, что указывает на то, что изменения флуоресценции в этот временной интервал характеризуют химические ферментативной Необходимо стадии реакции. отметить, что интенсивность tC^O. расположенного флуоресценции напротив основания oxoGua. изменялась незначительно при образовании фермент-субстратного комплекса, что не позволило выделить отдельные стадии образования каталитического комплекса, как в случае других флуорофоров. Рост интенсивности флуоресценции tC⁰ на временах более 100 с характеризовал каталитические стадии ферментативного процесса и последующую диссоциацию комплекса фермент-продукт. Тем не менее, полученные кинетические кривые, характеризующие взаимодействие hOGG1 WT с охоG/tC⁰12-субстратом, удалось описать кинетической схемой 2.



Рис. 24. Взаимодействие hOGG1 WT с ДНК, содержащей охоG. (*a*) изменения интенсивности флуоресценции aPu при взаимодействии hOGG1 с ^{aPu}охоG/C₁₂-субстратом при различных концентрациях hOGG1 WT при 25°С; (*б*) изменения интенсивности флуоресценции aPu при взаимодействии hOGG1 WT с ^{aPu}охоG/C₁₂-субстратом при различных температурах; (*в*) изменения интенсивности флуоресценции tC⁰ при взаимодействии hOGG1 WT с охоG/tC⁰₁₂-субстратом при различных концентрациях hOGG1 WT при 25°С; (*г*) изменения интенсивности флуоресценции tC⁰ при взаимодействии hOGG1 WT с охоG/tC⁰₁₂-субстратом при различных концентрациях hOGG1 WT при 25°С; (*г*) изменения интенсивности флуоресценции tC⁰ при взаимодействии hOGG1 WT с охоG/tC⁰₁₂-субстратом при различных температурах; зависимость концентрации продуктов N-гликозилазной реакции (*д*) и реакции β-элиминирования (*е*) от времени при различных температурах при взаимодействии hOGG1 WT с охоG/C₁₂-субстратом. Концентрации фермента и охоG/C₁₂-субстрата составляли 2,0 мкМ и 1,0 мкМ соответственно.

Схема 2

$$E + OG \xrightarrow{K_1} E \bullet OG \xrightarrow{k_2} E \bullet AP \xrightarrow{k_3} E \bullet P \xrightarrow{K_P} E + P,$$

где E – hOGG1; OG – **охоG/tC^O**₁₂-субстрат; E•OG – фермент-субстратный комплекс; E•AP – комплекс E с AP-сайтом, образующимся в результате N-гликозилазной реакции; E•P – комплекс E с продуктом реакции P, образующимся в результате AP-лиазной реакции; K_1 и K_P – равновесные константы, характеризующие стадии образования фермент-субстратного комплекса и диссоциацию комплекса фермент-продукт; k_2 и k_3 – константы скорости N-гликозилазной реакции и реакции β -элиминирования.

Из литературных данных известно, что hOGG1 WT способен дискриминировать охоG-субстраты по основанию, расположенному напротив повреждения, и имеет большую специфичность к паре oxoG/C [115, 116, 120]. Влияние основания, расположенного напротив повреждения, на образование каталитически компетентного фермент-субстратного комплекса обусловлено прямыми контактами аминокислотных остатков фермента с этим основанием [121]. Так, аминокислоты Arg154 и Arg204 встраиваются в цепь ДНК и образуют водородные связи со стоящим напротив охоGua основанием Cyt. остатки аминокислот Asn149 и Tyr203 встраиваются в дуплекс на место вывернутого основания oxoGua. В каталитически активном комплексе ароматическое кольцо Tyr203 расположено в пространстве между основанием Cyt, находящимся напротив охоGua в комплементарной цепи, и основанием с его 5'-стороны. Вследствие высокой чувствительности фермента к природе основания, расположенного напротив охоGua, был проведен анализ влияния на ферментативную активность hOGG1 WT флуоресцентного аналога цитозина - tC⁰. Активность фермента при взаимодействии с $oxoG/tC^{O}_{12}$ -субстратом была определена прямым анализом накопления продуктов реакции методом гель-электрофореза (рис. 25). Видно, что эффективность каталитических стадий значительно снижается по сравнению с охоG/C₁₂-субстратом. Поэтому данные, полученные при регистрации интенсивности флуоресценции tC⁰, не могут быть напрямую соотнесены с данными по другим типам флуоресценции.



Рис. 25. Зависимость концентрации продуктов N-гликозилазной реакции (*a*) и реакции β элиминирования (δ) от времени при взаимодействии hOGG1 WT с **охоG/С**₁₂- и **охоG/tC**⁰₁₂субстратами. Концентрации фермента ДНК-субстратов составляли 2,0 мкМ и 1,0 мкМ соответственно.

ДНК-	Lavarauru	Температура				
субстрат	константы	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C
	$k_1, \mathbf{M}^{-1}\mathbf{c}^{-1}$	$(1,3\pm0,7)\times10^7$	$(2,2\pm1,0)\times10^7$	$(1,7\pm0,8)\times10^7$	$(1,9\pm1,0)\times10^7$	$(2,0\pm1,0)\times10^7$
	k_{-1}, c^{-1}	230 ± 80	390 ± 50	360 ± 20	410 ± 70	520 ± 120
12	k_2, c^{-1}	$8,3 \pm 3,8$	$15,6 \pm 4,2$	$26,6 \pm 6,0$	$53,5 \pm 20,3$	$72,4 \pm 31,4$
	k_{-2}, c^{-1}	$6,1 \pm 0,2$	$11,8 \pm 0,2$	$19,6 \pm 1,7$	$37,9 \pm 11,1$	$40,5 \pm 12,5$
99	k_3, c^{-1}	$0,087 \pm 0,017$	$0,12 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,07$	$0,4 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
^x o ⁿ	k_{-3}, c^{-1}	$0,011 \pm 0,001$	$0,018 \pm 0,001$	$0,007 \pm 0,002$	$0,02 \pm 0,003$	$0,002 \pm 0,001$
ap	k_4, c^{-1}	$0,005 \pm 0,001$	$0,007 \pm 0,001$	$0,014 \pm 0,002$	$0,026 \pm 0,003$	$0,041 \pm 0,007$
	k_5, c^{-1}	$0,0006 \pm 0,0001$	$0,0012 \pm 0,0001$	$0,001 \pm 0,0001$	$0,001 \pm 0,001$	$0,0037 \pm 0,007$
5						
ုင်	<i>K</i> ₁ , M	$(1,2\pm0,3)\times10^{-5}$	$(1,1\pm0,2)\times10^{-5}$	$(0,9\pm0,3)\times10^{-5}$	$(0,7\pm0,2)\times10^{-5}$	$(0,1\pm0,4)\times10^{-5}$
1/1	k_2, c^{-1}	$0,007 \pm 0,003$	$0,011 \pm 0,002$	$0,010 \pm 0,002$	$0,017 \pm 0,006$	$0,014 \pm 0,006$
	k_3, c^{-1}	$0,00010 \pm 0,00003$	$0,00014 \pm 0,0001$	$0,00034 \pm 0,00006$	$0,00052 \pm 0,00018$	$0,0016 \pm 0,0008$
6	K _p , M	$(1,1\pm0,4)\times10^{-6}$	$(0,9\pm0,1)\times10^{-6}$	$(1,2\pm1,0)\times10^{-6}$	$(1,3\pm2,7)\times10^{-6}$	$(2,0\pm 2,2)\times 10^{-6}$

Таблица 10. Константы скорости, характеризующие взаимодействие hOGG1 дикого типа с ^{aPu}oxoG/C₁₂- и oxoG/tC^O₁₂-субстратами при разных температурах

Используя значения констант скорости прямых и обратных реакций, для каждой *i*-ой равновесной стадии были получены значения константы равновесия (K_i). Зависимость $ln(K_i)$ от 1/Т имела линейный вид (рис. 26*a*) и с помощью уравнения Вант-Гоффа [341] позволила рассчитать стандартную энтальпию и энтропию всех равновесных стадии. Рассчитанные значения термодинамических параметров ΔH_i° и ΔS_i° отдельных стадий многостадийного ферментативного процесса представлены в таблице 11. Там же приведены значения стандартной свободной энергии Гиббса ΔG_i° для 298 К. Кроме того, из зависимости величин констант скорости необратимых стадии, характеризующих гидролиз N-гликозидной связи k_4 и реакцию β -элиминирования k_5 , от температуры (рис. 26*6*), описываемой уравнением Эйринга для теории переходного состояния [341], рассчитаны значения стандартной энтальпии активации ($\Delta H^{\circ,\ddagger}$).

Для определения термодинамических образования параметров процесса неспецифического комплекса использовали ^{аРи}G/C₁₂-лиганд. Полученные для каждой из температур в диапазоне 10–30°С кинетические кривые (рис. 27а и б) описывали схемой 3. Ha основании полученных значений констант скорости были рассчитаны термодинамические параметры связывания неповрежденной ДНК (рис. 27в), которые приведены в таблице 12.



Рис. 26. Зависимость $\ln(K_i)$ (*a*) и $\ln(k_i/T)$ (*б*) от 1/Т в соответствии с уравнениями Вант-Гоффа и Эйринга, характеризующая взаимодействие hOGG1 WT с ^{аРи}охоG/C₁₂-субстратом.

Таблица 11. Термодинамические параметры взаимодействия hOGG1 WT с hOGG1 дикого типа с ^{аPu}охоG/C₁₂-субстратом

Параметр	$\Delta G^{\circ}_{i298},$	ΔH°_{i} ,	<i>∆S</i> °: кал/К*моль
стадии	ккал/моль	ккал/моль	
1	-6,4	$-2,8 \pm 0,7$	$11,2 \pm 2,4$
2	-0,2	2,1 ± 0,9	7,7 ± 3,3
3	-1,8	$23,2 \pm 7,8$	85,4 ± 26,6
$\sum_{i=1}^{i=3}$	-8,4	22,5 ± 9,4	104,3 ± 32,3
4	19,6	18,6± 1,1	$-3,5 \pm 3,9$
5	21,0	13,0 ± 1,9	$-27,0 \pm 6,7$

Таблица 12. Термодинамические параметры взаимодействия hOGG1 WT с hOGG1 дикого типа с ^{аPu}G/C₁₂-лигандом

Параметр Номер стадии	$\Delta G^{\circ}_{ m i298},$ ккал/моль	Δ <i>Н</i> ° _i , ккал/моль	Δ <i>S</i> ° _i , кал/(К×моль)
1	-7,7	$-2,4 \pm 0,2$	$18,0 \pm 0,7$
2	0,8	$-12,7 \pm 1,2$	$-44,7 \pm 4,1$
$\sum_{i=1}^{i=2}$	-6,9	$-15,1 \pm 1,4$	$-26,7 \pm 4,8$

Схема 3

$$E + G \xrightarrow{k_1} (E \cdot G)_1 \xrightarrow{k_2} (E \cdot G)_2$$

где Е – hOGG1, G – ^{аРи}G/C₁₂-лиганд, (Е•G)_i – комплексы фермента с неповрежденным ДНК-дуплексом.



Рис. 27. Взаимодействие ДНК-гликозилазы hOGG1 WT с ^{аРи}G/C₁₂-лигандом. (*a*) Изменения интенсивности флуоресценции аРи при взаимодействии hOGG1 с ^{аРи}G/C₁₂-лигандом при различных концентрациях hOGG1 при 25°С; (*б*) Изменения интенсивности флуоресценции аРи при взаимодействии hOGG1 с ^{аРи}G/C₁₂-лигандом при различных температурах; (*в*) зависимость $\ln(K_i)$ от 1/Т в соответствии с уравнением Вант-Гоффа.

Совокупный анализ термодинамических данных, полученных для неповрежденной ДНК и ДНК, содержащей охоG, позволяет заключить, что в обоих случаях первой стадией является образование неспецифического комплекса, сопровождающееся «плавлением» цепи ДНК [120, 386, 400], что следует из эффекта возрастания интенсивности флуоресценции аPu как для ${}^{aPu}G/C_{12}$ -лиганда, так и aPu охоG/C₁₂-субстрата. Кроме того, в ходе первой стадии происходит сканирование повреждения путем вставки в двойную спираль ДНК «клина» в виде аминокислотного остатка Туг203 и выворачивание оснований Gua и охоGua из спирали ДНК в экзо-сайт, что характеризуется энергетически выгодными изменениями энтальпии и энтропии (таблицы 11 и 12). Эта стадия имеет

близкие значения термодинамических параметров как для ^{aPu}G/C₁₂-лиганда, так и для ДНК-субстратов, содержащих охоG.

В случае взаимодействия hOGG1 с ^{аРu}G/C₁₂-лигандом регистрируется вторая стадия, которая так же характеризуется возрастанием интенсивности флуоресценции аPu и заканчивается к ~0,2 с. Из рис. 27 видно, что, в отличие от ^{аPu}охоG/C₁₂-субстрата, в случае $^{aPu}G/C_{12}$ -лиганда на больших временах не происходит падения интенсивности флуоресценции aPu, что указывает на отсутствие внедрения остальных аминокислотных остатков фермента (Asn149, Arg154 и Arg204) в ДНК-спираль. Эта стадия в случае $^{aPu}G/C_{12}$ -лиганда благоприятна по энтальпийному вкладу, но неблагоприятна по изменению энтропии, что может быть следствием образования новых энергетически выгодных контактов, но структурно более жесткого комплекса. Такой результат согласуется со сделанным ранее выводом на основе мутационного анализа о том, что на этой стадии происходит изгибание цепи ДНК и более глубокое внедрение остатка Tyr203 внутрь двойной спирали [400]. В целом, образование комплекса hOGG1 с неповрежденным $^{aPu}G/C_{12}$ -лигандом является термодинамически выгодным процессом с $\Delta G^o_{298} = -6,9$ ккал/моль.

В случае взаимодействия hOGG1 с ДНК, содержащей охоG, вторая стадия узнавания является энергетически нейтральной повреждения В случае регистрации конформационных изменений ДНК-субстратов, и проигрыш энтальпии компенсируется ростом энтропии. Увеличение энтропии при взаимодействии ДНК-связывающих белков с ДНК, как правило, обусловлено двумя факторами: десольватацией полярных групп в области контакта белок-ДНК [408] вытеснением высокоупорядоченных И «кристаллических» молекул воды из бороздок ДНК [410]. На этой стадии, начиная с 0,2 с, происходит падение интенсивности флуоресценции aPu, что означает внедрение дополнительных остатков аминокислот внутрь спирали ДНК. Важно отметить, что это внедрение происходит сразу же после выворачивания основания из спирали. Следовательно, эта стадия очень важна для дискриминации между основаниями Gua и охоGua. Учитывая данные рентгеноструктурного анализа [113, 121, 391, 396, 397], можно сделать вывод, что на этой стадии основание oxoGua помещается в активный центр, где формируется стэкинг с Phe319, а также образуются водородные связи между остатками Arg154, Arg204 и Asn149 фермента и остатком Cyt противоположной цепи ДНК, а His270 образует водородные связи с фосфатной группой охоG [400, 407].

Последняя третья стадия узнавания поврежденного основания приводит к формированию каталитически компетентной конформации hOGG1. На этой стадии

основание охоGua полностью находится внутри активного центра и образует контакт с Gly42, а Tyr203 целиком встроен внутрь спирали ДНК. В активном центре происходят локальные перегруппировки, необходимые для осуществления каталитической стадии гидролиза N-гликозидной связи. В случае aPu oxoG/C₁₂-субстрата формирование каталитического комплекса характеризуется большой эндотермичностью за счет изменения энтальпии, что компенсируется существенным ростом энтропии. Рост энтропии происходит благодаря дегидратации области контакта белок-ДНК и образованию более компактного фермент-субстратного комплекса.

Таким образом, на основании полученных термодинамических данных можно заключить, что связывание hOGG1 с неповрежденной ДНК приводит к локальному плавлению дуплекса и выворачиванию основания Gua из двойной спирали, однако это основание не встраивается внутрь активного центра, в отличие от основания охоGua, как это следует из кинетического поведения интенсивности флуоресценции 2-аминопурина.

Образование второго и третьего комплексов hOGG1 с ДНК, содержащей охоG, происходит с положительными изменениями энтальпии и энтропии. Неблагоприятные вклады в изменение энтальпии могут давать различные процессы, например, десольватация полярных групп белка [408]. Это может происходить при связывании белка с малой бороздкой ДНК, из которой при этом удаляются молекулы воды, находившиеся в высокоструктурированном связывание квазикристаллическом состоянии. Такое характеризуется положительным изменением энтальпии, компенсируемым за счет роста энтропии, то есть является энтропийно-стимулируемым [410]. Именно такой тип взаимодействия предполагается для образования комплекса hOGG1 с ДНК, содержащей охоG, при котором арильная группа остатка Туг203 hOGG1 вставляется в ДНК-спираль со стороны малой бороздки [121], что подтверждается характером изменения термодинамических параметров.

Другой причиной положительного изменения ΔH° может быть перестройка структуры ДНК. Сравнение изменений энтальпии и энтропии при образовании широкого набора белково-нуклеиновых комплексов показывает [408], что в этих комплексах ДНК изогнута и деформирована, что приводит к неблагоприятному изменению энтальпии, компенсируемому за счет роста энтропии. В соответствии со структурными данными [121] в каталитически активном комплексе hOGG1 в районе поврежденного нуклеотида спираль ДНК изогнута примерно на 70°. Такое изгибание ДНК должно происходить на второй и третьей стадиях взаимодействия hOGG1 с ДНК, содержащей охоG, давая соответствующие вклады в изменения ΔH° и ΔS° .

3.2.2. Эндонуклеаза III Nth из E. coli

Эндонуклеаза III (Nth) из E. coli впервые описана как нуклеаза, которая образует одноцепочечный разрыв в двойной цепи ДНК, поврежденной УФ-излучением [95]. Дальнейшие исследования показали, Nth обладает широкой что субстратной специфичностью и наиболее активен по отношению к окисленным пиримидинам, таким как тимин-гликоль [102, 410, 411]. Фермент Nth содержит [4Fe-4S] кластер [412]. Было показано, что фермент обладает двумя активностями и, аналогично своему структурному гомологу hOGG1, катализирует гидролиз N-гликозидной связи с образованием свободного модифицированного основания (N-гликозилазная активность), после чего происходит разрыв фосфодиэфирной связи со стороны З'-атома углерода остатка 2'-дезоксирибозы путем В-элиминирования с образованием в ДНК одноцепочечного разрыва (АР-лиазная активность) (рис. 6) [413, 414]. Бифункциональная активность Nth связана с наличием в активном центре фермента остатков Lys120 и Asp138 [413, 415-417].

Регистрация степени расщепления ДНК-дуплексов, содержащих DHU и AP-сайт, путем разделения продуктов реакции в полиакриламидном геле показала, что скорость Nгликозилазной реакции равна либо превышает скорость AP-лиазной реакции, и APлиазная реакция является лимитирующей стадией каталитического процесса (рис. 28).



Рис. 28. Степень расщепления ДНК-дуплексов, содержащих DHU и AP-сайт. Концентрация ДНКдуплексов и Nth равна 1,0 мкМ.

Наиболее информативным подходом для исследования взаимных конформационных изменений, происходящих в процессе фермент-субстратного взаимодействия, является получение комбинации данных, полученнных путем анализа изменений собственной триптофановой флуоресценции фермента и флуоресценции флуорофоров, включенных в модельные ДНК-дуплексы. Анализ рентгеноструктурных данных [418, 419] показал (рис.

29a), что два остатка триптофана фермента Nth из *E. coli* (Trp132 и Trp178) расположены вдали от ДНК-связывающего центра. Остаток Trp178 находится в достаточно жестко организованном FeS-домене фермента, что может ограничивать его подвижность, а также стабилизировать его микроокружение в процессе взаимодействия с ДНК. Остаток Trp132 расположен на поверхности белка с противоположной стороны от ДНК-связывающего канала. Сравнение структуры свободного Nth из E. coli и комплекса Nth из G. stearothermophilus с дуплексом ДНК, содержащим F-сайт (рис. 29б), косвенно свидетельствует о том, что при образовании комплекса с ДНК не происходит значительных конформационных превращений в области остатка Trp132. Из-за этих структурных особенностей расположения остатков Тгр в ферменте Nth дикого типа не удалось зарегистрировать изменения интенсивности флуоресценции Тгр в процессе Nth с ДНК-субстратами. Поэтому для исследования процесса взаимолействия фермента с ДНК-субстратами использовали взаимодействия олигонуклеотиды, содержащие флуоресцирующие аналоги оснований – 2-аминопурин aPu, пирролоцитозин C^{py} , 3-гидроксихромон 3HC и 1,3-диаза-2-оксофеноксозин tC^O [377].



Рис. 29. Структура свободного фермента Nth из *E. coli* (*a*, PDB ID 2ABK) и структура комплекса Nth из *G. stearothermophilus* с дуплексом ДНК, содержащим F-сайт (δ , PDB ID 1P59). Показан [4Fe-4S] кластер (желтые и фиолетовые шары), боковые радикалы каталитических аминокислотных остатков Lys120 и Asp138, а также остатки Trp132 и Trp178 (синий цвет). В комплексе F-сайт расположен в активном центре фермента, показаны каталитические остатки Lys121 и Asp139 (номера соответствуют Lys120 и Asp138 Nth из *E. coli*).



Рис. 30. Зависимость интенсивности флуоресценции аналогов оснований от строения модельных ДНК-дуплексов, содержащих флуорофор с 5'- или 3'-стороны от поврежденного основания DHU либо в комплементарной цепи напротив повреждения. Влияние положения остатка aPu (*a*) на активность Nth по сравнению с дуплексом, не содержащим aPu (время реакции 60 с при 25°C) и (δ) на чувствительность к конформационным изменениям ДНК, происходящим в процессе взаимодействия с Nth. (*в*) Чувствительность aPu, C^{py} и tC^o, расположенных в комплементарной цепи напротив DHU, к конформационным изменениям ДНК, происходящим в процессе взаимодействия с Nth.

Был проведен выбор оптимального строения модельных ДНК-дуплексов, содержащих флуорофор с 5'- или 3'-стороны от поврежденного основания либо в комплементарной цепи напротив повреждения. В первую очередь, методом разделения продуктов реакции гель-электорофорезом установлено влияние положения флуорофоров на активность фермента. Было показано (рис. 30*a*), что остаток aPu, имеющий наименьшие отличия от природных пуриновых оснований по сравнению с другими флуорофорами, не оказывал влияния на активность Nth. Однако, нужно отметить, что ДНК-дуплексы, содержащие с 5'-стороны от DHU флуорофоры C^{py} , t C^{O} и 3HC, приобрели устойчивость к действию фермента (данные не приводятся). Таким образом, введение этих модифицированных нуклеотидов с 5'-стороны от повреждения приводит к полной потере активности фермента Nth, и такие модельные ДНК-дуплексы не могут быть использованы в дальнейшей работе. Далее анализировали чувствительности флуорофоров к конформационным изменениям ДНК, происходящим в процессе взаимодействия с Nth. Из рис. 30б видно, что остаток aPu, расположенный с 3'-стороны от DHU, позволяет зарегистрировать большее число конформационных переходов в ДНК. Аналогичный анализ для флуорофоров, расположенных напротив DHU, показал (рис. 30e), что остаток t C^{O} имеет более выраженные изменения интенсивности флуоресценции по сравнению с aPu и C^{py} .

Таким образом, в качестве модельных ДНК-субстратов были выбраны конструкции в которых aPu расположен с 3'-стороны от повреждения, а 1,3-диаза-2-оксофеноксазин tC^O расположен в комплементарной цепи напротив повреждения.

3.2.2.1. Конформационные изменения поврежденной цепи ДНК

Конформационные изменения поврежденной цепи ДНК были зарегистрированы по изменению интенсивности флуоресценции остатков 2-аминопурина, расположенного с 3'стороны от повреждения. Образование неспецифического комплекса Nth с неповрежденной ДНК (C^{aPu}/G_{12} -лиганд) не приводило к изменению интенсивности флуоресценции aPu, что свидетельствует о незначительном влиянии фермента на структуру ДНК.

При взаимодействии Nth с дуплексом $\mathbf{F}^{a\mathbf{Pu}}/\mathbf{G}_{12}$, сначала интенсивность флоресценции не изменялась, а начиная t $\approx 0,1$ с наблюдали уменьшение интенсивности флуоресценции вплоть до 10 с (рис. 31*a*). Падение интенсивности флуоресценции aPu может быть связано с увеличением гидрофобности окружения в области остатка aPu и характеризует встраивание в дуплекс аминокислотных остатков фермента. Данный процесс хорошо описывается одностадийным равновесием (схема 4). Значения констант скорости реакций, соответствующих схеме 4, представлены в таблице 13.

При взаимодействии Nth с дуплексом, содержащим AP-сайт (**AP^{aPu}/G**₁₂-субстрат), после образования каталитически активного комплекса протекает реакция βэлиминирования, ведущая к накоплению ДНК-продукта, и последующая стадия диссоциации комплекса с продуктом. При этом на кинетических кривых можно выделить 4 области изменения интенсивности флуоресценции aPu: 1) небольшой рост интенсивности флуоресценции до 0,2 с, 2) падение до 3 с, 3) повторный рост до 20 с и 4) плато (рис. 31*б*). Эти кривые удовлетворяют кинетической схеме, которая включает 2 стадии комплексообразования, необратимую каталитическую реакцию и обратимую стадию высвобождения продукта из активного центра фермента (схема 5). Значения констант скорости реакций, соответствующих схеме 5, представлены в таблице 13.



Рис. 31. Экспериментальные и теоретические кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков aPu, полученные при взаимодействии Nth с ДНК-дуплексами, содержащими F-сайт (a), AP-сайт (δ) и DHU (b). Концентрация ДНК-дуплексов = 1,0 мкM, концентрация Nth указана на рисунке.

Схема 4

$$E + F \xrightarrow{k_1} E \cdot F$$

где Е – фермент, F – нерасщепляемый аналог субстрата $\mathbf{F}^{\mathbf{aPu}}/\mathbf{G}_{12}$, E•F – комплекс фермента с аналогом субстрата.

Схема 5

$$E + AP \xrightarrow{k_1} (E \cdot AP)_1 \xrightarrow{k_2} (E \cdot AP)_2 \xrightarrow{k_3} E \cdot P \xrightarrow{K_P} E + P$$

где Е – фермент, АР - **АР^{аРи}/G**₁₂- и **АР^{tCo}/tC^O**₁₂-субстраты, (Е•АР)_n – фермент-субстратные комплексы, Е•Р – комплекс фермент-продукт, Р – продукт реакции.

При переходе от AP^{aPu}/G_{12} -субстрата к DHU^{aPu}/G_{12} -субстрату, содержащему остаток 5,6-дигидроурацила, из кривых флуоресценции, отражающих конформационные изменения ДНК (рис. 31*в*), видно, что по сравнению с AP^{aPu}/G_{12} -субстратом имеет место замедление фазы падения интенсивности флуоресценции, которая протекает в интервале времени 20–40 с. Это свидетельствует о том, что процесс выворачивания поврежденного основания DHU из ДНК и его встраивание в активный центр фермента замедляет время образования каталитически активного комплекса. Рост интенсивности флуоресценции на более длинных временах характеризует необратимую стадию катализа и высвобождение продукта (схема 6). Константы скорости реакций, соответствующих данной схеме, приведены в таблице 13.

Схема 6

$$E + DHU \xrightarrow{k_1} (E \cdot DHU)_1 \xrightarrow{k_2} (E \cdot DHU)_2 \xrightarrow{k_3} E \cdot P \xrightarrow{K_P} E + P$$

где Е – фермент, DHU – **DHU**^{aPu}/ G_{12} - и **DHU**^{$tCo}/<math>tC^{O}_{12}$ -субстраты, (E•DHU)_n – ферментсубстратные комплексы, E•P – комплекс фермент-продукт, P – продукт реакции.</sup>

Константы	F^{aPu}/G_{12}	AP^{aPu}/G_{12}	DHU ^{aPu} /G ₁₂
$k_1, \mathrm{M}^{-1} \times \mathrm{c}^{-1}$	$(0,13\pm0,01)\times10^{6}$	$(3,6\pm0,8)\times10^{6}$	$(95 \pm 5) \times 10^{6}$
k_{-1}, c^{-1}	$0,30 \pm 0,03$	$5,6 \pm 1,4$	670 ± 30
k_2, c^{-1}		$0,5 \pm 0,1$	$0,29 \pm 0,09$
k_{-2}, c^{-1}		$0,03 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,02$
k_3, c^{-1}		$0,38 \pm 0,02$	$0,054 \pm 0,009$
K _P , M		$(1,1\pm0,6)\times10^{-5}$	$(1,6\pm0,6)\times10^{-5}$

Таблица 13. Значения констант скорости, характеризующие взаимодействие фермента Nth с ДНК-субстратами, содержащими 2-аминопурин с 3'-стороны от повреждения

Как видно из таблицы 13, константы скорости 1-й стадии для $\mathbf{F}^{a\mathbf{Pu}}/\mathbf{G}_{12}$, $\mathbf{AP}^{a\mathbf{Pu}}/\mathbf{G}_{12}$, $\mathbf{DHU}^{a\mathbf{Pu}}/\mathbf{G}_{12}$, различаются в пределах 3-х порядков. Причина таких различий состоит в том, что для $\mathbf{DHU}^{a\mathbf{Pu}}/\mathbf{G}_{12}$ первая стадия, характеризующая образование первичного комплекса и сопровождающаяся нарушением структурры дуплекса в области поврежденного основания и флуорофора приводит к появлению фазы быстрого роста интенсивности флуоресценции aPu. В то же время для $\mathbf{F}^{a\mathbf{Pu}}/\mathbf{G}_{12}$ и $\mathbf{AP}^{a\mathbf{Pu}}/\mathbf{G}_{12}$, у которых основание aPu не имеет контактов с поврежденным основанием в силу его отсутствия, эта стадия не может быть зарегистрирована и соответственно на кинетических кривых отражены процессы дальнейшей перестройки структуры ДНК-дуплекса, которые проходят на более поздних временах и имеют меньшее значение константы скорости.

3.2.2.2. Конформационные изменения комплементарной цепи ДНК

При взаимодействии Nth с неповрежденным дуплексом (G/tC^{O}_{12} -лиганд), содержащим остаток гуанина напротив флуорофорной группы 1,3-диаза-2оксофеноксазина, наблюдалось увеличение интенсивности флуоресценции, с выходом на плато к 10–15 секундам (рис. 32*a*). Такой рост описывается одностадийным равновесием и может характеризовать процесс неспецифического связывания фермента с ДНКдуплексом (схема 7). Значения констант скорости реакций, соответствующих схеме 7, представлены в таблице 14.

Схема 7

$$E + G \xrightarrow{k_1} E \cdot G$$

где Е – фермент, G – неспецифический лиганд G/tC⁰₁₂, содержащий остаток гуанина, E•G – комплекс фермента с неповрежденным ДНК-дуплексом.

Для **F/tC⁰**₁₂-лиганда, содержащего F-сайт напротив 1,3-диаза-2-оксофеноксазина, наблюдается падение интенсивности флуоресценции на временах ≤ 10 мс, по-видимому, связанное с образованием неспецифического фермент-субстратного комплекса (рис. 32*б*). Далее можно выделить стадию роста интенсивности флуоресценции tC^O, которая выходит на плато к 7 с. Такие изменения описываются двумя равновесными стадиями (схема 8). Значения констант скорости реакций, соответствующих схеме 8, представлены в таблице 14.



Рис. 32. Экспериментальные и теоретические кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков tC^{0} , полученные при взаимодействии Nth с неповрежденным ДНКдуплексом (*a*) и дуплексами, содержащими F-сайт (δ), AP-сайт (ϵ) и DHU (ϵ). Концентрация ДНКдуплексов равна 1,0 мкM, концентрация Nth указана на рисунке.

Схема 8

$$\mathbf{E} + \mathbf{F} \xrightarrow{k_1} (\mathbf{E} \cdot \mathbf{F})_1 \xrightarrow{k_2} (\mathbf{E} \cdot \mathbf{F})_2$$

где Е – фермент, F – нерасщепляемый аналог субстрата F/tC^{0}_{12} , (E•F)_n – комплексы фермента с аналогом субстрата.

В случае **AP/tC⁰**₁₂-субстрата, содержащего AP-сайт напротив tC⁰, наблюдалось 2 стадии падения интенсивности флуоресценции: первое падение на временах ≤ 10 мс, и второе – на временах ≤ 2 с (рис. 32*в*). Эти изменения флуоресценции соответствуют стадии неспецифического связывания и образованию каталитически активного комплекса фермента с субстратом. Дальнейший рост интенсивности флуоресценции вплоть до 40–50
с с выходом на плато характеризует необратимую стадию катализа и высвобождение продукта реакции из фермент-субстратного комплекса. Кинетическая схема, удовлетворяющая таким изменениям, аналогична той, что была предложена ранее для дуплекса, содержащего 2-аминопурин (схема 5). Константы скорости реакций, соответствующие данной схеме, приведены в таблице 14.

Таблица 14. Значения констант скорости, характеризующие взаимодействие фермента Nth с ДНК-субстратами, содержащими остаток оксофеноксазина напротив повреждения

Константы	G/tC ⁰ 12	F/tC ⁰ ₁₂	AP/tC ⁰ ₁₂	DHU/tC ⁰ 12
$k_1, M^{-1} \times c^{-1}$	$(3,8\pm0,9)\times10^3$	$(180 \pm 20) \times 10^{6}$	$(77 \pm 17) \times 10^{6}$	$(98 \pm 18) \times 10^{6}$
k_{-1}, c^{-1}	$0,20 \pm 0,01$	78 ± 16	356 ± 45	139 ± 10
k_2, c^{-1}		$0,09 \pm 0,03$	5 ± 2	$6,4 \pm 1,4$
k_{-2}, c^{-1}		$1,0 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$
k_3, c^{-1}			$0,13 \pm 0,01$	$0,078 \pm 0,003$
$K_{\rm P},{ m M}$			$(14,6\pm4,6)\times10^{-5}$	$(11,3\pm0,4)\times10^{-5}$
$K_{\rm a},{ m M}^{-1}$		$0,2 \times 10^{6}$	$1,8 \times 10^{6}$	$1,7 \times 10^{6}$

^a $K_a = K_1 \times K_2, K_i = k_i / k_{-i}.$

Для **DHU/tC⁰**₁₂-субстрата, содержащего напротив DHU остаток 1,3-диаза-2оксофеноксазина, при концентрациях Nth 0,5–4,0 мкМ также зарегистрировано двухстадийное уменьшение интенсивности флуоресценции. Из рис. 32z видно, что первое падение происходит на временах менее 20 мс и соответствует стадии неспецифического связывания. Затем в диапазоне времени 0,1–1 с происходит второе падение, которое должно характеризовать образование каталитически активного комплекса. Дальнейший рост интенсивности флуоресценции до 300 с связан с необратимой каталитической стадией и высвобождением продукта. В случае дуплекса, содержащего остаток оксофеноксазина, полученная кинетическая схема аналогична схеме, полученной для взаимодействия фермента с дуплексом, содержащим 2-аминопурин (схема 6). Значения констант скорости для дуплекса, содержащего остаток 5,6-дигидроурацила, приведены в таблице 14.

Совокупный анализ полученных данных показал, что ДНК претерпевает множественные конформационные превращения в процессе образования ферментсубстратного комплекса. Сравнение данных для дуплексов, несущих различные повреждения в комбинации с разными типами флуоресцентных меток, позволяет детализировать стадии ферментативного процесса.

В случае ДНК-дуплексов, содержащих F- и AP-сайты, остаток aPu, расположенный с 3'-стороны от отсутствующего основания, имеет прямой контакт с водным раствором, то есть, в составе этих дуплексов аРи находится в гидрофильном окружении. Поэтому образование первичного столкновительного комплекса с молекулой фермента, вероятно, вызывающее локальное «плавление» цепи ДНК, не сказывается на интенсивности флуоресценции aPu. По этой причине процесс связывания фермента с таким субстратом содержал лишь одну равновесную стадию, а не две, как в случае tC⁰-метки. Переход aPu в сопровождающийся гидрофобное окружение, уменьшением интенсивности флуоресценции aPu, свидетельствует о встраивании остатка Gln41 в двойную спираль, которое происходит после выворачивания поврежденного нуклеотида. При этом в случае АР^{аРи}/G₁₂-субстрата этому предшествует стадия стабилизации вывернутого АР-сайта, выраженная незначительным ростом интенсивности флуоресценции аРи на начальном участке кинетической кривой на временах менее 0,2 с. В случае ДНК-дуплекса, содержащего DHU, остаток аРи экранируется от водного раствора поврежденным основанием. Поэтому стадия выворачивания основания DHU и его внеспиральная стабилизация в активном центре фермента приводит к хорошо выраженному быстрому росту интенсивности флуоресценции aPu в начальный момент времени (до 10 мс). Уменьшение интенсивности флуоресценции aPu, следующее за этой стадией, как и в случае с F- и AP-дуплексами, указывает на встраивание остатка Gln41 в двойную спираль. Однако этот процесс происходит в 5-10 раз медленнее, заканчиваясь лишь к 30 с, что свидетельствует о том, что этот процесс более энергетически затратен, чем в случае АРсайта.

Сравнение данных, полученных при использовании в качестве флуоресцентного маркера tC^O позволило проанализировать конформационные изменения комплементарной цепи ДНК. Однако закономерности изменения интенсивности флуоресценции tC^O не такие однозначные, как в случае aPu [371]. Так, в одноцепочечном состоянии интенсивность флуоресценции tC^O зависит от природы азотистых оснований с 3'- и 5'- стороны, а в дуплексе эта зависимость практически исчезает. Тем не менее, интенсивность флуоресценции tC^O, расположенного между основаниями гуанина, как в нашем случае, уменьшается в одноцепочечном состоянии по сравнению с дуплексом. Исходя из этого, можно предположить, что уменьшение интенсивности флуоресценции на начальном участке кинетических кривых в случае ДНК-дуплексов, содержащих F-сайт, AP-сайт и

DHU, может характеризовать процесс изгибания ДНК или вставку остатка Leu81 и одновременное выворачивание поврежденного нуклеотида из дуплекса. Нужно отметить, что эти процессы происходят до встраивания Gln41 в дуплекс, которое было зарегистрировано по изменению интенсивности aPu.

Вторая фаза связывания ДНК-дуплекса, содержащего F-сайт, приводит к росту интенсивности флуоресценции tC^{O} . С другой стороны, вторая фаза, наблюдаемая с расщепляемыми AP- и DHU-субстратами, сопровождается уменьшением сигнала флуоресценции tC^{O} . Сравнение структуры ДНК в непосредственной близости от повреждений в случаях F-сайта и восстановленного основания Шиффа с AP-сайтом [419] указывает на то, что F-сайт расположен глубже в кармане активного центра фермента, что приводит к уменьшению расстояния между соседними основаниями и возможному стэкингу с частью ароматического кольца остатка tC^{O} . Это приводит к появлению фазы роста в случае F-сайта. В то же время образование каталитически компетентного комплекса приводит к релаксации этого состояния и сопровождается дальнейшим снижением интенсивности флуоресценции.

Сравнение значений констант скорости k_3^{aPu} and k_3^{tCo} , полученных по измерениям флуоресценции aPu и tC^O (таблицы 13 и 14) свидетельствуют о том, что скоростьлимитирующей стадией ферментативного процесса является гидролиз N-гликозидной связи поврежденного основания.

Медленный рост интенсивности флуоресценции tC⁰ в процессе связывания неповрежденного дуплекса и образования неспецифического комплекса также может свидетельствовать о частичном плавлении ДНК-дуплекса. Нарушение структуры ДНК в неспецифическом комплексе может быть результатом попыток фермента вывернуть азотистое основание независимо от того, повреждено оно или нет. Выворачивание неповрежденного азотистого основания в неспецифическом комплексе было доказано для другого фермента этого же структурного семейства HhH-GPD – 8-оксогуанин-ДНКгликозилазы человека hOGG1 [396, 398]. Анализ всех доступных структур комплексов ДНК-гликозилаз с неповрежденной ДНК свидетельствуют о том, что аминокислотные остатки ферментов, выполняющие функцию сенсора повреждения, уже В неспецифическом встроены ДНК 420-425]. Сравнение комплексе В [396, пространственной структуры ДНК-связывающего домена ферментов Nth и hOGG1 показывает (рис. 33), что аминокислотным остаткам Arg154 и Arg204, отвечающим за вытягивание основания Cyt y hOGG1, соответствуют остатки Arg78 и Arg84 в Nth. При этом ключевому остатку Tyr203 у hOGG1, вклинивающемуся в ДНК-дуплекс на начальной стадии узнавания повреждения, пространствено соответствует Leu82 в G. *Stearothermophilus*. Кроме того, у Nth также есть «функциональный» аналог остатка Asn149. Это Gln42 в Nth из G. *stearothermophilus*.

Полученные данные свидетельствуют о том, что у Nth из *E. coli* остаток Leu81 выполняет функцию сенсора поврежденного нуклеотида, и попытки его встраивания в дуплекс в случае взаимодействия с неповрежденной ДНК приводят к росту интенсивности флуоресценции tC^{O} . Анализ активности мутантной формы Nth Leu81Ala, проведенный в недавних работах [17, 426, 427], показал, что данная замена приводит к потере способности фермента узнавать поврежденный нуклеотид и его полной каталитической инактивации. При этом пространственное совпадение остатков Tyr2O3 и Leu81 в структурах hOGG1 и Nth подтверждают их «функциональную» гомологию.



Рис. 33. Сравнение пространственной структуры ДНК-связывающих центров hOGG1 (розовый, PDB ID 1FN7 [113]) и Nth из G. Stearothermophilus (зеленоватый, PDB ID 1P59, [419]) с ДНК, содержащей F-сайт. (a) Остатки аргинина, взаимодействующие с фосфатными группами комплементарной цепи ДНК. Arg154 и Arg204 в hOGG1 выделены красным цветом, Arg78 и Arg84 в Nth выделены зеленым цветом. (б) Пространственное соответствие остатков Туr203 и Gln149 (красный) в hOGG1 и остатков Leu82 и Gln42 (зеленый) в Nth.

Таким образом, совокупность полученных для Nth кинетических и термодинамических данных, а также анализ мутантных форм Nth позволила установить молекулярно-кинетический механизм фермент-субстратного взаимодействия и выяснить природу стадий, обеспечивающих высокую специфичность узнавания ферментами

поврежденного участка в молекуле ДНК (рис. 34). Как и в случае hOGG1, образование каталитически компетентного комплекса протекает через последовательность стадий, сопровождающийся изменением конформаций молекул Nth и ДНК-субстратов. Из анализа зависимостей от времени интенсивностей флуоресценции фермента и ДНК, а также качественного характера этих изменений сделан вывод о природе отдельных стадий. Предложены кинетические схемы и определены константы скорости реакций, приводящих к специфическому узнаванию поврежденных оснований и их удалению из ДНК. Остаток Leu81 выполняет функцию сенсора поврежденного нуклеотида и участвует в процессе поиска поврежденного нуклеотида на этапе образования неспецифического комплекса. В неспецифическом комплексе происходит изгибание ДНК-дуплекса и его частичное плавление. Выворачивание поврежденного нуклеотида из дуплекса ДНК и встраивание остатка Gln41 происходят на второй стадии взаимодействия. Показано, что фермент выворачивает более объемный нуклеотид, содержащий основание DHU, медленнее, чем АР-сайт. Эти процессы приводят к образованию каталитически компетентного комплекса, в котором осуществляются каталитические стадии гидролиза N-гликозидной связи и реакция β-элиминирования 3'-фосфатной группы.



Рис. 34. Схематический механизм структурных перестроек в процессе взаимодействия Nth и поврежденной ДНК. В качестве структурных моделей для E, (E•S)₂ и (E•P) использованы пространственные структуры 2ABK [418], 1P59 [419] и 1ORN [419] соответственно.

3.2.3. Метилцитозин-связывающий домен 4 человека MBD4

ДНК-гликозилаза MBD4 содержит два домена – метилцитозин-связывающий и ДНКгликозилазный. Каталитический N-гликозилазный домен MBD4^{cat} состоит из 138 аминокислотных остатков (остатки 426–580), образующих 9 α-спиралей, которые формируют глобулярную структуру и карман активного центра [428]. Структура MBD4^{cat} позволяет отнести его к семейству «спираль-шпилька-спираль» (HhH), названному так изза мотива α7-петля-α8, характерного для различных белков этого семейства.

Основным субстратом MBD4 является ДНК, содержащая некомплементарные пары G•T либо G•U (рис. 35) [429]. MBD4 также активен в отношении 5-гидроксиметилурацила (5-hmU) [83]. Считается, что 5-hmU образуется в качестве интермедиата в многостадийном пути активного деметилирования, в котором 5-meC гидроксилируется TET-диоксигеназами с образованием 5-гидроксиметилцитозина (5-hmC). Затем 5-hmC дезаминируется дезаминазой AID с образованием 5-hmU и удаляется при участии MBD4 в процессе эксцизионной репарации оснований [430]. MBD4 активен и в отношении некоторых галогенированных субстратов: 5-CIU и 5-BrU, образующихся при воспалительных процессах, и 5-FU, который может возникать при химиотерапии [431]. Более того, фермент активен по отношению к $3,N^4$ -этеноцитозину (ϵ C), который образуется при перекисном окислении липидов и метаболизме винилхлорида [143].



Рис. 35. Гидролиз N-гликозидной связи и удаление поврежденного основания с образованием АРсайта, катализируемый MBD4.

В настоящее время определены структуры MBD4^{cat} в свободном состоянии и в комплексах с ДНК-дуплексами, содержащими пары 5-hmU/G, T/G и AP/G [84, 432]. Как показано на рис. 36*a*, в комплексе с продуктом реакции фермент взаимодействует преимущественно с пятью нуклеотидами поврежденной цепи ДНК. Образование фермент-субстратного комплекса не приводит к значительным конформационным перестройкам по сравнению со свободным белком (рис. 366). В то же время ДНК-дуплексы в комплексе с MBD4^{cat} изогнуты в области модифицированного нуклеотида, нуклеотид вывернут из двойной спирали, а азотистое основание находится в активном центре. MBD4^{cat} образует прямые контакты с пятью фосфатными группами,

расположенными с 5'- и 3'-стороны от вывернутого нуклеотида [432]. Два аминокислотных остатка, Arg468 и Leu508, встраиваются в ДНК через малую бороздку и заполняют пространство в дуплексе, которое образуется после выворачивания модифицированного нуклеотида. Предполагается, что гидролиз N-гликозидной связи протекает по механизму нуклеофильного замещения [83]. Нуклеофильная атака на C1'-атом осуществляется либо координированной в активном центре фермента молекулой воды, либо карбоксильной группой Asp560 [83, 432].

Поэтому для понимания кинетических особенностей узнавания повреждения представлось интересным изучить конформационные изменения как самого фермента MBD4^{cat}, так и ДНК-субстратов в процессе их взаимодействия [433].



Рис. 36. Схематическое изображение пространственной структуры комплекса MBD4^{cat} с ДНК (*a*) функционально важные аминокислотные остатки, участвующие в образовании специфических контактов между ферментом и ДНК [432]. (*б*) Сравнение структур свободного фермента MBD4^{cat} (розовый, PDB ID 4E9E, [84]) и комплекса фермента MBD4^{cat} с ДНК (зеленый, PDB ID 4DK9, [432]). АР-сайт (черный) вывернут из дуплекса и расположен в активном центре фермента, аминокислотные остатки Агg468 и Leu508 (синий) встроены в дуплекс ДНК.

3.2.3.1. Конформационные изменения MBD4^{cat} при взаимодействии с ДНКсубстратами разной длины

Взаимодействие MBD4^{cat} с 28-звенным ДНК-дуплексом

На рис. 37*а* представлены кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp в процессе взаимодействия MBD4^{cat} с 28-звенным U/G₂₈-

субстратом. Поскольку MBD4^{cat} образует контакты лишь с пятью нуклеотидами ДНК, использование в качестве субстрата 28-звенного ДНК-дуплекса приводит к значительному вкладу в кинетику процесса стадии поиска остатка урацила в ДНК. Действительно, на полученных кинетических кривых видно, что фаза уменьшения интенсивности флуоресценции Trp наблюдается в широком диапазоне времени 2 мс–10 с. Затем следует фаза роста интенсивности флуоресценции Trp в диапазоне времени 10–100 с.



Рис. 37. Кинетика взаимодействия MBD4^{cat} с U^{Trp}/G₂₈-субстратом. (*a*) Экспериментальные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp и расчетные кривые, полученные путем обработки данных согласно схеме 9. [MBD4^{cat}] = 2,0 мкМ, концентрация U^{Trp}/G₂₈ изменяется от 1,0 до 4,0 мкМ. (*б*) Зависимость концентрации продуктов N-гликозилазной реакции от времени при взаимодействии MBD4^{cat} с U/G₂₈-субстратом. [MBD4^{cat}] = 4,0 мкМ, концентрация U/G₂₈ изменяется от 0,25 до 2,0 мкМ.

Анализ накопления продуктов реакции путем разделения реакционной смеси электрофорезом в ПААГ (рис. 376) показывает, что процесс характеризуется двумя фазами: быстрой (до ~200 с) и медленной (до 1600 с и выше). На начальном участке кинетических кривых до 200 с наблюдается «скачок», за которым следует медленный рост. Такой вид кривых свидетельствует о существовании скорость-лимитирующей стадии после каталитической реакции. Увеличение концентрации U/G_{28} -субстрата с 0,25 мкМ до 1,0 мкМ приводит к увеличению степени расщепления субстрата на стадии «скачка» до 0,7 мкМ. Однако при дальнейшем увеличении концентрации U/G_{28} -субстрата до 2,0 мкМ степень расщепления незначительно увеличивается до 0,9 мкМ, что свидетельствует о насыщении активной формы фермента ДНК-субстратом. Таким образом, данные о степени накопления продуктов реакции показывают, что концентрация

активной формы фермента равна примерно 1,0 мкМ. Достаточно низкая удельная активность каталитического домена MBD4^{cat} (~ 25% от общей концентрации фермента), по-видимому, связана с особенностями структурной сборки полипептида в функциональный белок в процессе экспрессии гена в клетках *E. coli* и согласуется с данными работы [434].

Таким образом, можно предположить, что падение интенсивности флуоресценции Trp в интервале времени 2 мс – ~10с характеризует образование первичного комплекса и поиск модифицированного основания, а рост в интервале ~(10-100) с характеризует образование каталитически-компетентной конформации фермента и начало процесса накопления продукта. Необходимо отметить, фаза роста ЧТО интенсивности флуоресценции Trp (10 – 100 c) на рис. 37*а* совпадает по времени с началом накопления продуктов реакции на рис. 376. Скорость-лимитирующей стадией ферментативного процесса, скорее всего, является стадия диссоциации комплекса фермент-продукт, что согласуется с выводами, сделанными ранее в работе [143].

Количественный анализ кинетических кривых, полученных для процесса взаимодействия MBD4^{cat} с 28-звенным ДНК-субстратом, позволил определить минимальную кинетическую схему 9, удовлетворительно описывающую экспериментальные данные. Две равновесные стадии, входящие в схему 9, характеризуют первичное связывание ДНК и последующий процесс перестройки конформации фермента, приводящий к образованию каталитически компетентного комплекса, в котором происходит необратимая реакция гидролиза N-гликозидной связи. Завершает ферментативный цикл равновесная стадия диссоциации комплекса фермента и ДНК-продукта. Константы скорости и равновесия, характеризующие стадии, входящие в схему 9, представлены в таблице 15. Используя константы скорости элементарных стадий, получены значения стационарных параметров ферментативного процесса K_m и k_{cat} , которые хорошо согласуются с данными [84, 434].

Схема 9

$$E + U \xrightarrow{k_1} (E \cdot U)_1 \xrightarrow{k_2} (E \cdot U)_2 \xrightarrow{k_3} E \cdot P \xrightarrow{K_P} E + P$$

где Е – фермент MBD4^{cat}, U – ДНК-субстрат, (E•U)₁ и (E•U)₂ – комплексы фермента с субстратом, (E•P) – комплекс фермента с продуктом, P – продукт превращения субстрата, k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных стадий равновесных стадий, k_3 – константа скорости каталитической стадии, K_p – равновесная константа диссоциации комплекса ЕР.

Таблица 15. Константы скорости и равновесия процессов взаимодействия MBD4^{cat} с различными субстратами, полученные из анализа флуоресцентных данных

Субстраты	U/G ₂₈	U/G ₁₇	U/G ₁₂	F/G ₁₂
Константы				
$k_1 \times 10^{-6}, c^{-1} \cdot M^{-1}$	7,0±2,0	12,0±3,0	0,5±0,2	10,0±4,0
k_{-1}, c^{-1}	30±10	45±20	3,3±0,5	8,0±4,0
${}^{a}K_{1} \times 10^{-6}, \mathrm{M}^{-1}$	0,2±0,1	0,3±0,1	0,15±0,06	1,2±0,8
k_2, c^{-1}	2,1±0,3	3,0±1,0	0,18±0,04	0,08±0,01
k_{-2}, c^{-1}	0,38±0,05	0,23±0,05	0,12±0,01	0,03±0,01
$^{a}K_{2}$	5,5±1,1	13,0±5,0	1,5±0,3	2,7±0,9
k_3, c^{-1}	0,056±0,007	0,046±0,002	< 0,01	
<i>K</i> _P , M	$(1,0\pm0,2)\times10^{-7}$	$(1,5\pm0,2)\times10^{-7}$		
$^{6}K_{\rm d},{ m M}$	6,6×10 ⁻⁷	2,7×10 ⁻⁷	2,6×10 ⁻⁶	2,2×10 ⁻⁷
$^{\mathrm{B}}K_{\mathrm{m}},\mathrm{M}$	7,4×10 ⁻⁷	3,2×10 ⁻⁷		
$^{\mathrm{r}}k_{\mathrm{cat}},\mathrm{c}^{-1}$	4,6×10 ⁻²	4,2×10 ⁻²		

^a $K_1 = \overline{k_1/k_{-1}, K_2 = k_2/k_{-2}},$ ⁶ $K_1 = \frac{1}{K}, K_2 = \frac{1}{K}, K_2 = \frac{1}{K}, K_1 = \frac{1}{K}, K_2 = \frac{1}{K}, K_2 = \frac{1}{K}, K_1 = \frac{1}{K}, K_2 = \frac{1}{K}, K_2 = \frac{1}{K}, K_1 = \frac{1}{K}, K_2 = \frac{1}{K},$

$$\mathbf{K}_{d} = 1/\mathbf{K}_{ass}, \ \mathbf{K}_{ass} = \mathbf{K}_{1} + \mathbf{K}_{1} \times \mathbf{K}_{2}$$

$$^{B} K_{m} = (k_{2}k_{3} + k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_{3})/k_{1}(k_{2} + k_{-2} + k_{3})$$

$$^{\Gamma} k_{cat} = k_{2}k_{3}/(k_{2} + k_{-2} + k_{3})$$

На основании данных ($e_0 = 4,0$ мкМ, $s_0 = 0,5$ мкМ, рис. 376), используя зависимость $V_{\text{st}} = \Delta[P]/\Delta t$, где $\Delta[P]$ – прирост концентрации продукта P за время Δt , была получена оценка фактической скорости стационарной фазы реакции $V_{\text{st}} \approx (3,2\pm1,2)\times10^{-5}$ мкМ/с. Ожидаемое значение максимальной скорости каталитической реакции, оцененное по формуле $V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} \times e_0$, где e_0 –исходная концентрация фермента, с учетом 25% активности фермента равно 4,6×10⁻² мкМ/с. Это означает, что лимитирующей является не химическая стадия, а, вероятно, диссоциация комплекса фермента с продуктом реакции, что коррелирует с наличием «скачка» на кинетических кривых накопления продукта.

Взаимодействие MBD4^{cat} с 17-звенным ДНК-дуплексом

Кинетические кривые, полученные при взаимодействии MBD4^{cat} с более коротким 17-звенным ДНК-субстратом, имеют две фазы изменения интенсивности флуоресценции Trp, как и в случае с 28-звенным дуплексом (рис. 38*a*). Анализ продуктов реакции с

помощью разделения реакционной смеси методом гель-электрофореза (рис. 386) показал, что кривые накопления продуктов в случае U/G_{17} -субстрата имеют выраженный «скачок» в интервале времени до 200 с и последующее медленное увеличение концентрации продукта. Замедление накопления продуктов реакции свидетельствует о том, что процесс диссоциации комплекса фермент-продукт является скорость-лимитирующим, как это было показано для U/G_{28} -субстрата.



Рис. 38. Кинетика взаимодействия MBD4^{cat} с U/G₁₇-субстратом. (*a*) Экспериментальные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp и расчетные кривые, полученные путем обработки данных согласно схеме 9. [MBD4^{cat}] = 2,0 мкМ, концентрация U/G₁₇ изменяется от 1,0 до 4,0 мкМ. (*б*) Зависимость концентрации продуктов N-гликозилазной реакции от времени при взаимодействии MBD4^{cat} с U/G₁₇-субстратом. [MBD4^{cat}] = 4,0 мкМ, концентрация U/G₁₇ изменяется от 0,25 до 2,0 мкМ.

Анализ флуоресцентных кинетических кривых, представленных на рис. 38a, показал, что они описываются минимальной кинетической схемой 9. Константы скорости и равновесия, характеризующие эти стадии, представлены в таблице 15. Интересно отметить, что уменьшение неспецифического участка дуплекса U/G₁₇-субстрата на 11 нуклеотидов, по сравнению с U/G₂₈-субстратом, не приводит к значительным изменениям констант скорости образования и распада первичного комплекса (E•U)₁. Тем не менее, уменьшение длины дуплекса привело к увеличению константы равновесия K_2 , характеризующей образование каталитического комплекса (E•U)₂, в 2,4 раза по сравнению с U/G₂₈-субстратом (13,0 и 5,5 соответственно). Это должно быть связано с уменьшением времени поиска поврежденного нуклеотида, который происходит как путем 1Д-диффузии вследствие скольжения и небольших «прыжков» (hopping) [181, 426, 435] фермента по

цепи ДНК, так и ЗД-диффузии, включающей множественные акты ассоциациидиссоциации.

Как и в случае U/G₂₈-субстрата, для U/G₁₇-субстрата фактическая стационарная скорость накопления продукта V_{st} составляет ~ $(6,2\pm0,9)\times10^{-5}$ мкM/с для $e_0 = 4,0$ мкM, $s_0 = 0,5$ мкM. При этом $V_{max} = 4,2\times10^{-2}$ мкM/с. Таким образом, V_{st} меньше V_{max} почти в 1000 раз. Это различие, а также наличие «скачка» на кинетических кривых накопления продукта реакции (рис. 386) свидетельствует о том, что диссоциация комплекса фермента с продуктом реакции лимитирует скорость ферментативного процесса.

Взаимодействие MBD4^{cat} с 12-звенным ДНК-дуплексом

На рис. 39 представлены кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp, соответствующие процессу взаимодействия MBD4^{cat} с двенадцатизвенным U/G₁₂-субстратом. Как видно из рис. 39*a*, кинетические кривые имеют две фазы: падение интенсивности (10-500 мс) и рост с выходом на плато (0,5-10 с). Кинетика накопления продуктов ферментативной реакции, изученная методом разделения реакционной смеси электрофорезом в ПААГ (рис. 39б), свидетельствует о том, что каталитическая стадия ферментативного процесса проходит на временах более 1000 с, то есть значительно медленнее стадий, соответствующих изменению интенсивности Тгр. Следовательно, изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp, зарегистрированные в интервале времени до 200 с, скорее всего, отражают начальные конформационные изменения фермента в ходе образования фермент-субстратного комплекса и дальнейшую перестройку конформации фермента. При этом каталитически компетентное состояние формируется неэффективно, и реакция гидролиза N-гликозидной связи значительно замедляется по сравнению с 17- и 28-звенными субстратами. Поэтому для анализа серии кинетических кривых использовали только равновесные стадии связывания ДНК, характеризующие образование комплексов (E•U)₁ и (E•U)₂ в схеме 9. Константы скорости, характеризующие эти стадии и полученные путем анализа кинетических кривых изменения интенсивности флуоресценции фермента, представлены в таблице 15.



Рис. 39. Кинетика взаимодействия MBD4^{cat} с U/G₁₂-субстратом. (*a*) Экспериментальные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp и расчетные кривые, полученные путем обработки данных согласно схеме 9 (стадии 1 и 2). [MBD4^{cat}] = 2,0 мкМ, концентрация U/G₁₂ изменяется от 1,0 до 3,0 мкМ. (*б*) Зависимость концентрации продуктов N-гликозилазной реакции от времени при взаимодействии MBD4^{cat} с U/G₁₂-субстратом. [MBD4^{cat}] = 4,0 мкМ, концентрация U/G₁₂ изменяется от 2,0 до 20,0 мкМ.

Сравнение констант скорости взаимодействия MBD4^{саt} с 12- и 17-звенным субстратами показывает, что при уменьшении длины дуплекса на 5 нуклеотидов происходит значительное уменьшение скорости как процесса образования первичного комплекса (E•U)₁, характеризуемого константой скорости k_1 , так и его распада, k_1 , в 24 и 14 раз соответственно. При этом константа ассоциации фермента и ДНК-субстрата с образованием комплекса (E•U)₁, K_1 , уменьшается лишь в два раза. Можно предположить, что неспецифический участок U/G₁₇-субстрата выполняет функцию матрицы, с которой в условиях быстрого равновесия образуется первичный комплекс (E•U)₁, что позволяет ферменту производить эффективный поиск поврежденного участка. Действительно, константа образования k_2 каталитического комплекса (E•U)₂ в 17 раз больше в случае U/G₁₇-субстрата, чем U/G₁₂-субстрата. Таким образом, увеличение неспецифического участка дуплекса на пять нуклеотидов в U/G₁₇-субстрате по сравнению с U/G₁₂-субстратом приводит к уменьшению общей константы диссоциации K_d в 10 раз (таблица 15). Отсутствие в U/G₁₂-субстрате неспецифического участка ДНК, по-видимому, препятствует образованию правильно ориентированной активной конформации фермента.

Взаимодействие MBD4^{cat} с аналогом продукта

Удаление модифицированного основания ферментом MBD4 приводит к образованию AP-сайта в ДНК. Для того, чтобы идентифицировать природу конформационных изменений фермента и ДНК, происходящих в процессе связывания продукта ферментативной реакции, содержащего AP-сайт, был использован его стабильный аналог F-сайт. Взаимодействие MBD4^{cat} с **F/G**₁₂-лигандом должно приводить к формированию комплекса, имитирующего комплекс фермента с продуктом реакции после осуществления каталитической стадии ферментативного процесса.

Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции Trp при взаимодействии MBD4^{cat} и F/G₁₂-лиганда имеют двухфазный профиль (рис. 40), как и в случае взаимодействия с U/G₁₂-субстратом (рис. 39). Можно предположить, что уменьшение и последующий рост интенсивности флуоресценции Тгр имеют такую же природу, как и в случае ДНК-дуплекса, содержащего уридин. Таким образом, полученные данные показывают, что независимо от природы модифицированного нуклеотида в процессе взаимодействия MBD4^{cat} с ДНК происходит первичное связывание и дальнейшая перестройка конформации фермента, ведущие к образованию каталитически активного комплекса. Полученные кинетические кривые удовлетворительно описываются двухстадийной равновесной кинетической схемой 10. Константы скорости, характеризующие эти стадии, представлены в таблице 15.



Рис. 40. Кинетика взаимодействия MBD4^{cat} с F/G_{12} -лигандом. Экспериментальные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp и расчетные кривые, полученные путем обработки данных согласно схеме 10. [MBD4^{cat}] = 2,0 мкМ, концентрация F/G_{12} изменяется от 1,0 до 4,0 мкМ.

Сравнение констант скорости и равновесия (таблица 15), характеризующих взаимодействие MBD4^{cat} с U/G₁₂-субстратом и F/G_{12} -лигандом показывает, что образование первичного комплекса происходит примерно в десять раз более эффективно с аналогом продукта реакции. Нужно отметить, что константы равновесия второй стадии отличаются менее чем в два раза. Таким образом, можно сделать заключение, что поиск и связывание поврежденного участка ДНК ферментом MBD4^{cat} происходит более эффективно в случае дестабилизированного F-сайтом ДНК-дуплекса.

Схема 10

$$\mathbf{E} + \mathbf{F} \xrightarrow{k_1} (\mathbf{E} \cdot \mathbf{F})_1 \xrightarrow{k_2} (\mathbf{E} \cdot \mathbf{F})_2,$$

где Е – фермент MBD4^{cat}, F – F/G₁₂-лиганд, (E•F)₁ и (E•F)₂ – комплексы фермента с $\mathbf{F}^{\mathbf{Trp}}/\mathbf{G}_{12}$ -лигандом, k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных стадий равновесных стадий.

3.2.3.2. Сравнительный анализ конформационных изменений фермента и ДНК

Для того, чтобы уточнить природу процессов, происходящих при образовании каталитического комплекса и зарегистрированных по изменению интенсивности остатков Тгр, использовали модельные ДНК-дуплексы, несущие флуоресцентные остатки (aPu и FRET-пару FAM/BHQ1) в качестве «сенсоров» конформационных изменений ДНК.

Использование U^{aPu}/G_{17} -субстрата, несущего остаток aPu с 3'-стороны от уридина, позволило зарегистрировать конформационные изменения в ДНК, происходящие, вероятно, в результате выворачивания поврежденного нуклеотида из ДНК и встраивания в образовавшуюся полость остатков Arg468 и Leu508. Как видно из рис. 41, на кинетической кривой, характеризующей взаимодействие MBD4^{cat} и U^{aPu}/G_{17} -субстрата, имеется фаза быстрого роста (1–50 мс) интенсивности флуоресценции aPu, свидетельствующая о дестабилизации центральной части дуплекса на начальных этапах фермент-субстратного взаимодействия.



Рис. 41. Сравнение кинетических кривых, зарегистрированных по изменению интенсивности флуоресценции остатков Trp, aPu или FRET-сигнала в процессе взаимодействия MBD4^{cat} с ДНКдуплексами U/G₁₇, U^{aPu}/G₁₇, F^{aPu}/G₁₂ и U^{FAM/BHQ1}/G₁₇ и по накоплению продуктов реакции. Показаны экспериментальные и теоретические кинетические кривые. Концентрация ДНКсубстратов равна 1,0 мкМ, [MBD4^{cat}] = 2,0 мкМ.

Использование U^{FAM/BHQ1}/G₁₇-субстрата, содержащего красители FAM и BHQ1 на 5'концах олигонуклеотидов, формирующих дуплекс позволило зарегистрировать конформационные изменения дуплекса, связанные с изменением расстояния между красителями. Видно (рис. 41), что на начальном участке кинетической кривой (1–50 мс) происходит небольшое уменьшение FRET-сигнала, означающему уменьшении расстояния между эмиттером флуоресценции FAM и тушителем BHQ1 и свидетельствующее об изгибании дуплекса. Сравнение с кинетической кривой изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp показывает, что в этот момент времени (< 100 мс) фермент претерпевает значительных конформационных изменений. Поэтому можно не предположить, что в процессе первичного связывания ДНК происходит изгибание спирали и частичное плавление центральной части дуплекса. По-видимому, именно такие индуцированные ферментом изменения структуры дуплекса позволяют MBD4^{cat} проводить дискриминацию модифицированных и немодифицированных оснований в процессе скольжения по двойной спирали ДНК.

Интересно отметить, что фаза роста интенсивности флуоресценции остатков Тгр (10–100 с), совпадающая с начальным накоплением продукта реакции, не приводит к изменению FRET-сигнала. В то же время, диссоциация комплекса фермента с продуктом реакции, являющаяся скорость лимитирующей стадией, приводит к медленному росту FRET-сигнала в интервале времени 100–3000 с, а также к медленному накоплению продуктов реакции в этом временном диапазоне (рис. 41).

Интересно отметить, что изменения интенсивности флуоресценции аРи при связывании ДНК-дуплексов, содержащих урацил (U^{aPu}/G_{17}) и F-сайт (F^{aPu}/G_{12}), происходят разнонаправленно (рост и падение) и в разные интервалы времени (t < 0,1 с и 0,1 с t < 1 с соответственно). Фаза роста интенсивности флуоресценции aPu для UaPu₁₇-субстрата, отражающая локальное плавление дуплекса при образовании первичного комплекса, не может быть зарегистрирована в случае F^{aPu}/G₁₂-лиганда, поскольку расположенный с 3'-стороны от F-сайта остаток aPu уже находится в менее гидрофобном окружении, чем в канонической ДНК. Однако при взаимодействии MBD4^{cat} с **F**^{aPu}/G₁₂-лигандом регистрируется хорошо выраженное уменьшение интенсивности флуоресценции aPu на более поздних временах (до 1 с). Уменьшение интенсивности флуоресценции aPu, связанное с увеличением гидрофобности окружения остатка aPu, скорее всего, свидетельствует о встраивании аминокислотных остатков фермента MBD4^{cat} (Arg468 и Leu508) в дуплекс на этих временах.

Таким образом, основываясь на данных полученных в работе и рентгеноструктурного данных [84, 432], можно предположить, что при взаимодействии MBD4^{cat} с ДНК в начальный момент времени происходит образование первичного комплекса, в котором аминокислотные остатки фермента образуют систему неспецифических контактов с рибозо-фосфатным остовом, позволяющую ферменту за счет тепловых движений двигаться вдоль двойной спирали в поиске поврежденного нуклеотида. Известно, что поиск ферментами специфических сайтов в молекуле ДНК происходит путем сочетания одномерной (1Д) и трехмерной (3Д) диффузии: без диссоциации фермент-субстратного комплекса за счет «скольжения» фермента и небольших «прыжков» по цепи ДНК, и путем множественных актов диссоциации-ассоциации соответственно [426, 435]. Длина участков 1Д-диффузии отличается для разных ДНК-гликозилаз. Было показано, что урацил-ДНК-гликозилаза UNG между актами диссоциации способна перемещаться на длину примерно соответствующую 4-м нуклеотидам [436]. В случае 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы hOGG1 это расстояние может составлять от 60 [437] до 400 [438] нуклеотидов.

Сравнение флуоресцентных кинетических кривых для 12-, 17- и 28-звенных ДНКсубстратов свидетельствует о том, что с увеличением длины дуплекса происходит замедление фазы уменьшения интенсивности флуоресценции Trp, характеризующей поиск модифицированного основания в процессе скольжения или перепрыгивания MBD4^{cat} по цепи ДНК. При использовании флуоресцентно меченых U^{aPu}/G₁₇- и U^{FAM/BHQ1}/G₁₇-субстратов было показано, что в первичном комплексе происходит изгибание ДНК-дуплекса и его локальное плавление. В последующий момент времени происходит выворачивание поврежденного нуклеотида из дуплекса и встраивание аминокислотных остатков Arg468 и Leu508 фермента MBD4^{саt} в образовавшуюся полость, как и в случае ДНК-гликозилаз hOGG1 и Nth структурного класса HhH-GPD. Поэтому, эти аминокислоты могут выполнять функцию детекторов в процессе поиска поврежденного нуклеотида.

Результаты, полученные при использовании F^{aPu}/G_{12} , показывают, что встраивание аминокислотных остатков Arg468 и Leu508 в ДНК-дуплекс предшествует фазе роста интенсивности флуоресценции Trp. Встраивание аминокислотных остатков в ДНК обеспечивает специфическое узнавание модифицированного основания. Фаза роста интенсивности флуоресценции Trp характеризует образование каталитически активного комплекса и во всех случаях заканчивается к 100–200 с, что совпадает с начальным скачком накопления продуктов реакции. Диссоциация комплекса фермента с продуктом реакции является скорость лимитирующей стадией всего ферментативного процесса. Наблюдаемая скорость каталитической реакции заметно увеличивается с увеличением длины дуплекса. Это указывает на возможное участие соседних с модифицированным основанием неповрежденных участков ДНК в формировании правильно ориентированной и активной конформации MBD4^{cat}.

3.2.4. Аденин-ДНК-гликозилаза MutY из E. coli

В процессе репликации основание охоGua может образовывать пару Хугстеновского типа с Ade (пара охоG/A). Последующая репликация приводит к мутации G/C \rightarrow T/A [39, 40]. Это объясняет высокий мутагенный потенциал охоGua и обуславливает наличие развитого механизма (GO-система) по удалению этого повреждения у всех видов живых организмов [42, 124]. Защитная GO-система в *E.coli* состоит из трех ферментов: Fpg (MutM) – формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы, катализирующей гидролиз Nгликозидной связи поврежденного основания охоGua и последующие реакции βэлиминирования 3'- и 5'-фосфатных групп [177, 178, 439]; MutY – аденин-ДНКгликозилазы, удаляющей основание Ade в паре охоG/A [125, 126]; и MutT – фосфатазы, расщепляющей 8-охо-dGTP.

Фермент MutY проявляет высокую специфичность в процессе узнавания охоG/Апары в ДНК. Константа специфичности (kcat/Km) для охоG/А-пары более чем в 100 раз выше, чем в случае G/А-пары [125, 126]. Очевидно, что эффективность дискриминации поврежденного участка ДНК достигается за счет специфических взаимодействий фермента и ДНК. В настоящее время известны кристаллические структуры фермента MutY в свободном состоянии и в комплексе с ДНК [145, 406, 440, 441], из которых следует, что MutY принадлежит структурному семейству HhH-GPD. Согласно рентгеноструктурным данным, установлено, что в каталитически активном комплексе дуплекс ДНК изогнут примерно на 55°, аденин вывернут из двойной спирали и располагается в активном центре фермента, образованном аминокислотными остатками Arg26, Leu28, Trp30, Arg31, Leu46, Glu43, Val51, Tyr126, Glu188, Ile191, Glu192, (номера аминокислотных остатков соответствуют MutY из Geobacillus stearothermophilus, рис. 42*a*). Аминокислотные остатки Gln48 и Tyr88 встроены в ДНК-дуплекс и стабилизируют изгиб рибозофосфатного остова и внеспиральное положение аденозина. Необходимо отметить, что MutY образует множество контактов с обеими цепями ДНК-дуплекса (рис. 426). Аминокислотные остатки Gln48, Thr49, Leu86, Tyr88, Ser308 образуют прямые контакты с основанием охоGua, которое находится в дуплексе, и, тем самым, обеспечивают высокую специфичность фермента к охоG/А-паре. После образования каталитически активного комплекса основание Ade протонируется по N7 атому аминокислотным остатком Glu43, что приводит к разрыву N-гликозидной связи по S_N1 механизму [442, 443]. Использование аналога аденозина, содержащего замену атома N7 на группу С7-Н [444], а также замена Glu43 [145, 441], приводили к полной потере каталитической активности MutY. В работе [443] было показано, что после разрыва N-

гликозидной связи промежуточный оксокарбениум-ион скорее всего образует ковалентную связь с остатком Asp144. При этом свободное основание Ade уходит из активного центра, а остаток Glu43 координирует молекулу воды, которая выступает нуклеофилом в последующей реакции замещения карбоксильной группы остатка Asp144 (рис. 43). Остаток Туr126 участвует в образовании водородной связи с остатком Glu43 и приводит к его правильной координации в активном центре, кроме того, за счет электростатических взаимодействий дополнительно стабилизирует промежуточный оксокарбениум-ион.



Рис. 42. Схематическое изображение пространственной структуры комплекса MutY с ДНК. (*a*) Структура комплекса аденин-ДНК-гликозилазы MutY из *Geobacillus stearothermophilus* с ДНК-дуплексом, содержащим охоG/А-пару (PDB ID 3GOQ) [441]. (*б*) Аминокислотные остатки, участвующие в образовании специфических контактов MutY с ДНК-дуплексом и каталитической реакции гидролиза N-гликозидной связи с основанием Ade.

До недавнего времени оставался открытым вопрос, каким образом происходит эффективная дискриминация ферментом MutY охоG/A пары от охоG/C пары. В работе [445] было показано, что в комплексе MutY с ДНК, содержащей охоG/C-пару, основание Cyt частично выворачивается из дуплекса ДНК и располагается в экзо-сайте фермента, образуя прямые контакты с аминокислотными остатками Lys163, Cys164 и Arg167. Дальнейшее выворачивание и встраивание Cyt в активный центр блокируется аминокислотными остатками активного центра. Интересно отметить, что замена каталитического аминокислотного остатка Asp144 снимает такую блокировку и в комплексе мутантной формы Asp144Asn MutY с охоG/C-дуплексом основание Cyt располагается в активном центре [445].



Рис. 43. Химические стадии процесса катализа MutY. Стадия 1: протонирование N7 Ade, разрыв N-гликозидной связи, образование ковалентной связи с остатком Asp144; стадия 2: замещение карбоксильной группы остатка Asp144 гидроксильной группой молекулы воды и образование AP-сайта [443].

Исследование предстационарных характеристик процесса связывания дуплекса ДНК, содержащего пару oxoG/A было ранее выполнено в работе [446]. Для этого использовали метод остановленной струи с регистрацией интенсивности флуоресценции 2-аминопурина (aPu), расположенного с 5'-стороны от Ade (aPu-A/oxoG-cyбстрат) или охоGua (A/aPu-охоG-субстрат). В качестве контрольной последовательности использовали С/аРи-охоG-дуплекс. В случае А/аРи-охоG-субстрата интенсивность флуоресценции аРи быстро возрастала в течение 50 мс, что свидетельствовало о потере стэкинга между основаниями aPu и охоGua за счет дестабилизации дуплекса ДНК ($k_{obs}^{1} = 108 \text{ c}^{-1}$). Кинетическая кривая, полученная для aPu-A/oxoG-cyбстрата, отражала процесс выворачивания основания Ade и характеризовалась константой скорости $k_{obs}^{2} = 16 \text{ c}^{-1}$. Кроме того, авторам удалось выделить из этой кинетической кривой еще одну фазу изменения интенсивности флуоресценции с $(k_{obs}^{3} = 1.9 \text{ c}^{-1})$, которая была отнесена к изомеризации структуры фермента, стабилизирующей вывернутое основание Ade. После образования каталитически активного комплекса происходила каталитическая стадия реакции с константой скорости $k_{cat} = 0.25 \text{ c}^{-1}$. В результате исследований [447-449] было показано, что константа N-гликозилазной реакции равна 0,17 с⁻¹ и близка к значению, приведенному выше. Кроме того, установлено, что скорость-лимитирующей стадией всего ферментативного процесса является диссоциация комплекса фермент-продукт. Эта стадия во всех трех работах [447-449] характеризуется константой скорости, лежащей в диапазоне 0,24–0,42 с⁻¹.

3.2.4.1. Сравнительный анализ конформационных изменений MutY и ДНК Взаимодействие MutY с ДНК, содержащей пару охоG/A

Представлось интересным изучить подробно конформационные изменения как самого фермента MutY, так и ДНК-субстратов в процессе их взаимодействия [450]. В ходе этих исследований показано, что связывание MutY с охоG/A₁₂-субстратом характеризуется трехстадийным изменением интенсивности флуоресценции Тгр (рис. 44а). Быстрое первоначальное снижение интенсивности флуоресценции в интервале времени до 0,25 с описывалось двумя обратимыми кинетическими стадиями и, скорее всего, отражало процесс узнавания и связывания белка с ДНК-дуплексом. Третья стадия характеризуется небольшим увеличением интенсивности флуоресценции в интервале времени до 25 с.



Рис. 44. Кинетические кривые, полученные при взаимодействии MutY с ДНК, содержащей пару охоG/А. (*a*) Изменение интенсивности флуоресценции остатков Trp. (*б*) Накопление продукта реакции по данным электрофореза в ПААГ. (*в*) Изменение интенсивности флуоресценции FAM.

Методом разделения реакционной смеси электрофорезом в ПААГ (рис. 446) было показано, что удаление основания Ade и накопление продукта реакции, содержащего APсайт, также происходит в интервале времени до 25 с. Несмотря на то, что накопление ДНК-продукта происходит быстро и затрудняет точную регистрацию скорости каталитической стадии реакции с помощью электрофореза в ПААГ, соотнесение по времени позволяет считать, что третья стадия, зарегистрированная по изменению интенсивности флуоресценции Тгр, относится к каталитической стадии ферментативного процесса. Необходимо отметить, что независимо от концентрации охоG/А12-субстрата на начальном участке кинетических кривых, характеризующих накопление ДНК-продукта, наблюдается «скачок» до величины ~0,6 мкМ (рис. 446), что позволило рассчитать долю активной формы фермента в используемом препарате. Указанная на рисунках концентрация соответствует концентрации активной формы фермента MutY В реакционной смеси. Кроме того, такой вид кинетических кривых свидетельствует о существовании скорость-лимитирующей стадии после каталитической реакции. Действительно, согласно [448] MutY имеет большее сродство к ДНК-продуктам, содержащим аналог AP-сайта напротив охоG или G, чем к ДНК-дуплексам, содержащим пары охоG/А и G/А. Таким образом, скорость лимитирующей стадией ферментативного процесса, катализируемого MutY, является диссоциация комплекса фермент-продукт.

Количественный анализ кинетических кривых, полученных в случае взаимодействия MutY с охоG/A₁₂-субстратом (рис. 44*a*), позволил определить минимальную кинетическую схему 11, удовлетворительно описывающую экспериментальные данные. Две равновесные стадии, входящие в схему 11, характеризуют первичное связывание ДНК и последующий процесс перестройки конформации фермента, приводящий к образованию каталитически компетентного комплекса. Последняя необратимая стадия характеризует реакцию гидролиза N-гликозидной связи и последующую скорость-лимитирующую фермент-продукт. Константы скорости диссоциацию комплекса И равновесия, характеризующие стадии, входящие в схему 11, представлены в таблице 16.

Константы	oxoG/A ₁₂	G/A ₁₂	oxoG/C ₁₂	oxoG ^{FAM} /A ₁₂	G^{FAM}/A_{12}	oxoG ^{FAM} /C ₁₂	$\mathbf{F}^{\mathrm{FAM}}/\mathrm{G}_{12}$
$k_1 \times 10^{-6}, \mathrm{M}^{-1} \mathrm{c}^{-1}$	130 ± 30	220 ± 10	90 ± 30	710 ± 110	680 ± 130	270 ± 40	900 ± 300
k_{-1}, c^{-1}	46 ± 13	1,4 ± 0,9	90 ± 20	10 ± 4	180 ± 50	35 ± 6	230 ± 60
$K_1 \times 10^{-6}, \mathrm{M}^{-1}$	2,8	160	1,0	71	3,8	7,7	3,9
k_2, c^{-1}	16 ± 8	0,9 ± 0,3	3,5±1,1	26 ± 6	48 ± 9	$9,2 \pm 2,8$	40 ± 10
k_{-2}, c^{-1}	7,3 ±1,3	0,3 ± 0,2	9,0±1,4	$2,5 \pm 1,4$	$0,03 \pm 0,02$	9,9 ±2,6	$0,004 \pm 0,003$
<i>K</i> ₂	2,2	3,0	0,4	10,4	$1,6 \times 10^3$	0,93	1,0×10 ⁴
k_3, c^{-1}	$0,051 \pm 0,004$	-	-	0,7 ± 0,4	$0,3 \pm 0,1$	$0,19 \pm 0,07$	0,8 ± 0,6
k_{-3}, c^{-1}	-	-	-	$0,13 \pm 0,04$	$0,002 \pm 0,001$	0,13 ±0,05	0,3 ± 0,2
<i>K</i> ₃	-	-	-	5,4	$1,5 \times 10^{2}$	1,5	2,7

Таблица 16. Константы скорости кинетических стадий взаимодействия MutY с ДНК-субстратами

 $K_{\rm i} = k_{\rm i}/k_{\rm -i}$

Схема 11

$$E + S \xrightarrow{k_1} (E \cdot S)_1 \xrightarrow{k_2} (E \cdot S)_2 \xrightarrow{k_3} E + P$$

где Е – MutY, S – **охоG**^{Trp}/A₁₂-субстрат, $(E \cdot S)_1$ и $(E \cdot S)_2$ – комплексы фермента с субстратом, Р – продукт превращения субстрата, k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных стадий равновесных стадий, k_3 – константа скорости каталитической стадии.

Регистрация конформационных изменений ДНК при связывании с ферментом MutY проводилась с **охоG**^{FAM}/A₁₂-субстратом. Анализ кинетических кривых показал, что наблюдаемый процесс протекает по трехстадийному механизму, описываемому схемой 12. Константы скорости, соответствующие этой схеме, представлены в таблице 16. При взаимодействии с MutY на начальном участке кинетических кривых в интервале времени до 15 мс происходило падение интенсивности флуоресценции FAM (рис. 44*в*), вероятно, характеризующее образование первичного столкновительного комплекса. Константа скорости образования первичного комплекса k_1 , зарегистрированная по флуоресценции Trp.

Схема 12

$$\mathbf{E} + \mathbf{S} \xrightarrow{k_1} (\mathbf{E} \cdot \mathbf{S})_1 \xrightarrow{k_2} (\mathbf{E} \cdot \mathbf{S})_2 \xrightarrow{k_3} (\mathbf{E} \cdot \mathbf{S})_3$$

где Е – MutY, S – $\mathbf{oxoG^{FAM}}/\mathbf{A_{12}}$ - и $\mathbf{G^{FAM}}/\mathbf{A_{12}}$ -субстраты, $(E \cdot S)_i$ – комплексы фермента с субстратом, k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных стадий равновесных стадий.

В интервале времени 15–200 мс происходило увеличение интенсивности флуоресценции FAM, свидетельствующее о конформационных изменениях ДНК, связанных с узнаванием пары 0x0G/A. Интересно отметить, что процессы связывания ДНК и узнавания пары 0x0G/A, происходящие на второй стадии, сопровождаются взаимосогласованными конформационными изменениями фермента и ДНК. Константы скорости образования второго комплекса k_2 , зарегистрированные по флуоресценции Trp и FAM, отличаются менее чем в 2 раза.

Уменьшение интенсивности флуоресценции FAM в интервале времени 0,2–25 с совпадает с ростом интенсивности флуоресценции Trp, характеризующим

каталитическую стадию реакции. Однако, как было показано методом разделения реакционной смеси электрофорезом в ПААГ, MutY полностью теряет способность удалять основание Ade в **охоG^{FAM}/A₁₂-субстрате**. Скорее всего, при взаимодействии MutY с ДНК-дуплексом, содержащим на 5'-конце остаток FAM, происходит нарушение образования сети контактов в активном центре фермента и затруднение образования каталитически активной конформации фермент-субстратного комплекса.

Взаимодействие MutY с ДНК, содержащей пару G/A

При взаимодействии фермента MutY с G/A₁₂-субстратом были зарегистрированы конформационные изменения фермента (рис. 45*a*). Анализ флуоресцентных кинетических кривых, показал, что они описывали минимальной кинетической схемой 13. Константы скорости и равновесия, характеризующие эти стадии, представлены в таблице 16.



Рис. 45. Кинетические кривые, полученные при взаимодействии MutY с ДНК, содержащей пару G/A. (*a*) Изменение интенсивности флуоресценции остатков Trp. (*б*) Накопление продукта реакции по данным электрофореза в ПААГ. (*в*) Изменение интенсивности флуоресценции FAM.

Как видно из рис. 45*a*, уменьшение интенсивности флуоресценции Тгр на начальном участке кинетических кривых имеет значительно меньшую амплитуду изменений по сравнению с **охоG/A₁₂-субстратом**. Тем не менее, сравнение полученных констант скорости для G/A_{12} - и **охоG/A₁₂-субстратов** (таблица 16) показывает, что константы скорости образования первичного комплекса (E•S)₁ (*k*₁) отличаются менее, чем в 2 раза. Это указывает на то, что при образовании первичного комплекса происходит формирование неспецифических контактов между ДНК-связывающим центром фермента и ДНК-дуплексом.

Схема 13

$$E + S \xrightarrow{k_1} (E \cdot S)_1 \xrightarrow{k_2} (E \cdot S)_2$$

где Е – MutY, S – G/A₁₂- и охоG/C₁₂-субстраты, $(E \cdot S)_i$ – комплексы фермента с субстратом, k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных стадий равновесных стадий.

Вторая фаза уменьшения интенсивности флуоресценции Тгр проходила в интервале времени 0,5-5 с и была значительно медленнее, чем для **охоG/A₁₂-субстрата**. Можно предположить, что на этой стадии происходит дискриминация оснований Gua и охоGua. Эти данные согласуются с результатами работы [446], показывающими, что нарушение структуры дуплекса в области основания охоGua при образовании комплекса фермента с ДНК, содержащей охоG/А-пару, протекает на начальном этапе взаимодействия. С основанием охоGua в активном центре взаимодействуют аминокислотные остатки Gln48, Thr49, Leu86, Tyr88, Ser308. Нужно отметить, что Tyr88 является структурным аналогом Tyr203 у 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека hOGG1, который выполняет функцию «сенсора» поврежденного участка ДНК и играет ключевую роль при узнавании поврежденного основания [400]. Кроме того, остаток Ser308 образует водородные связи с атомом O8 и группой N7-H основания охоGua и, скорее всего, отвечает за специфичность MutY по отношению к охоG/A-паре. Поэтому, можно предположить, что вторая стадия контактов взаимодействия характеризует образование специфических между аминокислотными остатками Tyr88 и Ser308 и охоG/А-парой. В случае G/А-пары отсутствие специфических взаимодействий с Ser308 приводит к замедлению стадии образования каталитического комплекса, характеризуемого константой скорости k_2 . примерно в 18 раз (таблица 16). Действительно, ДНК, содержащая пару G/A, хоть и

является субстратом для MutY, однако скорость удаления аденина из пары G/A значительно меньше, чем из пары охоG/A (рис. 45*б*). Поэтому на кинетических кривых (рис. 45*a*) отсутствовал рост интенсивности флуоресценции Trp, характеризующий протекание каталитическ стадии реакции.

Изменения интенсивности флуоресценции FAM (рис. 45*в*), происходящие при связывании G^{FAM}/A_{12} -субстрата имеют одинаковый профиль с кривыми, полученными для **охоG**^{FAM}/A₁₂-субстрата, что свидетельствует о схожих конформационных изменениях ДНК в обоих случаях. Для анализа серии кинетических кривых использовали схему 12. Из данных таблицы 16 видно, что константы образования первичного комплекса k_1 имеют близкие значения для **охоG**^{FAM}/A₁₂- и G^{FAM}/A₁₂-субстратов. Однако константы равновесия, характеризующие образование второго и третьего комплекса (K_2 и K_3 соответственно), значительно отличаются для субстратов, содержащих G/A- и охоG/A-пары, что подтверждает предположение о том, что на этих стадиях происходит дискриминация оснований охоGua и Gua.

Взаимодействие MutY с ДНК, содержащей пару охоG/С

Специфические контакты, образующиеся с основанием охоGua, являются одним из наиболее важных факторов в процессе узнавания охоС/А-пары в ДНК. Кроме того, фермент MutY обладает уникальной специфичностью к основанию Ade, расположенному напротив охоGua и не удаляет другие азотистые основания. В работе [445] было показано, что высокая специфичность обеспечивается за счет частичного выворачивания основания, расположенного напротив охоGua, в экзо-сайт фермента, в котором происходит дискриминация Ade И других азотистых оснований. Поэтому для анализа конформационных изменений фермента И ДНК при узнавании основания, расположенного напротив охоGua, использовали ДНК-дуплекс, содержащий охоG/С-пару.

Как видно на рис. 46*a*, при взаимодействии MutY с **охоG/C**₁₂-субстратом происходит двухстадийное изменение интенсивности флуоресценции Trp, которое описывали кинетической схемой 13. Константы скорости (k_1), характеризующие образование первичного комплекса (E•S)₁ для **охоG/A**₁₂- и **охоG/C**₁₂-субстратов, незначительно отличаются друг от друга (таблица 16), что подтверждает предположение о том, что в первичном комплексе происходит образование неспецифических контактов между ДНК-связывающим центром фермента и ДНК-дуплексом. Тем не менее, константа скорости диссоциации (k_{-1}) первичного комплекса (E•S)₁ примерно в 2 раза больше для **охоG/C**₁₂-субстрата по сравнению с **охоG/A**₁₂-субстратом, что свидетельствует об отсутствии

стабилизирующих контактов с основанием Суt, которые образуются с Ade. Кроме того, константа скорости образования второго комплекса $(E \cdot S)_2 k_2$ в 4,7 раза меньше в случае **охоG/C**₁₂-субстрата, по сравнению с **охоG/A**₁₂-субстратом, что приводит к уменьшению в 5,5 раз константы K_2 , отражающей стабильность второго комплекса $(E \cdot S)_2$.



Рис. 46. Кинетические кривые изменений интенсивности флуоресценции остатков Trp (*a*) и FAM (*б*), полученные при взаимодействии MutY с ДНК, содержащей пару охоG/C.

Интересно отметить, что кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения ДНК при взаимодействии с **охоG**^{FAM}/**C**₁₂-субстратом (рис. 466) отличаются от кривых, полученных для **охоG**^{FAM}/**A**₁₂- и **G**^{FAM}/**A**₁₂-субстратов. Как видно на рис. 466, в случае **охоG**^{FAM}/**C**₁₂-субстрата исчезает фаза роста интенсивности флуоресценции FAM. Анализ кинетических кривых по схеме 12 показал, что константа образования второго комплекса (E•S)₂ K_2 для **охоG**^{FAM}/**C**₁₂-субстрата уменьшается в 11 раз по сравнению со значением, полученным для **охоG**^{FAM}/**A**₁₂-субстрата (таблица 16).

Таким образом, данные, полученные для **охоG**^{FAM}/**С**₁₂-субстрата, показывают, что на второй стадии взаимодействия MutY с ДНК-субстратом происходит не только дискриминация оснований Gua и охоGua, но и основания, расположенного напротив.

Взаимодействие MutY с ДНК, содержащей пару F/G

Удаление основания Ade из ДНК-субстрата приводит к образованию AP-сайта. Диссоциация комплекса фермент-продукт является скорость-лимитирующей стадией всего ферментативного процесса. Для понимания природы высокого сродства фермента MutY к ДНК-продукту был проведен анализ конформационных изменений ДНК, содержащей F-сайт. На кинетических кривых (рис. 47) можно выделить три области изменения интенсивности флуоресценции FAM. Анализ кинетических кривых показал, что наблюдаемый процесс, как и в случае **охоG**^{FAM}/A₁₂-субстрата, протекает по трехстадийному механизму (схема 12). Константы скорости, соответствующие этой схеме, представлены в таблице 16. Нужно отметить, что константа скорости образования первичного комплекса k_1 незначительно отличается для $\mathbf{F}^{FAM}/\mathbf{G}_{12}$ - и $\mathbf{G}^{FAM}/\mathbf{A}_{12}$ -субстратов, что подтверждает предположение о том, что на первой стадии взаимодействия происходит образование неспецифических контактов между ДНК-связывающим центром фермента и ДНК-дуплексом. Поскольку узнавание основания, расположенного напротив охоGua, происходит на второй стадии взаимодействия, то, как и следовало ожидать, константа равновесия этой стадии K_2 значительно отличается для $\mathbf{F}^{FAM}/\mathbf{G}_{12}$ - и $\mathbf{G}^{FAM}/\mathbf{A}_{12}$ -субстратов.



Рис. 47. Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатка FAM, полученные при взаимодействии MutY с ДНК, содержащей пару F/G.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что узнавание специфической пары оснований охоGua/Ade происходит последовательно. На первой стадии образуются неспецифические контакты между ДНК-связывающим центром фермента и ДНК. На второй стадии происходит дискриминация оснований Gua и охоGua, а также узнавание основания, расположенного напротив охоGua.

3.3. Конформационные изменения ДНК-гликозилаз структурного семейства Н2tH и ДНК в процессе их взаимодействия

3.3.1. Эндонуклеаза VIII Nei из E. coli

Эндонуклеаза VIII (Nei) является одной из основных ДНК-гликозилаз в клетках *Escherichia coli*, удаляющих широкий набор окисленных или восстановленных пиримидиновых оснований [154, 451]. Продуктами окисления пиримидиновых оснований ДНК являются тимингликоль, 5,6-дигидротимин, 5,6-дигидроурацил, остаток мочевины, 5-формилурацил, 5-оксиметилурацил, 5-гидроксицитозин, 5-гидроксиурацил и урацилгликоль и другие. Nei катализирует гидролиз N-гликозидной связи поврежденного основания (N-гликозилазная активность) с образованием свободного модифицированного основания и последующие реакции β-элиминирования З'- и 5'-фосфатных групп образовавшегося апуринового/апиримидинового сайта (AP-лиазная активность), образуя в ДНК одноцепочечный разрыв (рис. 48) [452, 453].



Рис. 48. Химические стадии процесса катализа Nei. Стадия 1: гидролиз N-гликозидной связи и удаление поврежденного основания с образованием AP-сайта; стадия 2: β-элиминирование 3'-фосфатной группы; стадия 3: β-элиминирование 5'-фосфатной группы.

Анализ рентгеноструктурных данных свободного фермента и его комплекса с ДНК показал, что взаимодействие Nei с ДНК приводит к конформационным изменениям как в молекуле белка, так и в молекуле субстрата (рис. 49) [454, 455]. В фермент-субстратном комплексе происходит изгибание рибозо-фосфатного остова ДНК примерно на 45°, поврежденное основание выворачивается из дуплекса и располагается в активном центре фермента, а в образовавшуюся полость встраиваются аминокислотные остатки Gln69, Leu70 и Tyr71. Такие изменения структуры взаимодействующих молекул приводят к образованию специфических контактов (рис. 496), результатом которых является высокоэффективное узнавание и связывание поврежденных участков ДНК.



Рис. 49. Схематическое изображение пространственной структуры комплекса Nei с ДНК. (*a*) Структура ковалентного комплекса фермента Nei с дуплексом ДНК, содержащим AP-сайт (PDB ID 1K3W) [455]. (б) Функционально важные аминокислотные остатки, участвующие в образовании специфических контактов между ферментом и ДНК.

Фермент Nei содержит 4 остатка Trp (Trp26, Trp74, Trp176, и Trp256), которые, как показано ранее [338], позволили зарегистрировать конформационные изменения фермента в процессе связывания ДНК. Нужно отметить, что Trp74 и Trp176 расположены внутри глобулы фермента, в то время как Trp26 и Trp256 находятся на поверхности (рис. 50). При этом образование фермент-субстратного комплекса, которое вызывает значительное движение N- и C-концевых доменов фермента (рис. 50), приводит также к изменению локального окружения всех четырех остатков Trp. Таким образом, все четыре остатка Trp могут вносить вклад в зарегистрированное изменение интенсивности флуоресценции [338].

Полученные данные о кинетике изменения интенсивности флуоресценции Trp в ходе фермент-субстратного взаимодействия [338] позволили сделать вывод о том, что молекула фермента подвергается последовательным конформационным изменениям (схема 14). На первой стадии происходит первичное связывание ДНК, содержащей повреждение (схема 14). Изгибание ДНК, выворачивание поврежденного основания в активный центр фермента, встраивание в образовавшееся пространство ДНК-спирали аминокислотных остатков Gln69, Leu70 и Tyr71, и образование каталитически компетентного состояния должны происходить в ходе второй и третьей стадии. После этого происходит гидролиз N-гликозидной связи, β-элиминирование 3'- и 5'-фосфатных групп, и диссоциация комплекса фермента с продуктом превращения ДНК. Полученные данные, характеризующие конформационные изменения фермента, не позволили определить природу процессов, происходящих в ходе узнавания повреждения и образования каталитического комплекса.



Рис. 50. Пространственное расположение N- и C-концевых доменов фермента Nei в свободном состоянии (зеленый, PDB ID 1Q39) и в комплексе с ДНК (розовый, PDB ID 1K3W). Остатки Trp выделены зеленым цветом в случае свободной формы фермента и красным цветом в случае комплекса с ДНК.

Схема 14

$$E + DHU \xrightarrow{k_1} (E \cdot DHU)_1 \xrightarrow{k_2} (E \cdot DHU)_2 \xrightarrow{k_3} (E \cdot DHU)_3 \xrightarrow{k_{cat}} E \cdot P \xrightarrow{K_p} E + P$$

где Е – Nei; DHU – DHU-субстрат; $(E•DHU)_n$ – различные фермент-субстратные комплексы, образующиеся в ходе узнавания 5,6-дигидроурацила; E•P – комплекс Е с продуктом реакции P; k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакций отдельных стадий.

3.3.1.1. Конформационные изменения ДНК

Для уточнения природы процессов, происходящих на стадиях в схеме 14, были зарегистрированы конформационные изменения ДНК, содержащей DHU [368]. Для этого использовали флуоресцентные аналоги гетероциклических оснований ДНК – 2аминопурин (aPu), пирролоцитозин (C^{Py}), 1,3-диаза-2-оксофеноксазин (tC^{O}) и 3гидроксихромон (3HC). Как видно из рис. 51, основание, расположенное с 5'-стороны от поврежденного нуклеотида, взаимодействует только с аминокислотным остатком Leu70, тогда как основание, расположенное напротив поврежденного нуклеотида образует контакты также с Gln69 и Tyr71. Таким образом, были выбраны следующие перспективные положения для встраивания флуоресцентных меток: с 5'-стороны от DHU либо напротив DHU в комплементарной цепи.



Рис. 51. Взаимодействие триады аминокислотных остатков Gln69, Leu70 и Туг71 с ДНК в активном центре. Стрелками показаны расстояния между Туг71 Сє2 или Gln69 Nє2 и N3 основания Ade (синий), расположенного напротив поврежденного нуклеотида (3.8 Å или 2.9 Å соответственно); между Туг71 Оп и О4' (3.6 Å); между Leu70 Сб1 и С2 основания Ade (синий), расположенного напротив поврежденного нуклеотида (4,5 Å) или C4 основания Ade (красный), расположенного с 5'-стороны от поврежденного нуклеотида (3.7 Å).

В экспериментах с флуоресцентно-мечеными ДНК-субстратами в качестве контроля ферментативной активности использовали DHU/G₁₂-субстрат, который позволил зарегистрировать конформационные изменения фермента (рис. 52*a*). Минимальная наблюдаемые изменения кинетическая схема, описывающая интенсивности флуоресценции Тгр, была идентична схеме 14 и содержала три равновесные стадии, которые характеризовали связывание субстрата, необратимую стадию, включающую гидролиз N-гликозидной связи и последовательные реакции β-элиминирования 3'- и 5'фосфатных групп, и последующую равновесную стадию диссоциации комплекса 142 фермент-продукт. Константы скорости элементарных стадий, соответствующие этой кинетической схеме, приведены в таблице 17. Константы скорости были использованы для получения профиля образования и расходования фермент-субстратных комплексов, входящих в схему 14 (рис. 52*6*). Следует отметить, что образование первого фермент-субстратного комплекса $(E^{\bullet}S)_1^{Trp}$ происходило в течение первых 50 мс. Максимум концентрации второго комплекса $(E^{\bullet}S)_2^{Trp}$ был достигнут через 0,6 с, тогда как каталитически активный комплекс $(E^{\bullet}S)_3^{Trp}$ формировался через 5–10 с после начала взаимодействия. Необратимые каталитические реакции и последующее высвобождение продукта приводят к росту интенсивности флуоресценции Trp на временах более 20 с. При этом кинетика образования комплекса фермент-продукт Е•Р, регистрируемая по изменению интенсивности флуоресценции Trp, хорошо согласуется с кинетикой накопления продуктов реакции, зарегистрированной методом гель-электрофореза (рис. 52*6*).



Рис. 52. Взаимодействие Nei с **DHU**/ G_{12} -субстратом. (*a*) Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения фермента. (б) Сравнение кинетики изменения интенсивности флуоресценции Trp, накопления продуктов реакции и профиля образования и расходования фермент-субстратных комплексов, входящих в схему 14.

Таблица 17. Константы скорости и равновесия, характеризующие взаимодействие Nei с ДНК-субстратом, содержащим DHU, полученными на основе анализа кинетики флуоресценции Trp, 3HC, tC^O и C^{Py}

Константы	DHU/G ₁₂	DHU/3HC ₁₂	DHU/tC ⁰ 12	DHU/C ^{Py} ₁₂
$k_1, \mathrm{M}^{-1}\mathrm{c}^{-1}$	$(10,5\pm6,2)\times10^{6}$	$(53\pm10)\times10^{6}$	$(200\pm70)\times10^{6}$	$(115\pm30)\times10^{6}$
k_{-1}, c^{-1}	6,1±3,4	69±22	380±150	246±44
k_2, c^{-1}	9,5±2,4	3,9±1,7	0,46±0,16	0,52±0,11
k_{-2}, c^{-1}	1,6±0,2	4,8±1,5	0,005±0,002	2,5±0,2
k_3, c^{-1}	0,4±0,1	0,30±0,08	-	-
k_{-3}, c^{-1}	0,9±0,2	0,4±0,1	-	-
$k_{\rm cat},{\rm c}^{-1}$	0,056±0,027	0,014±0,003	0,035±0,015	0,040±0,028
$K_{\rm P},{ m M}$	$(6,5\pm3,4)\times10^{-6}$	(0,16±0,08)×10 ⁻⁶	$(6,0\pm2,5)\times10^{-6}$	$(3,6\pm2,1)\times10^{-6}$

Используя в качестве контроля данные о конформационных изменениях фермента, проводили регистрацию конформационных изменений ДНК-субстратов. В качестве субстратов использовали дуплексы, содержащие флуоресцентный краситель (aPu, C^{Py}, 3HC) с 5'-стороны от поврежденного основания DHU (рис. 53*a*). Взаимодействие Nei с

^{аРи}DHU/G₁₂-субстратом не приводило к изменениям флуоресценции на временах до 100 с, несмотря на то, что фермент расщепляет этот субстрат с хорошей эффективностью (рис. 53б). Следовательно, aPu не обладает чувствительностью к процессам, проходящим на стадиях образования комплекса с Nei. Увеличение интенсивности флуоресценции aPu на временах более 100 с является результатом уменьшения эффективности тушения флуоресценции вследствие потери стэкинга остатка aPu с соседним основанием при протекании каталитических стадий и диссоциации комплекса фермент-продукт. Связывание Nei с ^{Сру}DHU/G₁₂-субстратом приводило к небольшому увеличению флуоресценции С^{Ру} до 10 с (рис. 53*a*). В отличие от ДНК-субстратов, содержащих аРи и С^{Ру}, ^{3HC}DHU/G₁₂-субстрат позволил зарегистрировать по меньшей мере четыре фазы изменения интенсивности флуоресценции (рис. 53*a*). Однако анализ накопления продуктов реакции методом гель-электрофореза показал, что встраивание флуорофоров С^{Ру} и ЗНС в ДНК приводят к полной потере ферментативной активности (рис. 536). Таким образом, введение в ДНК-дуплекс стерически более объемных флуоресцентных красителей С^{Ру} и ЗНС с 5'-стороны от DHU препятствует достижению каталитически компетентного состояния фермента.


Рис. 53. Взаимодействие Nei с DHU-субстратами, содержащими флуоресцентные аналоги оснований aPu, C^{Py} и 3HC с 5'-стороны от основания DHU. (*a*) Сравнение флуоресцентных кинетических кривых, характеризующих взаимодействие Nei с DHU/G₁₂, ^{3HC}DHU/G₁₂, ^{Cpy}DHU/G₁₂ и ^{aPu}DHU/G₁₂. Вертикальные линии ограничивают временные диапазоны конформационных изменений фермента, соответствующие кинетическим стадиям в схеме 14. (*б*) Влияние флуоресцентных групп на ферментативную активность Nei. Концентрации фермента и ДНК-субстрата составляли 2,0 мкМ и 1,0 мкМ соответственно.

Поэтому на следующем этапе работы был проведен анализ конформационной динамики ДНК-субстратов, несущих флуоресцентные метки (C^{Py} , aPu, t C^{O} или 3HC) напротив поврежденного основания DHU. Кинетические кривые, полученные для этих субстратов, представлены на рис. 54*a*. Из этого рисунка видно, что для всех субстратов наблюдаются изменения интенсивности флуоресценции во всем регистрируемом диапазоне времени. При этом, как показано на рис. 54*б*, флуоресцентные основания C^{Py} и аPu не оказывают влияния на активность Nei, в то время как t C^{O} и 3HC приводят к небольшому замедлению ферментативного процесса.

При взаимодействии Nei с **DHU/aPu**₁₂-субстратом интенсивность флуоресценция аPu изменялась очень незначительно (рис. 54*a*), что свидетельствует о недостаточной чувствительности aPu, расположенного в комплементарной цепи, к конформационным изменениям ДНК, индуцируемым Nei.

Использование **DHU/C^{Py}**₁₂-субстрата позволило зарегистрировать три фазы изменений интенсивности флуоресценции C^{Py} (рис. 54*a*). Для получения кинетической схемы и расчета соответствущих ей констант скорости были проведены эксперименты при разных концентрациях Nei (рис. 55*a*). На основании анализа полученных данных определена минимальная кинетическая схема 15 и рассчитаны значения констант скорости (таблица 17). На рис. 55*б* показан профиль образования и расходования фермент-субстратных комплексов. Быстрое увеличение интенсивности флуоресценции C^{Py} в

течение 10 мс соответствует началу первой стадии, обнаруженной по флуоресценции Trp. Постепенное уменьшение флуоресценции C^{Py} между 10 мс и 10 с включает образование комплексов $(E \cdot S)_2^{Trp}$ и $(E \cdot S)_3^{Trp}$. Последующее выраженное снижение интенсивности флуоресценции C^{Py} на временах более 90 с связано с диссоциацией комплекса фермент-продукт $E \cdot P^{Trp}$.



Рис. 54. Взаимодействие Nei с DHU-субстратами, содержащими напротив основания DHU флуоресцентные аналоги оснований aPu, C^{py} , tC^{O} и 3HC. (*a*) Сравнение флуоресцентных кинетических кривых, характеризующих взаимодействие Nei с DHU/G₁₂, DHU/3HC₁₂, DHU/tC^O₁₂, DHU/C^{Py}₁₂ и DHU/aPu₁₂. Вертикальные линии ограничивают временные диапазоны конформационных изменений фермента, соответствующие кинетическим стадиям в схеме 14. (*б*) Влияние флуоресцентных групп на ферментативную активность Nei. Концентрации фермента и ДНК-субстрата составляли 2,0 мкМ и 1,0 мкМ соответственно.

Схема 15

$$E + DHU \xrightarrow{k_1} (E \cdot DHU)_1 \xrightarrow{k_2} (E \cdot DHU)_2 \xrightarrow{k_{cat}} E \cdot P \xrightarrow{K_p} E + P$$

где Е – Nei; DHU – DHU-субстрат; $(E•DHU)_n$ – различные фермент-субстратные комплексы, образующиеся в ходе узнавания 5,6-дигидроурацила; E•P – комплекс Е с продуктом реакции P; k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакций отдельных стадий.



Рис. 55. Взаимодействие Nei с **DHU**/ C^{py}_{12} -субстратом. (*a*) Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения ДНК. (б) Сравнение кинетики изменения интенсивности флуоресценции C^{Py} и профиля образования и расходования фермент-субстратных комплексов, входящих в схему 15.



Рис. 56. Взаимодействие Nei с **DHU/tC⁰**₁₂-субстратом. (*a*) Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения ДНК. (δ) Сравнение кинетики изменения интенсивности флуоресценции tC⁰ и профиля образования и расходования фермент-субстратных комплексов, входящих в схему 15.

Используя краситель tC^O, так же, как и в случае C^{Py}, удалось зарегистрировать три фазы изменения интенсивности флуоресценции, характеризующие конформационные переходы в субстрате **DHU/tC^O**₁₂ (рис. 54*a*). Необходимо отметить, что в случае tC^O эти фазы протекают в других временных диапазонах, то есть, по своей природе отличаются от фаз, полученных при использовании C^{Py}, однако коррелируют с первыми тремя фазами, наблюдаемыми по флуоресценции Trp. Начальное небольшое увеличение флуоресценции tC^O в течение 0,6 с совпадает с образованием комплексов (E•S)₁^{Trp} и (E•S)₂^{Trp} (рис. 54*a*), тогда как уменьшение интенсивности флуоресценции tC^O в интервале времени 1–30 с хорошо коррелирует с образованием комплекса $(E \cdot S)_3^{Trp}$. Каталитические стадии и диссоциация комплекса фермента с продуктом реакции $E \cdot P^{Trp}$ незначительно влияют на флуоресценцию tC^O. Полученные кинетические данные удовлетворительно описывались схемой 15, содержащей две равновесные стадии образования каталитического комплекса. Значения констант скорости, соответствующие схеме 15, представлены в таблице 17.

В отличие от DHU/ C^{py}_{12} - и DHU/ tC^{0}_{12} -субстратов, при взаимодействии Nei с DHU/3HC₁₂ было зарегистрировано четыре фазы изменения интенсивности флуоресценции 3HC (рис. 54*a*). Следовательно, конформационные изменения DHU/3HC₁₂-субстрата практически совпадали с конформационными изменениями фермента. Быстрое начальное увеличение интенсивности флуоресценции ЗНС связано с образованием первичного комплекса (E•S)1^{Trp}. Вторая фаза увеличения интенсивности флуоресценции 3HC характеризует окончание образования (E•S)1^{Trp} и (E•S)2^{Trp}. В интервале времени 1-50 с происходит небольшое уменьшение интенсивности флуоресценции. В этот момент времени образуется каталитически активный комплекс (E•S)₃^{Trp}. В процессе диссоциации комплекса фермент-продукт E•P^{3HC} происходит дальнейшее уменьшение интенсивности флуоресценции 3HC и ее выход на начальный уровень. Полученные кинетические кривые (рис. 57а) описывали схемой 14. Значения полученные констант скорости представлены в таблице 17.



Рис. 57. Взаимодействие Nei с **DHU/3HC**₁₂-субстратом. (*a*) Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения фермента. (δ) Сравнение кинетики изменения интенсивности флуоресценции 3HC, накопления продуктов реакции и профиля образования и расходования фермент-субстратных комплексов, входящих в схему 14.

Сравнение констант скорости (таблица 17) для процессов, зарегистрированных при использовании разных флуорофоров (Trp, C^{Py}, tC^O и 3HC), показало, что флуорофоры, расположенные напротив повреждения в ДНК, быстрее реагируют на первоначальное связывание с Nei. Константа скорости k_1 , которая характеризует конформационное изменение ДНК, по меньшей мере в 5 раз превышает ту же константу скорости для конформационного изменения фермента. Вероятно, это связано с тем, что изменение интенсивности флуоресценции остатков Тгр происходит только при значительных конформационных изменениях белка, таких как движение С- и N-доменов фермента. Константы скорости k₂ второй стадии связывания, полученные в случаях Trp и 3HC, отличаются незначительно (в 2,4 раза), что указывает на то, что оба флуорофора процесс характеризуют последовательно скоординированный изгибания ДНК. выворачивания основания DHU и встраивание аминокислотных остатков фермента в ДНК-дуплекс. Интересно отметить, что константы скорости k₃ третьей стадии связывания, полученные в случаях Trp и 3HC, и константы скорости k_2 второй стадии связывания, в случае С^{Ру} и tC^O, имеют близкие значения, что указывает на то, что перестройки активного центра, необходимые для достижения каталитически компетентного состояния, требуют взаимных одновременных конформационных изменений фермента и ДНК. Константы скорости каталитической стадии k_{cat} незначительно уменьшаются (~1,5 раза) в случаях DHU/C^{ру}12- и DHU/tC⁰12-субстратов по сравнению с DHU/G12-субстратом. Для DHU/3HC₁₂-субстрата это значение отличается от DHU/G₁₂-субстрата в 4 раза, что соответствует качественным данным, полученным при анализе продуктов реакции методом гель-электрофореза (рис. 54б).

Таким образом, регистрация флуоресценции Тгр и флуорофоров в ДНК позволила зарегистрировать сопряженную конформационную динамику фермента и ДНК в ходе ферментативного процесса и детализировать природу стадий узнавания повреждения. Начальный рост интенсивности флуоресценции Тгр, а также начальное увеличение интенсивности флуоресценции ЗНС до 6 мс, вероятно, характеризуют быстрый процесс «закрытия» N- и C-доменов фермента при образовании первичного неспецифического комплекса. Сравнение кинетических кривых показывает, что за время первого изменения интенсивности флуоресценции Тгр (до 0,6 с) протекают два конформационных изменения ДНК, зарегистрированных по 3HC (плато от 0,006 до 0,02 с и увеличения интенсивности до 1,0 с). Эти фазы кинетики флуоресценции ЗНС могут отражать изгибание спирали ДНК, выворачивание из спирали основания DHU и последующую вставку аминокислотных остатков Gln69, Leu70 и Туг71 в спираль ДНК, поскольку эти процессы приводят к увеличению гидрофобности среды вблизи остатка 3HC. Следующий рост интенсивности флуоресценции Trp (в интервале времени от 1 до 10 с) приводит к незначительному изменению флуоресценции 3HC. В этом интервале времени происходит подстройка структуры активного центра, необходимая для достижения каталитически компетентного состояния. Последнее изменение интенсивностей флуоресценции Trp и 3HC на временах более 10 с является результатом каталитических стадий и диссоциации комплекса фермент-продукт, которые приводят к появлению более гидратированногоокружения 3HC в ДНК-продукте.

3.3.1.2. Конформационные изменения мутантных форм Nei при взаимодействии с ДНК

С целью дальнейшего уточнения природы специфических стадий связывания ДНК использовали стратегию включения дополнительного остатка Trp в разные части молекулы фермента [456]. Для замены были выбраны аминокислотные остатки Glu2, Leu70, Tyr71, Phe121, Phe230 и Pro253, которые участвуют в связывании ДНК и каталитических стадиях. Методом сайт-направленного мутагенеза были получены мутантные формы Nei, содержащие замены Glu2Gln, Leu70Ser, Leu70Trp, Tyr71Trp, Phe121Trp, Phe230Trp и Pro253Trp. В большинстве случаев специфические аминокислоты были замещены флуоресцентным остатком Trp, что позволило установить как наличие конформационных переходов вблизи этих остатков в ходе ферментативного процесса, так и роль этих аминокислотных остатков в узнавании поврежденной ДНК.

Остатки Leu70 и Tyr71, которые встраиваются в ДНК-дуплекс (рис. 58а), могут выступать в роли «клина» и играть важную роль в начальном распознавании и последующем выворачивании поврежденного основания. Результаты рентгеноструктурного исследования показали, что и Leu70, и Tyr71 имеют прямые контакты с основаниями ДНК, расположенными как напротив, так и с 5'- и 3'-сторон от поврежденного нуклеотида (рис. 51). Остаток Phe121 расположен в пептидном линкере, соединяющем N- и C-домены фермента, образующие сайт связывания ДНК, и взаимодействует с фосфатными группами ДНК (рис. 586). Остаток Phe230 расположен в кармане активного центра фермента и образует контакт с 5'-фосфатной группой поврежденного нуклеотида (рис. 586). Остаток Pro253 расположен в ДНК-связывающем сайте фермента и взаимодействует с двумя фосфатными группами нуклеотидов, расположенных с 5'-стороны от поврежденного нуклеотида (рис. 58г). Замена каталитического остатка Glu2 инактивирует фермент и может позволить провести регистрацию только стадий связывания ДНК-субстрата.



Рис. 58. Специфические контакты, обеспечивающие узнавание поврежденного основания в активном центре Nei. Контакты, образующиеся при взаимодействии ДНК с аминокислотными остатками Gln69, Leu70 и Tyr71 (*a*), Phe121 (*б*), Phe230 (*в*) и Pro253 (*г*). Стрелками показаны расстояния между (*a*) Tyr71 Cɛ1 и N3 основания Ade, расположенным напротив поврежденного нуклеотида (3,8 Å); Tyr71 Oŋ и O4' нуклеотида (3,6 Å); Leu70 Cô1 и N9 оснований Ade и Gua (4,2 Å и 3,7 Å соответственно); Gln69 Nɛ2 и N3 основания Ade, расположенным напротив поврежденного врежденного нуклеотида (3,8 Å и 2,9 Å соответственно); Gln69 Nɛ2 и N2 основания Gua (3,1 Å); (*б*) Phe230 Cζ и O-атомом фосфатной группы (3,7 Å); (*в*) Phe121 Cɛ1 или Cζ и O-атомом фосфатных групп (оба 3,5 Å); (*г*) Pro253 Cδ и O-атомом фосфатной группы, и Pro253 Cγ и O-атомом фосфатной группы (оба 3,4 Å).

Относительную активность мутантных форм ферментов определяли прямым анализом кинетики накопления продуктов реакции методом гель-электрофореза (рис. 59). Анализ продуктов реакции показал, что ферментативная активность в отношении **DHU/G₁₂-** и **AP/G₁₂-**субстратов практически не зависит от замены остатков Туг71, Phe121, Phe230 и Pro253 на остаток Trp. Максимальный эффект влияния на ферментативную активность получен в случае замены Leu70 на Ser и Trp. У данных мутантных форм практически полностью отсутствовала AP-лиазная активность в случае **AP/G₁₂-**субстрата. В то время как активность в отношении **DHU/G₁₂-**субстрата снижалась более чем в пять раз по сравнению с ферментом дикого типа.



Рис. 59. Относительная активность Nei WT и мутантных форм фермента. Анализ продуктов Nгликозилазной реакции и реакций β-элиминирования через 30 с при взаимодействии Nei WT и мутантных форм фермента с **DHU/G**₁₂- и **AP/G**₁₂-субстратами.

Изменения интенсивности флуоресценции Тгр, характеризующие конформационные перестройки фермента, были зарегистрированы при взаимодействии мутантных форм с **DHU/G**₁₂- и **AP/G**₁₂-субстратами (рис. 60). Как видно на рис. 60, для всех мутантных форм фермента имеются различия в амплитуде и форме флуоресцентных кинетических кривых. Вид полученных кинетических кривых позволяет заключить, что снижение ферментативной активности, вызванное заменой аминокислот, приводит к уменьшению амплитуды изменений интенсивности флуоресценции Trp. Следует отметить, что замена Glu2Gln, полностью инактивирующая ферментативную активность, одновременно практически полной потере каких-либо приводит к изменений интенсивности флуоресценции Тгр. Кроме того, как упоминалось ранее [338], в случаях взаимодействия Nei дикого типа с неповрежденной ДНК или с ДНК, содержащей нерасщепляемый аналог AP-сайта (F-сайт), не удалось зарегистрировать изменение интенсивности флуоресценции Тгр. Полученные данные свидетельствуют о том, что амплитуда изменений интенсивности флуоресценции Тгр связана с протеканием каталитических стадий ферментативного процесса.



Рис. 60. Экспериментальные кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения фермента в процессе взаимодействия Nei дикого типа и мутантных форм с (*a*) **DHU/G**₁₂- и (δ) **AP/G**₁₂-субстратами.

Более того, для мутантных форм Nei Tyr71Trp, Nei Phe121Trp, Nei Phe230Trp и Nei Pro253Trp, сохранивших ферментативную активность, наблюдается различное поведение интенсивности флуоресценции Trp на начальном участке кинетической кривой (до 5 с), который характеризует стадии узнавания повреждения и образования каталитического комплекса. Такие различия с формой кинетической кривой, полученной для фермента дикого типа, свидетельствуют о вкладе в интенсивность флуоресценции нового остатка Trp и позволяют сделать заключение о наличии конформационных изменений фермента в области данной аминокислоты.

Для расчета констант скорости, характеризующих ферментативный процесс, были получены концентрационные серии кинетических кривых, отражающие взаимодействие мутантных форм фермента с DHU/G₁₂- (рис. 61) и AP/G₁₂-субстратами (рис. 62). Экспериментальные данные, полученные для Nei Tyr71Trp, Nei Phe121Trp, Nei Phe230Trp и Nei Pro253Trp при различных концентрациях ДНК-субстратов, хорошо описывались предложенной ранее схемой 14. В то же время экспериментальные данные для мутантов Leu70Trp и Leu70Ser удовлетворительно описывались упрощенной схемой 16. В отличие от кинетической схемы 14 она содержит одну равновесную стадию связывания фермента с ДНК, одну необратимую каталитическую стадию и равновесную стадию диссоциации

комплекса фермент-продукт. Значения констант скорости и равновесия, полученные для **DHU/G₁₂-** и **AP/G₁₂-**субстратов, приведены в таблицах 18 и 19 соответственно.

Схема 16

$$E + DHU \xrightarrow{k_1} E \cdot DHU \xrightarrow{k_{cat}} E \cdot P \xrightarrow{K_P} E + P$$

где Е – Nei; DHU – DHU-субстрат; E•DHU – фермент-субстратный комплекс; E•P – комплекс Е с продуктом реакции P; k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакций отдельных стадий.



Рис. 61. Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения (*a*) Nei Leu70Ser, (*b*) Nei Leu70Trp, (*b*) Nei Tyr71Trp, (*c*) Nei Pro253Trp, (*b*) Nei Phe230Trp и (*c*) Nei Phe121Trp в процессе взаимодействия с ДНК дуплексами **DHU/G**₁₂-субстратом.



Рис. 62. Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения (*a*) Nei Leu70Ser, (*б*) Nei Leu70Trp, (*в*) Nei Tyr71Trp, (*г*) Nei Pro253Trp, (*д*) Nei Phe230Trp и (*е*) Nei Phe121Trp в процессе взаимодействия с ДНК дуплексами **AP/G**₁₂-субстратом.

Константы	L70S	L70W	Y71W	F121W	F230W	P253W	WT [338]
$k_1, \mathrm{M}^{-1}\mathrm{c}^{-1}$	$(0,09\pm0,02)\times10^{6}$	$(0,06 \pm 0,01) \times 10^6$	$(21 \pm 3) \times 10^{6}$	$(39 \pm 11) \times 10^{6}$	$(30 \pm 2) \times 10^{6}$	$(27 \pm 2) \times 10^{6}$	$(36 \pm 7) \times 10^{6}$
k_{-1}, c^{-1}	$1 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	330 ± 30	120 ± 31	310 ± 45	310 ± 26	410 ± 20
K_1, M^{-1}	$0,9 \times 10^{5}$	$1,5 \times 10^5$	0,63×10 ⁵	3×10 ⁵	$0,97 \times 10^{5}$	$0,87 \times 10^5$	$0,88 \times 10^5$
k_2, c^{-1}			16 ± 3	17 ± 4	21 ± 3	23 ± 3	27 ± 2
k_{-2}, c^{-1}			$2,5 \pm 0,1$	$0,55 \pm 0,25$	$1,2 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,3$
<i>K</i> ₂			6,4	31	17,5	28,7	15
k_3, c^{-1}			$0,4 \pm 0,1$	$0,58 \pm 0,15$	$0,82 \pm 0,04$	$1,0 \pm 0,03$	1,6 ± 0,1
k_{-3}, c^{-1}			$1,1 \pm 0,1$	$0,89 \pm 0,14$	$0,66 \pm 0,06$	$1,2 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,2$
<i>K</i> ₃			0,36	0,65	1,2	0,83	1,1
$K_{\rm ass},{ m M}^{-1}$			$1,45 \times 10^5$	6×10 ⁶	2×10 ⁶	2×10^{6}	$1,45 \times 10^{6}$
$k_{\rm cat},{ m c}^{-1}$	$0,09 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,09$	$0,38 \pm 0,01$	$0,4 \pm 0,03$	$0,35 \pm 0,02$
<i>К</i> р, М	$(1,0\pm0,2)\times10^{-6}$	$(0,7\pm0,5)\times10^{-6}$	$(0,4\pm0,1)\times10^{-6}$	$(0,6\pm0,1)\times10^{-6}$	$(0,6\pm0,2)\times10^{-6}$	$(0,63\pm0,08)\times10^{-6}$	$(0,7\pm0,1)\times10^{-6}$

Таблица 18. Константы скорости и равновесия, характеризующие взаимодействие Nei дикого типа и мутантных форм с DHU/G₁₂-субстратом

 $K_{i} = k_{i}/k_{-i}, i$ – номер стадии, $K_{ass} = K_{1} \times K_{2} \times K_{3}.$

Константы	L70S	L70W	Y71W	F121W	F230W	P253W	WT [338]
$k_1, \mathrm{M}^{-1}\mathrm{c}^{-1}$	$(0,09\pm0,01)\times10^{6}$	$(0,11\pm0,02)\times10^{6}$	$(14 \pm 2) \times 10^{6}$	$(16 \pm 1) \times 10^{6}$	$(18 \pm 8) \times 10^{6}$	$(18 \pm 3) \times 10^{6}$	$(12 \pm 1) \times 10^{6}$
k_{-1}, c^{-1}	$0,9 \pm 0,03$	$0,6 \pm 0,05$	170 ± 17	132 ± 12	81 ± 32	130 ± 28	260 ± 10
K_1, M^{-1}	1×10^{5}	$1,8 \times 10^5$	$0,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$0,5 \times 10^5$
k_2, c^{-1}			21 ± 2	35 ± 3	25 ± 6	37 ± 4	30 ± 1
k_{-2}, c^{-1}			$1,4 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,5$	4,4 ± 0,2
<i>K</i> ₂			15	39	25	19	6,8
k_3, c^{-1}			0,13 ± 0,01	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$0,35 \pm 0,02$	2,1 ± 0,1
k_{-3}, c^{-1}			$1,0 \pm 0,1$	3,0 ± 0,6	$4,7 \pm 1,1$	$1,9 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,1$
<i>K</i> ₃			0,13	0,27	0,19	0,18	1,9
$K_{\rm a},{ m M}^{-1}$	1×10 ⁵	1×10^{5}	1,6×10 ⁵	$12,6 \times 10^5$	$10,5 \times 10^5$	4,9×10 ⁵	6,5×10 ⁵
$k_{\rm cat},{ m c}^{-1}$	$0,09 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,007$	$0,29 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,05$	$1,0 \pm 0,1$	$0,\!45 \pm 0,\!08$	$0,79 \pm 0,03$
<i>К</i> р, М	$(0,18\pm0,02)\times10^{-6}$	$(0,2\pm0,1)\times10^{-6}$	$(0,11\pm0,01)\times10^{-6}$	$(1,5\pm0,4)\times10^{-6}$	$(1,1\pm0,6)\times10^{-6}$	$(1,4\pm0,2)\times10^{-6}$	$(1,8\pm0,3)\times10^{-6}$

Таблица 19. Константы скорости и равновесия, характеризующие взаимодействие Nei дикого типа и мутантных форм с AP/G₁₂-субстратом

 $K_{i} = k_{i}/k_{-i}, i$ – номер стадии, $K_{a} = K_{1} \times K_{2} \times K_{3}.$

Сравнение данных, приведенных в таблицах 18 и 19, показывает, что замена Phe121Trp приводит к увеличению общей константы связывания K_{ass} с DHU/G₁₂субстратом в четыре раза по сравнению с ферментом дикого типа. При этом образование каталитического комплекса (E•DHU)₃ происходит менее эффективно, чем для фермента дикого типа. Поскольку остаток Phe121 находится в линкерном пептиде, соединяющем два домена белка, которые образуют ДНК-связывающий центр, и взаимодействует с фосфатными группами, то его влияние на образование каталитического комплекса свидетельствует о том, что формирование этих контактов за счет окончательной подстройки доменов происходит на этой стадии. Более того, по-видимому, мутантная форма Nei Phe121Trp имеет пониженную активность (значение k_{cat} примерно в два раза меньше, чем для WT) по сравнению с ферментом дикого типа за счет потери и/или не оптимального формирования контактов с ДНК остатком Trp.

Остаток Phe230 является одной из аминокислот, образующих карман активного центра, в котором располагается вывернутое поврежденное основание. Более того, Phe230 взаимодействует с 5'-фосфатной группой поврежденного нуклеотида. Тем не менее, замена Phe230Trp практически не влияет на активность фермента, что свидетельствует о том, что остаток Trp может выполнять аналогичные контакты с вывернутым основанием, как и остаток Phe.

Мутантная форма Nei Pro253Trp имеет активность близкую к ферменту дикого типа. Остаток Pro253 расположен в ДНК-связывающем центре фермента, поэтому отсутствие влияния замены Pro253Trp на протекание стадий связывания ДНК-субстрата может указывать на две возможности: остаток Trp способен образовывать те же контакты с ДНК, что и Pro253 или контакты между Pro253 и рибозофосфатным остовом субстрата не имеют большого значения для образования каталитически компетентного состояния.

Данные рентгеноструктурного анализа [455] и анализа мутантных форм фермента [427] свидетельствуют о том, что Туг71 может выполнять функцию сенсора поврежденного основания за счет вклинивания между азотистыми основаниям ДНК. Однако замена Туг71Тгр лишь незначительно уменьшала каталитическую активность. Кроме того, согласно [427], мутантная форма Nei Tyr71Ala также сохраняет каталитическую активность близкую ферменту дикого типа. Эти К данные свидетельствуют о том, что контакты, образованные остатком Туг71, не являются необходимыми для формирования каталитического комплекса. Тем не менее, замена Туг71Trp приводит к уменьшению амплитуды изменений интенсивности флуоресценции Trp по сравнению с WT. Сравнение констант скорости показывает, что замена Туг71Trp

влияет на вторую и третью стадии образования фермент-субстратных комплексов в схеме 14 и в целом снижает константу связывания ДНК K_{ass} в четыре (для **AP/G**₁₂-субстрата) и десять (для **DHU/G**₁₂-субстрата) раз по сравнению с WT.

Полученные данные показывают, что замена остатка Leu70 сильно влияет как на стадию связывание ДНК-субстрата, так и на каталитическую стадию. Замены Leu70Ser и Leu70Trp приводят к значительному (~5–10 раз) снижению каталитической активности и уменьшению амплитуды изменения интенсивности флуоресценции Trp. Медленное, по сравнению с WT, уменьшение интенсивности флуоресценции Trp (~ 0,2 с у WT и ~10 с у Leu70Trp) в процессе связывания ДНК-субстратов указывает на то, что остаток Leu70 важен на самой ранней стадии образования комплекса фермент-субстрат. Скорее всего, замена Leu70 нарушает систему специфических контактов, которые важны для первичного узнавания повреждения.

Связывание ДНК-субстратов мутантными формами Nei Leu70Ser и Nei Leu70Trp протекает примерно в 300 раз медленнее, чем первая стадия связывания для других мутантных форм, а также фермента дикого типа. Более того, константа связывания Nei Leu70Ser и Nei Leu70Trp **DHU/G**₁₂-субстратом в десять раз ниже, чем в других случаях (сравнение K_1 для Nei Leu70Ser и Nei Leu70Trp и K_a для других мутантных форм и фермента WT, таблица 18). Кроме того, значение k_{cat} в четыре раза ниже, чем для фермента WT. Тем не менее, поскольку обе мутантные формы имеют остаточную каталитическую активность, можно сделать вывод о том, что вторая и третья стадии связывания в схеме 14, ведущие к образованию каталитически активного фермент-субстратного комплекса, проходят очень неэффективно при замене остатка Leu70. Таким образом, полученные данные свидетельствует о том, что остаток Leu70 является «сенсором» повреждения и играет ключевую роль в процессе поиска и выворачивания поврежденного основания из дуплекса ДНК.

Таким образом, совокупность полученных данных, характеризующих конформационные изменения фермента и ДНК-субстратов, а также мутационный анализ позволили предложить молекулярно-кинетический механизм узнавания повреждения ферментом Nei (рис. 63). Стадия (1) соответствует быстрому первоначальному связыванию ДНК и образованию неспецифического комплекса фермент-субстратного комплекса, в котором N- и C-домены фермента находятся в закрытом положении. В этом комплексе происходит вклинивание остатка Leu70 в ДНК-дуплекс, которое является ключевым процессом узнавания поврежденного участка ДНК. Стадия (2) включает изгиб

двойной спирали в месте поврежденного основания, выворачивание DHU из дуплекса и встраивание Туг71 в ДНК-дуплекс. Остаток Туг71 необходим для стабилизации вывернутой конформации поврежденного основания. Кроме того, на стадии (3) в процессе подстройки активного центра для достижения каталитически-компетентного состояния остаток Туг71 также принимает участие. На этой стадии образуются контакты между Phe121 и рибозофосфатным остовом ДНК. Формирование каталитического комплекса приводит к гидролизу N-гликозидной связи и последующей реакции β-элиминирования 3'-и 5'-фосфатных групп (4). Завершает ферментативный цикл диссоциация комплекса фермент-продукт (стадия 5).



Рис. 63. Схематический механизм структурных перестроек в процессе взаимодействия Nei и поврежденной ДНК. В качестве структурных моделей для свободного фермента Е и всех комплексов с ДНК ((E•S)_i и (E•P)) использованы пространственные структуры 1Q39 [454] и 1K3W [455] соответственно.

3.3.2. Формамидопиримидин-ДНК-гликозилаза Fpg из E. coli

В прокариотических клетках окисленные азотистые основания, в том числе охоG, репарируются ферментом формамидопиримидин-ДНК-гликозилазой (Fpg-белком) [13, 152, 457]. Fpg состоит из двух доменов, связанных между собой полипептидом [458]. Nконцевой домен включает В-сэндвичевый кор и длинную альфа-спираль, которая заканчивается участвующими в катализе остатками Glu2 и Pro1 [175, 177]. Стерминальный домен состоит в основном из альфа-спиралей и содержит два консервативных для Fpg-белков структурных мотива: H2tH (helix-two turn-helix) и цинковый палец. Молекула белка имеет положительно заряженный канал, в котором происходит связывание ДНК. Для того, чтобы прошел каталитический акт, поврежденное основание должно быть вывернуто из цепи ДНК и помещено в активный центр фермента (рис. 64). Это достигается благодаря изгибанию цепи ДНК в месте расположения поврежденного основания. После выворачивания поврежденного основания из цепи ДНК образующееся свободное пространство заполняется аминокислотными остатками Met73, Arg108 и Phe110 белка [458]. При этом с 3'-стороны от охоGua встраиваются остатки Met73 и Phe110, в то время как с 5'-стороной взаимодействует остаток Arg108 (рис. 64). В каталитически компетентном состоянии атом С1' становится доступным для атаки нуклеофильной группой фермента, в роли которой выступает остаток Pro1, что в конечном итоге ведет к гидролизу N-гликозидной связи и образованию основания Шиффа [177]. После чего происходит разрыв фосфодиэфирной связи со стороны З'-атома углерода остатка 2'-дезоксирибозы путем β-элиминирования и образуется одноцепочечный разрыв. Затем фермент Fpg катализирует вторую реакцию β-элиминирования, которая приводит к удалению остатка рибозы в форме 4-оксо-2-пентеналя и образованию однонуклеотидного пробела с остатками фосфатных групп на 3'- и 5'-концах ДНК [175, 177, 178] (аналогично Nei, рис. 48). Согласно работам [178, 439, 459, 460], лимитирующей стадией процесса является гидролиз N-гликозидной связи.

В цикле работ [337, 381, 460, 462] наблюдение за конформационными изменениями Fpg дикого типа, мутантных форм Phe110Trp и Phe110Ala и ДНК-субстратов осуществляли по изменению интенсивности флуоресценции остатков Trp и aPu соответственно. Для выяснения природы стадий ферментативного процесса, сопровождающихся изменениями конформаций фермента и ДНК, использовали 12-ти звенные дуплексы, содержащие остатки охоG, AP-сайт и F-сайт. В качестве контроля использовали дуплекс с неповрежденным нуклеотидом G. Такое постадийное усложнение субстрата, заключающееся в переходе от неспецифического дуплекса ДНК (G-лиганд, наиболее



Рис. 64. (*a*) Структура комплекса фермента Fpg из *Bacillus stearothermophilus* с дуплексом ДНК, содержащим охоб (PDB ID 1R2Y) [461]. (*б*) Функционально важные аминокислотные остатки фермента Fpg из *Escherichia coli*, участвующие в образовании специфических контактов между ферментом и ДНК [458].

простые взаимодействия) к специфическому охоG-субстрату (полный ферментативный цикл реакций) позволило проследить конформационные изменения,происходящие в молекуле фермента и субстрата. Данные, полученные для G- и F-лигандов и AP-субстрата, послужили основой для анализа наиболее сложного процесса взаимодействия фермента со специфическим охоG-субстратом. Основное отличие охоG-субстрата состоит в том, что к стадиям связывания добавляется процесс узнавания основания охоGua и его взаимодействие с активным центром фермента.

Совокупность данных, представленных в работах [337, 381, 460, 462], позволила сделать заключение о том, что образование каталитически активного комплекса фермента Fpg со специфическим ДНК-субстратом проходит в результате не менее пяти стадий (схема 17), в ходе которых происходят взаимосогласованные конформационные превращения белковой молекулы и ДНК. Первичное неспецифическое связывание приводит к формированию столкновительного комплекса с ДНК. Образование второго комплекса играет ключевую роль в процессе распознавания поврежденного участка ДНК. Используя мутантную форму Fpg, содержащую замену Phe110 на флуоресцентный остаток Trp, были идентифицированы стадии, включающие движение Phe110 в ходе 163

конформационных перестроек фермента. Показано, что вторая и третья стадии в схеме 17 особенно чувствительны к замене Phe110Trp, что свидетельствует об участии Phe110 на этих стадиях узнавания и связывания поврежденного дуплекса. Кроме того, в случае мутантной формы Phe110Ala не удалось зарегистрировать конформационные изменения фермента при взаимодействии с охоG-субстратом. В то же время замена Phe110Ala не влияла на активность относительно AP-субстрата. Эти данные свидетельствуют о том, что Phe110 необходим для поиска и выворачивания основания охоGua. В том случае, когда в сайте связывания фермента находится дуплекс, содержащий охоG, происходит третья стадия процесса – выворачивание поврежденного основания. Эта стадия приводит к формированию полости в дуплексе ДНК. Четвертая стадия характеризует процесс внедрения аминокислотных остатков Met73 и Arg108 в образовавшуюся в ДНК полость. После этого происходит подстройка конформации активного центра фермента и осуществление каталитических стадий процесса. Завершает ферментативный цикл равновесная стадия диссоциации комплекса фермент-продукт.

Схема 17

$$E + OG \xrightarrow{k_1} (E \circ OG)_1 \xrightarrow{k_2} (E \circ OG)_2 \xrightarrow{k_3} (E \circ OG)_3 \xrightarrow{k_4} (E \circ OG)_4 \xrightarrow{k_5} (E \circ OG)_5 \xrightarrow{k_6} E \circ P \xrightarrow{k_7} E + P$$

где E – Fpg; OG – охоG-субстрат; (E•OG)_n – различные фермент-субстратные комплексы, образующиеся в ходе узнавания 8-оксогуанина; E•P – комплекс E с продуктом реакции P; k_i и k_{i} – константы скорости прямых и обратных реакций отдельных стадий.

3.3.2.1. PELDOR анализ процессов изгибания ДНК

Определение угла изгиба ДНК-дуплексов, вызванное как самим поврежденным нуклеотидом, так и индуцированное Fpg в равновесных условиях, (рис. 65) проведено методом двойного электрон-электронного резонанса (Pulsed ELectron DOuble Resonance, PELDOR). Метод PELDOR позволяет рассчитать расстояние между двумя спиновыми метками и широко применяется в структурных исследованиях ДНК [463].

Проведен анализ влияния F-сайта на структуру ДНК-дуплекса и показано, что введение F-сайта приводит к уменьшению среднего расстояния между спиновыми метками на 0,09 нм и 0,13 нм в случае 12-ти и 13-ти звенных дуплексов ДНК (таблица 20) [464]. Это уменьшение, скорее всего, связано с изгибом дуплекса в месте вставки (рис. 656) и может быть достигнуто при угле изгиба около 20°. Однако при увеличении длины дуплекса до 17 нуклеотидов, приводящих к повышению тепловых флуктуаций,

регистрация влияния F-сайта затрудняется. Нужно также отметить, что охоG практически не влияет на структуру ДНК-дуплекса.



Рис. 65. Схематические представления спин-меченой молекулы ДНК, (*a*) не содержащей повреждений, (*б*) содержащей поврежденный нуклеотид и (*в*) в составе комплекса фермент-ДНК. Угол изгиба молекулы ДНК Θ можно рассчитать согласно формуле $\cos\Theta = (r^2 - r_1^2 - r_2^2)/(2r_1r_2)$.

На следующем этапе работы проведен анализ индуцированных ферментом структурных изменений в дуплексах ДНК (рис. 65*6*) [465]. Показано, что Fpg изгибает неповрежденный 13-ти звенный дуплекс (образцы G/C_{13} и $G/C_{13}/Fpg$, таблица 20). Эти данные показывают, что образование неспецифического комплекса фермент-ДНК сопровождается структурными изменениями ДНК, в результате которых, вероятно, происходит обнаружение поврежденного основания. В случае неповрежденного 17-ти звенного дуплекса не удалось зарегистрировать индуцированный Fpg изгиб ДНК, то есть величины r_{max} для свободного дуплекса и в составе комплекса были близки. Однако при образовании комплекса происходит уширение функции распределения расстояний на 0,2 нм. Согласно рентгеноструктурным данным, в ДНК-связывающем центре Fpg образуются контакты с восемью нуклеотидами. Таким образом, на 17-ти звенном дуплексе G/C_{17} возможно образование набора комплексов фермент-ДНК, в которых Fpg распределен по всей длине дуплекса, что приводит к уширению функции распределения расстояний, но не сдвигу ее максимума. Для ДНК-дуплексов F/C_{13} и F/C_{17} , содержащих F-сайт, было

165

зарегистрировано существенное уменьшение расстояния в комплексах с Fpg (таблица 20), что хорошо согласуется с данными рентгеноструктурного анализа [13, 420, 458].

Образец	<i>r</i> _{max} (нм)*	Δ (нм)
G/C ₁₂	4,35	0,98
F/C ₁₂	4,26	0,95
G/C ₁₃	4,96	1,12
oxoG/C ₁₃	4,96	1,15
F/C ₁₃	4,83	1,12
F/C ₁₃ /Fpg	4,6	1,2
G/C ₁₃ /Fpg	4,78	1,1
G/C ₁₇	6,0	1,2
oxoG/C ₁₇	6,02	1,25
F/C ₁₇	5,98	1,23
F/C ₁₇ /Fpg	5,76	1,2
G/C ₁₇ /Fpg	5,99	1,4

Таблица 20. Расстояние между спиновыми метками в ДНК-дуплексах, содержащих G, охоG и F-сайт, а также в комплексе с Fpg

*Параметры r_{max} и Δ характеризуют расстояние, соответствующее максимуму распределения, и ширине на полувысоте в функции распределения Гауса.

Таким образом, анализ расстояний в модельных ДНК-дуплексах показал, что присутствие F-сайта в дуплексе приводит к его изгибу примерно на 20°, в то время как нуклеотид, содержащий поврежденное основание охоG, не влияет на общую структуру дуплекса. Кроме того, в равновесных условиях показано, что Fpg приводит к дополнительному изгибанию ДНК-дуплекса, содержащего F-сайт, и индуцирует изгиб неповрежденной ДНК при образовании неспецифического комплекса.

3.3.2.2. Анализ накопления продуктов реакции в миллисекундном и секундном диапазонах времени методом «прерывания реакции»

Методом «прерывания реакции» («quench-flow») показано, что кинетические кривые накопления продуктов ферментативной реакции характеризуются наличием «скачка» ("burst") в диапазоне времени до 1 с (рис. 66) [466]. При этом в предстационарном периоде реакции в условиях «одного оборота фермента» активность Fpg по отношению к **oxoG/C₁₂-** и **AP/C₁₂-**субстратам была одинакова, то есть, разрыв цепи в обоих ДНК-субстратах происходил с одинаковыми скоростями, тогда как в стационарном периоде реакция с **AP/C₁₂-**субстратом протекала в два раза быстрее, чем с **oxoG/C₁₂-**субстратом. Эти данные свидетельствуют о том, что лимитирующей стадией ферментативного процесса является высвобождение фермента из комплекса с продуктом.



Рис. 66. Накопление продуктов реакции в процессе взаимодействия Fpg с (*a*) **охоG/С**₁₂- и (δ) **АР/С**₁₂-субстратами. Приведены серии кривых, в которых концентрация одного из компонентов (Fpg или ДНК-субстрат) была равна 2,0 мкМ, а концентрация второго компонента варьировалась (концентрация показана справа от кривых). Остановку реакции проводили раствором 7 М мочевины.

Схема 18 описывает минимально возможный кинетический механизмом реакции, с помощью которой начальный «скачок» накопления продуктов ферментативной реакции можно объяснить медленной диссоциацией комплекса фермент-продукт [467, 468]. Согласно этой схеме наблюдаемая концентрация продукта равна сумме концентраций свободного продукта реакции Р и комплекса фермент-продукт E•P. Следует отметить, что амплитуда скачка, полученная путем линейной экстраполяции участка кривых к нулевому времени, оказалась значительно меньше, чем соответствующая концентрация фермента, что косвенно свидетельствует о том, что стадия образования комплекса фермент-продукт может быть обратимой. Поэтому анализ кинетических кривых был проведен с использованием кинетической схемы 19, включающей обратимое образование комплекса фермент-продукт. В этом случае уменьшение амплитуды скачка по сравнению с начальной концентрацией фермента может быть вызвано тем, что величина k_{-2} , сравнима с величиной k_2 .

Схема 18

$$E + S \xrightarrow{k_1} E \cdot S \xrightarrow{k_2} E \cdot P \xrightarrow{k_3} E + P$$

где Е – Fpg; S – **охоG/C**₁₂- и **АР/C**₁₂-субстраты; E•S – фермент-субстратный комплекс; E•P – комплекс Е с продуктом реакции P; k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакций отдельных стадий.

Схема 19

$$E + S \xrightarrow{k_1} E \cdot S \xrightarrow{k_2} E \cdot P \xrightarrow{k_3} E + P$$

где Е – Fpg; S – **охоG/C**₁₂- и **AP/C**₁₂-субстраты; E•S – фермент-субстратный комплекс; E•P – комплекс Е с продуктом реакции P; k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакций отдельных стадий.

Анализ кинетических данных согласно схеме 19 позволил рассчитать значения констант скорости (таблица 21). Нужно отметить, что константы скорости k_2 имеют близкие значения для **охоG/C**₁₂- и **AP/C**₁₂-субстратов. В то время как скоростьлимитирующая константа диссоциации комплекса фермент-продукт E•P (k_3) была в 1,7 раза выше для **AP/C**₁₂-субстрата, что указывает на то, что высвобождение продукта в этом случае происходит быстрее.

Таблица 21. Константы скорости, характеризующие взаимодействие Fpg с **охоG/C₁₂-** и **АР/C₁₂-**субстратами

Константы	oxoG/C ₁₂	AP/C_{12}
$k_1, \mathrm{M}^{-1} \times \mathrm{c}^{-1}$	$(640 \pm 40) \times 10^{6}$	$(840 \pm 110) \times 10^{6}$
k_{-1}, c^{-1}	560 ± 30	290 ± 90
k_2, c^{-1}	$2,5 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,1$
k_{-2}, c^{-1}	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
k_3, c^{-1}	$0,003 \pm 0,001$	$0,005 \pm \overline{0,001}$

Сравнение характерных времен образования и расходования различных ферментных комплексов ДНК (рис. 67) показывает, что комплекс $E \cdot OG^Q$, полученный по данным «quench-flow», соответствует комплексам $E \cdot OG_1^{Trp}$ и $E \cdot OG_2^{Trp}$. Начало накопления комплекса $E \cdot OG_3^{Trp}$ совпадает с появлением комплекса $E \cdot P^Q$. Согласно полученным раннее данным [120], при образовании комплекса $E \cdot OG_2^{Trp}$ происходит дестабилизация локальной структуры ДНК, а комплекс $E \cdot OG_3^{Trp}$, скорее всего, связан с выворачиванием поврежденного основания из спирали ДНК. Комплекс $E \cdot OG_4^{Trp}$ был приписан к процессу встраивания аминокислотных остатков Met73 и Arg108 в образовавшуюся полость в ДНК. Действительно, по данным «quench-flow», химическая реакция протекает в комплексе $E \cdot OG_3^{Trp}$. С одной стороны это свидетельствует о том, что уже на этой стадии

поврежденный нуклеотид должен быть полностью вывернут в активный центр, а каталитический остаток Pro1 имеет доступ к атому C1'. То есть гидролиз N-гликозидной связи и образование основания Шиффа происходят в комплексе $E \cdot OG_3^{Trp}$. Тогда комплексы $E \cdot OG_4^{Trp}$ и $E \cdot OG_5^{Trp}$ были бы обнаружены в виде комплекса $E \cdot P^Q$ в экспериментах «quench-flow». Альтернативный вариант интерпретации данных, полученных методом «quench-flow» заключается в том, что воздействие «тушителя» (7 М мочевины) ферментативной реакции на различные фермент-субстратные комплексы $E \cdot OG_1^{Trp}$ может быть различным. При этом после выворачивания поврежденного основания в комплексе $E \cdot OG_3^{Trp}$ воздействие «тушителя» замедляется настолько, что диссоциация комплекса фермент-субстрат происходит медленнее внутримолекулярных конформационных перестроек, ведущих к образованию каталитически компетентного состояния и протекания химических стадий.



Рис. 67. Сравнение профилей образования и расходования фермент-субстратных комплексов, зарегистрированных по изменению интенсивности флуоресценции Trp (индекс Trp, схема 17) и данных метода «quench-flow» (индекс Q, схема 19).

Для оценки времени диссоциации фермент-субстратного комплекса под воздействием мочевины в качестве «тушителя» использовали модельный комплекс Fpg и F/C_{12} -лиганда. Методом «остановленного потока» были зарегистрированы изменения интенсивности флуоресценции Trp и aPu (рис. 68), характеризующие изменение структуры свободного фермента и его комплекса с F/C_{12} - и F^{aPu}/C_{12} -лигандами. В качестве контроля денатурации белковой глобулы смешивали раствор фермента и 7 М мочевину. Как видно на рис. 68, это приводит к однофазному уменьшению интенсивности флуоресценции Trp в интервале времени до 1 с, что, по-видимому, отражает разрушение собственной структуры белка. Кинетика денатурации комплекса Fpg•F^{aPu}/C₁₂-лиганда

также имела одну фазу увеличения флуоресценции aPu, что указывает на разрушение комплекса фермент-ДНК в течение примерно 0,5 с. При этом изменение интенсивности флуоресценции Trp при смешивании комплекса Fpg•**F**/C₁₂-лиганд с мочевиной имеет две фазы, которые, вероятно, соответствуют диссоциации комплекса фермент-ДНК (до 0,2 с) и последующей медленной денатурации белка (до 5 с). Можно предположить, что фермент теряет каталитически компетентную конформацию до того, как происходит диссоциация комплекса с ДНК и, тем более, денатурация белковой глобулы. Однако полученные данные показывают, что на нарушение белковой структуры существенное влияние оказывает образование комплекса с ДНК, что поддерживает предположение о существовании этапа фермент-субстратного взаимодействия, после протекания которого добавление в реакционную смесь «тушителя» не влияет на достижение каталитической конформации.



Рис. 68. Изменения интенсивности флуоресценции Trp и aPu, характеризующие нарушение структуры фермента и его комплекса с **F**/**C**₁₂- и **F**^{aPu}/**C**₁₂-лигандами.

3.3.2.3. Масс-спектрометрический анализ интермедиатов ферментативного процесса

Еще одним вопросом, возникшим при анализе данных «quench-flow», является природа скорость-лимитирующего процесса, характеризуемого константой скорости k_3 . Механизм расщепления поврежденной ДНК с помощью Fpg включает последовательное образование трех ковалентных промежуточных комплексов фермента и ДНК (рис. 69). Чтобы определить характерные времена образования и исчезновения этих промежуточных продуктов, был использован масс-спектрометрический анализ MS-ESI реакционных смесей Fpg с **охоG/C**₁₂- или **AP/C**₁₂-субстратами после восстановления основания Шиффа обработкой NaBH₄. Как видно из рис. 69*a*, в ходе взаимодействия Fpg с

охоG/C₁₂- или **AP/C**₁₂-субстратами возможно образование трех стабильных ковалентных аддуктов. Для масс-спектрометрической регистрации аддуктов ферментативную реакцию проводили в условиях одного оборота фермента, при этом в реакционную смесь добавляли NaBH4 через 0–200 с после начала реакции (рис. 69*б*).

Macc-спектр MS-ESI свободного фермента Fpg содержал набор одиночных ионных пиков с зарядами от +32 до +46, которые соответствовали молекулярному весу немодифицированного белка (30160 Да) (рис. 70а). В течение первых 100 с после начала реакции с **охоG/C**₁₂-субстратом как серия одиночных пиков был зарегистрирован только продукт восстановления первого ковалентного комплекса (аддукт I, 33517 Да). Следует отметить, что в ходе проведенного анализа не удалось зарегистрировать аддукт II (31754 Да), соответствующий ковалентному комплексу с ДНК после реакции β-элиминирования 3'-фосфатной группы. В следующей временной точке (120 с) были зарегистрированы аддукт III (30240 Да) и свободный фермент. Последующий анализ реакционной смеси (200 с) показал присутствие свободного Fpg, содержащего небольшое количество аддукта III. Анализ масс-спектров, полученных для АР/С₁₂-субстрата, представлен на рис. 706. В этом случае реакция протекала быстрее, что согласуется как с литературными данными о стационарной кинетике Fpg [459], так и данными «quench-flow» (k_3 , таблица 21). Аддукты I и III были обнаружены уже через 15 с после начала ферментативного процесса, через 50 с был зарегистрирован только аддукт III и свободный Fpg. Медленный гидролиз аддукта III заканчивался лишь к 100 с.

Таким образом, полученные данные (рис. 70) показывают, что регенерация свободного фермента из комплекса с остатком рибозы, приводящего к аддукту III, происходит достаточно медленно и при протекании стационарной фазы реакции может лимитировать скорость ферментативного процесса. Кроме того, присутствие свободного основания охоGua в активном центре также влияет на ограничение скорости регенерации свободного фермента.

171



Рис. 69. (*a*) Основные стадии реакции, катализируемые Fpg: стадия 1 – удаление поврежденного основания (реакция гидролиза N-гликозидной связи), стадия 2 – реакция β -элиминирования 3'-фосфатной группы, стадия 3 – реакция β -элиминирования 5'-фосфатной группы и стадия 4 – регенерация свободного фермента. Показаны стабильные ковалентные аддукты, образующиеся после восстановления основания Шиффа NaBH₄. (*б*) Структура и молекулярный вес восстановленных ковалентных аддуктов, образующихся в ходе реакции Fpg с **охоG/C**₁₂- и **AP/C**₁₂- субстратами.



Рис. 70. Масс-спектры MS-ESI реакционной смеси Fpg с **охоG/C**₁₂- (*a*) и **AP/C**₁₂-субстратом (δ) в разные моменты времени. Показано время ферментативной реакции до добавления в раствор NaBH₄.

Полученные масс-спектрометрические данные свидетельствуют о том, что лимитирующей стадией процесса является распад ковалентного аддукта III Fpg с остатком рибозы, образующимся в результате протекания реакций β -элиминирования 3'- и 5'- фосфатных групп. Кроме того, скорость гидролиза аддукта фермента с остатком рибозы зависит от присутствия/отсутствия в активном центре фермента удаленного в ходе гликозилазной реакции остатка 8-оксогуанина. Присутствие свободного основания охоGua в активном центре фермента снижает скорость распада ковалентного аддукта III Fpg с остатком рибозы и тем самым, снижает скорость оборота фермента [466].

3.3.2.4. Термодинамические параметры ферментативного процесса

Кинетические закономерности процесса, катализируемого ДНК-гликозилазой Fpg из *E.coli*, при разных температурах изучены с использованием флуоресцирующего аналога основания – пирролоцитозина С^{Py}, расположенного напротив поврежденного нуклеотида в противоположной цепи [369]. Для этого получены кинетические кривые, характеризующие взаимодействие Fpg с 17-звенными ДНК-дуплексами **X**/С^{Py}₁₇, где X – это охоG, F-сайт или нативный гуанозин G.

Для регистрации изменений интенсивности флуоресценции С^{Ру}, происходящих в процессе связывания неповрежденной ДНК, использовали G/C^{Py}17-лиганд. Как видно на рис. 71*a*, процесс связывания G/C^{Py}_{17} -лиганда завершается за 0,1 с и характеризуется увеличением интенсивности флуоресценции С^{Ру}, что свидетельствует о дестабилизации Уотсон-Криковских взаимодействий и/или стэкинга в первичном неспецифическом комплексе фермент-ДНК. Локальное «плавление» двойной спирали в неспецифическом комплексе также было показано ранее в работе с использованием неповрежденного дуплекса с остатком aPu (G^{aPu}/C₁₂-лиганд, [120]). Исходя из данных, полученных при структурном и мутационном анализе Fpg, можно высказать предположение о природе процессов, протекающих на этой стадии. Так, согласно рентгеноструктурным данным [469], в комплексе Fpg из G. stearothermophilus с неповрежденной ДНК три аминокислотных остатка (Arg77, Met112 и Phe-114, которые являются аналогами Met73, Arg108 и Phe110 в Fpg из E. coli [470]) встраиваются в спираль ДНК и вызывают её изгиб. При этом в таком неспецифическом комплексе основание Gua частично выворачивается из ДНК, но не достигает каталитического центра фермента. Кроме того, в работах [381, 382, 471] при использовании ряда мутантных форм Fpg показано, что остаток Phe110 играет ключевую роль в поиске и первичном узнавании поврежденного участка ДНК путем вклинивания в двойную спираль. Полученные для каждой температуры

концентрационные серии кинетических кривых описаны схемой 20, что позволило рассчитать значения констант скорости (таблица 22).

Для определения параметров образования каталитического комплекса использовали модельный дуплекс F/C^{Py}_{17} , содержащий F-сайт. Отсутствие C1' гидроксильной группы 2'- дезоксирибозы в случае F-сайта исключает протекание каталитических реакций β -элиминирования. Поэтому ДНК-дуплекс, содержащий F-сайт, является удобной моделью для изучения стадий специфического связывания ДНК. Согласно рентгеноструктурным данным в комплексе с Fpg, ДНК, содержащая F-сайт, изгибается в месте поврежденного нуклеотида, а аминокислотные остатки Met73, Arg108 и Phe110 встроены в дуплекс [470].

Кинетические кривые, полученные при исследовании взаимодействия Fpg с F/C^{Py}_{17} лигандом (рис. 71*б*), характеризовались увеличением интенсивности флуоресценции C^{Py} в течение 1 с. Таким образом, можно заключить, что встраивание аминокислотных остатков Met73, Arg108 и Phe110 в дуплекс ДНК приводит к увеличению интенсивности флуоресценции C^{Py} . Экспериментальные кривые были описаны кинетической схемой 21. Константы скорости элементарных стадий связывания Fpg с F/C^{Py}_{17} -лигандом приведены в таблице 22.



Рис. 71. Изменения интенсивности флуоресценции C^{Py} при взаимодействии Fpg с (*a*) G/C^{Py}_{17} - и (б) F/C^{Py}_{17} -лигандами при различных температурах.

Схема 20

$$E + G \xrightarrow{k_1} E \cdot G$$

где Е – Fpg; G – G/C^{Py}₁₇-лиганд; Е•G – фермент-субстратный комплекс; k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакций отдельных стадий.

Схема 21

$$\mathbf{E} + \mathbf{F} \xrightarrow{k_1} (\mathbf{E} \cdot \mathbf{F})_1 \xrightarrow{k_2} (\mathbf{E} \cdot \mathbf{F})_2$$

где Е – Fpg; F – $\mathbf{F/C^{Py}}_{17}$ -лиганд; (E•F)_i – фермент-субстратные комплексы; k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакций отдельных стадий.

Изменение интенсивности флуоресценции C^{Py} при взаимодействии Fpg с **охоG/C**^{Py}₁₇субстратом регистрировали в интервале времени от 1,5 миллисекунд до 1000 секунд для различных концентраций Fpg в широком интервале температур 10, 15, 20, 25, 30°C при постоянной концентрации ДНК-дуплекса (рис. 72).

Из рис. 72 видно, что сначала происходит двухфазный рост интенсивности флуоресценции C^{py} , а затем ее падение. Положение обоих максимумов на кинетических кривых сдвигается в сторону меньших времен с ростом концентрации фермента и температуры. Это, по-видимому, указывает на то, что интенсивность флуоресценции C^{Py} возрастает с увеличением гидрофобности окружения, что происходит при сближении молекул фермента и ДНК в комплексе по мере удаления молекул воды из области контакта. Показано, что кинетические кривые могут быть описаны схемой 17, полученной ранее путем регистрации изменений интенсивности флуоресценции остатков Trp в Fpg [462].

Для каждой температуры определены значения индивидуальных констант скорости прямых и обратных реакций равновесных и неравновесных стадий (k_i и k_{-i} , где i – номер стадии), и рассчитаны константы равновесия отдельных стадий многостадийного процесса образования фермент-субстратных промежуточных комплексов K_i (k_i/k_{-i}), сопровождающихся конформационными перестройками в ферменте и ДНК (таблица 23). Для каждой *i*-ой равновесной стадии получены зависимости между термодинамической константой равновесия (K_i) и температурой в соответствии с уравнением Гиббса (ур. 5). Все зависимости $ln(K_i)$ от 1/Т были линейными (рис. 73*a*).

Рассчитанные значения термодинамических параметров ΔH_i° и ΔS_i° отдельных стадий многостадийного ферментативного процесса схематически изображены на рис. 736 и представлены в таблице 24. Там же приведены значения стандартной свободной энергии Гиббса ΔG_i° для 298 К (ур. 5). Кроме того, из зависимости величины константы скорости необратимой химической стадии k_6 от температуры, описываемой с помощью уравнения Эйринга (ур. 6) теории переходного состояния [341], рассчитаны значения стандартной энтальпии активации ($\Delta H^{\circ,\ddagger}$) и стандартной энтропии активации ($\Delta S^{\circ,\ddagger}$).



Рис. 72. Изменения интенсивности флуоресценции C^{Py} при взаимодействии Fpg с **охоG**/ C^{Py}_{17} субстратом (*a*) при различных концентрациях фермента ([**охоG**/ C^{Py}_{17}] = 1,0 мкМ) при 25°С и (*б*) при различных температурах ([**охоG**/ C^{Py}_{17}] = [Fpg] = 1,0 мкМ).

ДНК-	Konorowski	Температура				
лиганд	константы	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C
	$k_1, M^{-1}s^{-1}$	$(1,3\pm0,9)\times10^7$	$(1,2\pm0,7)\times10^7$	$(1,1\pm0,6)\times10^7$	$(1,0\pm0,6)\times10^7$	$(1,4\pm0,7)\times10^7$
	k_{-1}, s^{-1}	68 ± 25	74 ± 9	70 ± 6	81 ± 5	112 ± 13
Py 12	K_1, M^{-1}	$1,9 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$1,3 \times 10^{5}$
,C ¹						
5						
	$k_1, M^{-1}s^{-1}$	$(1,0\pm0,5)\times10^7$	$(0,9\pm0,3)\times10^7$	$(0,8\pm0,2)\times10^7$	$(0,8\pm0,2)\times10^7$	$(0,7\pm0,1)\times10^7$
	k_{-1}, s^{-1}	35 ± 5	36 ± 10	39 ± 6	43 ± 5	42 ± 6
	K_1, M^{-1}	$2,9 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$2,1\times10^{5}$	$1,9 \times 10^{5}$	$1,7 \times 10^{5}$
y12	k_2, s^{-1}	$1,0 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$
C	k_{-2}, s^{-1}	$5,3 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,1$
E	<i>K</i> ₂	0,19	0,23	0,25	0,35	0,36

Таблица 22. Константы скорости, характеризующие взаимодействие Fpg с G/C^{Py}17- и F/C^{Py}17-лигандами при разных температурах

 $K_{\rm i} = k_{\rm i}/k_{\rm -i}$

Konorowski	Температура						
константы	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C		
$k_1, M^{-1}c^{-1}$	$(3,5\pm0,3)\times10^7$	$(4,5\pm0,8)\times10^7$	$(4,6\pm0,6)\times10^7$	$(4,3\pm0,4)\times10^7$	$(3,7\pm0,3)\times10^7$		
k_{-1}, c^{-1}	183 ± 37	250 ± 160	270 ± 47	293 ± 24	275 ± 22		
k_2, c^{-1}	$8,0 \pm 0,2$	$9,2 \pm 2,8$	$9,7 \pm 0,1$	$10,0 \pm 0,1$	$6,9 \pm 0,5$		
k_{-2}, c^{-1}	$18,4 \pm 1,1$	$18,3 \pm 2,9$	$21,4 \pm 0,4$	$20,0 \pm 0,2$	$15,2 \pm 0,3$		
k_3, c^{-1}	$0,24 \pm 0,06$	$0,26 \pm 0,11$	$0,30 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,01$	$4,1 \pm 0,2$		
k_{-3}, c^{-1}	$1,2 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,5$	$1,1 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$	$9,7 \pm 1,0$		
k_4, c^{-1}	$5,0 \pm 1,4$	$5,9 \pm 1,7$	$1,8 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,1$	$0,97 \pm 0,3$		
k_{-4}, c^{-1}	$0,15 \pm 0,04$	$0,4 \pm 0,2$	$0,15 \pm 0,05$	$0,08 \pm 0,01$	$0,3\pm 0,2$		
k_5, c^{-1}	$0,048 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,07$	$0,3 \pm 0,1$	$0,35 \pm 0,02$	$0,6 \pm 0,2$		
k_{-5}, c^{-1}	$0,052 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,04$	$0,015 \pm 0,003$	$0,018 \pm 0,006$		
k_6, c^{-1}	$0,014 \pm 0,002$	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	$0,023 \pm 0,002$	$0,035 \pm 0,008$		
K _p , M	$(4,9\pm1,0)\times10^{-6}$	$(5,7\pm1,2)\times10^{-6}$	$(6,2\pm1,3)\times10^{-6}$	$(7,4\pm2,0)\times10^{-6}$	$(7,9\pm0,4)\times10^{-6}$		

		E avaPv a	
Таблица 23 Константи скорости	ν α α α α α α α α α α α α α α α α α α α	e Hng c ovo($2/(2)^{*}$, -cyfer	NATOM THE RADIULY TEMPERATURAN
$1 a 0 j \mu \mu \mu a 2 j$. Runchanibi erupuci μ	ларактеризующие взаимоденстви	$C \Gamma D \Sigma C U A U G / C \Gamma 7 - C V U C \Gamma$	

Таблица 24. Термодинамические параметры взаимодействия ДНК-гликозилазы Fpg с G/C^{Py}₁₂- и F/C^{Py}₁₂-лигандами и **охоG**/C^{Py}₁₂-субстратом^а [369]

днк	Параметр Номер стадии	$\Delta G^_{\mathrm{i298}},$ ккал/моль	Δ <i>Н</i> ° _i , ккал/моль	Δ <i>S</i> ° _i , кал/(К×моль)	Процесс
G/C ^{Py} 12	1	-7,0	$-3,8 \pm 0,9$	$10,9 \pm 3,2$	Неспецифическое связывание, локальное «плавление» участка спирали ДНК, дегидратация
	1	-7,2	$-4,0 \pm 0,3$	$10,8 \pm 1,0$	Неспецифическое связывание, локальное «плавление» участка спирали ДНК, дегидратация
F/C^{Py}_{12}	2	0,7	$6,7 \pm 0,3$	$20,3\pm 0,9$	Изгибание цепи ДНК и вставка внутрь цепи остатков аминокислот Fpg
	$\sum_{i=1}^{i=2}$	-6,5	$2,7 \pm 0,4$	31,1±1,3	
	1	-7,0	$-3,2 \pm 0,4$	$12,7 \pm 1,5$	Неспецифическое связывание, локальное «плавление» участка спирали ДНК, дегидратация
	2	0,4	$0,3 \pm 0,8$	$-0,3 \pm 2,7$	Вставка в спираль ДНК «клина» – остатка аминокислоты Phe110 с целью дискриминации поврежденного и неповрежденного участков ДНК
	3	0,8	$6,3 \pm 1,7$	$18,4 \pm 5,8$	Изгибание цепи ДНК
oxoG/C ^{Py} 12	4	-1,5	$-15,5 \pm 3,9$	$-46,9 \pm 13,5$	Выворачивание основания охоGua в активный центр Fpg одновременно с вставкой аминокислот Arg108 и Met73 в освободившуюся полость в спирали ДНК
	5	-1,9	$31,2 \pm 5,5$	111,1 ± 18,6	Окончательная подстройка активного центра к структуре каталитически компетентного состояния, дегидратация бороздок ДНК
	$\sum_{i=1}^{i=5}$	-9,2	19,1 ± 12,3	$95,0 \pm 42,1$	
	6	19,6	$6,0 \pm 1,4$	$-45,5 \pm 4,7$	Переходное состояние каталитической химической стадии
	7	-7,0	$-4,1 \pm 0,3$	9,6 ± 0,9	Образование комплекса фермент-продукт

^аОшибка определения ± 1 ст. отклонение. $\Delta \Delta G^{\circ}_{i298} = \text{RT}(\Delta K_i/K_i) \leq 0,1$ ккал/моль.


Рис. 73. Взаимодействие ДНК-гликозилазы Fpg с G/C^{Py}_{17} -лигандом и **охо** G/C^{Py}_{17} -субстратом. (*a*) Зависимость $\ln(K_i)$ от 1/Т в соответствии с уравнением Вант-Гоффа для G/C^{Py}_{17} -лиганда и **охо** G/C^{Py}_{17} -субстрата. (*в*) Вклады изменений энтальпии и энтропии для каждой стадии связывания ДНК. Вставка представляет собой увеличенный масштаб для 2-ой стадии.

Совокупный анализ кинетических и термодинамических данных о конформационных превращениях фермента Fpg и ДНК, протекающих в ходе их взаимодействия, позволяет расширить представление о природе молекулярных процессов, происходящих на стадиях связывания субстрата, узнавания поврежденного основания и его удаления из ДНК (таблица 24), полученное ранее при исследовании процесса при одной температуре [337, 369, 381, 382, 460, 462, 466].

В таблице 24 приведена наиболее вероятная интерпретация природы конформационных переходов, протекающих в составе фермент-субстратных комплексов вдоль координаты реакции на пути превращения в каталитически-компетентное состояние, основанная на совокупности полученных данных.

Первая стадия в схеме 17 характеризует первичное неспецифическое связывание молекулы фермента с ДНК. Эта стадия имеет близкие термодинамические параметры для ДНК-дуплексов, содержащих G, F-сайт и охоG. Уменьшение энтальпии, свидетельствующее об образовании энергетически выгодных контактов, сопровождается увеличением энтропии, вероятно, из-за локального «плавления» двойной спирали и конформационных изменений ДНК-связывающего центра в молекуле Fpg, включающих попытку вклинивания остатка Phe110 в дуплекс [381, 382, 422, 471].

Вторая стадия характеризует вставку в спираль ДНК «клина» – остатка Phe110, этот процесс является ключевым этапом распознавания поврежденного участка ДНК, а остаток Phe110 выполняет функцию «сенсора» повреждения. Эта стадия энергетически нейтральна.

Третья стадия приводит к росту энтальпии вследствие изгибания цепи ДНК, которая компенсируется ростом энтропии за счет дегидратации.

Четвертая стадия характеризуется отрицательным изменением энтальпии и энтропии. Такие изменения позволили изменить предыдущую интерпретацию природы процессов, происходящих на этой стадии. Поскольку на этой стадии должно происходить как образование новых энергетически выгодных контактов в фермент-субстратном комплексе, так и его стабилизация, то на этой стадии должно происходить выворачивание основания охоGua в активный центр фермента и последующее встраивание остатков Arg108 и Met73 в дуплекс ДНК. Такие конформационные изменения приводят к образованию контактов между аминокислотами активного центра и основанием охоGua, а также между Arg108 и Met73 и ДНК, что приводит к отрицательному изменению энтальпии. Как следствие этих контактов, структура комплекса становится более жесткой и стабильной, что объясняет отрицательное изменение энтропии. Такая стабилизация фермент-субстратного комплекса также косвенно подтверждается данными «quenchflow», свидетельствующими об образовании прочного фермент-субстратного комплекса в ходе образования каталитически компетентного состояния.

Пятая стадия включает окончательную подстройку активного центра к структуре каталитически компетентного состояния и характеризуется ростом энтальпии, которая компенсируется ростом энтропии. Такое положительное изменение энтропии, происходящее на этой стадии, наиболее вероятно, связано с десольватацией взаимодействующих функциональных групп фермента и ДНК и дополнительной дегидратацией малой и большой бороздок ДНК.

Шестая стадия представляет необратимые химические стадии ферментативного процесса.

Седьмая стадия отражает диссоциацию из комплекса фермента с продуктом реакции. При этом каталитический остаток Pro1 остается в виде основания Шиффа с остатком рибозы. Гидролиз этого основания является скорость лимитирующей стадией всего ферментативного процесса.

Необходимо отметить, что суммарное изменение энергии Гиббса, равное $\Delta G_{298} = \Sigma \Delta G_{i298} = -9,2$ ккал/моль, в пределах экспериментальной ошибки согласуется с величиной -10,9 ккал/моль, полученной ранее в работе [387] методом SILC ("stepwise increased ligand complexity"). Как видно из таблицы 24, энергетика первой стадии образования комплексов Fpg с **охоG/C^{Py}**₁₇-субстратом и G/C^{Py}₁₇- и F/C^{Py}₁₇-лигандами, а также с продуктом реакции одинакова. Это означает, что данная стадия представляет собой один и тот же процесс,

независящий от последовательности ДНК и относящийся к неспецифическому связыванию ДНК ферментом Fpg. Суммарные величины ΔH_i и ΔS_i , характеризующие общий процесс связывания Fpg с **охоG/C^{Py}17-**субстратом, отличаются от аналогичных величин, полученных для F/C^{Py}17-лиганда, который моделирует AP-сайт, интермедиат превращения **охоG/C^{Py}17-**субстрата. Сравнение этих величин приводит к заключению, что, хотя по сравнению с AP-сайтом узнавание остатка охоG более выгодно ($\Delta\Delta G = -2,7$ ккал/моль), однако оно невыгодно с точки зрения изменения энтальпии ($\Delta \Delta H = 16.4$ ккал/моль) и выгодно за счет роста энтропии ($\Delta\Delta S = 63.9$ кал/(К×моль)). Такое различие можно объяснить дополнительными затратами энергии при формировании активным центром каталитически-компетентной структуры. С другой стороны, при связывании ферментом **охоG/C^{Ру}17**-субстрата в составе комплекса белок-ДНК образуется большее число контактов, чем при связывании АР-сайта. Этот процесс индуцирует дегидратацию области контакта, что ведет к возрастанию энтропии. Дегидратация области контакта белок-ДНК может протекать и на более ранних стадиях взаимодействия, включая образования первичного неспецифического комплекса, последовательно приводящих к компактизации структуры комплексов Fpg-ДНК. Нужно отметить, что изменения сольватации в области контакта ДНК-процессирующих ферментов и их субстратов в целом имеют решающее значение для достаточно большого числа ферментов [472].

Таким образом, из полученных термодинамических данных [369] следует, что стадии узнавания, соответствующие конформационным переходам в каталитически-компетентное состояние фермента Fpg, протекают со значительными затратами энергии (энтальпии). Эти затраты энергии компенсируются увеличением энтропии за счет десольватации полярных групп и удаления молекул воды из бороздок ДНК, что приводит к формированию прочносвязанного фермент-субстратного комплекса. Полученные результаты существенно уточняют и детализируют механизм узнавания повреждений в ДНК формамидопиримидин-ДНК-гликозилазой Fpg.

3.3.3. Эндонуклеаза VIII человека NEIL1

Эндонуклеаза VIII человека NEIL1 является гомологом фермента Nei [151, 473]. NEIL1 обладает широкой субстратной специфичностью, удаляя из ДНК как пиримидиновые, так и пуриновые окисленные поврежденные основания [96, 155, 156, 161, 162, 165, 474]. NEIL1 является бифункциональной ДНК-гликозилазой, способной катализировать гидролиз N-гликозидной связи и последующие реакции β-элиминирования 3'- и 5'-фосфатных групп, аналогично другим рассмотренным ферментам структурного семейства H2tH (рис. 48) [13, 176]. NEIL1, так же как Nei и Fpg, использует в качестве каталитической аминокислоты N-концевую аминогруппу Pro1, которая атакует C1' атом поврежденного нуклеотида, что приводит к образованию основания Шиффа в ходе каталитического процесса [159, 179, 180].

Сравнение аминокислотных последовательностей NEIL1, Fpg и Nei показывает высокую степень гомологии ферментов (рис. 74). В настоящее время известна кристаллическая структура NEIL1 в свободном состоянии [475, 476]. Сравнение структуры NEIL1 со структурами комплексов Fpg и Nei с поврежденной ДНК показывает также высокую степень структурного соответствия (рис. 75). Необходимо иметь в виду, что белки семейства H2tH разделяются на две группы, отличающиеся структурной организацией аминокислотных остатков, которые вставляются В ДНК после выворачивания поврежденного нуклеотида. В случае Nei эти остатки расположены последовательно на одной петле (Gln69-Leu70-Tyr71), а в случаях NEIL1 (Met80, Arg117 и Phe119) и Fpg (Met73, Arg108 и Phe110) эти остатки расположены удаленно друг от друга в аминокислотной последовательности.

NEIL1 содержит четыре остатка Trp (рис. 74). Как видно из рис. 75, Trp122 и Trp258 расположены внутри белковой глобулы. Trp128 находится в линкерной последовательности, соединяющей N- и C-концевые домены фермента и должен быть чувствителен к перемещению доменов в процессе связывания ДНК. Trp279 находится в ДНК-связывающей канавке и также может быть чувствительным к трансформации фермент-субстратного комплекса.

NEIL1 Fpg	MPEGPELHLASQFVNEACRALVFGGCVEKSSVSRNPEVPFESSAYRISASA MPELPEVETSRRGIEPHLVGATILHAVVRNGRLRWPVSEE-IYRLSDOPVLSVOR	51 54
Nei	MPEGPEIRRAADNLEAAIKGKPLTDVWFAFPQLKTYQSQLIGQHVTHVET	50
	*** **:. : : : : : : : : . :	
NEIL1	RGKELRLILSPLPGAQPQQEPLALVFRFGMSGSFQLVPREELPRHAHLRFYTAPPGPRLA	111
Fpg	RAKYLLLELPEGWII-IHLGMSGSLRILPEELPPEKHDHVDLVMSNGKV	102
Nei	RGKALLTHFSNDLTLYSHNQLYGVWRVVDTSEEPQTTRVLRVKLQTADKTI *.* * ::: . *.	101
NEIL1	LCFVDI <mark>RRF</mark> GRWDLGGKWQPGRGPCVLQEYQQFRENVLRNLADKAFDRPICEA	164
Fpg	LRYTDP R R F GAW L WTKELEGHNVLTHLGPEPLSDDFNGEYLHQKCAKKKTAIKPW	157
Nei	LLYSASDIEMLRPEQLTTHPFLQRVGPDVLDPNLTPEVVKERLLSPRFRNRQFAGL * : : : : : : : : : : : : : : : : : : :	157
NEIL1	LLDQRFFNGIGNYLRAEILYRLKIPPFEKARSVLEALQQHRPSPELTLSQKIRTKLQNPD	224
Fpg	LMDNKLVVGVGNIYASESLFAAGIHPDRLASSLSLAECELLA	199
Nei	LLDQAFLAGLGNYLRVEILWQVGLTGNHKAKDLNAAQLDALA	199
NEIL1	LLELCHSVPKEVVQLGGRGYGSESGEEDFAAFRAWLRCYGMPGMSSLQ-	272
Fpg	RVIKAVLLRSIEQGGTTLKDFLQSDGKPGYFAQELQVYGRKGEPCRVCGTPIVATK	255
Nei	HALLEIPRFSYATRGQVDE-NKHHGALFRFKVFHRDGELCERCGGIIEKTT . : *: : * .	249
NEIL1	DRHGRTIWFQGDPGPLAPKGRKSRKKKSKATQLSPEDRVEDALPPSKAPSRTRRAKRDLP	332
Fpg	HAQRATFYCRQCQK	269
Nei	LSSRPFYWCPGCQH	263
NEIL1	KRTATQRPEGTSLQQDPEAPTVPKKGRRKGRQAASGHCRPRKVKADIPSLEPEGTSAS	390
Fpg		269
Nei		263

Рис. 74. Сравнение последовательностей NEIL1, Fpg и Nei. Остатки Trp выделены синим; аминокислоты, встраивающиеся в ДНК, выделены красным.

Высокая гомология структуры NEIL1, Fpg и Nei позволяет предположить, что NEIL1 в процессе образования каталитического комплекса аналогичным образом претерпевает конформационные перестройки, связанные с узнаванием поврежденного нуклеотида, изгибанием ДНК, выворачиванием поврежденного основания в активный центр фермента и встраиванием аминокислотных остатков в ДНК. Поэтому для регистрации взаимных конформационных изменений NEIL1 и ДНК в процессе их взаимодействия был использован такой же подход, как в случаях Nei и Fpg. В качестве ДНК-субстратов для регистрации конформационных изменений фермента по изменению интенсивности флуоресценции Trp использовали серию дуплексов, которые в центральной части содержали неповрежденный нуклеотид либо модифицированные нуклеотиды: F-сайт, APсайт или 5,6-дигидроуридин. Для регистрации конформационных изменений ДНК использовали ДНК-дуплексы, содержащие красители FAM и BHQ1 на 5'-концах олигонуклеотидов, формирующих дуплекс.



Рис. 75. Сравнение структуры NEIL1 (зеленый, синим цветом показаны остатки Trp, PDB ID 1TDH) с (*a*) Fpg из *E. coli* (серый, черным цветом показаны остатки Trp, PDB ID 1K82) и (δ) Nei из *E. coli* (серый, черным цветом показаны остатки Trp, PDB ID 1K82).

3.3.3.1. Конформационные изменения NEIL1 при взаимодействии с ДНК

Образование комплекса с неповрежденным G/C_{12} -лигандом приводило к быстрому уменьшению интенсивности флуоресценции Trp на начальном участке кинетических кривых и последующему более медленному росту на временах до 0,1 с (рис. 76*a*). Полученные кинетические кривые хорошо описывались схемой 22, содержащей две равновесные стадии, и позволили рассчитать значения констант скорости, характеризующих эти стадии (таблица 25).

Интересно отметить, что кинетика образования комплекса с неповрежденной ДНК для NEIL1 и Nei имеет одинаковые фазы изменения интенсивности флуоресценции Trp (рис. 766). Несмотря на то, что эти два белка содержат остатки Trp в разных частях белковой глобулы, такое сходство может свидетельствовать о том, что как NEIL1, так и Nei могут претерпевать аналогичные конформационные перегруппировки в ходе образования комплекса с неповрежденной ДНК. При этом константа скорости k_1 , характеризующая образование первичного комплекса (E•S)₁ для эукариотического белка примерно в 10 раз больше, чем для Nei (таблица 25 и данные в [338]).



Рис. 76. (*a*) Экспериментальные и теоретические (гладкие линии) кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp, полученные при взаимодействии NEIL1 с неповрежденным ДНК-дуплексом G/C_{12} . (*б*) Сравнение кинетических кривых, полученных для NEIL1 и Nei. Концентрация ферментов равна 1,0 мкМ, концентрация G/C_{12} -лиганда составляла 2,0 мкМ.

Схема 22

$$E + S \xrightarrow{k_1} (E \cdot S)_1 \xrightarrow{k_2} (E \cdot S)_2$$

где Е – NEIL1; S – G/C₁₂- и F/G₁₂-лиганды; (E•S)_i – фермент-субстратные комплексы; k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакций отдельных стадий.

Таблица 25. Значения констант скорости, характеризующие конформационные перестройки NEIL1 в процессе взаимодействия с ДНК-дуплексами

Константы	G/C ₁₂	F/G ₁₂	AP/G ₁₂	DHU/G ₁₂	
$k_1, \mathrm{M}^{-1} \times \mathrm{c}^{-1}$	$(300 \pm 40) \times 10^{6}$	$(250 \pm 30) \times 10^{6}$	$(180 \pm 30) \times 10^{6}$	$(840 \pm 60) \times 10^{6}$	
k_{-1}, c^{-1}	180 ± 10	150 ± 30	210 ± 20	140 ± 40	
k_2, c^{-1}	$4,1 \pm 1,5$	3,9 ± 1,0	20 ± 1	$9,4 \pm 1,4$	
k_{-2}, c^{-1}	25 ± 1	17 ± 1	$0,7 \pm 0,1$	$0,15 \pm 0,03$	
k_3, c^{-1}			$0,26 \pm 0,01$	14 ± 1	
k_{-3}, c^{-1}			$0,016 \pm 0,002$	90 ± 10	
k_4, c^{-1}			$0,10 \pm 0,01$	$1,0 \pm 0,2$	
k_{-4}, c^{-1}			-	$0,04 \pm 0,01$	
k_5, c^{-1}			-	$0,\!08 \pm 0,\!01$	
$K_{\rm a},{\rm M}^{-1}$	$(2,0\pm0,3)\times10^{6}$	$(2,2\pm0,6)\times10^{6}$	$(4,5\pm0,5)\times10^8$	$(1,0\pm0,7)\times10^9$	
$K_{\rm P},{ m M}$			$(3,6\pm0,1)\times10^{-6}$	$(1,1\pm0,3)\times10^{-6}$	
$x = \sum_{i=1}^{N} \frac{\pi}{2} i + \frac{k_i}{2}$					

$$K_{a} = \sum_{i=1}^{N} \prod_{j=1}^{J=i} K_{j}, K_{j} = \frac{\kappa_{j}}{\kappa_{-j}}$$

187

В процессе образования комплекса между NEIL1 и F/G₁₂-лигандом происходит двухфазное уменьшение интенсивности флуоресценции Тгр в течение 0,1-0,2 с (рис. 77). При связывании F/G₁₂-лиганда интенсивность флуоресценции Тгр сначала быстро уменьшалась, как в случае G/C₁₂-лиганда, тогда как вторая фаза изменений отличалась направленностью для поврежденной и неповрежденной ДНК, что указывает на то, что на этой стадии происходи узнавание F-сайта. Тем не менее, полученные кинетические кривые также хорошо описывались схемой 22, содержащей две равновесные стадии, и позволили рассчитать значения констант скорости. Как видно из таблицы 25, константы скорости, относящиеся к первой и второй стадий реакции, для G/C₁₂- и F/G₁₂-лигандов имеют близкие значения. Однако, несмотря на близкую общую стабильность комплексов с поврежденной и неповрежденной ДНК, природа второго комплекса (E•S)₂ в этих случаях должна иметь различия. Интересно отметить, что кинетические кривые, полученные для NEIL1, отличались от кривых, полученных ранее для Nei [338] и Fpg [462] (рис. 77б). Это различие указывает на то, что специфическое узнавание F-сайта имеет индивидуальные особенности, которые могут включать в себя как индивидуальное распределение остатков Trp в белке, так и возможные отличия в природе формируемых контактов между конкретным ферментом и ДНК.

Взаимодействие NEIL1 с АР/G₁₂-субстратом приводит к образованию каталитического комплекса, в котором последовательно протекают две реакции βэлиминирования 3'- и 5'-фосфатных групп. Действительно, конформационные изменения NEIL1 в процессе связывания с АР/G₁₂-субстратом в целом имели более выраженные изменения интенсивности флуоресценции Trp, чем в случае F/G₁₂-лиганда (рис. 78*a*). Переход от F/G₁₂-лиганда к расщепляемому АР/G₁₂-субстрату не менял тенденций изменения интенсивности флуоресценции на ранних стадиях реакции. При этом, образование каталитически компетентного комплекса, включающее изгибание ДНК, выворачивание повреждения, встраивание аминокислотных остатков и подстройка структуры активного центра, протекали в течение ~10 с (рис. 78*a*). Кинетические кривые имели выраженный минимум, который, как и в случаях Fpg и Nei (рис. 78б), соответствовал формированию каталитического комплекса, а последующий рост интенсивности флуоресценции отражал диссоциацию комплекса фермент-продукт. Минимальная кинетическая схема (схема 23), описывающая наблюдаемые изменения интенсивности флуоресценции Тгр, содержала три равновесные стадии с последующей необратимой каталитической стадией и равновесной стадией диссоциации комплекса фермент-продукт.



Рис. 77. (*a*) Экспериментальные и теоретические (гладкие линии) кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp, полученные при взаимодействии NEIL1 с F/G_{12} -лигандом. (*б*) Сравнение кинетических кривых, полученных для NEIL1, Fpg и Nei. Концентрация ферментов равна 1,0 мкМ, концентрация F/G_{12} -лиганда составляла 2,0 мкМ.



Рис. 78. (*a*) Экспериментальные и теоретические (гладкие линии) кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp, полученные при взаимодействии NEIL1 с **AP**/ G_{12} -субстратом. (*б*) Сравнение кинетических кривых, полученных для NEIL1, Fpg и Nei. Концентрация ферментов равна 1,0 мкМ, концентрация **AP**/ G_{12} -субстрата составляла 2,0 мкМ.

Схема 23

$$E + AP \xrightarrow{k_1} (E \cdot AP)_1 \xrightarrow{k_2} (E \cdot AP)_2 \xrightarrow{k_3} (E \cdot AP)_3 \xrightarrow{k_4} E \cdot P \xrightarrow{K_p} E + P$$

где Е – NEIL1; AP – **AP/G**₁₂-субстрат; (E•AP)_n – различные фермент-субстратные комплексы; E•P – комплекс Е с продуктом реакции P; k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакций отдельных стадий.

Сравнение констант скорости в таблице 25 для F/G_{12} -лиганда и AP/G_{12} -субстрата показывает, что вторая стадия взаимодействия протекает значительно эффективнее (k_2 и k_2) в случае расщепляемого AP-сайта, чем в случае F-сайта. При этом общая константа связывания ДНК-дуплекса $K_{связ}$, содержащего AP-сайт, была в 200 раз больше, чем для F-сайта.

Интересно отметить, что такой же кинетический механизм (схема 23) получен для Nei [338], тогда как кинетическая схема для Fpg содержала еще одну обратимую стадию [462]. Тем не менее, как показано на рис. 78*б*, кинетические кривые для NEIL1, Fpg и Nei, полученные в одинаковых условиях, значительно отличаются друг от друга, однако общей особенностью всех кинетических кривых является локальный минимум интенсивности флуоресценции Trp в процессе образования каталитического комплекса.

Кинетические кривые, характеризующие взаимодействие NEIL1 с DHU/G₁₂субстратом, имели форму, схожую с кривыми, полученными для АР/G₁₂-субстрата (рис. 79а). Тем не менее, на начальном участке кинетических кривых (~30 мс) в случае DHU/G₁₂-субстрата происходило дополнительное небольшое увеличение интенсивности флуоресценции Тгр, для описания которого в кинетическую схему была введена дополнительная равновесная стадия (схема 24). По-видимому, на этой стадии образуются контакты с поврежденным нуклеотидом, которые в случае с DHU приводят к дополнительной конформационной подстройке фермента. Необходимо отметить, что стадия, непосредственно предшествующая каталитической реакции, имеет близкие значения константы равновесия для AP/G₁₂- и DHU/G₁₂-субстратов (14,7 и 24,5 соответственно), хотя присутствие поврежденного основания примерно в 4 раза увеличивает константу как прямой, так и обратной реакции (таблица 25). Как и для **АР/G₁₂-субстрата**, образование каталитического комплекса приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции Trp. Однако в случае DHU/G₁₂-субстрата минимум интенсивности флуоресценции Trp на кинетических кривых сдвигается в большие времена (примерно на 20 с для 3,0 мкМ концентрации ДНК-субстратов). При этом из кинетических кривых невозможно выделить отдельные химические стадии процесса, характеризующие N-гликозилазную реакцию и две последовательные реакции βэлиминирования. Они регистрируются, как одна стадия, характеризуемая константой скорости лимитирующей реакции. Сравнение кинетических кривых, полученных для ДНК-гликозилаз структурного семейства H2tH NEIL1, Fpg и Nei, показывает (рис. 79б), что, несмотря на общие закономерности образования каталитического ферментсубстратного комплекса, изменения интенсивности флуоресценции Тгр в каждом случае

определяются индивидуальными особенностями расположения остатков Trp в глобуле фермента.



Рис. 79. (*a*) Экспериментальные и теоретические (гладкие линии) кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp, полученные при взаимодействии NEIL1 с **DHU/G₁₂**-субстратом. (*б*) Сравнение кинетических кривых, полученных для NEIL1, Fpg и Nei. Концентрация ферментов равна 1,0 мкМ, концентрация **DHU/G₁₂**-субстрата составляла 2,0 мкМ.

Схема 24

$$E + DHU \xrightarrow{k_1} (E \bullet DHU)_1 \xrightarrow{k_2} (E \bullet DHU)_2 \xrightarrow{k_3} (E \bullet DHU)_3 \xrightarrow{k_4} (E \bullet DHU)_4 \xrightarrow{k_5} E \bullet P \xrightarrow{K_p} E + P$$

где Е – NEIL1; DHU – **DHU/G**₁₂-субстрат; (E•DHU)_n – различные фермент-субстратные комплексы; E•P – комплекс Е с продуктом реакции P; k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакций отдельных стадий.

3.3.3.2. Конформационные изменения ДНК

Для регистрации конформационных изменений ДНК в процессе взаимодействия с NEIL1 использовали ДНК-дуплексы, содержащие пару FAM/BHQ1. Как показано на рис. 80*a* и *б*, изменения сигнала FRET при взаимодействии NEIL1 с $C^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ - и $F^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ -лигандами приводят к медленному снижению интенсивности флуоресценции на временах до 500 с. Уменьшение сигнала FRET должно отражать уменьшение расстояния между остатком FAM и тушителем флуоресценции BHQ1 из-за изгибания ДНК в комплексе с ферментом. Интересно отметить, что быстрые конформационные изменения молекулы фермента в течение 0,2 с, обнаруженные по изменению интенсивности флуоресценции Trp, были разными в случаях неповрежденного дуплекса и ДНК, содержащей F-сайт. Тем не менее, эти конформационные изменения

белка в обоих случаях индуцировали медленное снижение FRET-сигнала, свидетельствующее о том, что связывание неповрежденного дуплекса и ДНК, содержащую F-сайт, приводит к аналогичным конформационным изменениям ДНКдуплекса. Кинетические кривые, полученные для $C^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ - и $F^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ -лигандов, были описаны схемой 22 (таблица 26). Константы скорости образования первичного комплекса (E•S)₁ имеют схожие значения, в то время как образование второго комплекса в случае $F^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ -лиганда проходит в 7,5 раза быстрее.

Таблица	26.	Значения	констант	скорости,	характеризующие	конформационные
перестройки ДНК в процессе взаимодействия с NEIL1						

Константы	C ^{FAM/BHQ1} /G ₁₇	F ^{FAM/BHQ1} /G ₁₇	AP ^{FAM/BHQ1} /G ₁₇	DHU ^{FAM/BHQ1} /G ₁₇		
$k_1, \mathbf{M}^{-1} \times \mathbf{c}^{-1}$	$(0,5\pm0,2)\times10^{6}$	$(0,6\pm0,4)\times10^{6}$	$(3,6\pm1,1)\times10^{6}$	$(7,0\pm2,0)\times10^{6}$		
k_{-1}, c^{-1}	$3,1 \pm 1,8$	$8,0 \pm 5,0$	$18,8 \pm 5,6$	20 ± 9		
k_2, c^{-1}	$0,02 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,06$	$3,7 \pm 0,7$	$3,3 \pm 1,8$		
k_{-2}, c^{-1}	$0,05 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,01$	$1,7 \pm 0,2$	1,6 ± 0,9		
k_3, c^{-1}	-	-	$0,11 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,02$		
$K_{\rm a},{\rm M}^{-1}$	$(3,9\pm0,6)\times10^5$	$(3,6\pm0,7)\times10^5$	$(5,6\pm0,5)\times10^5$	$(9,0\pm2,0)\times10^5$		

 $K_{\rm a} = K_1 + K_1 \times K_2, K_{\rm i} = k_{\rm i}/k_{\rm -i}$

Взаимодействие NEIL1 с расщепляемыми $AP^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ и DHU^{FAM/BHQ1}/G₁₇субстратами приводит к образованию каталитического комплекса, последующим каталитическим реакциям и диссоциации комплекса фермент-продукт, и, как следствие этого, к удалению флуорофора и тушителя друг от друга. Как видно на кинетических кривых (рис. 80*в* и *г*) связывание обоих ДНК-субстратов приводит к уменьшению FRETсигнала на временах до 1 с. Следует отметить, что FRET-сигнал не изменяется в этом временном интервале в процессе взаимодействия NEIL1 с нерасщепляемыми ДНКлигандами. Это указывает на то, что узнавание расщепляемых сайтов в ДНК-субстратах происходит на начальных стадиях связывания ДНК. Каталитические реакции и диссоциация комплекса фермент-продукт приводят к увеличению сигнала FRET из-за увеличения расстояния между красителями FAM и BHQ1.



Рис. 80. Экспериментальные и теоретические (гладкие линии) кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции FAM, полученные при взаимодействии NEIL1 с (*a*) $C^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ -лигандом, (*b*) $F^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ -лигандом, (*b*) $AP^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ -субстратом, (*c*) $DHU^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ -субстратом.

Наблюдаемые изменения FRET-сигнала описывались минимальной кинетической схемой 25. В этой схеме первая и вторая стадия характеризуют связывание субстрата и образование каталитически активного комплекса (E•S)₂, а необратимая стадия включает в себя каталитические реакции и последующую диссоциацию комплекса фермент-продукт.

Сравнение констант скорости (таблица 26) показывает, что образование первичного комплекса (E•S)₁ происходит примерно в 10 раз быстрее для расщепляемых ДНКсубстратов, чем для ДНК-лигандов. Более того, образование второго каталитического комплекса (E•S)₂ заметно ускоряется в ряду $C^{FAM/BHQ1}/G_{17} < F^{FAM/BHQ1}/G_{17} < AP^{FAM/BHQ1}/G_{17} ~ DHU^{FAM/BHQ1}/G_{17}$. Константы скорости k_3 , характеризующие каталитическую реакцию и диссоциацию комплекса фермент-продукт, равны 0,11 с⁻¹ и 0,07 с⁻¹ для $AP^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ - и $DHU^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ -субстратов соответственно, и хорошо согласуются с константой скорости каталитических реакций, рассчитанной с использованием флуоресценции Trp (0,1 c⁻¹ и 0,08 c⁻¹ для **AP/G₁₂-** и **DHU/G₁₂-**субстратов соответственно). В пределах ошибки эксперимента эти цифры примерно одинаковы. Эти данные означают, что реакции β -элиминирования фосфатных групп поврежденного нуклеотида являются скорость-лимитирующими стадиями ферментативного процесса.

Схема 25

$$E + S \xrightarrow{k_1} (E \cdot S)_1 \xrightarrow{k_2} (E \cdot S)_2 \xrightarrow{k_3} E + P$$

где Е – NEIL1; S – $AP^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ - и $DHU^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ -субстраты; $(E \cdot S)_n$ – различные фермент-субстратные комплексы; E · P – комплекс Е с продуктом реакции P; k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакций отдельных стадий.

3.3.3.3. Сравнительный анализ конформационных изменений фермента и ДНК

Для того, чтобы сопоставить конформационные изменения фермента и ДНК, происходящие при образовании каталитического комплекса и уточнить время прохождения процессов выворачивания поврежденного основания и встраивания аминокислотных остатков в ДНК, использован ДНК-дуплекс, несущий остаток aPu с 3'стороны от DHU (рис. 81). Как видно из рис. 81, интенсивность флуоресценции aPu уменьшается в интервале времени от 1,0 мс до 3,0 с и свидетельствует об образовании гидрофобного окружения в области аРи, которое может быть связано с процессом встраивания аминокислотных остатков фермента в ДНК. Более того, это изменение совпадает по времени с окончанием фазы уменьшения интенсивности флуоресценции Тгр и FAM, характеризующим образование каталитического комплекса. Нужно отметить, что флуоресценция aPu оказалась нечувствительной к процессам, протекающим на стадиях образования первичного комплекса, в котором происходит локальное плавление дуплекса, а также к процессу выворачивания поврежденного основания из ДНК, поскольку эти процессы должны сопровождаться ростом интенсивности флуоресценции. Это свидетельствует о том, что утратившее ароматичность основание DHU само по себе способствует формированию гидрофильного окружения в области аРи, что затрудняет регистрацию конформационных изменений, индуцируемый ферментом.



Рис. 81. Сравнение кинетических кривых, зарегистрированных по изменению интенсивности флуоресценции остатков Trp, aPu или FRET-сигнала в процессе взаимодействия NEIL1 с ДНК-дуплексами **DHU/G₁₂**, **DHU^{aPu}/G₁₂** и **DHU^{FAM/BHQ1}/G₁₇**. Концентрация ДНК-субстратов и NEIL1 равна 1,0 мкМ.

Таким образом, процесс узнавания поврежденного нуклеотида ферментом NEIL1 имеет общие особенности с поведением прокариотических ферментов Fpg и Nei, что может свидетельствовать об общей модели узнавания повреждения членами структурного семейства H2tH. Первая стадия (схема 24) характеризует образование неспецифического комплекса. При этом видно (рис. 81), что в течение первых 30 мс не происходит значительных изменений интенсивности флуоресценции Trp. Следовательно, процессы, протекающие на стадиях образования неспецифического комплекса и распознавания поврежденного нуклеотида, не приводят к значительным изменениям конформации в областях фермента, в которых расположены остатки Тгр. Вторая стадия в механизме, предложенном для NEIL1, как и в случае Fpg и Nei, скорее всего, связана с интеркалированием между основаниями ДНК аминокислоты-сенсора. Поскольку такими аминокислотами являются Phe110 у Fpg и Leu70 у Nei, то, основываясь на гомологии последовательностей этих ферментов, можно заключить, что таким аминокислотным остатком у NEIL1 является Phe119. Вклинивание Phe119 в дуплекс инициирует выворачивание поврежденного основания в активный центр фермента и сопровождается встраиванием остатков Met80 и Arg117 в образовавшуюся полость на следующей стадии ферментативного процесса. Сравнение кинетических кривых, полученных с использованием DHU^{аРи}/G₁₂ и DHU^{FAM/BHQ1}/G₁₇-субстратов, показывает, что встраивание аминокислотных остатков фермента в ДНК также происходит одновременно с изгибанием дуплекса. Последняя стадия должна характеризовать подстройку структуры ферментсубстратного комплекса для достижения каталитически компетентного состояния. Согласно термодинамическим данным, полученным для Fpg, на этой стадии происходит компактизация фермент-субстратного комплекса и вытеснение молекул воды из области контакта фермента и ДНК-субстрата. Формирование каталитически компетентного комплекса индуцирует протекание химических стадий процесса и последующей диссоциации комплекса фермента с продуктом.

3.4. АР-эндонуклеаза человека АРЕ1

Одними из наиболее часто встречающихся повреждений ДНК являются апуриновые/апиримидиновые сайты (АР-сайты) [9, 45], которые образуются в ДНК при спонтанном или катализируемом ДНК-гликозилазами гидролизе N-гликозидных связей [1]. Ежедневно в каждой клетке организма человека может возникать до 10 000 АР-сайтов. Высокая мутагенность АР-сайтов связана как с отсутствием кодирующего азотистого основания, так и с их повышенной способностью вызывать одноцепочечные разрывы ДНК [477, 478].

Ключевой фермент системы эксцизионной репарации оснований (ЭРО) апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза человека АРЕ1 – отвечает за поиск и процесса удаления АР-сайтов ДНК [92, инициирование ИЗ 479]. Основной физиологической функцией фермента является гидролиз фосфодиэфирной связи в ДНК с 5'-стороны от АР-сайта, в результате чего происходит разрыв рибозофосфатного остова с фрагментов цепи, содержащих 3'-гидроксильную И 2'образованием группу дезоксирибозо-5'-фосфат [65, 480]. Однако было показано, что фермент способен узнавать в качестве субстратов не только АР-сайты, но и некоторые поврежденные основания, например 5,6-дигидроурацил и альфа-аномер аденозина [317]. Кроме того, фермент АРЕ1 обладает З'-фосфодиэстеразной, З'-5'-экзонуклеазной и З'-фосфатазной активностями [323, 480].

Анализ кристаллических структур свободного фермента АРЕ1 [326, 481, 482] и его ковалентных комплексов с ДНК [315, 327, 483] показал, что для осуществления катализа в комплексе АРЕ1-ДНК образуются контакты, которые приводят к выворачиванию АРсайта из двойной спирали (рис. 82а). На рис. 826 представлена схема контактов в фермент-субстратном комплексе АРЕ1 с ДНК, содержащей F-сайт, у которого отсутствует ОН-группа в положении C1' дезоксирибозы (PDB ID 1DE8). Видно, что аминокислотные остатки фермента взаимодействуют преимущественно с одной цепью дуплекса, как правило, с образованием водородных связей и электростатических контактов между фосфатными группами ДНК и боковыми радикалами аминокислот, а также с амидными группами пептидных связей белка. Остатки Arg73, Ala74 и Lys78 контактируют с фосфатными группами комплементарной цепи с 5'-стороны от АР-сайта. Остатки Туг128 и Gly127 располагаются в малой бороздке ДНК, что приводит к ее расширению примерно на ~ 2 Å. Активный центр фермента образован остатками Asp308, His309, Glu96, Asp210, Tyr171, Asn212 и Asn174. Стабилизация внеспиральной конформации AP-сайта осуществляется остатками Met270 и Arg177. Met270 встраивается в малую бороздку ДНК, тем самым вытесняя основание, расположенное напротив АР-сайта. Остаток Arg177

встраивается со стороны большой бороздки ДНК и образует водородную связь с фосфатной группой, расположенной с 3'-стороны от AP-сайта. В фермент-субстратном комплексе, находящемся в каталитически компетентном состоянии, остаток фосфата, расположенный с 5'-стороны от AP-сайта, координирован остатками Asn174, Asn212 и His309. Каталитическая реакция начинается с нуклеофильной атаки атома кислорода молекулы воды, координированной прямо или опосредованно через ион Mg²⁺ остатком Asp210 [327, 483]. Предложены также альтернативные механизмы катализа [484, 485], согласно которым остаток Туг171 в фенолатной форме взаимодействует с гидролизуемой фосфатной группой или остаток His309 выступает в качестве нуклеофильного основания.



Рис. 82. (*a*) Структура комплекса AP-эндонуклеазы APE1 с F-субстратом (PDB ID 1DE8) [327]. (*б*) Функционально важные аминокислотные остатки, участвующие в образовании специфических контактов между ферментом и ДНК.

Способы координации и функциональная роль ионов металлов в связывании субстрата, расщеплении и высвобождении продукта активно обсуждаются в ряде работ [326, 481, 482, 486-490]. На сегодняшний день получены данные о нескольких кристаллических структурах APE1, содержащих в активном центре ионы Sm³⁺, Pb²⁺ или Mg²⁺. При этом идентифицированы два сайта связывания металла: «А-сайт» и «В-сайт». Более того, предложен механизм «подвижного иона металла», когда один ион Mg²⁺ перемещается из «В-сайта» в «А-сайт» при расщеплении субстрата [487]. Последние

структурные исследования APE1 показали, что движение иона Mg^{2+} облегчается за счет конформационной пластичности остатка Glu96 в активном центре фермента [490]. Было показано, что в комплексе фермента с продуктом реакции ион Mg^{2+} координирован непосредственно остатком Glu96, группой 3'-OH, немостиковым атомом кислорода гидролизованной 5'-фосфатной группы и тремя молекулами воды, одна из которых связана с Asp70 [491].

Ранее методом «остановленной струи» с регистрацией изменения интенсивности флуоресценции остатков триптофана [492, 493], входящих в состав фермента, и 2аминопурина [494], расположенного с 3'- или 5'-стороны от АР-сайта, был установлен кинетический механизм взаимодействия APE1 с ДНК-субстратами (схема 26). В качестве субстратов использовали ДНК-дуплексы, содержащие нативный AP-сайт или его аналог F-сайт. Показано, что взаимодействие APE1 с субстратами включает, как минимум, две стадии связывания ДНК и узнавания AP-сайта, которые приводят к образованию каталитически компетентного комплекса. В этом комплексе происходит необратимая стадия каталитического гидролиза 5'-фосфодиэфирной связи AP-сайта. Последняя стадия кинетического механизма характеризует равновесный процесс диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции.

Схема 26

$$\mathbf{E} + \mathbf{S} \xrightarrow{k_1} (\mathbf{E} \cdot \mathbf{S})_1 \xrightarrow{k_2} (\mathbf{E} \cdot \mathbf{S})_2 \xrightarrow{k_3} \mathbf{E} \cdot \mathbf{P} \xrightarrow{K_p} \mathbf{E} + \mathbf{P}$$

где Е – фермент, S – ДНК-субстрат, (E•S)₁ и (E•S)₂ – комплексы фермента с субстратом, P – продукт превращения субстрата, E•P – комплекс фермента с продуктом, k_i и $k_{.i}$ – константы скорости прямых и обратных стадий равновесных стадий, k_3 – константа скорости каталитической стадии, K_p – равновесная константа диссоциации комплекса E•P.

Следует отметить, что, согласно рентгеноструктурным данным, связывание ДНК приводит лишь к незначительным структурным перестройкам APE1 (рис. 83). Сравнение структуры свободного APE1 (PDB ID 4LND) и комплекса APE1 с ДНК, содержащей F-сайт (PDB ID 1DE8), показывает, что один из семи остатков триптофана молекулы фермента (Trp280) расположен в ДНК-связывающем центре фермента и образует водородную связь с фосфатной группой ДНК. Таким образом, наблюдаемые изменения флуоресценции Trp, скорее всего, характеризуют конформационные изменения фермента в области Trp280.



Рис. 83. Сравнение структуры свободного APE1 (розовый, PDB ID 4LND) и комплекса APE1 с ДНК, содержащей F-сайт (фиолетовый, PDB ID 1DE8).

3.4.1. Влияние ионов Mg²⁺ на связывание ДНК и катализ

Для выяснения эффективности связывания APE1 с ДНК-дуплексом, содержащим Fсайт, были получены кинетические кривые при различных концентрациях Mg^{2+} , характеризующие образование фермент-субстратного комплекса и каталитическую стадию. Изменения интенсивности флуоресценции Trp при взаимодействии APE1 с F/G₁₃субстратом имели характерные фазы падения и роста (рис. 84*a*), которые, согласно предыдущим работам [492-494], относятся к стадиям связывания ДНК и последующей каталитической реакции и диссоциации комплекса фермент-продукт.

Начальное двухфазное уменьшение интенсивности флуоресценции Тгр относится к процессу образования специфического комплекса фермент-субстрат, в котором происходит каталитический гидролиз межнуклеотидной фосфодиэфирной связи. После каталитической реакции происходит диссоциация комплекса фермент-продукт, которая ведет к увеличению интенсивности флуоресценции. Взаимодействие APE1 с F/G₁₃субстратом в присутствии даже небольшой концентрации ионов Mg²⁺ приводило к увеличению интенсивности флуоресценции Trp на конечных участках кинетических кривых. Однако, кинетическая кривая, полученная при взаимодействии апо-APE1 с F/G₁₃субстратом в отсутствие ионов Mg^{2+} , не содержала этой фазы роста сигнала, что указывает на отсутствие каталитической стадии. Действительно, анализ накопления продуктов реакции методом гель-электрофореза показал, что скорость каталитической реакции сильно зависит от концентрации Mg^{2+} , и в отсутствие ионов Mg^{2+} APE1 теряет каталитическую активность (рис. 84δ).



Рис. 84. Влияние ионов Mg^{2+} на взаимодействие APE1 с **F**/**G**₁₃-субстратом. (*a*) Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции Trp. (*б*) Накопление продукта реакции, определенное методом гель-электрофореза в 20%-ом ПААГ.

Проведен анализ степени накопления продуктов реакции при взаимодействии APE1 с ДНК-дуплексами **X/G**₁₃, содержащими в качестве повреждения DHU, α A (α -аномер аденозина) и ϵ A (1,N6-этеноаденозин). Как видно на рис. 85*a*, ДНК-субстрат, содержащий основание DHU, расщепляется с большей эффективностью, чем α A и ϵ A. Поэтому для определения влияния ионов Mg²⁺ на процессы связывания и катализа использовали DHU/G₁₃-субстрат. Так же, как и в случае **F**/G₁₃-субстрата, при отсутствии ионов Mg²⁺ была зарегистрирована только фаза уменьшения интенсивности флуоресценции, отражающая образование фермент-субстратного комплекса (рис. 85*б*). С ростом концентрации ионов Mg²⁺ происходило ускорение этого процесса и появление фазы роста на более поздних временах реакции, свидетельствующее о протекании каталитической реакции и последующей диссоциации комплекса фермент-продукт. Действительно, начало фазы роста интенсивности на поздних временах согласуется с началом накопления продуктов реакции, зарегистрированного методом гель-электрофореза (рис. 85*6*).

Нужно отметить, что профиль кинетических кривых, полученных для **DHU/G**₁₃субстрата, отличается от аналогичных данных для **F/G**₁₃-субстрата появлением дополнительной фазы роста и последующего падения интенсивности флуоресценции в диапазоне времени 0,1–1,0 с. По-видимому, эти изменения интенсивности флуоресценции Тгр отражают взаимодействие между активным центром фермента и поврежденным основанием. Полученные кинетические кривые обрабатывали, как сумму экспонент по уравнению (4).



Рис. 85. (*a*) Скорость накопления продуктов реакции при взаимодействии APE1 с ДНКдуплексами X/G_{13} , (*б*) влияние ионов Mg^{2+} на взаимодействие APE1 с DHU/G₁₃-субстратом. (*в*) Накопление продукта реакции, определенное методом гель-электрофореза.

В случае **F**/**G**₁₃-субстрата кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции Trp были получены в присутствии или в отсутствие ионов Mg²⁺ и проанализированы с помощью трех- ([Mg²⁺] = 0,05–5,0 мМ) или двухэкспоненциальных ([Mg²⁺] = 0,0 мМ) уравнений (4) (*i* = 2 или 3 соответственно). Зависимости значений наблюдаемых констант скорости от концентрации ионов Mg²⁺, характеризующие стадии связывания ДНК, представлены на рис. 86*a* и *б*. Из рис. 86*a* следует, что наблюдаемая константа скорости k_1^{Trp} первой быстрой фазы не зависит от концентрации Mg²⁺. Как показано в работах [492, 493], быстрая начальная фаза соответствует неспецифическому связыванию ДНК, поэтому полученные данные свидетельствуют о том, что ионы Mg²⁺ не участвуют в образовании неспецифического комплекса фермент-ДНК.

Зависимость наблюдаемой константы скорости $k_2^{\text{Тгр}}$ второй фазы от концентрации ионов Mg²⁺ имела гиперболический вид (рис. 866), что характерно для процессов комплексообразования. Поэтому данная зависимость была обработана по уравнению (7).

При этом были получены следующие параметры: $k_{20} = 0.9 \pm 0.1 \text{ c}^{-1}$, $k_{2\text{max}} = 2.6 \pm 0.4 \text{ c}^{-1}$, $K_D^{\text{Mg2+}} = 1.1 \pm 0.5 \text{ MM}$.

$$k_2^{\text{Trp}} = k_{20} + (k_{2\text{max}} \times [\text{Mg}^{2^+}])/(\text{K}_D^{\text{Mg}^{2+}} + [\text{Mg}^{2^+}])$$
, (7)
где k_{20} – константа скорости при $[\text{Mg}^{2^+}] = 0,0$ мМ, $k_{2\text{max}}$ – константа скорости при
насыщающей концентрации ионов Mg^{2^+} , $\text{K}_D^{\text{Mg}^{2+}}$ – константа диссоциации для комплекса
 Mg^{2^+} с APE1.



Рис. 86. Зависимость наблюдаемых констант скорости $k_1^{\text{Trp}}(a)$, $k_2^{\text{Trp}}(b)$, $k_{\text{cat}}^{\text{Trp}}(b)$, $k_{\text{cat}}^{\text{ПАА}\Gamma}(c)$ от концентрации Mg^{2+} .

Наблюдаемые константы скорости k_{cat}^{Trp} третьей фазы на кинетических кривых соответствуют каталитической реакции. Параметры каталитической стадии также были определены прямым анализом накопления продукта методом гель-электрофореза. Константы скорости накопления продукта $k_{cat}^{\Pi AA\Gamma}$ были определены для каждой концентрации ионов Mg²⁺ путем обработки кинетических кривых по уравнению (1).

Зависимости констант скорости k_{cat}^{Trp} и $k_{cat}^{\Pi AA\Gamma}$ от ионов Mg²⁺ имели линейный вид и позволили рассчитать коэффициент активации APE1 ионами Mg²⁺ по уравнению (8). Необходимо отметить, что в анализируемом диапазоне концентраций ионов Mg²⁺ в обоих случаях коэффициент активации B = 0,033 ± 0,001 M⁻¹c⁻¹.

$$k_{\text{cat}}^{\text{Trp}} = k_{\text{cat}}^{\text{ПААГ}} = \text{B} \times [\text{Mg}^{2+}],$$
 (8)
где B – коэффициент, пропорциональный фракции APE1, активированной ионом Mg²⁺.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что активация APE1 ионами Mg²⁺ связана со специфическими взаимодействиями ионов двухвалентного металла в активном центре фермента, которые не только ускоряют образование каталитически компетентного комплекса, но и обеспечивают эффективное протекание каталитической реакции гидролиза фосфодиэфирной связи.

3.4.2. Влияние ионов К⁺ на связывание ДНК и катализ

Одной из возможных причин влияния ионов Mg^{2+} на скорость связывания ДНК могут быть электростатические взаимодействия между ионами Mg^{2+} , ферментом и ДНК. Чтобы определить роль неспецифического электростатического эффекта на процесс взаимодействия APE1 с F/G₁₇-субстратом в реакционную смесь, содержащую 5,0 мM Mg^{2+} , добавляли различную концентрации одновалентных катионов K⁺ (рис. 87*a*).

Наблюдаемая константа скорости k_1^{Trp} связывания **F**/**G**₁₇-субстрата уменьшалась в 13,5 раз по мере увеличения концентрации ионов K⁺ от 0 до 250 мМ (136,5 ± 0,8 с⁻¹ и 10,1 ± 0,4 с⁻¹ соответственно, рис. 87*б*). Эти данные показывают, что увеличение ионной силы приводит к нарушению контактов между ферментом и ДНК, тем самым препятствуя образованию комплекса. Следует отметить, что наблюдаемая константа скорости каталитической стадии (k_{cat}^{Trp}) незначительно увеличивалась с 0,62 ± 0,01 с⁻¹ до 0,86 ± 0,01 с⁻¹ при увеличении концентрации соли от 0 до 50 мМ. Последующее увеличение концентрации вело к 18-кратному уменьшению k_{cat}^{Trp} до значения 0,048 ± 0,003 с⁻¹ при 250 мМ K⁺ (рис. 87*г*). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о значительном вкладе электростатических взаимодействий при связывании ДНК с APE1 и образовании каталитического комплекса. Более того, эти данные позволяют сделать заключение о том, что увеличение констант скорости образования каталитического комплекса (E•S)₂ и каталитической реакции при увеличении концентрации ионов Mg²⁺ является следствием специфической роли Mg²⁺ в этих процессах, поскольку эффект ионов Mg²⁺ наблюдается при значительно более низких концентрациях этого катиона.



Рис. 87. Влияние одновалентных катионов K⁺ на активность APE1. (*a*) Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции Trp. Зависимость наблюдаемых констант скорости k_1^{Trp} (*б*) и $k_{\text{cat}}^{\text{Trp}}$ (*в*), рассчитанных по уравнению (1) от концентрации ионов K⁺. Теоретические кривые на панелях (*б*) и (*в*) представлены для того, чтобы продемонстрировать тенденцию изменения наблюдаемых констант скорости.

3.4.3. Влияние природы металла на связывание ДНК и катализ

Анализ конформационных изменений АРЕ1

Для выяснения влияния природы двухвалентного металла на процессы связывания ДНК и катализ были использованы Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} и Cu^{2+} (рис. 88).

Следует отметить, что инкубирование APE1 с EDTA приводит к образованию апофермента, который не содержит ионов металла в активном центре. Тем не менее, апофермент способен связывать F/G_{13} -субстрат (рис. 88*a*). На кинетических кривых во всем диапазоне концентраций ДНК видна начальная фаза уменьшения интенсивности флуоресценции Trp. Однако при низких концентрациях ДНК (0,25–1,0 мкМ) также хорошо разрешена фаза роста, за которой следует фаза снижения интенсивности флуоресценции. Отсутствие фазы роста интенсивности флуоресценции Trp в конце кинетических кривых, а также отсутствие накопления продукта, зарегистрированное методом гель-электрофореза (рис. 89), свидетельствуют о полной инактивации APE1 обработкой EDTA. Для анализа полученных кинетических кривых использовали схему 27, содержащую три равновесные стадии связывания **F**/**G**₁₃-субстрата. Константы скорости отдельных стадий реакции представлены в таблице 27.



Рис. 88. Влияние ионов металлов на взаимодействие APE1 с **F**/**G**₁₃-субстратом: (*a*) EDTA, ионы двухвалентных металлов отсутствуют, (δ) Ca²⁺, (ϵ) Mg²⁺, (ϵ) Mn²⁺, (∂) Ni²⁺ и (e) Zn²⁺.

Схема 27

$$E + F \xrightarrow{k_1} (E \cdot F)_1 \xrightarrow{k_2} (E \cdot F)_2 \xrightarrow{k_3} (E \cdot F)_3$$

где Е – фермент, F – **F**/**G**₁₃-субстрат, (E•F)_i – комплексы фермента с субстратом, k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных стадий равновесных стадий.



Рис. 89. Влияние ионов двухвалентных металлов на накопление продукта реакции. (*a*) Накопление продукта реакции, зарегистрированное методом гель-электрофореза. (*б*) Зависимость наблюдаемой константы скорости накопления продукта реакции $k_{cat}^{\Pi A \Lambda \Gamma}$ от природы металла. [APE1] = [**F**/**G**₁₃] = 1,0 мкМ, [MeCl2] = 5,0 мМ.

По сравнению с процессом связывания ДНК апо-ферментом (рис. 88*a*), в присутствии ионов Ca^{2+} на кинетических кривых исчезает промежуточная фаза роста интенсивности флуоресценции (рис. 88*б*), а кинетические кривые удовлетворительно описываются схемой 28, содержащей две равновесные стадии (таблица 27).

Схема 28

$$\mathbf{E} + \mathbf{F} \xrightarrow{k_1} (\mathbf{E} \cdot \mathbf{F})_1 \xrightarrow{k_2} (\mathbf{E} \cdot \mathbf{F})_2$$

где Е – фермент, F – **F**/**G**₁₃-субстрат, (E•F)_i – комплексы фермента с субстратом, k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных стадий равновесных стадий.

Таблица 27. Константы скорости и равновесия отдельных стадий взаимодействия APE1 с **F**/G₁₃-субстратом в присутствии различных двухвалентных ионов металлов

Константы	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺	Ca ²⁺	EDTA
$k_1, M^{-1}c^{-1}$	$(90\pm10)\times10^{6}$	$(40\pm7)\times10^{6}$	$(50\pm15)\times10^{6}$	(35±8)×10 ⁶	$(70\pm20)\times10^{6}$	$(100\pm10)\times10^{6}$
k_{-1}, c^{-1}	10,1±4,3	28±12	45±17	75±20	50±16	32±15
<i>K</i> ₁ , M	8,9×10 ⁶	$1,4 \times 10^{6}$	$1,1 \times 10^{6}$	$0,47 \times 10^{6}$	1,4×10 ⁶	3,1×10 ⁶
k_2, c^{-1}	43,1±8,5	34,8±12,7	5,7±0,6	8,2±0,9	9,4±2,4	14±6
k_{-2}, c^{-1}	7,1±1,6	2,6±1,0	0,03±0,02	0,04±0,03	$(1,9\pm1,0)\times10^{-3}$	22±12
<i>K</i> ₂	6,1	13,4	190	205	4950	0,6
k_3, c^{-1}						6,3±1,9
k_{-3}, c^{-1}						$(1,2\pm0,8)\times10^{-2}$
<i>K</i> ₃						525
$k_{\rm cat},{\rm c}^{-1}$	0,30±0,10	0,30±0,10	0,055±0,007	0,041±0,004		
$k_{\rm cat}^{\Pi AA\Gamma}, {\rm c}^{-1}$	0,28±0,01	0,19±0,07	0,11±0,01	0,05±0,01	-	-
<i>K</i> _p , M	$(7,2\pm0,4)\times10^{-6}$	(8,4±0,3)×10 ⁻⁶	(6,6±1,7)×10 ⁻⁶	$(4,5\pm1,3)\times10^{-6}$		

Константы равновесия для стадий связывания рассчитаны по формуле $K_i = k_i/k_{-i}$

В присутствии ионов Cu^{2+} в реакционной смеси APE1 полностью теряет способность связывать ДНК, поскольку на кинетических кривых не происходило изменений интенсивности флуоресценции Trp. Такой ингибирующий эффект, скорее всего, связан с сильным взаимодействием ионов Cu^{2+} с азотистыми основаниями и фосфатными группами, как было описано ранее [495].

Как показано на рис. 886-е, кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции Trp, характеризующие процесс взаимодействия APE1 с F/G₁₃-субстратом в присутствии ионов Mg²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺ и Zn²⁺ имеют схожую форму. После фазы уменьшения интенсивности флуоресценции на начальном участке кинетических кривых, характеризующем связывание ДНК и образование каталитического комплекса, происходит рост интенсивности флуоресценции в интервале времени более 10 с, который свидетельствует о протекании каталитической реакции и диссоциации комплекса ферментпродукт. Следует отметить, что в присутствии ионов различных металлов связывание ДНК, а также каталитическая реакция и диссоциация комплекса фермент-продукт протекали в разных временных интервалах. Для анализа кинетических кривых использовали схему 26, предложенную в работах [492-494]. Константы скорости, полученные в ходе анализа, приведены в таблице 27.

Следует отметить, что константа равновесия первой стадии связывания ДНК К₁ имеет примерно одинаковые значения для ano-APE1 и APE1 в присутствии ионов Mg²⁺ (8,9×10⁶ М⁻¹ и 3,1×10⁶ М⁻¹ соответственно, таблица 27). Эти данные согласуются с тем, что наблюдаемая константа скорости связывания ДНК k_1^{Trp} не зависит от концентрации Mg^{2+} (рис. 86*a*) и подтверждают вывод о том, что присутствие иона Mg^{2+} в активном центре фермента не влияет на первоначальное связывание ДНК. По сравнению с результатами, полученными в присутствии ионов Mg²⁺, константы скорости прямой реакции k_1 были примерно в два раза ниже для ионов Ni²⁺, Mn²⁺ и Zn²⁺, а константы скорости обратной реакции k_{1} , как минимум, в три раза выше для ионов Ni²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺ и Zn^{2+} . Поэтому значения равновесной константы K_1 , характеризующей первую стадию связывания ДНК в присутствии этих ионов металлов, были по меньшей мере в 6,4 раза ниже $(0,47-1,4\times10^6 \text{ M}^{-1})$, чем K_1 в присутствии Mg^{2+} $(8,9\times10^6 \text{ M}^{-1})$. Эти данные свидетельствуют о том, что первоначальное неспецифическое связывание ДНК незначительно ингибируется ионами Ni^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} и Zn^{2+} , вероятно, из-за их способности напрямую взаимодействовать с ДНК и индуцировать структурные изменения, связанные с нарушением комплементарных взаимодействий и стэкинга [495]. Более того, увеличение значения константы скорости k_1 образования комплекса (E•F)₁ коррелирует с уменьшением аффинности этих ионов к азотистым основаниям ДНК: $Cu^{2+} \gg Zn^{2+} > Mn^{2+} >$

Ni²⁺ > Ca²⁺ > Mg²⁺ [495, 496]. Известно, что взаимодействие ионов металлов с азотистыми основаниями нарушает водородные связи между парами оснований, и, тем самым, дестабилизируют двойную спираль ДНК. В то же время катионы с более высокой специфичностью связывания фосфатных групп стабилизируют двойную спираль ДНК за счет нейтрализации зарядов рибозо-фосфатного остова.

Вторая стадия связывания ДНК в схеме 26 характеризует образование каталитически компетентного комплекса фермент-ДНК. На этой стадии должны образовываться специфические контакты с ионом металла, расположенном в активном центре. Необходимо отметить, что константа скорости прямой реакции k_2 , как минимум, в 4,6 раза выше для иона Mg²⁺ по сравнению с другими металлами, за исключением Mn²⁺ (таблица 27). Константа скорости обратной реакции k_2 имела самую высокую величину, а равновесная константа K_2 была наименьшая, в случае апо-АРЕ1, что указывает на то, что ион металла необходим для стабилизации комплекса (E•F)₂. При этом, суррогатные ионы металлов стабилизируют комплекс (E•F)₂ лучше, чем природный кофактор Mg²⁺. Величина константы K_{D2} была по меньшей мере в 30 раз выше для ионов Mg²⁺ по сравнению с Ca²⁺, Zn²⁺ и Ni²⁺, тогда как образование каталитического комплекса (E•F)₂ в присутствии Mg²⁺ или Mn²⁺ характеризуется достаточно близкими константа равновесия K_p , характеризующая диссоциацию комплекса фермент-продукт, не зависит от природы иона металла (таблица 27).

Способность ионов располагаться в активном центре фермента может зависеть от их ионных радиусов. Эффективные ионные радиусы ионов для координационного числа 6 составляют 1,0 Å для Ca²⁺, 0,74 Å для Zn²⁺, 0,73 Å для Cu²⁺, 0,72 Å для Mg²⁺, 0,69 Å для Ni²⁺ и 0,67–0,83 Å для Mn²⁺ [497]. Самый большой ион (Ca²⁺), по-видимому, не может правильно координироваться в металл-связывающем центре фермента и не может выполнять каталитическую функцию (рис. 886 и 89). Согласно полученным данным по изменению флуоресценции Trp (рис. 88) и прямой регистрации продуктов (рис. 89) эффективность ионов металлов в процессе гидролиза фосфодиэфирной связи уменьшается в ряду Mg²⁺ > Mn²⁺ > Ni²⁺ > Zn²⁺, который согласуется с более ранними исследованиями в стационарных условиях [498, 499].

Анализ конформационных изменений ДНК

Для анализа конформационных изменений ДНК в процессе взаимодействия с APE1 использовали $X^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ -субстраты, где X = C, F-сайт и DHU (рис. 90). Дуплекс $C^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ использовали в качестве контроля конформационных изменений,

происходящих при образовании неспецифического комплекса. Как видно из рис. 90, взаимодействие APE1 с С^{FAM/BHQ1}/G₁₇-лигандом приводит к небольшому росту интенсивности флуоресценции FAM в интервале времени до 100 мс. При взаимодействии APE1 с $\mathbf{F}^{\text{FAM/BHQ1}}/\mathbf{G}_{17}$ -субстратом в присутствии ионов Mg^{2+} на начальном участке (до 20 мc) кинетических кривых происходит быстрое уменьшение интенсивности флуоресценции FAM, за которым следует фаза роста в интервале времени от 50 мс до 5 с. Начальное уменьшение интенсивности флуоресценции FAM свидетельствует об уменьшении расстояния между FAM и тушителем BHQ1 вследствие изгибания ДНК в комплексе с АРЕ1. Увеличение интенсивности флуоресценции FAM на следующем этапе отражает каталитическую стадию и высвобождение расщепленного ДНК-продукта из комплекса с ферментом. Действительно, в случае взаимодействия каталитически неактивной формы ano-APE1 с **F**^{FAM/BHQ1}/**G**₁₇-субстратом была зарегистрирована только фаза падения интенсивности флуоресценции FAM, отражающая образование ферментсубстратного комплекса. Кроме того, в качестве субстрата был использован дуплекс DHU^{FAM/BHQ1}/G₁₇, содержащий в качестве повреждения основание DHU. Как видно на рис. 90, в случае взаимодействия фермента с DHU^{FAM/BHQ1}/G₁₇-субстратом происходит уменьшение интенсивности флуоресценции FAM на начальном участке кинетических кривых (до 1 с), отражающее образование комплекса. При этом в присутствии ионов Mg²⁺ не была зарегистрирована фаза роста, характеризующая каталитическую стадию, что свидетельствует о более медленном расщеплении DHU^{FAM/BHQ1}/G₁₇-субстрата. чем **F**^{FAM/BHQ1}/**G**₁₇-субстрата, что хорошо согласуется с данными [492, 500].



Рис. 90. Сравнение конформационных изменений $X^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ -субстратов при взаимодействии с APE1 (в присутствие 5,0 мМ Mg²⁺) и апо-APE1 (в присутствии 1 мМ EDTA).

При исследовании кинетики взаимодействия APE1 с $\mathbf{F}^{\text{FAM/BHQ1}}/\mathbf{G}_{17}$ -субстратом показано, что двухзарядные ионы металлов оказывают влияние как на стадию образования фермент-субстратного комплекса, так и на каталитическую реакцию (рис. 91). Полученные кинетические кривые были описаны двухэкспоненциальным уравнением (1). Следует отметить, что константы скорости образования комплексов, k_1^{FAM} , в случае апо-APE1 и в присутствии ионов Mg^{2+} имеют близкие значения, тогда как суррогатные металлы вызывали небольшое снижение константы скорости образования каталитической стадии $k_{\text{саt}}^{\text{FAM}}$ уменьшалась в ряду $\text{Mg}^{2+} \approx \text{Mn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Ca}^{2+}, \text{Cu}^{2+}, \text{EDTA}$ (рис. 91*6*).



Рис. 91. Влияние ионов металлов на взаимодействие APE1 с $\mathbf{F}^{\text{FAM/BHQ1}}/\mathbf{G}_{17}$ -субстратом. (*a*) Экспериментальные кинетические кривые и теоретические кривые, полученные по уравнению (1). Зависимость значения $k_1^{\text{FAM}}(\vec{o})$ и $k_{\text{cat}}^{\text{FAM}}(\vec{e})$ от природы ионов металлов.

3.4.4. Активация APE1 ионом Mg²⁺ в составе комплекса с ДНК

Для определения скорости встраивания иона Mg^{2+} в активный центр фермента F/G₁₃и F^{FAM/BHQ1}/G₁₇-субстраты предварительно инкубировали с апо-APE1 для формирования комплекса фермент-субстрат и затем смешивали с буфером, содержащим 5,0 мM MgCl₂ или без него (рис. 92). Регистрировали изменения интенсивности флуоресценции Trp или FAM для обнаружения конформационных изменений фермента или ДHK-субстрата соответственно, которые могут быть вызваны связыванием иона Mg²⁺ в активном центре фермента. Кинетическая кривая, полученная при взаимодействии комплекса ano-APE1-F/G₁₃ с ионами Mg²⁺, имела одну фазу роста сигнала в интервале времени 0,5–20,0 с, которая соответствует каталитической реакции. Этот результат показывает, что встраивание ионов Mg²⁺ в активный центр апо-APE1 приводит к образованию каталитически активного состояния фермента без индукции изменений флуоресценции Trp. To есть изменение интенсивности флуоресценции Trp происходит только при конформационных изменениях, происходящих при связывании ДHK-субстрата и диссоциации продукта. Это свидетельствует о том, что остаток Trp280, расположенный в ДHK-связывающем канале, вносит наибольший вклад в изменения флуоресценции Trp.



Рис. 92. Активация апо-APE1 ионами Mg^{2+} в комплексах с F/G_{13^-} и $F^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ -субстратами. Один шприц содержал смесь апо-APE1 (1,0 мкМ) и F/G_{13^-} или $F^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ (1,0 мкМ) в буфере (50 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 50 мМ KCl, 1,0 мМ EDTA, 1,0 мМ DDT). Второй шприц содержал тот же буфер с или без 5,0 мМ MgCl₂.

В то же время, встраивание иона Mg^{2+} в активный центр апо-APE1 в комплексе с **F^{FAM/BHQ1}/G**₁₇-субстратом приводит к быстрому начальному уменьшению (в пределах 5 мс) интенсивности флуоресценции FAM. Это указывает на то, что связывание иона Mg^{2+} с ферментом протекает быстро и вызывает дополнительный изгиб дуплекса вследствие образования прямых связей между ионом Mg^{2+} , 5'-фосфатной группой F-сайта и аминокислотными остатками активного центра Asp308, Glu96 и Asp70. Гидролиз 5'фосфодиэфирной связи F-сайта приводит к высвобождению продукта и сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции FAM в интервале времени 0,2–10,0 с. Фаза роста флуоресценции FAM практически совпадает с фазой увеличения флуоресценции Trp, что указывает на то, что оба изменения флуоресценции соответствуют одному и тому же процессу диссоциации комплекса фермент-продукт.

3.4.5. Влияние ионов металлов на структуру АРЕ1 и ДНК-субстрата

Для определения степени изменения конформаций ДНК и АРЕ1, вызванных связыванием ионов металлов, был использован метод кругового дихроизма (CD). Спектры CD F/G₁₃-субстрата были получены в присутствии 5,0 мМ MeCl₂. Как видно из рис. 93*a*, F/G13-субстрат имеет классический спектр В-формы ДНК и состоит из положительной полосы на 275 нм, характеризующей стэкинг азотистых оснований, и отрицательной полосы на 236 нм, вызванной спиральной формой дуплекса. Спектры CD показывают, что использованные ионы двухзарядных металлов в условиях эксперимента не приводят к существенному изменению конформации F/G₁₃-субстрат. CD-спектры APE1 содержат две отрицательные полосы около 208 и 222 нм, которые являются характеристиками αспиральной структуры белка (рис. 936) [501, 502]. Полоса в области 222 нм вызвана наличием водородных связей в α-спирали и практически не зависит от длины спирали. С другой стороны, интенсивность отрицательной полосы в области 208 нм уменьшается при уменьшении длины спирали. Как видно из рис. 936, отрицательная полоса в области 208 нм уменьшается в присутствии ионов металла, что указывает на то, что они индуцируют структурные перестройки фермента. Следует отметить, что ионы Cu²⁺ и Ni²⁺ значительно увеличивают шум в диапазонах длин волн 200-300 и 200-230 нм, что препятствует регистрации CD-спектров в присутствии этих ионов.

Таким образом, впервые получены данные о динамике конформационных превращений АР-эндонуклеазы человека и ДНК-субстратов в ходе их взаимодействия в присутствии моно- и бивалентных ионов металлов (K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+}).



Рис. 93. Спектры кругового дихроизма **F/G₁₃-**субстрата (*a*) и APE1 (*б*) в отсутствие и присутствии ионов металлов.

Таким образом, при исследовании влияния ионов металлов на ферментативный процесс, катализируемый АРЕ1, пказано, что первая стадия связывания субстрата и образования первичного фермент-субстратного комплекса не зависит от концентрации и природы двухвалентных ионов металлов. Однако эффективность образования первичного комплекса значительно уменьшается с ростом концентрации моновалентных ионов К⁺, что свидетельствует о существенном вкладе неспецифических электростатических взаимодействиях на этой стадии ферментативного процесса. Показано, что образование каталитического комплекса, а также скорость каталитической реакции зависят от концентрации Mg²⁺, а природа металла влияет как на процессы связывания ДНК, так и на каталитический гидролиз 5'-фосфодиэфирной связи. Так, ионы Cu²⁺ полностью лишают фермент АРЕ1 ДНК-связывающей способности, вероятно, за счет взаимодействия с азотистыми основаниями и рибозо-фосфатным остовом ДНК. В присутствии ионов Ca²⁺ АРЕ1 полностью теряет каталитическую активность, хотя фермент способен связывать ДНК-субстрат. По-видимому, это связано с тем, что за счет большого ионного радиуса ионы Ca²⁺ не могут правильно разместиться в активном центре фермента. Каталитическая активность фермента зависит от природы металла и уменьшается в ряду $Mg^{2+} > Mn^{2+} >$ $Ni^{2+} > Zn^{2+}$. Анализ CD-спектров показал, что ионы металлов вызывают структурные перестройки фермента, которые, по-видимому, могут приводить к уменьшению каталитической активности.

3.4.6. Влияние рН на связывание ДНК и катализ

Был проведен анализ влияния pH на стадии образования каталитического комплекса и реакцию гидролиза фосфодиэфирной связи. Как видно из рис. 94*a*, увеличение pH приводило к ускорению как фазы падения интенсивности флуоресценции Trp, так и фазы роста. Для расчета наблюдаемых констант скорости полученные кинетические кривые описывали уравнением (4, *i* = 2). Наблюдаемая константа скорости k_1^{Trp} связывания **F/G**₁₃субстрата увеличивалась более чем в 100 раз при изменении pH от 5,5 до 9,0 (рис. 94*b*). Эти данные свидетельствуют о том, что изменение степени поляризации аминокислотных остатков ДНК-связывающего центра, такких как Arg73, Lys78, Glu96, Arg 156, Arg177,



Рис. 94. Влияние pH на изменение интенсивности флуоресценции Trp в ходе взаимодействия APE1 с **F**/**G**₁₃-субстратом. (*a*) Экспериментальные кинетические кривые и теоретические кривые, полученные по уравнению (1). Зависимость значения k_1^{Trp} (*б*) и $k_{\text{cat}}^{\text{Trp}}$ (*в*) от pH. Теоретические кривые на панели (*в*) представлены для того, чтобы продемонстрировать тенденцию изменения наблюдаемой константы скорости.
Arg181, Asp210, Lys276, Asp308 и His309 (рис. 82), имеет важное значение для образования фермент-субстратного комплекса. При этом протонирование полярных групп аминокислотных остатков в более кислых pH препятствует образованию комплекса.

Кроме того, с ростом pH выше значения 7,5 значительно увеличивается наблюдаемая константа каталитической стадии k_{cat}^{Trp} , что свидетельствует о том, что депротонирование аминокислот в активном центре значительно ускоряет реакцию гидролиза фосфодиэфирной связи.

Увеличение наблюдаемой константы скорости $k_{cat}^{\Pi AA\Gamma}$ более чем в 10 раз при увеличении pH от 5,5 до 9,0 наблюдалось также в экспериментах по регистрации продуктов реакции методом гель-электрофореза (рис. 95).

Поскольку активный центр фермента включает остатки Asp308, His309, Glu96, Asp210, Tyr171, Asn212 и Asn174, среди которых His309 и Tyr171 имеют pKa 6,6 и 9,6 соответственно, то в использованном диапазоне pH эти два остатка могут изменить полярность. Нужно отметить, что и His309, и Tyr171 координируют расщепляемую фосфатную группу, расположенную с 5'-стороны от AP-сайта. Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что скорость гидролиза фосфодиэфирной связи увеличивается при депротонировании His309 и, возможно, Tyr171.



Рис. 95. Влияние pH на скорость накопления продуктов реакции в ходе взаимодействия APE1 с $\mathbf{F}/\mathbf{G}_{13}$ -субстратом. (*a*) Экспериментальные кинетические кривые и теоретические кривые, полученные по уравнению (3). (б) Зависимость значения $k_{\text{cat}}^{\Pi AA\Gamma}$ от pH.

3.4.7. Взаимодействие мутантных форм АРЕ1 с ДНК

С целью выяснения роли отдельных аминокислот в проявлении каталитической активности АРЕ1 были исследованы некоторые мутантные формы фермента, содержащие единичные замены аминокислот. Для замены были выбраны потенциально важные для катализа и связывания ДНК аминокислотные остатки Asp210 и Asp308, расположенные в фермента и непосредственно участвующие В активном центре формировании каталитически компетентного состояния фермент-субстратного комплекса. Было показано, что замена Asp210Asn приводит к полной потере каталитической активности (рис. 96*a*), при этом мутантная форма APE1 способна связывать ДНК (рис. 96*б*). Однако образование фермент-субстратного комплекса происходит значительно медленнее и заканчивается в течение 1 с, тогда как для фермента дикого типа этот процесс происходит за 0,1 с. Эти данные показывают, что остаток Asp210 не только выполняет важную роль в протекании каталитической реакции, но и участвует в процессе связывания ДНК и образования каталитического комплекса. Замена Asp308Ala не приводит к уменьшению каталитической активности фермента, что свидетельствует о том, что в составе активного центра остаток Asp308 не участвует в процессах, связанных с осуществлением каталитической реакции (рис. 96*a*). Однако, как видно на рис. 966, замена Asp308Ala изменения приводит К значительному уменьшению амплитуды интенсивности флуоресценции эффективность Trp, соответственно снижает образования И каталитического комплекса.



Рис. 96. (*a*) Относительная активность APE1 WT и мутантных форм Asp308Ala и Asp210Asn. Анализ продуктов реакции проводили через 30 с при взаимодействии APE1 WT и мутантных форм Asp308Ala и Asp210Asn с F/G_{13} -субстратом. (*б*) Экспериментальные кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения фермента в процессе взаимодействия с F/G_{13} -субстратом.

3.4.8. Экзонуклеазная каталитическая активность АРЕ1

Несмотря на то, что в процессе связывания ДНК и гидролиза 5'-фосфодиэфирной связи в ходе AP-эндонуклеазной реакции APE1 претерпевает конформационные превращения, которые регистрируются по изменению интенсивности флуоресценции Trp (рис. 97, **F**/**G**₁₇-субстрат), при исследовании 3'-5' экзонуклеазной активности не происходило изменения интенсивности флуоресценции Trp (рис. 97, Exo-A/T-субстрат).



Рис. 97. Изменение интенсивности флуоресценции Trp при осуществлении АР-эндонуклеазной и 3'-5' экзонуклеазной активностей.

Поэтому, для определения скорости отщепления нуклеотида в процессе 3'-5' экзонуклеазной реакции, катализируемой APE1, были использованы дуплексы, содержащие остаток 2-аминопурина в первом, втором, четвертом и шестом положении от 3'-конца олигонуклеотида **Exo-aPu**ⁱ/T (i = 1, 2, 4 и 6). После образования ферментсубстратного комплекса и протекания каталитического акта происходит выщепление свободного нуклеотида с 3'-конца олигонуклеотида. Таким образом, наблюдая за флуоресценцией aPu, можно судить о накоплении в реакционной смеси продуктов реакции. При этом ферменту требуется различное время для удаления нуклеотида, содержащего 2-аминопурин, что позволяет охарактеризовать как скорость удаления нуклеотидов, расположенных на 3'-конце последовательности, так и скорость перемещения фермента в направлении 3'→5'.

Как видно на рис. 98*a*, взаимодействие APE1 с дуплексами **Exo-aPu¹/T** приводит к возрастанию интенсивности флуоресценции aPu. В зависимости от местоположения aPu в дуплексе **Exo-aPuⁱ/T** рост интенсивности флуоресценции происходит со сдвигом во временной шкале от 2 с для **Exo-aPu¹/T** до 500 с для **Exo-aPu⁶/T** при [APE1] = 1 мкМ. Для соотнесения изменения интенсивности флуоресценции с процессом удаления нуклеотида



0

60

50

40 %

10

0

0

20 40 60 80

, 100дукт, 20

г

0

200

[АРЕ1] = 1,0 мкМ

400

0

в

д

4

3

2

1

0

0.1

Интенсивность флуоресценции аРи

t, c 0

0

2000

20

10

4000 60 Время, с

Exo-aPu¹/T

14 нт

15 нт

xo-aPu²/

12 нт

1000

Exo-aPu4/

Exo-aPu⁶/T

30

6000

60

8000

600

300

10000

1200

1.0

-0.75 .5 [Продукт], мкМ

0.25

0.0

10000



220

0,5 0,25

1200

14 нт

13 нт 12 **H**T

11 нт 10 HT 9 нт

1000

800

[Exo-aPu¹/T] = 0,25 мкМ

400

Время, с

800

1200

600

Время, с

представляющих суммарный набор укороченных олигонуклеотидов (рис. 98*в*), показывают, что экзонуклеазная активность APE1 приводит к эффективному расщеплению олигонуклеотида в течение примерно 200 с. Кроме того, полученные электрофоретические данные позволили получить профиль накопления и расходования укороченных промежуточных продуктов реакции (рис. 98*г*). Сравнение флуоресцентных кинетических кривых, полученных с использованием дуплексов **Exo-aPuⁱ/T** с накоплением и расходованием укороченных продуктов реакции, соответствующих *i*-тому положению, показывает, что фаза быстрого роста интенсивности флуоресценции соответствует выщеплению нуклеотида, содержащего aPu (рис. 98*д*).

Для каждого из исследуемых дуплексов **Exo-aPuⁱ/T** получена концентрационная серия кривых (рис. 99). При взаимодействии APE1 с дуплексами **Exo-aPuⁱ/T** происходит образование первичного фермент-субстратного комплекса, выщепление первого нуклеотида, далее происходит дислокация фермента к n-1 нуклеотиду, его выщепление и т.д. В случае субстратов **Exo-aPu²/T**, **Exo-aPu⁴/T** и **Exo-aPu⁶/T**, требующих перемещения фермента вдоль укороченного продукта реакции, время, необходимое для удаления нуклеотида, содержащего основание aPu, возрастало до 1000–10000 с. Поскольку в ходе множественных оборотов фермента и перемещения по укороченной цепи происходит разупорядочивание ферментативного процесса, кинетические кривые, полученные для **Exo-aPu²/T**, **Exo-aPu⁶/T**, описывались многоэкспоненциальной (ур. (3), *i* > 3) функцией, что значительно затрудняло получение количественных параметров процессов с участием этих субстратов.

Для определения величины наблюдаемой константы скорости экзонуклеазной реакции каждую кинетическую кривую аппроксимировали суммой экспонент. При этом для **Exo-aPu¹/T** кинетические кривые описывались двухэкспоненциальным уравнением (4, i = 2). Наблюдаемая константа скорости k_1^{aPu} , соответствующая фазе максимального роста интенсивности флуоресценции aPu и характеризующая скорость удаления нуклеотида aPu, характеризовалась гиперболической зависимостью от концентрации APE1 (рис. 100*a*). Такая зависимость свидетельствует о том, что каталитической стадии удаления нуклеотида предшествует стадия образования фермент-субстратного комплекса (схема 29). Используя уравнение (9), была рассчитана константа связывания субстрата K_1 ((1,4 ± 0,2)×10⁶ M⁻¹) и константа скорости каталитической стадии k_2 (0,096 ± 0,004 с⁻¹). Наблюдаемая константа скорости k_2^{aPu} , характеризующая вторую медленную стадию, не зависела от концентрации APE1 и, по-видимому, отражает процесс выхода нуклеотида, содержащего aPu, из активного центра фермента (рис. 100*б*).

$$k_1^{\text{aPu}} = K_1 \times [\text{APE1}] \times k_2 / (K_1 \times [\text{APE1}] + 1)$$
(9)

221



Рис. 99. Изменение интенсивности флуоресценции aPu при взаимодействии APE1 с дуплексами **Exo-aPuⁱ/T**. Концентрация субстрата 1 мкМ, диапазон изменения концентрации фермента указан на рисунке.



Рис. 100. Зависимость наблюдаемых констант скорости $k_1^{a^{Pu}}(a)$ и $k_2^{a^{Pu}}(\delta)$ от концентрации APE1 при взаимодействии с **Exo-aPu¹/T**.

Схема 29

 $\mathbf{E} + \mathbf{S} \stackrel{K_1}{\longleftrightarrow} \mathbf{E} \cdot \mathbf{S} \stackrel{k_2}{\longrightarrow} \mathbf{E} \cdot \mathbf{P},$

где Е – фермент, S – **Exo-aPu¹/T**-субстрат, E•S – каталитически активный комплекс фермент-субстрат, E•P – комплекс фермента с укороченным продуктом реакции K_1 – константа образования каталитического комплекса и k_2 – константа скорости удаления нуклеотида, содержащего аPu.

Поскольку эффективность 3'-5' экзонуклеазной реакции зависит от термической стабильности ДНК-дкплексов [321, 503], была проведена оценка влияния стабильности концевой пары на выщепление первого нуклеотида. Для этой цели были использованы дуплексы **Exo-aPu¹/N**, содержащие напротив aPu азотистые основания цитозина, тимина, аденина или гуанина (N = C, T, A и G соответственно). На рис. 101 представлены кинетические кривые взаимодействия APE1 с дуплексами **Exo-aPu¹/N**. Видно, что скорость выщепления 2-аминопурина зависит от природы стоящего напротив нуклеотида и уменьшается в ряду G > A > C > T.



Рис. 101. (*a*) Изменение интенсивности аРи при взаимодействии APE1 с **Exo-aPu¹/N**-субстратами. (*б*) Значения наблюдаемых констант скоростей k_i^{aPu} .

Экспериментальные данные были количественно обработаны суммой двух экспонент (ур. 4, i = 2). Как видно из рис. 101 δ , от природы стоящего напротив нуклеотида зависит только значение наблюдаемой константы скорости первой фазы k_1^{aPu} . Значение наблюдаемой константы скорости второй фазы k_2^{aPu} не зависело от природы стоящего напротив нуклеотида и составило величину, равную $(3,4 \pm 0,2) \times 10^{-3}$ с⁻¹. Первая стадия

роста интенсивности флуоресценции отражает выщепление нуклеотида, содержащего остаток 2-аминопурина, как было показано в экспериментах с радиоактивно меченым субстратом. Вторая стадия роста интенсивности флуоресценции отражает, по-видимому, процесс диссоциации отщепленного нуклеотида.



Рис. 102. Изменение интенсивности флуоресценции aPu при взаимодействии APE1 с дуплексами **Exo-aPu²-X/N**, содержащими неповрежденные (*a*) или поврежденные (*б*) нуклеотиды. Концентрация [APE1] = [**Exo-aPu²-X/N**] = 1 мкМ. (*в*) Значения наблюдаемых констант скоростей k_1^{aPu} .

Значение наблюдаемой константы скорости k_1^{aPu} (с⁻¹) изменяется в ряду G (0,13) > A $(7,5\times10^{-2}) > C (5,0\times10^{-2}) \ge T (4,0\times10^{-2})$. Таким образом, из представленных данных видно, что природа нуклеотидов концевой пары значительно влияет на скорость выщепления концевого нуклеотида. Основание aPu образует две водородные связи с тимином и одну водородную связь с цитозином, в то время как с пуриновыми основаниями образование таких пар невозможно. Таким образом, можно предположить, что образование каталитически активного комплекса фермента с дуплексами, содержащими aPu/G и aPu/A

пары, происходит быстрее вследствие отсутствия комплементарных взаимодействий между концевыми нуклеотидами, что приводит к увеличению скорости выщепления 3'- концевого нуклеотида.

Для выяснения влияния природы концевого нуклеотида на скорость его удаления использовали набор дуплексов **Exo-aPu²-X/N**, в которых aPu располагается во втором положении от 3'-конца, а X представляет собой нуклеотид, содержащий либо неповрежденное основание аденин (A), гуанин (G), цитозин (C), тимин (T), либо модифицированное основание, такое как 8-оксогуанин (охоG), урацил (U), метилцитозин (5mC), альфа-аденозин (α A), либо является остатком тетрагидрофурана (F) или фосфата (p).

На рис. 102*а* представлены экспериментальные данные зависимости интенсивности флуоресценции аРи от времени при взаимодействии APE1 с дуплексами **Exo-aPu²-X/N**. Интересно, что скорость выщепления аРи, расположенного после G/C и C/G пары, была выше, чем в случаях A/T и T/A пары. Скорость выщепления 2-аминопурина, расположенного после поврежденной X/N пары, уменьшается в ряду: F/G $\geq \alpha$ A/T >охоG/C = U/G > meC/G \geq p/C (рис. 102*6*). Экспериментальные данные были количественно обработаны по уравнению (1). Значения наблюдаемых констант скорости k_{obs} , соответствующих отщеплению остатка 2-аминопурина, приведены в таблице 28 и на рис. 102*в*.

Таблица 28. Значения наблюдаемой константы скорости k_{obs} , соответствующей удалению остатка aPu из дуплекса **Exo-aPu²-X/N**

Пара Х/N	$k_{\rm obs},{\rm c}^{-1}$
F/G	$(4,6\pm0,05)\times10^{-3}$
oxoG/C	$(1,7\pm0,07)\times10^{-3}$
p/C	$(5,3\pm0,6)\times10^{-4}$
5mC/G	$(8,9\pm0,5)\times10^{-4}$
U/G	$(1,9\pm0,06)\times10^{-3}$
αΑ/Τ	$(3,3\pm0,04)\times10^{-3}$
A/T	$(9,9\pm0,6)\times10^{-4}$
T/A	$(9,2\pm0,5)\times10^{-4}$
C/G	$(2,1\pm0,07)\times10^{-3}$
G/C	$(2,9\pm0,05)\times10^{-3}$

Видно, что взаимодействие APE1 с дуплексами, содержащими F-сайт и альфааденозин, приводит в наибольшему значению наблюдаемой константы скорости. Интересно, что значения наблюдаемых констант для дуплексов, содержащих охоG/C, U/G и C/G пару практически одинаковы и находятся в пределах $(1,7-2,1)\times10^{-3}$ c⁻¹, тогда как значение наблюдаемой константы скорости для дуплекса, содержащего G/C пару, немного выше и составляет $2,9\times10^{-3}$ c⁻¹. Следует отметить, что реакция гидролиза 3'-фосфатной группы (3'-фосфатазная активность) имеет наименьшую величину наблюдаемой константы скорости (5,3 ± 0,6)×10⁻⁴ c⁻¹, что согласуется с литературными данными [504, 505], показывающими, что 3'-фосфатазная активность APE1 примерно в 200 раз слабее, чем AP-эндонуклеазная активность.

3.4.9. Термодинамические параметры ферментативного процесса

Для уточнения природы процессов, происходящих на последовательных стадиях узнавания F-сайта в ДНК-субстрате, катализа и диссоциации комплекса фермента с продуктом, выполнен постадийный термодинамический анализ взаимодействия АРЕ1 с F/G₁₇-субстратом. Получены кинетические кривые, характеризующие взаимодействие APE1 с F/G_{17} -субстратом в условиях одного оборота фермента при температуре от 10 до 37°С. На рис. 103*а* приведен пример концентрационной серии кинетических кривых, полученных при 25°С. Согласно полученным ранее данным [492, 493], уменьшение интенсивности флуоресценции Тгр на начальном участке кинетических кривых характеризует образование каталитически компетентного комплекса. Каталитическая стадия процесса, приводящая к образованию продуктов и последующей диссоциации комплекса фермент-продукт, сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции Тгр на более поздних временах (начиная примерно от 1 с). Как видно из кинетических кривых (рис. 1036), обе фазы изменения интенсивности флуоресценции зависят от температуры.

Анализ кинетических кривых изменения интенсивности флуоресценции белка показал, что минимальный кинетический механизм взаимодействия APE1 с F/G_{17} субстратом включает двухстадийное равновесное связывание, необратимое образование комплекса фермент–продукт и равновесную диссоциацию этого комплекса, который, как и ранее [14–16], описывается схемой 26. Константы скорости прямых и обратных реакций, характеризующие взаимодействие APE1 с F/G_{17} -субстратом при разных температурах, приведены в таблице 29.



Рис. 103. (*a*) Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения APE1 при взаимодействии с $\mathbf{F/G_{17}}$ -субстратом при 25°С. [APE1] = 1,0 мкМ, концентрация $\mathbf{F/G_{17}}$ -субстрата изменяется в диапазоне от 0,5 до 2,5 мкМ. (*б*) Изменения интенсивности флуоресценции Trp в процессе взаимодействия APE1 и $\mathbf{F/G_{17}}$ -субстрата при различных температурах. [APE1] = 1,0 мкМ, [$\mathbf{F/G_{17}}$] = 2,0 мкМ.

Как показано на рис. 104, зависимости $\ln(K_i)$ и $\ln(k_3/T)$ от 1/T имеют линейный вид, что позволяет рассчитать термодинамические параметры равновесных стадий по уравнению Вант–Гоффа (5) и параметры переходного состояния каталитической стадии по уравнению Эйринга (6). Полученные данные представлены в таблице 30.



Рис. 104. Зависимости $\ln(K_i)$ (*a*) и $\ln(k_3/T)$ (б) от 1/T.

Таблица 29. Константы скорости отдельных стадий взаимодействия APE1 с **F/G**₁₇-субстратом и константы диссоциации комплекса ферментпродукт при разной температуре

Константы	Температура					
KUICTAIITBI	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C
$k_1, \mathbf{M}^{-1}\mathbf{c}^{-1}$	$(5,1\pm2,1)\times10^{6}$	$(16,0\pm3,4)\times10^{6}$	$(46,0\pm 12,0)\times 10^6$	$(100 \pm 12) \times 10^{6}$	$(190 \pm 32) \times 10^{6}$	$(520 \pm 20) \times 10^{6}$
k_{-1}, c^{-1}	$3,3 \pm 0,4$	$7,3 \pm 3,6$	$12,0 \pm 5,1$	$11,0 \pm 2,5$	$19,0 \pm 5,2$	$47,0 \pm 13,0$
K_1^{*}, M	$1,5 \times 10^{6}$	$2,2 \times 10^{6}$	$3,8 \times 10^{6}$	$9,1 \times 10^{6}$	10,0×10 ⁶	$11,1 \times 10^{6}$
k_2, c^{-1}	$4,2 \pm 2,6$	$3,7 \pm 1,2$	$8,2 \pm 3,9$	$8,8 \pm 4,4$	$15,0 \pm 1,8$	$24,0 \pm 9,0$
k_{-2}, c^{-1}	$5,7 \pm 1,9$	$5,5 \pm 2,9$	$19,0 \pm 3,7$	$27,0 \pm 4,2$	$40,0 \pm 6,6$	$93,0 \pm 17,4$
K_2	0,74	0,67	0,43	0,33	0,37	0,26
$k_{\rm cat},{\rm c}^{-1}$	$1,4 \pm 0,6$	$2,0 \pm 0,7$	$2,5 \pm 1,2$	$4,6 \pm 2,2$	$6,6 \pm 2,2$	$9,2 \pm 1,0$
$K_{\rm p},{ m M}$	$(13,5\pm3,9)\times10^{-6}$	$(10,6\pm1,9)\times10^{-6}$	$(7,2\pm1,8)\times10^{-6}$	$(6,6\pm2,3)\times10^{-6}$	$(6,9\pm1,2)\times10^{-6}$	$(4,2\pm0,6)\times10^{-6}$

Константы равновесия для стадий связывания рассчитаны по формуле $K_i = k_i/k_{-i}$.

Таблица 30.	Термодинамические п	араметры взаимодействия	APE1 c F/C	3 ₁₇ -субстратом
-------------	---------------------	-------------------------	------------	-----------------------------

Параметр			
	$\Delta G^{\circ}_{\mathrm{i,298}}$,	ΔH°_{i} ,	ΔS°_{i} ,
	ккал/моль	ккал/моль	кал/(моль×К)
Стадия (номер)			
Первичное связывание ДНК (1)	-9,2	$14,3 \pm 2,2$	$79,0 \pm 7,6$
Специфическое узнавание F-сайта (2)	0,5	-6,8 ± 1,2	-24,6 ± 4,0
Суммарное значение параметров для стадий связывания $\sum_{i=1}^{i=2}$	-8,7	7,5 ± 3,4	54,4 ± 11,7
Переходное состояние каталитической стадии (3)	16,6	12,2 ± 0,8	-14,8 ± 2,8
Образование комплекса фермент– продукт (4)	-7,0	6,8 ± 1,0	46,6 ± 3,5

Стандартная ошибка ± 1 SD. Ошибка определения энергии Гиббса, $\Delta\Delta G^{\circ}_{i298} = \text{RT}(\Delta K_i/K_i) \leq 0,1$ ккал/моль.

Согласно полученным данным, образование первичного фермент-субстратного комплекса (первая стадия в схеме 26) характеризуется положительным изменением стандартной энтальпии (14,3 ккал/моль) и положительным изменением энтропии (79,0 кал/(моль×К)). Поскольку увеличение энтропии при взаимодействии ДНК-связывающих белков с ДНК обусловлено либо десольватацией полярных групп в области контакта белок–ДНК [408], либо вытеснением высокоупорядоченных «кристаллических» молекул воды из бороздок ДНК [409], то можно заключить, что на этой стадии происходит образование связей между аминокислотными остатками ДНК-связывающего центра и ДНК-дуплексом. Среди них можно отметить взаимодействие между фосфатными группами ДНК-дуплекса с 5'- и 3'-стороны от F-сайта и остатками Arg73, Ala74, Lys78, Trp280, Asn222, Asn226 и Asn229 (рис. 82). Кроме того, в этот момент времени, вероятно, происходит встраивание остатка Arg177 в ДНК-дуплекс со стороны большой бороздки и образование водородной связи с фосфатной группой, расположенной с 3'-стороны от F-сайта. Остаток Met270 встраивается в ДНК-дуплекс со стороны малой бороздки и также может вытеснять «кристаллическую» воду.

Вторая стадия взаимодействия APE1 с F-субстратом, представляющая собой специфическую перегруппировку комплекса (E•S)₁, характеризуется отрицательным значением изменения как энтальпии ($\Delta H^{\circ}_2 = -6.8$ ккал/моль), так и энтропии (-24,6 кал/(моль×К)). Отрицательное значение ΔH°_2 свидетельствует о стабилизации комплекса при образовании новых, энергетически выгодных связей между взаимодействующими атомами, а отрицательное значение ΔS°_2 – об увеличении его жесткости, т.е. об уменьшении внутренних степеней свободы. Эти результаты свидетельствуют о том, что данная стадия включает процесс выворачивания F-сайта в активный центр фермента и стабилизации этого состояния с помощью остатков Arg177 и Met270, которые встраиваются в большую и малую бороздки ДНК соответственно. Кроме того, в этот момент происходит, вероятно, образование связей между фосфатной группой, расположенной в 5'-направлении от F-сайта, остатками Asn174, Asn212 и His309 и ионом Mg²⁺, расположенными в активном центре фермента.

Для третьей, каталитической, стадии были рассчитаны значения изменений энтальпии (ΔH^{\neq}) и энтропии (ΔS^{\neq}) активации процесса образования переходного комплекса. Полученное значение для энтальпии активации равно 12,2 ккал/моль. Необходимо отметить, что это значение относится к стадии гидролиза фосфодиэфирной связи ферментом APE1 и лежит в диапазоне величин 6,0–18,6 ккал/моль, полученных для каталитических стадий реакций разрыва N-гликозидной связи и β-элиминирования фосфатных групп, осуществляемых ДНК-гликозилазами Fpg и hOGG1 [369, 407].

Интересно отметить, что термодинамические параметры стадии образования комплекса фермента с продуктом реакции коррелируют с параметрами образования первая стадия, этот процесс характеризуется первичного комплекса. Как и положительными значениями изменений стандартных значений энтальпии и энтропии (6,8 ккал/моль и 46,6 кал/(моль×К) соответственно). Это свидетельствует о том, что основной вклад в термодинамические параметры этой стадии вносят те же взаимодействия, которые происходят на первой стадии связывания АРЕ1 с ДНКсубстратом – неспецифические контакты между ДНК-связывающим центром и рибозофосфатным остовом ДНК-дуплекса. Однако комплекс фермента с продуктом Е•Р можно считать истинным неспецифическим комплексом, тогда как образование первичного комплекса (E•S)₁ в случае короткого ДНК-субстрата включает некоторые элементы специфического узнавания F-сайта. Поэтому образование комплекса (E•S)₁ по сравнению с комплексом E•P энергетически более выгодно ($\Delta\Delta G^{\circ}_{298} = -2,2$ ккал/моль, $\Delta\Delta H^{\circ} = 7,5$ ккал/моль, $\Delta\Delta S^{\circ} = 32,4$ кал/(моль×К)).

3.5 Практическое применение данных о молекулярно-кинетических механизмах ферментов репарации

Практическим приложением полученных данных об особенностях взаимодействия ферментов репарации с ДНК является разработка метода, позволяющего определить их активность в биологических образцах, включая лизаты клеток, содержащих небольшое количество ферментов. Разработка таких методов имеет большое значение для диагностирования уровня репарационно-защитного статуса конкретного организма. Кроме того, использование высокочувствительного метода определения специфической быстрого, востребовано для поточного поиска низкомолекулярных активности соединений, оказывающих влияние на эту активность. При этом активаторы ферментов репарации могут быть рассмотрены как средства, позволяющие проводить профилактику возникновения заболеваний, вызванных накоплением мутаций в геноме, в том числе и опухолевую трансформацию клеток, тогда как ингибиторы данных ферментов могут быть использованы, например, при химио- и лучевой терапии онкологических заболеваний, поскольку уменьшение репарационной устойчивости организма необходимо для более эффективного протекания лечения.

Для создания высокочувствительного специфического метода определения активности ключевых ферментов репарации, включая ДНК-гликозилазы и АРэндонуклеазу необходимо:

 создать ряд флуоресцентных ДНК-зондов, содержащих различные типы поврежденных оснований ДНК, в том числе повреждения ДНК, встречающиеся при химио- и лучевой терапии онкологических заболеваний, которые будут обеспечивать максимальную чувствительность к специфическим ферментам;

 ДНК-зонды должны содержать модификации, повышающие их устойчивость к неспецифическим эндо- и экзонуклеазам и позволяющие их использование в общем клеточном лизате, в качестве неспецифического контроля использовать ДНК-зонды, не содержащие специфического повреждения;

3) определить эффективность данных зондов с использованием очищенных препаратов ферментов и провести апробацию метода на лизатах культивируемых клеток.

3.5.1. Определение активности ферментов репарации

В рамках разработанной концепции был создан ДНК-зонд $\mathbf{F}^{FAM/Dab}/\mathbf{G}_{13}$, использованный для определения активности APE1. Принципиальная схема метода представлена на рис. 105*a*. ДНК-зонд $\mathbf{F}^{FAM/Dab}/\mathbf{G}_{13}$ представляет собой дуплекс олигонуклеотидов, несущих FRET пару FAM/Dab. Один из олигодезоксирибонуклеотидов

5'-конце, несет флуоресцентный краситель на а комплементарный олигодезоксирибонуклеотид несет краситель на 3'-конце. Флуоресцентные красители подобраны таким образом, что спектр испускания флуоресценции одного красителя (флуоресцеин, FAM) перекрывается со спектром поглощения второго красителя (дабцил, Dab). Образование дуплекса приводит к пространственному сближению флуорофора FAM и тушителя флуоресценции Dab, в результате чего происходит эффективное тушение флуоресценции. специфического сайта В качестве был использован F-сайт. Взаимодействие APE1 и **F**^{FAM/Dab}/**G**₁₃ приводит к расщеплению рибозо-фосфатного остова ДНК В по специфическому сайту. результате, вследствие нестабильности образовавшегося в качестве продукта реакции дуплекса, его цепи в растворе расходятся, что приводит к пространственному разделению флуорофора и тушителя. Интенсивность флуоресценции увеличивается по мере накопления продукта реакции. Как видно на рис. 1056, $\mathbf{F}^{\text{FAM/Dab}}/\mathbf{G}_{13}$ обладает высокой чувствительностью к низким концентрациям очищенного препарата АРЕ1.

Таким образом, апробация данного ДНК-зонда показала перспективность его использования для определения низких концентраций APE1. Тем не менее, для использования данного подхода необходимо повысить устойчивость ДНК-зонда к действию неспецифических экзонуклеаз.



Рис. 105. (*a*) Принципиальная схема метода определения активности APE1 и (б) эффективность ДНК-зонда **F**^{FAM/Dab}/**G**₁₃.

Согласно данным о механизме действия APE1 [9, 92, 326, 327], замены 3'-концевого мостикового атома кислорода в фосфатной группе нуклеотида, расположенного с 5'стороны от AP-сайта, на иминогруппу NH с образованием N3'-P5'-фосфорамида или одного из немостиковых атомов кислорода на атом серы, аминогруппу NH₂ или остаток тетраметилгуанидина (Tmg) (рис. 106, таблица 31) должны привести к нарушению контактов с ионом Mg^{2+} и аминокислотными остатками активного центра, что может уменьшить скорость каталитической реакции. Поскольку APE1 обладает 3'-5'-экзонуклеазной активностью, то для блокирования этого процесса в 3'-концевую межнуклеотидную фосфатную группу в некоторых случаях введены замены атомов О на S или Tmg (таблица 31). Синтез модифицированных амидофосфитов и олигонуклеотидов совместно проведен в лаборатории органического синтеза, лаборатории биомедицинской химии и лаборатории химии нуклеиновых кислот ИХБФМ.



Рис. 106. Химическая модификация 5'-фосфатной группы F-сайта с образованием аналогов, устойчивых к действию APE1.

Оценку эффективности расщепления олигонуклеотидов проводили путем разделения продуктов реакции методом гель-электрофореза. Наблюдаемые константы скорости расщепления дуплексов олигонуклеотидов, имеющих замену только в фосфатной группе, расположенной с 5'-стороны от F-сайта уменьшаются в ряду $\mathbf{F}^{O}/\mathbf{G}^{O} > \mathbf{F}^{3'N}/\mathbf{G}^{O} > \mathbf{F}^{N}/\mathbf{G}^{O} > \mathbf{F}^{S}/\mathbf{G}^{O}$ (рис. 107*a*). Интересно отметить, что N3'-P5'-фосфорамидная межнуклеотидная связь 1b в ДНК-дуплексе $\mathbf{F}^{3'N}/\mathbf{G}^{O}$ расщепляется примерно в 30 раз медленнее, чем фосфодиэфирная связь 1a в нативном ДНК-дуплексе $\mathbf{F}^{O}/\mathbf{G}^{O}$. В то же время динуклеотиды, содержащие тиофосфат 1c или фосфорамид 1d, расщепляются более чем на три порядка медленнее немодифицированного динуклеотида. Таким образом, данные

типы модификаций фосфатной группы в составе дуплексов олигонуклеотидов могут быть использованы для связывания и ингибирования активности фермента APE1.

Сокращенное название	Последовательность олигонуклеотида и сайт
	модификации
$F^{0}, X = O, Y = O^{-}, Z = O^{-}$	Q F
$\mathbf{F}^{3'N}$, X = NH, Y = O ⁻ , Z = O ⁻	
F^{S} , X = O, Y = S ⁻ , Z = O ⁻	
F^{SS} , X = O, Y = S ⁻ , Z = S ⁻	Y Y Q
$\mathbf{F}^{\mathbf{N}}, \mathbf{X} = \mathbf{O}, \mathbf{Y} = \mathbf{NH}_2, \mathbf{Z} = \mathbf{O}^-$	
\mathbf{F}^{NB} , X = O, Y = NH ₂ , Z = Tmg*	
$\mathbf{F}^{\mathbf{BB}}, \mathbf{X} = \mathbf{O}, \mathbf{Y} = \mathrm{Tmg}, \mathbf{Z} = \mathrm{Tmg}$	Z
$\mathbf{G}^{0}, \mathbf{Z} = \mathbf{O}$	0
$\mathbf{G}^{\mathbf{S}}, \mathbf{Z} = \mathbf{S}^{-}$	
$\mathbf{G}^{\mathbf{B}}, \mathbf{Z} = \mathrm{Tmg}$	5'-GpGpApApGpGpGpGpApGpApG-0-P-0-A-'3
	Ż

Таблица 31. Модификации фосфатной группы, использованные в работе

* Tmg –тетраметилгуанидиновая группа N=C(NMe₂)₂.

Таким образом, эндонуклеазная активность АРЕ1 значительно снижена по одношению к ДНК-дуплексам, содержащим модифицированные фосфатные группы с 5'стороны от F-сайта. Однако анализ продуктов расщепления данных дуплексов после выдерживания реакционных смесей более 12 ч свидетельствовал о протекании 3'-5'экзонуклеазного отщепления З'-концевого нуклеотида. Для того, чтобы уменьшить 3'-концевого нуклеотида, в олигонуклеотидах скорость отщепления была модифицирована межнуклеотидная фосфатная группа, ближайшая к 3'-концу (таблица 31). В качестве защитной модификации использовали тетраметилфосфорилгуанидиновую группу (Tmg) [506]. Было показано, что такая модификация приводит к блокированию 3'-5'-экзонуклеазной активности фермента АРЕ1 в интервале времени более 12 ч. Кроме того, Tmg была протестирована как защитная модификация фосфатной группы с 5'стороны от F-сайта 1e (рис. 106). Данные, полученные методом разделения продуктов реакции в ПААГ, показали, что дуплекс, содержащий динуклеотид 1е, обладает высокой устойчивостью к действию эндонуклеазной активности фермента АРЕ1 в течение 3 ч (рис. 107б).



Рис. 107. Эндонуклеазная активность APE1 при взаимодействии с дуплексами олигонуклеотидов, несущими модифицированную фосфатную группу (*a*) только с 5'-стороны от F-сайта или (*б*) как с 5'-стороны от F-сайта, так и 3'-межнуклеотидную фосфатную группу. [APE1] = [ДНК-дуплекс] = 1,0 мкМ. (*в*) Отностительная эффективность расщепления модифицированных ДНК-дуплексов.

эффективность Для чтобы оценить связывания фермента APE1 того, с модифицированными ДНК-дуплексами регистрировали изменения интенсивности флуоресценции Тгр (рис. 108). Уменьшение интенсивности флуоресценции в начальный момент времени (до 0,1 с) характеризует процесс образования фермент-субстратного комплекса, в котором происходит каталитическая реакция расщепления межнуклеотидной фосфатной группы. После чего происходит диссоциация комплекса фермента с продуктом реакции, которая сопровождается ростом интенсивности флуоресценции в интервале времени 0,1–10 с. Как видно из рис. 108, взаимодействие APE1 с дуплексами F^N/G^O и **F^{NB}/G^B** сопровождается только фазой уменьшения интенсивности флуоресценции до 0,1 с, свидетельствующей об образовании фермент субстратного комплекса. В то же время взаимодействие APE1 с дуплексом F^{BB}/G^B не приводит к изменению интенсивности

флуоресценции. Это указывает на то, что объемная Tmg модификация фосфатной группы с 5'-стороны от F-сайта блокирует процесс образования комплекса фермент-ДНК.

Таким образом, полученные данные показывают, что использование объемных заместителей для предотвращения каталитической реакции приводит к потере специфичности фермента и такие модификации не могут быть использованы в ДНК-зондах в непосредственной близости от специфического сайта. Однако такие заместители могут эффективно блокировать экзонуклеазную активность ферментов. Проведенный скрининг модификаций фосфатной группы показал, что они могут быть использованы для повышения устойчивости ДНК-зондов, разрабатываемых для определения активности ферментов репарации в общих лизатах клеток, содержащих неспецифические эндо- и экзонуклеазы.



Рис. 108. Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp при взаимодействии APE1 с модифицированными ДНК-дуплексами. [APE1] = [ДНК-дуплекс] = 1,0 мкМ.

3.5.2. Поиск и разработка соединений, оказывающих влияние на активность ферментов репарации

В связи с тем, что функционирование ферментативных систем репарации ДНК является одним из ключевых факторов в процессах лечения опухолевых заболеваний методами химио- и лучевой терапии, еще одним направлением использования стабильных ДНК-дуплексов, несущих специфический сайт, является селективное ингибирование ферментов репарации ДНК. Поэтому для одного из перспективных ингибиторов фермента APE1, дуплекса $\mathbf{F}^{N}/\mathbf{G}^{O}$, была оценена способность ингибирования реакции расщепления дуплекса $\mathbf{F}^{O}/\mathbf{G}^{O}$. Для этого в реакционную смесь APE1 и $\mathbf{F}^{O}/\mathbf{G}^{O}$ в различных концентрациях добавляли дуплекс $\mathbf{F}^{N}/\mathbf{G}^{O}$. Как видно на рис. 109*а* скорость расщепления немодифицированного субстрата $\mathbf{F}^{O}/\mathbf{G}^{O}$ значительно уменьшалась в присутствии $\mathbf{F}^{N}/\mathbf{G}^{O}$.



Рис. 109. Степень расщепления дуплекса $\mathbf{F}^{\mathbf{O}}/\mathbf{G}^{\mathbf{O}}$ АР-эндонуклеазой АРЕ1 в присутствии дуплексов $\mathbf{F}^{\mathbf{N}}/\mathbf{G}^{\mathbf{O}}$ (*a*) и \mathbf{G}/\mathbf{C} (*b*). (*b*) Зависимость наблюдаемой константы скорости расщепления дуплекса $\mathbf{F}^{\mathbf{O}}/\mathbf{G}^{\mathbf{O}}$ от концентрации дуплексов $\mathbf{F}^{\mathbf{N}}/\mathbf{G}^{\mathbf{O}}$ и \mathbf{G}/\mathbf{C} . [APE1] = [$\mathbf{F}^{\mathbf{O}}/\mathbf{G}^{\mathbf{O}}$] = 1,0 мкМ.

В качестве контроля специфического ингибирования фермента APE1 дуплексом $\mathbf{F}^{N}/\mathbf{G}^{O}$ использовали дуплекс $\mathbf{G}/\mathbf{C}_{13}$, который не содержит модифицированных нуклеотидов. Как видно на рис. 1096, такой дуплекс практически не приводит к уменьшению ферментативной активности APE1. Зависимость наблюдаемой константы скорости расщепления субстрата $\mathbf{F}^{O}/\mathbf{G}^{O}$ от концентрации ингибитора $\mathbf{F}^{N}/\mathbf{G}^{O}$ позволила оценить значение $\mathbf{IC}_{50} = 2,5 \times 10^{-7}$ M (рис. 1096), которое хорошо согласуется с константой ассоциации фермента APE1 с ДНК-дуплексами, несущими F-сайт [492, 493]. При этом для дуплекса $\mathbf{G}/\mathbf{C}_{13}$ величина $\mathbf{IC}_{50} = 8,0 \times 10^{-6}$ M (рис. 1096) и согласуется с величиной константы связывания неспецифического дуплекса [492]. Таким образом, замена атома O в фосфатной группе с 5'-стороны от F-сайта на NH не изменяет сродство фермента APE1 к дуплексу. При этом каталитическая активность APE1 значительно снижена, и фермент может оставаться в комплексе с $\mathbf{F}^{N}/\mathbf{G}^{O}$, что приводит к уменьшению общей ферментативной активности APE1 в реакции. Таким образом, ингибирующая активность

дуплекса $\mathbf{F}^{N}/\mathbf{G}^{O}$ связана со специфическими взаимодействиями фермента APE1 с Fсайтом. Полученные данные свидетельствуют о том, что на величину константы ингибирования в значительно меньшей степени влияют неспецифические взаимодействия с рибозофосфатным остовом ДНК-дуплекса.

Кроме того, в ходе выполнения работ д.ф.-м.н. Ю.Н. Воробьевым проведен рациональный дизайн структур потенциальных ингибиторов 8-оксогуанин-ДНКгликозилазы человека hOGG1. Предлагаемые соединения, являющиеся аналогами гетероциклических оснований нуклеиновых кислот, синтезированы в лаборатории органического синтеза ИХБФМ СО РАН. Библиотеку полученных соединений использовали для определения эффекта ингибирования. Было показано, что 6-амино-4хлоропиразоло[3,4-d]пиримидин является эффективным ингибитором фермента hOGG1 (рис. 110). Концентрация соединения, которая вызывает 50% снижение активности hOGG1, равна 12,5 мкМ. В настоящее время найденное соединение является первым и единственным в мире ингибитором фермента hOGG1.



Рис. 110. Степень ингибирования hOGG1 различными концентрациями 6-амино-4хлоропиразоло[3,4-d]пиримидина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выяснение механизмов узнавания повреждений в ДНК ферментами репарации представляет собой трудную и нетривиальную задачу, требующую применения широкого спектра методов исследования и использования различных подходов.

1. В рамках настоящей работы разработана и апробирована комплексная методология изучения механизмов узнавания повреждений ферментами эксцизионной репарации оснований ДНК, основанная на кинетическом, термодинамическом и мутационном анализах изменений конформации ферментов и ДНК.

Кинетический анализ конформационных изменений ферментов и ДНК при образовании и превращении фермент-субстратных комплексов включал использование методов предстационарной кинетики, поскольку процессы узнавания повреждений являются быстрыми. Конформационные переходы фермента регистрировались по флуоресценции, обусловленной, преимущественно, изменению как собственной присутствием природного набора остатков Тгр в молекуле, так и флуоресценции введенных методом сайт-направленного мутагенеза дополнительных остатков Trp в различные домены молекулы, принимающие участие в специфических белковонуклеиновых взаимодействиях. Чтобы регистрировать конформационные превращения в ДНК-субстратах, использовали модельные ДНК-дуплексы, содержащие флуоресцирующие аналоги азотистых оснований, которые располагались либо с 5'-, 3'стороны от поврежденного нуклеотида, либо в комплементарной цепи напротив повреждения. Проведена апробация различных флуорофоров и их положения в составе ДНК. Кроме того, анализировалось качественное поведение сигнала флуоресцентной метки, позволяющее судить о характере изменения ее окружения. Изгибание ДНКсубстрата при образовании комплекса с ферментом, каталитические стадии реакции и диссоциация комплекса фермент-продукт регистрировались методом FRET, который чувствителен к изменению расстояния между донором и акцептором флуоресценции. В отдельных случаях изгибание спирали ДНК доказывали с помощью метода PELDOR.

Для соотнесения конформационных изменений в ДНК с взаимодействиями конкретных остатков в процессе образования специфических фермент-субстратных комплексов использовали подход постадийного усложнения субстрата, разработанный ранее в работах д.х.н. Г.А. Невинского [387-389]. Переход от неповрежденного дуплекса ДНК, отражающего наиболее простые, неспецифические взаимодействия, к специфическому ДНК-субстрату, характеризующему полный ферментативный цикл, позволил выявить природу взаимодействий между реагирующими молекулами и соотнести их с взаимодействиями конкретных химических групп.

239

Термодинамический анализ основывался на исследовании ферментативных процессов методом остановленной струи с флуориметрической детекцией при различных температурах. Данная методология позволила определить термодинамические параметры ΔH_o и ΔS_o равновесных стадий формирования промежуточных короткоживущих белковонуклеиновых комплексов и интермедиатов из зависимостей ln(K) от l/T по уравнению Вант-Гоффа. Несмотря на общеизвестность самого принципа определения величин ΔH_o и ΔS_o равновесных процессов, в литературе до настоящего времени, за исключением наших работ [369, 407, 507] и работы проф. К.А. Джонсона, опубликованной в 2017 году [508], отсутствовали данные о практическом применении такого подхода к многостадийным быстропротекающим процессам, возможно, вследствие трудоемкости получения и сложности обработки данных.

Мутационный анализ основывался на использовании мутантных форм ферментов (9 мутантных форм для hOGG1, 7 для Nei и 2 для APE1), содержащих замены аминокислотных остатков, входящих в активный центр фермента и участки связывания с субстратом, что позволяло определять функциональную роль этих остатков на различных стадиях превращения фермент-субстратного комплекса.

Масс-спектрометрический анализ интермедиатов ферментативного процесса, катализируемого ферментами Fpg и hOGG1 подтвердил, что скорость-лимитирующей стадией является реакция β-элиминирования фосфатной группы. Более того, регенерация ДНК-гликозилазы Fpg из комплекса с остатком рибозы происходит медленно и также может лимитировать скорость ферментативного процесса в стационарном режиме реакции.

Совокупность полученных использованием данных, с всех подходов И характеризующих конформационные изменения как ферментов и их мутантных форм, так и модельных ДНК-дуплексов, содержащих модификации разной степени специфичности и различные флуорофоры, позволила установить детальные молекулярно-кинетические механизмы узнавания специфических сайтов в ДНК, образования каталитически компетентных комплексов и протекания химических стадий реакции. Разработанная в работе методология может быть распространена для изучения не только ДНКбелок-белковых взаимодействий, процессирующих ферментов, но И а также взаимодействий ферментов с низкомолекулярными субстратами (пептидами, аминокислотами, нуклеотидами и т.д.) или низкомолекулярными соединениями, выступающим в роли ингибиторов или активаторов ферментативных процессов.

2. Проведено систематическое исследование молекулярно-кинетических механизмов процессов, катализируемых рядом про- и эукариотических ферментов эксцизионной

репарации оснований ДНК (hOGG1, Nth, MBD4, MutY, Fpg, Nei, NEIL1 и APE1), ответственных за сохранение стабильности генетической информации живых организмов. Показано, что высокая субстратная специфичность ферментов, относящихся к разным семействам, и дискриминация структурным поврежденных И неповрежденных нуклеотидов обеспечивается в результате последовательной взаимосогласованной подстройки конформаций ферментов и ДНК в составе фермент-субстратных комплексов. B пределах каждого структурного класса определена функциональная роль аминокислотных остатков, входящих в активные центры ферментов. Впервые проведено детальное сравнение про- и эукариотических ДНК-гликозилаз структурных семейств H2tH и HhH-GPD, а также АР-эндонуклеазы, структурно и каталитически отличной от ДНК-гликозилаз, показавшее, что процессы распознавания повреждений ДНК этими ферментами, включающие стадии изгибания ДНК, выворачивания поврежденного нуклеотида и встраивания аминокислотных остатков ферментов в ДНК-дуплекс, имеют общие кинетические и термодинамические особенности.

ДНК-гликозилазы структурного семейства HhH-GPD (hOGG1, Nth, MutY, MBD4)

Ферменты, входящие в структурное семейство HhH-GPD, значительно отличаются, как по размеру, так и по общей компоновке глобулы белка. Такие отличия связаны, в том числе, со специфическими функциями этих ферментов. Так, например, MutY обладает уникальной специфичностью по отношению к охоG/A-паре и образует развитую сеть контактов с обеими цепями ДНК. Фермент MBD4 содержит лишь N-гликозилазный каталитический домен, взаимодействующий, в основном, с поврежденной цепью ДНК. Тем не менее, полученные данные о последовательности стадий образования каталитически компетентных комплексов этими ферментами позволяют выделить общие особенности, указанные ниже. 1) На первом этапе происходит неспецифическое связывание, образование водородных связей между боковыми группами аминокислотных остатков (Arg154 и Arg204 y hOGG1, Arg78 и Arg84 y Nth и, возможно, Arg468 y MBD4) и нуклеотидом, расположенным напротив поврежденного основания, что приводит к дестабилизации уотсон-криковских водородных связей в поврежденном участке ДНКдуплекса. Кроме того, на этой стадии происходит вклинивание аминокислотного остаткасенсора (Tyr203 y hOGG1, Leu81 y Nth, Tyr88 y MutY и, возможно, Leu508 y MBD4) в дестабилизированный остатками аргинина дуплекс ДНК, что приводит к частичному выворачиванию поврежденного основания из цепи ДНК. У hOGG1 частично вывернутое основание образует контакты с His270 и Lys249 (Lys120 y Nth). 2) В случае hOGG1 происходит выворачивание охоGua в карман активного центра фермента с образованием стэкинга с ароматическим кольцом Phe319, окончательное формирование контактов между аминокислотными остатками Arg154, Arg204 и Asn149, которые встраиваются в дуплекс, и основанием Cyt. У Nth в роли этих остатков выступают Arg78, Arg84 и Gln41, a у MutY – Gln48 и, возможно, Arg50 и Arg91. 3) На последнем этапе происходит полное встраивание Tyr203 у hOGG1 (Leu81 у Nth, Tyr88 у MutY и, возможно, Leu508 у MBD4) в двойную спираль ДНК и окончательная подстройка конформации фермент-субстратого для достижения каталитически активного состояния.

ДНК-гликозилазы структурного семейства H2tH (Fpg, Nei, NEIL1)

Последовательные стадии образования каталитически компетентного комплекса ферментами, принадлежащими к структурному семейству H2tH, включают: 1) образование первичного неспецифического комплекса между ферментом и ДНКсубстратом, сопровождающееся локальным «плавлением» ДНК-дуплекса; 2) ранняя стадия узнавания повреждения в дуплексе ДНК путем дополнительной дестабилизации двойной спирали в результате вклинивания аминокислоты-сенсора (Phe110 y Fpg, Leu70 y Nei, Phe119 y NEIL1); 3) изгибание ДНК-дуплекса; 4) выворачивание поврежденного нуклеотида из двойной спирали в активный центр фермента с одновременным встраиванием в дуплекс нескольких аминокислотных остатков, стабилизирующих внеспиральное положение повреждения остатками (Met73 и Arg108 y Fpg, Gln69 и Tyr71 y Nei, Met80 и Arg117 y NEIL1) и 5) компактизация фермент-субстратного комплекса и подстройка структуры активного центра для достижения каталитически компетентного состояния.

АР-эндонуклеаза АРЕ1

Согласно полученным данным, на первой стадии взаимодействия образуются связи между фосфатными группами ДНК-дуплекса с 5'- и 3'-стороны от F-сайта и остатками Arg73, Ala74, Lys78, Trp280, Asn222, Asn226 и Asn229. Кроме того, в этот момент времени, вероятно, остаток Arg177 встраивается в ДНК-дуплекс со стороны большой бороздки, что ведет к образованию водородной связи с фосфатной группой, расположенной с 3'-стороны от F-сайта. Одновременно в ДНК-дуплекс со стороны малой бороздки встраивается остаток Met270. Вторая стадия взаимодействия APE1 с F-субстратом включает выворачивание F-сайта в активный центр фермента и стабилизацию этого состояния с помощью остатков Arg177 и Met270, которые встраиваются в большую и малую бороздки ДНК соответственно. Кроме того, в этот момент происходит образование связей между фосфатной группой, расположенными в активном центре фермента, ведущее к формированию каталитически компетентного состояния.

Изучено влияние одно- и двухзарядных ионов металлов на процесс образования каталитического комплекса и скорость гидролиза фосфодиэфирной связи. Показано, что замена атомов кислорода на серу или аминогруппу в фосфатной группе нуклеотида, расположенного с 5'-стороны от F-сайта, значительно уменьшает скорость ферментативного гидролиза модифицированных олигонуклеотидов.

3. Термодинамический быстропротекающих анализ стадий образования каталитически компетентных состояний ферментов в составе комплексов с поврежденной ДНК для ДНК-гликозилаз, принадлежащих к структурным семействам HhH-GPD и H2tH, и АР-эндонуклеазы показал, что субстратная специфичность ферментов обеспечивается многостадийного образования специфических связей, путем сопряженного с конформационными перестройками, ведущими к последовательной компактизации структуры белково-нуклеинового комплекса. Такое изменение структуры фермента и ДНК требует дополнительных затрат энергии, которые компенсируются за счет роста энтропии системы вследствие десольватации полярных групп в области контакта белок-ДНК и удаления молекул воды из области контактов, в том числе «кристаллической» воды, расположенной в бороздках ДНК.

4. На основании результатов, полученных в ходе исследований, разработан и апробирован высокочувствительный метод определения активности одного из ключевых ферментов репарации ДНК – АРЕ1. Разработанный подход к созданию специфических ДНК-зондов может быть расширен для определения активности других ферментов репарации ДНК, например ДНК-гликозилаз hOGG1, NEIL1 и AAG, выполняющих важную роль при удалении повреждений ДНК, с целью диагностирования уровня репарационно-защитного статуса конкретного организма. Кроме того, специфические ДНК-зонды могут быть использованы для быстрого, поточного поиска низкомолекулярных соединений, оказывающих селективное влияние на активность ферментов репарации ДНК. Ингибиторы данных ферментов могут быть использованы для уменьшения репарационной устойчивости организма и повышения эффективности химиои лучевой терапии, направленной на повреждение ДНК. Найдено низкомолекулярное соединение, являющееся первым и единственным в мире ингибитором важнейшего фермента репарации человека hOGG1.

выводы

1. Разработана комплексная методология изучения механизмов узнавания повреждений про- и эукариотическими ферментами эксцизионной репарации оснований ДНК, основанная на предстационарном кинетическом, термодинамическом и мутационном анализах конформационных изменений ферментов и ДНК-субстратов и включающая:

a) анализ конформационных изменений ферментов по изменению интенсивности флуоресценции остатков Trp ферментов дикого типа, а также мутантных форм ферментов, содержащих дополнительные остатки Trp, введенные методом сайт-направленного мутагенеза;

б) использование для выяснения природы конформационных переходов в молекуле ДНК модельной системы ДНК-субстратов, содержащих флуоресцентные аналоги азотистых оснований и/или FRET-красителей, и основанной на постадийном усложнении их строения;

 в) получение термодинамических параметров быстропротекающих стадий, приводящих к узнаванию поврежденного нуклеотида;

г) использование мутантных форм ферментов, содержащих замены функционально важных аминокислотных остатков, входящих в активный центр или участвующих в связывании субстратов, что позволяет определять их функциональную роль на различных стадиях превращения фермент-субстратных комплексов.

2. С помощью разработанной методологии впервые проведено систематическое исследование широкого круга ферментов репарации ДНК человека и *E.coli*, ДНК-гликозилаз, принадлежащих к разным структурным семействам, а также АР-эндонуклеазы, которая структурно и каталитически отличается от ДНК-гликозилаз (всего 8 ферментов и 18 мутантных форм):

 а) показано, что элементарные акты всех изученных ферментативных процессов сопровождаются взаимосвязанными последовательными конформационными перестройками взаимодействующих молекул;

 б) установлены молекулярно-кинетические механизмы взаимодействия ферментов с ДНК-субстратами;

в) установлены ключевые стадии ферментативных процессов, обеспечивающие высокую субстратную специфичность и ответственные за узнавание поврежденных нуклеотидов в ДНК;

г) определена и детализирована функциональная роль отдельных аминокислотных остатков, входящих в активные центры и участки связывания субстратов.

244

3. При сравнении молекулярно-кинетических механизмов, полученных для про- и эукариотических ДНК-гликозилаз и АР-эндонуклеазы человека, установлено, что ферменты обладают общими кинетическими особенностями распознавания повреждений ДНК, включающими стадии дестабилизации дуплекса, изгибания ДНК, выворачивания поврежденного нуклеотида и встраивания аминокислотных остатков активного центра ферментов в ДНК-дуплекс.

4. Впервые проведен термодинамический анализ быстропротекающих процессов узнавания поврежденного нуклеотида. Сравнение термодинамических параметров равновесных стадий молекулярно-кинетических механизмов, установленных ДЛЯ ферментов hOGG1, Fpg и APE1, позволило выявить общие термодинамические особенности трансформации фермент-субстратных комплексов. включающие десольватацию полярных аминокислотных остатков активного центра, дегидратацию бороздок ДНК и компактизацию структуры комплексов в ходе образования каталитически компетентных состояний.

5. Создана тест-система для определения активности АР-эндонуклеазы человека АРЕ1. Апробирован набор модификаций концевых и межнуклеотидных фосфатных групп, повышающих устойчивость ДНК-зонда. Впервые показано, что 6-амино-4хлоропиразоло[3,4-d]пиримидин является эффективным ингибитором важнейшего фермента репарации человека hOGG1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] E.C. Friedberg, G.C. Walker, W. Siede, R.D. Wood, R.A. Schultz, T. Ellenberger, DNA Repair and Mutagenesis, ASM Press, Washington, 2006.

[2] T. Iyama, D.M. Wilson, 3rd, DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells, DNA Repair (Amst), 12 (2013) 620-636.

[3] S.S. Parikh, C.D. Mol, J.A. Tainer, Base excision repair enzyme family portrait: integrating the structure and chemistry of an entire DNA repair pathway, Structure, 5 (1997) 1543-1550.

[4] L.C.J. Gillet, O.D. Scharer, Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair, Chem. Rev., 106 (2006) 253-276.

[5] R.R. Iyer, A. Pluciennik, V. Burdett, P.L. Modrich, DNA mismatch repair: functions and mechanisms, Chem. Rev., 106 (2006) 302-323.

[6] D.S. Shin, C. Chahwan, J.L. Huffman, J.A. Tainer, Structure and function of the doublestrand break repair machinery, DNA Repair (Amst), 3 (2004) 863-873.

[7] H.E. Krokan, H. Nilsen, F. Skorpen, M. Otterlei, G. Slupphaug, Base excision repair of DNA in mammalian cells, FEBS Lett., 476 (2000) 73-77.

[8] A. Memisoglu, L. Samson, Base excision repair in yeast and mammals, Mutat. Res., 451 (2000) 39-51.

[9] D.M. Wilson III, D. Barsky, The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA, Mutat. Res., 485 (2001) 283-307.

[10] Y. Kubota, R.A. Nash, A. Klungland, P. Schar, D.E. Barnes, T. Lindahl, Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase β and the XRCC1 protein, EMBO J., 15 (1996) 6662-6670.

[11] B. Pascucci, G. Maga, U. Hübscher, M. Bjoras, E. Seeberg, I.D. Hickson, G. Villani, C. Giordano, L. Cellai, E. Dogliotti, Reconstitution of the base excision repair pathway for 7,8dihydro-8-oxoguanine with purified human proteins, Nucleic Acids Res., 30 (2002) 2124-2130.

[12] J.C. Fromme, A. Banerjee, G.L. Verdine, DNA glycosylase recognition and catalysis, Curr.Opin. Struct. Biol., 14 (2004) 43-49.

[13] D.O. Zharkov, G. Shoham, A.P. Grollman, Structural characterization of the Fpg family of DNA glycosylases, DNA Repair (Amst), 2 (2003) 839-862.

[14] L.H. Pearl, Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily, Mutat. Res.,460 (2000) 165-181.

[15] S.C. Brooks, S. Adhikary, E.H. Rubinson, B.F. Eichman, Recent advances in the structural mechanisms of DNA glycosylases, Biochim. Biophys. Acta, 1834 (2013) 247-271.

[16] A.J. Lee, S.S. Wallace, Hide and seek: How do DNA glycosylases locate oxidatively damaged DNA bases amidst a sea of undamaged bases?, Free Radic. Biol. Med., (2016).

[17] A.J. Lee, S.S. Wallace, Visualizing the Search for Radiation-damaged DNA Bases in Real Time, Radiat. Phys. Chem. Oxf. Engl. 1993, 128 (2016) 126-133.

[18] S.S. Wallace, Biological consequences of free radical-damaged DNA bases, Free Radic.Biol. Med., 33 (2002) 1-14.

[19] L.J. Marnett, Oxyradicals and DNA damage, Carcinogenesis, 21 (2000) 361-370.

[20] M. Dizdaroglu, P. Jaruga, M. Birincioglu, H. Rodriguez, Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement, Free Radic. Biol. Med., 32 (2002) 1102-1115.

[21] S. Boiteux, M. Guillet, Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*, DNA Repair (Amst), 3 (2004) 1-12.

[22] B. van Loon, E. Markkanen, U. Hubscher, Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine, DNA Repair (Amst), 9 (2010) 604-616.

[23] K.B. Beckman, B.N. Ames, The free radical theory of aging matures, Physiol. Rev., 78 (1998) 547-581.

[24] M.L. Hamilton, H. Van Remmen, J.A. Drake, H. Yang, Z.M. Guo, K. Kewitt, C.A. Walter,A. Richardson, Does oxidative damage to DNA increase with age?, Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A., 98 (2001) 10469-10474.

[25] E.K. Hudson, B.A. Hogue, N.C. Souza-Pinto, D.L. Croteau, R.M. Anson, V.A. Bohr, R.G. Hansford, Age-associated change in mitochondrial DNA damage, Free Radical Res., 29 (1998) 573-579.

[26] L.P. Candeias, S. Steenken, Reaction of HO* with guanine derivatives in aqueous solution: formation of two different redox-active OH-adduct radicals and their unimolecular transformation reactions. Properties of $G(-H)^*$, Chemistry, 6 (2000) 475-484.

[27] W.L. Neeley, J.M. Essigmann, Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products, Chem. Res. Toxicol., 19 (2006) 491-505.

[28] H. Kasai, S. Nishimura, Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents, Nucleic Acids Res., 12 (1984) 2137-2145.

[29] J. Cadet, M. Berger, T. Douki, J.L. Ravanat, Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biological significance, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 131 (1991) 1-87.

[30] M. Dizdaroglu, Chemical determination of free radical-induced damage to DNA, Free Radic. Biol. Med., 10 (1991) 225-242.

[31] A.R. Collins, Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer, Bioessays, 21 (1999) 238-246.

[32] C. von Sonntag, Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair: A Chemical Perspective, Springer, Berlin - Heidelberg, 2006.

[33] A.A. Kuznetsova, D.G. Knorre, O.S. Fedorova, Oxidation of DNA and its components with reactive oxygen species, Russ. Chem. Rev., 78 (2009) 659-678.

[34] M. Dizdaroglu, P. Jaruga, M. Birincioglu, H. Rodriguez, Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement, Free Radical Bio. Med., 32 (2002) 1102-1115.

[35] M. Dizdaroglu, G. Kirkali, P. Jaruga, Formamidopyrimidines in DNA: Mechanisms of formation, repair, and biological effects, Free Radical Bio. Med., 45 (2008) 1610-1621.

[36] M.S. Cooke, M.D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec, Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, FASEB J., 17 (2003) 1195-1214.

[37] M.L. Hamilton, Z.M. Guo, C.D. Fuller, H. Van Remmen, W.F. Ward, S.N. Austad, D.A. Troyer, I. Thompson, A. Richardson, A reliable assessment of 8-oxo-2-deoxyguanosine levels in nuclear and mitochondrial DNA using the sodium iodide method to isolate DNA, Nucleic Acids Res., 29 (2001) 2117-2126.

[38] S. Uesugi, M. Ikehara, C-13 Magnetic-Resonance Spectra of 8-Substituted Purine Nucleosides - Characteristics Shifts for Syn Conformation, J. Am. Chem. Soc., 99 (1977) 3250-3253.

[39] S. Shibutani, M. Takeshita, A.P. Grollman, Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG, Nature, 349 (1991) 431-434.

[40] A.P. Grollman, M. Moriya, Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within, Trends Genet., 9 (1993) 246-249.

[41] M.L. Wood, M. Dizdaroglu, E. Gajewski, J.M. Essigmann, Mechanistic Studies of Ionizing-Radiation and Oxidative Mutagenesis - Genetic-Effects of a Single 8-Hydroxyguanine (7-Hydro-8-Oxoguanine) Residue Inserted at a Unique Site in a Viral Genome, Biochemistry, 29 (1990) 7024-7032.

[42] M.L. Michaels, J.H. Miller, The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxy-guanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine), J. Bacteriol., 174 (1992) 6321-6325.

[43] L.H. Sanders, J. Sudhakaran, M.D. Sutton, The GO system prevents ROS-induced mutagenesis and killing in Pseudomonas aeruginosa, Fems. Microbiol. Lett., 294 (2009) 89-96.

[44] C. Greenman, P. Stephens, R. Smith, G.L. Dalgliesh, C. Hunter, G. Bignell, H. Davies, J. Teague, A. Butler, S. Edkins, S. O'Meara, I. Vastrik, E.E. Schmidt, T. Avis, S. Barthorpe, G. Bhamra, G. Buck, B. Choudhury, J. Clements, J. Cole, E. Dicks, S. Forbes, K. Gray, K. Halliday, R. Harrison, K. Hills, J. Hinton, A. Jenkinson, D. Jones, A. Menzies, T. Mironenko, J. Perry, K. Raine, D. Richardson, R. Shepherd, A. Small, C. Tofts, J. Varian, T. Webb, S. West, S. Widaa, A. Yates, D.P. Cahill, D.N. Louis, P. Goldstraw, A.G. Nicholson, F. Brasseur, L. Looijenga, B.L. Weber, Y.E. Chiew, A. Defazio, M.F. Greaves, A.R. Green, P. Campbell, E. Birney, D.F.

Easton, G. Chenevix-Trench, M.H. Tan, S.K. Khoo, B.T. Teh, S.T. Yuen, S.Y. Leung, R. Wooster, P.A. Futreal, M.R. Stratton, Patterns of somatic mutation in human cancer genomes, Nature, 446 (2007) 153-158.

[45] T. Lindahl, Instability and decay of the primary structure of DNA, Nature, 362 (1993) 709-715.

[46] T. Lindahl, B. Nyberg, Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid, Biochemistry, 11 (1972) 3610-3618.

[47] J. Nakamura, V.E. Walker, P.B. Upton, S.Y. Chiang, Y.W. Kow, J.A. Swenberg, Highly sensitive apurinic/apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions, Cancer Res., 58 (1998) 222-225.

[48] L.A. Frederico, T.A. Kunkel, B.R. Shaw, A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy, Biochemistry, 29 (1990) 2532-2537.

[49] T. Lindahl, B. Nyberg, Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid, Biochemistry, 13 (1974) 3405-3410.

[50] H.E. Krokan, F. Drablos, G. Slupphaug, Uracil in DNA - occurrence, consequences and repair, Oncogene, 21 (2002) 8935-8948.

[51] P.C. Burcham, Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism, Mutat. Res., 443 (1999) 11-36.

[52] D.T. Beranek, Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents, Mutat. Res., 231 (1990) 11-30.

[53] T.R. O'Connor, S. Boiteux, J. Laval, Ring-opened 7-methylguanine residues in DNA are a block to in vitro DNA synthesis, Nucleic Acids Res., 16 (1988) 5879-5894.

[54] M.D. Evans, M. Dizdaroglu, M.S. Cooke, Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance., Mutat. Res., 567 (2004) 1-61.

[55] Y. Xie, H. Yang, C. Cunanan, K. Okamoto, D. Shibata, J. Pan, D.E. Barnes, T. Lindahl, M. McIlhatton, R. Fishel, J.H. Miller, Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-Ras oncogene in lung tumors, Cancer Res., 64 (2004) 3096-3102.

[56] J. Wan, M.-A. Bae, B.-J. Song, Acetoaminophen-induced accumulation of 8oxodeoxyguanosine through reduction of Ogg1 DNA repair enzyme in C6 glioma cells, Exp. Mol. Med., 36 (2004) 71-77.

[57] Y. Gu, T. Desai, P.L. Gutierrez, A.-L. Lu, Alteration of DNA base excision repair enzymes hMYH and hOGG1 in hydrogen peroxide resistant transformed human breast cells, Med. Sci. Monit., 7 (2001) 861-868.

[58] S. Raha, B.H. Robinson, Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing, Trends Biochem. Sci., 25 (2000) 502-508.

[59] Z. Radak, Z. Bori, E. Koltai, I.G. Fatouros, A.Z. Jamurtas, I.I. Douroudos, G. Terzis, M.G. Nikolaidis, A. Chatzinikolaou, A. Sovatzidis, S. Kumagai, H. Naito, I. Boldogh, Age-dependent changes in 8-oxoguanine-DNA glycosylase activity are modulated by adaptive responses to physical exercise in human skeletal muscle, Free Radical Bio. Med., 51 (2011) 417-423.

[60] G.S. Leandro, P. Sykora, V.A. Bohr, The impact of base excision DNA repair in age-related neurodegenerative diseases, Mutat. Res.-Fund. Mol. M., 776 (2015) 31-39.

[61] F. Coppede, L. Migliore, DNA damage in neurodegenerative diseases, Mutat. Res.-Fund. Mol. M., 776 (2015) 84-97.

[62] M.L. Dodson, M.L. Michaels, R.S. Lloyd, Unified catalytic mechanism for DNA glycosylases, J. Biol. Chem., 269 (1994) 32709-32712.

[63] M.L. Dodson, R.S. Lloyd, Mechanistic comparison among base exision repair glycosylases, Free Radic. Biol. Med., 32 (2002) 678-682.

[64] D.O. Zharkov, Base excision DNA repair, Cell Mol. Life Sci., 65 (2008) 1544-1565.

[65] B. Demple, J.-S. Sung, Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair, DNA Repair (Amst), 4 (2005) 1442-1449.

[66] E. Trushina, C.T. McMurray, Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases, Neuroscience, 145 (2007) 1233-1248.

[67] M.S. Cooke, M.D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec, Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, FASEB J., 17 (2003) 1195-1214.

[68] M.D. Evans, M. Dizdaroglu, M.S. Cooke, Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance, Mutat. Res., 567 (2004) 1-61.

[69] M.W. Germann, C.N. Johnson, A.M. Spring, Recognition of damaged DNA: structure and dynamic markers, Med. Res. Rev., 32 (2012) 659-683.

[70] B.J. Glassner, G. Weeda, J.M. Allan, J.L. Broekhof, N.H. Carls, I. Donker, B.P. Engelward,R.J. Hampson, R. Hersmus, M.J. Hickman, R.B. Roth, H.B. Warren, M.M. Wu, J.H.Hoeijmakers, L.D. Samson, DNA repair methyltransferase (Mgmt) knockout mice are sensitiveto the lethal effects of chemotherapeutic alkylating agents, Mutagenesis, 14 (1999) 339-347.

[71] A. Klungland, I. Rosewell, S. Hollenbach, E. Larsen, G. Daly, B. Epe, E. Seeberg, T. Lindahl, D.E. Barnes, Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96 (1999) 13300-13305.

[72] J.L. Parsons, R.H. Elder, DNA N-glycosylase deficient mice: a tale of redundancy, Mutat.Res., 531 (2003) 165-175.

[73] H. Nilsen, I. Rosewell, P. Robins, C.F. Skjelbred, S. Andersen, G. Slupphaug, G. Daly, H.E. Krokan, T. Lindahl, D.E. Barnes, Uracil-DNA glycosylase (UNG)-deficient mice reveal a primary role of the enzyme during DNA replication, Mol. Cell, 5 (2000) 1059-1065.

[74] H. Fung, B. Demple, A vital role for Ape1/Ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells, Mol. Cell, 17 (2005) 463-470.

[75] D.R. Denver, S.L. Swenson, M. Lynch, An evolutionary analysis of the helix-hairpin-helix superfamily of DNA repair glycosylases, Mol. Biol. Evol., 20 (2003) 1603-1611.

[76] A.J. Doherty, L.C. Serpell, C.P. Ponting, The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA, Nucleic Acids Res., 24 (1996) 2488-2497.

[77] N. Schormann, R. Ricciardi, D. Chattopadhyay, Uracil-DNA glycosylases-Structural and functional perspectives on an essential family of DNA repair enzymes, Protein Sci., 23 (2014) 1667-1685.

[78] D.O. Zharkov, A.P. Grollman, The DNA trackwalkers: principles of lesion search and recognition by DNA glycosylases, Mutat. Res., 577 (2005) 24-54.

[79] J.E.A. Wibley, T.R. Waters, K. Haushalter, G.L. Verdine, L.H. Pearl, Structure and specificity of the vertebrate anti-mutator uracil-DNA glycosylase SMUG1, Mol. Cell, 11 (2003) 1647-1659.

[80] J.L. Huffman, O. Sundheim, J.A. Tainer, DNA base damage recognition and removal: new twists and grooves, Mutat. Res., 577 (2005) 55-76.

[81] K. Hitomi, S. Iwai, J.A. Tainer, The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: implications for DNA damage recognition, removal, and repair, DNA Repair (Amst), 6 (2007) 410-428.

[82] T. Hollis, Y. Ichikawa, T. Ellenberger, DNA bending and a flip-out mechanism for base excision by the helix-hairpin-helix DNA glycosylase, *Escherichia coli* AlkA, EMBO J., 19 (2000) 758-766.

[83] H. Hashimoto, X. Zhang, X. Cheng, Excision of thymine and 5-hydroxymethyluracil by the MBD4 DNA glycosylase domain: structural basis and implications for active DNA demethylation, Nucleic Acids Res., 40 (2012) 8276-8284.

[84] S. Morera, I. Grin, A. Vigouroux, S. Couve, V. Henriot, M. Saparbaev, A.A. Ishchenko, Biochemical and structural characterization of the glycosylase domain of MBD4 bound to thymine and 5-hydroxymethyuracil-containing DNA, Nucleic Acids Res., 40 (2012) 9917-9926.

[85] A.-L. Lu, D.S. Yuen, J. Cillo, Catalytic mechanism and DNA substrate recognition of *Escherichia coli* MutY protein, J. Biol. Chem., 271 (1996) 24138-24143.

[86] S.D. Williams, S.S. David, Evidence that MutY is monofunctional glycosylase capable of forming a covalent Schiff base intermediate with substrate DNA, Nucleic Acids Res., 26 (1998) 5123-5133.

[87] S.D. Williams, S.S. David, Formation of a Schiff base intermediate is not required for the adenine glycosylase activity of *Escherichia coli* MutY, Biochemistry, 38 (1999) 15417-15424.

[88] J.J. Tsaiwu, H.F. Liu, A.L. Lu, *Escherichia coli* Muty Protein Has Both N-Glycosylase and Apurinic Apyrimidinic Endonuclease Activities on a-Circle-C and a-Circle-G Mispairs, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89 (1992) 8779-8783.

[89] P.M. Wright, J. Yu, J. Cillo, A.-L. Lu, The active site of the *Escherichia coli* MutY DNA adenine glycosylase, J. Biol. Chem., 274 (1999) 29011-29018.

[90] R.C. Manuel, K. Hitomi, A.S. Arvai, P.G. House, A.J. Kurtz, M.L. Dodson, A.K. McCullough, J.A. Tainer, R.S. Lloyd, Reaction intermediates in the catalytic mechanism of *Escherichia coli* MutY DNA glycosylase, J. Biol. Chem., 279 (2004) 46930-46939.

[91] D.O. Zharkov, A.P. Grollman, MutY DNA glycosylase: base release and intermediate complex formation, Biochemistry, 37 (1998) 12384-12394.

[92] S.S. David, S.D. Williams, Chemistry of glycosylases and endonucleases involved in baseexcision repair, Chem. Rev., 98 (1998) 1221-1261.

[93] J. Cadet, A.G. Bourdat, C. D'Ham, V. Duarte, D. Gasparutto, A. Romieu, J.L. Ravanat, Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes, Mutat. Res.-Rev. Mutat., 462 (2000) 121-128.

[94] S.D. Williams, S.S. David, A single engineered point mutation in the adenine glycosylase MutY confers bifunctional glycosylase/AP lyase activity, Biochemistry, 39 (2000) 10098-10109.

[95] M. Radman, Endonuclease from *Escherichia coli* That Introduces Single Polynucleotide Chain Scissions in Ultraviolet-Irradiated DNA, J. Biol. Chem., 251 (1976) 1438-1445.

[96] A. Katafuchi, T. Nakano, A. Masaoka, H. Terato, S. Iwai, F. Hanaoka, H. Ide, Differential specificity of human and *Escherichia coli* endonuclease III and VIII homologues for oxidative base lesions, J. Biol. Chem., 279 (2004) 14464-14471.

[97] M. Dizdaroglu, C. Bauche, H. Rodriguez, J. Laval, Novel substrates of *Escherichia coli* nth protein and its kinetics for excision of modified bases from DNA damaged by free radicals, Biochemistry, 39 (2000) 5586-5592.

[98] M. Dizdaroglu, B. Karahalil, S. Senturker, T.J. Buckley, T. Roldan-Arjona, Excision of products of oxidative DNA base damage by human NTH1 protein, Biochemistry, 38 (1999) 243-246.
[99] L. Eide, L. Luna, E.C. Gustad, P.T. Henderson, J.M. Essigmann, B. Demple, E. Seeberg, Human endonuclease III acts preferentially on DNA damage opposite guanine residues in DNA, Biochemistry, 40 (2001) 6653-6659.

[100] K. Asagoshi, H. Odawara, H. Nakano, T. Miyano, H. Terato, Y. Ohyama, S. Seki, H. Ide, Comparison of substrate specificities of *Escherichia coli* endonuclease III and its mouse homologue (mNTH1) using defined oligonucleotide substrates, Biochemistry, 39 (2000) 11389-11398.

[101] M. Dizdaroglu, J. Laval, S. Boiteux, Substrate specificity of the *Escherichia coli* endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals, Biochemistry, 32 (1993) 12105-12111.

[102] Z. Hatahet, Y.W. Kow, A.A. Purmal, R.P. Cunningham, S.S. Wallace, New substrates for old enzymes. 5-Hydroxy-2'-deoxycytidine and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine are substrates for *Escherichia coli* endonuclease III and formamidopyrimidine DNA N-glycosylase, while 5-hydroxy-2'-deoxyuridine is a substrate for uracil DNA N-glycosylase, J. Biol. Chem., 269 (1994) 18814-18820.

[103] M. Takao, S. Kanno, K. Kobayashi, Q.M. Zhang, S. Yonei, G.T.J. van der Horst, A. Yasui, A back-up glycosylase in Nth1 knock-out mice is a functional Nei (endonuclease VIII) homologue, J. Biol. Chem., 277 (2002) 42205-42213.

[104] M.T.A. Ocampo, W. Chaung, D.R. Marenstein, M.K. Chan, A. Altamirano, A.K. Basu,R.J. Boorstein, R.P. Cunningham, G.W. Teebor, Targeted deletion of mNth1 reveals a novelDNA repair enzyme activity, Mol. Cell Biol., 22 (2002) 6111-6121.

[105] R. Lu, H.M. Nash, G.L. Verdine, A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer, Curr. Biol., 7 (1997) 397-407.

[106] H. Aburatani, Y. Hippo, T. Ishida, R. Takashima, C. Matsuba, T. Kodama, M. Takao, A. Yasui, K. Yamamoto, M. Asano, Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue, Cancer Res., 57 (1997) 2151-2156.

[107] T.A. Rosenquist, D.O. Zharkov, A.P. Grollman, Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94 (1997) 7429-7434.

[108] T. Roldán-Arjona, Y.F. Wei, K.C. Carter, A. Klungland, C. Anselmino, R.P. Wang, M. Augustus, T. Lindahl, Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94 (1997) 8016-8020.

[109] J.P. Radicella, C. Dherin, C. Desmaze, M.S. Fox, S. Boiteux, Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94 (1997) 8010-8015.

[110] K. Nishioka, T. Ohtsubo, H. Oda, T. Fujiwara, D. Kang, K. Sugimachi, Y. Nakabeppu, Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs, Mol. Biol. Cell., 10 (1999) 1637-1652.

[111] S. Boiteux, J.P. Radicella, The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis, Arch. Biochem. Biophys., 377 (2000) 1-8.

[112] B. Karahalil, P.M. Girard, S. Boiteux, M. Dizdaroglu, Substrate specificity of the Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: excision of guanine lesions produced in DNA by ionizing radiation- or hydrogen peroxide/metal ion-generated free radicals, Nucleic Acids Res., 26 (1998) 1228-1232.

[113] J.C. Fromme, S.D. Bruner, W. Yang, M. Karplus, G.L. Verdine, Product-assisted catalysis in base-excision DNA repair, Nat. Struct. Biol., 10 (2003) 204-211.

[114] K. Asagoshi, T. Yamada, H. Terato, Y. Ohyama, Y. Monden, T. Arai, S. Nishimura, H. Aburatani, T. Lindahli, H. Ide, Distinct repair activities of human 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase and formamidopyrimidine DNA glycosylase for formamidopyrimidine and 7,8-dihydro-8-oxoguanine, J. Biol. Chem., 275 (2000) 4956-4964.

[115] P.M. Girard, N. Guibourt, S. Boiteux, The Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: a 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase/AP lyase whose lysine 241 is a critical residue for catalytic activity, Nucleic Acids Res., 25 (1997) 3404-3411.

[116] D.O. Zharkov, T.A. Rosenquist, S.E. Gerchman, A.P. Grollman, Substrate specificity and reaction mechanism of murine 8-oxoguanine-DNA glycosylase, J. Biol. Chem., 275 (2000) 28607-28617.

[117] N.A. Kuznetsov, V.V. Koval, D.O. Zharkov, G.A. Nevinsky, K.T. Douglas, O.S. Fedorova, Kinetics of substrate recognition and cleavage by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase, Nucleic Acids Res., 33 (2005) 3919-3931.

[118] L. Chen, K.A. Haushalter, C.M. Lieber, G.L. Verdine, Direct visualization of a DNA glycosylase searching for damage, Chem. Biol., 9 (2002) 345-350.

[119] M. Bjoras, L. Luna, B. Johnsen, E. Hoff, T. Haug, T. Rognes, E. Seeberg, Opposite basedependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8oxoguanine and abasic sites, EMBO J., 16 (1997) 6314-6322. [120] N.A. Kuznetsov, V.V. Koval, G.A. Nevinsky, K.T. Douglas, D.O. Zharkov, O.S. Fedorova, Kinetic conformational analysis of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase, J. Biol. Chem., 282 (2007) 1029-1038.

[121] S.D. Bruner, D.P. Norman, G.L. Verdine, Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA, Nature, 403 (2000) 859-866.

[122] K.G. Au, M. Cabrera, J.H. Miller, P. Modrich, *Escherichia coli* Muty Gene-Product Is Required for Specific a-G-]C.G Mismatch Correction, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85 (1988) 9163-9166.

[123] M.L. Michaels, C. Cruz, A.P. Grollman, J.H. Miller, Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89 (1992) 7022-7025.

[124] R.G. Fowler, S.J. White, C. Koyama, S.C. Moore, R.L. Dunn, R.M. Schaaper, Interactions among the *Escherichia coli* mutT, mutM, and mutY damage prevention pathways, DNA Repair (Amst), 2 (2003) 159-173.

[125] A.-L. Lu, J.-J. Tsai-Wu, J. Cillo, DNA determinants and substrate specificities of *Escherichia coli* MutY, J. Biol. Chem., 270 (1995) 23582-23588.

[126] N.V. Bulychev, C.V. Varaprasad, G. Dorman, J.H. Miller, M. Eisenberg, A.P. Grollman,F. Johnson, Substrate specificity of *Escherichia coli* MutY protein, Biochemistry, 35 (1996) 13147-13156.

[127] M.L. Michaels, J. Tchou, A.P. Grollman, J.H. Miller, A repair system for 8-oxo-7,8dihydrodeoxyguanine, Biochemistry, 31 (1992) 10964-10968.

[128] M. Saparbaev, J. Laval, Excision of hypoxanthine from DNA containing dIMP residues by the *Escherichia coli*, yeast, rat, and human alkylpurine DNA glycosylases, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91 (1994) 5873-5877.

[129] M. Saparbaev, K. Kleibl, J. Laval, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, rat and human 3-methyladenine DNA glycosylases repair 1,N6-ethenoadenine when present in DNA, Nucleic Acids Res., 23 (1995) 3750-3755.

[130] L. Thomas, C.H. Yang, D.A. Goldthwait, Two DNA glycosylases in *Escherichia coli* which release primarily 3-methyladenine, Biochemistry, 21 (1982) 1162-1169.

[131] C.A. Carter, Y. Habraken, D.B. Ludlum, Release of 7-alkylguanines from haloethylnitrosourea-treated DNA by *E. coli* 3-methyladenine-DNA glycosylase II, Biochem. Bioph. Res. Co., 155 (1988) 1261-1265.

[132] T.V. McCarthy, P. Karran, T. Lindahl, Inducible repair of O-alkylated DNA pyrimidines in *Escherichia coli*, EMBO J., 3 (1984) 545-550.

[133] S. Bjelland, N.K. Birkeland, T. Benneche, G. Volden, E. Seeberg, DNA glycosylase activities for thymine residues oxidized in the methyl group are functions of the AlkA enzyme in *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 269 (1994) 30489-30495.

[134] A. Masaoka, H. Terato, M. Kobayashi, A. Honsho, Y. Ohyama, H. Ide, Enzymatic repair of 5-formyluracil. I. Excision of 5-formyluracil site-specifically incorporated into oligonucleotide substrates by alka protein (*Escherichia coli* 3-methyladenine DNA glycosylase II), J. Biol. Chem., 274 (1999) 25136-25143.

[135] D. Gasparutto, C. Dherin, S. Boiteux, J. Cadet, Excision of 8-methylguanine sitespecifically incorporated into oligonucleotide substrates by the AlkA protein of *Escherichia coli*, DNA Repair (Amst), 1 (2002) 437-447.

[136] A.Y. Lau, M.D. Wyatt, B.J. Glassner, L.D. Samson, T. Ellenberger, Molecular basis for discriminating between normal and damaged bases by the human alkyladenine glycosylase, AAG, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97 (2000) 13573-13578.

[137] Y. Yamagata, M. Kato, K. Odawara, Y. Tokuno, Y. Nakashima, N. Matsushima, K. Yasumura, K. Tomita, K. Ihara, Y. Fujii, Y. Nakabeppu, M. Sekiguchi, S. Fujii, Threedimensional structure of a DNA repair enzyme, 3-methyladenine DNA glycosylase II, from *Escherichia coli*, Cell, 86 (1996) 311-319.

[138] K.G. Berdal, R.F. Johansen, E. Seeberg, Release of normal bases from intact DNA by a native DNA repair enzyme, The EMBO journal, 17 (1998) 363-367.

[139] P.J. O'Brien, T. Ellenberger, The *Escherichia coli* 3-methyladenine DNA glycosylase AlkA has a remarkably versatile active site, J. Biol. Chem., 279 (2004) 26876-26884.

[140] B. Hang, B. Singer, G.P. Margison, R.H. Elder, Targeted deletion of alkylpurine-DNA-N-glycosylase in mice eliminates repair of 1,N6-ethenoadenine and hypoxanthine but not of 3,N4-ethenocytosine or 8-oxoguanine, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94 (1997) 12869-12874.

[141] B. Singer, A. Antoccia, A.K. Basu, M.K. Dosanjh, H. Fraenkel-Conrat, P.E. Gallagher, J.T. Kusmierek, Z.H. Qiu, B. Rydberg, Both purified human 1,N6-ethenoadenine-binding protein and purified human 3-methyladenine-DNA glycosylase act on 1,N6-ethenoadenine and 3-methyladenine, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89 (1992) 9386-9390.

[142] J. Labahn, O.D. Schärer, A. Long, K. Ezaz-Nikpay, G.L. Verdine, T.E. Ellenberger, Structural basis for the excision repair of alkylation-damaged DNA, Cell., 86 (1996) 321-329.

[143] F. Petronzelli, A. Riccio, G.D. Markham, S.H. Seeholzer, M. Genuardi, M. Karbowski, A.T. Yeung, Y. Matsumoto, A. Bellacosa, Investigation of the substrate spectrum of the human mismatch-specific DNA N-glycosylase MED1 (MBD4): fundamental role of the catalytic domain, J. Cell Physiol., 185 (2000) 473-480.

[144] S. Cortellino, D. Turner, V. Masciullo, F. Schepis, D. Albino, R. Daniel, A.M. Skalka, N.J. Meropol, C. Alberti, L. Larue, A. Bellacosa, The base excision repair enzyme MED1 mediates DNA damage response to antitumor drugs and is associated with mismatch repair system integrity, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100 (2003) 15071-15076.

[145] Y. Guan, R.C. Manuel, A.S. Arvai, S.S. Parikh, C.D. Mol, J.H. Miller, R.S. Lloyd, J.A. Tainer, MutY catalytic core, mutant and bound adenine structures define specificity for DNA repair enzyme superfamily, Nat. Struct. Biol., 5 (1998) 1058-1064.

[146] S.L. Porello, M.J. Cannon, S.S. David, A substrate recognition role for the [4Fe-4S](2+) cluster of the DNA repair glycosylase MutY, Biochemistry, 37 (1998) 6465-6475.

[147] T.J. Begley, B.J. Haas, J. Noel, A. Shekhtman, W.A. Williams, R.P. Cunningham, A new member of the endonuclease III family of DNA repair enzymes that removes methylated purines from DNA, Curre. Biol., 9 (1999) 653-656.

[148] T.E. Messick, N.H. Chmiel, M.P. Golinelli, M.R. Langer, L. Joshua-Tor, S.S. David, Noncysteinyl coordination to the [4Fe-4S](2+) cluster of the DNA repair adenine glycosylase MutY introduced via site-directed mutagenesis. Structural characterization of an unusual histidinyl-coordinated cluster, Biochemistry, 41 (2002) 3931-3942.

[149] M.P. Golinelli, N.H. Chmiel, S.S. David, Site-directed mutagenesis of the cysteine ligands to the [4Fe-4S] cluster of *Escherichia coli* MutY, Biochemistry, 38 (1999) 6997-7007.

[150] C.L. Chepanoske, M.P. Golinelli, S.D. Williams, S.S. David, Positively charged residues within the iron-sulfur cluster loop of *E. coli* MutY participate in damage recognition and removal, Arch. Biochem. Biophys., 380 (2000) 11-19.

[151] S.S. Wallace, V. Bandaru, S.D. Kathe, J.P. Bond, The enigma of endonuclease VIII, DNA Repair (Amst), 2 (2003) 441-453.

[152] J. Tchou, H. Kasai, S. Shibutani, M.H. Chung, J. Laval, A.P. Grollman, S. Nishimura, 8oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88 (1991) 4690-4694.

[153] M.H. Chung, H. Kasai, D.S. Jones, H. Inoue, H. Ishikawa, E. Ohtsuka, S. Nishimura, An Endonuclease Activity of *Escherichia coli* That Specifically Removes 8-Hydroxyguanine Residues from DNA, Mutat. Res., 254 (1991) 1-12.

[154] D. Jiang, Z. Hatahet, R.J. Melamede, Y.W. Kow, S.S. Wallace, Characterization of *Escherichia coli* endonuclease VIII, J. Biol. Chem., 272 (1997) 32230-32239.

[155] T.K. Hazra, T. Izumi, I. Boldogh, B. Imhoff, Y.W. Kow, P. Jaruga, M. Dizdaroglu, S. Mitra, Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99 (2002) 3523-3528.

[156] I. Morland, V. Rolseth, L. Luna, T. Rognes, M. Bjoras, E. Seeberg, Human DNA glycosylases of the bacterial Fpg/MutM superfamily: an alternative pathway for the repair of 8-oxoguanine and other oxidation products in DNA, Nucleic Acids Res., 30 (2002) 4926-4936.

[157] И.Р. Грин, Д.О. Жарков Эукариотические гомологи эндонуклеазы VIII: новые элементы системы эксцизонной репарации оснований ДНК, Биохимия, 76 (2011) 99-114.

[158] V. Bandaru, S. Sunkara, S.S. Wallace, J.P. Bond, A novel human DNA glycosylase that removes oxidative DNA damage and is homologous to *Escherichia coli* endonuclease VIII, DNA Repair (Amst), 1 (2002) 517-529.

[159] T.K. Hazra, Y.W. Kow, Z. Hatahet, B. Imhoff, I. Boldogh, S.K. Mokkapati, S. Mitra, T. Izumi, Identification and characterization of a novel human DNA glycosylase for repair of cytosine-derived lesions, J. Biol. Chem., 277 (2002) 30417-30420.

[160] H. Miller, A.S. Fernandes, E. Zaika, M.M. McTigue, M.C. Torres, M. Wente, C.R. Iden, A.P. Grollman, Stereoselective excision of thymine glycol from oxidatively damaged DNA, Nucleic Acids Res., 32 (2004) 338-345.

[161] P. Jaruga, M. Birincioglu, T.A. Rosenquist, M. Dizdaroglu, Mouse NEIL1 protein is specific for excision of 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine and 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine from oxidatively damaged DNA, Biochemistry, 43 (2004) 15909-15914.

[162] I.R. Grin, G.L. Dianov, D.O. Zharkov, The role of mammalian NEIL1 protein in the repair of 8-oxo-7,8-dihydroadenine in DNA, FEBS Lett., 584 (2010) 1553-1557.

[163] H. Dou, S. Mitra, T.K. Hazra, Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2, J. Biol. Chem., 278 (2003) 49679-49684.

[164] J.P. Hu, N.C. de Souza-Pinto, K. Haraguchi, B.A. Hogue, P. Jaruga, M.M. Greenberg, M. Dizdaroglu, V.A. Bohr, Repair of formamidopyrimidines in DNA involves different glycosylases - Role of the OGG1, NTH1, and NEIL1 enzymes, J. Biol. Chem., 280 (2005) 40544-40551.

[165] T.A. Rosenquist, E. Zaika, A.S. Fernandes, D.O. Zharkov, H. Miller, A.P. Grollman, The novel DNA glycosylase, NEIL1, protects mammalian cells from radiation-mediated cell death, DNA Repair (Amst), 2 (2003) 581-591.

[166] M.T. Ocampo-Hafalla, A. Altamirano, A.K. Basu, M.K. Chan, J.E.A. Ocampo, A. Cummings, R.J. Boorstein, R.P. Cunningham, G.W. Teebor, Repair of thymine glycol by hNth1 and hNeil1 is modulated by base pairing and cis-trans epimerization, DNA Repair (Amst), 5 (2006) 444-454.

[167] Q.M. Zhang, S. Yonekura, M. Takao, A. Yasui, H. Sugiyama, S. Yonei, DNA glycosylase activities for thymine residues oxidized in the methyl group are functions of the hNEIL1 and hNTH1 enzymes in human cells, DNA Repair (Amst), 4 (2005) 71-79.

[168] X. Zhao, N. Krishnamurthy, C.J. Burrows, S.S. David, Mutation versus repair: NEIL1 removal of hydantoin lesions in single-stranded, bulge, bubble, and duplex DNA contexts, Biochemistry, 49 (2010) 1658-1666.

[169] N. Krishnamurthy, X. Zhao, C.J. Burrows, S.S. David, Superior removal of hydantoin lesions relative to other oxidized bases by the human DNA glycosylase hNEIL1, Biochemistry, 47 (2008) 7137-7146.

[170] M.K. Hailer, P.G. Slade, B.D. Martin, T.A. Rosenquist, K.D. Sugden, Recognition of the oxidized lesions spiroiminodihydantoin and guanidinohydantoin in DNA by the mammalian base excision repair glycosylases NEIL1 and NEIL2, DNA Repair (Amst), 4 (2005) 41-50.

[171] M. Redrejo-Rodriguez, C. Saint-Pierre, S. Couve, A. Mazouzi, A.A. Ishchenko, D. Gasparutto, M. Saparbaev, New Insights in the Removal of the Hydantoins, Oxidation Product of Pyrimidines, via the Base Excision and Nucleotide Incision Repair Pathways, PloS one, 6 (2011).

[172] M.M. Liu, V. Bandaru, J.P. Bond, P. Jaruga, X.B. Zhao, P.P. Christov, C.J. Burrows, C.J. Rizzo, M. Dizdaroglu, S.S. Wallace, The mouse ortholog of NEIL3 is a functional DNA glycosylase in vitro and in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 107 (2010) 4925-4930.

[173] S.Z. Krokeide, J.K. Laerdahl, M. Salah, L. Luna, F.H. Cederkvist, A.M. Fleming, C.J. Burrows, B. Dalhus, M. Bjoras, Human NEIL3 is mainly a monofunctional DNA glycosylase removing spiroimindiohydantoin and guanidinohydantoin, DNA Repair (Amst), 12 (2013) 1159-1164.

[174] M. Liu, S. Doublie, S.S. Wallace, Neil3, the final frontier for the DNA glycosylases that recognize oxidative damage, Mutat. Res., 743-744 (2013) 4-11.

[175] J. Tchou, A.P. Grollman, The catalytic mechanism of Fpg protein. Evidence for a Schiff base intermediate and amino terminus localization of the catalytic site, J. Biol. Chem., 270 (1995) 11671-11677.

[176] A.K. McCullough, M.L. Dodson, R.S. Lloyd, Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures, Annu. Rev. Biochem., 68 (1999) 255-285.

[177] D.O. Zharkov, R.A. Rieger, C.R. Iden, A.P. Grollman, 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., 272 (1997) 5335-5341.

[178] M. Bhagwat, J.A. Gerlt, 3'- and 5'-strand cleavage reactions catalyzed by the Fpg protein from *Escherichia coli* occur via successive β - and δ -elimination mechanisms, respectively, Biochemistry, 35 (1996) 659-665.

[179] R.A. Rieger, M.M. McTigue, J.H. Kycia, S.E. Gerchman, A.P. Grollman, C.R. Iden, Characterization of a cross-linked DNA-endonuclease VIII repair complex by electrospray ionization mass spectrometry, J. Am. Soc. Mass. Spectrom., 11 (2000) 505-515.

[180] E.S. Vik, I. Alseth, M. Forsbring, I.H. Helle, I. Morland, L. Luna, M. Bjoras, B. Dalhus, Biochemical mapping of human NEIL1 DNA glycosylase and AP lyase activities, DNA Repair (Amst), 11 (2012) 766-773.

[181] J.I. Friedman, J.T. Stivers, Detection of damaged DNA bases by DNA glycosylase enzymes, Biochemistry, 49 (2010) 4957-4967.

[182] D.O. Zharkov, G.V. Mechetin, G.A. Nevinsky, Uracil-DNA glycosylase: Structural, thermodynamic and kinetic aspects of lesion search and recognition, Mutat. Res., 685 (2010) 11-20.

[183] H.E. Krokan, R. Standal, G. Slupphaug, DNA glycosylases in the base excision repair of DNA, Biochem. J., 325 (1997) 1-16.

[184] H. Nilsen, M. Otterlei, T. Haug, K. Solum, T.A. Nagelhus, F. Skorpen, H.E. Krokan, Nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylases are generated by alternative splicing and transcription from different positions in the UNG gene, Nucleic Acids Res., 25 (1997) 750-755.

[185] G. Slupphaug, I. Eftedal, B. Kavli, S. Bharati, N.M. Helle, T. Haug, D.W. Levine, H.E. Krokan, Properties of a Recombinant Human Uracil-DNA Glycosylase from the Ung Gene and Evidence That Ung Encodes the Major Uracil-DNA Glycosylase, Biochemistry, 34 (1995) 128-138.

[186] R. Savva, K. Mcauleyhecht, T. Brown, L. Pearl, The Structural Basis of Specific Base-Excision Repair by Uracil-DNA Glycosylase, Nature, 373 (1995) 487-493.

[187] C.D. Mol, A.S. Arvai, G. Slupphaug, B. Kavli, I. Alseth, H.E. Krokan, J.A. Tainer, Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis, Cell, 80 (1995) 869-878.

[188] G. Slupphaug, C.D. Mol, B. Kavli, A.S. Arvai, H.E. Krokan, J.A. Tainer, A nucleotideflipping mechanism from the structure of human uracil-DNA glycosylase bound to DNA, Nature, 384 (1996) 87-92.

[189] S.S. Parikh, C.D. Mol, G. Slupphaug, S. Bharati, H.E. Krokan, J.A. Tainer, Base excision repair initiation revealed by crystal structures and binding kinetics of human uracil-DNA glycosylase with DNA, EMBO J., 17 (1998) 5214-5226.

[190] G.Y. Xiao, M. Tordova, J. Jagadeesh, A.C. Drohat, J.T. Stivers, G.L. Gilliland, Crystal structure of *Escherichia coli* uracil DNA glycosylase and its complexes with uracil and glycerol: Structure and glycosylase mechanism revisited, Proteins, 35 (1999) 13-24.

[191] S.S. Parikh, G. Walcher, G.D. Jones, G. Slupphaug, H.E. Krokan, G.M. Blackburn, J.A. Tainer, Uracil-DNA glycosylase-DNA substrate and product structures: conformational strain promotes catalytic efficiency by coupled stereoelectronic effects, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97 (2000) 5083-5088.

[192] B. Kavli, G. Slupphaug, C.D. Mol, A.S. Arvai, S.B. Petersen, J.A. Tainer, H.E. Krokan, Excision of cytosine and thymine from DNA by mutants of human uracil-DNA glycosylase, EMBO J., 15 (1996) 3442-3447.

[193] O.D. Scharer, J. Jiricny, Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases, Bioessays, 23 (2001) 270-281.

[194] J. Dong, A.C. Drohat, J.T. Stivers, K.W. Pankiewicz, P.R. Carey, Raman spectroscopy of uracil DNA glycosylase-DNA complexes: Insights into DNA damage recognition and catalysis, Biochemistry, 39 (2000) 13241-13250.

[195] S.S. Parikh, C.D. Putnam, J.A. Tainer, Lessons learned from structural results on uracil-DNA glycosylase, Mutat. Res.-DNA Repair, 460 (2000) 183-199.

[196] C.Y. Chen, D.W. Mosbaugh, S.E. Bennett, Mutations at Arginine 276 transform human uracil-DNA glycosylase into a single-stranded DNA-specific uracil-DNA glycosylase, DNA Repair (Amst), 4 (2005) 793-805.

[197] R.M. Werner, Y.L. Jiang, R.G. Gordley, G.J. Jagadeesh, J.E. Ladner, G.Y. Xiao, M. Tordova, G.L. Gilliland, J.T. Stivers, Stressing-out DNA? The contribution of serine-phosphodiester interactions in catalysis by uracil DNA glycosylase, Biochemistry, 39 (2000) 12585-12594.

[198] Y.L. Jiang, J.T. Stivers, Mutational analysis of the base-flipping mechanism of uracil DNA glycosylase, Biochemistry, 41 (2002) 11236-11247.

[199] I. Wong, A.J. Lundquist, A.S. Bernards, D.W. Mosbaugh, Presteady-state analysis of a single catalytic turnover by *Escherichia coli* uracil-DNA glycosylase reveals a "pinch-pull-push" mechanism, J. Biol. Chem., 277 (2002) 19424-19432.

[200] T.E. Barrett, R. Savva, G. Panayotou, T. Barlow, T. Brown, J. Jiricny, L.H. Pearl, Crystal structure of a G : T/U mismatch-specific DNA glycosylase: Mismatch recognition by complementary-strand interactions, Cell, 92 (1998) 117-129.

[201] R.J. O'Neill, O.V. Vorob'eva, H. Shahbakhti, E. Zmuda, A.S. Bhagwat, G.S. Baldwin, Mismatch uracil glycosylase from *Escherichia coli* - A general mismatch or a specific DNA glycosylase?, J. Biol. Chem., 278 (2003) 20526-20532.

[202] S. Cortellino, J.F. Xu, M. Sannai, R. Moore, E. Caretti, A. Cigliano, M. Le Coz, K. Devarajan, A. Wessels, D. Soprano, L.K. Abramowitz, M.S. Bartolomei, F. Rambow, M.R. Bassi, T. Bruno, M. Fanciulli, C. Renner, A.J. Klein-Szanto, Y. Matsumoto, D. Kobi, I.

Davidson, C. Alberti, L. Larue, A. Bellacosa, Thymine DNA Glycosylase Is Essential for Active DNA Demethylation by Linked Deamination-Base Excision Repair, Cell, 146 (2011) 67-79.

[203] A.L. Jacobs, P. Schar, DNA glycosylases: in DNA repair and beyond, Chromosoma, 121 (2012) 1-20.

[204] D. Cortazar, C. Kunz, Y. Saito, R. Steinacher, P. Schar, The enigmatic thymine DNA glycosylase, DNA Repair (Amst), 6 (2007) 489-504.

[205] M.G. Goll, T.H. Bestor, Eukaryotic cytosine methyltransferases, Annu. Rev. Biochem., 74 (2005) 481-514.

[206] S.W. Chan, I.R. Henderson, S.E. Jacobsen, Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*, Nat. Rev. Genet., 6 (2005) 351-360.

[207] J.H. Huh, M.J. Bauer, T.F. Hsieh, R.L. Fischer, Cellular programming of plant gene imprinting, Cell, 132 (2008) 735-744.

[208] J.A. Law, S.E. Jacobsen, Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals, Nat. Rev. Genet., 11 (2010) 204-220.

[209] D. Cortazar, C. Kunz, J. Selfridge, T. Lettieri, Y. Saito, E. MacDougall, A. Wirz, D. Schuermann, A.L. Jacobs, F. Siegrist, R. Steinacher, J. Jiricny, A. Bird, P. Schar, Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability, Nature, 470 (2011) 419-U210.

[210] K. Rai, I.J. Huggins, S.R. James, A.R. Karpf, D.A. Jones, B.R. Cairns, DNA Demethylation in Zebrafish Involves the Coupling of a Deaminase, a Glycosylase, and Gadd45, Cell, 135 (2008) 1201-1212.

[211] M. Tahiliani, K.P. Koh, Y.H. Shen, W.A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L.M. Iyer, D.R. Liu, L. Aravind, A. Rao, Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1, Science, 324 (2009) 930-935.

[212] S. Ito, A.C. D'Alessio, O.V. Taranova, K. Hong, L.C. Sowers, Y. Zhang, Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification, Nature, 466 (2010) 1129-U1151.

[213] S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S.C. Wu, L.B. Collins, J.A. Swenberg, C. He, Y. Zhang, Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine, Science, 333 (2011) 1300-1303.

[214] H. Wu, Y. Zhang, Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation, Genes Dev., 25 (2011) 2436-2452.

[215] A. Maiti, A.C. Drohat, Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites, J. Biol. Chem., 286 (2011) 35334-35338.

[216] L. Zhang, X. Lu, J. Lu, H. Liang, Q. Dai, G.L. Xu, C. Luo, H. Jiang, C. He, Thymine DNA glycosylase specifically recognizes 5-carboxylcytosine-modified DNA, Nat. Chem. Biol., 8 (2012) 328-330.

[217] A. Maiti, M.T. Morgan, E. Pozharski, A.C. Drohat, Crystal structure of human thymine DNA glycosylase bound to DNA elucidates sequence-specific mismatch recognition, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105 (2008) 8890-8895.

[218] T.E. Barrett, O.D. Scharer, R. Savva, T. Brown, J. Jiricny, G.L. Verdine, L.H. Pearl, Crystal structure of a thwarted mismatch glycosylase DNA repair complex, EMBO J., 18 (1999) 6599-6609.

[219] A. Maiti, M.S. Noon, A.D. MacKerell, E. Pozharski, A.C. Drohat, Lesion processing by a repair enzyme is severely curtailed by residues needed to prevent aberrant activity on undamaged DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 109 (2012) 8091-8096.

[220] A. Maiti, E. Pozharski, A.C. Drohat, Crystal structure of human thymine DNA glycosylase bound to a DNA substrate analog reveals the molecular basis of specificity and catalysis, FASEB J., 25 (2011).

[221] H. Hashimoto, X. Zhang, X.D. Cheng, Activity and crystal structure of human thymine DNA glycosylase mutant N140A with 5-carboxylcytosine DNA at low pH, DNA Repair (Amst), 12 (2013) 535-540.

[222] H. Hashimoto, X. Zhang, X. Cheng, Activity and crystal structure of human thymine DNA glycosylase mutant N140A with 5-carboxylcytosine DNA at low pH, DNA repair (Amst), 12 (2013) 535-540.

[223] A. Maiti, M.T. Morgan, A.C. Drohat, Role of Two Strictly Conserved Residues in Nucleotide Flipping and N-Glycosylic Bond Cleavage by Human Thymine DNA Glycosylase, J. Biol. Chem., 284 (2009) 36680-36688.

[224] C.T. Coey, S.S. Malik, L.S. Pidugu, K.M. Varney, E. Pozharski, A.C. Drohat, Structural basis of damage recognition by thymine DNA glycosylase: Key roles for N-terminal residues, Nucleic Acids Res., 44 (2016) 10248-10258.

[225] M.T. Morgan, M.T. Bennett, A.C. Drohat, Excision of 5-halogenated uracils by human thymine DNA glycosylase. Robust activity for DNA contexts other than CpG, J. Biol. Chem., 282 (2007) 27578-27586.

[226] R.J. Boorstein, A. Cummings, Jr., D.R. Marenstein, M.K. Chan, Y. Ma, T.A. Neubert, S.M. Brown, G.W. Teebor, Definitive identification of mammalian 5-hydroxymethyluracil DNA N-glycosylase activity as SMUG1, J. Biol. Chem., 276 (2001) 41991-41997.

[227] T. Lindahl, An N-glycosidase from *Escherihia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71 (1974) 3649-3653.

[228] K.A. Haushalter, P.T. Stukenberg, M.W. Kirschner, G.L. Verdine, Identification of a new uracil-DNA glycosylase family by expression cloning using synthetic inhibitors, Curr. Biol., 9 (1999) 174-185.

[229] B. Kavli, O. Sundheim, M. Akbari, M. Otterlei, H. Nilsen, F. Skorpen, P.A. Aas, L. Hagen, H.E. Krokan, G. Slupphaug, hUNG2 is the major repair enzyme for removal of uracil from U:A matches, U:G mismatches, and U in single-stranded DNA, with hSMUG1 as a broad specificity backup, J. Biol. Chem., 277 (2002) 39926-39936.

[230] A. Masaoka, M. Matsubara, R. Hasegawa, T. Tanaka, S. Kurisu, H. Terato, Y. Ohyama, N. Karino, A. Matsuda, H. Ide, Mammalian 5-formyluracil-DNA glycosylase. 2. Role of SMUG1 uracil-DNA glycosylase in repair of 5-formyluracil and other oxidized and deaminated base lesions, Biochemistry, 42 (2003) 5003-5012.

[231] S. Bjelland, E. Seeberg, Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation, Mutat. Res., 531 (2003) 37-80.

[232] M. Matsubara, T. Tanaka, H. Terato, E. Ohmae, S. Izumi, K. Katayanagi, H. Ide, Mutational analysis of the damage-recognition and catalytic mechanism of human SMUG1 DNA glycosylase, Nucleic Acids Res., 32 (2004) 5291-5302.

[233] M. Matsubara, A. Masaoka, T. Tanaka, T. Miyano, N. Kato, H. Terato, Y. Ohyama, S. Iwai, H. Ide, Mammalian 5-formyluracil-DNA glycosylase. 1. Identification and characterization of a novel activity that releases 5-formyluracil from DNA, Biochemistry, 42 (2003) 4993-5002.

[234] H.S. Pettersen, O. Sundheim, K.M. Gilljam, G. Slupphaug, H.E. Krokan, B. Kavli, Uracil-DNA glycosylases SMUG1 and UNG2 coordinate the initial steps of base excision repair by distinct mechanisms, Nucleic Acids Res., 35 (2007) 3879-3892.

[235] R.M. Werner, J.T. Stivers, Kinetic isotope effect studies of the reaction catalyzed by uracil DNA glycosylase: Evidence for an oxocarbenium ion-uracil anion intermediate, Biochemistry, 39 (2000) 14054-14064.

[236] K. Brettel, M. Byrdin, Reaction mechanisms of DNA photolyase, Curr. Opin. Struc. Biol., 20 (2010) 693-701.

[237] E.C. Friedberg, J.J. King, Endonucleolytic cleavage of UV-irradiated DNA controlled by the V+ gene in phage T4, Biochem. Bioph. Res. Co., 37 (1969) 646-651.

[238] F. Repoila, F. Tetart, J.Y. Bouet, H.M. Krisch, Genomic polymorphism in the T-even bacteriophages, EMBO J., 13 (1994) 4181-4192.

[239] Z. Lu, Y. Li, Y. Zhang, G.F. Kutish, D.L. Rock, J.L. Van Etten, Analysis of 45 kb of DNA located at the left end of the chlorella virus PBCV-1 genome, Virology, 206 (1995) 339-352.

[240] E.S. Miller, J.F. Heidelberg, J.A. Eisen, W.C. Nelson, A.S. Durkin, A. Ciecko, T.V. Feldblyum, O. White, I.T. Paulsen, W.C. Nierman, J. Lee, B. Szczypinski, C.M. Fraser, Complete genome sequence of the broad-host-range vibriophage KVP40: comparative genomics of a T4-related bacteriophage, J. Bacteriol., 185 (2003) 5220-5233.

[241] M. Furuta, J.O. Schrader, H.S. Schrader, T.A. Kokjohn, S. Nyaga, A.K. McCullough, R.S. Lloyd, D.E. Burbank, D. Landstein, L. Lane, J.L. Van Etten, Chlorella virus PBCV-1 encodes a homolog of the bacteriophage T4 UV damage repair gene denV, Appl. Environ. Microbiol., 63 (1997) 1551-1556.

[242] B.J. May, Q. Zhang, L.L. Li, M.L. Paustian, T.S. Whittam, V. Kapur, Complete genomic sequence of Pasteurella multocida, Pm70, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98 (2001) 3460-3465.

[243] V.G. DelVecchio, V. Kapatral, R.J. Redkar, G. Patra, C. Mujer, T. Los, N. Ivanova, I. Anderson, A. Bhattacharyya, A. Lykidis, G. Reznik, L. Jablonski, N. Larsen, M. D'Souza, A. Bernal, M. Mazur, E. Goltsman, E. Selkov, P.H. Elzer, S. Hagius, D. O'Callaghan, J.J. Letesson, R. Haselkorn, N. Kyrpides, R. Overbeek, The genome sequence of the facultative intracellular pathogen Brucella melitensis, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99 (2002) 443-448.

[244] A. Dufresne, M. Salanoubat, F. Partensky, F. Artiguenave, I.M. Axmann, V. Barbe, S. Duprat, M.Y. Galperin, E.V. Koonin, F. Le Gall, K.S. Makarova, M. Ostrowski, S. Oztas, C. Robert, I.B. Rogozin, D.J. Scanlan, N. Tandeau de Marsac, J. Weissenbach, P. Wincker, Y.I. Wolf, W.R. Hess, Genome sequence of the cyanobacterium Prochlorococcus marinus SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100 (2003) 10020-10025.

[245] S. Riazuddin, L. Grossman, Micrococcus-Luteus Correndonucleases .1. Resolution and Purification of 2 Endonucleases Specific for DNA Containing Pyrimidine Dimers, J. Biol. Chem., 252 (1977) 6280-6286.

[246] S. Riazuddin, L. Grossman, Micrococcus Luteus Correndonucleases .2. Mechanism of Action of 2 Endonucleases Specific for DNA Containing Pyrimidine Dimers, J. Biol. Chem., 252 (1977) 6287-6293.

[247] S. Riazuddin, L. Grossman, I. Mahler, Micrococcus Luteus Correndonucleases .3.Evidence for Involvement in Repair Invivo of 2 Endonucleases Specific for DNA Containing Pyrimidine Dimers, J. Biol. Chem., 252 (1977) 6294-6298. [248] D.A. Vasquez, S.G. Nyaga, R.S. Lloyd, Purification and characterization of a novel UV lesion-specific DNA glycosylase/AP lyase from Bacillus sphaericus, Mutat. Res.-DNA Repair, 459 (2000) 307-316.

[249] S.G. Nyaga, R.S. Lloyd, Two glycosylase/abasic lyases from Neisseria mucosa that initiate DNA repair at sites of UV-induced photoproducts, J. Biol. Chem., 275 (2000) 23569-23576.

[250] A.K. McCullough, M.T. Romberg, S. Nyaga, Y.F. Wei, T.G. Wood, J.S. Taylor, J.L. Van Etten, M.L. Dodson, R.S. Lloyd, Characterization of a novel cis-syn and trans-syn-II pyrimidine dimer glycosylase AP lyase from a eukaryotic algal virus, Paramecium bursaria chlorella virus-1, J. Biol. Chem., 273 (1998) 13136-13142.

[251] P. Jaruga, R. Jabil, A.K. McCullough, H. Rodriguez, M. Dizdaroglu, R.S. Lloyd, Chlorella virus pyrimidine dimer glycosylase excises ultraviolet radiation and hydroxyl radical-induced products
4,6-diamino-5-formamidopyrimidine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine from DNA, Photochem. Photobiol., 75 (2002) 85-91.

[252] J.F. Garvish, R.S. Lloyd, The catalytic mechanism of a pyrimidine dimer-specific glycosylase (pdg) abasic lyase, chlorella virus-pdg, J. Biol. Chem., 274 (1999) 9786-9794.

[253] J.F. Garvish, R.S. Lloyd, Active-site determination of a pyrimidine dimer glycosylase, J.Mol. Biol., 295 (2000) 479-488.

[254] R.D. Schrock, R.S. Lloyd, Site-Directed Mutagenesis of the Nh2 Terminus of T4-Endonuclease-V - the Position of the Alpha-Nh2 Moiety Affects Catalytic Activity, J. Biol. Chem., 268 (1993) 880-886.

[255] M.L. Dodson, R.D. Schrock, R.S. Lloyd, Evidence for an Imino Intermediate in the T4-Endonuclease-V Reaction, Biochemistry, 32 (1993) 8284-8290.

[256] T. Doi, A. Recktenwald, Y. Karaki, M. Kikuchi, K. Morikawa, M. Ikehara, T. Inaoka, N. Hori, E. Ohtsuka, Role of the Basic-Amino-Acid Cluster and Glu-23 in Pyrimidine Dimer Glycosylase Activity of T4-Endonuclease-V, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89 (1992) 9420-9424.

[257] R.C. Manuel, K.A. Latham, M.L. Dodson, R.S. Lloyd, Involvement of Glutamic-Acid-23 in the Catalytic Mechanism of T4 Endonuclease-V, J. Biol. Chem., 270 (1995) 2652-2661.

[258] M. Fuxreiter, A. Warshel, R. Osman, Role of active site residues in the glycosylase step of T4 Endonuclease V. Computer simulation studies on ionization states, Biochemistry, 38 (1999) 9577-9589.

[259] K. Morikawa, M. Ariyoshi, D.G. Vassylyev, O. Matsumoto, K. Katayanagi, E. Ohtsuka, Crystal-Structure of a Pyrimidine Dimer-Specific Excision-Repair Enzyme from Bacteriophage-T4 - Refinement at 1.45 Angstrom and X-Ray-Analysis of the 3 Active-Site Mutants, J. Mol. Biol., 249 (1995) 360-375. [260] K. Morikawa, O. Matsumoto, M. Tsujimoto, K. Katayanagi, M. Ariyoshi, T. Doi, M. Ikehara, T. Inaoka, E. Ohtsuka, X-Ray Structure of T4 Endonuclease-V - an Excision Repair Enzyme Specific for a Pyrimidine Dimer, Science, 256 (1992) 523-526.

[261] D.G. Vassylyev, T. Kashiwagi, Y. Mikami, M. Ariyoshi, S. Iwai, E. Ohtsuka, K. Morikawa, Atomic Model of a Pyrimidine Dimer Excision-Repair Enzyme Complexed with a DNA Substrate - Structural Basis for Damaged DNA Recognition, Cell, 83 (1995) 773-782.

[262] G. Golan, D.O. Zharkov, A.P. Grollman, M.L. Dodson, A.K. McCullough, R.S. Lloyd, G. Shoham, Structure of T4 pyrimidine dimer glycosylase in a reduced imine covalent complex with abasic site-containing DNA, J. Mol. Biol., 362 (2006) 241-258.

[263] J.T. Stivers, Y.L. Jiang, A mechanistic perspective on the chemistry of DNA repair glycosylases, Chem. Rev., 103 (2003) 2729-2759.

[264] D.R. Dowd, R.S. Lloyd, Biological Significance of Facilitated Diffusion in Protein-DNA Interactions - Applications to T4 Endonuclease V-Initiated DNA-Repair, J. Biol. Chem., 265 (1990) 3424-3431.

[265] S.G. Nyaga, M.L. Dodson, R.S. Lloyd, Role of specific amino acid residues in T4 endonuclease V that alter nontarget DNA binding, Biochemistry, 36 (1997) 4080-4088.

[266] J. Kemmink, R. Boelens, T.M.G. Koning, R. Kaptein, G.A. Vandermarel, J.H. Vanboom, Conformational-Changes in the Oligonucleotide Duplex D(Gcgttgcg).D(Cgcaacgc) Induced by Formation of a Cis-Syn Thymine Dimer - a Two-Dimensional Nmr-Study, Eur. J. Biochem., 162 (1987) 37-43.

[267] B.J. Lee, H. Sakashita, T. Ohkubo, M. Ikehara, T. Doi, K. Morikawa, Y. Kyogoku, T. Osafune, S. Iwai, E. Ohtsuka, Nuclear-Magnetic-Resonance Study of the Interaction of T4 Endonuclease-V with DNA, Biochemistry, 33 (1994) 57-64.

[268] C.I. Wang, J.S. Taylor, Site-Specific Effect of Thymine Dimer Formation on Dan.Dtn Tract Bending and Its Biological Implications, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88 (1991) 9072-9076.

[269] K.A. Latham, R.C. Manuel, R.S. Lloyd, The Interaction of T4 Endonuclease-V E23q Mutant with Thymine Dimerhydrofuran-Containing and Tetrahydrofuran-Containing DNA, J. Bacteriol., 177 (1995) 5166-5168.

[270] B. Sedgwick, P.A. Bates, J. Paik, S.C. Jacobs, T. Lindahl, Repair of alkylated DNA: recent advances, DNA Repair (Amst), 6 (2007) 429-442.

[271] B. Sedgwick, Repairing DNA-methylation damage, Nat. Rev. Mol. Cell. Bio., 5 (2004) 148-157.

[272] K.S. Gates, An Overview of Chemical Processes That Damage Cellular DNA: Spontaneous Hydrolysis, Alkylation, and Reactions with Radicals, Chem. Res. Toxicol., 22 (2009) 1747-1760.

[273] K.S. Gates, T. Nooner, S. Dutta, Biologically relevant chemical reactions of N7alkylguanine residues in DNA, Chem. Res. Toxicol., 17 (2004) 839-856.

[274] G.P. Margison, P.J. O'Connor, Biological implications of the instability of the Nglycosidic bone of 3-methyldeoxyadenosine in DNA, Biochim. Biophys. Acta, 331 (1973) 349-356.

[275] A. Barbin, Etheno-adduct-forming chemicals: from mutagenicity testing to tumor mutation spectra, Mutat. Res., 462 (2000) 55-69.

[276] J. Nair, A. Barbin, I. Velic, H. Bartsch, Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species, Mutat. Res., 424 (1999) 59-69.

[277] K. Larson, J. Sahm, R. Shenkar, B. Strauss, Methylation-induced blocks to in vitro DNA replication, Mutat. Res., 150 (1985) 77-84.

[278] B.S. Plosky, E.G. Frank, D.A. Berry, G.P. Vennall, J.P. McDonald, R. Woodgate, Eukaryotic Y-family polymerases bypass a 3-methyl-2'-deoxyadenosine analog in vitro and methyl methanesulfonate-induced DNA damage in vivo, Nucleic Acids Res., 36 (2008) 2152-2162.

[279] E.H. Rubinson, A.S.P. Gowda, T.E. Spratt, B. Gold, B.F. Eichman, An unprecedented nucleic acid capture mechanism for excision of DNA damage, Nature, 468 (2010) 406-U309.

[280] A.Y. Lau, O.D. Scharer, L. Samson, G.L. Verdine, T. Ellenberger, Crystal structure of a human alkylbase-DNA repair enzyme complexed to DNA: mechanisms for nucleotide flipping and base excision, Cell, 95 (1998) 249-258.

[281] E.H. Rubinson, B.F. Eichman, Nucleic acid recognition by tandem helical repeats, Curr.Opin. Struc. Biol., 22 (2012) 101-109.

[282] T.M. Hitchcock, L. Dong, E.E. Connor, L.B. Meira, L.D. Samson, M.D. Wyatt, W. Cao, Oxanine DNA glycosylase activity from Mammalian alkyladenine glycosylase, J. Biol. Chem., 279 (2004) 38177-38183.

[283] T.R. O'Connor, Purification and characterization of human 3-methyladenine-DNA glycosylase, Nucleic Acids Res., 21 (1993) 5561-5569.

[284] P.J. O'Brien, T. Ellenberger, Dissecting the broad substrate specificity of human 3methyladenine-DNA glycosylase, J. Biol. Chem., 279 (2004) 9750-9757.

[285] M. Saparbaev, S. Langouet, C.V. Privezentzev, F.P. Guengerich, H. Cai, R.H. Elder, J. Laval, 1,N(2)-ethenoguanine, a mutagenic DNA adduct, is a primary substrate of *Escherichia*

coli mismatch-specific uracil-DNA glycosylase and human alkylpurine-DNA-N-glycosylase, J. Biol. Chem., 277 (2002) 26987-26993.

[286] M. Saparbaev, K. Kleibl, J. Laval, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, rat and human 3-methyladenine DNA glycosylases repair 1,N6-ethenoadenine when present in DNA, Nucleic Acids Res., 23 (1995) 3750-3755.

[287] M. Saparbaev, J.C. Mani, J. Laval, Interactions of the human, rat, I and *Escherichia coli* 3methyladenine-DNA glycosylases with DNA containing dIMP residues, Nucleic Acids Res., 28 (2000) 1332-1339.

[288] P. Karran, T. Lindahl, Hypoxanthine in deoxyribonucleic acid: generation by heat-induced hydrolysis of adenine residues and release in free form by a deoxyribonucleic acid glycosylase from calf thymus, Biochemistry, 19 (1980) 6005-6011.

[289] C.Y.I. Lee, J.C. Delaney, M. Kartalou, G.M. Lingaraju, A. Maor-Shoshani, J.M. Essigmann, L.D. Samson, Recognition and Processing of a New Repertoire of DNA Substrates by Human 3-Methyladenine DNA Glycosylase (AAG), Biochemistry, 48 (2009) 1850-1861.

[290] A.Y. Lau, M.D. Wyatt, B.J. Glassner, L.D. Samson, T. Ellenberger, Molecular basis for discriminating between normal and damaged bases by the human alkyladenine glycosylase, AAG, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97 (2000) 13573-13578.

[291] E.E. Connor, M.D. Wyatt, Active-site clashes prevent the human 3-methyladenine DNA glycosylase from improperly removing bases, Chem. Biol., 9 (2002) 1033-1041.

[292] J.W. Setser, G.M. Lingaraju, C.A. Davis, L.D. Samson, C.L. Drennan, Searching for DNA lesions: structural evidence for lower- and higher-affinity DNA binding conformations of human alkyladenine DNA glycosylase, Biochemistry, 51 (2012) 382-390.

[293] A.E. Wolfe, P.J. O'Brien, Kinetic mechanism for the flipping and excision of 1,N(6)-ethenoadenine by human alkyladenine DNA glycosylase, Biochemistry, 48 (2009) 11357-11369.
[294] D.M. Lyons, P.J. O'Brien, Efficient Recognition of an Unpaired Lesion by a DNA Repair Glycosylase, J. Am. Chem. Soc., 131 (2009) 17742-17743.

[295] J. Klapacz, G.M. Lingaraju, H.H. Guo, D. Shah, A. Moar-Shoshani, L.A. Loeb, L.D. Samson, Frameshift Mutagenesis and Microsatellite Instability Induced by Human Alkyladenine DNA Glycosylase, Mol. Cell, 37 (2010) 843-853.

[296] X. Sun, J.K. Lee, Acidity and proton affinity of hypoxanthine in the gas phase versus in solution: intrinsic reactivity and biological implications, J. Org. Chem., 72 (2007) 6548-6555.

[297] M. Liu, M. Xu, J.K. Lee, The acidity and proton affinity of the damaged base 1,N6ethenoadenine in the gas phase versus in solution: intrinsic reactivity and biological implications, J. Org. Chem., 73 (2008) 5907-5914. [298] A. Asaeda, H. Ide, K. Asagoshi, S. Matsuyama, K. Tano, A. Murakami, Y. Takamori, K. Kubo, Substrate specificity of human methylpurine DNA N-glycosylase, Biochemistry, 39 (2000) 1959-1965.

[299] F. Miao, M. Bouziane, T.R. O'Connor, Interaction of the recombinant human methylpurine-DNA glycosylase (MPG protein) with oligodeoxyribonucleotides containing either hypoxanthine or abasic sites, Nucleic Acids Res., 26 (1998) 4034-4041.

[300] P.J. O'Brien, T. Ellenberger, Human alkyladenine DNA glycosylase uses acid-base catalysis for selective excision of damaged purines, Biochemistry, 42 (2003) 12418-12429.

[301] L.R. Rutledge, S.D. Wetmore, Modeling the Chemical Step Utilized by Human Alkyladenine DNA Glycosylase: A Concerted Mechanism Aids in Selectively Excising Damaged Purines, J. Am. Chem. Soc., 133 (2011) 16258-16269.

[302] A.C. Vallur, R.L. Maher, L.B. Bloom, The efficiency of hypoxanthine excision by alkyladenine DNA glycosylase is altered by changes in nearest neighbor bases, DNA Repair (Amst), 4 (2005) 1088-1098.

[303] X. Sun, J.K. Lee, Stability of DNA duplexes containing hypoxanthine (inosine): gas versus solution phase and biological implications, J. Org. Chem., 75 (2010) 1848-1854.

[304] I. Alseth, T. Rognes, T. Lindback, I. Solberg, K. Robertsen, K.I. Kristiansen, D. Mainieri, L. Lillehagen, A.B. Kolsto, M. Bjoras, A new protein superfamily includes two novel 3methyladenine DNA glycosylases from Bacillus cereus, AlkC and AlkD, Mol. Microbiol., 59 (2006) 1602-1609.

[305] E.H. Rubinson, A.H. Metz, J. O'Quin, B.F. Eichman, A new protein architecture for processing alkylation damaged DNA: the crystal structure of DNA glycosylase AlkD, J. Mol. Biol., 381 (2008) 13-23.

[306] E.H. Rubinson, Z. Wawrzak, A.H. Metz, J. O'Quin, B.F. Eichman, Crystal Structure of DNA Repair Protein AlkD Reveals a New Protein Architecture for Locating and Excising Alkylpurines from DNA, Chem. Res. Toxicol., 21 (2008) 2433-2433.

[307] B. Dalhus, I.H. Helle, P.H. Backe, I. Alseth, T. Rognes, M. Bjoras, J.K. Laerdahl, Structural insight into repair of alkylated DNA by a new superfamily of DNA glycosylases comprising HEAT-like repeats, Nucleic Acids Res., 35 (2007) 2451-2459.

[308] E.A. Mullins, R.X. Shi, Z.D. Parsons, P.K. Yuen, S.S. David, Y. Igarashi, B.F. Eichman, The DNA glycosylase AlkD uses a non-base-flipping mechanism to excise bulky lesions, Nature, 527 (2015) 254-+.

[309] Z.D. Parsons, J.M. Bland, E.A. Mullins, B.F. Eichman, A Catalytic Role for C-H/pi Interactions in Base Excision Repair by Bacillus cereus DNA Glycosylase AlkD, J. Am. Chem. Soc., 138 (2016) 11485-11488.

[310] C.D. Mol, C.F. Kuo, M.M. Thayer, R.P. Cunningham, J.A. Tainer, Structure and Function of the Multifunctional DNA-Repair Enzyme Exonuclease-Iii, Nature, 374 (1995) 381-386.

[311] D.J. Hosfield, Y. Guan, B.J. Haas, R.P. Cunningham, J.A. Tainer, Structure of the DNA repair enzyme endonuclease IV and its DNA complex: Double-nucleotide flipping at abasic sites and three-metal-ion catalysis, Cell, 98 (1999) 397-408.

[312] B. Demple, A. Johnson, D. Fung, Exonuclease-Iii and Endonuclease-Iv Remove 3' Blocks from DNA-Synthesis Primers in H2o2-Damaged *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83 (1986) 7731-7735.

[313] B. Demple, L. Harrison, Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology, Annu. Rev. Biochem., 63 (1994) 915-948.

[314] A.A. Ishchenko, G. Sanz, C.V. Privezentzev, A.V. Maksimenko, M. Saparbaev, Characterisation of new substrate specificities of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* AP endonucleases, Nucleic Acids Res., 31 (2003) 6344-6353.

[315] C.D. Mol, D.J. Hosfield, J.A. Tainer, Abasic site recognition by two apurinic/apyrimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means, Mutat. Res., 460 (2000) 211-229.

[316] A.A. Ischenko, M.K. Saparbaev, Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage, Nature, 415 (2002) 183-187.

[317] L. Gros, A.A. Ishchenko, H. Ide, R.H. Elder, M.K. Saparbaev, The major human AP endonuclease (Ape1) is involved in the nucleotide incision repair pathway, Nucleic Acids Res., 32 (2004) 73-81.

[318] A.A. Ishchenko, X.M. Yang, D. Ramotar, M. Saparbaev, The 3 '->-5 ' exonuclease of Apn1 provides an alternative pathway to repair 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine in *Saccharomyces cerevisiae*, Mol. Cell Biol., 25 (2005) 6380-6390.

[319] G. Barzilay, I.D. Hickson, Structure and Function of Apurinic/Apyrimidinic Endonucleases, Bioessays, 17 (1995) 713-719.

[320] D.M. Wilson, Properties of and substrate determinants for the exonuclease activity of human apurinic endonuclease Ape1, Journal of Molecular Biology, 330 (2003) 1027-1037.

[321] K.M. Chou, Y.C. Cheng, An exonucleolytic activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease on 3 ' mispaired DNA, Nature, 415 (2002) 655-659.

[322] J.L. Parsons, I.I. Dianova, G.L. Dianov, APE1-dependent repair of DNA single-strand breaks containing 3 '-end 8-oxoguanine, Nucleic Acids Res., 33 (2005) 2204-2209.

[323] M. Li, D.M. Wilson, 3rd, Human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1, Antioxid. Redox. Signal., 20 (2014) 678-707.

[324] M. Redrejo-Rodriguez, A. Vigouroux, A. Mursalimov, I. Grin, D. Alili, Z. Koshenov, Z. Akishev, A. Maksimenko, A.K. Bissenbaev, B.T. Matkarimov, M. Saparbaev, A.A. Ishchenko, S. Morera, Structural comparison of AP endonucleases from the exonuclease III family reveals new amino acid residues in human AP endonuclease 1 that are involved in incision of damaged DNA, Biochimie, 128 (2016) 20-33.

[325] P. Burkovics, V. Szukacsov, I. Unk, L. Haracska, Human Ape2 protein has a 3 '-5 ' exonuclease activity that acts preferentially on mismatched base pairs, Nucleic Acids Res., 34 (2006) 2508-2515.

[326] P.T. Beernink, B.W. Segelke, M.Z. Hadi, J.P. Erzberger, D.M. Wilson, 3rd, B. Rupp, Two divalent metal ions in the active site of a new crystal form of human apurinic/apyrimidinic endonuclease, Ape1: implications for the catalytic mechanism, J. Mol. Biol., 307 (2001) 1023-1034.

[327] C.D. Mol, T. Izumi, S. Mitra, J.A. Tainer, DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 and DNA repair coordination, Nature, 403 (2000) 451-456.

[328] E.D. Garcin, D.J. Hosfield, S.A. Desai, B.J. Haas, M. Bjoras, R.P. Cunningham, J.A. Tainer, DNA apurinic-apyrimidinic site binding and excision by endonuclease IV, Nat. Struct. Mol. Biol., 15 (2008) 515-522.

[329] I. Ivanov, J.A. Tainer, J.A. McCammon, Unraveling the three-metal-ion catalytic mechanism of the DNA repair enzyme endonuclease IV, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 104 (2007) 1465-1470.

[330] G.D. Fasman, Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3 ed., CRC Press, Cleveland, 1975.

[331] S.T. Hoehn, C.J. Turner, J. Stubbe, Solution structure of an oligonucleotide containing an abasic site: evidence for an unusual deoxyribose conformation, Nucleic Acids Res., 29 (2001) 3413-3423.

[332] A.A. Kuznetsova, N.A. Kuznetsov, A.A. Ishchenko, M.K. Saparbaev, O.S. Fedorova, Presteady-state fluorescence analysis of damaged DNA transfer from human DNA glycosylases to AP endonuclease APE1, Biochim. Biophys. Acta, 1840 (2014) 3042-3051.

[333] H. Asahara, P.M. Wistort, J.F. Bank, R.H. Bakerian, R.P. Cunningham, Purification and characterization of *Escherichia coli* endonuclease III from the cloned nth gene, Biochemistry, 28 (1989) 4444-4449.

[334] S.C. Gill, P.H. von Hippel, Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, Anal. Biochem., 182 (1989) 319-326.

[335] G.L. Verdine, D.P.G. Norman, Covalent trapping of protein-DNA complexes, Annu. Rev. Biochem., 72 (2003) 337-366. [336] I.R. Grin, S.N. Khodyreva, G.A. Nevinsky, D.O. Zharkov, Deoxyribophosphate lyase activity of mammalian endonuclease VIII-like proteins, FEBS Lett., 580 (2006) 4916-4922.

[337] N.A. Kuznetsov, V.V. Koval, D.O. Zharkov, Y.N. Vorobiev, G.A. Nevinsky, K.T. Douglas, O.S. Fedorova, Kinetic basis of lesion specificity and opposite-base specificity of *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase, Biochemistry, 46 (2007) 424-435.

[338] N.A. Kuznetsov, V.V. Koval, D.O. Zharkov, O.S. Fedorova, Conformational dynamics of the interaction of *Escherichia coli* endonuclease VIII with DNA substrates, DNA Repair (Amst), 11 (2012) 884-891.

[339] Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук, Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование., М.: Мир, 1984.

[340] P. Kuzmic, Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase, Anal. Biochem., 237 (1996) 260-273.

[341] P. Atkins, J. Paula, Atkins' Physical Chemistry, 8th Edition ed., Oxford university press, 2006.

[342] R. Ragone, G. Colonna, L. Ambrosone, Reliability of the van't Hoff Plots, J. Phys. Chem., 99 (1995) 13050-13050.

[343] Т. Келети, Основы ферментативной кинетики, М.: Мир, 1990.

[344] Э. Фершт, Структура и механизм действия ферментов, М.: Мир, 1980.

[345] M.L. Carpenter, A.W. Oliver, G.G. Kneale, Analysis of DNA-protein interactions by intrinsic fluorescence, Methods Mol. Biol., 148 (2001) 491-502.

[346] J.R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, Third ed., Springer, New York, 2006.

[347] Д. Лакович, Основы флуоресцентной спектроскопии, М.: Мир, 1986 [*Principles of fluorescence spectroscopy*. (J.R.Lakowicz). Plenum Press, New York, 1983].

[348] G.G. Kneale, R.W. Wijnaendts van Resandt, Time-resolved fluorescence of bacteriophage Pf1 DNA-binding protein. Determination of oligonucleotide and polynucleotide binding parameters, Eur. J. Biochem., 149 (1985) 85-93.

[349] C.A. Dunlap, M.D. Tsai, Use of 2-aminopurine and tryptophan fluorescence as probes in kinetic analyses of DNA polymerase β , Biochemistry, 41 (2002) 11226-11235.

[350] A.V. Cherepanov, S. de Vries, Binding of nucleotides by T4 DNA ligase and T4 RNA ligase: optical absorbance and fluorescence studies, Biophys. J., 81 (2001) 3545-3559.

[351] R.W. Sinkeldam, N.J. Greco, Y. Tor, Fluorescent analogs of biomolecular building blocks: design, properties, and applications, Chem. Rev., 110 (2010) 2579-2619.

[352] L.M. Wilhelmsson, Fluorescent nucleic acid base analogues, Q. Rev. Biophys., 43 (2010) 159-183.

[353] K.T. Kim, H.W. Kim, D. Moon, Y.M. Rhee, B.H. Kim, (DNS)C: a fluorescent, environmentally sensitive cytidine derivative for the direct detection of GGG triad sequences, Org. Biomol. Chem., 11 (2013) 5605-5614.

[354] A. Suzuki, N. Takahashi, Y. Okada, I. Saito, N. Nemoto, Y. Saito, Naphthalene-based environmentally sensitive fluorescent 8-substituted 2'-deoxyadenosines: application to DNA detection, Bioorg. Med. Chem. Lett., 23 (2013) 886-892.

[355] M.G. Pawar, A. Nuthanakanti, S.G. Srivatsan, Heavy Atom Containing Fluorescent Ribonucleoside Analog Probe for the Fluorescence Detection of RNA-Ligand Binding, Bioconjug. Chem., (2013).

[356] M.G. Pawar, S.G. Srivatsan, Environment-responsive fluorescent nucleoside analogue probe for studying oligonucleotide dynamics in a model cell-like compartment, J. Phys. Chem. B, 117 (2013) 14273-14282.

[357] M. Segal, E. Yavin, P. Kafri, Y. Shav-Tal, B. Fischer, Detection of mRNA of the cyclin D1 breast cancer marker by a novel duplex-DNA probe, J. Med. Chem., 56 (2013) 4860-4869.

[358] D.C. Ward, E. Reich, L. Stryer, Fluorescence studies of nucleotides and polynucleotides. I. Formycin, 2-aminopurine riboside, 2,6-diaminopurine riboside, and their derivatives, J. Biol. Chem., 244 (1969) 1228-1237.

[359] V. Purohit, N.D.F. Grindley, C.M. Joyce, Use of 2-aminopurine fluorescence to examine conformational changes during nucleotide incorporation by DNA polymerase I (Klenow Fragment), Biochemistry, 42 (2003) 10200-10211.

[360] Y. Jia, A. Kumar, S.S. Patel, Equilibrium and stopped-flow kinetic studies of interaction between T7 RNA polymerase and its promoters measured by protein and 2-aminopurine fluorescence changes, J. Biol. Chem., 271 (1996) 30451-30458.

[361] S.S. Mandal, E. Fidalgo da Silva, L.J. Reha-Krantz, Using 2-aminopurine fluorescence to detect base unstacking in the template strand during nucleotide incorporation by the bacteriophage T4 DNA polymerase, Biochemistry, 41 (2002) 4399-4406.

[362] S.M. Watanabe, M.F. Goodman, Kinetic measurement of 2-aminopurine•cytosine and 2aminopurine•thymine base pairs as a test of DNA polymerase fidelity mechanisms, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79 (1982) 6429-6433.

[363] L.C. Sowers, G.V. Fazakerley, R. Eritja, B.E. Karlan, M.F. Goodman, Base pairing and mutagenesis: observation of a protonated base pair between 2-aminopurine and cytosine in an oligonucleotide by proton NMR, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83 (1986) 5434-5438.

[364] L.C. Sowers, Y. Boulard, G.V. Fazakerley, Multiple structures for the 2-aminopurinecytosine mispair, Biochemistry, 39 (2000) 7613-7620. [365] J.M. Jean, K.B. Hall, 2-Aminopurine fluorescence quenching and lifetimes: role of base stacking, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98 (2001) 37-41.

[366] E.L. Rachofsky, R. Osman, J.B.A. Ross, Probing structure and dynamics of DNA with 2aminopurine: effects of local environment on fluorescence, Biochemistry, 40 (2001) 946-956.

[367] H. Zang, Q. Fang, A.E. Pegg, F.P. Guengerich, Kinetic analysis of steps in the repair of damaged DNA by human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase, J. Biol. Chem., 280 (2005) 30873-30881.

[368] A.A. Kuznetsova, N.A. Kuznetsov, Y.N. Vorobjev, N.P. Barthes, B.Y. Michel, A. Burger, O.S. Fedorova, New Environment-Sensitive Multichannel DNA Fluorescent Label for Investigation of the Protein-DNA Interactions, PloS one, 9 (2014) e100007.

[369] N.A. Kuznetsov, Y.N. Vorobjev, L.N. Krasnoperov, O.S. Fedorova, Thermodynamics of the multi-stage DNA lesion recognition and repair by formamidopyrimidine-DNA glycosylase using pyrrolocytosine fluorescence--stopped-flow pre-steady-state kinetics, Nucleic Acids Res., 40 (2012) 7384-7392.

[370] K. Yang, R.J. Stanley, The extent of DNA deformation in DNA photolyase-substrate complexes: a solution state fluorescence study, Photochem. Photobiol., 84 (2008) 741-749.

[371] P. Sandin, K. Borjesson, H. Li, J. Martensson, T. Brown, L.M. Wilhelmsson, B. Albinsson, Characterization and use of an unprecedentedly bright and structurally non-perturbing fluorescent DNA base analogue, Nucleic Acids Res., 36 (2008) 157-167.

[372] K. Borjesson, P. Sandin, L.M. Wilhelmsson, Nucleic acid structure and sequence probing using fluorescent base analogue tC(O), Biophys. Chem., 139 (2009) 24-28.

[373] G. Stengel, B.W. Purse, L.M. Wilhelmsson, M. Urban, R.D. Kuchta, Ambivalent incorporation of the fluorescent cytosine analogues tC and tCo by human DNA polymerase alpha and Klenow fragment, Biochemistry, 48 (2009) 7547-7555.

[374] G. Stengel, M. Urban, B.W. Purse, R.D. Kuchta, High density labeling of polymerase chain reaction products with the fluorescent base analogue tCo, Anal. Chem., 81 (2009) 9079-9085.

[375] B.J. Rodgers, N.A. Elsharif, N. Vashisht, M.M. Mingus, M.A. Mulvahill, G. Stengel, R.D. Kuchta, B.W. Purse, Functionalized tricyclic cytosine analogues provide nucleoside fluorophores with improved photophysical properties and a range of solvent sensitivities, Chemistry, 20 (2014) 2010-2015.

[376] P. Sandin, G. Stengel, T. Ljungdahl, K. Borjesson, B. Macao, L.M. Wilhelmsson, Highly efficient incorporation of the fluorescent nucleotide analogs tC and tCO by Klenow fragment, Nucleic Acids Res., 37 (2009) 3924-3933.

[377] N.A. Kuznetsov, O.A. Kladova, A.A. Kuznetsova, A.A. Ishchenko, M.K. Saparbaev, D.O. Zharkov, O.S. Fedorova, Conformational Dynamics of DNA Repair by *Escherichia coli* Endonuclease III, J. Biol. Chem., 290 (2015) 14338-14349.

[378] M.J. Rist, J.P. Marino, Fluorescent Nucleotide Base Analogs as Probes of Nucleic Acid Structure, Dynamics and Interactions, Curr. Org. Chem., 6 (2002) 775-793.

[379] D.A. Berry, K.Y. Jung, D.S. Wise, A.D. Sercel, W.H. Pearson, H. Mackie, J.B. Randolph, R.L. Somers, Pyrrolo-dC and pyrrolo-C: fluorescent analogs of cytidine and 2'-deoxycytidine for the study of oligonucleotides, Tetrahedron Lett., 45 (2004) 2457-2461.

[380] Н.А. Кузнецов, В.В. Коваль, О.С. Федорова, Механизмы ферментативного катализа и узнавания поврежденных участков ДНК 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой человека hOGG1, Биохимия, 76 (2011) 142-156.

[381] N.A. Kuznetsov, C. Bergonzo, A.J. Campbell, H. Li, G.V. Mechetin, C. de los Santos, A.P. Grollman, O.S. Fedorova, D.O. Zharkov, C. Simmerling, Active destabilization of base pairs by a DNA glycosylase wedge initiates damage recognition, Nucleic Acids Res., 43 (2015) 272-281.

[382] V.V. Koval, N.A. Kuznetsov, A.A. Ishchenko, M.K. Saparbaev, O.S. Fedorova, Real-time studies of conformational dynamics of the repair enzyme *E. coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase and its DNA complexes during catalytic cycle, Mutat. Res., 685 (2010) 3-10.

[383] B.B. Hopkins, N.O. Reich, Simultaneous DNA binding, bending, and base flipping evidence for a novel M.EcoRI methyltransferase-DNA complex, J. Biol. Chem., 279 (2004) 37049-37060.

[384] A. Maksimenko, A.A. Ishchenko, G. Sanz, J. Laval, R.H. Elder, M.K. Saparbaev, A molecular beacon assay for measuring base excision repair activities, Biochem. Bioph. Res. Co., 319 (2004) 240-246.

[385] W. Bujalowski, Thermodynamic and kinetic methods of analyses of protein-nucleic acid interactions. From simpler to more complex systems, Chem. Rev., 106 (2006) 556-606.

[386] О.С. Федорова, Н.А. Кузнецов, В.В. Коваль, Д.Г. Кнорре Конформационная динамика и предстационарная кинетика ДНК-гликозилаз, Биохимия, 75 (2010) 1377-1394.

[387] A.A. Ishchenko, N.L. Vasilenko, O.I. Sinitsina, V.I. Yamkovoy, O.S. Fedorova, K.T. Douglas, G.A. Nevinsky, Thermodynamic, kinetic, and structural basis for recognition and repair of 8-oxoguanine in DNA by Fpg protein from *Escherichia coli*, Biochemistry, 41 (2002) 7540-7548.

[388] G.A. Nevinsky, Structural, thermodynamic, and kinetic basis for the activities of some nucleic acid repair enzymes, J. Mol. Rec., 24 (2011) 656-677.

[389] N.G. Beloglazova, O.O. Kirpota, K.V. Starostin, A.A. Ishchenko, V.I. Yamkovoy, D.O. Zharkov, K.T. Douglas, G.A. Nevinsky, Thermodynamic, kinetic and structural basis for recognition and repair of abasic sites in DNA by apurinic/apyrimidinic endonuclease from human placenta, Nucleic Acids Res., 32 (2004) 5134-5146.

[390] Y. Monden, T. Arai, M. Asano, E. Ohtsuka, H. Aburatani, S. Nishimura, Human MMH (OGG1) type 1a protein is a major enzyme for repair of 8-hydroxyguanine lesions in human cells, Biochem. Bioph. Res. Co., 258 (1999) 605-610.

[391] D.P. Norman, S.J. Chung, G.L. Verdine, Structural and biochemical exploration of a critical amino acid in human 8-oxoguanine glycosylase, Biochemistry, 42 (2003) 1564-1572.

[392] B. Dalhus, M. Forsbring, I.H. Helle, E.S. Vik, R.J. Forstrom, P.H. Backe, I. Alseth, M. Bjoras, Separation-of-function mutants unravel the dual-reaction mode of human 8-oxoguanine DNA glycosylase, Structure, 19 (2011) 117-127.

[393] H.M. Nash, R. Lu, W.S. Lane, G.L. Verdine, The critical active-site amine of the human 8oxoguanine DNA glycosylase, hOgg1: direct identification, ablation and chemical reconstitution, Chem. Biol., 4 (1997) 693-702.

[394] N. Guibourt, B. Castaing, P.A. Van Der Kemp, S. Boiteux, Catalytic and DNA binding properties of the ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison between the wild type and the K241R and K241Q active-site mutant proteins, Biochemistry, 39 (2000) 1716-1724.

[395] M. Bjoras, E. Seeberg, L. Luna, L.H. Pearl, T.E. Barrett, Reciprocal "flipping" underlies substrate recognition and catalytic activation by the human 8-oxo-guanine DNA glycosylase, J. Mol. Biol., 317 (2002) 171-177.

[396] A. Banerjee, W. Yang, M. Karplus, G.L. Verdine, Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damaged DNA, Nature, 434 (2005) 612-618.

[397] C.T. Radom, A. Banerjee, G.L. Verdine, Structural characterization of human 8oxoguanine DNA glycosylase variants bearing active site mutations, J. Biol. Chem., 282 (2007) 9182-9194.

[398] C.M. Crenshaw, K. Nam, K. Oo, P.S. Kutchukian, B.R. Bowman, M. Karplus, G.L. Verdine, Enforced presentation of an extrahelical guanine to the lesion recognition pocket of human 8-oxoguanine glycosylase, hOGG1, J. Biol. Chem., 287 (2012) 24916-24928.

[399] P.A. van der Kemp, J.B. Charbonnier, M. Audebert, S. Boiteux, Catalytic and DNAbinding properties of the human Ogg1 DNA N-glycosylase/AP lyase: biochemical exploration of H270, Q315 and F319, three amino acids of the 8-oxoguanine-binding pocket, Nucleic Acids Res., 32 (2004) 570-578. [400] A.A. Kuznetsova, N.A. Kuznetsov, A.A. Ishchenko, M.K. Saparbaev, O.S. Fedorova, Step-by-Step Mechanism of DNA Damage Recognition by Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase, Biochim. Biophys. Acta, 1840 (2014) 387–395.

[401] М.В. Лукина, А.А. Кузнецова, Н.А. Кузнецов, О.С. Федорова, Кинетический анализ узнавания поврежденных нуклеотидов мутантными формами 8-оксогуанин-ДНКгликозилазы hOGG1, Биоорган. химия., 43 (2017) 4-17.

[402] D.P. Norman, S.D. Bruner, G.L. Verdine, Coupling of substrate recognition and catalysis by a human base-excision DNA repair protein, J. Am. Chem. Soc., 123 (2001) 359-360.

[403] M. Audebert, J.P. Radicella, M. Dizdaroglu, Effect of single mutations in the OGG1 gene found in human tumors on the substrate specificity of the Ogg1 protein, Nucleic Acids Res., 28 (2000) 2672-2678.

[404] F. Faucher, S.S. Wallace, S. Doublie, Structural basis for the lack of opposite base specificity of Clostridium acetobutylicum 8-oxoguanine DNA glycosylase, DNA Repair (Amst), 8 (2009) 1283-1289.

[405] M. Rogacheva, A. Ishchenko, M. Saparbaev, S. Kuznetsova, V. Ogryzko, High resolution characterization of formamidopyrimidine-DNA glycosylase interaction with its substrate by chemical cross-linking and mass spectrometry using substrate analogs, J. Biol. Chem., 281 (2006) 32353-32365.

[406] D.O. Zharkov, R. Gilboa, I. Yagil, J.H. Kycia, S.E. Gerchman, G. Shoham, A.P. Grollman, Role for lysine 142 in the excision of adenine from A:G mispairs by MutY DNA glycosylase of *Escherichia coli*, Biochemistry, 39 (2000) 14768-14778.

[407] N.A. Kuznetsov, A.A. Kuznetsova, Y.N. Vorobjev, L.N. Krasnoperov, O.S. Fedorova, Thermodynamics of the DNA damage repair steps of human 8-oxoguanine DNA glycosylase, PloS one, 9 (2014) e98495.

[408] L. Jen-Jacobson, L.E. Engler, L.A. Jacobson, Structural and thermodynamic strategies for site-specific DNA binding proteins, Structure, 8 (2000) 1015-1023.

[409] P.L. Privalov, A.I. Dragan, C. Crane-Robinson, Interpreting protein/DNA interactions: distinguishing specific from non-specific and electrostatic from non-electrostatic components, Nucleic Acids Res., 39 (2011) 2483-2491.

[410] B. Demple, S. Linn, DNA N-Glycosylases and Uv Repair, Nature, 287 (1980) 203-208.

[411] L.H. Breimer, T. Lindahl, DNA Glycosylase Activities for Thymine Residues Damaged by Ring Saturation, Fragmentation, or Ring Contraction Are Functions of Endonuclease-Iii in *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 259 (1984) 5543-5548. [412] R.P. Cunningham, H. Asahara, J.F. Bank, C.P. Scholes, J.C. Salerno, K. Surerus, E. Munck, J. Mccracken, J. Peisach, M.H. Emptage, Endonuclease-III Is an Iron Sulfur Protein, Biochemistry, 28 (1989) 4450-4455.

[413] V. Bailly, W.G. Verly, *Escherichia coli* Endonuclease-III Is Not an Endonuclease but a Beta-Elimination Catalyst, Biochem. J., 242 (1987) 565-572.

[414] H.L. Katcher, S.S. Wallace, Characterization of the *Escherichia coli* X-Ray Endonuclease, Endonuclease III, Biochemistry, 22 (1983) 4071-4081.

[415] Y.W. Kow, S.S. Wallace, Mechanism of Action of *Escherichia coli* Endonuclease-III, Biochemistry, 26 (1987) 8200-8206.

[416] A. Mazumder, J.A. Gerlt, M.J. Absalon, J. Stubbe, R.P. Cunningham, J. Withka, P.H. Bolton, Stereochemical Studies of the Beta-Elimination Reactions at Aldehydic Abasic Sites in DNA - Endonuclease III from *Escherichia coli*, Sodium-Hydroxide, and Lys-Trp-Lys, Biochemistry, 30 (1991) 1119-1126.

[417] C.F. Kuo, D.E. McRee, C.L. Fisher, S.F. O'Handley, R.P. Cunningham, J.A. Tainer, Atomic structure of the DNA repair [4Fe-4S] enzyme endonuclease III, Science, 258 (1992) 434-440.

[418] M.M. Thayer, H. Ahern, D. Xing, R.P. Cunningham, J.A. Tainer, Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure, EMBO J., 14 (1995) 4108-4120.

[419] J.C. Fromme, G.L. Verdine, Structure of a trapped endonuclease III-DNA covalent intermediate, EMBO J., 22 (2003) 3461-3471.

[420] A. Banerjee, W.L. Santos, G.L. Verdine, Structure of a DNA glycosylase searching for lesions, Science, 311 (2006) 1153-1157.

[421] J.B. Parker, M.A. Bianchet, D.J. Krosky, J.I. Friedman, L.M. Amzel, J.T. Stivers, Enzymatic capture of an extrahelical thymine in the search for uracil in DNA, Nature, 449 (2007) 433-437.

[422] Y. Qi, M.C. Spong, K. Nam, A. Banerjee, S. Jiralerspong, M. Karplus, G.L. Verdine, Encounter and extrusion of an intrahelical lesion by a DNA repair enzyme, Nature, 462 (2009) 762-766.

[423] B.R. Bowman, S. Lee, S. Wang, G.L. Verdine, Structure of *Escherichia coli* AlkA in complex with undamaged DNA, J. Biol. Chem., 285 (2010) 35783-35791.

[424] Y. Qi, K. Nam, M.C. Spong, A. Banerjee, R.J. Sung, M. Zhang, M. Karplus, G.L. Verdine, Strandwise translocation of a DNA glycosylase on undamaged DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 109 (2012) 1086-1091. [425] R.J. Sung, M. Zhang, Y. Qi, G.L. Verdine, Structural and biochemical analysis of DNA helix invasion by the bacterial 8-oxoguanine DNA glycosylase MutM, J. Biol. Chem., 288 (2013) 10012-10023.

[426] A.J. Lee, D.M. Warshaw, S.S. Wallace, Insights into the glycosylase search for damage from single-molecule fluorescence microscopy, DNA Repair (Amst), 20 (2014) 23-31.

[427] S.R. Nelson, A.R. Dunn, S.D. Kathe, D.M. Warshaw, S.S. Wallace, Two glycosylase families diffusively scan DNA using a wedge residue to probe for and identify oxidatively damaged bases, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 111 (2014) E2091-2099.

[428] W. Zhang, Z. Liu, L. Crombet, M.F. Amaya, Y. Liu, X. Zhang, W. Kuang, P. Ma, L. Niu,C. Qi, Crystal structure of the mismatch-specific thymine glycosylase domain of human methyl-CpG-binding protein MBD4, Biochem. Bioph. Res. Co., 412 (2011) 425-428.

[429] A.B. Sjolund, A.G. Senejani, J.B. Sweasy, MBD4 and TDG: multifaceted DNA glycosylases with ever expanding biological roles, Mutat. Res., 743-744 (2013) 12-25.

[430] P.W. Hill, R. Amouroux, P. Hajkova, DNA demethylation, Tet proteins and 5hydroxymethylcytosine in epigenetic reprogramming: an emerging complex story, Genomics, 104 (2014) 324-333.

[431] D.P. Turner, S. Cortellino, J.E. Schupp, E. Caretti, T. Loh, T.J. Kinsella, A. Bellacosa, The DNA N-glycosylase MED1 exhibits preference for halogenated pyrimidines and is involved in the cytotoxicity of 5-iododeoxyuridine, Cancer Res., 66 (2006) 7686-7693.

[432] B.A. Manvilla, A. Maiti, M.C. Begley, E.A. Toth, A.C. Drohat, Crystal structure of human methyl-binding domain IV glycosylase bound to abasic DNA, J. Mol. Biol., 420 (2012) 164-175.
[433] Д.А. Яковлев, А.А. Кузнецова, О.С. Федорова, Н.А. Кузнецов, Поиск поврежденных

участков ДНК метил-СрG-связывающим ферментом MBD4, Acta naturae, 9 (2017) 95-105.

[434] F. Petronzelli, A. Riccio, G.D. Markham, S.H. Seeholzer, J. Stoerker, M. Genuardi, A.T. Yeung, Y. Matsumoto, A. Bellacosa, Biphasic kinetics of the human DNA repair protein MED1 (MBD4), a mismatch-specific DNA N-glycosylase, J. Biol. Chem., 275 (2000) 32422-32429.

[435] S.E. Halford, M.D. Szczelkun, How to get from A to B: strategies for analysing protein motion on DNA, Eur. Biophys. J., 31 (2002) 257-267.

[436] J.D. Schonhoft, J.T. Stivers, Timing facilitated site transfer of an enzyme on DNA, Nat. Chem. Biol., 8 (2012) 205-210.

[437] M.M. Rowland, J.D. Schonhoft, P.L. McKibbin, S.S. David, J.T. Stivers, Microscopic mechanism of DNA damage searching by hOGG1, Nucleic Acids Res., 42 (2014) 9295-9303.

[438] P.C. Blainey, A.M. van Oijen, A. Banerjee, G.L. Verdine, X.S. Xie, A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 103 (2006) 5752-5757.

[439] E.I. Zaika, R.A. Perlow, E. Matz, S. Broyde, R. Gilboa, A.P. Grollman, D.O. Zharkov, Substrate discrimination by formamidopyrimidine-DNA glycosylase: a mutational analysis, J. Biol. Chem., 279 (2004) 4849-4861.

[440] J.C. Fromme, A. Banerjee, S.J. Huang, G.L. Verdine, Structural basis for removal of adenine mispaired with 8-oxoguanine by MutY adenine DNA glycosylase, Nature, 427 (2004) 652-656.

[441] S. Lee, G.L. Verdine, Atomic substitution reveals the structural basis for substrate adenine recognition and removal by adenine DNA glycosylase, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 106 (2009) 18497-18502.

[442] J.A. McCann, P.J. Berti, Transition-state analysis of the DNA repair enzyme MutY, J. Am. Chem. Soc., 130 (2008) 5789-5797.

[443] R.D. Woods, V.L. O'Shea, A. Chu, S. Cao, J.L. Richards, M.P. Horvath, S.S. David, Structure and stereochemistry of the base excision repair glycosylase MutY reveal a mechanism similar to retaining glycosidases, Nucleic Acids Res., 44 (2016) 801-810.

[444] S.L. Porello, S.D. Williams, H. Kuhn, M.L. Michaels, S.S. David, Specific recognition of substrate analogs by the DNA mismatch repair enzyme MutY, J. Am. Chem. Soc., 118 (1996) 10684-10692.

[445] L. Wang, S.J. Lee, G.L. Verdine, Structural Basis for Avoidance of Promutagenic DNA Repair by MutY Adenine DNA Glycosylase, J. Biol. Chem., 290 (2015) 17096-17105.

[446] A.S. Bernards, J.K. Miller, K.K. Bao, I. Wong, Flipping duplex DNA inside out a double base-flipping reaction mechanism by *Escherichia coli* MutY adenine glycosylase, J. Biol. Chem., 277 (2002) 20960-20964.

[447] S.L. Porello, A.E. Leyes, S.S. David, Single-turnover and pre-steady-state kinetics of the reaction of the adenine glycosylase MutY with mismatch-containing DNA substrates, Biochemistry, 37 (1998) 14756-14764.

[448] N.H. Chmiel, M.P. Golinelli, A.W. Francis, S.S. David, Efficient recognition of substrates and substrate analogs by the adenine glycosylase MutY requires the C-terminal domain, Nucleic Acids Res., 29 (2001) 553-564.

[449] J.A.B. McCann, P.J. Berti, Adenine release is fast in MutY-catalyzed hydrolysis of G:A and 8-oxo-G:A DNA mismatches, J. Biol. Chem., 278 (2003) 29587-29592.

[450] Т.Е. Тюгашев, А.А. Кузнецова, Н.А. Кузнецов, О.С. Федорова, Особенности взаимодействия аденин-ДНК-гликозилазы MutY из *E. coli* с ДНК-субстратами, Биоорган. химия., 43 (2017) 18-28.

[451] R.J. Melamede, Z. Hatahet, Y.W. Kow, H. Ide, S.S. Wallace, Isolation and characterization of endonuclease VIII from *Escherichia coli*, Biochemistry, 33 (1994) 1255-1264.

[452] S. Burgess, P. Jaruga, M.L. Dodson, M. Dizdaroglu, R.S. Lloyd, Determination of active site residues in *Escherichia coli* Endonuclease VIII, J. Biol. Chem., 277 (2002) 2938-2944.

[453] K.Y. Kropachev, D.O. Zharkov, A.P. Grollman, Catalytic mechanism of *Escherichia coli* Endonuclease VIII: roles of the intercalation loop and the zinc finger, Biochemistry, 45 (2006) 12039-12049.

[454] G. Golan, D.O. Zharkov, H. Feinberg, A.S. Fernandes, E.I. Zaika, J.H. Kycia, A.P. Grollman, G. Shoham, Structure of the uncomplexed DNA repair enzyme Endonuclease VIII indicates significant interdomain flexibility, Nucleic Acids Res., 33 (2005) 5006-5016.

[455] D.O. Zharkov, G. Golan, R. Gilboa, A.S. Fernandes, S.E. Gerchman, J.H. Kycia, R.A. Rieger, A.P. Grollman, G. Shoham, Structural analysis of an *Escherichia coli* Endonuclease VIII covalent reaction intermediate, EMBO J., 21 (2002) 789-800.

[456] O.A. Kladova, A.A. Kuznetsova, O.S. Fedorova, N.A. Kuznetsov, Mutational and Kinetic Analysis of Lesion Recognition by *Escherichia coli* Endonuclease VIII, Genes, 8 (2017).

[457] S. Boiteux, T.R. O'Connor, F. Lederer, A. Gouyette, J. Laval, Homogeneous *Escherichia coli* FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/apyrimidinic sites, J. Biol. Chem., 265 (1990) 3916-3922.

[458] R. Gilboa, D.O. Zharkov, G. Golan, A.S. Fernandes, S.E. Gerchman, E. Matz, J.H. Kycia, A.P. Grollman, G. Shoham, Structure of formamidopyrimidine-DNA glycosylase covalently complexed to DNA, J. Biol. Chem., 277 (2002) 19811-19816.

[459] J. Tchou, V. Bodepudi, S. Shibutani, I. Antoshechkin, J. Miller, A.P. Grollman, F. Johnson, Substrate specificity of Fpg protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA, J. Biol. Chem., 269 (1994) 15318-15324.

[460] O.S. Fedorova, G.A. Nevinsky, V.V. Koval, A.A. Ishchenko, N.L. Vasilenko, K.T. Douglas, Stopped-flow kinetic studies of the interaction between *Escherichia coli* Fpg protein and DNA substrates, Biochemistry, 41 (2002) 1520-1528.

[461] J.C. Fromme, G.L. Verdine, DNA lesion recognition by the bacterial repair enzyme MutM,J. Biol. Chem., 278 (2003) 51543-51548.

[462] V.V. Koval, N.A. Kuznetsov, D.O. Zharkov, A.A. Ishchenko, K.T. Douglas, G.A. Nevinsky, O.S. Fedorova, Pre-steady-state kinetics shows differences in processing of various DNA lesions by *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase, Nucleic Acids Res., 32 (2004) 926-935.

[463] О.С. Федорова, Ю.Д. Цветков, Импульсный двойной электрон-электронный резонанс в структурных исследованиях спин-меченых нуклеиновых кислот, Acta naturae, 5 (2013) 9-32.

[464] N.A. Kuznetsov, A.D. Milov, V.V. Koval, R.I. Samoilova, Y.A. Grishin, D.G. Knorre, Y.D. Tsvetkov, O.S. Fedorova, S.A. Dzuba, PELDOR study of conformations of double-spinlabeled single- and double-stranded DNA with non-nucleotide inserts, Phys. Chem. Chem. Phys., 11 (2009) 6826-6832.

[465] N.A. Kuznetsov, A.D. Milov, N.P. Isaev, Y.N. Vorobjev, V.V. Koval, S.A. Dzuba, O.S. Fedorova, Y.D. Tsvetkov, PELDOR analysis of enzyme-induced structural changes in damaged DNA duplexes, Mol. Biosyst., 7 (2011) 2670-2680.

[466] N.A. Kuznetsov, D.O. Zharkov, V.V. Koval, M. Buckle, O.S. Fedorova, Reversible Chemical Step and Rate-Limiting Enzyme Regeneration in the Reaction Catalyzed by Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase., Biochemistry, 48 (2009) 11335-11343.

[467] K.A. Johnson, Kinetic Analysis of Macromolecules, Oxford University Press, Oxford, 2003.

[468] C.A. Fierke, G.G. Hammes, Transient Kinetic Approaches to Enzyme Mechanisms, Method Enzymol, 249 (1995) 3-37.

[469] Y. Qi, M.C. Spong, K. Nam, M. Karplus, G.L. Verdine, Entrapment and structure of an extrahelical guanine attempting to enter the active site of a bacterial DNA glycosylase, MutM, J. Biol. Chem., 285 (2010) 1468-1478.

[470] K. Pereira de Jesus, L. Serre, C. Zelwer, B. Castaing, Structural insights into abasic site for Fpg specific binding and catalysis: comparative high-resolution crystallographic studies of Fpg bound to various models of abasic site analogues-containing DNA, Nucleic Acids Res., 33 (2005) 5936-5944.

[471] A.R. Dunn, N.M. Kad, S.R. Nelson, D.M. Warshaw, S.S. Wallace, Single Qdot-labeled glycosylase molecules use a wedge amino acid to probe for lesions while scanning along DNA, Nucleic Acids Res., 39 (2011) 7487-7498.

[472] P.L. Privalov, A.I. Dragan, C. Crane-Robinson, K.J. Breslauer, D.P. Remeta, C.A. Minetti, What drives proteins into the major or minor grooves of DNA?, J. Mol. Biol., 365 (2007) 1-9.

[473] A. Prakash, S. Doublie, S.S. Wallace, The Fpg/Nei family of DNA glycosylases: substrates, structures, and search for damage, Prog. Mol. Biol. Transl. Sci., 110 (2012) 71-91.

[474] T.K. Hazra, S. Mitra, Purification and characterization of NEIL1 and NEIL2, members of a distinct family of mammalian DNA glycosylases for repair of oxidized bases, DNA Repair (Amst), 408 (2006) 33-48.

[475] S. Doublie, V. Bandaru, J.P. Bond, S.S. Wallace, The crystal structure of human endonuclease VIII-like 1 (NEIL1) reveals a zincless finger motif required for glycosylase activity, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101 (2004) 10284-10289.

[476] A. Prakash, B.L. Carroll, J.B. Sweasy, S.S. Wallace, S. Doublie, Genome and cancer single nucleotide polymorphisms of the human NEIL1 DNA glycosylase: Activity, structure, and the effect of editing, DNA Repair (Amst), 14 (2014) 17-26.

[477] L.A. Loeb, B.D. Preston, Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites, Annu. Rev. Genet., 20 (1986) 201-230.

[478] R.M. Schaaper, T.A. Kunkel, L.A. Loeb, Infidelity of DNA synthesis associated with bypass of apurinic sites, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80 (1983) 487-491.

[479] C.D. Mol, S.S. Parikh, C.D. Putnam, T.P. Lo, J.A. Tainer, DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 28 (1999) 101-128.

[480] Н.С. Дырхеева, С.Н. Ходырева, О.И. Лаврик Полифункциональная апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 человека: роль дополнительных функций, Молекуляр. биология, 41 (2007) 450-466.

[481] M.A. Gorman, S. Morera, D.G. Rothwell, E. de La Fortelle, C.D. Mol, J.A. Tainer, I.D. Hickson, P.S. Freemont, The crystal structure of the human DNA repair endonuclease HAP1 suggests the recognition of extra-helical deoxyribose at DNA abasic sites, EMBO J., 16 (1997) 6548-6558.

[482] B.A. Manvilla, E. Pozharski, E.A. Toth, A.C. Drohat, Structure of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 with the essential Mg2+ cofactor, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 69 (2013) 2555-2562.

[483] S.E. Tsutakawa, D.S. Shin, C.D. Mol, T. Izumi, A.S. Arvai, A.K. Mantha, B. Szczesny, I.N. Ivanov, D.J. Hosfield, B. Maiti, M.E. Pique, K.A. Frankel, K. Hitomi, R.P. Cunningham, S. Mitra, J.A. Tainer, Conserved structural chemistry for incision activity in structurally non-homologous apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 and endonuclease IV DNA repair enzymes, J. Biol. Chem., 288 (2013) 8445-8455.

[484] S.T. Mundle, M.H. Fattal, L.F. Melo, J.D. Coriolan, N.E. O'Regan, P.R. Strauss, Novel role of tyrosine in catalysis by human AP endonuclease 1, DNA Repair (Amst), 3 (2004) 1447-1455.

[485] S.T. Mundle, J.C. Delaney, J.M. Essigmann, P.R. Strauss, Enzymatic mechanism of human apurinic/apyrimidinic endonuclease against a THF AP site model substrate, Biochemistry, 48 (2009) 19-26.

[486] A.S. Lipton, R.W. Heck, S. Primak, D.R. McNeill, D.M. Wilson, 3rd, P.D. Ellis, Characterization of Mg2+ binding to the DNA repair protein apurinic/apyrimidic endonuclease 1 via solid-state 25Mg NMR spectroscopy, J. Am. Chem. Soc., 130 (2008) 9332-9341.

[487] N. Oezguen, C.H. Schein, S.R. Peddi, T.D. Power, T. Izumi, W. Braun, A "moving metal mechanism" for substrate cleavage by the DNA repair endonuclease APE-1, Proteins, 68 (2007) 313-323.

[488] Y. Masuda, R.A. Bennett, B. Demple, Rapid dissociation of human apurinic endonuclease (Ape1) from incised DNA induced by magnesium, J. Biol. Chem., 273 (1998) 30360-30365.

[489] J.P. Erzberger, D.M. Wilson, 3rd, The role of Mg^{2+} and specific amino acid residues in the catalytic reaction of the major human abasic endonuclease: new insights from EDTA-resistant incision of acyclic abasic site analogs and site-directed mutagenesis, J. Mol. Biol., 290 (1999) 447-457.

[490] H. He, Q. Chen, M.M. Georgiadis, High-resolution crystal structures reveal plasticity in the metal binding site of apurinic/apyrimidinic endonuclease I, Biochemistry, 53 (2014) 6520-6529.

[491] B.D. Freudenthal, W.A. Beard, M.J. Cuneo, N.S. Dyrkheeva, S.H. Wilson, Capturing snapshots of APE1 processing DNA damage, Nat. Struct. Mol. Biol., 22 (2015) 924-931.

[492] N.A. Timofeyeva, V.V. Koval, D.G. Knorre, D.O. Zharkov, M.K. Saparbaev, A.A. Ishchenko, O.S. Fedorova, Conformational dynamics of human AP endonuclease in base excision and nucleotide incision repair pathways, J. Biomol. Struct. Dyn., 26 (2009) 637-652.

[493] L.Y. Kanazhevskaya, V.V. Koval, D.O. Zharkov, P.R. Strauss, O.S. Fedorova, Conformational transitions in human AP endonuclease 1 and its active site mutant during abasic site repair, Biochemistry, 49 (2010) 6451-6461.

[494] L.Y. Kanazhevskaya, V.V. Koval, Y.N. Vorobjev, O.S. Fedorova, Conformational dynamics of abasic DNA upon interactions with AP endonuclease 1 revealed by stopped-flow fluorescence analysis, Biochemistry, 51 (2012) 1306-1321.

[495] J. Duguid, V.A. Bloomfield, J. Benevides, G.J. Thomas, Raman Spectral Studies of Nucleic-Acids .44. Raman-Spectroscopy of DNA-Metal Complexes .1. Interactions and Conformational Effects of the Divalent-Cations - Mg, Ca, Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Pd, and Cd, Biophys. J., 65 (1993) 1916-1928.

[496] E.V. Hackl, S.V. Kornilova, Y.P. Blagoi, DNA structural transitions induced by divalent metal ions in aqueous solutions, Int. J. Biol. Macromol., 35 (2005) 175-191.

[497] R.D. Shannon, Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides, Acta Cryst., 32 (1976) 751-767.

[498] G. Barzilay, C.D. Mol, C.N. Robson, L.J. Walker, R.P. Cunningham, J.A. Tainer, I.D. Hickson, Identification of critical active-site residues in the multifunctional human DNA repair enzyme HAP1, Nat. Struct. Biol., 2 (1995) 561-568.

[499] K.M. Schermerhorn, S. Delaney, Transient-state kinetics of apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease 1 acting on an authentic AP site and commonly used substrate analogs: the effect of diverse metal ions and base mismatches, Biochemistry, 52 (2013) 7669-7677.

[500] Н.А. Тимофеева, В.В. Коваль, А.А. Ищенко, М.К. Сапарбаев, О.С. Федорова, Кинетический механизм действия апуриновой-апиримидиновой эндонуклеазы человека в процессе инцизионной репарации нуклеотидов, Биохимия, 76 (2011) 211-222.

[501] N.J. Greenfield, Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data, Anal. Biochem., 235 (1996) 1-10.

[502] J.T. Pelton, L.R. McLean, Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure, Anal. Biochem., 277 (2000) 167-176.

[503] N.S. Dyrkheeva, A.A. Lomzov, D.V. Pyshnyi, S.N. Khodyreva, O.I. Lavrik, Efficiency of exonucleolytic action of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 towards matched and mismatched dNMP at the 3' terminus of different oligomeric DNA structures correlates with thermal stability of DNA duplexes, Biochim. Biophys. Acta, 1764 (2006) 699-706.

[504] D.S. Chen, T. Herman, B. Demple, Two distinct human DNA diesterases that hydrolyze 3'-blocking deoxyribose fragments from oxidized DNA, Nucleic Acids Res., 19 (1991) 5907-5914.
[505] A.R. Evans, M. Limp-Foster, M.R. Kelley, Going APE over ref-1, Mutat. Res., 461 (2000) 83-108.

[506] М.С. Купрюшкин, Д.В. Пышный, Д.А. Стеценко, Фосфорилгуанидины. Новый класс аналогов нуклеиновых кислот., Acta naturae, 6 (2014) 123-125.

[507] A.D. Miroshnikova, A.A. Kuznetsova, N.A. Kuznetsov, O.S. Fedorova, Thermodynamics of Damaged DNA Binding and Catalysis by Human AP Endonuclease 1, Acta naturae, 8 (2016) 103-110.

[508] A. Li, J.L. Ziehr, K.A. Johnson, A new general method for simultaneous fitting of temperature and concentration dependence of reaction rates yields kinetic and thermodynamic parameters for HIV reverse transcriptase specificity, J. Biol. Chem., 292 (2017) 6695-6702.