**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК**
**СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ**
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ**
**ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ**

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ**
**РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ**
**УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ**
**«НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ**
**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

***на правах рукописи***

**Юдкина Анна Владимировна**

# ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ С БЛОКИРУЮЩИМИ ПОВРЕЖДЕНИЯМИ ДНК РАЗНЫХ КЛАССОВ

**03.01.04 – Биохимия**

**ДИССЕРТАЦИЯ**
**на соискание ученой степени**
**кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:**
**доктор биологических наук, чл.-корр. РАН Жарков Д. О.**

**Новосибирск – 2020**

# ОГЛАВЛЕНИЕ

**1. ВВЕДЕНИЕ** ... 5
**2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ** ... 9
2.1. Блокирующие повреждения ДНК ... 9
2.1.1. Апурин-апиримидиновые сайты ... 9
2.1.2. Аддукты апурин-апиримидиновых сайтов с метоксиамином ... 14
2.1.3. Ковалентные сшивки нуклеиновых кислот ... 16
2.1.3.1. Ковалентные сшивки нуклеиновых кислот, индуцируемые координационными соединениями платины ... 18
2.1.4. ДНК-белковые сшивки ... 22
2.1.4.1. Образование ДНК-белковых сшивок при общем окислительном стрессе ... 25
2.1.4.2. Образование ДНК-белковых сшивок, индуцируемое альдегидами ... 26
2.1.4.3. Образование ДНК-белковых сшивок, индуцируемое металлами ... 27
2.1.4.4. Образование ДНК-белковых сшивок противоопухолевыми агентами ... 28
2.1.4.5. Образование ДНК-белковых сшивок при ионизирующем излучении ... 28
2.1.4.6. Образование ДНК-белковых сшивок при ошибках ферментов ... 29
2.1.4.7. Репарация ДНК-белковых сшивок ... 30
2.1.4.8. Прохождение ДНК-белковых сшивок в контексте репликативного аппарата 33
2.1.5. Нековалентно связанные с ДНК белки как возможные препятствия для ДНК-полимераз ... 34
2.1.5.1. ДНК-гликозилазы ... 37
2.1.5.2 Система иммунитета бактерий CRISPR/Cas ... 39
2.2. ДНК-полимеразы ... 41
2.2.1 Классификация и свойства ДНК-полимераз ... 42
2.2.2. Проблема прохождения повреждений ДНК-полимеразами ... 45
**3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ** ... 49
3.1. Материалы ... 49
3.1.1. Стандартные буферы и смеси ... 49
3.1.2. Ферменты ... 50
3.1.3. Плазмиды и бактериальные штаммы ... 50
3.1.4. Хроматографические сорбенты и колонки ... 50
3.1.5. Стандартные буферы для ДНК-полимераз ... 51
3.1.6. Олигодезоксинуклеотиды ... 51
3.2. Методы ... 53

3.2.1. Получение двуцепочечных олигодезоксирибонуклеотидных субстратов ..... 53
3.2.2. Реакция образования основания Шиффа и ковалентной ДНК-белковой сшивки ..... 53
3.2.3. Проверка проходимости ДНК-белковых сшивок ДНК-полимеразами ..... 54
3.2.4. Вытеснение ДНК-гликозилазы OGG1 из комплекса с продуктом ..... 54
3.2.5. Определение типа продукта реакции OGG1 в присутствии ДНК-полимеразы β ..... 55
3.2.6. Вытеснение ДНК-гликозилазы NEIL1 из комплекса с продуктом ..... 55
3.2.7. Вытеснение нуклеазы Cas9 из комплекса с продуктом ..... 56
3.2.8. Активность ДНК-полимераз в присутствии Cas9 ..... 56
3.2.9. Вытеснение Cas9 из комплекса с плазмидной ДНК ДНК-полимеразой RB69 56
3.2.10. Активность ДНК-полимераз в присутствии полиоксониобата платины ..... 57
3.2.11. Анализ взаимодействия полиоксиониобата платины с ДНК ..... 57
3.2.12. Получение аддуктов АП-сайтов с метоксиамином ..... 58
3.2.13. Определение кинетических параметров включения dNMP ДНК-полимеразами напротив аддукта АП-сайта с метоксиамином ..... 59
3.2.14. Определение спектра включения dNMP ДНК-полимеразами напротив аддукта АП-сайта с метоксиамином ..... 59
3.2.15. Расщепление аддукта АП-сайта с метоксиамином ферментами эксцизионной репарации оснований ..... 60
3.2.16. Молекулярный докинг структур ..... 60
**4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ** ..... 61
4.1. Взаимодействие ДНК-полимераз с ДНК-белковыми сшивками ..... 61
4.1.1. Создание модельной ДНК-белковой сшивки ..... 61
4.1.2. Элонгация праймера на одноцепочечном субстрате, содержащем ДНК-белковую сшивку, ДНК-полимеразами разных семейств ..... 64
4.1.3. Элонгация праймера на двуцепочечном субстрате, содержащем ДНК-белковую сшивку в матричной цепи, ДНК-полимеразами разных семейств ..... 69
4.1.4. Элонгация праймера на двуцепочечном субстрате, содержащем ДНК-белковую сшивку в цепи, комплементарной матричной, ДНК-полимеразами разных семейств ..... 71
4.1.5. Структурные аспекты взаимодействия ДНК-полимераз с ДНК-белковыми сшивками ..... 73

4.2. Взаимодействие белков, движущихся по ДНК, с белками, прочно нековалентно связанными с ДНК ..... 78
4.2.1. Взаимодействие белков, движущихся по ДНК, с медленнообращающейся ДНК-гликозилазой OGG1 ..... 79
4.2.2. Взаимодействие белков, движущихся по ДНК, с ДНК-гликозилазой NEIL1 .. 87
4.2.3. Взаимодействие белков, движущихся по ДНК, с медленнообращающейся ДНК-нуклеазой Cas9 ..... 88
4.3. Активность ДНК-полимераз в присутствии полиоксометаллатов платины ..... 93
4.3.1. Подавление активности ДНК-полимераз полиоксониобатом платины ..... 94
4.3.2. ДНК-полимеразы как возможная мишень полиоксониобата платины ..... 96
4.3.3. ДНК как потенциальная молекулярная мишень полиоксониобатов платины . 98
4.4. Исследование взаимодействия ферментов метаболизма ДНК с аддуктом АП-сайта с метоксиамином ..... 100
4.4.1. Получение и характеристика аддукта АП-сайта с метоксиамином ..... 101
4.4.2. Кинетические параметры включения dNMP напротив АП-сайта и аддукта АП-сайта с метоксиамином ДНК-полимеразами в условиях стационарной кинетики ..... 103
4.4.3. Спектр включения dNMP напротив АП-сайта и аддукта АП-сайта с метоксиамином ДНК-полимеразами в ходе процессивного синтеза ..... 109
4.4.4. Влияние аддукта АП-сайта с метоксиамином на активность некоторых ДНК-гликозилаз ..... 113
**5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ** ..... 115
**6. ВЫВОДЫ** ..... 117
**7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ** ..... 118
**8. СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ** ..... 120

# 1. ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что ДНК — это основной носитель генетической информации, она обладает ограниченной химической стабильностью и непрерывно повреждается под воздействием эндогенных и экзогенных генотоксичных агентов, а также вследствие ошибок ферментов метаболизма ДНК в процессе репликации. ДНК может подвергаться окислению, гидролизу, алкилированию, дезаминированию и т. п.

В результате этих реакций образуется широкий спектр повреждений ДНК — модифицированные основания, апурин-апиримидиновые (АП-) сайты, разрывы ДНК, сшивки внутри цепи ДНК, между цепями, сшивки ДНК с белками и аддукты с молекулами ксенобиотиков. По своим последствиям для репликативного аппарата клетки повреждения принято делить на блокирующие, которые препятствуют синтезу ДНК, и предмутагенные, которые направляют включение неверного нуклеотида. Первые при отсутствии репарации ведут к гибели клетки, а вторые вызывают мутации, которые могут в дальнейшем служить причиной канцерогенеза и старения. Крупные аддукты и сшивки, как правило, представляют собой блокирующие повреждения, а модифицированные основания и АП-сайты, в зависимости от природы повреждения и вида ДНК-полимеразы, могут вести себя либо как блокирующие, либо как предмутагенные. Кроме повреждений ДНК, ферменты матричного синтеза зачастую сталкиваются с препятствиями в виде белковых комплексов, прочно связанных с ДНК — нуклеосомами, другими компонентами хроматина и ядерного матрикса и т. д. В ряде случаев механизмы взаимодействия ДНК- и РНК-полимераз с такими прочно связанными белками достаточно хорошо изучены, но общие принципы взаимодействия полимераз с белковыми комплексами, препятствующими их продвижению, остаются до сих пор неясными.

Помимо повреждения ДНК по естественным причинам, возникновение в ДНК блокирующих модификаций и прочное нековалентное связывание с ней молекул разной природы имеет место при многих видах химио- и радиотерапии онкологических заболеваний. Блокируют синтез ДНК многие продукты электрофильной модификации химиотерапевтическими соединениями (алкилирующие агенты, соединения платины), сшивки с ДНК-топоизомеразами, вызываемые ингибиторами этих ферментов, пептидные малобороздочные лиганды. В связи с этим понимание механизмов действия блокирующих повреждений имеет не только фундаментальный, но и практический интерес.

Исследования влияния блокирующих повреждений ДНК на клетку идут интенсивно, однако разнородный характер таких повреждений затрудняет выделение общих черт их взаимодействия с белками. В области изучения ДНК-белковых сшивок главным препятствием остается отсутствие хороших экспериментальных моделей и гетерогенность повреждений,

образуемых внутри клетки под влиянием генотоксичных факторов, вызывающих сшивки. Для аддуктов и модифицированных нуклеотидов хорошо изучены механизмы их взаимодействия с ДНК-полимеразами на молекулярном уровне только для нескольких экспериментальных моделей, оказавшихся наиболее удобными, а другие повреждения этих классов, несмотря на их возможные уникальные особенности, обычно рассматриваются как в принципе аналогичные исследованным моделям. Таким образом, в настоящее время любая информация о механизмах влияния блокирующих повреждений на синтез ДНК важна для дальнейшего понимания причин чувствительности клеток к генотоксичному стрессу, а также может быть полезна для разработки новых противоопухолевых препаратов.

**Цель** настоящей работы заключается в изучении взаимодействия ДНК-полимераз с препятствиями разной природы, потенциально блокирующими их перемещение по ДНК. Эта цель подразумевает решение нескольких **задач**, различающихся в зависимости от природы блокирующих структур:

1) изучить эффективность элонгации праймера ДНК-полимеразами разных семейств при наличии в матричной либо вытесняемой цепи ДНК-белковой сшивки;
2) изучить способность белков, активно передвигающихся по ДНК или пассивно диффундирующих по контуру ДНК, преодолевать препятствие в виде прочно нековалентно связанного белка;
3) установить возможность образования аддуктов ДНК с крупными неорганическими комплексами — полиоксометаллатами платины и влияние такой модификации на действие ДНК-полимераз;
4) изучить влияние аддуктов АП-сайта с метоксиамином, ингибирующих эксцизионную репарацию оснований ДНК, на эффективность и специфичность включения dNMP ДНК-полимеразами разных семейств.

**Научная новизна работы**. В рамках исследования разработан высокоэффективный способ получения химически детерминированных модельных ДНК-белковых сшивок. Впервые картированы места остановки ДНК-полимераз семейств A, B, X и Y в области ДНК-белковых сшивок. Установлена способность ДНК-полимераз вытеснять прочно связанные белки (на примере модельных белков OGG1, NEIL1, Cas9) из комплекса с ДНК при элонгации и при пассивной диффузии. Впервые обнаружена способность полиоксометаллатов платины образовывать ковалентные аддукты с ДНК и подавление при этом синтеза ДНК ДНК-полимеразами. Впервые сравнено включение dNMP напротив альдегидного АП-сайта, и АП-сайта, модифицированного метоксиамином, и показано сохранение профиля специфичности для ДНК-полимераз семейств A, B, X и Y.

**Теоретическая и практическая значимость работы**. По сравнению с другими повреждениями, ДНК-белковые сшивки представляют собой наименее изученный тип. В работе сформулированы общие структурные принципы взаимодействия ДНК-полимераз с ДНК-белковыми сшивками, включающие деформацию полипептидных глобул, которые в целом применимы и к другим белкам, передвигающимся по ДНК. Аналогичную модель можно приложить и к случаю столкновения белков, нековалентно связанных с ДНК. Что касается низкомолекулярных агентов, повреждающих ДНК, данная работа вводит в список повреждающих ДНК комплексов металлов еще один класс — полиоксометаллаты, уникальные свойства лигандов которых заметно отличают их взаимодействие с клеткой от традиционных комплексов платины. Другой модифицирующий ДНК агент — метоксиамин — уже проходит клинические испытания как потенциальный сенсибилизатор опухолевых клеток к повреждению ДНК, но до настоящего исследования оставались неизученными многие аспекты его действия, в том числе последствия взаимодействия его аддуктов с ДНК-полимеразами. Актуальность работы в значительной мере обусловлена и тем, что ее результаты могут послужить отправной точкой для множества исследований взаимодействия клеточных систем с блокирующими повреждениями ДНК. В самом деле, наличие хорошо охарактеризованной модели ДНК-белковых сшивок поможет впоследствии установить и уточнить механизмы их репарации, клеточного ответа на них, оценить их вклад в цитотоксичность при химио- и радиотерапии онкологических заболеваний. Развитие части проекта, связанной с повреждающими ДНК агентами — комплексами платины и метоксиамином — дает возможность разработки противоопухолевых средств и средств для лечения инфекционных заболеваний.

**Методология и методы исследования**. В работе широко использовались стандартные биохимические методы характеристики свойств белков, методы ферментативной кинетики, методы генной инженерии, продукции и выделения рекомбинантных белков. Также применялись компьютерные методы исследования биополимеров.

**Положения, выносимые на защиту**

1) ДНК-полимеразы семейств A, B, X и Y не способны пройти ДНК-белковую сшивку, находящуюся в ДНК в матричной цепи и не способны вытеснить впереди лежащую цепь, содержащую ДНК-белковую сшивку. ДНК-полимеразы варьируют по своей способности вести синтез до точки сшивки, причем некоторые из них способны продвигаться непосредственно до точки сшивки, что не может быть достигнуто без значительного искажения структуры полимеразы или сшитого с ДНК белка.
2) Как белки, активно передвигающиеся по ДНК с затратой энергии, так и белки, пассивно диффундирующие по контуру ДНК, способны вытеснять другие

нековалентно связанные белки из комплекса с ДНК, причем эффективность этого процесса зависит от сродства вытесняемого белка к ДНК.

3) Комплексные соединения платины с полиоксониобатными лигандами образуют аддукты с ДНК, что подавляет активность ДНК-полимераз.

4) Присоединение метоксиамина к АП-сайту в ДНК не меняет специфичности ДНК-полимераз к включаемому dNMP по сравнению с немодифицированным АП-сайтом, но влияет на эффективность этой реакции.

**Личный вклад соискателя.** Представленные в работе экспериментальные данные получены лично автором. Масс-спектрометрический анализ осуществлялся на базе Объединенного Центра геномных, протеомных и метаболомных исследований ИХБФМ СО РАН. Молекулярный докинг структур выполнялся совместно с руководителем работы д. б. н., чл-корр. РАН Жарковым Д. О.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Основные положения работы представлены на 5 российских и международных конференциях: Всероссийский симпозиум «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015), «EEMS 2015: 44$^{th}$ Annual Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society» (Прага, Чехия, 2015), «EEMS 2016: 45$^{th}$ Annual Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society» (Копенгаген, Дания, 2016), международная конференция «Химическая биология», посвященная 90-летию академика Д. Г. Кнорре (Новосибирск, 2016), «BGRS\SB’2016: 10$^{th}$ International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology» (Новосибирск, 2016).

По материалам диссертации опубликовано 4 научных статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus.

**Структура и объём работы**. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 139 страницах, содержит 51 рисунок и 8 таблиц. Библиография включает 365 литературных источников.

# 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## *2.1. Блокирующие повреждения ДНК*

Биологические макромолекулы в живых организмах обладают ограниченной химической стабильностью и постоянно подвергаются модификации под действием экзогенных факторов и внутренних клеточных процессов. В частности, молекулы ДНК подвергаются гидролизу, окислению, дезаминированию, алкилированию даже в ходе нормального клеточного метаболизма. К числу внешних генотоксичных факторов можно отнести ионизирующее и ультрафиолетовое излучение и ксенобиотики, способные вступать в реакцию с молекулой ДНК, в том числе образовывать объемные аддукты с ДНК. Несмотря на разнообразную природу индуцирующих агентов, спектры вызываемых ими повреждений могут в значительной степени перекрываться, и одни и те же повреждения могут быть вызваны как химическими, так и физическими факторами. Накопление повреждений в конечном итоге может приводить к мутагенезу и далее, у многоклеточных, к канцерогенезу и старению. Поэтому у всех живых организмов существует набор систем репарации поврежденных звеньев ДНК, обеспечивающих устойчивость генетического материала [1].

Объемные аддукты приводят к значительному изменению структуры двуцепочечной ДНК и блокируют репликативный аппарат клетки, что в отсутствие репарации ДНК часто приводит к ее гибели. На сегодняшний день на фармацевтическом рынке существует широкий спектр препаратов (кармустин, хлорметин, циклофосфамид, хлорамбуцил, топотекан, иринотекан и др.), противоопухолевое действие которых направлено на образование блокирующих репликацию аддуктов разной природы. Таким образом, исследования, направленные на понимание молекулярных механизмов взаимодействия ферментов метаболизма ДНК с блокирующими повреждениями ДНК, в наше время крайне актуальны.

### *2.1.1. Апурин-апиримидиновые сайты*

К наиболее частым спонтанным повреждениям, возникающим в клетке, относятся апурин-апиримидиновые (АП-) сайты. АП-сайты — семейство повреждений ДНК (Рисунок 1), которые возникают при гидролизе *N*-гликозидной связи дезоксирибонуклеотидов. Апуринизация хорошо идет при низких значениях pH, однако протекает с заметной скоростью и в физиологических условиях [2]. В любой момент времени в клетке присутствует некоторое количество АП-сайтов (5–20 АП-сайтов на $10^6$ нуклеотидных звеньев ДНК [3]), и их количество значительно повышается при некоторых видах генотоксичного стресса (ионизирующее излучение и т. п.). ДНК подвержена апуринизации в значительно большей степени, чем РНК. Эффективность потери основания среди пуриновых нуклеотидов на 1–2 порядка выше, чем у пиримидиновых,

что обусловлено p$K_a$ атома основания, подверженного протонированию, инициирующему гидролиз *N*-гликозидной связи [4], именно поэтому сам процесс потери оснований зачастую называют «апуринизацией». АП-сайты также образуются как интермедиаты в процессе эксцизионной репарации оснований (см. разд. 2.1.5.1), что вносит вклад в их общее число в клетке.

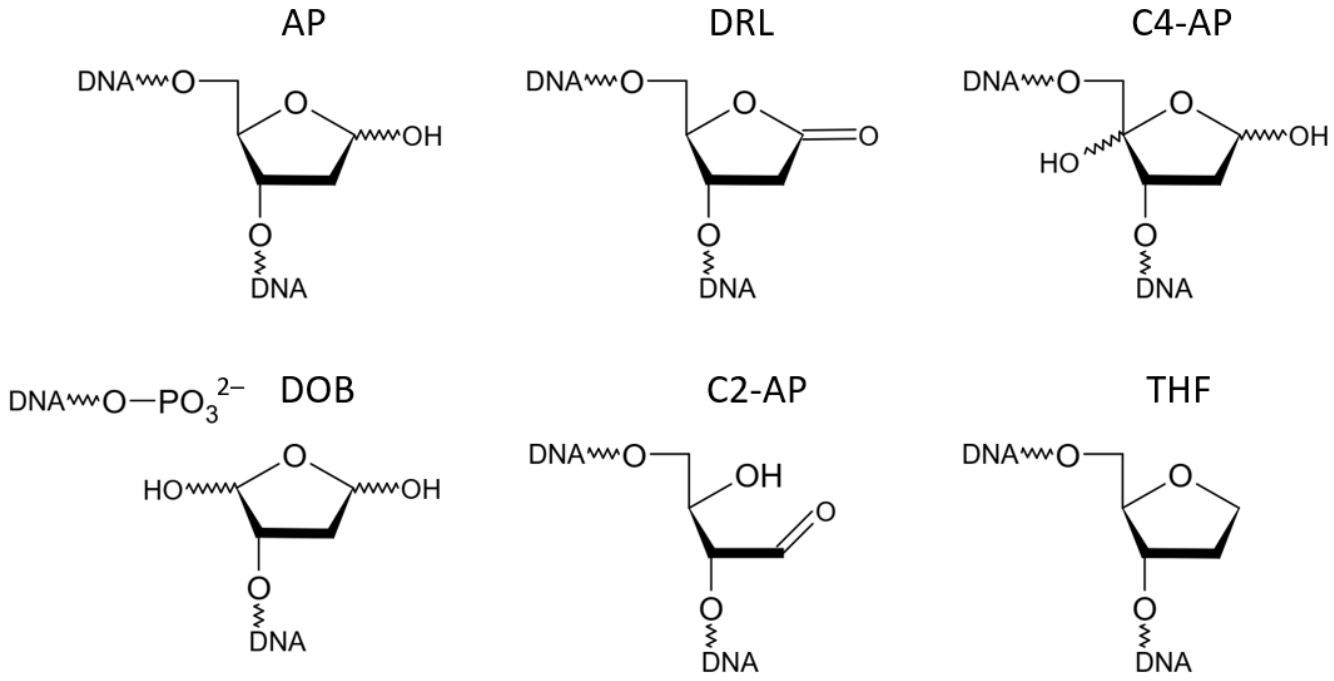


**Рисунок 1**. Виды АП-сайтов (по [5]). AP — АП-сайт; DRL — 2-дезоксириболактонфосфат; C4-AP — C4′-окисленый АП-сайт ((3R)-2-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2,3,5-триолметилфосфат); DOB — C5′- окисленный АП-сайт ((3R)-тетрагидрофуран-2,3,5-триол); C2-AP — C2′-окисленный АП-сайт (2,3-дигидрокси-5-оксобутилфосфат); THF — «фурановый АП-сайт» (3-гидроситетрагидрофуран-2-ил)метилфосфат.

В понятие «АП-сайты» часто включают целый ряд повреждений (Рисунок 1). Наиболее обычный представитель этой группы — альдегидный АП-сайт, который образуется в результате спонтанного гидролиза *N*-гликозидной связи или как промежуточный продукт репарации ДНК. В физиологических условиях он, как и некоторые модифицированные АП-сайты, существует в равновесии между циклической полуацетальной формой и открытой альдегидной формой (Рисунок 2). Под воздействием различных окислителей, противоопухолевых агентов (блеомицин, энедиины) или γ-излучения могут образовываться АП-сайты, окисленные по C4′-положению (C4-AP) или по C5′-положению дезоксирибозного кольца (DOB, Рисунок 1), которые легко формируют ковалентные сшивки ДНК-ДНК с основанием напротив повреждения [6,7]. Потеря атома водорода в анаэробных условиях приводит к еще одному окисленному варианту АП-сайта (C2-AP, Рисунок 1). Еще один вариант окисленного АП-сайта, 2-дезоксириболактон

(DRL, Рисунок 1), реагирует со многими ферментами репарации и образует с ними ДНК-белковые сшивки (разд. 2.1.4) [5,8,9]. Наконец, в исследованиях часто используются синтетические аналоги дезоксинуклеотидов, лишенные основания, из которых наиболее известен так называемый «фурановый АП-сайт» — (3-гидроксителтрагидрофуран-2-ил)метилфосфат (THF, Рисунок 1).

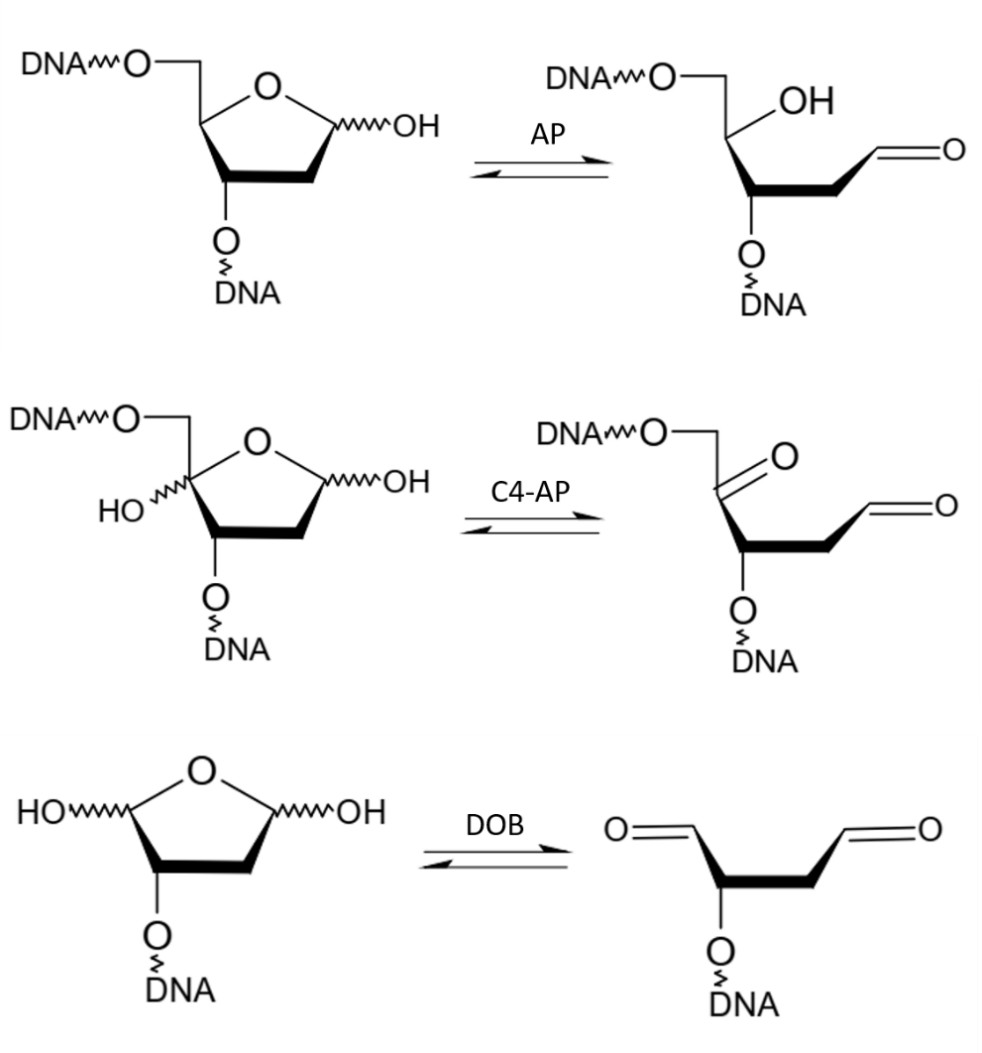


**Рисунок 2.** Циклическая полуацетальная (слева) и открытая альдегидная (справа) формы АП-сайтов. AP — АП-сайт; C4-AP — C4′-окисленый АП-сайт ((3R)-2-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2,3,5-триолметилфосфат); DOB — C5′- окисленный АП-сайт ((3R)-тетрагидрофуран-2,3,5-триол) (по [7]).

АП-сайты высоколетальны и высокомутагенны для клетки. Связано это с тем, что фосфодиэфирные связи при АП-сайтах химически менее стабильны и на их месте под действием нуклеофильных агентов и ионов металлов могут легко возникать одноцепочечные разрывы ДНК (ОЦР) [10], которые могут вызывать коллапс репликативной вилки [11,12]. Помимо этого, АП-сайты электрофильны и могут взаимодействовать с ДНК и белками, вызывая образование сшивок нуклеиновых кислот (разд. 2.1.3), необратимое ингибирование ферментов репарации и

метаболизма ДНК и модификацию гистонов [5]. В физиологических условиях время полупревращения АП-сайта составляет несколько дней [10]. Мутагенность АП-сайтов объясняется отсутствием возможности для образования комплементарных связей (см. ниже).

АП-сайты удаляются из ДНК системой эксцизионной репарации оснований (ЭРО) (более подробно этот путь описан в разд. 2.1.5.1). Однако между способами репарации разных видов АП-сайтов существуют важные различия. Репарация альдегидных АП-сайтов в клетках высших эукариот идет по классическому короткозаплаточному пути ЭРО с участием АП-эндонуклеазы, полимеразной и дезоксирибофосфатлиазной (ДРФазной) активностей ДНК-полимеразы β (POLβ). В то же время C2-AP представляет собой субстрат для фосфодиэстераз, но не для ДРФазной активности POLβ. Это препятствие преодолевается за счет длинозаплаточного пути ЭРО — вытесненный в ходе репаративного синтеза фрагмент ДНК, содержащий повреждение на 5′-конце, гидролизуется нуклеазой FEN1 [13,14]. С еще большими проблемами связана репарация DRL: как сказано выше, это повреждение образует ДНК-белковые сшивки с остатками Lys в активных центрах ДНК-гликозилазы Nth и POLβ [15–17] (Рисунок 3В), а продукт β-элиминирования DRL может сходным образом формировать сшивки с ДНК-гликозилазами Fpg и NEIL1 [18]. Присутствие 1,4-дикарбонильной группы у C4-AP и DOB также оказывает значительное влияние на ферменты репарации за счет ковалентной модификации POLβ и ДНК-полимеразы λ (POLλ) [19,20] (Рисунок 3Г). Остается неясным, способны ли ферменты в этом случае осуществлять включение корректного нуклеотида и завершать процесс репарации. Таким образом, необратимое ингибирование основных ферментов репарации ДНК свидетельствует о значительной цитотоксичности модифицированных АП-сайтов [5].

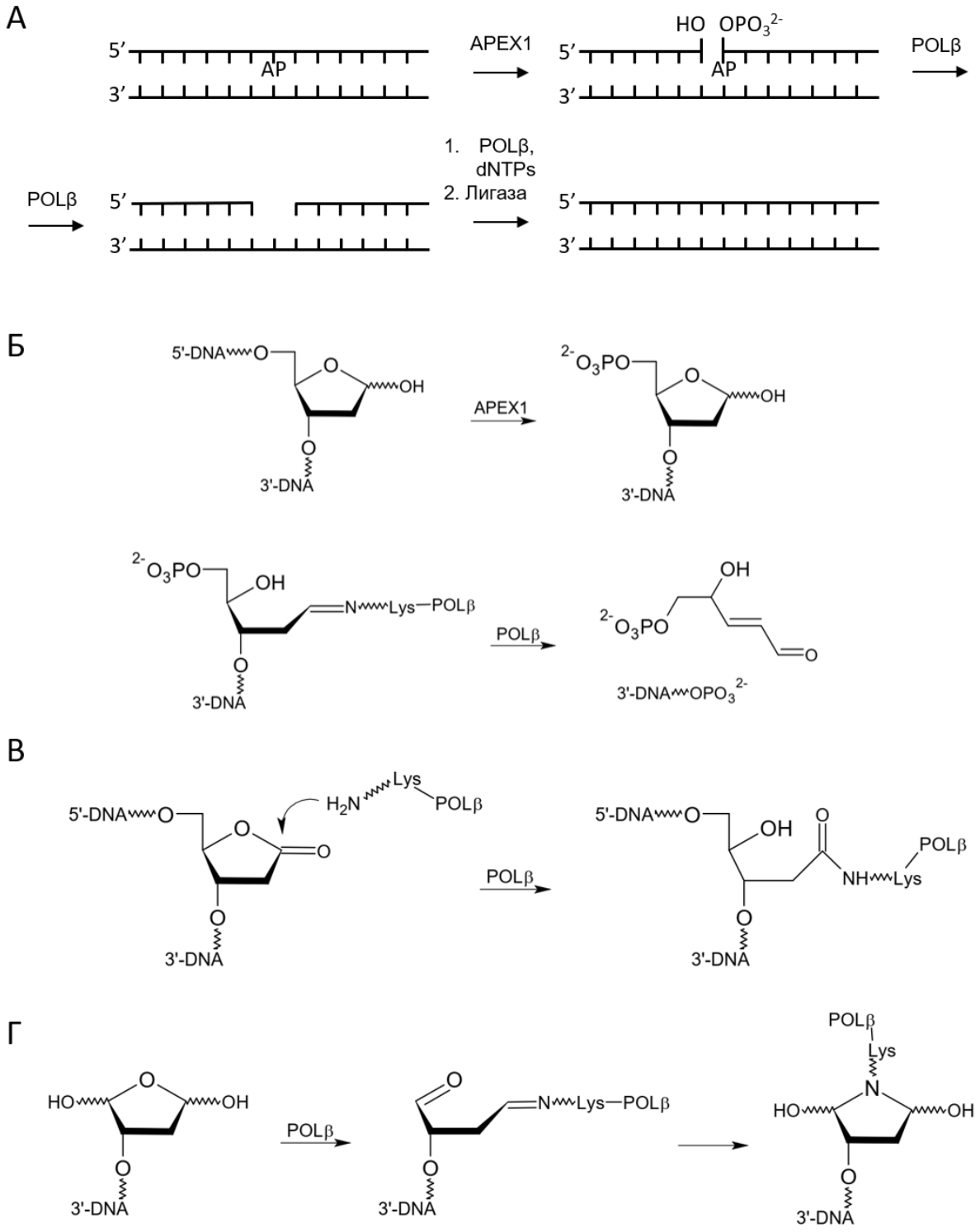


**Рисунок 3.** А — Схема репарации АП-сайтов; Б — механизм ЭРО АП-сайтов с участием APEX1 и POLβ; В — инактивация POLβ DRL; Г — инактивация POLβ DOB (по [5]).

ДНК-полимеразы не способны образовывать канонические пары оснований при достижении АП-сайтов и либо блокируются, либо катализируют ненаправленное включение dNMP в синтезируемую цепь. Например, было показано, что фрагмент Кленова ДНК-

полимеразы I *E. coli* (KF) напротив АП-сайта преимущественно включает dAMP. Это предпочтение получило название «правило А» [21] и объясняется тем, что пара AP:dAdo обладает максимальной термодинамической стабильностью среди других за счет стэкинга основания Ade с соседними парами оснований [22–24], а также лучше подходит к структуре активного центра полимеразы. Эта закономерность включения dAMP напротив АП-сайтов была продемонстрирована для некоторых других ДНК-полимераз [25], однако позже было показано, что «правило А» далеко не универсально и неприменимо ко многим эукариотическим ДНК-полимеразам [26–30]. Блокировка ДНК-полимераз АП-сайтами, вероятно, объясняется переходом фермента в каталитически неактивную конформацию и ингибированием транслокации. ДНК-полимеразы, главная функция которых состоит во включении dNMP напротив неканонических нуклеотидов (так называемые транслезионные ДНК-полимеразы), способны эффективнее преодолевать АП-сайты в ДНК-матрице, однако степень мутагенности остается все такой же высокой [21,25,31–33].

Недавно был открыт уникальный механизм репарации АП-сайтов в одноцепочечной ДНК (оцДНК) в участках репликативных вилок, находящихся в одноцепочечном состоянии [34]. Он заключается в направленном образовании ДНК-белковой сшивки (ДБС) между АП-сайтом и белком HMCES с последующим переключением на протеасомно-зависимый путь репарации ДБС. Такая последовательность действий предохраняет клетку от мутагенного действия транслезионных ДНК-полимераз и ковалентного захвата белков репарации АП-сайтами.

Как для альдегидных, так и для модифицированных АП-сайтов остаются неясными многие детали механизмов действия ферментов, взаимодействующих с ними при репарации и синтезе ДНК, поскольку ввиду нестабильности этих поврежденных звеньев ДНК при их изучении обычно используются аналоги, не содержащие альдегидной группы. Это затрудняет разработку фармакологических ингибиторов ферментов, которые могут найти применение в терапии опухолевых и инфекционных заболеваний. С другой стороны, высокая реакционноспособность АП-сайтов делает возможным создание низкомолекулярных агентов, направленных на модификацию самой ДНК, в терапевтических целях. Далее рассматривается пример такого средства — метоксиамин (MOX).

### *2.1.2. Аддукты апурин-апиримидиновых сайтов с метоксиамином*

Один из основных путей приобретения клетками опухоли устойчивости к химио- и радиотерапии — работа механизмов репарации ДНК [35]. Цитотоксичность и генотоксичность повреждений ДНК, индуцируемых противоопухолевыми препаратами, может быть минимизирована с участием нескольких путей репарации ДНК, центральное место среди которых занимает ЭРО (разд. 2.1.5.1.). Несколько лет назад в клиническую практику вошли

ингибиторы поли(АДФ-рибоза)полимеразы 1 (PARP1), которые подавляют сигнальный путь, ведущий к активации системы ЭРО, и эффективно сенсибилизируют опухолевые клетки с дефектами альтернативного пути защиты генома — рекомбинационной репарации — к действию генотоксичных агентов [36–38]. Резистентность к таким алкилирующим противораковым препаратам разных химических классов, как циклофосфамид, хлорамбуцил, кармустин, темозоломид, тиотепа и др., обусловлена активностью путей эксцизионной репарации оснований, мисматч-репарации и реактивации алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазой. При лечении алкилирующими противоопухолевыми агентами в ДНК преимущественно протекает алкилирование по позиции N3 пуринового кольца; такие аддукты эффективно репарируются с участием пути ЭРО, и в случае его ингибирования аддукты становятся более цитотоксичными, а лечение — более эффективным [39]. Действие ряда других противоопухолевых препаратов (прокарбазин, блеомицин, средства для фотодинамической терапии) и лучевой терапии основано на их способности генерировать окислительные повреждения, которые также представляют собой один из основных классов повреждений, репарируемых в процессе ЭРО. Многие гены репарации ДНК могут быть гиперэкспрессированы в опухолевых клетках, что в еще большей степени осложняет успешное применение терапии. Таким образом, ЭРО представляет собой один из важнейших факторов, определяющих клиническую устойчивость опухолей [40].

Метоксиамин, также известный под названием TRC-102, представляет собой небольшую молекулу, которая специфично ингибирует ЭРО, образуя аддукты непосредственно с АП-сайтами, что предотвращает их расщепление эндонуклеазой APEX1 [40,41]. Предполагается, что реакция идет по альдегидной группе остатка дезоксирибозы с образованием *N*-метоксииминового продукта [42], однако в точности природа и структура аддукта на сегодня не установлена [3] (Рисунок 4).

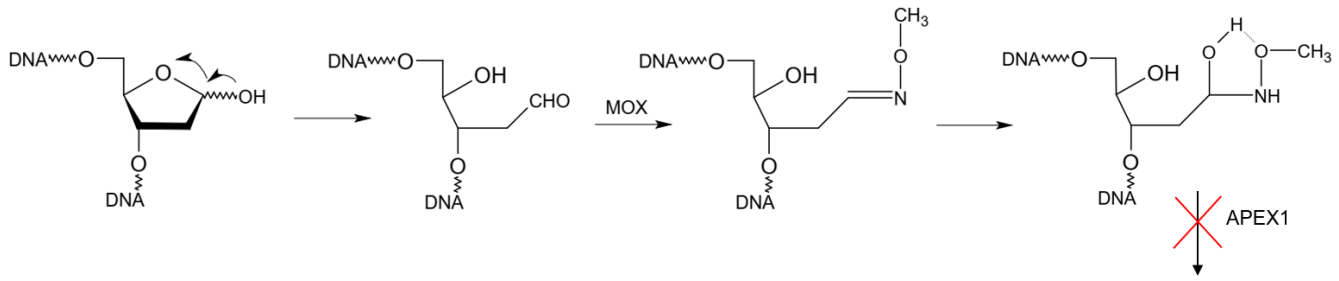


**Рисунок 4.** Предположительный механизм действия MOX: MOX конденсируется с открытой формой дезоксирибозного кольца, в результате APEX1 не способен узнать субстрат (по [41,43]).

Таким образом, образуя аддукт с АП-сайтом, MOX предположительно ингибирует ЭРО за счет препятствования связыванию APEX1, чем усиливает цитотоксичность широкого спектра

агентов, повреждающих ДНК. В исследованиях *in vitro*, а также в исследованиях опухолевых ксенотрансплантантов, МОХ усиливает действие таких препаратов, как темозоломид, кармустин, пеметрексед, доксорубицин и идоксуридин [44–55]. На данный момент завершены либо продолжаются клинические испытания МОХ I и II фазы (NCT00892385, NCT02535325, NCT01658319, NCT02395692, NCT02535312, NCT01851369, NCT00692159). В частности, уже показана его эффективность и безопасность в клинических испытаниях при совместном применении с флударабином [56]. МОХ выбран в качестве одного из соединений для программы Rapid Access to Intervention Development (RAID) Национального института онкологии США, цель которой состоит в скорейшем проведении ограниченных клинических испытаний веществ с предполагаемым новым механизмом действия [50].

Несмотря на эти многообещающие результаты, до сих пор остается неясным, основано ли действие МОХ исключительно на резистентности его аддукта к действию APEX1. Известно лишь, что МОХ сам по себе обладает определенной мутагенностью, поскольку способен превращать основания цитозина в $N^4$-метоксицитозин. Производные метоксицитозина могут существовать в енамино- и кетимино-таутомерных формах. В то время как енамино-таутомер $N^4$-метоксицитозина может образовать каноническую комплементарную пару с гуанином, имино-таутомер формирует пару уотсон-криковского типа с аденином [57].

В клетках человека существуют APEX1-независимые пути репарации АП-сайтов [58,59], действие которых на аддукты с МОХ совершенно не охарактеризовано. Более того, поскольку АП-эндонуклеазы эффективно расщепляют в ДНК даже вставки ненуклеотидной природы, не содержащие азотистых оснований [60,61], устойчивость аддуктов МОХ к действию APEX1 выглядит парадоксальной и требует углубленного анализа своих причин. К тому же, до сих пор не изучен механизм взаимодействия образуемого им аддукта с ферментом APEX1, непонятно, какое влияние аддукт МОХ с ДНК может оказывать на другие ферменты метаболизма ДНК, и даже не известна пространственная структура образуемого МОХ аддукта с АП-сайтом.

### *2.1.3. Ковалентные сшивки нуклеиновых кислот*

Одно из наиболее опасных и тяжело устраняемых клеткой повреждений — сшивки нуклеиновых кислот. Различают внутрицепочечные сшивки ДНК, межцепочечные сшивки ДНК и ДНК-белковые сшивки (ДБС). Такое разделение имеет под собой не только структурные, но и функциональные основания, поскольку повреждения этих типов имеют разные последствия для клетки и репарируются по разным путям.

Сшивки между цепями нуклеиновых кислот могут возникать под действием как ксенобиотиков, так и эндогенно образующихся соединений. Несмотря на разнообразную химическую природу, все они функционируют в основном как электрофильные реагенты.

К сшивающим реагентам относят, например, низкомолекулярные органические соединения с двумя электрофильными группировками. Наиболее изученный класс сшивающих реагентов — иприты (эмбихин, азотистый иприт), которые вызывают алкилирование расположенных рядом оснований гуанина по положению *N*7 в большой бороздке ДНК в обеих цепях дуплекса. Подобным действием также обладают производные эпоксидов, этилениминов и фосфамидов, содержащие два реактивных центра.

Соединения на основе переходных металлов (например, комплексы Co, Rh, Cu, Pt) также способствуют индукции сшивок ДНК–ДНК, и это свойство используется в противоопухолевой терапии. На примере противоопухолевых препаратов на основе платины было показано, что *цис*-изомеры комплексов металла приводят в основном к образованию сшивок по GG-последовательности внутри одной цепи. При этом сшивка сильно искажает структуру цепи, комплекс располагается в большой бороздке и вызывает локальный переход B-формы ДНК в Z-форму [62].

Псоралены (фурокумарины) представляют собой класс фотоактивируемых сшивающих реагентов. Образование сшивки инициируется после интеркаляции планарного трициклического соединения между плоскостями двух пар оснований AT или TA и поглощения кванта света с прохождением реакции фотоциклоприсоединения 4′,5′-двойной связи фуранового кольца или 3,4-двойной связи кумарина по 5,6-двойной связи тимина. Такая сшивка вызывает локальное раскручивание цепей на 25° в месте присоединения псоралена, но не оказывает существенного влияния на дуплекс в целом и он сохраняет B-форму уже на расстоянии трех нуклеотидных пар от места сшивки [63–65].

К сшивающим реагентам также относят некоторые антибиотики и противоопухолевые средства, например, митомицин C, выделяемый из *Streptomyces caespitosis*. Активация митомицина C с последующим образованием сшивки происходит в результате многостадийного процесса с участием ряда редуктаз. Присоединение происходит по динуклеотидам CG в малой бороздке ДНК с участием атомов $N^2$ гуанина и $C^1$ и $C^{10}$ молекулы антибиотика. Митомицин C практически не вносит серьезных изменений в структуру B-формы ДНК дуплекса, приводя лишь к незначительному локальному расширению малой бороздки [66,67].

Кроме ксенобиотиков, образование ковалентных сшивок между цепями ДНК также индуцируют эндогенные альдегиды. Они образуются клеткой как побочные продукты окислительной деградации ненасыщенных липидов и в результате других эндогенных метаболических процессов. Первоначально образуются 1,$N^2$-γ-гидроксипропано-dG-аддукты, которые при взаимодействии с аминогруппой гуанина второй цепи в соседних парах оснований последовательности 5′-CpG-3′ дают межцепочечную сшивку [68].

При ковалентной сшивке цепей ДНК между собой становится невозможным процесс разворачивания двойной спирали, что приводит к блокированию процессов репликации и транскрипции и к остановке клеточного деления. Межцепочечные сшивки ДНК высоколетальны: установлено, что даже одна такая сшивка способна убить гаплоидную бактериальную или дрожжевую клетку, в которых невозможна рекомбинационная репарация, а летальное количество межцепочечных сшивок для клеток млекопитающих составляет около 40 [69].

### *2.1.3.1. Ковалентные сшивки нуклеиновых кислот, индуцируемые координационными соединениями платины*

Координационные соединения платины входят в число наиболее часто используемых противоопухолевых средств. Цисплатин (*цис*-$[Pt(NH_3)_2Cl_2]$, *цис*-диамминдихлороплатина(II)), вошедший в клиническую онкологию в конце 1970-х гг., представляет собой редкий пример лекарства неорганической природы с хорошо охарактеризованным механизмом действия. Цисплатин применяется в лечении широкого спектра злокачественных опухолей, хотя наибóльшую эффективность показывает против рака яичка [70,71]. Из-за низкой концентрации ионов $Cl^-$ внутри клетки соединение постепенно гидролизуется с образованием электрофильных производных *цис*-$[PtCl(NH_3)_2(H_2O)]^+$ и *цис*-$[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$, которые охотно реагируют с нуклеофильными атомами в гетероциклических основаниях ДНК [72]. Межцепочечные сшивки составляют меньшинство (1–2%) от общего числа аддуктов, образуемых цисплатином, но имеют самые негативные последствия для репликации ДНК, так как абсолютно непроходимы для ДНК-полимераз [73] (Рисунок 5). Основная масса аддуктов представляет собой внутрицепочечные сшивки между соседними основаниями Gua по положению *N*7; также с меньшим выходом возникают сшивки между Gua, разделенными одним основанием. *Транс*-изомер цисплатина из-за стерических ограничений не дает сшивок ДНК–ДНК, однако, как и *цис*-изомер, может образовывать моноаддукты и ДНК-белковые сшивки [72,74,75]. Все эти повреждения также представляют собой значительные препятствия для работы ДНК-полимераз [76]. Блокирование продвижения репликативной вилки активирует сигнальные системы, которые запускают процессы клеточной гибели [77].

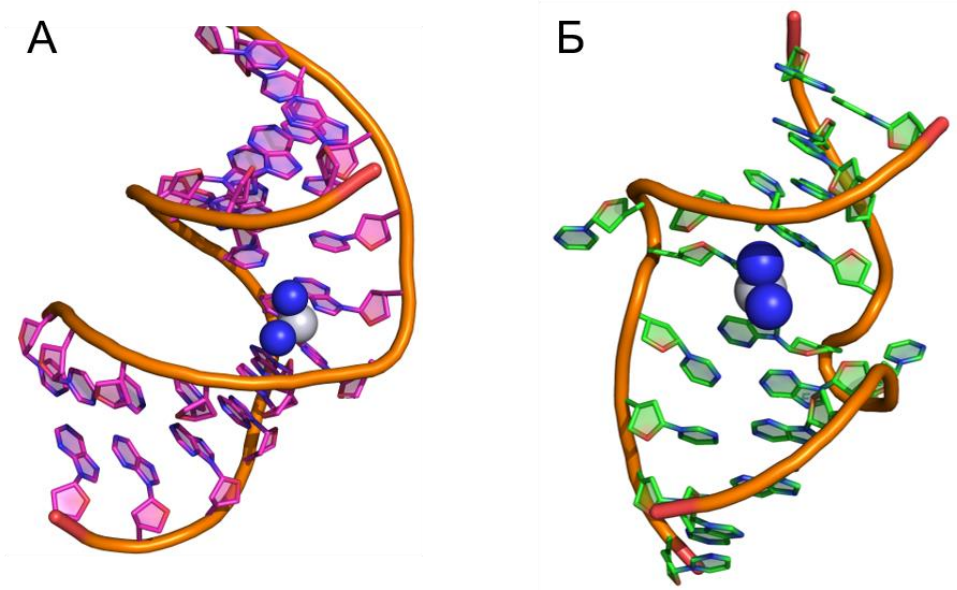


**Рисунок 5.** Структура внутрицепочечной сшивки ДНК с цисплатином (А) и межцепочечной сшивки (Б). Белый кружок — атом платины, синие кружки — $NH_3$ группы заместителей атома платины (по [78,79]).

Клетки противодействуют повреждениям, вызванным платиновыми реагентами, при помощи репарации ДНК, детоксификации активных форм соединений, снижения их транспорта в клетку и усиления вывода из клетки [74]. Репарация платиновых моноаддуктов и внутрицепочечных сшивок осуществляется по пути эксцизионной репарации нуклеотидов, а межцепочечных сшивок — по пути рекомбинационной репарации [72,74]. Детоксификация цисплатина в основном зависит от действия глутатион-*S*-трансфераз, катализирующих образование комплексов глутатиона с платиной [80]. Эпидемиологические исследования выявили зависимость токсичности цисплатина от полиморфизма генов, кодирующих глутатион-*S*-трансферазы GSTP1 [81–84], GSTM1 [83] и GSTM3 [85], поверхностный клеточный рецептор LRP2 (мегалин) [86], тиопуринметилтрансферазу и катехол-*O*-метилтрансферазу [87], тимидилатсинтазу [81] и белок эксцизионной репарации нуклеотидов XPC [88]. Захват платиновых соединений клетками осуществляется при помощи высокоаффинного транспортера ионов меди CTR1 (SLC31A1) и низкоаффинного транспортера ионов меди SLC31A2 [89,90], а выведение их из клеток — при помощи специфичных к ионам меди мембранных АТФаз P-типа ATP7A и ATP7B [91–93]. ATP7A и ATP7B во многом отвечают за устойчивость клеток к цисплатину, однако в резистентность опухолей также может вносить вклад и АТФ-зависимые белки-транспортеры множественной лекарственной устойчивости MDR1 (P-гликопротеин, ABCB1), MRP1 (ABCC1), MRP2 (cMOAT, ABCC2) и ABCG2, удаляющие из клеток многие ксенобиотики [91–98].

В связи с серьезными побочными эффектами цисплатина и быстрым развитием устойчивости в клетках многих опухолей разного происхождения в клиническую практику были

введены другие производные платины(II): карбоплатин, оксалиплатин, недаплатин, дициклоплатин и др. (Рисунок 6). Общий механизм действия всех этих соединений заключается в гидролизе до активных хлораква- и диаква-комплексов, которые реагируют с ДНК, образуя моноаддукты, внутри- и межцепочечные сшивки, препятствующие дальнейшему синтезу ДНК [72,74,75].

Основные проблемы в клиническом применении соединений платины заключаются в полиорганной токсичности, в особенности выраженной по отношению к почечной и нервной ткани и чувствительным клеткам внутреннего уха, и развитии лекарственной устойчивости по механизмам репарации ДНК, усиленной детоксификации, снижения транспорта в клетки и повышения активного выведения из них. В связи с этим соединения платины, способные эффективно повреждать ДНК, но обладающие меньшей системной токсичностью или лучшими фармакокинетическими и фармакодинамическими параметрами, представляют значительный интерес как потенциальные противоопухолевые агенты.

Хотя все применяемые в клинике противоопухолевые соединения платины представляют собой комплексы Pt(II), в последние годы активно исследуются возможности фармакологического использования веществ-предшественников с атомом платины в степени окисления Pt(IV) [99]. Производные Pt(IV) отличаются большей биодоступностью и стабильностью в биологических жидкостях, а наличие дополнительных валентностей позволяет модифицировать фармакофор лигандами с полезными свойствами. В клетках соединения Pt(IV) активируются восстанавливающими системами, в частности, цитохромом С и микросомальными оксидоредуктазами, до Pt(II) [100].

### *Полиоксометаллаты*

Полиоксометаллаты — анионные многоцентровые группировки переходных металлов (Рисунок 6Б) — в последнее время вызывают значительный интерес в фармакологии [101–103]. Показано их антибактериальное и антивирусное действие [104–106], ингибирование амилоидогенеза [107] и цитотоксичность в отношении раковых клеток [106,108]. Кроме того, полиоксометаллаты сильно ингибируют АТФазы Р-типа, что снижает способность раковых клеток выводить лекарственные вещества и их метаболиты [109]. Немаловажно, что способ проникновения полиоксометаллатов в клетки не зависит от транспортеров и, по-видимому, объясняется непосредственным взаимодействием кластерных лигандов с фосфолипидами в клеточной мембране, а также эндоцитозом и макропиноцитозом [106,110]. В сочетании с ингибированием выведения из клеток, это делает полиоксометаллаты многообещающими агентами для трансмембранной доставки активных соединений, и в настоящее время развиваются

способы синтеза конъюгатов полиоксометаллатных кластеров с биоактивными органическими лигандами, в том числе противоопухолевыми лекарствами [111,112].

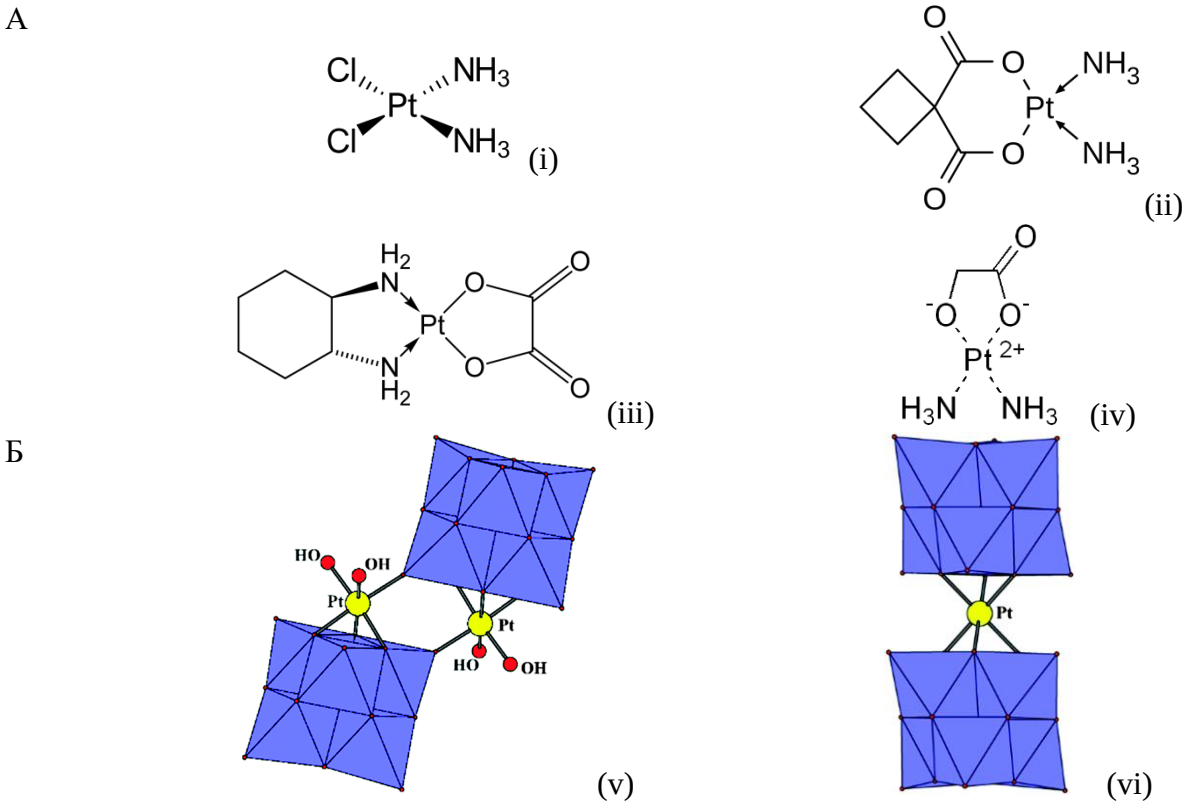


**Рисунок 6**. А — структуры некоторых применяемых в клинике соединений платины: (i) – цисплатин, (ii) – карбоплатин, (iii) – оксалиплатин, (iv) – недаплатин. Б — структуры полиоксониобатов платины(IV) как примеров полиметаллатных соединений Pt: (v) – $[Nb_6O_{19}\{Pt(OH)_2\}]_2^{12-}$, (vi) – $[Pt(Nb_6O_{19})_2]^{12-}$ [113].

На сегодняшний момент конкретные молекулярные мишени полиоксометаллатов остаются во многом неизвестными. Сообщалось об ингибировании этими соединениями широкого круга фосфатаз, нуклеотидгидролаз, киназ, нуклеаз, протеаз и ряда других ферментов [114]. На этом фоне особый интерес представляют сообщения об эффективном ингибировании активности обратной транскриптазы и некоторых ДНК-зависимых ДНК-полимераз [115–117], что говорит о принципиальной возможности подавления репликации и репарации ДНК полиоксометаллатами.

Цитотоксичное действие полиоксометаллатных соединений, содержащих атомы платины, практически не изучалось. В единственном опубликованном исследовании [118] было показано, что конъюгат цис-тетраамминдихлорплатины(IV) с полиоксовольфраматными кластерами ингибирует рост клеток аденокарциномы кишечника *in vitro* и в модели мышиных ксенографтов. Биологические свойства полиоксометаллатов, в которых кластеры выступали бы как лиганды непосредственно при атомах Pt, не изучены вообще. В то же время, сочетание генотоксичных свойств платиновых комплексов и способности полиоксометаллатов ингибировать ДНК-полимеразы и проникать в клетку по другим путям, чем традиционные соединения платины,

делают такие соединения крайне интересными как цитотоксичные агенты с потенциальным противоопухолевым действием.

### *2.1.4. ДНК-белковые сшивки*

ДНК в живых клетках постоянно связана с широким набором разнообразных белков. Присутствие некоторых генотоксичных агентов может привести к реакции между ДНК и белком и в конечном итоге вызвать образование ковалентной связи аминокислотных остатков белка с нуклеотидами ДНК. Как правило, белки, которые образуют ковалентные сшивки с ДНК, либо находятся в составе стабильных нуклеопротеиновых комплексов, либо участвуют в процессах метаболизма ДНК [119]. Уровень ДБС в клетках человека находится, по данным разных методов, в пределах 0,5–70 на $10^7$ оснований и увеличивается с возрастом [119–121].

ДБС — чрезвычайно объемные аддукты по сравнению с другими повреждениями ДНК и мешают многим процессам метаболизма ДНК, в том числе репликации и транскрипции [8,121,122]. Предполагается, что образование ДБС служит одной из причин старения, рака и нейродегенеративных расстройств [123–126], а накапливающиеся экспериментальные данные, подтверждающие эту теорию [127–129], позволяют считать ДБС, наряду с 8-оксогуанином (8-oxoGua), наиболее точным биомаркером старения [125].

ДБС вследствие своей объемной природы приводят к множеству последствий для клетки. Прежде всего, они могут блокировать матричный синтез в процессах репликации и транскрипции, затруднять топологические перестройки ДНК и ремоделирование хроматина, приводить к фрагментации ДНК и нарушению паттернов метилирования, что может приводить в конечном счете к клеточной гибели. Возникновение ДБС в онкосупрессорных генах ведет к инактивации и потере копии этого гена и в конечном счете может вызвать злокачественное перерождение клетки [130]. Исследования ДБС показывают, что эти повреждения удаляются из генома значительно медленнее повреждений других типов и сохраняются после нескольких циклов репликации [131]. Характерное время существования ДБС в культуре активно делящихся клеток млекопитающих в зависимости от природы сшивки, типа клетки и условий роста может достигать нескольких дней [132–134]. Это указывает на возможность того, что в клетках существуют механизмы, помогающие репликативному аппарату преодолевать барьеры в виде ДБС, поскольку продолжительное существование ДБС может иметь серьезные последствия для репликации и транскрипции. В зависимости от химического состава, размера и позиции в репликативной вилке ДБС могут устраняться с помощью различных систем репарации. Большинство ДБС в клетках млекопитающих должны подвергаться деградации клеточными протеазами, например, убиквитинзависимой протеасомной системой [135]. Полученная сшивка ДНК с коротким пептидом (4-12 аминокислот) уже представляет собой субстрат для системы

эксцизионной репарации нуклеотидов [136]. С другой стороны, поскольку структура ДБС внешне неотличима от структуры стабильного ДНК-белкового комплекса, предполагается, что аналогичному протеолитическому расщеплению могут подвергаться и сигнальные белки, белки-регуляторы клеточного цикла, транскрипционные факторы, что может негативно повлиять на клеточные процессы [119,131].

Хотя ДБС могут значительно отличаться по размеру, физико-химическим свойствам, механизмам возникновения и типам ковалентных связей с присоединенным белком, все известные в настоящее время ДБС можно разделить на четыре типа в зависимости от того, как они расположены по отношению к разрывам в цепи ДНК (Рисунок 7).

Наиболее распространенный в физиологических условиях тип 1 включает в себя ДБС, содержащие белки, ковалентно связанные с неразорванной цепью ДНК. Сшивки типа 1 образуются под воздействием химических и физических агентов, таких как альдегиды, ионы тяжелых металлов, ионизирующее и УФ-излучение. Сшивки типа 2 содержат ДНК-полимеразу β или поли(АДФ-рибоза)полимеразу 1 PARP1, связанные с 5′- или 3′-концом ОЦР соответственно [137]. Сшивки типа 3 содержат топоизомеразу I (TOP I), соединенную с 3′-концом при ОЦР, а сшивки типа 4 — топоизомеразу II (TOP II), присоединенную к двум 5′-концам при двуцепочечном разрыве (ДЦР) через тирозилфосфодиэфирную связь [136,138]. В принципе, сшивки типов 2–4 могут возникать и при взаимодействии белков с продуктами окисления ДНК под действием ионизирующего излучения, если оно также влечет за собой образование разрыва ДНК. Некоторые исследователи делят ДБС на две большие группы на основании свойсв сшитого белка: ферментативные и неферментативные [139]. Так, многие ферменты в процессе катализа образуют промежуточное состояние, характеризующееся обратимой ковалентной связью с ДНК, которое может при определенных обстоятельствах приводить к образованию ферментативной ДБС. Среди таких ферментов топоизомеразы, ДНК-полимеразы, ДНК-метилтрансферазы, АП-лиазы. К нефемерментативным ДБС принято относить ковалентный неспецифический захват белков, находящихся вблизи ДНК, под воздействием генотоксичных факторов [139].

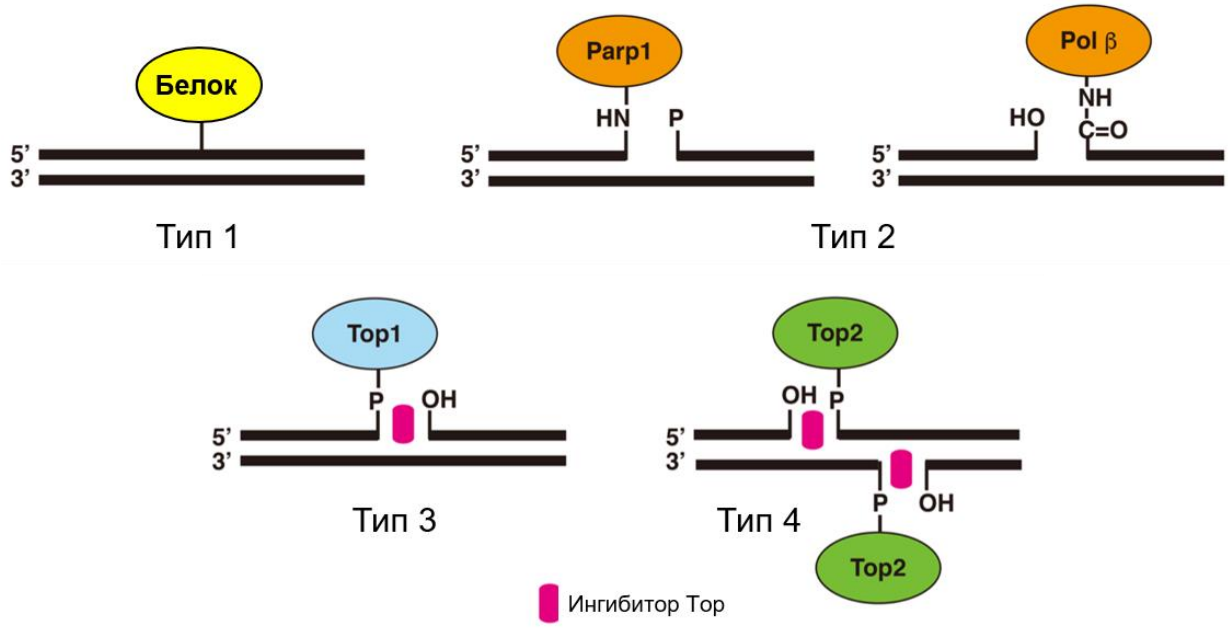


**Рисунок 7.** Классификация ДНК-белковых сшивок (по [136,138,139]).

Основной вопрос для понимания механизма генотоксичного эффекта ДБС заключается в том, как ведут себя ДНК-полимеразы, сталкиваясь с такого рода аддуктом. На нескольких доступных *in vitro* системах ДБС полностью блокировали работу ДНК-полимераз [140–142]. Однако некоторые ДНК-полимеразы способны проходить сшивки с пептидами размером до 12 а. к. о. без ошибок [142–145] или с делецией/инсерцией размером 1–2 нуклеотида [145]. Репликативные ДНК-полимеразы могут непосредственно столкнуться с ДБС в клетке только при определенных обстоятельствах, так как ДНК-геликазы, разделяющие цепи ДНК в движущейся репликативной вилке, первыми столкнутся с ДБС, что должно вызвать остановку синтеза ДНК. Тем не менее, если ДНК-геликаза перемещается по неповрежденной цепи и может пройти ДБС, то аппарат синтеза ДНК может столкнуться со сшивкой [146]. В других биологически значимых ситуациях — например, при репарации комплексных (кластерных) повреждений — с ДБС также могут взаимодействовать репаративные и транслезионные ДНК-полимеразы. В лабораторно-аналитических сферах применения ДНК-полимераз ДБС могут препятствовать амплификации древней ДНК [147] или ПЦР-анализу ДНК из тканей, зафиксированных формалином [148]. Поэтому информация о взаимодействии различных ДНК-полимераз с ДБС важна как с фундаментальной, так и с практической точки зрения.

Влияние ДБС на клеточные процессы остается малоизученным, в том числе из-за отсутствия хороших экспериментальных моделей. Исследование ДБС осложняется несколькими факторами. Прежде всего, процесс возникновения ДБС химически не детерминирован — они могут возникнуть под влиянием разных агентов по разным механизмам и иметь разную

структуру. Кроме того, все известные ДБС-индуцирующие агенты производят, помимо сшивок, и другие формы повреждений ДНК, что затрудняет отнесение наблюдаемого эффекта именно к ДБС [131]. В частности, воздействие на клетку соединениями, вызывающими сшивки, или ионизирующим излучением индуцирует широкий спектр повреждений, из которых ДБС составляют около 1–3% [149]. Ниже рассмотрены некоторые известные виды ДБС и способы их образования.

#### *2.1.4.1. Образование ДНК-белковых сшивок при общем окислительном стрессе*

Окислительный стресс разного происхождения — один из основных факторов, вызывающих образование ДБС в клетке. Связь окислительного стресса с ДБС подтверждается тем, что уровень этих повреждений сильно коррелирует с количеством присутствующего в ДНК биомаркера окислительного стресса 8-oxoGua [125].

Образование ДБС при окислительном стрессе инициируется окислением основания с последующим захватом электрондефицитного ДНК-интермедиата нуклеофильной группой белка (Рисунок 8А), или напротив, формированием белкового радикала, который атакует основание в ДНК (Рисунок 8Б). Чаще всего в качестве групп белка и ДНК, которые при окислении реагируют с образованием ДБС, выступают Lys и Gua либо Tyr и Thy (разд. 2.1.4.5). Третий путь образования ДБС — радикальная рекомбинация (Рисунок 8В), которая возможна, когда и белковый, и нуклеиновый радикал относительно долгоживущи и пространственно сближены. Показано, что различная структура ДНК-белковых аддуктов характерна для разных типов окислительного стресса (например, фотосенсибилизаторы типа I, генерирующие свободные радикалы, в основном индуцируют образование аддуктов лизина по положению C8 Gua, а фотосенсибилизаторы типа II, генерирующие синглетный $O_2$ — по положению C5) [120].

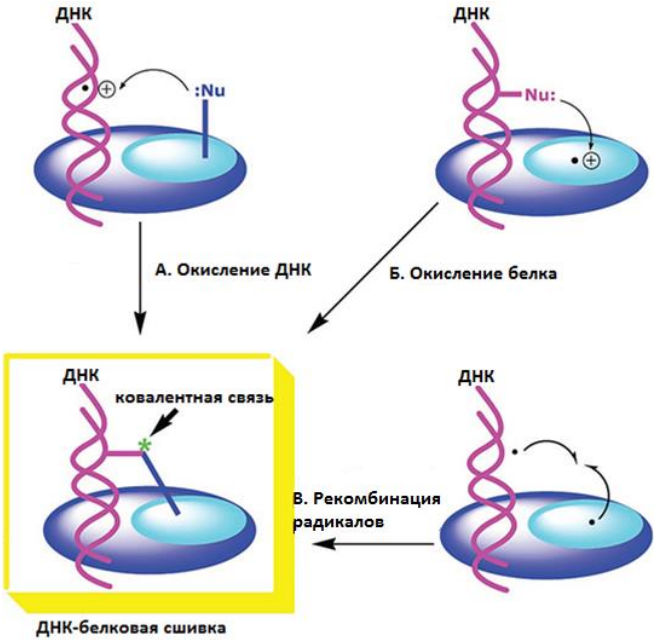


**Рисунок 8**. Механизмы образования ДНК-белковых сшивок при свободнорадикальном окислении белков и ДНК [120]**.**

### *2.1.4.2. Образование ДНК-белковых сшивок, индуцируемое альдегидами*

ДБС в клетке могут возникать при действии ненасыщенных альдегидов (еналей), в частности акролеина, кротонового альдегида, побочных продуктов окислительной деградации ненасыщенных липидов, а также альдегидной формы дезоксирибозы при образовании АП-сайтов.

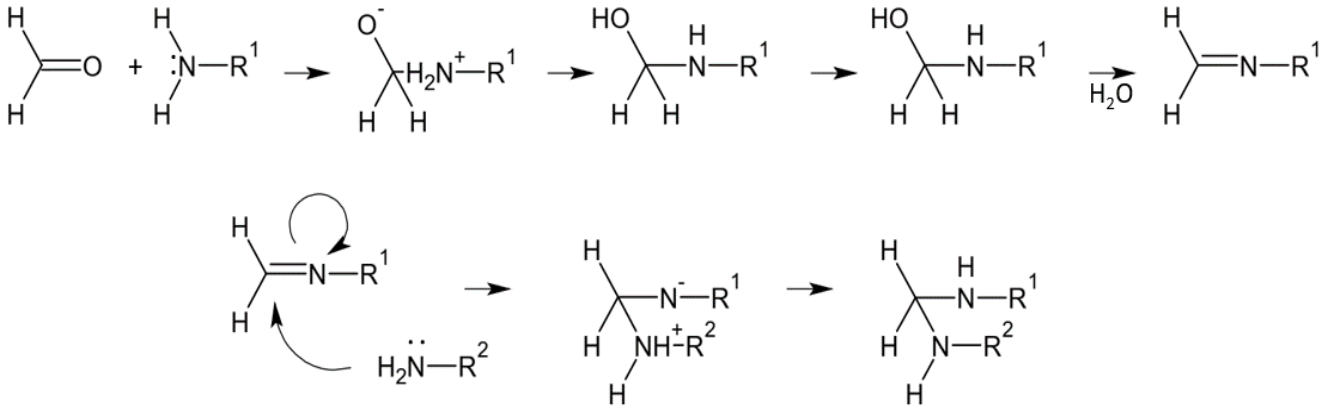

**Рисунок 9**. Механизм образования ДБС, индуцированной формальдегидом [131].

Насыщенные альдегиды могут реагировать с аминами (ε-аминогруппа Lys), образуя основание Шиффа, а α,β-ненасыщенные альдегиды реагируют с тиолами, гидроксильными группами и амидами, что может приводить к образованию различных типов аддуктов и

инактивации белка [150,151]. ДБС образуются при реакции альдегидной группы с амино- или иминогруппами белка (например, боковыми радикалами Lys или Arg) с формированием основания Шиффа, с которым затем реагирует другая аминогруппа (Рисунок 9) [152,153].

Альдегиды могут приводить к образованию сшивок ДНК с гистонами и другими связанными с ней белками. Эта реакция не только важна как источник повреждений в живой клетке, но также лежит в основе метода иммунопреципитации хроматина, при котором сшивки индуцированно получают обработкой формальдегидом [154].

ДБС, индуцированные альдегидами, способны к реверсии за счет спонтанного гидролиза. Например, из сшивок, образованных ацетальдегидом, только 25% сохраняется после инкубации в течение 8 ч при 37°C, а время полураспада сшивок, образованных малоновым альдегидом, составляет в тех же условиях 13,4 ч [133].

На мезенхимальных стволовых клетках костного мозга мышей было показано, что обработка клеток формальдегидом в концентрации 75–200 мкМ подавляет выживаемость вследствие образования ДБС [153]. В культуре фибробластов и кератиноцитов человека при нетоксичных концентрациях формальдегида (25–100 мкМ) наблюдается накопление ДБС со временем [155]. В лимфобластах человека увеличение дозы формальдегида приводит к значительному нелинейному росту числа ДБС, что коррелирует с наступлением значительной цитотоксичности [156]. С другой стороны, цитотоксичность ДБС, индуцированных формальдегидом, не сопровождается образованием хромосомных мутаций в клетках млекопитающих, поэтому их роль в канцерогенном действии формальдегида нельзя считать выясненной [157,158].

#### *2.1.4.3. Образование ДНК-белковых сшивок, индуцируемое металлами*

Еще один класс широко распространенных ДБС-индуцирующих агентов — это ионы переходных металлов. Анализ сшивок, индуцируемых металлами, показывает, что некоторые белки присоединяются к ДНК с образованием хелатных комплексов металлов, некоторые — образуют мостиковую сульфидную связь с участием иона металла, но большинство ковалентных ДНК-белковых сшивок все же образуется по механизмам окисления [159]. Ионы переходных металлов имеют высокое сродство к некоторым аминокислотам (преимущественно к His, Cys, Asp), что позволяет им катализировать окислительно-восстановительные реакции в непосредственной близости от белковой глобулы. Например, в исследованиях реакции сшивки ДНК с участием Cr(VI) было показано, что он сначала восстанавливается до Cr(III), который образует комплекс с белком, и затем вступает в реакцию с ДНК, при которой образуется ДБС [132]. Наконец, можно еще раз упомянуть, что координационные соединения многих металлов,

в частности, Pt, способны к образованию ДБС за счет электрофильного присоединения к основаниям ДНК и аминокислотным остаткам белков [72,74,75].

#### *2.1.4.4. Образование ДНК-белковых сшивок противоопухолевыми агентами*

Механизм и образование ДНК-белковых сшивок, индуцированных противоопухолевыми агентами, в целом, сходен с таковым для сшивок между цепями ДНК (разд. 2.1.3). Отличия заключаются в том, что в реакции участвуют не два азотистых основания, а основание и аминокислотный остаток белка. Так как противоопухолевые препараты в основном представляют собой алкилирующие агенты электрофильной природы, реакция часто проходит по аминокислотному остатку Lys. Например, алкилирующий агент β-пропиолактон специфично осуществляет сшивку между *N*7 положением Gua в ДНК и Lys. Инкубация β-пропиолактона с ДНК и очищенными белками ведет к образованию ДБС [160].

#### *2.1.4.5. Образование ДНК-белковых сшивок при ионизирующем излучении*

Под воздействием ионизирующего излучения в клетках на небольшом расстоянии друг от друга образуются молекулы активных форм кислорода (АФК), многие из которых, в том числе крайне реакционноспособный гидроксильный радикал, возникают в высоких концентрациях в небольшом объеме вдоль траектории движения высокоэнергетической частицы (треки АФК). Когда такие треки перекрываются с ДНК, могут возникнуть так называемые «кластерные повреждения», поскольку каждая молекула АФК в области их порождения потенциально может приводить к повреждению ДНК. В результате возникает несколько типов повреждений: ОЦР и ДЦР, АП-сайты, поврежденные основания, сшивки ДНК-ДНК и ДНК-белок. При подсчете количества повреждений каждого типа на единицу дозы поглощенной радиации в клетках млекопитающих было показано, что ДБС образуются в количестве ~150 на клетку на 1 Гр, что больше, чем количество образующихся ДЦР и сшивок ДНК–ДНК (20–40 на клетку на 1 Гр) [131]. При повышении дозы радиации наблюдается линейное увеличение количества ДБС. Показано, что pH, состав среды, температура и фаза роста клеток не влияют на выход ДБС, однако наблюдается заметное увеличение количества сшивок в условиях гипоксии [161]. В клетках млекопитающих индукция образования ДБС под воздействием ионизирующего излучения в 1,5–5,5 раза выше в условиях гипоксии, чем в атмосфере с высоким содержанием кислорода. Более того, в условиях гипоксии ДБС превалируют над другими типами повреждения ДНК [162]. Также клетки, дефицитные по некоторым факторам репарации ДНК, гораздо более чувствительны к ионизирующему излучению в условиях гипоксии, чем при аэрации [119,163]. Под воздействием ионизирующего излучения в условиях гипоксии формируются ДБС типа 1 (разд. 2.1.4), которые

могут повышать радиочувствительность этих клеток [136]. С другой стороны, при анализе весьма чувствительным методом щелочной элюции, позволяющим детектировать сшивки при дозах ионизирующего излучения < 5 Гр, гипоксия практически не влияла на индукцию ДБС [119].

Сшивка Thy–Tyr — доминирующий тип ДБС, обнаруженный в геномной ДНК после воздействия на клетки γ-излучения в присутствии $O_2$ или обработки $H_2O_2$ в присутствии Fe(III) или Cu(II) [121]. Фоновый уровень Thy–Tyr ДБС составляет около 7 на $10^6$ оснований и повышается в несколько раз при γ-облучении [119,121].

ДНК — не единственная мишень для атаки АФК, образованными под воздействием ионизирующего излучения. ДБС могут возникать и по радикальному механизму с атакой $^{\bullet}OH$ аминокислотного остатка, последующим присоединением аминокислотного радикала по C6-положению тимина и окислением получившегося аддукта. При добавлении в реакцию антиоксидантов выход сшивки не снижается, что свидетельствует об индукции ДБС долгоживущими радикалами [131].

#### *2.1.4.6. Образование ДНК-белковых сшивок при ошибках ферментов*

Ферменты метаболизма ДНК неизбежно взаимодействуют со своим субстратом. В ходе реакций, катализируемых некоторыми ферментами метаболизма ДНК, образуются нестабильные ковалентные интермедиаты, которые при ошибках в работе фермента или под воздействием экзогенных факторов могут превращаться в стабильные ДБС. Топоизомеразы типов I и II образуют с фосфатами в составе ДНК тирозилфосфодиэфирную связь, которая затем в ходе реакции подвергается гидролизу. Спонтанно, либо под действием некоторых ингибиторов (антрацены, эпиподофиллотаксины), а также в случае, когда топоизомераза расщепляет ДНК вблизи поврежденных нуклеотидов, продуктивная реакция может прерываться, и топоизомераза остается зафиксированной в виде ДБС [164] (разд. 2.1.4). О значимости такого процесса в метаболических путях клетки свидетельствует тот факт, что существует специальный механизм репарации сшивок тирозилфосфодиэфирной природы с участием тирозилфосфодиэстераз TDP1 и TDP2 [133], ферментов, которые удаляют ковалентную связь между ДНК и TOP I или TOP II соответственно [165]. C5-цитозин-ДНК-метилтрансферазы в ходе реакции образуют ковалентную связь с атомом C6 метилируемого остатка Cyt и также могут оставаться в составе ДБС в случае прерывания продуктивной реакции. На этом основано действие антинеопластических агентов азацитидина и децитабина, которые включаются в ДНК и служат сайтами образования конъюгатов с метилтрансферазами [122].

Распространенное в эукариотических клетках повреждение — образование амидной связи между ДНК-полимеразой β (разд. 2.1.4) и 2-дезоксириболактоном, который образуется после расщепления окисленного АП-сайта эндонуклеазой APEX1. ДНК-полимераза β и некоторые

другие ферменты, обладающие функцией дезоксирибофосфатлиазы в пути ЭРО, образуют основания Шиффа по позиции C1′ удаляемого дезоксирибозного фрагмента. При окислении дезоксирибозы до лактонового производного попытка репарации с нуклеофильной атакой по C1′ приводит к захвату фермента в виде ДБС [8]. Еще одно повреждение ДНК, приводящее в конечном итоге к появлению ДБС — нитрозилирование гуанина с последующей изомеризацией в оксанин, который реагирует с аминогруппами любых ДНК-связывающих белков с образованием амидной связи [18].

ДНК-белковые сшивки также могут образовываться в процессе мейоза. Нуклеаза SPO11 вносит двунитевые разрывы для инициации мейотической рекомбинации, каждая субъединица димерного белка связывается с одним из 5′-концов при разрыве через тирозилфосфодиэстеразную связь. В отличие от сшивок с топоизомеразой I, сшивки SPO11–ДНК удаляются эндонуклеазами, которые расщепляют ДНК за 21–37 п. н. от места сшивки. ДБС с топоизомеразой II удаляются по этому же механизму [166].

#### *2.1.4.7. Репарация ДНК-белковых сшивок*

В зависимости от химического состава, размера и ориентации ДБС могут удаляться из генома с помощью различных систем репарации. В случае, когда сшивка образована за счет хелатирования иона металла, возможен прямой возврат к нативному состоянию при удалении мостикового иона. Для альдегид-индуцируемых сшивок возможна их непосредственная гидролитическая реверсия [131]. Для некоторых видов ДБС, в частности, для тирозилфосфоэфирных сшивок, существуют специализированные системы репарации (разд. 2.1.4.6). Наконец, большинство ДБС представляют собой объемные аддукты, сильно искажающие спираль, и можно ожидать, что сшивки будут субстратами для пути эксцизионной репарации нуклеотидов (ЭРН) [131].

Для изучения репарации ДБС обычно используется анализ чувствительности к ДБС-индуцирующим агентам линий клеток про- и эукариот, дефицитных по ферментам репарации [167], так как из-за химической гетерогенности ДБС прямое измерение репарации сшивок, за исключением тимин-тирозиновых, сложно провести.

При исследовании клеток *E. coli* было показано, что системы ЭРН и RecBCD-зависимая гомологичная рекомбинация (ГР) совместно снижают токсичность ДБС-индуцирующих агентов. При обработке набора мутантных штаммов такими ДБС-индуцирующими агентами, как формальдегид (образует широкий спектр сшивок) и азацитидин (селективно приводит к ковалентному захвату цитозинметилтрансферазы Dcm с молекулярной массой 53 кДа), было показано, что белки меньше 12–14 кДа удаляются по механизму ЭРН, а превышающие этот размер — удаляются RecBCD-зависимой ГР [168]. Подробные исследования вклада ЭРН и ГР

при репарации ДНК-белковых сшивок разного размера показали, что в клетках бактерий белки в составе ДБС не подвергаются протеолизу. Эффективность ЭРН напрямую зависит от размера белка [169]. Предельный размер белка, поддающегося ЭРН, обусловлен эффективностью связывания с ДБС узнающего повреждения комплекса $UvrA_2B$ [167]. Показано, что в эксцизионной репарации ДБС принимает участие эндонуклеаза Cho — альтернативная эндонуклеаза пути ЭРН, а ДНК-геликаза UvrD способна проходить место сшивки и вытеснять цепь, содержащую ДБС. RecBCD-зависимая ГР с последующим PriA–PriB-зависимым возобновлением репликации представляет собой наиболее эффективный механизм, помогающий клеткам выживать при возникновении ДБС [167]. Отсутствие транслезионных полимераз практически не влияет на выживаемость клеток *E. coli*, содержащих ДБС, а, значит, транслезионный синтез, вероятно, не вносит существенного вклада в борьбу клеток с такими сшивками [167].

При исследовании репарации ДБС в клетках млекопитающих было открыто несколько путей, использование которых частично зависит от природы сшивки. Как уже упоминалось, сшивки с участием топоизомеразы I репарируются в один шаг ферментом TDP1, который расщепляет 3′-тирозилфосфодиэстеразную связь и освобождает 3′-OH-конец разрыва, способный к лигированию.

ЭРН принимает меньшее участие в репарации ДБС у млекопитающих, чем у прокариот, так как минимальный предел размера белка, поддающегося процессингу системой ЭРН, у млекопитающих ниже, чем у бактерий. Этот путь работает эффективно только при наличии сшивки с коротким пептидом (4–12 аминокислотных остатков). На основании эффективности ЭРН в удалении небольших ДБС *in vitro* предполагается, что в клетках млекопитающих белки в составе ДБС перед поступлением в путь ЭРН должны деградироваться клеточными протеазами, например, убиквитинзависимой протеасомной системой [135]. Показано, что при инкубации с ингибиторами 26S протеасомы репарация ДБС уменьшается более чем на 50% [149]. Полученная сшивка ДНК с коротким пептидом уже представляет собой субстрат для репарации и удаляется ЭРН [136]. Была предложена модель, в которой репарация ДНК-белковых сшивок сопряжена с репликацией [135]. Большой вклад в механизмы устойчивости клеток млекопитающих к ДБС вносит система ГР и повторного старта репликации, которые не зависят от размера пришитого белка. При этом вовлечение пути ГР в репарацию ДБС млекопитающих, вероятно, зависит от наличия разрывов ДНК рядом с ДБС [170].

В перечисленных выше исследованиях была доказана необходимость протеотилической деградации ДБС с участием 26S протеасомы для успешной репарации этого вида повреждений. Недавно были обнаружены более специфические протеазы, вовлеченные в репарацию ДБС —

Wss1 дрожжей и его функциональный гомолог животных SPRTN, которые расщепляют сшитый белок до небольшого пептида [171] (Рисунок 10).

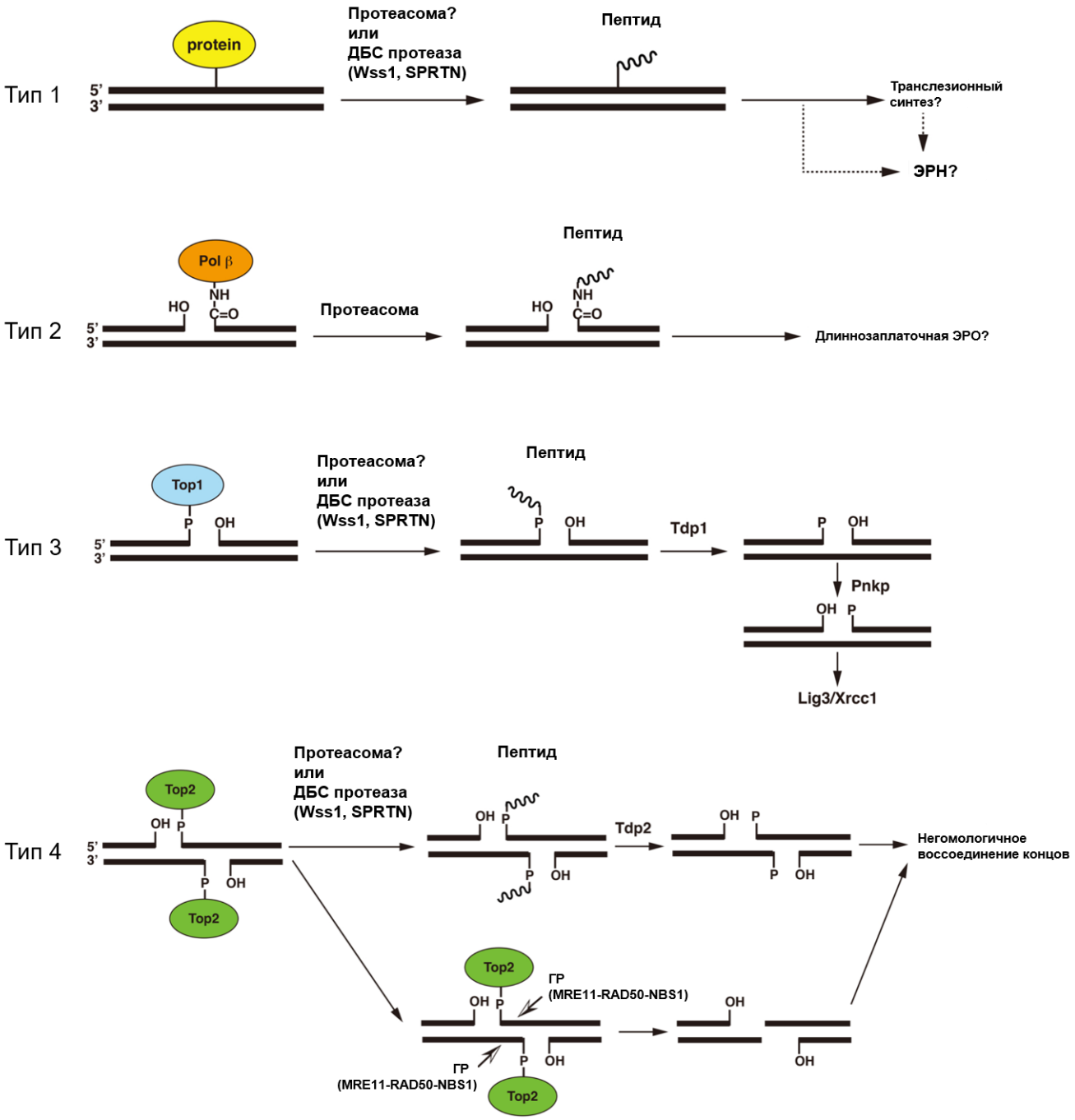


**Рисунок 10.** Механизмы репарации различных типов ДБС (по [138]).

Совсем недавно была открыта еще одна протеаза Ddi дрожжей, участвующая в репарации ДБС [172], однако, несмотря на недавно открытые специфические протеазы и неослабевающий интерес исследователей, до сих пор не ясно, какой путь ответственен за репарацию ДБС *in vivo* и как осуществляется переключение и взаимодействие путей репарации ДБС между собой.

### *2.1.4.8. Прохождение ДНК-белковых сшивок в контексте репликативного аппарата*

Присутствие такого большого аддукта, как ДБС, несомненно, сказывается на метаболизме ДНК. Можно ожидать, что наличие сшивки осложнит работу ДНК-полимераз — ферментов, выполняющих в клетке ряд фундаментальных функций. Взаимодействие ДНК-полимераз с повреждениями может происходить в ходе репликации, транслезионного синтеза или репарации. Эти процессы, в особенности первые два, вовлекают достаточно большое количество разных белков.

В репликативной вилке геликаза разделяет цепи материнской ДНК (Рисунок 11). В клетках *E. coli* геликаза $DnaB_6$ представляет собой гексамерное кольцо и транслоцируется вдоль отстающей цепи в направлении 5′→3′. ДНК-полимераза III осуществляет синтез как по лидрующей, так и по отстающей цепи. Считается, что эукариотические репликативные геликазы (комплекс MCM2–MCM7) также собираются в гексамерное кольцо, но перемещаются по лидирующей цепи в направлении 3′→5′. У эукариот ДНК-полимеразы ε и δ осуществляют синтез по лидирующей и отстающей цепям соответственно. Центральный канал гексамерного кольца геликазы $DnaB_6$ имеет в диаметре 20–40 Å и вмещает двуцепочечную ДНК. Таким образом, обычные блокирующие повреждения проходят через гексамерное кольцо и достигают активного центра ДНК-полимеразы, ингибируя элонгацию и приводя к блоку ДНК-полимеразы [136]. Вероятность же ДБС пройти через канал геликазного гексамера, очевидно, зависит от размера белковой части сшивки. Показано, что ДБС с участием метилтрансферазы Dcm (53 kDa) приводят к коллапсу репликативной вилки за счет ингибирования геликазы DnaB [122]. Те же белки, размер которых позволяет им проходить через канал геликаз, могут, вероятно, взаимодействовать с ДНК-полимеразами непосредственно.

Недавно стало понятно, что ДБС, взаимодействуя с репликативным аппаратом эукариот, подвергаются протеолизу. Так сшивка, находящаяся на лидирующей цепи, останавливает репликацию в системе экстракта ооцитов *Xenopus laevis*, блокируя геликазу [173]. Белковая часть ДБС подвергается протеасомной деградации до аддукта ДНК-пептид и эффективно проходится геликазой, после чего синтез ДНК возобновляется, а оставшийся аддукт преодолевается ДНК-полимеразой ζ. ДБС на отстающей цепи лишь временно останавливает репликативный аппарат и также деградирует по протеасомному пути. Таким образом, механизм протеолиза в S-фазе помогает избежать коллапса репликативной вилки [173].

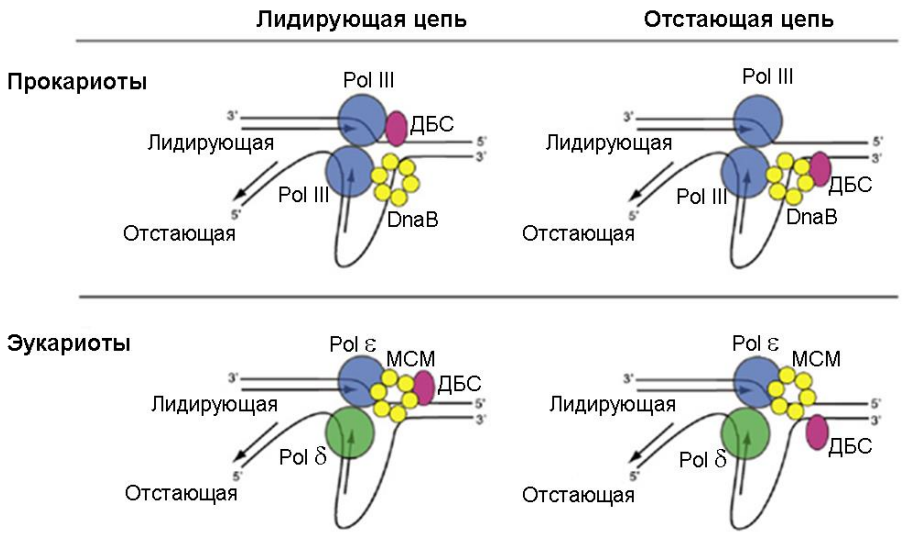


**Рисунок 11.** Модель прокариотической и эукариотической репликативной вилки, движущейся через ДБС, которая находится в лидирующей или отстающей цепи. Геликазы DnaB или MCM разделяют ДНК-дуплекс на лидирующую и отстающую цепи. ДНК-полимераза III у бактерий и POLε/POLδ у эукариот ведут синтез. ДБС показана эллипсом. Прочие белки репликативной вилки не показаны [136].

У многих бактериофагов репликация кольцевой ДНК осуществляется однонаправлено по механизмам, кардинально отличающимся от механизма репликации у про- и эукариот (механизм катящегося кольца для одно- и двуцепочечной ДНК, механизм катящейся шпильки, вытеснения цепи и т. п.). В этих случаях структура репликативной вилки сильно отличается от описанной выше, и зачастую разделение цепей материнской ДНК осуществляется активностью самой ДНК-полимеразы, вытесняющей впереди лежащую цепь. В этом случае, ДНК-полимеразы могут непосредственно сталкиваться с ДБС.

Таким образом, взаимодействие ДНК-полимераз с ДБС или продуктами их деградации возможно даже с учетом того, что молекулярно-генетические процессы с участиеми ДНК-полимераз обычно протекают в сложных комплексах. Для понимания механизмов взаимодействия ДНК-белковых сшивок с репликативным и репаративным аппаратом клетки в целом представляется необходимым изучить процессы, протекающие при непосредственном взаимодействии ДНК-полимераз с ДБС.

### *2.1.5. Нековалентно связанные с ДНК белки как возможные препятствия для ДНК-полимераз*

В процессе жизнедеятельности организма различные белки постоянно образуют с ДНК прочные нековалентные комплексы. В клетках млекопитающих наибольшее количество таких белков представляют собой структурные компоненты хроматина, участвующие в упаковке ДНК. В частности, с ДНК всегда ассоциированы гистоны — основные белковые компоненты хромосом

даже в деконденсированном состоянии. Эти высококонсервативные положительно заряженные ядерные белки прочно связаны с ДНК, образуя цепочку нуклеопротеидных частиц — нуклеосом, представляющих собой низший уровень упаковки ДНК в хромосоме. На более высоких уровнях упаковки в состав хроматина привлекается ряд других белков — конденсины, когезины и т. п.

Для прохождения репликации молекула ДНК должна быть освобождена от белковых комплексов и доступна для ДНК-полимераз. Если белок, прочно связанный с ДНК, не может быть легко вытеснен, он может приводить к блокированию движения репликативной вилки и фактически восприниматься репликативным аппаратом как ДБС. Ниже рассмотрено несколько изученных моделей взаимодействия ДНК-полимераз и репликативной вилки с белковыми «препятствиями», прочно нековалентно связанными с ДНК.

РНК-полимераза — наиболее частое «препятствие» при синтезе ДНК-полимеразами, так как транскрипция в клетке не прекращается при протекании репликации. ДНК-полимеразы могут сталкиваться с РНК-полимеразами либо при сонаправленном движении, либо «лоб-в-лоб». Столкновения «лоб-в-лоб» приводят к коллапсу репликативной вилки, в то время как столкновение при сонаправленном движении приводит к вытеснению РНК-полимеразы и возобновлению репликации с использованием оборванного транскрипта в качестве праймера [174]. Предполагается, что движению репликативной вилки при столкновении с РНК-полимеразами способствуют вспомогательные ДНК-геликазы [175]. Однако механизмы привлечения дополнительных белков в вилку для разрешения ситуаций столкновения с РНК-полимеразами остаются во многом неясными.

Геном эукариот упакован в уникальную нуклеопротеиновую структуру — хроматин, в котором ДНК намотана на нуклеосомы — большие белковые комплексы, состоящие из гистонов. В таком состоянии процесс репликации невозможен до тех пор, пока структура хроматина не будет ремоделирована для беспрепятственного прохождения репликативной вилки; после репликации необходима обратная сборка нуклеосом. Успешность репликации во многом зависит от того, как эффективно будет работать АТФ-зависимый фактор ремоделирования хроматина (ACF). Также в разборке хроматина, связанной с репликацией, участвуют белковые комплексы WSTF и INO80. Для восстановления нуклеосом на ДНК необходим консервативный шаперон гистонов CAF-1, обладающий уникальным свойством стимулировать связывание гистонов H3-H4 с вновь синтезированной ДНК. Перенос этих гистоновых белков с нереплицированной ДНК к месту депонирования CAF-1 осуществляется с помощью белка ASF1. Для добавления гистонов H2A-H2B и завершения формирования нуклеосомы необходим шаперон NAP1. Таким образом, нуклеосомы представляют собой пример прочного ДНК-белкового комплекса, для преодоления которого в ходе репликации существует специальная достаточно сложная система [176,177].

Во время репликации, длинные оц-фрагменты ДНК защищены обладающими высокой афинностью к ДНК белками Ssb (RPA у эукариот). Недавнее исследование показало, что присутствие Ssb не замедляет скорость элонгации ДНК-полимеразами γ человека и бактериофага T7 [178]. Были показано также наличие специфических взаимодействий между ДНК-полимеразами и Ssb [179], однако до сих пор не ясно, каким образом эти взаимодействия помогают преодолеть высокий энергетический барьер связывания Ssb–ДНК. Возможно, что вытеснение Ssb облегчается за счет электростатического отталкивания между отрицательно заряженными участками поверхностей белков Ssb и ДНК-полимераз [178].

Взаимодействие ДНК-полимераз с белками, прочно связанными с ДНК, также хорошо изучено на примере ДНК-полимеразы V *E. coli* и RecA-филаментов. При генотоксичном воздействии на клетку активируется белок RecA, запускающий SOS-ответ, в результате которого индуцируется синтез ряда защитных белков, в т. ч. транслезионную ДНК-полимеразу V ($UmuD_2C$). Кроме того, для стабилизации поврежденной ДНК RecA связывается с оцДНК, образуя на ней филаменты. Однако для возобновления репликации RecA должен быть удален с ДНК. Механизм, по которому ДНК-полимераза V разрушает RecA-филамент, называют «моделью бульдозера» [180]: ДНК-полимераза V связывается с 3′-концом филамента [181] и ведет синтез ДНК, вытесняя RecA из ДНК в направлении 3′→5′, не требуя для этого гидролиза АТФ [180]. Одновременно с этим, в направлении 5′→3′ происходит уже АТФ-зависимая разборка RecA-филаментов (Рисунок 12).

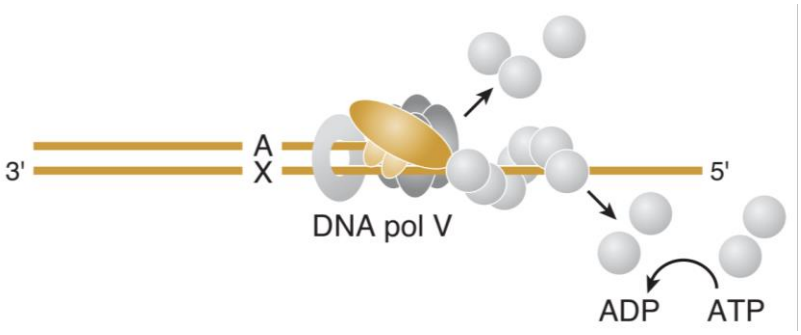


**Рисунок 12.** Схема вытеснения RecA ДНК-полимеразой V. Серые кружки — мономеры RecA, темно-серым показаны мономеры белка Ssb, оранжевым — ДНК-полимераза V (по [180]).

Приведенные примеры отражают достаточно специфические взаимодействия, однако реакция ДНК-полимераз на прочие белки ядерного матрикса, такие как ламинины, топоизомераза II и др., а также неструктурные белки, которые также в большом количестве присутствуют в комплексе с ДНК, практически не изучена. Маловероятно наличие

специфических механизмов вытеснения для каждого из возможных прочно связанных с ДНК белков, а универсальную модель такого взаимодействия только предстоит описать.

В данной работе для изучения механизма взаимодействия ДНК-полимераз с неструктурными белками, образующими с ДНК стабильные комплексы, в качестве моделей последних были выбраны ДНК-гликозилазы OGG1 и NEIL1 (непосредственно измеренное характерное время полураспада комплекса с ДНК для OGG1 ~17 мин [182]) и нуклеаза адаптивного иммунитета бактерий Cas9 (характерное время полураспада комплекса с ДНК ~ 43-91 час [183]). Ниже рассмотрены некоторые аспекты их взаимодействия с ДНК.

#### *2.1.5.1. ДНК-гликозилазы*

Из неструктурных белков, образующих с ДНК стабильные комплексы, стоит упомянуть некоторые ферменты репарации, в частности ДНК-гликозилазы.

Эксцизионная репарация оснований (ЭРО) — основной способ репарации ДНК в живой клетке, направленный на исправление модифицированных азотистых оснований, вызванных спонтанным дезаминированием и гидролизом, а также действием алкилирующих агентов и АФК. ЭРО — многостадийный процесс, инициируемый ферментами ДНК-гликозилазами, которые узнают повреждение и расщепляют *N*-гликозидную связь между азотистым основанием и атомом C1′ дезоксирибозы. Выщепление азотистого основания характерно именно для ЭРО, тогда как в других системах репарации (за исключением реактивации) происходит удаление dNMP либо короткого дезоксирибонуклеотида. Дальнейший путь ЭРО определяется природой ДНК-гликозилазы, инициировавшей процесс. Если *N*-гликозидная связь была гидролизирована монофункциональной ДНК-гликозилазой, то возникает АП-сайт, после чего другой фермент, АП-эндонуклеаза (у человека APEX1), гидролизует фосфодиэфирную связь с 5′-стороны от него. Однако некоторые ДНК-гликозилазы способны сами расщеплять АП-сайт с 3′-стороны по механизму β-элиминирования (бифункциональные ДНК-гликозилазы или ДНК-гликозилазы/АП-лиазы). Остаток дезоксирибозы, образовавшийся в результате β-элиминирования, удаляется из ДНК за счет фосфодиэстеразной активности той же АП-эндонуклеазы [59,184,185]. Впоследствии корректный dNMP включается репаративной ДНК-полимеразой (ДНК-полимераза I у прокариот и ДНК-полимераза β у эукариот).

Чтобы удалить 2′-дезоксирибозо-5′-фосфатный остаток (dRP) и создать субстрат для лигирования, необходима еще одна ферментативная активность (фосфодиэстераза или 2'-дезоксирибозо-5'-фосфатлиаза, dRP-лиаза), принадлежащая ДНК-полимеразе β у эукариот и белкам RecJ или Fpg у прокариот. В конце процесса ДНК-лигаза (у эукариот — ДНК-лигаза IIIα в комплексе с фактором XRCC1) восстанавливает непрерывную цепь ДНК. При отсутствии dRP-лиазной активности в клетках эукариот ДНК-полимераза δ и факторы RFC и PCNA

осуществляют синтез цепи ДНК с вытеснением исходной цепи, затем флэп-эндонуклеаза FEN1 удаляет вытесненную цепь, а ДНК-лигаза I восстанавливает ковалентную связь между 5′-фосфатом и 3′-OH группой. У прокариот при отсутствии dRP-лиазной активности вытесненную цепь деградирует 5′→3′-экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы I. Затем образовавшийся ОЦР лигируется ДНК-лигазой IIIα в комплексе с белком XRCC1. В длиннозаплаточном варианте ЭРО после включения первого dNMP репаративный синтез продолжается с заменой 2–20 нуклеотидов путем вытеснения или деградации впереди лежащей цепи. У эукариот за такой синтез отвечают ДНК-полимеразы δ, ε или β при участии эндонуклеазы FEN1, а также вспомогательных факторов PCNA, RFC и RPA. Затем ОЦР репарируется ДНК-лигазой I [185–187].

Таким образом, в процессе эксцизионной репарации оснований повреждения репарируются за счет последовательного действия нескольких ферментов — ДНК-гликозилазы, АП-эндонуклеазы, ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы, причем считается, что эти ферменты не образуют единого олигомерного комплекса, а динамически сменяют друг друга в области повреждения. Некоторые ДНК-гликозилазы обладают очень высоким сродством к продукту реакции ($K_d$ < 10 пМ) [182]. Такое их свойство объясняется тем, что промежуточные продукты репарации (АП-сайты или ОЦР) потенциально более опасны для клетки, чем исходное поврежденное основание. Повышенное сродство гликозилаз к АП-ДНК-продукту может проявляться в достаточно широком диапазоне, начиная от легкого ингибирования (UNG человека, Fpg и Nei *E. coli*) и до полной остановки фермента после одного акта катализа (TDG человека, MutY *E. coli*). Во всех этих случаях ДНК-гликозилаза вытесняется из комплекса с АП-ДНК под действием АП-эндонуклеазы, что в условиях стационарной кинетики приводит к стимуляции активности гликозилазы АП-эндонуклеазой. Явление стимуляции было открыто на примере урацил-ДНК-гликозилазы и АП-эндонуклеазы человека (UNG, APEX1); APEX1 ускоряет работу фермента UNG в 1,5–2 раза [188]. Последующие работы подтвердили, что АП-эндонуклеазы в той или иной мере стимулируют активность практически всех известных ДНК-гликозилаз [182,189].

Из всех примеров ДНК-гликозилаз с высоким сродством к продукту, активируемых АП-эндонуклеазами, лучше всего изучена пара OGG1 и APEX1 [190–195]. OGG1 — бифункциональная 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза, специфичная для эукариот и не гомологичная прокариотической 8-оксогуанин ДНК-гликозилазе Fpg. Изолированный фермент OGG1 характеризуется быстрым связыванием с субстратом и медленным высвобождением [196–198]. Такими образом, для него отдельно могут быть определены константа скорости гидролиза *N*-гликозидной связи ($k_2$) и комбинированная константа скорости реакции β-элиминирования и

высвобождения продукта ($k_3$, Рисунок 13). АП-эндонуклеаза APEX1 связывается с ДНК с 5′-стороны от молекулы OGG1 и активно вытесняет ее из комплекса с ДНК, увеличивая значение константы $k_3$ [193–195,199].

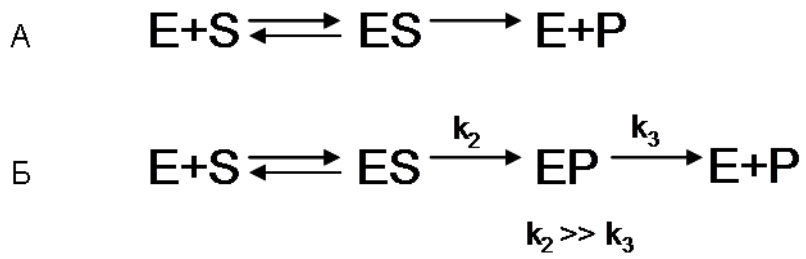


**Рисунок 13.** Кинетическая схема реакции, катализируемой ферментами с высоким сродством к продукту (Б). Для сравнения приведена минимальная кинетическая схема Михаэлиса–Ментен (А).

### *2.1.5.2 Система иммунитета бактерий CRISPR/Cas*

На сегодняшний день система адаптивного иммунитета бактерий против вирусов, опосредованная геномными кластерами, разделенными регуляторными промежутками коротких палиндромных повторов (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR) и ассоциированных с ними белок-кодирующими генами *cas* (CRISPR-associated), представляет огромный интерес для многих отраслей биологии, в частности, как мощный инструмент геномного редактирования [200–202]. CRISPR — это участок ДНК, состоящий из набора коротких повторов, разделенных уникальными промежуточными последовательностями (спейсерами). CRISPR копируются в геном бактерий с последовательностей ДНК инфекционного агента. Иммунитет против новых вирусов может развиваться путем добавления в геном бактерий новых спейсеров. Таким образом, уникальные спейсеры CRISPR представляют собой элементы, способствующие узнаванию вирусных геномов [203–205]. Для иммунного ответа бактерий, кроме CRISPR, необходим также набор ассоциированных с CRISPR генов *cas*, часть которых кодирует нуклеазы, гидролизующие чужеродную ДНК [204,206]. Эти белки образуют комплекс с направляющей РНК (crРНК), синтезируемой с CRISPR-матрицы; комплекс вносит ДЦР в целевую ДНК, содержащую протоспейсер — участок, комплементарный crРНК [203,204]. Важно отметить, что для предотвращения связывания и деградации собственных бактериальных участков CRISPR-локусов, связывание и деградация ДНК протоспейсера происходит только в присутствии специфичного нуклеотидного участка PAM (protospacer adjacent motif), который различается по размеру и последовательности в зависимости от вида нуклеазы Cas [207].

Системы CRISPR/Cas разделены на 5 основных типов согласно своему происхождению и механизму действия [200,206,207]. Наибольший интерес как инструмент геномного

редактирования представляет собой система CRISPR/Cas9 типа II, где в качестве нуклеазы выступает белок Cas9, который не требует других полипептидов ни для связывания, ни для расщепления ДНК [208]. Чаще всего используется белок Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). *In vivo* для активности нуклеазы Cas9 необходимо присутствие двух молекул РНК: CRISPR-ассоциированной направляющей РНК (crРНК), комплементарной участку вирусной ДНК, и трансактивирующей РНК (tracrРНК), играющей структурную роль в составе рибонуклеопротеина Cas9 [200,206,209,210]. Однако обе они могут быть объединены в химерную молекула — единую направляющую РНК (sgРНК) [204]. Полная длина sgРНК составляет около 120 н., из которых область длиной 19-20 оснований обеспечивает комплементарность с ДНК-мишенью. Для активности SpCas9 также необходимо присутствие PAM, содержащего тринуклеотид NGG непосредственно с 3′-стороны от протоспейсера. После связывания с ДНК, комплементарной sgРНК, Cas9 расщепляет обе цепи ДНК на расстоянии трех нуклеотидов от PAM, создавая ДЦР с тупыми концами.

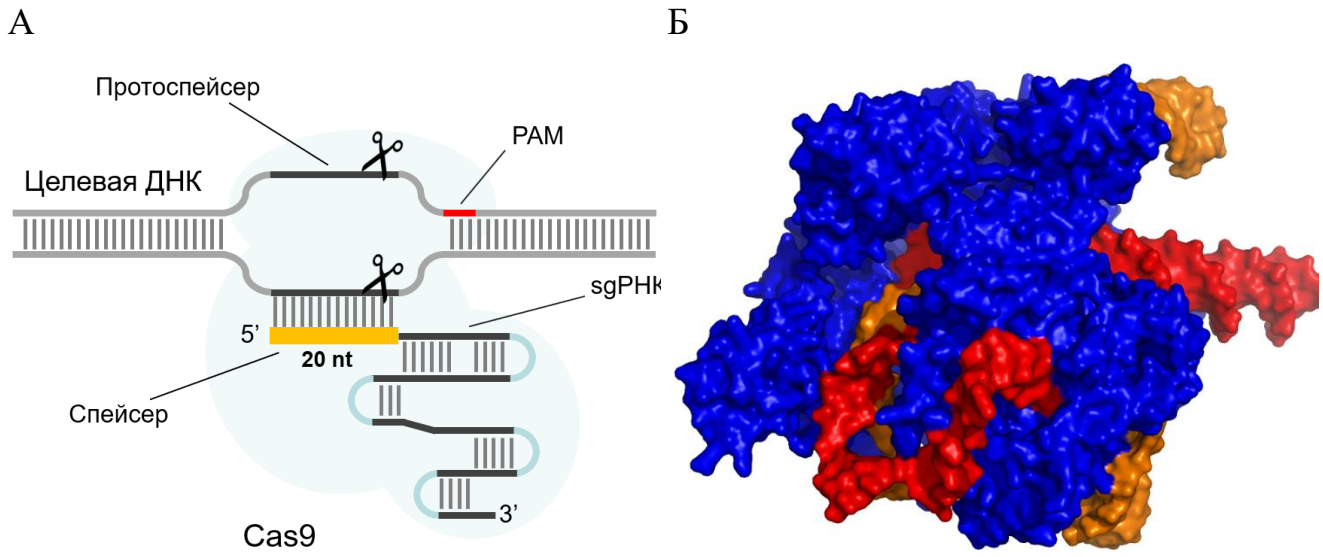


**Рисунок 14.** А — CRISPR/Cas9 система типа II. Cas9 направляется единой sgРНК для сайт-специфического разрезания ДНК (по [204]). Б — структура Cas9 (синий) в комплексе с sgРНК (оранжевый) и целевой ДНК (красный) (структура 5y36 [211]).

Фермент SpCas9 представляет собой большой мультидоменный белок с молекулярной массой около 160 кДа. Кроме описанной выше РНК-зависимой ДНК-эндонуклеазной активности, Cas9 также участвует в созревании crРНК и включении спейсеров в CRISPR-локус [212]. Методами рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии были получены структуры различных комплексов SpCas9 (Рисунок 14Б) [211,213–220]. На основании структурных данных, биохимических исследований и компьютерного моделирования был предложен механизм узнавания и катализа ДНК комплексом Cas9–sgРНК (Рисунок 14). В

текущей модели предполагается, что образование комплекса Cas9–sgРНК предшествует поиску ДНК-мишени. Собственно поиск осуществляется путем трехмерной диффузии [221,222], что отличает Cas9 от основной массы ДНК-зависимых ферментов, осуществляющих одномерную диффузию по контуру ДНК в поисках своих мишеней [223]. Узнавание мишени в ДНК ферментом SpCas9 начинается с образования специфичных связей белка с нуклеотидами PAM [224], после чего происходит разделение цепей ДНК дуплекса, стабилизация расплавленного состояния и образование гетеродуплекса ДНК-РНК [214,219,225]. Образование гетеродуплекса сопровождается значительными конформационными изменениями молекулы белка и сборкой активного центра [226,227], в результате чего осуществляется гидролиз обеих цепей ДНК [215,228]. SpCas9 представляет собой очень медленно обращающийся фермент: после завершения каталитического акта Cas9 остается настолько плотно связан с расщепленной ДНК, что считается условно однооборотным ферментом [183,228]. По этой причине Cas9 представляет собой очень удобную модель белка, прочно связанного с ДНК [183].

## *2.2. ДНК-полимеразы*

Репликация ДНК — один из важнейших процессов в клетке. Она осуществляется мультиферментным комплексом (реплисомой), в состав которого входят топоизомераза, ДНК-геликаза, ДНК-полимераза, праймаза и другие факторы. Репликативные топоизомераза и геликаза раскручивают двуцепочечную ДНК, в результате чего образуются две одноцепочечные ДНК, которые представляют собой матрицы для двух молекул ДНК-полимеразы, которые ведут синтез по лидирующей цепи и отстающей цепи (непрерывный и прерывистый синтез соответственно). В целом, механизм репликации геномной ДНК высококонсервативен во всех клеточных формах жизни [229,230].

Реплисома осуществляет синтез, преодолевая множество барьеров из ДНК-ассоциированных белков — нуклеосом, сайт-специфичных ДНК-связывающих белков и т. п. Репликативные геликазы разрушают нуклеосомы у эукариот, что сопряжено с модификацией гистонов и привлечением специализированных шаперонов, ассоциированных с геликазами, для разборки и сборки нуклеосом [231]. Геликазы также способны с разной эффективностью раскручивать ДНК, связанную с ДНК-связывающими белками [232,233] и вытеснять некоторые белки из комплексов с двуцепочечной ДНК [234]. Однако белки, связанные с ДНК, часто могут образовывать ДНК-белковые сшивки под воздействием различных эндогенных и экзогенных агентов (разд. 2.1.4). Было показано, что ДБС ингибируют репликацию плазмид [122,169,235] и, возможно, хромосомной ДНК, что указывает на то, что в целом ДБС представляют собой препятствие для движения реплисомы. Практически не известно, как репликативные геликазы, а также другие ДНК-геликазы, участвующие в клеточных процессах, реагируют на белки,

ковалентно сшитые с ДНК. На сегодняшний день этот вопрос рассматривался только в одной работе [236]. В случае, если ДНК-геликаза оказывается способна преодолеть повреждение, поддержание генетической стабильности организма в процессе репликации будет зависеть от ДНК-полимераз. Хотя предпологается, что ДНК-полимераза не способна вести синтез на матрицах, содержащих такой объемный белковый аддукт, при множестве других биологически значимых ситуаций (разд. 2.1.4), при которых ДНК-полимеразы также могут взаимодействовать с ДБС, механизм их взаимодействия с ДБС остается неясным.

### *2.2.1 Классификация и свойства ДНК-полимераз*

ДНК-полимеразы играют ключевую роль в процессах копирования генома и сохранения его интактной структуры. Они осуществляют синтез дочерних цепей при репликации, а также синтезируют участки ДНК взамен поврежденных в ходе репарации. Несмотря на разнообразие аминокислотных последовательностей, по своей третичной структуре ДНК-полимеразы напоминают полураскрытую кисть правой руки, в которой выделяют субдомены «ладонь», «пальцы» и «большой палец» [237]. Субдомен «ладонь» катализирует включение dNMP на 3′-конец праймера, субдомен «пальцы» отвечает за взаимодействия между включаемым dNMP и комплементарным основанием ДНК-матрицы, а субдомен «большой палец» обеспечивает позиционирование ДНК-дуплекса, взаимодействуя с малой бороздкой.

На основании особенностей структуры и филогенетического родства ДНК-полимеразы разделяют на несколько семейств (Рисунок 15) [238,239]. **Семейство A** содержит репаративные и некоторые репликативные ДНК-полимеразы (ДНК-полимераза I бактерий, митохондриальная ДНК-полимераза γ эукариот, ДНК-полимераза бактериофага T7). В **семейство B** входят в основном репликативные полимеразы, обладающие высокой точностью синтеза и участвующие в синтезе как лидирующей, так и отстающей цепей в ходе репликации (эукариотические ДНК-полимеразы α, δ, ε, ζ, некоторые архейные ДНК-полимеразы, ДНК-полимераза бактериофага T4). Многие из них обладают 3′→5′-экзонуклеазной активностью для коррекции ошибочно включенных нуклеотидов, не комплементарных матрице. **Семейство C** состоит в основном из бактериальных репликативных ферментов с 3′→5′-экзонуклеазной активностью (ДНК-полимераза III *E. coli*). **Семейство D** содержит репликативные полимеразы архей; в настоящее время оно остается малоизученным. В состав **семейства X** входят ДНК-полимераза β эукариот — основная ДНК-полимерааза, участвующая в процессе эксцизионной репарации оснований, а также ДНК-полимеразы λ и μ и терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза TdT, участвующие в том числе в соединении негомологичных концов при восстановлении ДЦР.

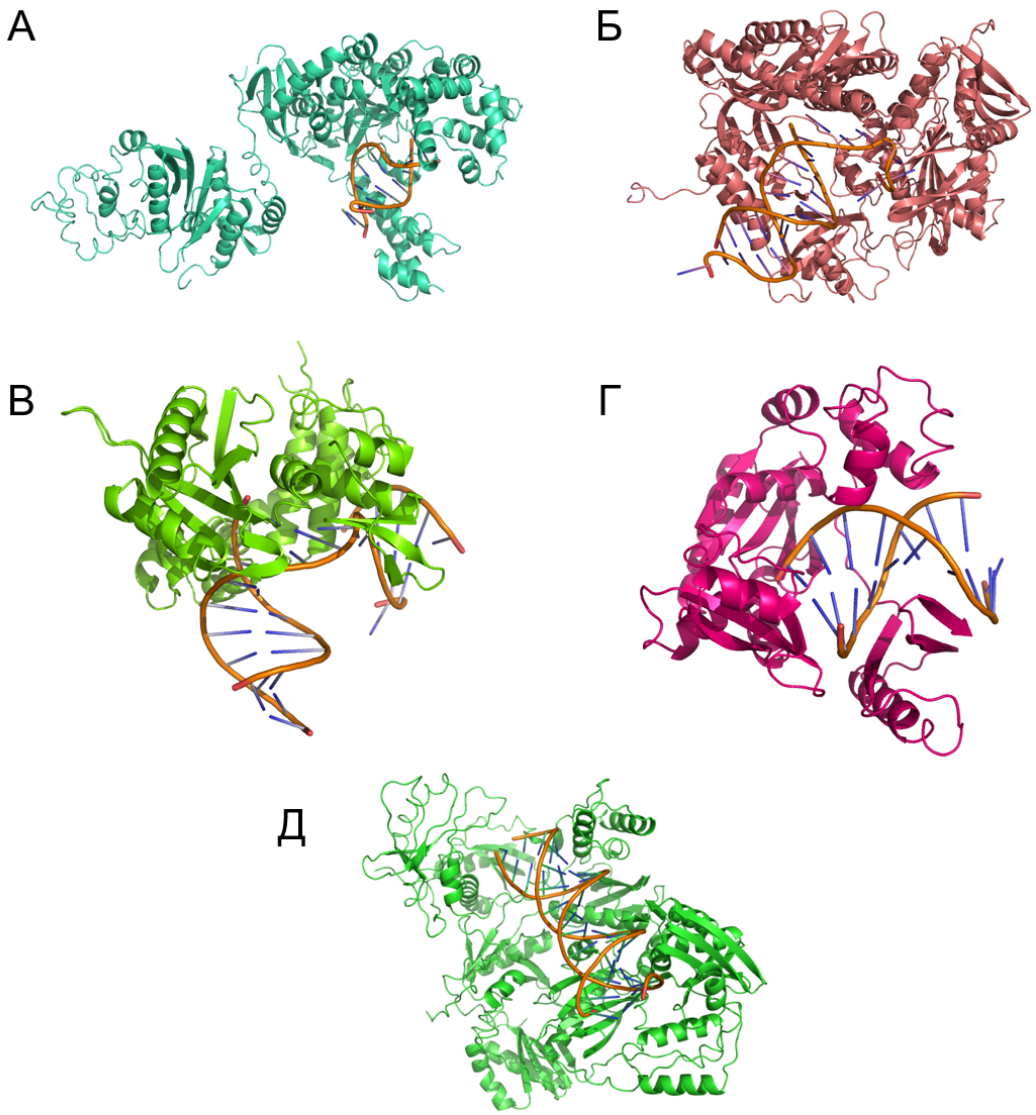


**Рисунок 15.** Структуры представителей основных семейств ДНК-полимераз. А) ДНК-полимераза I *Thermus aquaticus* (*Taq*-полимераза, семейство А) [253]; Б) ДНК-полимераза бактериофага RB69 (семейство В) [254]; В) ДНК-полимераза β человека (семейство X) [255]; Г) ДНК-полимераза IV *Sulfolobus solfataricus* (Dpo4, семейство Y) [256]; Д) РНК-зависимая ДНК-полимераза вируса иммунодефицита человека (семейство RT) [257].

ДНК-полимеразы **семейства Y** отличаются от прочих низкой точностью при работе на неповрежденных матрицах, но способны осуществлять синтез по поврежденной ДНК-матрице (транслезионный синтез) вследствии их особой структурной организации — они обладают коротким субдоменом «пальцы», в результате чего их активный центр достаточно широк, чтобы связать искаженную повреждением матрицу. К этому семейству относятся ДНК-полимеразы IV и V *E. coli*, эукариотические ДНК-полимеразы η, ι, κ и Rev1. *In vivo* POLη ответственна за прохождение *цис-син* тимин-тиминовых (TT) димеров [240]. Кроме хорошо изученного прохождения POLη *цис-син* TT димеров, на данный момент имеется мало информации о том, какие транслезионные полимеразы ответственны за прохождение конкретных повреждений в живой клетке. В экспериментах *in vitro* было показано, что POLη способна преододевать АП-сайты [241], 8-oxoGua [242], аддукт (+) *транс-анти*-бенз[*a*]пирендиолэпоксида с гуанином [243],

$N^6$-этенодезоксиаденозин [244], $O^6$-метилгуанин [245] и внутрицепочечную сшивку ДНК–ДНК — аддукт с цисплатином GpG [246]. POLι преодолевает АП-сайты, 8-oxoGua, *цис-син* TT димеры и (6→4) TT фотопродукты [247–250]. POLκ способна проходить $N^2$-карбоксиэтилгуанин, $N^2$-фурфурилгуанин, аддукты с бенз[*a*]пиреном, но блокируется аддуктами с акролеином [251]. Для Rev1 было показано, что она способна действовать как субстрат-независимая dCMP трансфераза. Была продемонстривана ее активность при синтезе на АП-сайт содержащих матрицах и G4-квадруплексах [251].

Наконец, **семейство обратных транскриптаз (RT)** включает в себя РНК-зависимые ДНК-полимеразы, найденные как у ретровирусов, так и у эукариот, и сильно обособлено от остальных семейств ДНК-зависимых ДНК-полимераз [252].

В работе были изучено поведение ряда ДНК-полимераз, принадлежащих этим семейтвам, при наличии в субстрате потенциально блокирующих повреждений. Ниже кратко описаны их основные свойства.

Фрагмент Кленова (KF) ДНК-полимеразы I *E. coli* — это большой фрагмент, образующийся при протеолитизе полноразмерной ДНК-полимеразы I *E. coli* (семейство A). У KF, в отличие от полноразмерного фермента, присутствуют лишь 5′→3′-полимеразная активность и 3′→5′-экзонуклеазная корректирующая активность и отсутствует 5′→3′-экзонуклеазная активность [258]. В данной работе наряду с классической полимеразой использовали мутантную форму фермента KF D424A, лишенную и 3′→5′-экзонуклеазной активности (KF exo$^-$) [259].

ДНК-полимераза *Taq* — фермент из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*, гомолог ДНК-полимеразы I *E. coli*, лишенный однако 3′→5′-экзонуклеазной активности. Температурный оптимум ДНК-полимеразы *Taq* составляет 70−80°C [260].

ДНК-полимераза бактериофага RB69 принадлежит к семейству B и сходна по структуре и последовательности с эукариотическими ДНК-полимеразами семейства B, будучи гомологичной ДНК-полимеразе α человека. Простота выделения и кристаллизации этой полимеразы делает ее удобным объектом для исследования общих особенностей репликативных ДНК-полимераз семейства B [261].

ДНК-полимераза бактериофага T4 также принадлежит к семейству B. Она отличается гораздо более сильной 3′→5′-экзонуклеазной активностью по сравнению с большинством других ферментов этого семейства [262].

Еще один фермент полученный из термофильной бактерии — ДНК-полимераза *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*), который, в отличие от *Taq* ДНК-полимеразы, обладает 3′→5′-экзонуклеазной активностью, что позволяет ей вести более точный синтез [263].

**Таблица 1**. Краткая характеристика ДНК-полимераз, исследованных в работе (по базе данных Polbase; http://polbase.neb.com)

| ДНК-полимераза | Мол. вес, (кДа) | Семейство | 5′→3′-полимеразная активность | 5′→3′-экзонуклеазная активность | 3′→5′-экзонуклеазная активность | Процессивность (нуклеотидов на ассоциацию) | Способность вытеснять впереди лежащую цепь |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| KF (exo–) | 68 | A | + | – | – | 10–300 | + |
| KF | 68 | A | + | – | + | 10–300 | + |
| *Taq* | 94 | A | + | + | – | 10–80 | + |
| *Pfu* | 90 | B | + | – | + | ~10 | – |
| T4 | 114 | B | + | – | + | 300–3000 | – |
| RB69 | 105 | B | + | – | + | ~50 | + |
| POLβ | 39 | X | + | – | – | 1–8 | + |
| POLλ | 63 | X | + | – | – | 1–6 | + |
| POLκ | 98 | Y | + | – | – | 10–50 | + |
| Dpo4 | 42 | Y | + | – | – | ~25 | –/+ |

ДНК-полимеразы человека POLβ и POLλ принадлежат к семейству X и участвуют в репаративном синтезе, не обладая экзонуклеазными активностями. Данные ДНК-полимеразы ведут дистрибутивный синтез на субстратах, содержащих длинные одноцепочечные участки, а их максимальная точность достигается на субстратах, содержащих короткую брешь [264,265]. Для них характерен кинетический механизм, при котором на один акт ассоциации с матрицей включается 1−2 нуклеотида, редко больше, и вытесняется то же число нуклеотидов впереди лежащей цепи.

ДНК-полимераза Dpo4 — фермент из термофильной бакерии *Sulfolobus solfataricus*, способный вести транслезионный синтез на поврежденной ДНК-матрице, относится к подсемейству DinB семейства Y ДНК-полимераз. Dpo4, как и все представители семейства Y, обладает низкой точностью, низкой процессивностью и не имеет корректирующей активности, что и позволяет ему вести синтез через повреждение [266]. Еще один представитель подсемейства DinB и близкий родственник Dpo4 — ДНК-полимераза κ человека [267]. POLκ обладает наибольшей точностью при работе на неповрежденной ДНК и наибольшей селективностью при синтезе на поврежденной ДНК относительно других представителей семейства Y [268].

### *2.2.2. Проблема прохождения повреждений ДНК-полимеразами*

Поддержание генетической стабильности имеет критическое значение для любых живых организмов. Репликативные ДНК-полимеразы работают с точностью ~$10^{-6}$ (1 ошибочно включенный нуклеотид на $10^6$ включенных нуклеотидов), которая может быть повышена до $10^{-8}$ при взаимодействии с различными вспомогательными белками. Наконец, пострепликативные системы репарации повышают точность до $10^{-10}$ [269,270]. Тем не менее, в клетке возникает

множество повреждений, и репликативный аппарат зачастую сталкивается с ситуацией, когда необходимо вести синтез по поврежденной матрице ДНК.

Повреждения ДНК в матрице делятся на блокирующие и предмутагенные (неправильно кодирующие) в зависимости от того, какое влияние они оказывают на кинетику включения канонических dNMP ДНК-полимеразами. Блокирующие поврежденные звенья (например, TT димеры) ингибируют активность ДНК-полимераз, которые не способны включить dNMP напротив них. Предмутагенные повреждения направляют включение dNMP, которые не комплементарны основанию, находившемуся в данном месте ДНК до повреждения. Например, урацил, возникающий при дезаминировании цитозина, приводит к включению dAMP, а не dGMP, а 8-oxoGua приводит к включению как dCMP, так и dAMP. За редким исключением неканонических оснований, которые обладают только неправильно кодирующими свойствами (Ura), практически все повреждения, даже сохраняющие способность к образованию комплементарных пар (например, дигидроурацил и тимингликоль), в той или иной мере блокируют ДНК-полимеразы, что часто связано с непланарностью поврежденных оснований, вызывающей деформацию активного центра фермента. Некоторые поврежденные звенья могут быть сильно блокирующими, а при редких событиях, когда ДНК-полимераза включает нуклеотид напротив них, проявлять предмутагенные свойства. К таким повреждениям относятся АП-сайты, напротив которых чаще всего включается dAMP вне зависимости от того, какой нуклеотид находился на месте АП-сайта до повреждения («правило А», разд. 2.1.1).

Следует отметить, что в основе такой функциональной классификации поврежденных нуклеотидов находится взаимодействие с ними репликативных ДНК-полимераз. Репликативные ДНК-полимеразы (например, эукариотические полимеразы δ и ε) имеют очень тесный активный центр и при наличии в цепи неканонического нуклеотида не могут достичь каталитически компетентной конформации из-за стерических факторов. У транслезионных ДНК-полимераз, с другой стороны, активный центр заметно просторнее, что позволяет им связывать поврежденные нуклеотиды, однако снижает точность включения на матрице неповрежденной ДНК, поскольку делает возможным образование неканонических пар. Так, в экспериментах *in vitro* было показано, что ДНК-полимеразы IV и V способны проходить объемные TT димеры, [6→4]-фотопродукты и АП-сайты [271]. Для осуществления транслезионного синтеза необходимо переключение репликативного аппарата с репликативных на транслезионные ДНК-полимеразы; у эукариот в этом процессе принимают участие фактор процессивности PCNA и гомологичный ему специализированный гетеротример Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) [272–274].

Кроме обычных повреждений, в ДНК могут существовать так называемые кластерные повреждения, представляющие собой 2 или более отдельных повреждения, приходящиеся на 1–

2 витка спирали ДНК. Кластерные повреждения имеют гораздо более тяжелые последствия, чем одиночные, поскольку при репарации одного из повреждений в составе кластера ДНК-полимеразы могут встретить другое, в результате чего может образоваться мутация или ДЦР [275]. ДБС также могут входить в состав кластерных повреждений, что приводит к ситуации, когда с ними взаимодействуют репаративные ДНК-полимеразы.

Вопрос о способности прохождения ДНК-полимеразами ДНК-белковых сшивок представляет особый интерес. Логично предположить, что белок, ковалентно связанный с матричной цепью, будет блокировать движение ДНК-полимеразы, при этом интерес представляет вопрос — на каком расстоянии от места сшивки фермент прекратит синтез ДНК. Единственные опубликованные данные, полученные с использованием определенной системы полимераз и ДБС, относятся к сшивке ОДН с гистоном H1, где в качестве сшивающего агента выступают комплексы платины [8,121]. В этих работах было показано, что фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* останавливается за один или несколько нуклеотидов от места сшивки. Поведение ДНК-полимераз при наличии ДБС в цепи, комплементарной матричной цепи ДНК, не было исследовано вообще.

В качестве модели транслезионного синтеза использовались также аддукты ДНК с пептидами. Поврежденное основание 1,$N^2$-γ-гидроксипропано-dG (γ-HOPdG), образующееся при взаимодействии акролеина с Gua, легко реагирует с аминогруппами белков и пептидов, образуя ковалентную связь. При изучении способности нескольких ДНК-полимераз эукариот и прокариот вести синтез по матрице, в которой γ-HOPdG конъюгирован с олигопептидами длиной до 12 а. к. о., выяснилось, что репликативные ДНК-полимеразы δ и ε блокируются объемным аддуктом ДНК с пептидом, однако транслезионная ДНК-полимераза κ, несмотря на паузу за два нуклеотида до места сшивки, способна пройти повреждение и продолжить синтез ДНК. ДНК-полимеразы II, III и V *E. coli* останавливаются за один нуклеотид до олигопептидного аддукта и не способны вести дальнейший синтез, в то время как ДНК-полимераза IV сильно блокируется за 1 нуклеотид до аддукта, однако способна преодолеть повреждение и синтезировать полноразмерный продукт [143]. Кроме того, в случае фрагмента Кленова было показано, что он способен к выпетливанию матрицы для обхода препятствий, сильно искажающих структуру ДНК (обширные ненуклеотидные вставки, шпильки) и блокирующих работу других ДНК-полимераз [276–278].

Вопрос о взаимодействии ДНК-полимераз с белками, прочно связанными с ДНК нековалентными взаимодействиями, достаточно подробно изучен в случае нуклеосом, которые служат «блоком» для репликативной вилки и должны активно разбираться факторами ремоделирования хроматина, а затем вновь собираться по ходу репликации [279,280]. Также в

литературе есть много данных о механизмах, обеспечивающих функционирование ДНК-полимераз при столкновении в ходе репликации с ведущими транскрипцию молекулами РНК-полимераз [281]. С другой стороны, Cas9, связанный с ДНК, блокирует продвижение эукариотической репликативной вилки *in vivo* [282], что, возможно, свидетельствует об отсутствии универсальных механизмов вытеснения белков, прочно связанных с ДНК. Прочие случаи присутствия на ДНК прочно связанных белковых молекул в свете взаимодействий с ДНК-полимеразами практически не рассматривались.

Таким образом, продвижение ДНК-полимераз в ходе синтеза ДНК может блокироваться агентами, разнообразными как по своей химической природе, так и по размеру. При этом блокирование ДНК-полимераз небольшими повреждениями ДНК (окисленные или алкилированные основания, АП-сайты) или аддуктами среднего размера (некоторые внутрицепочечные сшивки, конъюгаты оснований с электрофильными ароматическими остатками — бенз[*a*]пиреном, аминофлуореном и т. п.) достаточно хорошо изучено со структурной точки зрения и по большей части объясняется искажением конформации активного центра фермента и нарушением продуктивных взаимодействий в нем. С другой стороны, крупные препятствия — ДБС, межцепочечные сшивки, прочно связанные белки, аддукты с массой более 1 кДа — из-за своего размера, скорее всего, будут взаимодействовать не только с активным центром, и причины остановки ДНК-полимераз в этих случаях могут объясняться другими механизмами. Описанные ниже исследования посвящены сравнению процессов, происходящих при столкновении ДНК-полимераз с препятствиями разной природы.

# 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## *3.1. Материалы*

В работе были использованы $NaBH_4$ («Panreac», США), бычий сывороточный альбумин («New England Biolabs», США), $MgSO_4$, Triton X-100 («Sigma-Aldrich», США), HEPES («Helicon», Россия), dNTP («Сибэнзим», Россия), γ-[$^{32}$P]ATP с удельной активностью 1 МБк/мкл (Лаборатория биотехнологии ИХБФМ СО РАН), агароза, мочевина, борная кислота, *N,N′*-метиленбисакриламид, акриламид, персульфат аммония, *N,N,N′,N′*-тетраметилэтилендиамин (TEMED), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), глицерин, 1,4-дитиотреитол (ДТТ), трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), $NaHPO_4$, $NaH_2PO_4$, KCl, $MgCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$, NaCl, изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG), 2-меркаптоэтанол, глицерин, фенилметилсульфонил фторид (PMSF), кумасси R-250, краситель ксиленцианол, краситель бромфеноловый синий, формамид, бакто-агар, бакто-триптон, бакто-дрожжевой экстракт — все производства MP Biomedicals (США), остальные реактивы квалификации х. ч. и ос. ч. отечественного производства. Комплекс $Cs_2K_{10}[Nb_6O_{19}\{Pt(OH)_2\}_2]\cdot 13H_2O$ был любезно предоставлен д. х н. М. Н. Соколовым (Институт неорганической химии СО РАН); синтез и характеристика соединения описаны в [113]. Для всех экспериментов была использована бидистиллированная или деионизированная вода класса milliQ (18,2 МОм/см).

### *3.1.1. Стандартные буферы и смеси*

В работе были использованы следующие стандартные буферы, смеси и микробиологические среды (далее по тексту приводятся без расшифровки состава):

FDLB 80%-ный формамид, 20 мМ Na-ЭДТА, 0,1%-ный (w/v) ксиленцианол, 0,1%-ный (w/v) бромфеноловый синий

SLB 2%-ный (w/v) SDS, 10%-ный (v/v) глицерин, 5%-ный (v/v) β-меркаптоэтанол, 62,5 мМ Трис-HCl (pH 6,8), 0,1%-ный (w/v) бромфеноловый синий

TBE 90 мМ Трис, 90 мМ $H_3BO_3$, 2 мМ ЭДТА

TE 10 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА

TAE 40 mM Трис-ацетат (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА

LB 10 г/л бакто-триптона, 5 г/л бакто-дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl

SOC 20 г/л бакто-триптона, 5 г/л бакто-дрожжевого экстракта, 20 мМ глюкоза, 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$

### *3.1.2. Ферменты*

В работе использовали полинуклеотидкиназу бактериофага T4 (20 ед. акт./мкл) производства «Биосан» (Россия), фрагмент Кленова (exo$^+$) ДНК-полимеразы I *E. coli*, ДНК-полимеразу *Pfu*, урацил-ДНК-гликозилазу (Ung) *E. coli* («СибЭнзим»), ДНК-полимеразу Dpo4, ДНК-полимеразу бактериофага T4 («New England Biolabs»), ДНК-полимеразу *Taq* («Thermo Scientific»). POLβ человека и эндонуклеаза FEN1 были любезно предоставлена д. б. н. С. Н. Ходыревой и к. х. н. Н. А. Лебедевой (ИХБФМ СО РАН). Фрагмент Кленова (exo$^-$) ДНК-полимеразы I *E. coli*, ДНК-полимераза κ человека, ДНК-полимераза бактериофага RB69, ДНК-гликозилаза OGG1 человека, нуклеаза Cas9 *Streptococcus pyogenes* и ее каталитически неактивный вариант dCas9 (Cas9 D10A H840A), урацил-ДНК-гликозилаза вируса осповакцины vvUNG были предоставлены руководителем работы; все ферменты были выделены по описанным методикам [204,283–287]. ДНК-гликозилаза человека NEIL1, ДНК-гликозилазы *E. coli* Nei и Fpg, АП-эндонуклеаза человека APEX1 и POLλ человека были выделены лично соискателем по описанным методикам [193,288–291]. sgРНК для адресации Cas9 и dCas9 была синтезирована к. х. н. Г. В. Степановым (ИХБФМ СО РАН).

### *3.1.3. Плазмиды и бактериальные штаммы*

В работе использовали штаммы *E. coli* DH5α (F$^-$ *supE*44 Δ*lac*U169 (ϕ80 *lacZ* ΔM15) *hsdR*17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*96 *thi*-1 *relA*1), BL21(DE3) (F$^-$ *ompT gal dcm lon hsdS*$_B$($r_{B-}m_{B-}$) λ(DE3 [*lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5*]) [*malB*$^+$]$_{K-12}$(λS)) и Rosetta 2(DE3) (BL21(DE3) pRARE2 (*argN5 argU argW argX glyT ileX leuW metT proL thrT thrU* Cm$^R$), предоставленные руководителем работы. Все клетки хранили при –70°C в суспензии в 15%-ном глицерине до использования.

В работе использовали плазмиды для суперпродукции белков на основе векторов pET-22b (для продукции POLλ и NEIL1), pET-24b (Fpg и Nei) и pET-28a (APEX1). Плазмида pBlueScript II SK(–), содержащая вставку с сайтом узнавания для Cas9 и dCas9 (протоспейсером Sp2 и PAM-мотивом, 5′-GGATAACTCAATTTGTAAAAAATGG-3′ [204]) между сайтами рестрикции *Eco*RI и *Xho*I, была предоставлена руководителем работы.

### *3.1.4. Хроматографические сорбенты и колонки*

Для очистки меченых ОДН после введения радиоактивной метки использовали сорбент $C_{18}$ NenSorb (PerkinElmer Life Sciences, США). При выделении белков использовали упакованные хроматографические колонки фабричного производства «HiTrap Chelating», «HiTrap Heparin HP», «HiTrap SP HP» , «HiTrap Q HP» и «Mono S» (все — «GE Healthcare», США).

### *3.1.5. Стандартные буферы для ДНК-полимераз*

При исследовании взаимодействия ДНК-полимераз с блокирующими повреждениями, реакции проводили в буферах следующего состава, оптимальных по литературным данным или основанных на протоколах коммерческих наборов для действия соответствующих ферментов:

- для KF: 50 мМ Трис-HCl (pH 7,5); 5 мМ $MgCl_2$; 1 мМ ЭДТА; 30 мМ KCl; 0,1 мМ ДТТ [259];
- для ДНК-полимеразы *Pfu*: 20 мМ Трис-HCl (pH 8,8); 10 мМ KCl; 10 мМ $(NH_4)_2SO_4$; 2 мМ $MgSO_4$; 0.1%-ный Triton X-100;
- для ДНК-полимеразы *Taq*: 10 мМ Трис-HCl (pH 8,8); 50 мМ KCl; 1,5 мМ $MgCl_2$; 0.08%-ный Nonidet-P40;
- для POLβ: 10 мМ Трис-HCl (pH 7,6); 10 мМ $MgCl_2$; 1 мМ ДТТ [292];
- для POLλ: 50 мМ Трис-HCl (pH 8,5); 2,5 мМ $MgCl_2$; 1 мМ ДТТ; 2%-ный глицерин; 0,1 мг/мл БСА [293];
- для ДНК-полимеразы фага T4: 67 мМ Трис-HCl (pH 8,8); 6,7 мМ $MgCl_2$; 16,7 мМ $(NH_4)_2SO_4$; 1 мМ ДТТ;
- для ДНК-полимеразы RB69: 50 мМ Трис-HCl (pH 7,5); 5 мМ $MgCl_2$; 0,1 мМ ДТТ [284];
- для POLκ: 50 мМ HEPES (pH 7,5); 5 мМ $MgC_{l2}$; 60 мМ KCl; 5 мМ ДТТ [286];
- для ДНК-полимеразы Dpo4: 20 мМ Трис-HCl (pH 8,8), 10 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 10 мМ KCl, 2 мМ $MgSO_4$, 0,1%-ный Triton X-100.

### *3.1.6. Олигодезоксинуклеотиды*

В работе использовали олигодезоксинуклеотиды (ОДН) следующих последовательностей (Таблица 2), синтезированные в Лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН. Все ОДН подвергались очистке с помощью обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке LiChrosorb RP-18 (Merck, США) и, при необходимости, с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Для синтеза ОДН использовались коммерчески доступные фосфорамидиты (Glen Research, США).

**Таблица 2.** ОДН, использованные в работе

| Код | Последовательность ОДН, 5′→3′ | Длина | Модификация[1] |
|---|---|---|---|
| **ОДН для исследования взаимодействия ДНК-полимераз с ДБС** | | | |
| Temp1_oG | GCTCTGGAATTCCTTCXCTTCTTTCCTCTCGACGGTCTCG | 40 | X = 8-oxoGua |
| Down1_oG | GAGGAAAGAAGXGAAGGAATTCCAGAGC | 28 | X = 8-oxoGua |
| Down1 | GAGGAAAGAAGCGAAGGAATTCCAGAGC | 28 | |
| Temp1 | GCTCTGGAATTCCTTCCCTTCTTTCCTCTCGACGGTCTCG | 40 | |
| Gp-pri | CGAGACCGTCG | 11 | |
| Gp-marker | CGAGACCGTCGCGAGGAAAGAAG | 23 | |
| Gp-TK1 | CGAGACCGTCGCGAGGAAAGAAGCGAAGGAATTCCAGAGC | 40 | |
| TK2 | GCTCTGGAATTCCTTCGCTTCTTTCCTCTCGACGGTCTCG | 40 | |
| **ОДН для исследования взаимодействия ДНК-полимераз с прочно связанными с ДНК белками** | | | |
| Temp1_oG | GCTCTGGAATTCCTTCXCTTCTTTCCTCTCGACGGTCTCG | 40 | X = 8-oxoGua |
| Down1_oG | GAGGAAAGAAGXGAAGGAATTCCAGAGC | 28 | X = 8-oxoGua |
| Down1 | GAGGAAAGAAGCGAAGGAATTCCAGAGC | 28 | |
| Temp1 | GCTCTGGAATTCCTTCCCTTCTTTCCTCTCGACGGTCTCG | 40 | |
| Gp-pri | CGAGACCGTCG | 11 | |
| Gp-pri-FAM | (5,6-FAM)-CGAGACCGTCG | 11 | |
| 23oG | CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT | 23 | X = 8-oxoGua |
| 23oG-FAM | (5,6-FAM)-CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT | 23 | X = 8-oxoGua |
| compC | AGAGGAAAGGAGCGAAGGGAGAG | 23 | |
| Temp1_U | GCTCTGGAATTCCTTCXCTTCTTTCCTCTCGACGGTCTCG | 40 | X = Ura |
| Down1_U | GAGGAAAGAAGXGAAGGAATTCCAGAGC | 28 | X = Ura |
| 23hoU | CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT | 23 | X = HydroxyUra |
| Temp_psp_nontarg | GCTCAGTACCATTTTTTACAAATTGAGTTATCAGTTTCCTCTCGACGGTCTGC | 53 | |
| Down-psp-targ | GAGGAAACTGATAACTCAATTTGTAAAAAATGGTACTGAGC | 41 | |
| 35_targ | CTGATAACTCAATTTGTAAAAAATGGTACTGAGCA | 35 | |
| 35_nontarg | GACTATTGAGTTAAACATTTTTTACCATCACTCGT | 35 | |
| marker_21 | ACGACAACAGCCTAAAAGACC | 21 | |
| marker_47 | TCGTATCCCAGTCTGCATAGGAAATTGGTCTTTTAGGCTGTTGTCGT | 47 | |
| marker_41 | GAGGAAACTGATAACTCAATTTGTAAAAAATGGTACTGAGC | 41 | |
| **ОДН для исследования влияния полиоксониобатов платины** | | | |
| BK2 | GCTCTGGAATTCCTTCCCTTCTTTCCTCTCGACGGTCTCG | 40 | |
| Gp-pri | CGAGACCGTCG | 11 | |
| Cr-link1 | TTGTT | 5 | |
| Cr-link2 | TTTTGTT | 7 | |
| **ОДН для исследования влияния метоксиамина** | | | |
| 23U-FAM | (5,6-FAM)-TCTCCTTTCCTCXCTTCCCTCTC | 23 | X = Ura |
| 23U | CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT | 23 | X = Ura |
| compT | AGAGGAAAGGAGTGAAGGGAGAG | 23 | |
| compC | AGAGGAAAGGAGCGAAGGGAGAG | 23 | |
| 23T | (5,6-FAM)-TCTCCTTTCCTCTCTTCCCTCTC | 23 | |
| Mox-pri_1 | (5,6-FAM)-AGAGGAAAGGAG | 12 | |
| Mox_down | (p)GAAGGGAGAGGAAG | 14 | |
| 27U-FAM | (5,6-FAM)-CTTCCTCTCCCTTCUCTCCTTTCCTCT | 27 | X = Ura |
| Mox-pri_2 | (5,6-FAM)-AGAGGAAA | 8 | |
| Marker_A | (5,6-FAM)-AGAGGAAAGGAGA | 13 | |
| Marker_T | (5,6-FAM)-AGAGGAAAGGAGT | 13 | |
| Marker_G | (5,6-FAM)-AGAGGAAAGGAGG | 13 | |
| Marker_C | (5,6-FAM)-AGAGGAAAGGAGC | 13 | [1] |
| 12U | CTCTCUCCTTCC | 12 | X = Ura |

[1]В случае необходимости вводилась радиоактивная метка по 5′-концу ОДН по стандартной методике [294]. Меченый ОДН отделяли от невключившегося γ[$^{32}$P]-ATP обращеннофазовой хроматографией на колонке с сорбентом $C_{18}$ Nensorb («PerkinElmer», США).

[2]Радиоактивно меченый ОДН в составе дуплекса далее обозначен кодами цепей, разделёнными двумя косыми чертами, при этом меченая цепь обозначена звёздочкой (напр., 23oG*//compC). В ряде случаев использовались конструкции, состоящие из длинной матрицы и более коротких праймера и запирающего праймера; в обозначения таких конструкций праймеры разделены знаком «~» (напр., Gp-primer~Down_psp_targ//Temp_psp_nontarg*).

## *3.2. Методы*

### *3.2.1. Получение двуцепочечных олигодезоксирибонуклеотидных субстратов*

Отжиг вели с двукратным молярным избытком немеченой комплементарной цепи в следующем режиме: 2 мин при 95°C, 5 мин при 37°C, 30 мин при комнатной температуре. В случае субстрата типа праймер–матрица–запирающий праймер, где повреждение находится в запирающем праймере, отжиг вели с молярным соотношением праймер : матрица : запирающий праймер 1:1:2. Для олигонуклеотидов длиной больше 40 н. отжиг вели в режиме: 2 мин при 95°C, медленное остывание до комнатной температуры в течение 90 мин. Полученный дцОДН хранили при −20°C. Для создания конструкций ОДН, содержащего АП-сайт или аддукт АП-сайта с MOX с коротким комплементарным праймером, отжиг вели в течение 15 мин при комнатной температуре.

### *3.2.2. Реакция образования основания Шиффа и ковалентной ДНК-белковой сшивки*

Для получения ДНК-белковой сшивки в дцДНК реакцию проводили в буфере, содержащем 50 мМ фосфата Na (pH 6,8), 1 мМ ЭДТА и 1 мМ ДТТ. К 30 пмоль ОДН, содержащего 8-oxoGua (в матричной цепи Gp-pri~Down1//Temp1_oG либо в комплементарной цепи Gp-pri~Down1_oG//Temp1), добавляли двадцатикратный молярный избыток фермента Fpg при одновременном добавлении $NaBH_4$ до концентрации 100 мМ в конечной реакционной смеси. Реакцию вели 30 мин при 37°C и останавливали 40%-ным раствором глюкозы в течение 30 мин на льду. Глубину прохождения реакции определяли методом электрофореза в системе Лэммли.

Для получения ДНК-белковой сшивки в составе оцДНК (Temp1_oG) реакцию проводили аналогично, однако увеличивали объем и время протекания реакции до 60 мин, ввиду гораздо меньшего сродства Fpg к одноцепочечным субстратам. Глубину прохождения реакции определяли электрофорезом в неденатурирующем 8%-ном ПААГ. Для очистки продукта реакции фрагмент геля, содержащий сшивку, вырезали, измельчали, добавляли 1 мл 0,1×TE и оставляли для элюции на ночь при 4°C с постоянным встряхиванием. Суспензию центрифугировали, отбирали супернатант, к осадку снова добавляли 1 мл 0,1×TE и повторяли всю процедуру еще два раза с элюцией по 2 ч. Весь супернатант наносили на центрифужный фильтр Ultrafree-CL («Amicon», США) с размером пор 0,22 мкм для очистки от мелких фрагментов геля. Фильтрат концентрировали на центрифужном концентраторе Centricon-10 («Millipore», США) до необходимого объема. Гомогенность очищенного препарата сшивки оценивали методом электрофореза в системе Лэммли и визуализировали радиолюминисцентным сканированием. На

основании отобранных до и после очистки аликвот оценивали выход продукта, который составлял ~25%.

### *3.2.3. Проверка проходимости ДНК-белковых сшивок ДНК-полимеразами*

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала реакционный буфер для соответствующей полимеразы (разд. 3.1.5), смесь dNTP общей концентрации 500 мкМ (здесь и далее соотношение dATP:dGTP:dCTP:dTTP 1:1:1:1, если не указано иное), ОДН конструкцию, содержащую пришитый белок Fpg (разд. 3.2.2, Рисунок 17), в количестве 400 фмоль, а также исследуемую ДНК-полимеразу. Количество ДНК-полимеразы было оптимизировано на включение ~70% первого нуклеотида за 2 мин. и составляло: 0,015 ед. акт. для KF (exo$^+$) 14 нМ для KF(exo$^-$); 45 нМ для POLβ; 0,75 мкМ для POLλ; 1 ед. акт. для ДНК-полимеразы *Taq*; 5 ед. акт. для ДНК-полимеразы *Pfu*; 1 ед. акт. для ДНК-полимеразы T4; 1 ед. акт. для ДНК-полимеразы Dpo4; 30 нМ для ДНК-полимеразы RB69; 40 нМ для POLκ. При необходимости, в реакцию также добавлялась нуклеаза FEN1 до концентрации 400 нМ. Реакцию вели при 37°C, отбирали аликвоты объемом 5 мкл через 2, 5 и 30 мин. Реакцию в аликвотах останавливали добавлением равного объема FDLB и прогреванием при 95°C в течение 2 мин. Продукты анализировали электрофорезом в 20%-ном ПААГ в денатурирующих условиях (8 М мочевина) и визуализировали радиолюминесцентным сканированием экрана Image Screen K («Kodak», США) с использованием системы Typhoon FLA 9500 (GE, США). Длина продуктов элонгации определялась исходя из сравнения подвижности маркеров и продуктов более высокой подвижности, полученных в результате частичного удлинения праймера в присутствии разного количества ДНК-полимераз.

### *3.2.4. Вытеснение ДНК-гликозилазы OGG1 из комплекса с продуктом*

Реакционная смесь объемом 30 мкл содержала немеченый субстрат (20 нМ), состоящий из матрицы (40 н.), запирающего праймера (28 н.) и праймера (11 н.), содержащий остаток 8-oxoGua в матричной (Gp-pri~Down1//Temp1_oG) либо комплементарной (Gp-pri~Down1_oG//Temp1) цепи, и 10 нМ OGG1. Кроме того, реакционная смесь содержала 0,5 мМ dNTP; 50 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 10 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА и 1 мМ ДТТ. Через 2 мин в реакционную смесь добавляли 3 мкл меченого субстрата 23 oG*//compC до конечной концентрации 100 нМ и нужный фермент: 0,05 ед. акт. KF в 3 мкл буфера, содержащего 50 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ЭДТА, 30 мМ KCl, 0,1 мМ ДТТ; либо 20 нМ POLβ в 3 мкл буфера, содержащего 10 мМ Трис-HCl (pH 7,6), 10 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ДТТ; либо 20 нМ vvUNG в 3 мкл буфера, содержащего 20 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 1 мМ ЭДТА и 1 мМ ДТТ. Аликвоты объемом 5 мкл отбирали через 2, 5, 10, 15, 20 мин, останавливали реакцию добавлением NaOH до 0,1 N, с прогреванием в течении 2 мин при

95°C с последующей нейтрализацией эквимолярным количеством HCl. Продукты анализировали электрофорезом в ПААГ, как описано в разд. 3.2.3. Обсчет результатов проводили с использованием программ Quantity One v4.6.3 («Bio-Rad», США) и Sigmaplot 11.0 (SPSS, США).

### *3.2.5. Определение типа продукта реакции OGG1 в присутствии ДНК-полимеразы β*

Реакционная смесь объемом 30 мкл содержала радиоактивно меченый субстрат Gp-pri~Down1_oG*//Temp1 либо Gp-pri~Down1//Temp1_oG* (20 нМ), содержащий 8-oxoGua в запирающем праймере либо в матричной цепи, и 10 нМ OGG1. Кроме того, реакционная смесь содержала 0,5 мМ dNTP; 50 мМ Трис-HCl (pH 7,5); 10 мМ NaCl; 1 мМ ЭДТА и 1 мМ ДТТ. Через 2 мин в реакционную смесь добавляли 20 нМ POLβ в соответствующем буфере, содержащем 10 мМ Трис-HCl (pH 7,6); 10 мМ $MgCl_2$; 1 мМ ДТТ. Аликвоты объемом 5 мкл отбирали через 2, 5, 10, 15, 20 мин, останавливали реакцию добавлением NaOH до 0,1 N и прогреванием в течении 2 мин при 95°C с последующей нейтрализацией эквимолярным количеством HCl, либо останавливали добавлением равного объема FDLB и прогреванием при 95°C в течение 2 мин без добавления щелочи. Продукты анализировали, как описано в разд. 3.2.3.

### *3.2.6. Вытеснение ДНК-гликозилазы NEIL1 из комплекса с продуктом*

Для создания АП-сайт содержащего субстрата в заданной позиции, с которым впоследствии связывали бифункциональную ДНК-гликозилазу NEIL1, немеченую ОДН-конструкцию Gp-pri~Down1_U//Temp1 или Gp-pri~Down1//Temp1_U (1 мкМ), содержащую остаток урацила, обрабатывали Ung *E. coli* (5 ед. акт.) в присутствии 20 мМ Трис-HCl (pH 8,0); 1 мМ ЭДТА и 1 мМ ДТТ в течение 15 мин при 37°C. Субстраты были очищены от примесей белка гель-фильтрацией на сорбенте Sephadex G-25 с выходом ~70%. Полученные субстраты Gp-pri~Down1_AP//Temp1 и Gp-pri~Down1//Temp1_AP использовали для дальнейших экспериментов.

Для максимально полного образования комплекса NEIL1 с продуктом реакционная смесь суммарным объемом 30 мкл содержала немеченый субстрат, предварительно обработанный Ung, как описано выше — Gp-pri~Down1_AP//Temp1 (20 нМ), содержащий АП-сайт в запирающем праймере, и 20 нМ NEIL1, либо Gp-pri~Down1//Temp1_AP (20 нМ), содержащий АП-сайт в матричной цепи, и 10 нМ NEIL1. Кроме того, реакционная смесь содержала 0,5 мМ dNTP, 50 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 10 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА и 1 мМ ДТТ. Через 2 мин в реакционную смесь добавляли 3 мкл меченого субстрата 23 hoU*//compC до конечной концентрации 100 нМ и нужный фермент: 20 нМ POLβ в 3 мкл буфера, содержащего 10 мМ Трис-HCl (pH 7,6), 10 мМ $MgCl_2$ и 1 мМ ДТТ, либо 20 нМ vvUNG в 3 мкл буфера, содержащего 20 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 1 мМ ЭДТА и 1 мМ ДТТ. Аликвоты объемом 5 мкл отбирали через 2, 5, 10, 15, 20 мин,

останавливали реакцию добавлением равного объема FDLB и прогреванием в течении 2 мин при 95°C. Продукты анализировали и проводили обсчет, как описано в разд. 3.2.4.

### *3.2.7. Вытеснение нуклеазы Cas9 из комплекса с продуктом*

Перед началом реакции инкубировали фермент Cas9 с sgРНК в эквимолярном соотношении в течение 15 мин при 37°C в буфере, содержащем 25%-ный глицерин; 250 мМ KCl; 10 мМ HEPES-KOH (pH 7,5); 0,5 мМ ДТТ для образования 2,5 мкМ активного комплекса Cas9-sgРНК [204].

Реакционная смесь объемом 30 мкл содержащала немеченую конструкцию Gp-pri~Down_psp_targ//Temp_psp_nontarg в качестве субстрата (100 нМ), комплекс Cas9-sgРНК (80 нМ), 10 мМ $MgCl_2$, 500 мкМ dNTP, 10 мМ HEPES-KOH (pH 7.5), 50 мМ KCl, 2,5%-ный глицерин; 250 мкМ ЭДТА и 500 мкМ ДТТ. Через 2 мин в реакционную смесь добавляли 3 мкл меченого субстрата 35_targ*//35_nontarg до конечной концентрации 100 нМ и ДНК-полимеразу (KF(exo$^-$), POLβ, RB69) до конечной концентрации 100 нМ в 3 мкл соответствующего буфера (разд. 3.1.5), либо ДНК-гликозилазу vvUNG до конечной концентрации 100 нМ в 3 мкл буфера, содержащего 20 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 1 мМ ЭДТА и 1 мМ ДТТ. Через 2, 5, 10, 15, 30, и 60 мин отбирали аликвоты по 5 мкл и останавливали реакцию добавлением равного объема FDLB и прогреванием при 95°C в течение 2 мин. Продукты анализировали и проводили обсчет, как описано в разд. 3.2.4.

### *3.2.8. Активность ДНК-полимераз в присутствии Cas9*

Реакционная смесь объемом 15 мкл содержала меченую конструкцию Gp-pri*~Down_psp_targ//Temp_psp_nontarg (100 нМ), комплекс dCas9–sgРНК в десятикратном избытке по отношению к субстрату (1 мкМ), 10 мМ $MgCl_2$, 500 мкМ dNTP, 10 мМ HEPES-KOH (pH 7.5), 50 мМ KCl, 2,5%-ный глицерин; 250 мкМ ЭДТА и 500 мкМ ДТТ. Через 2 мин в реакционную смесь добавляли ДНК-полимеразу (KF(exo$^-$), POLβ, RB69) до конечной концентрации 100 нМ в соответствующем буфере (разд. 3.1.5). Через 1, 2, 5, 30 мин отбирали аликвоты по 2,5 мкл и останавливали реакцию добавлением равного объема FDLB и прогреванием при 95°C в течение 2 мин. Продукты анализировали, как описано в разд. 3.2.3.

### *3.2.9. Вытеснение Cas9 из комплекса с плазмидной ДНК ДНК-полимеразой RB69*

Перед началом реакции инкубировали фермент Cas9 с sgРНК в эквимолярном соотношении в течение 15 мин при 37°C в буфере, содержащем 25%-ный глицерин; 250 мМ KCl; 10 мМ HEPES-KOH (pH 7,5); 0,5 мМ ДТТ для образования 2,5 мкМ активного комплекса Cas9-sgРНК [204].

Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала предварительно очищенную электрофорезом в 1%-ном агарозном геле суперскрученную форму плазмиды pBlueScript II (–) в количестве 50 нг, 1,5 мкМ комплекс Cas9-sgРНК, эквимолярное количество ДНК-полимеразы RB69, 10 мМ $MgCl_2$, 500 мкМ dNTP, 10 мМ HEPES (pH 7.5), 50 мМ KCl, 2,5%-ный глицерин, 250 мкМ ЭДТА и 500 мкМ ДТТ. Реакцию вели в течение 1, 5, 10, 20 и 60 мин и останавливали добавлением 2 мкл Quenching buffer, содержащего 250 мМ ЭДТА; 1,2%-ный SDS; 30%-ный глицерин; 3%-ный бромфеноловый синий [204]. Продукты анализировали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле, дальнейший количественный анализ проводили с помощью программ Quantity One и Sigmaplot. Активность Cas9 оценивали как долю плазмидной ДНК, перешедшей из суперскрученой формы в линейную вследствие индуцированных Cas9 ДЦР:

$$DSB = \frac{V_{linear}}{\left(V_{linear} + V_{relaxed} + V_{supercoiled} * k\right)}$$

где $V$ — интенсивность флуоресценции соответствующих форм ДНК, а $k$ — коэффициент, равный 1,14, отражающий разницу в связывании бромистого этидия с суперскрученной и не суперскрученной формами плазмиды [295].

### *3.2.10. Активность ДНК-полимераз в присутствии полиоксониобата платины*

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала реакционный буфер для соответствующей полимеразы, dATP в концентрации 500 мкМ, ОДН-конструкцию вида праймер–матрица (Gp-pri*//Temp1) в количестве 2 пмоль, свежеприготовленные растворы полиоксониобата платины в конечных концентрациях от 1 мкМ до 1 мМ и исследуемую ДНК-полимеразу. Количество ДНК-полимеразы было оптимизировано для соблюдения условий стационарной кинетики — на включение следующего нуклеотида не более чем на 20% за 1 мин при 37°C и составляло: $1{,}5\times10^{-4}$ ед. акт. для KF ($exo^+$); 0,45 нМ для KF ($exo^-$); 3,4 нМ для POLβ; $1\times10^{-3}$ ед. акт. для ДНК-полимеразы Dpo4; 0,52 нМ для ДНК-полимеразы RB69; 0,27 нМ для POLκ. Реакцию вели в течение 1 мин при 37°C и останавливали добавлением равного объема FDLB и прогреванием при 95°C в течение 2 мин. Продукты анализировали и проводили обсчет, как описано в разд. 3.2.4.

### *3.2.11. Анализ взаимодействия полиоксиониобата платины с ДНК*

Для проверки возможности образования аддуктов с ДНК, индуцированных полиоксометаллатами платины проводили реакцию в смесь объемом 40 мкл, содержащую ОДН 5′-TTGTT-3′ (Cr-link1) или 5′-TTTTGTT-3′ (Cr-link2) в количестве 4 пмоль добавляли свежеприготовленные растворы полиоксониобата платины в конечных концентрациях 300 мкМ

или 1 мМ. Реакцию вели при 37°С, отбирали аликвоты объемом 5 мкл через 1, 2, 5, 20, 60, 120 мин. Реакцию останавливали добавлением равного объема FDLB и прогреванием при 95°С в течение 2 мин. Продукты анализировали, как описано в разд. 3.2.3.

Для проверки природы аддуктов, образумых полиоксометаллатами платины с ДНК, проводили реакцию в тех же условиях при 37°С в течение 10 мин. Затем в смесь добавляли NaOH или $NH_2OH$ до конечной концентрации 0,1 М и 10 мМ соответственно и продолжали реакцию еще 30 мин. Реакцию останавливали добавлением равного объема FDLB и прогреванием при 95°С в течение 2 мин. Продукты анализировали, как описано в разд. 3.2.3.

Для проверки природы аддуктов, образумых полиоксометаллатами платины с ДНК, также проводился MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ на базе Объединенного Центра геномных, протеомных и метаболомных исследований ИХБФМ СО РАН с использованием масс-спектрометра REFLEX III (Bruker Daltonics, Германия) и 2,5-дигидроксибензойной кислоты в качестве матрицы для кристаллизации.

### *3.2.12. Получение аддуктов АП-сайтов с метоксиамином*

ОДН 23U-FAM либо 27U-FAM в концентрации 1 мкМ, содержащие остаток урацила, были обработаны 5 ед. акт. Ung *E. coli* в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА и 1 мМ ДТТ при 37°С в течение 20 мин. Полученная смесь была поделена на 2 части для последующих экспериментов: одна часть, содержащая ОДН с АП-сайтом, была контрольной, вторая часть использовалась для образования аддукта с МОХ.

Для образования аддукта АП-сайта с МОХ реакционную смесь, содержащую 400 нМ АП-субстрат, 10 мМ Трис-HCl (pH 7.0) и 1 мМ ЭДТА, инкубировали с 5 мМ МОХ при комнатной температуре в течение 30 мин.

Для определения полноты протекания реакций образования АП-сайта и конъюгирования АП-сайта с МОХ 100 нМ ОДН после реакции инкубировали с 200 нМ комплементарной цепью (compT) при комнатной температуре в течение 10 мин и добавляли APEX1 до концентрации 10 нМ, HEPES-NaOH (pH 7,5) до 20 мМ, KCl до 50 мМ, $MgCl_2$ до 5 мМ и ДТТ до 1 мМ. Смесь инкубировали при 37°С в течение 7 мин. Реакцию останавливали добавлением равного объема 10 мМ раствора ЭДТА в формамиде и прогреванием при 95°С в течение 1 мин с последующим помещением образцов в лед до проведения электрофореза (см. разд. 3.2.4).

Для определения стабильности аддуктов АП-сайта с МОХ радиоактивно меченые субстраты (23U*), содержащие АП-сайт либо аддукт АП-сайта с МОХ, полученные, как описано выше, инкубировали при комнатной температуре в течение 11 суток. Через каждые 24 ч из реакционной смеси отбирали 5 мкл аликвоту и смешивали с равным объемом FDLB с

последующим прогреванием при 95°C в течение 1 мин. Продукты анализировали, как описано в разд. 3.2.4.

Для проверки природы аддуктов АП-сайтов с MOX проводился MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ на базе Объединенного Центра геномных, протеомных и метаболомных исследований ИХБФМ СО РАН с использованием масс-спектрометра REFLEX III (Bruker Daltonics, Германия) и 2,5-дигидроксибензойной кислоты в качестве матрицы. Аддукт с MOX был приготовлен на оцОДН вида 5′-CTCTCUCCTTCC-3′ (12U) как описано выше.

### *3.2.13. Определение кинетических параметров включения dNMP ДНК-полимеразами напротив аддукта АП-сайта с метоксиамином*

Для определения параметров стационарной кинетики для ДНК-полимераз KF, POLβ, POLλ, RB69 и POLκ использовали реакционную смесь объемом 10 мкл с 200 нМ субстратом, содержащим АП-сайт либо аддукт АП-сайта с MOX, предварительно инкубированный при комнатной температуре со 100 нМ флуоресцентно меченым праймером MOX-pri_1 (при необходимости также добавляли 200 нМ запирающий праймер MOX_down). Смесь также содержала исследуемую ДНК-полимеразу (концентрации подбирались для условий стационарной кинетики — включение следующего нуклеотида не более чем на 20% за 30 мин при 25°C и для всех ДНК-полимераз составляли от 0,2 до 10 нМ), буфер для нее (разд. 3.1.5) и конкретный dNTP, концентрация которого варьировалась в диапазоне 0,5–1000 мкМ. Реакцию проводили при 25°C в течение 30 мин и останавливали добавлением раствора 10 мМ ЭДТА в формамиде и прогреванием при 95°C в течение 1 мин с последующей инкубацией образцов во льду до проведения электрофореза. Продукты анализировали и проводили обсчет, как описано в разд. 3.2.4. Полученные данные описывали уравнением Михаэлиса–Ментен, параметры уравнения определяли из данных 3–6 независимых экспериментов нелинейной регрессией гиперболической функции в программе SigmaPlot. При невозможности определения отдельных значений $K_M$ и $k_{cat}$ из-за недостижимости насыщения фермента субстратом соотношение $k_{cat}/K_M$ (константа специфичности, $k_{sp}$) рассчитывали из угла наклона зависимости скорости реакции от концентрации субстрата.

### *3.2.14. Определение спектра включения dNMP ДНК-полимеразами напротив аддукта АП-сайта с метоксиамином*

Реакционная смесь объемом 40 мкл содержала 200 нМ субстрат, приготовленный, как описано выше, но с праймером MOX-pri_2, 10 нМ исследуемую ДНК-полимеразу (40 нМ в случае POLλ), соответствующий буфер (разд. 3.1.5) и 250 мкМ смесь dNTP. Для стабилизации комплекса праймер–матрица, а также для предотвращения спонтанного гидролиза АП-сайта,

реакцию вели при 22°C. Через 2, 5, 30 мин отбирали аликвоты по 10 мкл и останавливали реакцию добавлением равного объема раствора 10 мМ ЭДТА в формамиде и прогреванием при 95°C в течение 2 мин. Продукты анализировали, как описано в разд. 3.2.3.

### *3.2.15. Расщепление аддукта АП-сайта с метоксиамином ферментами эксцизионной репарации оснований*

Радиоактивно меченый субстрат, содержащий остаток урацила, отжигали с комплементарной цепью, содержащей C напротив поврежденного основания (23U*//compC), и обрабатывали Ung *E. coli* и затем MOX, как описано выше (разд. 3.2.12).

Для проверки способности ферментов ЭРО расщеплять ДНК, содержащую аддукты АП-сайта с MOX, использовали реакционную смесь объемом 30 мкл, содержащую субстрат с АП-сайтом либо с аддуктом АП-сайта с MOX (100 нМ), 50 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 10 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ДТТ и исследуемый фермент в соответствующей концентрации (для Fpg концентрация составляла 1 нМ, для APEX1, NEIL1 и Nei — 10 нМ). Реакцию вели при 37°C. Через 1, 2, 5 и 10 мин отбирали аликвоты по 5 мкл и останавливали реакцию добавлением равного объема FDLB и прогреванием при 95°C в течение 30 с последующем помещением образцов в лед. Продукты анализировали и проводили обсчет, как описано в разд. 3.2.4.

### *3.2.16. Молекулярный докинг структур*

Молекулярный докинг структур ДНК-полимераз (KF и POLβ) и ДНК-гликозилазы OGG1 проводили с использованием программного пакета GRAMM-X [296]. В качестве исходных структур были использованы структуры белковых частей комплекса OGG1 человека с ДНК (идентификатор в базе данных PDB 1EBM [297]), комплекса POLβ человека с ДНК (2FMP [298]) и комплекса KF *E. coli* с ДНК (1KFS [299]). Для каждой пары структур (KF–OGG1 и POLβ–OGG1) было идентифицировано по 10 моделей с максимальной энергией взаимодействия. На основании полученных моделей осуществляли поиск структуры комплекса, где ДНК-связывающие бороздки белков были бы ориентированы в одну сторону, что позволило бы паре ферментов одновременно взаимодействовать с ДНК. В случае наличия такой структуры, рассчитывали площадь сольватации в исследуемых молекулах с использованием программного обеспечения MDTRA [300].

# 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

## *4.1. Взаимодействие ДНК-полимераз с ДНК-белковыми сшивками*

### *4.1.1. Создание модельной ДНК-белковой сшивки*

Для изучения активности ДНК-полимераз при наличии ДБС в матричной цепи (при наличии или отсутствии комплементарной цепи) либо в цепи, которая не служит матрицей, а вытесняется ДНК-полимеразой при синтезе ДНК («запирающий праймер»), требуется прежде всего разработать способ количественного получения ДБС заданной структуры в определенном месте ДНК-субстрата. Для создания модельной ДНК-белковой сшивки использовали способность бифункциональной ДНК-гликозилазы Fpg *E. coli* образовывать с ДНК в ходе реакции ковалентный интермедиат типа основания Шиффа, который стабилизируется восстановлением $NaBH_4$ до третичного амина (Рисунок 16) [301]. ДНК-гликозилазы с ассоциированной АП-лиазной активностью при восстановлении $NaBH_4$ образуют стабильный ковалентный конъюгат с АП-сайтом. Эта реакция проходит с высоким выходом в условиях, близких к физиологическим. Так как ДБС может образовываться в клетке с множеством различных белков, ожидается, что взаимодействие ДНК-полимераз с ДБС не будет зависеть от природы конкретного белка, сшитого с ДНК.

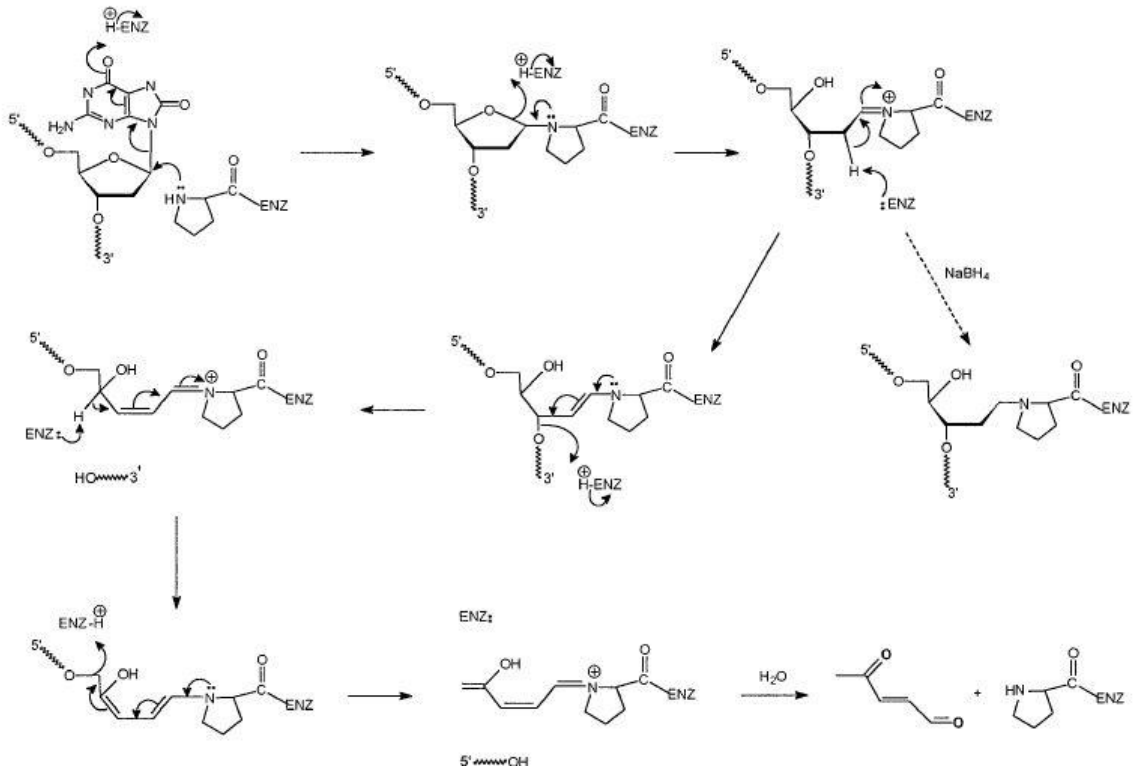


**Рисунок 16**. Механизм реакции, катализируемой ферментом Fpg (Enz), и механизм образования ДБС при восстановлении ковалентного интермедиата — основания Шиффа при помощи $NaBH_4$ [301].

Субстраты для ДНК-полимераз представляли собой конструкции, содержащие праймер и ДНК-матрицу или праймер, запирающий праймер и ДНК-матрицу (ОДН-конструкции Gp-pri*//Temp1_oG, Gp-pri*~Down1//Temp1_oG, Gp-pri*~Down1_oG//Temp1 соответственно). В ДНК-матрицу либо в запирающий праймер были введены ДБС, образованные белком Fpg (Рисунок 17). Для введения ДБС в соответствующей цепи находился остаток 8-oxoGua; полностью отожженный субстрат обрабатывался Fpg в присутствии $NaBH_4$. В качестве контролей активности ДНК-полимераз использовали субстраты, содержащие праймер и неповрежденную ДНК-матрицу либо праймер, запирающий праймер и матрицу, но не содержащие ДБС. В качестве маркеров подвижности использовали ОДН, совпадающие по длине с продуктом полного синтеза ДНК по матрице и с расстоянием от 5′-конца до места сшивки.

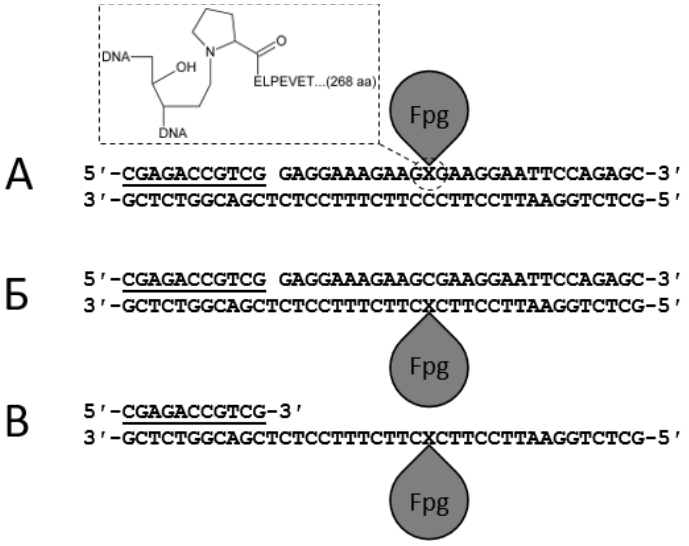


**Рисунок 17.** Схема использованных ДНК-субстратов. А — субстрат Gp-pri*~Down1_oG//Temp1 содержащий ДБС в вытесняемой цепи (в запирающем праймере). Б — субстрат Gp-pri*~Down1//Temp1_oG, содержащий ДБС в матричной цепи. В — субстрат Gp-pri*//Temp1_oG, содержащий ДБС в матричной цепи без запирающего праймера.

При анализе продуктов восстановления $NaBH_4$ основания Шиффа электрофорезом в ПААГ в неденатурирующих условиях наблюдалось снижение электрофоретической подвижности субстратов (Down1//Temp1_oG*, Down1_oG*//Temp1), содержащих ковалентно сшитый Fpg (Рисунок 18А). При электрофорезе тех же образцов в системе Лэммли был рассчитан выход сшивки (Рисунок 18Б). Субстрат Down1_oG*//Temp1 давал сшивку с Fpg с выходом 80–95%, а выход ДБС с субстратом Down1//Temp1_oG* был несколько ниже (65–85%) и наблюдались продукты с той же подвижностью, что и исходная ДНК-матрица (Рисунок 18Б, дорожка 2). По-видимому, это вызвано тем, что Fpg частично успевает провести реакцию и удалить 8-oxoGua, а $NaBH_4$ восстанавливает небольшое количество АП-ДНК, которая высвобождается из комплекса с Fpg без элиминирования.

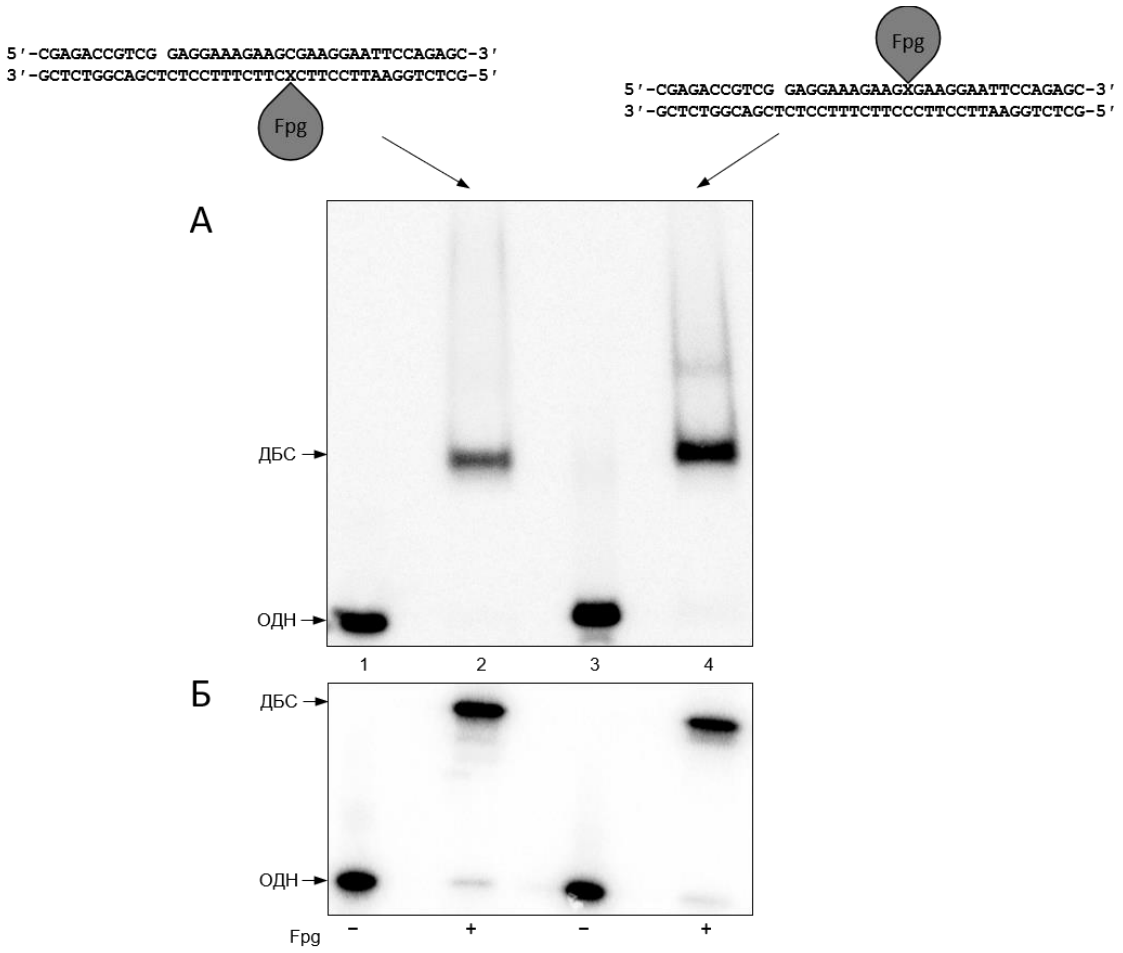


**Рисунок 18**. Радиоавтографы гелей после разделения продуктов сшивки Fpg с ДНК в неденатурирующих условиях (А) и в денатурирующих условиях в системе Лэммли (Б). Дорожка 1 — субстрат Down1//Temp1_oG*, дорожка 2 — субстрат Down1//Temp1_oG* после обработки Fpg в присутствии $NaBH_4$, дорожка 3 — субстрат Down1_oG*//Temp1, дорожка 4 — субстрат Down1_oG*//Temp1 после обработки Fpg в присутствии $NaBH_4$.

При реакции Fpg с оцДНК, содержащей 8-oxoGua, с последующим восстановлением $NaBH_4$ основания Шиффа анализ образцов проводили электрофорезом в ПААГ в неденатурирующих условиях (Рисунок 19А). В этом случае выход продукта был заметно ниже, чем с двуцепочечным субстратом, поскольку сродство Fpg к одноцепочной ДНК на 3 порядка меньше, чем к двуцепочечной [302]. Однако большой избыток фермента позволил достичь приемлемой глубины прохождения реакции. Полученная сшивка с оцДНК была очищена от примесей ДНК, не сшитой с Fpg, и сконцентрирована. Выход после чистки составил около 25%. Электрофорез в системе Лэммли показал, что полученная сшивка с оцДНК достаточно гомогенна и подходит для дальнейших экспериментов с ДНК-полимеразами (Рисунок 19Б).

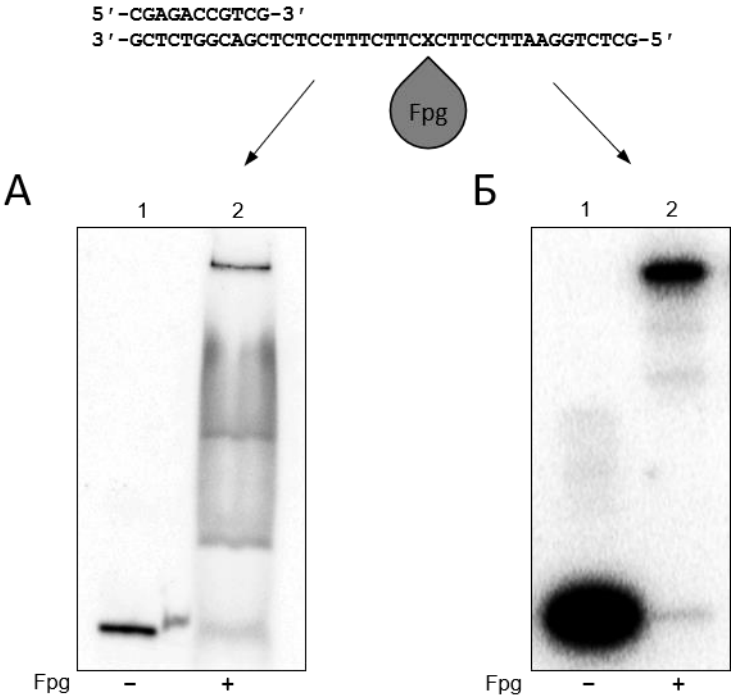


**Рисунок 19**. Радиоавтографы гелей после разделения продуктов сшивки Fpg с оцДНК в неденатурирующих условиях (А) и в денатурирующих условиях в системе Лэммли после очистки (Б). Дорожка 1 — субстрат Temp1_oG*, дорожка 2 — субстрат Temp1_oG* после обработки Fpg в присутствии $NaBH_4$

### *4.1.2. Элонгация праймера на одноцепочечном субстрате, содержащем ДНК-белковую сшивку, ДНК-полимеразами разных семейств*

В работе использовали ряд ДНК-полимераз, отличающихся способностью вести процессивный синтез и вытеснять запирающий праймер, принадлежащих к разным семействам. Был проведен анализ их поведения при столкновении с препятствием в виде ДБС.

Семейство А ДНК-полимераз объединяет ферменты, ведущие репликацию некоторых бактериофагов (ДНК-полимераза фага T7), репликацию митохондриальной ДНК (эукариотическая ДНК-полимераза γ), а также репарацию ДНК и процессинг фрагментов Оказаки бактерий (ДНК-полимеразы I *E. coli* и *Th. aquaticus*) [258]. Интересная особенность фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* — его способность проходить без ошибок додекапептидный аддукт по $N^6$-Ade [303]; некоторые ДНК-полимеразы семейства А способны к выпетливанию матрицы для обхода большого повреждения с возобновлением синтеза с 3′-стороны от него [276–278].

Общую картину синтеза ДНК-полимеразами семейства А на оц-матрицах, содержащих ДБС, можно проиллюстрировать результатами, полученными при изучении поведения фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* (Рисунок 20А).

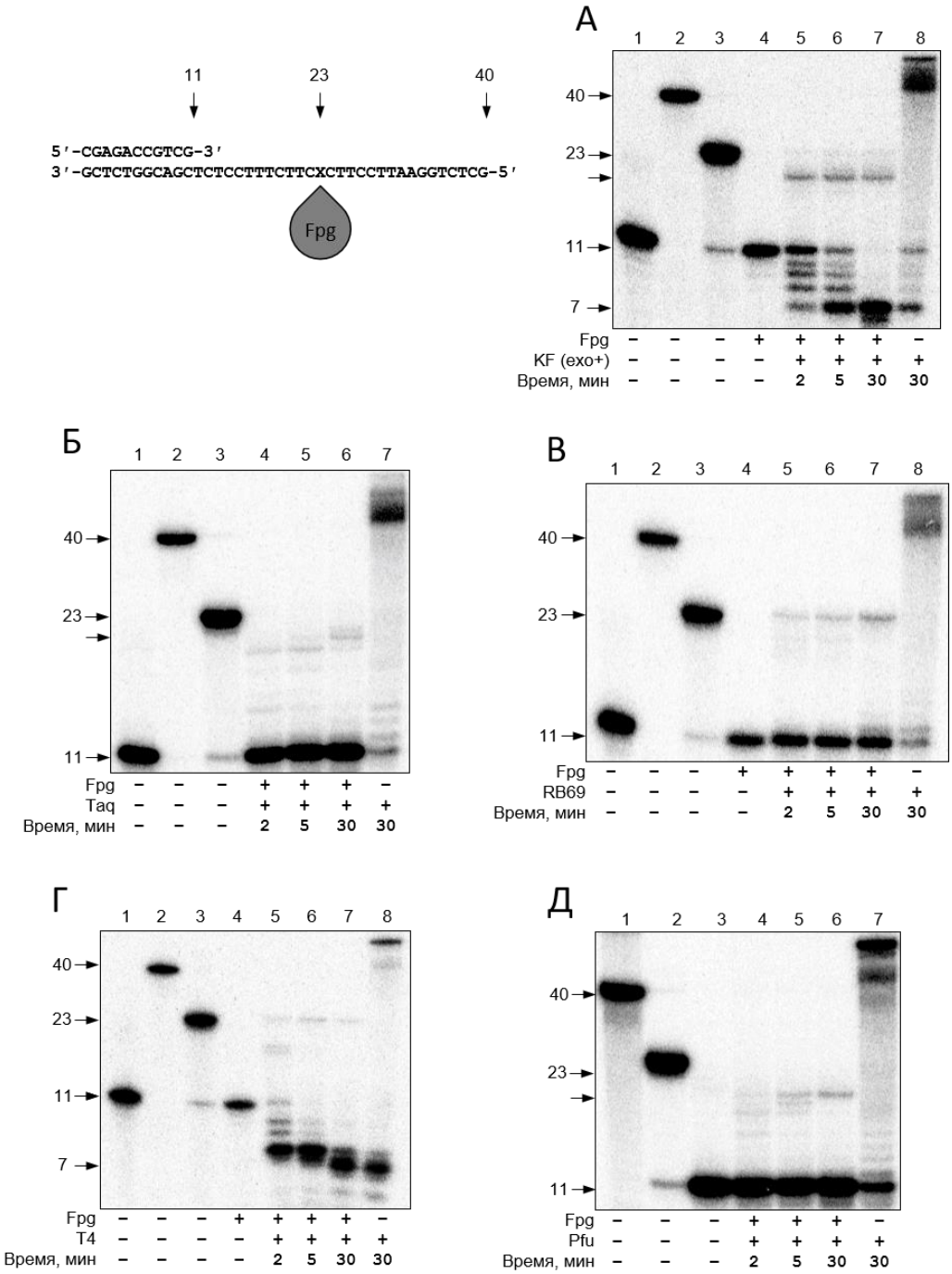


**Рисунок 20**. Радиоавтографы гелей после разделения продуктов синтеза ДНК ДНК-полимеразами семейств А и В на субстратах, содержащих ДБС в матричной цепи в составе оцДНК: фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* (exo+) (А), ДНК-полимераза *Taq* (Б), ДНК-полимераза бактериофага RB69 (В), ДНК-полимераза бактериофага Т4 (Г), ДНК-полимераза *Pfu* (Д). Нумерация дорожек на А, В и Г: дорожки 1, 2, 3 — маркеры подвижности длиной 11 н., 40 н. и 23 н. соответственно, дорожка 4 – конструкция, содержащая ДБС без ДНК-полимеразы, дорожки 5–7 — реакция с ДНК-полимеразой, время инкубации 2 мин (дорожка 5), 5 мин (дорожка 6), 30 мин (дорожка 7); дорожка 8 — контроль активности ДНК-полимеразы на субстрате без повреждений (субстрат вида праймер–матрица). Нумерация дорожек на Б: дорожки 1, 2, 3 — маркеры подвижности длиной 11 н., 40 н. и 23 н., соответственно, дорожки 4–6 — реакция с ДНК-полимеразой, время инкубации 2 мин (дорожка 4), 5 мин (дорожка 5), 30 мин (дорожка 6); дорожка 7 — контроль активности ДНК-полимеразы на субстрате без повреждений (субстрат вида праймер–матрица). Нумерация дорожек на Д: дорожки 1, 2, 3 — маркеры подвижности длиной 40 н., 23 н. и 11 н., соответственно, дорожки 4–6 — реакция с ДНК-полимеразой, время инкубации 2 мин (дорожка 4), 5 мин (дорожка 5), 30 мин (дорожка 6); дорожка 7 — контроль активности ДНК-полимеразы на субстрате без повреждений (субстрат вида праймер–матрица).

Видно, что полимераза эффективно ведет синтез, но останавливается приблизительно за 4 нуклеотида до места сшивки (Рисунок 20А, дорожки 5, 6, 7). Данный эксперимент проводился с ДНК-полимеразой, обладающей 3′→5′ экзонуклеазной активностью, поэтому наряду с продуктами удлинения праймера, мы можем наблюдать полосы, соответствующие гидролизу исходного праймера длинной 11 н. Лишенный 3′→5′ экзонуклеазной активности KF на данных субстратах демонстрировал аналогичное поведение, но без деградации праймера (данные не приведены).

Другой представитель семейства А — *Taq* ДНК-полимераза, останавливалась до места сшивки приблизительно в той же позиции, что и KF, и демонстрировала несколько точек пауз на ранних временах реакции (Рисунок 20Б). Стоит отметить, что точки паузы присутствуют и в контрольной реакции ДНК-полимеразы *Taq* с неповрежденным субстратом в присутствии запирающего праймера (Рисунок 23Б, дорожка 9), однако в системе праймер–матрица ДНК-полимераза *Taq* эффективно достраивает цепь до полноразмерного продукта. Возможно, это связано с особенностями последовательности ДНК и температурой реакции, субоптимальной для действия данного термофильного фермента.

Семейство В включает в себя в основном репликативные ДНК-полимеразы, ведущие синтез как по лидирующей, так и по отстающей цепи. К этому семейству относятся основные эукариотические репликативные ДНК-полимеразы α, δ, ε, а также транслезионная ДНК-полимераза ζ и некоторые ДНК-полимеразы архей (*Pfu*) и бактериофагов (T4 и RB69). Отличительные особенности полимераз этого семейства — это высокая точность репликации и наличие 3′→5′-экзонуклеазной активности. Даже у представителей этого семейства, не имеющих корректирующей активности (ДНК-полимеразы α и ζ), синтез считается более точным по сравнению с полимеразами других семейств. ДНК-полимераза ζ, как недавно показано, участвует в прохождении пептидного аддукта после протеолитической деградации ДНК-белковой сшивки в репликативной вилке [173].

Взаимодействие ДНК-полимераз семейства В с ДБС исследовали на примере ДНК-полимераз бактериофагов RB69 и T4 и архейной ДНК-полимеразы *Pfu* [261,304,305]. В отличие от ДНК-полимераз семейства А, на субстратах, содержащих ДБС в матричной цепи, RB69 синтезировала продукт, длина которого соответствует маркеру подвижности длиной 23 н., который свидетельствует о том, что данная ДНК-полимераза способна доходить непосредственно до места сшивки несмотря на присутствие объемного белкового аддукта (Рисунок 20В). Во многом аналогичная RB69 ДНК-полимераза T4 демонстрирует схожую способность. Хотя ДНК-полимераза T4 обладает самой сильной 3′→5′-экзонуклеазной активностью в семействе, и в реакции наблюдалась значительная деградация праймера, тем не

менее, ДНК-полимераза T4 была также способна доходить непосредственно до сайта сшивки (Рисунок 20Г).

Исследования активности высокоточной термостабильной ДНК-полимеразы *Pfu* осложнялись тем, что температурные условия реакций (37°C) не соответствовали оптимуму для нее (72–74°C). Использование оптимальной температуры было невозможным, так как в модельной ДБС температура плавления праймера составляла 44°C, а температура, при которой денатурирует пришитый к ДНК белок Fpg — 51°C. Результаты, полученные при 37°C, представлены на рисунке 20Д. На субстрате со сшивкой в оцДНК ДНК-полимераза *Pfu* останавливается за 4–5 нуклеотидов до места сшивки, таким образом, расположение точки паузы совпадает с ее расположением для ДНК-полимераз семейства A. Остается неясным, связана ли данная точка остановки с неоптимальными условиями реакции и будет ли способна полимераза *Pfu* вести синтез дальше при оптимальной температуре.

Семейство X содержит в основном репаративные ДНК-полимеразы эукариот и включает ДНК-полимеразу β, участвующую в процессе ЭРО [306,307], и ДНК-полимеразу λ, вовлеченную в соединение негомологичных концов при двуцепочечных разрывах ДНК [308,309]. В работе была исследована активность ДНК-полимераз β и λ на матрицах, содержащих ДНК-белковые сшивки. В отличие от ДНК-полимераз семейств A и B, эти ферменты ведут дистрибутивный синтез на субстратах вида праймер–матрица — катализируют присоединение к праймеру одного нуклеотида, затем высвобождают ДНК, и цикл повторяется снова. Накопление продуктов разной длины в ходе такого синтеза хорошо видно на примере POLλ, ведущей синтез на немодифицированной матрице (Рисунок 21А, дорожка 8). Для ДНК-полимераз семейства X оптимальны ДНК-субстраты, содержащие короткую брешь [289,310–312]. Как POLβ, так и POLλ не были способны вести синтез ближе, чем за 3–5 нуклеотидов до места сшивки, что делает их схожими с ДНК-полимеразами семейства A. Однако эффективность полимеразной реакции была значительно ниже, чем в случае с ДНК-полимеразами семейств A и B, что, вероятно, отражает предпочтение ДНК-полимераз семейства X к субстратам, содержащим брешь. Интересно, что POLβ и POLλ были способны синтезировать продукт большей длины на матрицах, содержащих ДБС, чем на неповрежденном субстрате (Рисунок 21А, Рисунок 21Б). Возможно, что ДБС на оц-матрице может обеспечить некоторые неспецифические белок-белковые взаимодействия, которые помогают ДНК-полимеразе удерживаться на матрице и подойти ближе к месту сшивки.

ДНК-полимеразы семейства Y отличаются своей способностью вести транслезионный синтез, то есть включать dNMP напротив поврежденных звеньев ДНК [313]. Эту особенность обеспечивает небольшой домен «пальцы», в результате чего образуется достаточно широкий активный центр, который позволяет связывать даже сильно искаженную повреждениями ДНК,

однако из-за этой же структурной особенности частота ошибок представителей семейства Y на 1–2 порядка превышает число ошибок ДНК-полимераз других семейств [314]. В работе исследовали активность транслезионных ДНК-полимераз на матрицах с ДНК-белковыми сшивками на примере архейной ДНК-полимеразы IV (Dpo4) *Sulfolobus solfataricus* и ДНК-полимеразы κ человека.

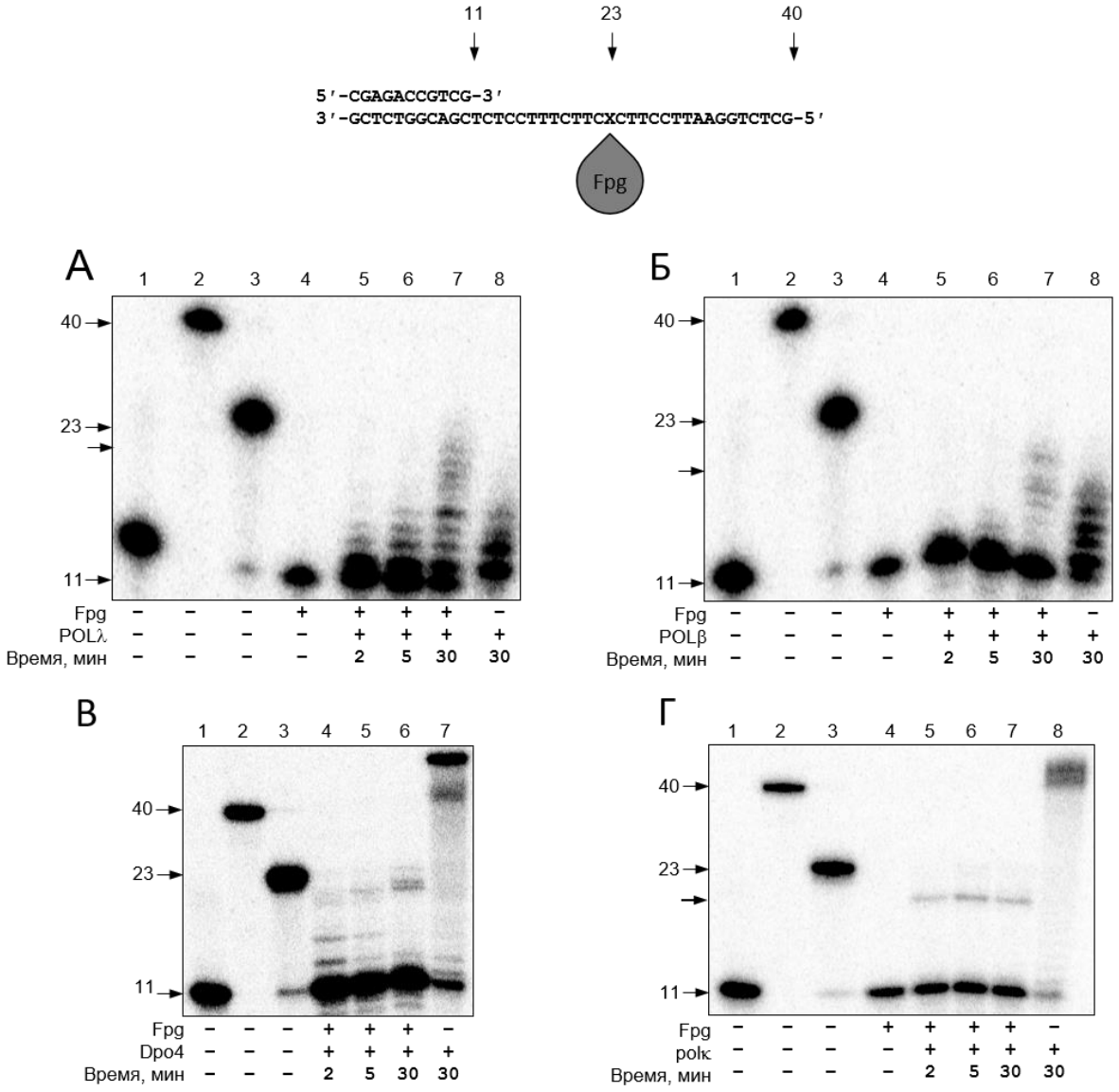


**Рисунок 21**. Радиоавтографы гелей после разделения продуктов синтеза ДНК ДНК-полимеразами семейств X и Y на субстратах, содержащих ДБС в матричной цепи в составе оцДНК: ДНК-полимераза λ человека (А), ДНК-полимераза β человека (Б), ДНК-полимераза Dpo4 *Sulfolobus sulfotaricus* (В), ДНК-полимераза κ человека (Г). Нумерация дорожек на А, Б и Г: дорожки 1, 2, 3 — маркеры подвижности длиной 11 н., 40 н. и 23 н. соответственно, дорожка 4 – конструкция, содержащая ДБС без ДНК-полимеразы, дорожки 5–7 — реакция с ДНК-полимеразой, время инкубации 2 мин (дорожка 5), 5 мин (дорожка 6), 30 мин (дорожка 7); дорожка 8 — контроль активности ДНК-полимеразы на субстрате без повреждений (субстрат вида праймер–матрица). Нумерация дорожек на В: дорожки 1, 2, 3 — маркеры подвижности длиной 11 н., 40 н. и 23 н. соответственно, дорожки 4–6 — реакция с ДНК-полимеразой, время инкубации 2 мин (дорожка 4), 5 мин (дорожка 5), 30 мин (дорожка 6); дорожка 7 — контроль активности ДНК-полимеразы на субстрате без повреждений (субстрат вида праймер–матрица).

В экспериментах с ДНК-полимеразой Dpo4 на субстрате, где ДБС находится в оцДНК, обращают на себя внимания точки паузы на этапах добавления к праймеру 2, 4 и 8 нуклеотидов, отсутствующие в контрольной реакции на субстрате праймер–матрица (Рисунок 21В). Интересно, что все они соответствуют включению dGMP в растущую цепь, и пауза может быть связана с тем, что субстрат dGTP для Dpo4 — наихудший с точки зрения кинетики из всех возможных пар [315]. Возможно, аналогичные кинетические соображения объясняют наличие точек пауз в контрольных реакциях и для других исследованных полимераз (например, ДНК-полимеразы *Taq*). Кроме того, при длительном времени инкубации ДНК-полимеразы с субстратом наблюдается полоса слабой интенсивности, соответствующая длине 23 н., что говорит о способности Dpo4 способна вести синтез непосредственно до места сшивки белка с ДНК (Рисунок 21В — дорожка 6). ДНК-полимераза κ при работе на том же субстрате не демонстрирует точек пауз, однако отчетливо видна полоса накопления продукта длиной 19 н., таким образом, POLκ останавливает синтез за 4 н. до места сшивки (Рисунок 21Г).

### *4.1.3. Элонгация праймера на двуцепочечном субстрате, содержащем ДНК-белковую сшивку в матричной цепи, ДНК-полимеразами разных семейств*

ДНК-полимеразы сильно различаются по способности вести синтез в присутствии запирающего праймера, когда необходимо вытеснять впереди лежащую цепь по ходу синтеза. ДНК-полимеразы семейства A способны гидролизовать впереди лежащую цепь благодаря активности их 5′→3′ экзонуклеазного домена (который на самом деле представляет собой структурно-специфичную эндонуклеазу, отщепляющую короткие фрагменты вытесняемой ДНК [316]). Если этот домен удалить, то оставшийся каталитический домен будет способен вытеснять запирающий праймер без его расщепления. К семейству B относятся ДНК-полимеразы сильно различающиеся по способности вытеснять впереди лежащую цепь: от совершенно неспособных (T4 и *Pfu* ДНК-полимеразы) до обладающих сильной способностью к вытеснению (ДНК-полимеразы бактериофагов RB69 и φ29) [317–319]. Ферменты семейства X обладают от слабой до умеренной способности вытеснять запирающий праймер (по разным данным от 1 до 10 н. [320,321]). ДНК-полимеразы семейства Y также обладают различной вытесняющей способностью [322,323].

Наличие второй цепи во всех исследуемых субстратах, содержащих дцДБС, сильно влияло на способность ДНК-полимераз достигать сайта сшивки. В экспериментах с использованием субстратов, содержащих ДБС в матричной цепи в составе дцДНК, ДНК-полимеразы T4 и *Pfu*, вследствие отсутствия способности вытеснять впереди лежащую цепь, включали один

нуклеотид, заполняя брешь, и не вели синтез дальше (Рисунок 22А). ДНК-полимераза Т4, кроме этого, сильно расщепляла праймер (данные не приведены). Dpo4 и POLκ слабо вытесняли запирающий праймер даже на неповрежденных контрольных дуплексах и демонстрировали такое же слабое вытеснение комплементарной цепи на субстратах с ДБС.

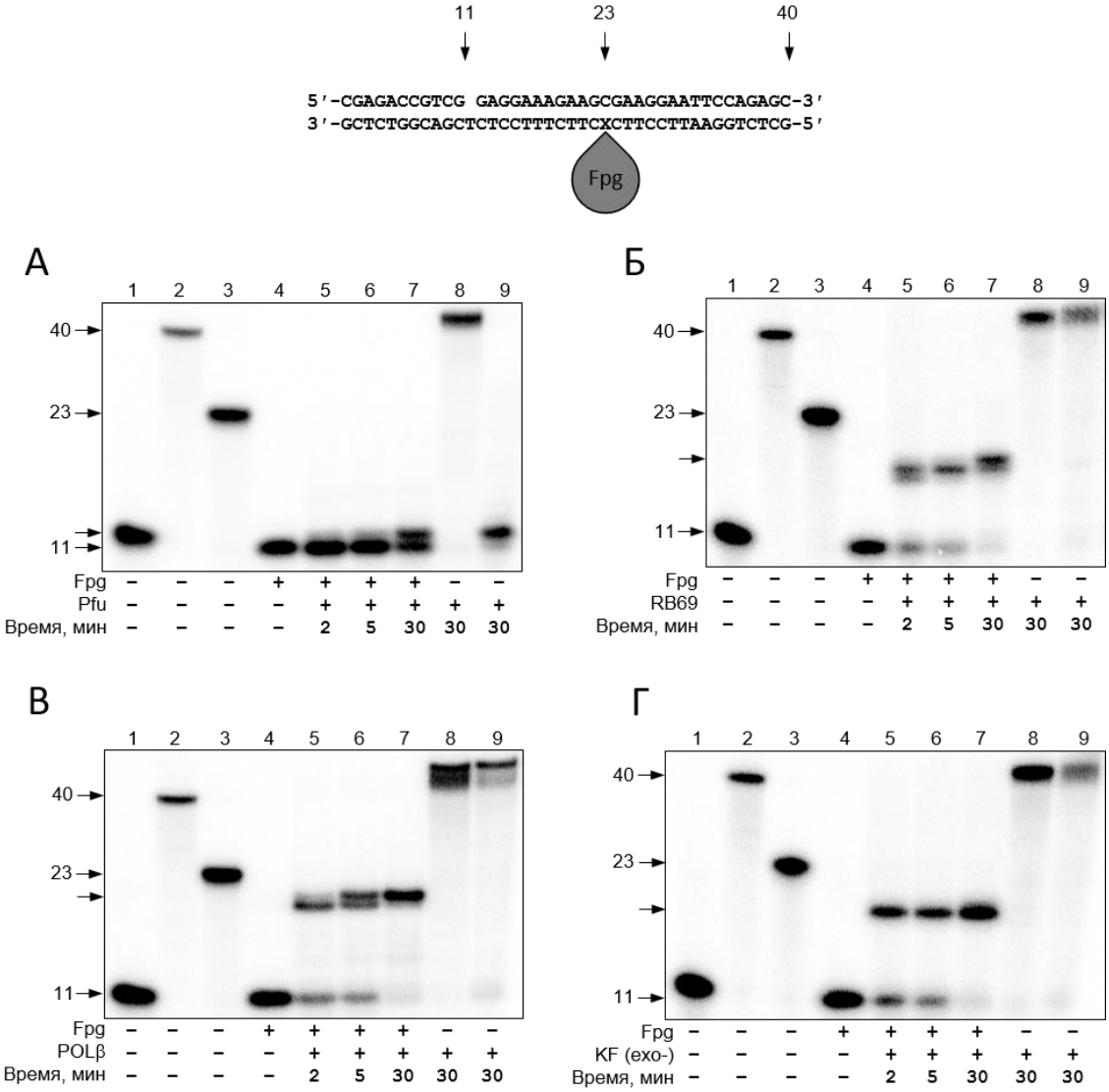


**Рисунок 22**. Радиоавтографы гелей после разделения продуктов синтеза ДНК ДНК-полимеразами на субстратах, содержащих ДБС в матричной цепи в составе дцДНК: ДНК-полимераза *Pfu* (А), ДНК-полимераза бактериофага RB69 (Б), ДНК-полимераза β человека (В), фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E.coli* (exo⁻) (Г). Нумерация дорожек на А, Б, В и Г общая: дорожки 1, 2, 3 — маркеры подвижности длиной 11 н., 40 н. и 23 н. соответственно, дорожка 4 – конструкция, содержащая ДБС без ДНК-полимеразы, дорожки 5–7 — реакция с ДНК-полимеразой, время инкубации 2 мин (дорожка 5), 5 мин (дорожка 6), 30 мин (дорожка 7); дорожка 8 — контроль активности ДНК-полимеразы на субстрате без повреждений (субстрат вида праймер–матрица), дорожка 9 — контроль активности ДНК-полимеразы на субстрате без повреждений (субстрат вида праймер–матрица–запирающий праймер).

Другие ДНК-полимеразы, хотя и показали способность к вытеснению запирающего праймера, но, тем не менее, останавливались раньше, чем в случае оц-субстратов. Эта разница

особо заметна в экспериментах с ДНК-полимеразой RB69 (фермент останавливался за 5–6 нуклеотидов до места сшивки, в то же время будучи способным достигать сайта сшивки на оц-матрице) (Рисунок 22Б). Единственным исключением можно назвать POLβ, которая, по-видимому, была способна вести синтез дальше, останавливаясь за 3–4 нуклеотида до места сшивки (в отличие от дистанции 4–5 нуклеотидов до места сшивки на оц-субстратах), что может быть связано с общим предпочтением данной полимеразы к субстратам, содержащим короткую брешь (Рисунок 22В). Одновременно с этим, ДНК-полимеразы семейства А оказались наименее восприимчивы к присутствию комплементарной цепи и включали лишь на 1–2 нуклеотида меньше, чем при синтезе на оцДНК-матрицах, содержащих ДБС (Рисунок 22Г).

### *4.1.4. Элонгация праймера на двуцепочечном субстрате, содержащем ДНК-белковую сшивку в цепи, комплементарной матричной, ДНК-полимеразами разных семейств*

Ситуация, при которой ДБС расположена в вытесняемой цепи, представляет особый интерес, так как в данном случае транслезионного синтеза не ожидается, и ДНК-полимераза потенциально способна пройти место повреждения при условии, что она способна разделять нити ДНК, в одной из которых присутствует ДБС.

ДНК-полимеразы семейства А, которые обладают способностью к вытеснению или деградации впереди лежащей цепи, демонстрировали примерно ту же эффективность синтеза на субстратах, содержащих ДБС в запирающем праймере, как и на субстратах, содержащих ДБС в оц-матрице. KF (exo$^+$) был способен удлинять праймер на 8–9 нуклеотидов и останавливался за 3–4 нуклеотида до сайта сшивки, в то время как KF (exo$^-$) был способен подходить даже немного ближе к пришитому белку (данные не приведены). Другой представитель семейства А, ДНК-полимераза *Taq,* останавливалась приблизительно в той же позиции на ДНК, что и KF (Рисунок 23Б). В отличие от KF, *Taq* ДНК-полимераза демонстрировала точки паузы в начале элонгации, но эти паузы успешно преодолевались ферментом. Похожие точки паузы наблюдались и в контрольной реакции на неповрежденном субстрате, что, возможно, является следствием субоптимальных условий реакции для данной ДНК-полимеразы (Рисунок 23Б, дорожка 9). Таким образом, несмотря на способность ДНК-полимераз семейства А проходить некоторые объемные пептидные аддукты [303], они не способны проходить ДБС, находящуюся в любом контексте (Рисунок 20А, Рисунок 20Б, Рисунок 22Г, Рисунок 23Б).

ДНК-полимераза RB69 семейства В была способна вести синтез до места сшивки, как и в случае, когда белковый аддукт находился в оц-матрице (Рисунок 23А). Следует учитывать, что при расположении пришитого белка Fpg в матричной цепи и в вытесняемой цепи на одном и том

же расстоянии от конца праймера не означает одинакового расстояния между белковыми глобулами Fpg и ДНК-полимеразы. Асимметричная ориентация Fpg на ДНК, как следует из пространственной структуры комплекса [288], сдвигает край футпринта Fpg на 2 н. в 3′ направлении в случае, когда сшивка расположена в запирающем праймере, по сравнению с ситуацией, когда сшивка расположена в матричной цепи (Рисунок 24). Однако эта разница сама по себе не может объяснить ~7 н. дистанцию в точках остановки ДНК-полимеразы при наличии ДБС в матрице и в запирающем праймере. По всей вероятности, ДНК-полимераза RB69 может частично вытеснять комплементарную цепь даже содержащую такой объемный белковый аддукт, как ДБС. Присутствие структурно–специфичной эндонуклеазы FEN1 не усиливало вытеснение запирающего праймера ДНК-полимеразой RB69 (данные не приведены). ДНК-полимеразы T4 и *Pfu*, не имеющие способности вытеснять впереди лежащую цепь, вели себя так же, как и в случае синтеза на субстратах, содержащих ДБС в матричной цепи в составе дцДНК.

ДНК-полимеразы семейства X показывали примерно такую же активность, как и на субстратах с ДБС в матричной цепи дцДНК. POLβ останавливалась за 4–5 нуклеотидов до места сшивки (Рисунок 23B), в то время как POLλ, обладающая меньшей способностью вытеснять комплементарную цепь [312], останавливалась приблизительно за 8 н. до места сшивки. Как и в случае RB69, разница в точках терминации POLβ при наличии ДБС в матричной цепи и в запирающем праймере не может быть объяснена 2 н. ассиметрией футпринта белка Fpg.

ДНК-полимеразы семейства Y демонстрировали слабую способность к вытеснению впереди лежащей цепи даже на контрольных субстратах. Только при длительном времени инкубации фермента Dpo4 наблюдалась полоса, соответствующая удлинению праймера до положения за 2–3 н. до места сшивки (данные не приведены).

Таким образом, полученные результаты показывают, что вытеснение цепи, несущей ДБС, проблематично даже для ДНК-полимераз, обладающих сильной способностью к вытеснению впереди лежащей цепи.

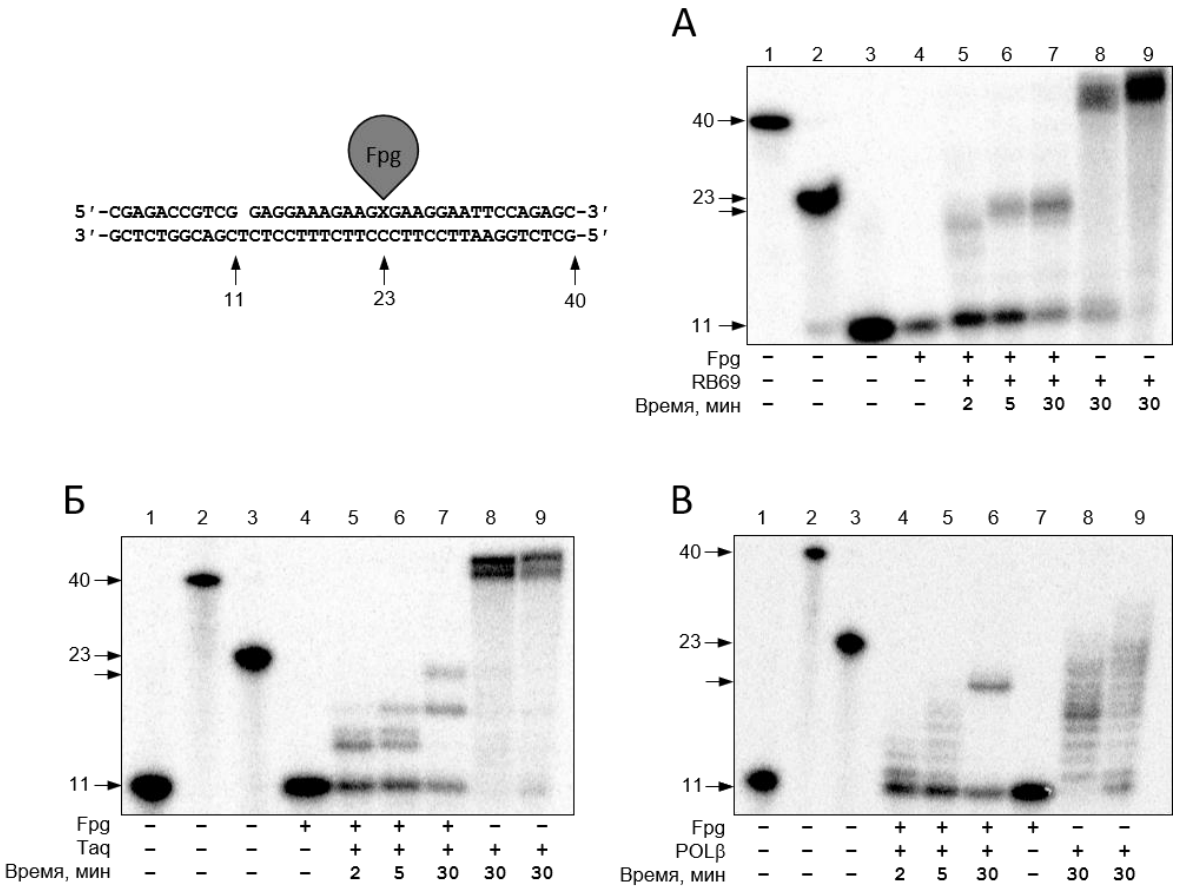


**Рисунок 23**. Радиоавтографы гелей после разделения продуктов синтеза ДНК ДНК-полимеразами на субстратах, содержащих ДБС в запирающем праймере: ДНК-полимераза бактериофага RB69 (А) ДНК-полимераза *Taq* (Б), ДНК-полимераза β человека (В). Нумерация дорожек на А: дорожки 1, 2, 3 — маркеры подвижности длиной 40 н., 23 н. и 11 н. соответственно, дорожка 4 — конструкция, содержащая ДБС без ДНК-полимеразы, дорожки 5–7 — реакция с ДНК-полимеразой, время инкубации 2 мин (дорожка 5), 5 мин (дорожка 6), 30 мин (дорожка 7); дорожка 8 — контроль активности ДНК-полимеразы на субстрате без повреждений (субстрат вида праймер–матрица), дорожка 9 — контроль активности ДНК-полимеразы на субстрате без повреждений (субстрат вида праймер–матрица–запирающий праймер). Нумерация дорожек на Б: дорожки 1, 2, 3 — маркеры подвижности длиной 11 н., 40 н. и 23 н. соответственно, дорожка 4 – конструкция, содержащая ДБС без ДНК-полимеразы, дорожки 5–7 — реакция с ДНК-полимеразой, время инкубации 2 мин (дорожка 5), 5 мин (дорожка 6), 30 мин (дорожка 7); дорожка 8 — контроль активности ДНК-полимеразы на субстрате без повреждений (субстрат вида праймер–матрица), дорожка 9 — контроль активности ДНК-полимеразы на субстрате без повреждений (субстрат вида праймер–матрица–запирающий праймер). Нумерация дорожек на В: дорожки 1, 2, 3 — маркеры подвижности длиной 11 н., 40 н. и 23 н. соответственно, дорожки 4–6 — реакция с ДНК-полимеразой, время инкубации 2 мин (дорожка 4), 5 мин (дорожка 5), 30 мин (дорожка 6); дорожка 7 — конструкция, содержащая ДБС без ДНК-полимеразы, дорожка 8 — контроль активности ДНК-полимеразы на субстрате без повреждений (субстрат вида праймер–матрица), дорожка 9 — контроль активности ДНК-полимеразы на субстрате без повреждений (субстрат вида праймер–матрица–запирающий праймер).

### *4.1.5. Структурные аспекты взаимодействия ДНК-полимераз с ДНК-белковыми сшивками*

По сравнению с большинством повреждений нуклеотидов в ДНК, ДНК-белковые сшивки представляют собой чрезвычайно объемные аддукты. В качестве модели ДБС был выбран белок Fpg, который по литературным данным закрывает около ~7 н. на поврежденной цепи ДНК и ~9 н.

на комплементарной цепи [288]. В использованных модельных конструкциях нуклеотид 8-oxodG, узнаваемый ферментом Fpg, находится на расстоянии 13 н. от 3′-конца праймера. ДНК-полимеразы, несмотря на гетерогенность их размеров, также представляют собой достаточно крупные белки (молекулярная масса ДНК-полимераз, исследованных в данной работе, лежит в диапазоне 38–114 кДа, в то время как молекулярная масса Fpg составляет 30 кДа) (разд. 2.2.1, Таблица 1). В качестве праймера был использован ОДН длиной 11 н. Таким образом, исходя из стерических соображений, ДНК-полимераза вскоре после начала синтеза сталкивается с препятствием в виде пришитого белка. Доступные кристаллические структуры [324,325] позволяют оценить расстояние во время старта синтеза между ДНК-полимеразами RB69 и POLβ и сшитым белком Fpg. В случае, когда Fpg ковалентно сшит с вытесняемой цепью, поверхности POLβ и RB69 находятся на расстоянии 6 и 5 н. от поверхности Fpg соответственно. Таким образом, остановка POLβ за 4–5 н. до сайта сшивки соответствует 2–3 н. перекрыванию между футпринтом POLβ и футпринтом Fpg. В случае, когда белок Fpg ковалентно пришит к матричной цепи, поверхности POLβ и Fpg находятся на расстоянии 4 н. из-за ассиметричности футпринта Fpg, и перекрывание при терминации синтеза составляет 0–1 н. (Рисунок 24). Еще более выражено перекрывание поверхностей Fpg с остановившейся ДНК-полимеразой RB69, которое составляет как минимум 4 н. при нахождении ДБС в матричной цепи и практически полностью перекрывает футпринт Fpg в случае ДБС в вытесняемой цепи (Рисунок 25).

Результаты по всем ДНК-полимеразам, исследованным в данной работе, сведены в таблице 3. ДНК-полимеразы, принадлежащие к разным семействам, показали определенную гетерогенность в наличии точек паузы синтеза и в способности доходить до места сшивки, однако в целом для описания процесса синтеза ДНК на матрицах, содержащих ДБС, можно предложить механизм «kiss-and-push» (Рисунок 25, Рисунок 26). Удлинение праймера на первом этапе в основном зависит от способности ДНК-полимераз вести синтез на данных субстратах (в частности способность ДНК-полимераз вытеснять запирающий праймер и активность ДНК-полимераз при используемых в исследовании температурных условиях) до тех пор, пока поверхность ДНК-полимеразы не столкнется с поверхностью сшитого белка («kiss»). Большинство ДНК-полимераз останавливается на этом этапе, но некоторые, в особенности ДНК-полимеразы семейства B и ДНК-полимераза Dpo4 (на оцДБС), способны «выталкивать» («push») сшитый белок и доходить до места сшивки, пока, вероятно, структура самой ДНК-полимеразы не искажается до такой степени, что она более не способна катализировать включение нуклеотидов.

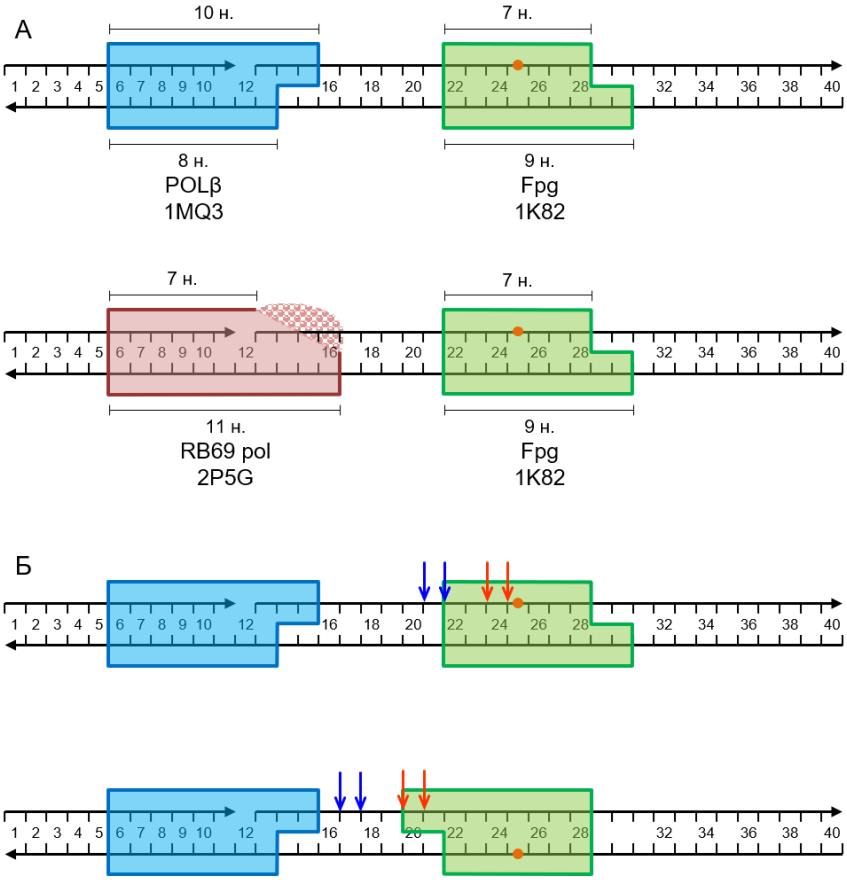


**Рисунок 24**. А — сравнение размеров ДНК-полимераз и Fpg на ДНК на основании структурных данных. Коды PDB для Fpg, POLβ и ДНК-полимеразы RB69 показаны на рисунке. Красные точки обозначают приблизительное расположение домена полимеразы RB69, отсутствующего в кристаллической структуре. Стрелками показаны 3′-концы ОДН. Оранжевая точка обозначает позицию сшивки Fpg с ДНК. Б — места остановки POLβ при столкновении с Fpg, ковалентно связанным с ДНК в запирающем праймере или в матричной цепи. Синие стрелки соответствуют позиции последнего включенного dNMP; красные — положению поверхности белка POLβ [324,325].

Даже на стадии «kiss» белковые глобулы ДНК-полимеразы либо ковалентно сшитого белка должны быть уже частично деформированы, так как точка терминации элонгации обычно находится ближе к сайту сшивки, чем позволяет размер обоих белков (Рисунок 26). В этом отношении этап «kiss» напоминает остановку обратных транскриптаз РНК-связывающими белками в тоупринтинге — методе, который используется для анализа комплексов трансляции. В этом случае синтез кДНК останавливается непосредственно на 3′-границе рибосомы или белка, связанного с РНК, или очень близко к этой границе [326]. Семейство B ДНК-полимераз обладает наибольшей способностью деформировать белковые препятствия.

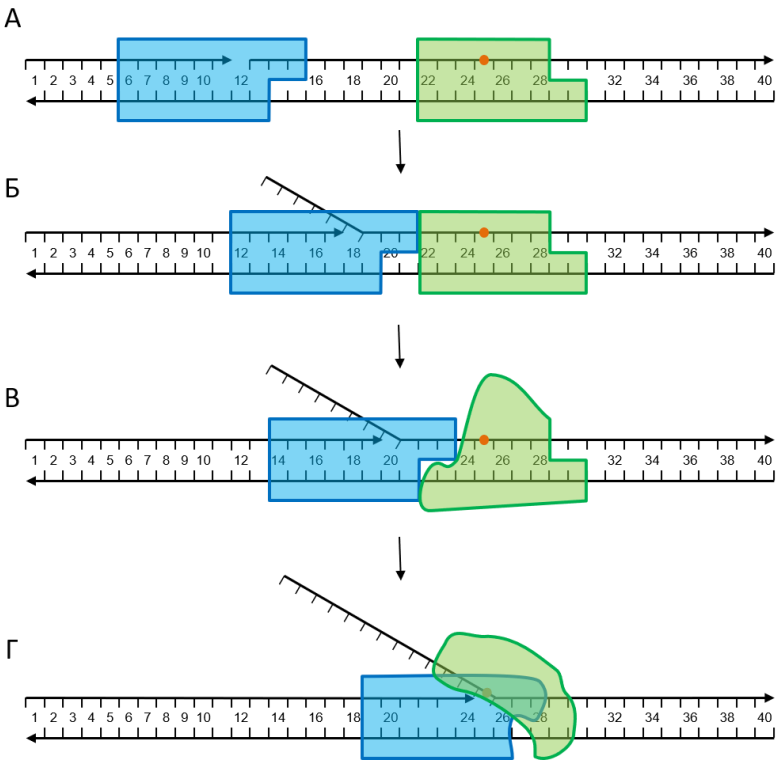


**Рисунок 25**. Схема механизма «kiss-and-push» на примере субстрата, содержащего ДБС в вытесняемой цепи в составе дцДНК. Схематичное взаимное расположение ДНК-полимеразы (синяя) и ДБС (зеленая) в начале синтеза (А). После включения нескольких нуклеотидов поверхность ДНК-полимеразы встречает поверхность ДБС — стадия «kiss» (Б). Способность некоторых ДНК-полимераз деформировать сшитый белок приводит к включению еще нескольних нуклеотидов в растущую цепь — стадия «push» (В). Синтез останавливается, когда искажается структура ДНК-полимеразы (Г).

**Таблица 3.** Точки остановки ДНК-полимераз на субстратах, содержащих ДБС.

| **Семейство** | **ДНК-полимераза** | **ДБС в матрице в оцДНК** | **ДБС в матрице дцДНК** | **ДБС в вытесняемой цепи в дцДНК** |
|---|---|---|---|---|
| A | KF | 4 н. до ДБС | 5 н. до ДБС | 3–4 н. до ДБС |
| A | *Taq* | 3–4 н. до ДБС | 5 н. до ДБС | 3–5 н. до ДБС |
| B | RB69 | непосредственно перед ДБС | 5–6 н. до ДБС | непосредственно перед ДБС |
| B | T4 | непосредственно перед ДБС | не вытесняет цепь. 3′→5′ расщепление | не вытесняет цепь. 3′→5′ расщепление |
| B | *Pfu* | 4 н. до ДБС | не вытесняет цепь[1] | не вытесняет цепь |
| X | POLβ | 4–5 н. до ДБС | 3–4 н. до ДБС | 4–5 н. до ДБС |
| X | POLλ | 3 н. до ДБС | 8 н. до ДБС | 8 н. до ДБС |
| Y | Dpo4 | непосредственно перед ДБС | слабо вытесняет цепь[2] | слабо вытесняет цепь |
| Y | POLκ | 4 н. до ДБС | слабо вытесняет цепь | слабо вытесняет цепь[3] |

[1]Не вытесняет впереди лежащую цепь: включение одного нуклеотида при заполнении бреши без дальнейшего продолжения синтеза на неповрежденном контрольном субстрате

[2]Слабо вытесняет впереди лежащую цепь: включение 3–4 нуклеотидов без дальнейшего продолжения синтеза ДНК на неповрежденном контрольном субстрате

[3]Для POLκ наблюдалось крайне ограниченное продвижение до 2–3 н. до ДБС.

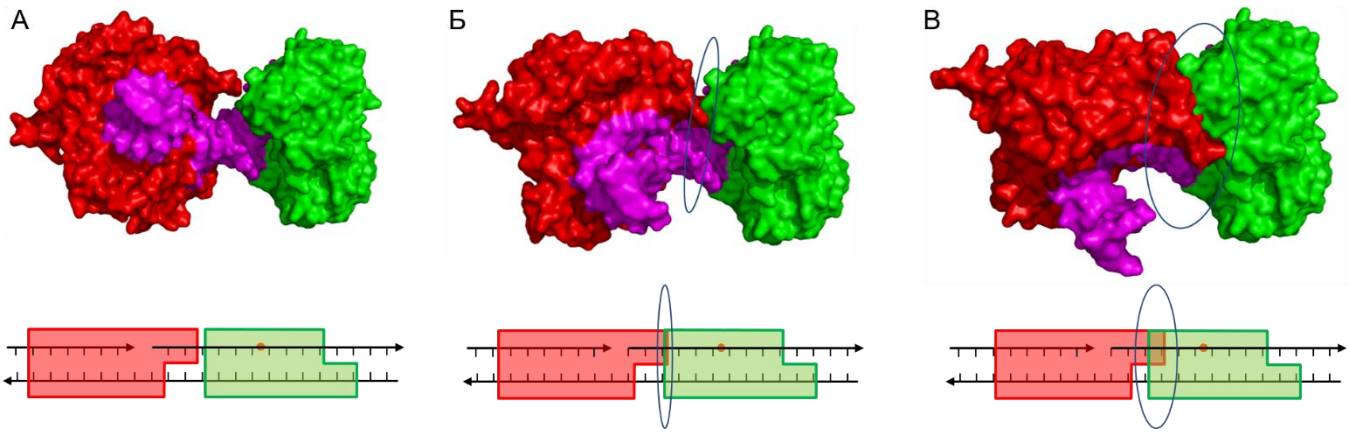


**Рисунок 26.** ДНК-опосредованный докинг ДНК-полимеразы β и Fpg. А — стадия, соответствующая стадии «kiss» при анализе белковых футпринтов. Поверхности белков находятся на небольшом расстоянии, но не соприкасаются. Б — стадия «kiss». Поверхности белковых глобул контактируют. В — начало стадии «push». Перекрывание поверхностей белковых глобул. Из структур белков видно, что даже сдвиг ДНК-полимеразы на +1 н. после стадии «kiss» приводит к значительному искажению белковых глобул. POLβ показана красным, Fpg — зеленым, ДНК — розовым, синий овал показывает область перекрывания белковых глобул (структура POLβ — 2FMP, структура Fpg — 1K82, струткура ДНК получена с импользованием программы 3DNA).

Ни одна из исследованных ДНК-полимераз не была способна пройти ДНК-белковую сшивку. Это вполне ожидаемо в случае, когда ДБС находится в матричной цепи, так как сшитый белок настолько велик, что его невозможно разместить в активном центре даже ДНК-полимераз семейства Y, и он не позволяет выпетливать матрицу для возобновления синтеза после ДБС. Также вклад в остановку ДНК-полимераз могло бы вносить отсутствие основания в матрице в сайте сшивки, хотя АП-сайты преодолеваются многими ДНК-полимеразами семейств A, B, X и Y [327–329]. Более того, сравнение результатов, полученных на субстратах, содержащих ДБС в оц- и дц-матрице, позволяет сделать вывод, что вытесняемая цепь препятствует продвижению ДНК-полимераз вблизи такого объемного аддукта.

Более интересен вопрос о том, почему ДНК-полимеразы, способные вытеснять запирающий праймер, не могут синтезировать полноразмерный продукт. К сожалению, на сегодняшний день не существует рентгеновских структур комплексов ДНК-полимераз, вытесняющих впереди лежащую цепь. В компьютерной модели вытеснения цепи ДНК-полимеразой бактериофага φ29, принадлежащей семейству B [318,330], вытесняемая цепь практически не формирует контактов с белком. По всей видимости, ДБС настолько велики, что мешают вытесняемой цепи каким-то образом продвигаться относительно ДНК-полимеразы вдоль, либо искажают структуру ДНК так сильно, что ДНК-полимераза не может поместить неповрежденную матрицу в свой активный центр.

В целом очевидно, что ДБС действительно представляют собой практически непреодолимое препятствие для ДНК-полимераз, поэтому такие повреждения должны подвергаться репарации для возможности дальшейней репликации. Репарация ДБС требует

наличия специфических протеаз, например Wss1 дрожжей и SPRTN животных, которые расщепляют сшитый белок до небольшого пептида [171,173,331,332]. Биаллельная мутация в гене *SPRTN* вызывает синдром Рёйс–Алфс — наследственное заболевание, характеризующееся прогероидным фенотипом, ранним развитием рака, гиперчувствительностью к повреждениям ДНК в S-фазе, что, как принято считать, связано с накоплением неотрепарированных ковалентных комплексов топоизомеразы I с ДНК [333–335]. Деформация ковалентно сшитого белка ДНК-полимеразой может вызывать экспозицию на поверхности белка пептидов, ранее скрытых внутри белковой глобулы. Остается открытым вопрос, может ли такая деформация запускать внутриядерную ветвь клеточного ответа на неправильно свернутые белки [336]. В контексте репликации остановка репликативной вилки может инициироваться при взаимодействии ДНК-геликаз с ДБС, что предотвращало бы столкновение с ними ДНК-полимераз. Что касается репаративного синтеза ДНК, то ДНК-полимеразы семейства X останавливаются за 4–5 н. до ДБС. Поэтому репарация кластерных повреждений ДНК, в которых ДБС расположена рядом с модифицированным основанием, АП-сайтом или ОЦР — типичными повреждениями, репарируемыми с участием POLβ и POLλ [337] — будет затруднена. Все эти процессы заслуживают дальнейшего изучения, а ДБС с Fpg, использованная в данной работе, дает удобную модель, которая может быть легко получена *in vitro* и включена в плазмиды для экспериментов в живых клетках.

## *4.2. Взаимодействие белков, движущихся по ДНК, с белками, прочно нековалентно связанными с ДНК*

Геномная ДНК всегда связана с множеством структурных, регуляторных и каталитических белков. Аффинность комплексов белок-ДНК варьирует в широких пределах, причем многие белки демонстрируют очень высокое сродство к ДНК. В клетках млекопитающих среди таких белков больше всего структурных компонентов хроматина, участвующих в упаковке ДНК и ее пространственной организации: это гистоны, ядерные негистоновые белки группы HMG (high-mobility group proteins), белки ядерного матрикса и т. п. В то же время известно, что очень многие белки, специфично связывающиеся с определенными сайтами или структурными элементами ДНК, ищут свои мишени, сочетая диффузию в трехмерном пространстве и одномерную диффузию по контуру ДНК [223]. Практически не изучен вопрос о том, как будут вести себя белки, перемещающиеся по контуру ДНК, при столкновении с препятствиями в виде прочно связанных белков. Такая же проблема встает и при матричном синтезе нуклеиновых кислот ДНК- и РНК-полимеразами. При этом достаточно логично будет предположить, что способность пассивно диффундирующих белков преодолевать такие препятствия будет зависеть как от относительного сродства обоих полипептидов к ДНК, так и от их коэффициентов одномерной

диффузии (Рисунок 27) [338]. В случае же активного перемещения с затратой энергии, как происходит при матричном синтезе, способность вытеснять другие белки должна быть выше. Как и для ДНК-белковых сшивок, разнообразная природа белков, прочно связанных с ДНК, наталкивает на мысль, что какие-то специфичные системы удаления «препятствий» могут существовать только для некоторых из них (например, для нуклеосом, см. разд. 2.1.5), а в большинстве случаев будет иметь место универсальный механизм взаимодействия между белками.

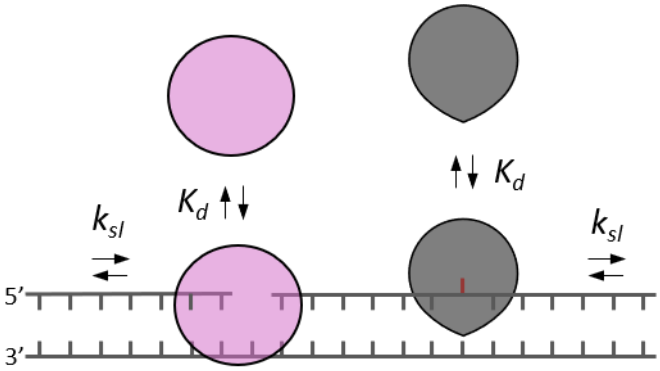


**Рисунок 27.** Кинетическая схема конкуренции белков за сайты связывания в ДНК при одномерной диффузии. $K_d$ — константа диссоциации, $k_{sl}$ — константа слайдинга. Розовым схематично обозначена ДНК-полимераза, серым — ДНК-гликозилаза.

Для исследования взаимодействий между нековалентными прочно связанными белками и белками, которые передвигаются по ДНК по разным механизмам, в качестве связанных белков-«препятствий» были использованы ДНК-гликозилазы OGG1 и NEIL1 и нуклеаза адаптивного иммунитета бактерий Cas9 *Streptococcus pyogenes*, обладающие разным сродством к определенным сайтам в ДНК. И белки, перемещающиеся по ДНК (ДНК-полимеразы и белок D4 — часть фактора процессивности вируса осповакцины), и белки, нековалентно связанные с ДНК, происходят из нескольких разных видов, что позволило изучить и потенциально специфичныее, и биоортогональные взаимодействия.

### *4.2.1. Взаимодействие белков, движущихся по ДНК, с медленнообращающейся ДНК-гликозилазой OGG1*

В первую очередь было изучено взаимодействие OGG1 и фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I. Поскольку эти белки происходят из совершенно разных видов и специфичные взаимодействия между ними маловероятны, такую систему можно рассматривать как модельную для изучения универсального процесса прохождения ДНК-полимеразами нековалентных ДНК-белковых комплексов. После удаления 8-oxoGua из ДНК, OGG1 остается прочно связанным с

продуктом — АП-сайтом; по литературным данным, характерное время существования этого комплекса составляет около 17 мин ($k_{off}$ = 6,8×10$^{-4}$ с$^{-1}$) [196].

В ходе реакции OGG1 инкубировали в течение 2 мин с избытком немеченого субстрата (конструкции Gp-pri~Down1//Temp1_oG или Gp-pri~Down1_oG//Temp1, «первичный субстрат») для максимально полного связывания ДНК-гликозилазы. После этого в реакционную смесь добавляли меченый субстрат («вторичный субстрат») и KF. Вторичный субстрат представлял собой двуцепочечный олигонуклеотид (23oG*//C) с тупыми концами и, таким образом, должен был связывать только OGG1, а связывание KF с таким субстратом возможно только неспецифически за счет общего сродства ДНК-полимераз к дцДНК (Рисунок 28).

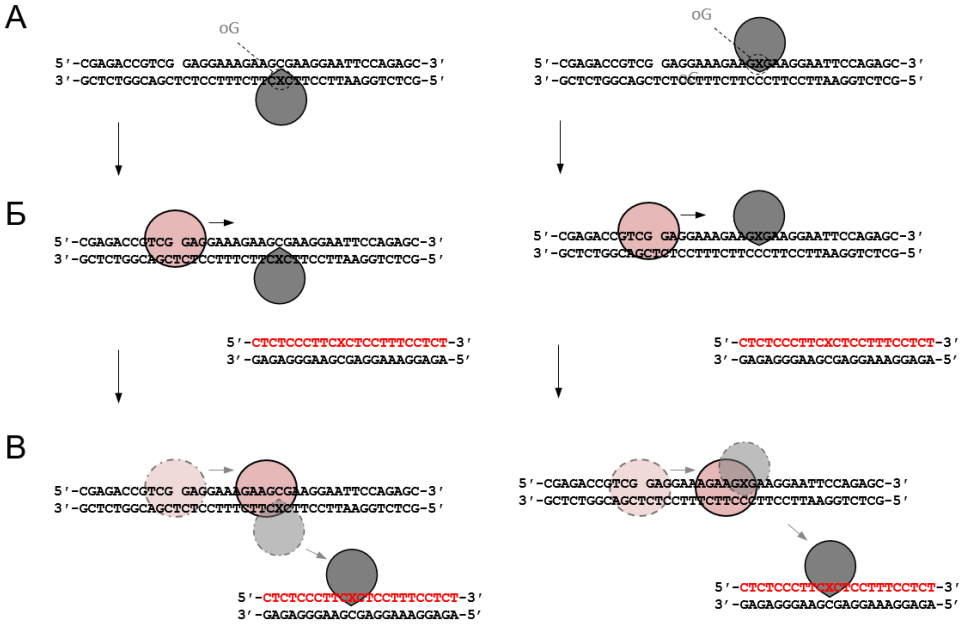


**Рисунок 28.** Схема эксперимента по вытеснению прочно связанного с ДНК белка OGG1 ДНК-полимеразой. Слева приведена реакция для первичного субстрата, содержащего прочно связанный с ДНК белок в матричной цепи, справа — для первичного субстрата, содержащего прочно связанный белок в запирающем праймере. Серым схематично изображен OGG1, розовым — ДНК-полимераза. А — этап связывания медленнообращающегося белка с первичным субстратом и образования комплекса с ДНК. Б — добавление в реакцию ДНК-полимеразы и вторичного субстрата, связывание ДНК-полимеразы с праймером и начало элонгации. В — по ходу синтеза ДНК-полимераза сталкивается с прочно связанным с ДНК белком и вытесняет его, OGG1 связывается со вторичным субстратом, расщепление которого детектируется электрофоретически.

В случае, если ДНК-полимераза может вытеснять OGG1 из комплекса с продуктом, то при добавлении KF к немеченому субстрату, состоящему из матрицы, праймера и запирающего праймера, который был предварительно инкубирован с OGG1, вытесненный фермент будет расщеплять меченый субстрат, и должно наблюдаться ускорение расщепления. Действительно, в присутствии фрагмента Кленова имело место повышенное расщепление меченого субстрата ДНК-гликозилазой OGG1 (Рисунок 29). Наличие ДНК-полимеразы в реакционной смеси увеличивало количество продукта в 2 и более раз как при наличии 8-oxoGua в матричной цепи,

так и в запирающем праймере. Это позволяет сделать вывод о том, что фрагмент Кленова способен вытеснять ДНК-гликозилазу OGG1 из комплекса с ДНК. В отсутствие dNTP статистически значимого усиления расщепления не наблюдалось, что говорит о неспособности KF вытеснять OGG1 за счет одномерной диффузии. В отсутствие ДНК-полимеразы наличие в реакционной смеси dNTP в концентрации 0,5 мМ, использованной в экспериментах, никак не влияло на активность OGG1 (данные не приведены).

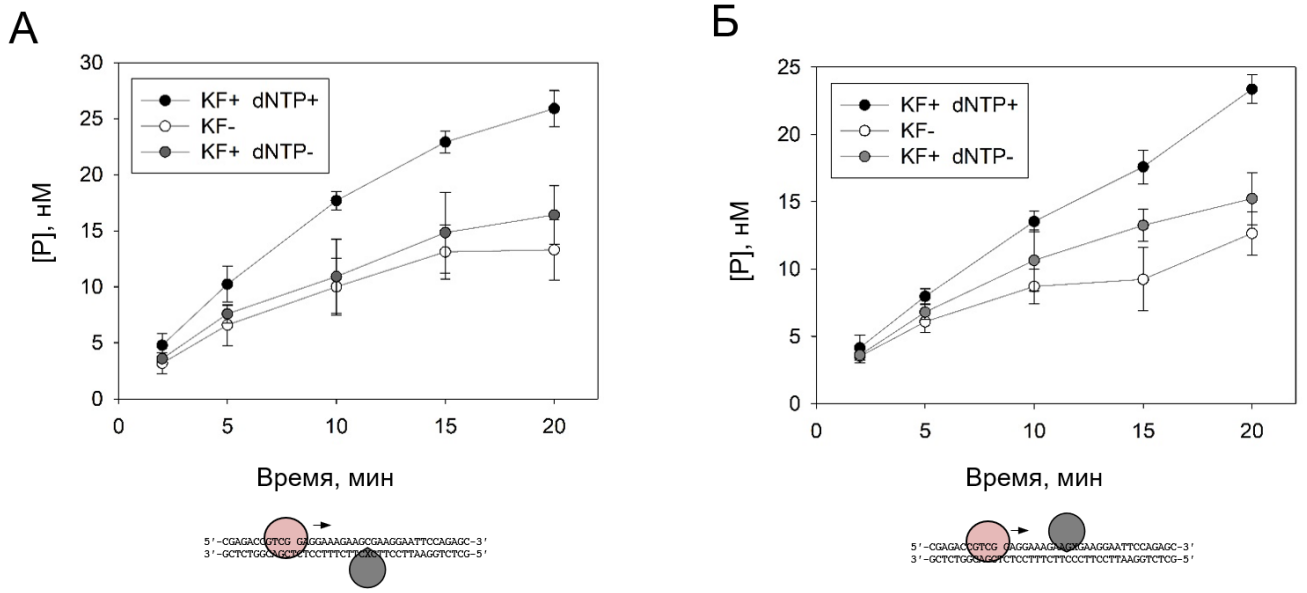


**Рисунок 29**. Вытеснение OGG1 фрагментом Кленова. Приведена зависимость концентрации продукта расщепления вторичного субстрата ДНК-гликозилазой OGG1 в присутствии KF от времени в случае использования в качестве немеченого субстрата конструкции Gp-pri~Down1//Temp1_oG (А) или конструкции Gp-pri~Down1_oG//Temp1 (Б). Белые кружки — реакция в отсутствие KF, серые кружки — реакция в присутствии KF, но без dNTP, черные кружки — реакция в присутствии KF и смеси dNTP.

Аналогичная серия экспериментов была проведена с OGG1 человека и ДНК-полимеразой β человека. В присутствии POLβ накопление продукта также увеличивалось в 2 и более раз как при наличии oxoGua в матричной цепи (данные не приведены), так и в запирающем праймере (Рисунок 30А), что свидетельствует о стимуляции ДНК-гликозилазы OGG1 ДНК-полимеразой β. Таким образом, способность ДНК-полимеразы вытеснять ДНК-гликозилазу OGG1 из прочного нековалентного комплекса с ДНК была показана и для ферментов, происходящих из одного вида. Однако результаты в случае POLβ отличались от результатов, полученных с KF: наличие в смеси POLβ даже без dNTP, то есть в отсутствие полимеразной реакции, приводило к заметной стимуляции OGG1 (Рисунок 30А, средняя кривая). При этом присутствие или отсутствие POLβ в том случае, когда в смеси находился только субстрат для гликозилазной реакции, не влияло на активность OGG1 (Рисунок 30Б). Возможно, POLβ специфично связывается с брешью в ДНК и, не получая субстратов dNTP, может ограниченно диффундировать по контуру ДНК, вытесняя

молекулу OGG1. В таком случае образование специфичных взаимодействий между POLβ и OGG1 могло бы облегчать вытеснение ДНК-гликозилазы.

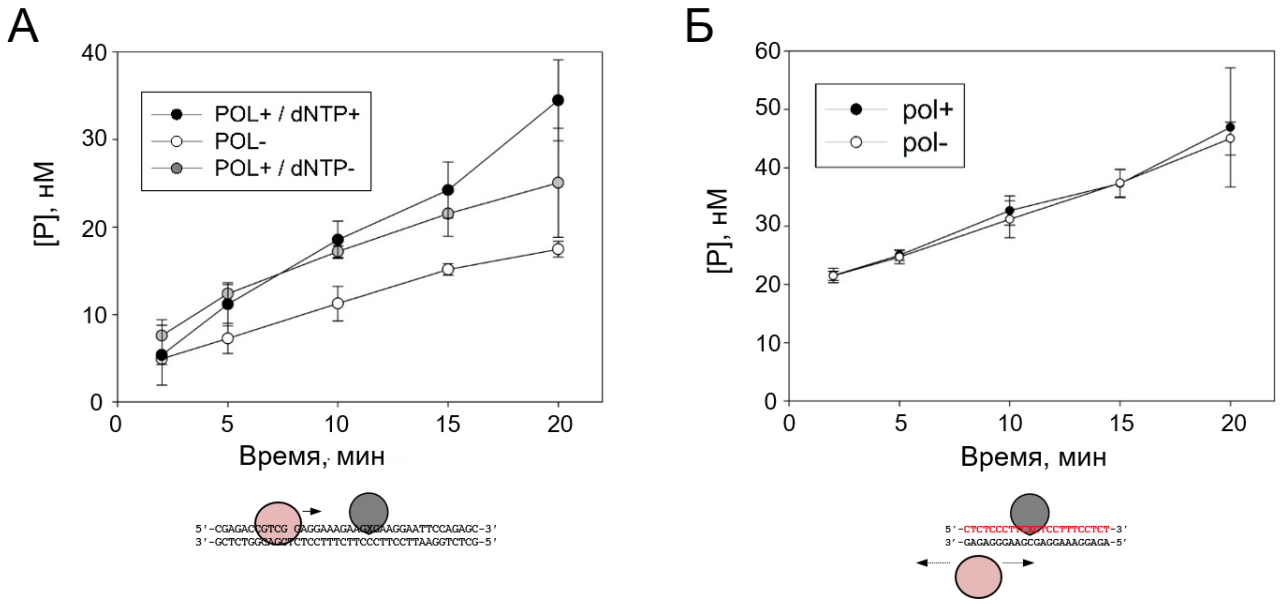


**Рисунок 30**. Вытеснение OGG1 ДНК-полимеразой β. А — зависимость концентрации продукта расщепления вторичного субстрата ДНК-гликозилазой OGG1 в присутствии ДНК-полимеразы β от времени в случае использования в качестве первичного субстрата конструкции Gp-pri~Down1_oG//Temp1. Белые кружки — реакция в отсутствие POLβ; серые кружки — реакция в присутствии POLβ, но без смеси dNTP; черные кружки — реакция в присутствии POLβ и смеси dNTP. Б — зависимость концентрации продукта расщепления субстрата 23oG*//compC (вторичного субстрата, первичный субстрат отсутствует) ДНК-гликозилазой OGG1 от времени в присутствии и в отсутствие POLβ. Белые кружки — реакция в отсутствие POLβ, черные кружки — реакция в присутствии POLβ и смеси dNTP.

Для проверки этой гипотезы был проведен молекулярный докинг структур ДНК-полимераз (KF и POLβ) и OGG1 с использованием программного пакета GRAMM-X. Для каждой пары структур было идентифицировано по 10 моделей с максимальной энергией взаимодействия. Среди моделей, идентифицированных для пары KF–OGG1, не было найдено выгодной структуры докинга, где ДНК-связывающие бороздки ферментов были бы ориентированы в одну сторону, что позволило бы им взаимодействовать с ДНК одновременно. Однако для пары OGG1–POLβ такая структура была обнаружена (Рисунок 31). Площадь взаимодействия между OGG1 и POLβ в этой структуре составляет 1308 Å$^2$, что сравнимо с рассчитанной площадью контакта OGG1 с ДНК (1097 Å$^2$) и POLβ с ДНК (1524 Å$^2$). Возможно, POLβ стимулирует распад прочного комплекса OGG1 с ДНК не просто за счет механического вытеснения при движении полимеразы, сопряженном с синтезом ДНК (как это, по-видимому, происходит в случае пары KF–OGG1), а за счет непосредственных белок-белковых взаимодействий.

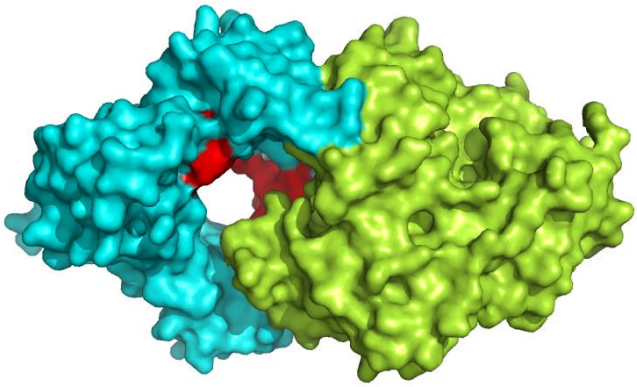

**Рисунок 31**. Модель взаимодействия POLβ и OGG1, полученная на основании молекулярного докинга. POLβ обозначена голубым, OGG1 обозначена зеленым, красным обозначена ДНК-связывающая бороздка для обоих ферментом.

ДНК-полимеразы представляют собой биологические машины, которые движутся по ДНК с затратой энергии, предоставляемой при гидролизе dNTP, и обладают разной процессивностью синтеза. Так как в рамках работы ставился вопрос, как ферменты, перемещающиеся по ДНК, сталкивают белки–«препятствия», было необходимо продемонстрировать элонгацию праймера ДНК-полимеразами KF и POLβ на матрицах, содержащих прочно связанный белок. Для проверки наличия полимеразной реакции в условиях эксперимента, позволяющей полимеразе двигаться по ДНК и сталкивать «препятствие» в виде OGG1, была проведена серия экспериментов в условиях, описанных выше, но с одновременной визуализацией обоих используемых в эксперименте субстратов. В конструкции Gp-pri$^{FAM}$~Down1_oG//Temp1, которая представляет собой первичный субстрат OGG1 и субстрат для ДНК-полимеразы, праймер содержал флюоресцентную метку FAM, которая давала возможность наблюдать за его элонгацией. Ферментативная активность OGG1 в то же время контролировалась, как описано выше — наблюдением расщепления радиоактивно меченого вторичного субстрата 23oG*//C (Рисунок 32). Также реакции для обеих ДНК-полимераз были проведены с радиоактивно меченым субстратом Gp-pri$^{*}$~Down1_oG//Temp1 и несущем флуоресцентную метку субстратом 23oG$^{FAM}$//C. Аналогичные серии экспериментов с визуализацией и первичного и вторичного субстратов для обоих изученных ДНК-полимераз были приведены с использованием конструкции, в которой OGG1 связывается с матричной цепью (Gp-pri$^{FAM}$~Down1//Temp1_oG и 23oG*//C или Gp-pri$^{*}$~Down1 //Temp1_oG и 23oG$^{FAM}$//C) (данные не приведены). Визуализация обоих субстратов позволила показать наличие активности ДНК-полимераз, что подтвердило работоспособность модели вытеснения ими прочно связанных белков.

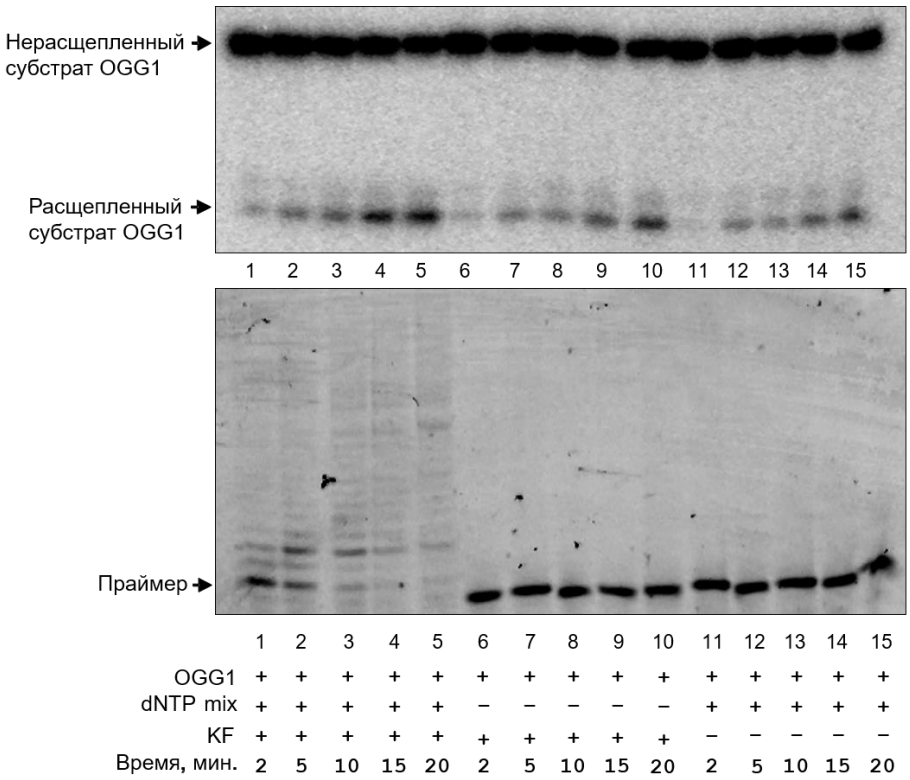


**Рисунок 32.** Визуализация полиакриламидного геля после разделения продуктов реакции расщепления ДНК-гликозилазой OGG1 в присутствии KF и реакции полимеризации ДНК KF в присутствии OGG1. Верхняя панель — радиоавтограф геля, визуализация продуктов реакции расщепления радиоактивно меченого вторичного субстрата 23oG*//C ДНК-гликозилазой OGG1. Нижняя панель — флуоресцентное сканирование того же геля, визуализация продуктов реакции элонгации флуоресцентно меченого праймера, входящего в первичный субстрат Gp-pri$^{FAM}$~Down1//Temp1_oG. Дорожки 1–5 — с KF и со смесью dNTP; дорожки 6–10 — с KF, но без смеси dNTP; дорожки 11–15 — в отсутствие KF и смеси dNTP. Время реакции приведено на рисунке.

Далее был определен тип продукта, образуемого OGG1 в описанных выше условиях, на первичном субстрате при вытеснении ДНК-полимеразами. Для этого был проведен эксперимент по аналогичной схеме, однако в данном случае, визуализировался уже запирающий праймер или матрица, в которых располагался остаток 8-oxoGua (субстраты Gp-pri~Down1_oG*//Temp1 и Gp-pri~Down1_oG//Temp1_oG*). На конструкции, в которой OGG1 связывается с 8-oxoGua в матричной цепи, при вытеснении OGG1 ДНК-полимеразой β в присутствии смеси dNTP, а также в отсутствие POLβ наблюдался преимущественно продукт β-элиминирования (Рисунок 33А). Интересно, что в присутствии ДНК-полимеразы, но в отсутствии dNTP наблюдались продукты β/δ-элиминирования (Рисунок 33А). Аналогично на модельном субстрате, в котором OGG1 находится в запирающем праймере, наблюдалось значительное (25–50%) смещение образования продукта в сторону β/δ-элиминирования, но лишь в реакции с POLβ в отсутствии dNTP смеси, в то время как в присутствии всех компонентов, необходимых для полимеразной реакции, тип продукта не изменялся (данные не приведены). Аналогичная картина образования продукта

OGG1 наблюдалась при вытеснении OGG1 из комплекса с первичным субстратом ДНК-полимеразой KF (Рисунок 33Б).

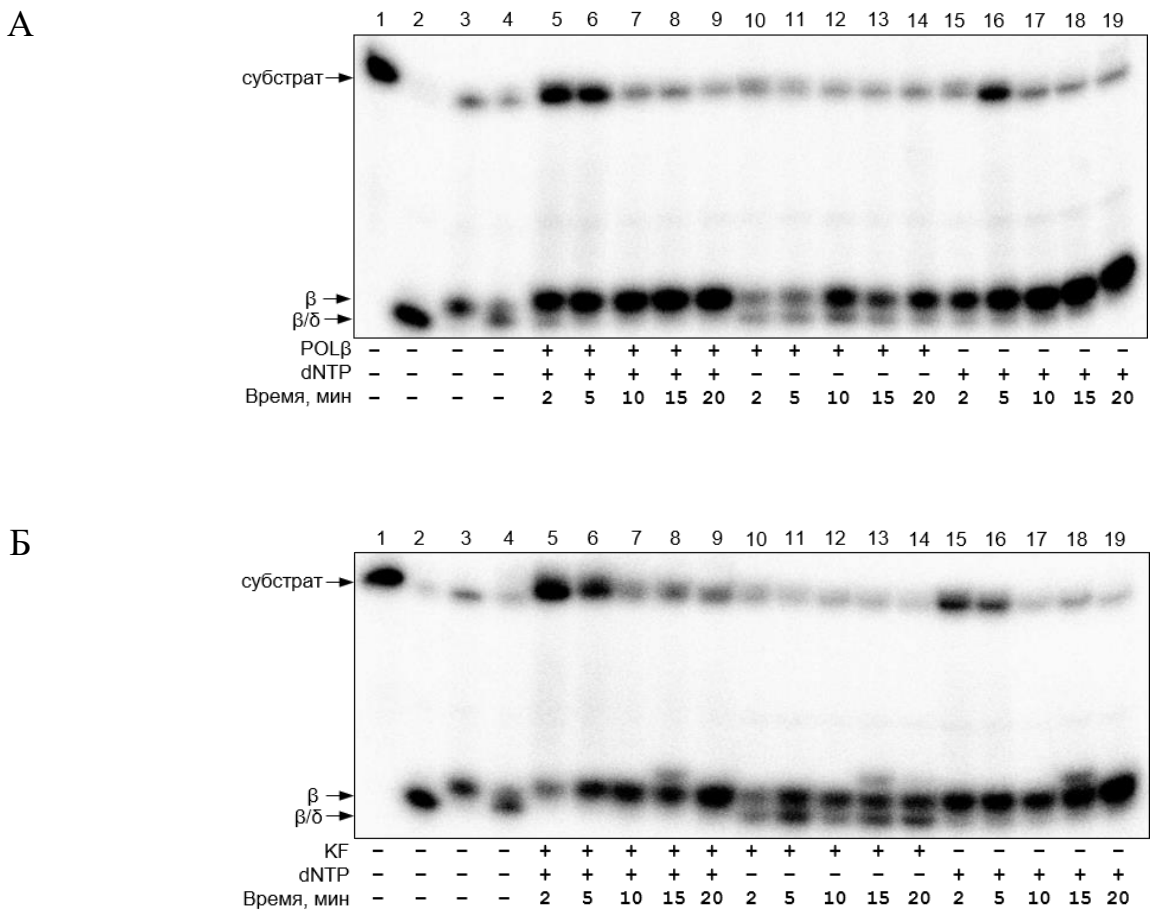


**Рисунок 33.** Радиоавтографы полиакриламидных гелей после разделения продуктов реакции расщепления ДНК гликозилазой OGG1 радиоактивномеченого субстрата вида Gp-pri~Down1//Temp1_oG* в присутствие ДНК-полимеразы β (А) и в присутствии ДНК-полимеразы KF (Б). Нумерация на панелях А и Б общая: дорожка 1 — субстрат без ферментов; дорожка 2 — субстрат, обработанный ДНК-гликозилазой Fpg и продукт, соответствующий β/δ-элиминированию; дорожка 3 — субстрат, обработанный ДНК-гликозилазой OGG1 и продукт, соответствующий β-элиминированию; дорожка 4 — субстрат, обработанный совместно ДНК-гликозилазой OGG1 и АП-эндонуклеазой APEX1; дорожки 5–9 — расщепление субстрата OGG1 в присутствии ДНК-полимеразы и смеси dNTP; дорожки 10–14 — расщепление субстрата OGG1 в присутствии ДНК-полимеразы, но без смеси dNTP; дорожки 15–19 — расщепление субстрата OGG1 в отсутствии ДНК-полимеразы. Время реакции приведено на рисунке.

По всей видимости, ДНК-полимеразы могут взаимодействовать с OGG1 по двум механизмам. Вытеснение OGG1 в ходе реакции элонгации праймера, скорее всего, обусловлено механическим выталкиванием OGG1 полимеразой из комплекса с ДНК и протекает независимо от ориентации OGG1 на субстрате. Возможно, как и в случае взаимодействия с ДБС, при этом происходит частичная деформация белковой глобулы OGG1, облегчающая его диссоциацию из комплекса с ДНК. В отсутствие же dNTP вытеснение должно идти в ходе одномерной диффузии ДНК-полимеразы по ДНК, в ходе которой ориентация полимеразы на ДНК может не совпадать с ее ориентацией при элонгации праймера, и ее взаимодействия с OGG1 осуществляются через

другие участки поверхности белков. После гидролиза *N*-гликозидной связи фермент OGG1 достаточно долгое время остается ковалентно связанным с ДНК через основание Шиффа, и можно предположить, что взаимодействие с ДНК-полимеразами через некоторые участки OGG1, может ускорять элиминирование фосфатных групп с 5′- и 3′-сторон от дезоксинуклеозида oxodGuo. Более того, поскольку в ходе нормальной ЭРО происходит вытеснение OGG1 АП-эндонуклеазой APEX1 [190,191,193], долгое существование комплекса OGG1 с продуктом может быть сигналом о недостаточности APEX1, а усиление β/δ-элиминирования следующим ферментом в пути ЭРО, POLβ, будет сдвигать репарацию в сторону APEX1-независимой, PNKP-зависимой ветви ЭРО [59].

Способность ДНК-полимераз вытеснять OGG1 при пассивной диффузии вызывает вопрос о том, могут ли другие белки, перемещающиеся по контуру ДНК, делать это же. Поэтому в той же экспериментальной системе был исследован другой белок — урацил-ДНК-гликозилаза (vvUNG, также известная как белок D4) вируса осповакцины, которая, помимо ферментативной активности, выполняет функцию фактора процессивности вирусной ДНК-полимеразы. В отличие от ДНК-полимераз, vvUNG движется по ДНК только путем диффузии без затраты энергии [339]. Оказалось, что белок vvUNG способен вытеснять OGG1 из комплекса с ДНК с высокой эффективностью — реакция ускорялась более чем в 2 раза (Рисунок 34).

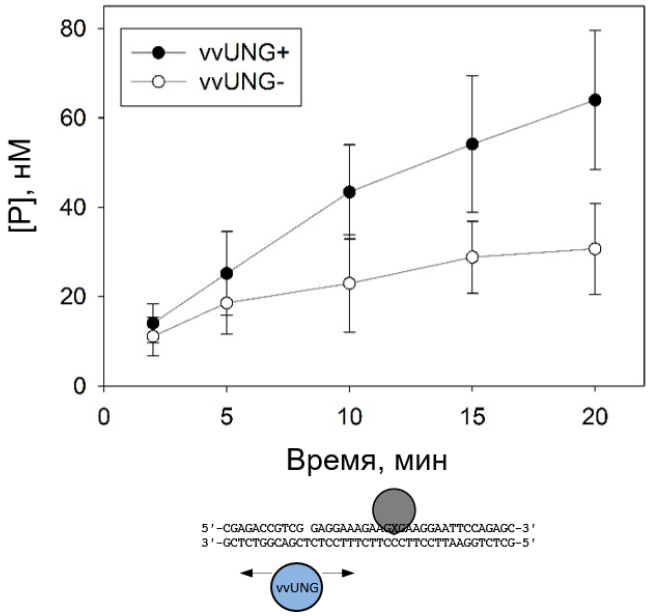


**Рисунок 34.** Вытеснение OGG1 ДНК-гликозилазой vvUNG. График зависимости концентрации продукта реакции расщепления вторичного субстрата ДНК-гликозилазой OGG1 в присутствии vvUNG от времени в случае использования в качестве немеченого субстрата конструкции Gp-pri~Down1_oG//Temp1. Белые кружки — реакция в отсутствие vvUNG; черные кружки — реакция в присутствии vvUNG.

Таким образом, как белки, активно передвигающиеся по ДНК с затратой энергии (KF, POLβ), так и пассивно диффундирующие по контуру (vvUNG), способны вытеснять из комплекса

с ДНК прочно связанный белок OGG1. Остается, однако, открытым вопрос, специфичны ли обнаруженные взаимодействия для OGG1 или отражают более универсальные аспекты белок-белковых взаимодействий на ДНК. Для ответа на этот вопрос была исследована способность KF, POLβ и vvUNG вытеснять другие белки.

### *4.2.2. Взаимодействие белков, движущихся по ДНК, с ДНК-гликозилазой NEIL1*

Бифункциональная ДНК-гликозилаза с ассоциированной АП-лиазной активностью NEIL1 гомологична эндонуклеазе VIII *E. coli* (Nei) и катализирует реакции β/δ-элиминирования. Как и фермент OGG1, ДНК-гликозилаза NEIL1 после удаления поврежденного основания остается связанной в виде основания Шиффа с АП-продуктом реакции, однако характерное время существования такого комплекса составляет 10–15 с [340]. При этом оба белка происходят из одного вида и обладают близкой молекулярной массой: 41,2 кДа у OGG1 и 43,7 кДа у NEIL1.

Так как NEIL1 проявляет специфичность к окисленным пиримидиновым основаниям и к АП-сайтам, экспериментальная схема была аналогична описанной выше, однако субстраты были адаптированы с учетов субстратной специфичности фермента NEIL1: первичный субстрат содержал АП-сайт, а способность POLβ вытеснять NEIL1 из комплекса с ДНК измерялась по количеству расщепленного вторичного субстрата, содержащего гидроксиурацил 5-OH-Ura [341].

POLβ оказалась способна вытеснять NEIL1 из комплекса с ДНК еще более эффективно, чем OGG1 — наблюдалась стимуляция фермента NEIL1 приблизительно в 3 раза на обоих модельных субстратах (Рисунок 35). При этом даже в отсутствии полимеразной реакции, наблюдалась эквивалентная способность POLβ вытеснять NEIL1. Белок vvUNG стимулировал накопление продукта расщепления вторичного субстрата примерно в такой же степени, что и для OGG1 (данные не приведены). Таким образом, белок NEIL1, менее прочно связанный с ДНК, легко вытесняется другими белками даже при пассивной диффузии.

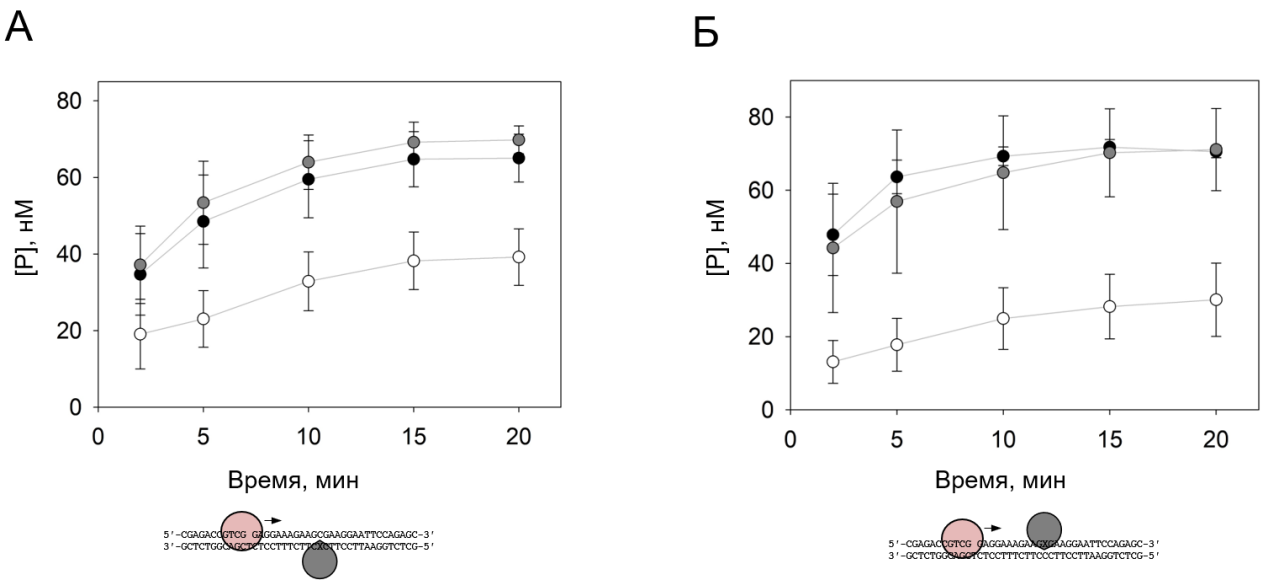


**Рисунок 35.** Вытеснение NEIL1 ДНК-полимеразой β. А — зависимость концентрации продукта расщепления вторичного субстрата ДНК-гликозилазой NEIL1 в присутствии ДНК-полимеразы β от времени в случае использования в качестве первичного субстрата конструкции Gp-pri~Down1//Temp1_AP. Б — зависимость концентрации продукта расщепления вторичного субстрата ДНК-гликозилазой NEIL1 в присутствии ДНК-полимеразы β от времени в случае использования в качестве первичного субстрата конструкции Gp-pri~Down1_AP//Temp1. Для всех панелей: белые кружки — реакция в отсутствие POLβ; серые кружки — реакция в присутствии POLβ, но без смеси dNTP; черные кружки — реакция в присутствии POLβ и смеси dNTP.

### *4.2.3. Взаимодействие белков, движущихся по ДНК, с медленнообращающейся ДНК-нуклеазой Cas9*

ДНК-нуклеаза Cas9 *Streptococcus pyogenes* после образования ДЦР образует экстремально стабильный комплекс с ДНК-продуктом, время полураспада которого составляет 43-91 ч [183]. Для изучения способности ДНК-полимераз вытеснять такой объемный белок (молекулярная масса 158,6 кДа) из прочного комплекса с ДНК, была проведена серия экспериментов по схожей методике, но с использованием других субстратов. Cas9 можно назвать биоортогональным белком для клетки человека — в норме ничего похожего на него не встречается в клетке человека, и он, очевидно, не может специфически взаимодействовать с ее компонентами. С другой стороны, из-за широкого использования Cas9 как инструмент геномного редактирования представляет интерес информация о том, как клеточные системы человека реагируют на него.

Для дизайна модельных конструкций, необходимо было включить в ДНК все необходимые для проявления активности Cas9 элементы: протоспейсер, комплементарный sgРНК, и PAM-последовательность (разд. 2.1.5.2). Кроме того, вследствие наличия протяженного участка узнавания субстрата Cas9 и большого размера самой нуклеазы, длина субстрата была увеличена, чтобы обеспечить беспрепятственное связывание ДНК-полимераз с праймером и начало синтеза.

В стандартном эксперименте при исследовании активности Cas9 белок используется в большом избытке [342]. Напротив, для анализа вытеснения необходимо, чтобы весь Cas9 был в комплексе с первичным субстратом. В отличие от белков OGG1 и NEIL1, сложная сборка комплекса и необходимость ассоциации с направляющей РНК не дает предсказать точное количество активного Cas9 в реакции, поэтому для наиболее полного его связывания с ДНК необходимо было взять минимальное соотношение Cas9 к субстрату, при котором можно получить детектируемое и воспроизводимое расщепление ДНК. Для оптимизации условий реакции были проверены несколько молярных соотношений Cas9:субстрат — 20%, 40%, 60%, 80% и 100%, и было выбрано соотношение 80% Cas9 к ДНК и временной интервал от 2 до 60 мин.

В ходе реакции в первую очередь инкубировали Cas9 с направляющей РНК. Затем полученный рибонуклеопротеиновый комплекс инкубировали в течение 2 мин с немеченым первичным субстратом (Gp-pri~Down_psp_targ//Temp_psp_nontarg) для связывания нуклеазы с ДНК. Далее к комплексу Cas9-ДНК добавляли меченый вторичный субстрат (35 targ*//35 nontarg) и ДНК-полимеразу (Рисунок 36). По степени расщепления Cas9 вторичного субстрата в присутствии и отсутсвие ДНК-полимеразы судили о взаимодействии ДНК-полимераз с Cas9 и их способности вытеснять медленообращающийся белок из комплекса с ДНК.

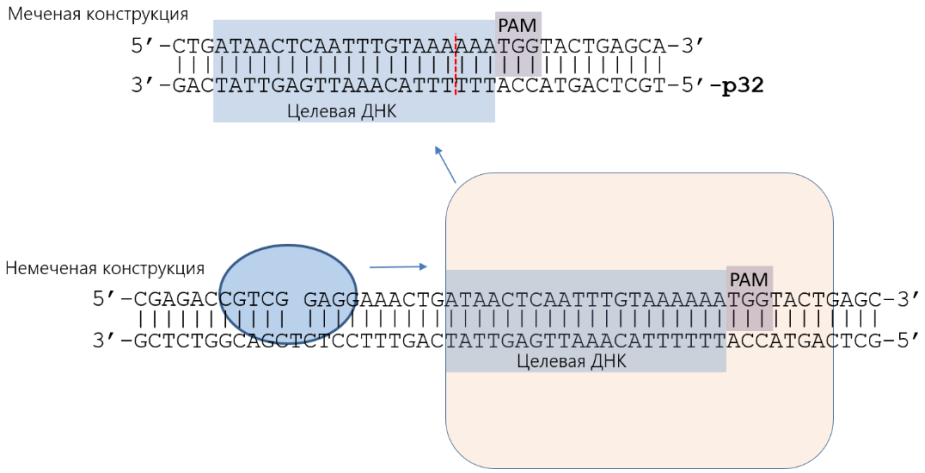


**Рисунок 36.** Схематичное изображение субстратов для Cas9. Немеченая конструкция Gp-pri~Down_psp_targ//Temp_psp_nontarg содержит праймер, матрицу и запирающей праймер; меченый субстрат с тупыми концами — 35 targ*//35nontarg. Область протостейсера обозначена светло-голубым. ДНК-полимераза обозначена голубым. Cas9 обозначен светло-желтым.

Описанный эксперимент был проведен с Cas9 и ДНК-полимеразой β. Хотя в условиях избытка субстрата над Cas9 наблюдаемое расщепление невелико, что совпадает с литературными данными [183], в присутствии POLβ накопление продукта статистически значимо увеличивалось (Рисунок 37А), что позволяет вывод о вытеснении Cas9 ДНК-полимеразой β. При этом сопоставимо выраженная стимуляция наблюдалась и в случае отсутствия в смеси полимеразной реакции dNTP (данные не представлены). Наблюдаемая стимуляция говорит о том, что, хотя

ДНК-полимераза β человека вряд ли может специфически взаимодействовать с Cas9 из *S. pyogenes*, она способна вытеснять белок Cas9 из прочного комплекса с ДНК.

Аналогичные эксперименты были проведены при использовании KF и ДНК-полимеразы бактериофага RB69 (Рисунок 37Б, Рисунок 37В). В отличие от POLβ, присутствие KF не влияло на эффективность расщепления вторичного субстрата нуклеазой Cas9 (Рисунок 37Б). Присутствие ДНК-полимеразы RB69 также не приводило к увеличению расщепления вторичного субстрата и даже несколько снижало его (Рисунок 37В). При этом влияние ДНК-полимеразы RB69 на активность Cas9, измеренное с использованием плазмиды, несущей протоспейсер, также было нейтральным или несколько негативным (Рисунок 37Г), что говорит о неспособности полимеразы увеличивать число оборотов нуклеазы Cas9.

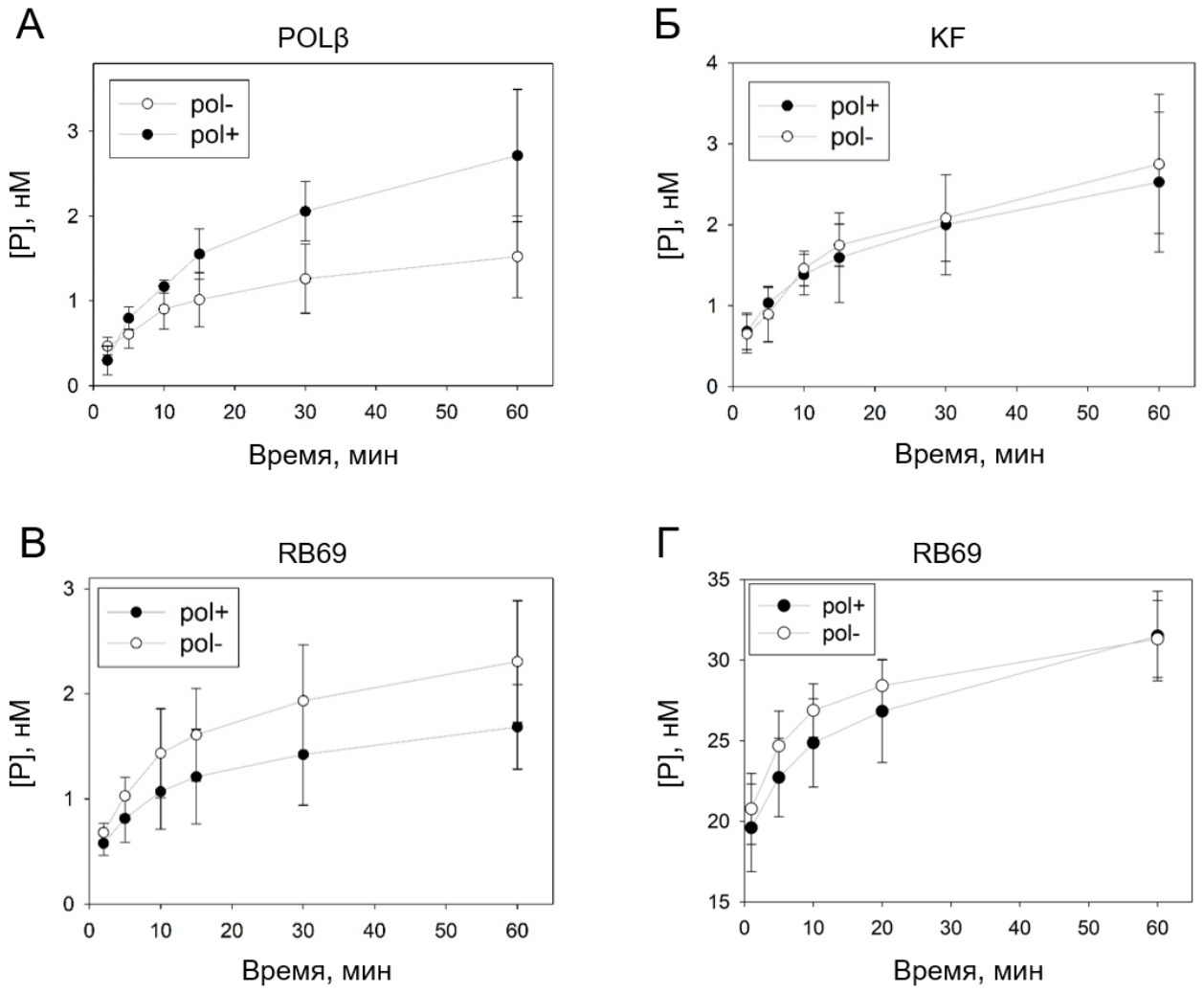


**Рисунок 37.** Вытеснение Cas9 некоторыми ДНК-полимеразами. Приведены графики зависимости концентрации продукта от времени реакции расщепления вторичного субстрата нуклеазой Cas9 в присутствии ДНК-полимеразы β (А), ДНК-полимеразы KF (Б) и ДНК-полимеразы RB69 (В). Г — зависимость количества продукта от времени при расщеплении плазмидного субстрата нуклеазой Cas9 в присутствии ДНК-полимеразы RB69. Для всех панелей: черные кружки — реакция в присутствии соответствующей ДНК-полимеразы и смеси dNTP; белые кружки — реакция в отсуствие соответствующей ДНК-полимеразы.

Белок vvUNG был неспособен вытеснять Cas9 из комплекса с ДНК, в отличие от комплексов белков OGG1 и NEIL1 (Рисунок 38). Таким образом, единственным белком из исследованных, способных к вытеснению Cas9, хоть и не очень эффективному, была ДНК-полимераза β. Как упоминалось ранее, POLβ также лучше вытесняла OGG1 по сравнению с KF (разд. 4.2.1).

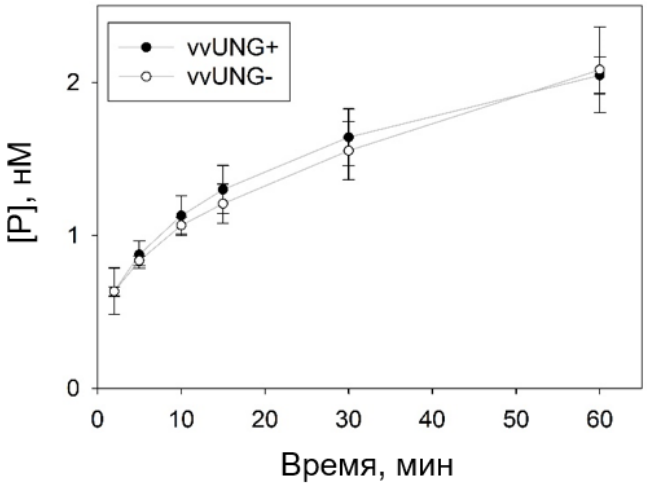


**Рисунок 38.** Вытеснение Cas9 ДНК-гликозилазой vvUNG. График зависимости концентрации продукта от времени реакции расщепления вторичного субстрата нуклеазой Cas9 в присутствии vvUNG. Белые кружки — реакция в отсутствие vvUNG; черные кружки — реакция в присутствии vvUNG.

Для проверки влияния комплекса Cas9 с ДНК на способность ДНК-полимераз к элонгации праймера, был проведен эксперимент с субстратом Gp-pri*~Down_psp_targ//Temp_psp_nontarg, в котором наблюдали за реакцией синтеза ДНК в присутствии и в отсутствие Cas9 (Рисунок 39) ДНК-полимеразами β, KF и RB69. Так как для проверки прохождения ДНК-полимеразами препятствия в виде Cas9 было необходимо иметь интактную полноразмерную ДНК-матрицу, в данном эксперименте использовался белок dCas9 — мутантный вариант Cas9 D10A H840A, дефицитный по нуклеазной активности [343]. Как и в предыдущих экспериментах, в первую очередь субстрат был инкубирован с dCas9 для образования комплекса с ДНК, а затем добавлялась ДНК-полимераза. Каждая из исследуемых ДНК-полимераз способна вытеснять запирающий праймер с высокой эффективностью. Однако из рисунка 39 видно, что синтез при наличии в ДНК препятствия в виде Cas9 идет значительно хуже, чем в отсутствие Cas9. POLβ обладает меньшей способность вытеснять запирающий праймер, чем ДНК-полимеразы KF и RB69. Несмотря на это, в отсутствие Cas9 наблюдалось образование продукта, близкого к полноразмерному (Рисунок 39А, дорожка 9). При наличии препятствия в виде Cas9 по ходу движения POLβ, ДНК-полимераза эффективно включала 3–4 нуклеотида, а дальнейший синтез шел с трудом, хотя на поздних временах реакции наблюдалось некоторое дополнительное

удлинение праймера (Рисунок 39А). Таким образом, ДНК-полимераза β не способна эффективно вести синтез при наличии на пути прочно связанного белка Cas9, хотя и может с небольшой эффективностью вытеснять Cas9 из комплекса с ДНК.

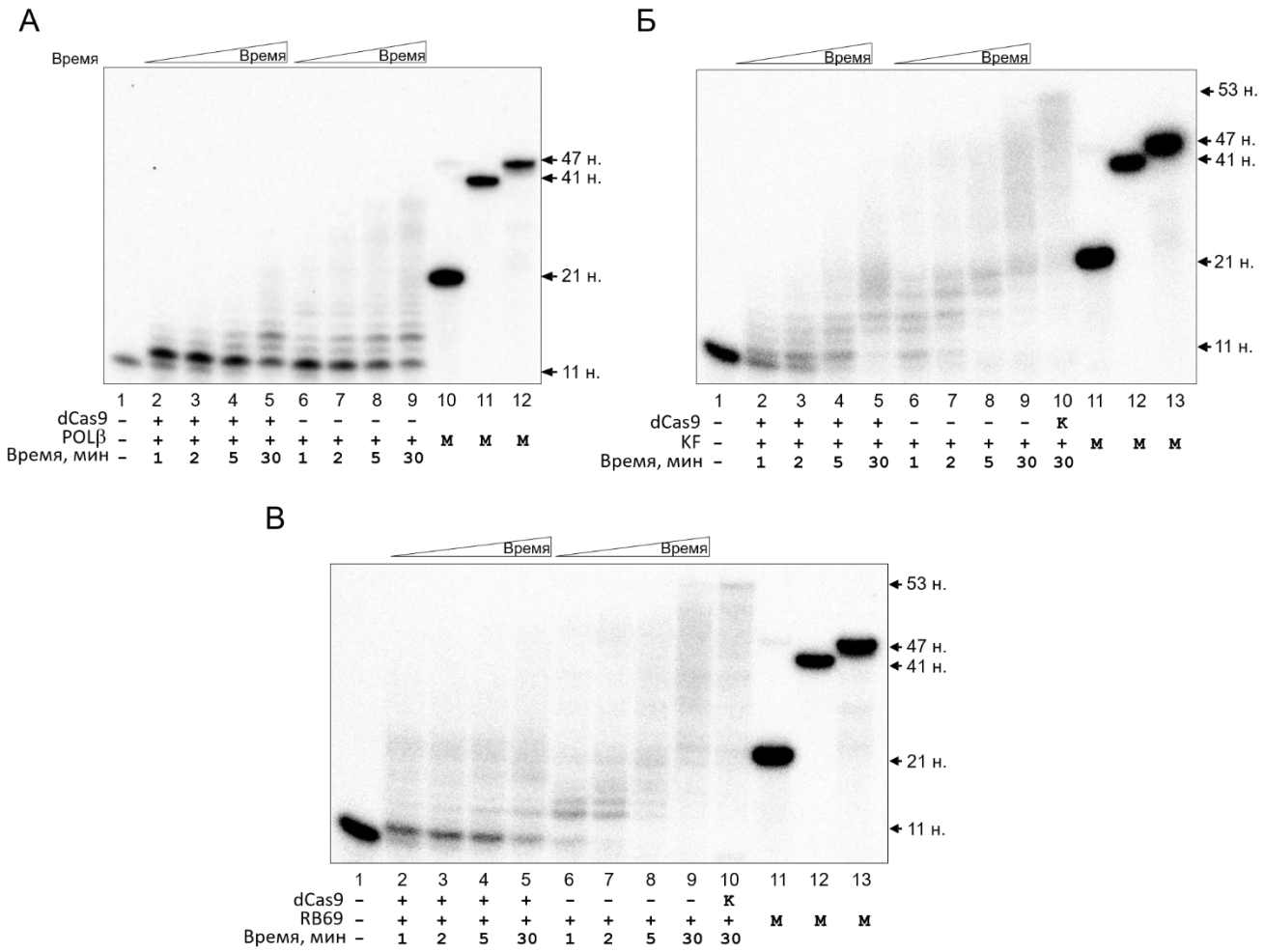


**Рисунок 39.** Радиоавтографы геля после разделения продуктов синтеза ДНК ДНК-полимеразами при наличии на субстрате прочно связанного с ДНК dCas9. А — Синтез ДНК-полимеразой β. Дорожки 2–5 — реакция с ДНК-полимеразой в присутствии dCas9, время инкубации представлено на рисунке; дорожки 6–9 — реакция с ДНК-полимеразой в отсутствие dCas9, время инкубации представлено на рисунке; дорожка 1 — субстрат без ферментов; дорожки 10, 11, 12 — маркеры подвижности длиной 21 н., 41 н. и 47 н соответственно. Б — Синтез ДНК-полимеразой KF. В — Синтез ДНК-полимеразой RB69. Нумерация для Б и В общая: дорожки 2–5 — реакция с ДНК-полимеразой в присутствии dCas9, время инкубации представлено на рисунке; дорожки 6–9 — реакция с ДНК-полимеразой в отсутствие dCas9, время инкубации представлено на рисунке; дорожка 1 — субстрат без ферментов; дорожка 10 — реакция с ДНК-полимеразой в отсутствие dCas9 на субстрате вида Gp-pri*//Temp_psp_nontarg (без запирающего праймера); дорожки 11, 12, 13 — маркеры подвижности длиной 21 н., 41 н. и 47 н соответственно.

Фрагмент Кленова при синтезе на ДНК, содержащей Cas9, также демонстрирует значительное снижение эффективности синтеза, останавливаясь на начальных этапах примерно там же, где и POLβ. При увеличении времени реакции наблюдается точка паузы через 7–8 нуклеотидов после начала синтеза (Рисунок 39Б, дорожка 5). Аналогичная картина имела место и для ДНК-полимеразы RB69, которая, однако, достигала точки окончательной остановки быстрее, чем POLβ и KF (Рисунок 39В). В первой части работы было показано, что ДНК-

полимеразы семейства B, к которому принадлежит ДНК-полимераза RB69, лучше других полимераз способны вести синтез на матрицах, содержащих ДБС — они способны деформировать впереди лежащую ДБС и вести синтез непосредственно до места сшивки (разд. 4.1.5). Возможно, эти свойства обуславливают бóльшую способность к элонгации праймера ДНК-полимеразой RB69 и в случае препятствия в виде Cas9.

Таким образом, прочно нековалетно связанный с ДНК белок Cas9 представляет собой препятствие как для белков, движущихся по ДНК с затратой энергии (ДНК-полимеразы), так и для белков, пассивно диффундирующих по контуру ДНК. Очевидно, энергии гидролиза dNTP при движении ДНК-полимеразы недостаточно для того, чтобы разрушить связи с ДНК рибонуклеопротеина Cas9, комплекс которого дополнительно стабилизирован взаимодействиями РНК–ДНК. В литературе встречаются сообщения о том, что Cas9 представляет затруднения для продвижения как транскрипционных, так и репликативных комплексов *in vivo* [282,344], что согласуется с полученными в настоящей работе данными *in vitro*.

Предложенный метод анализа вытеснения Cas9 и других прочно связанных белков может стать ценным инструментом для исследования механизма продвижения белков по ДНК в условиях конкуренции с другими белками за ее связывание. Несмотря на то, что продолжительно существующие комплексы белков с ДНК образуются повсеместно и не относятся к повреждениям ДНК, они могут служить препятствиями для ферментов матричного синтеза, что может приводить к негативным последствием для клетки. Полученные в работе данные свидетельствуют в пользу того, что ДНК-полимеразы при синтезе ДНК взаимодействуют с ДНК-белковыми сшивками и прочно связанными белками по сходным механизмам, включающим деформацию обеих белковых глобул. Способы преодоления таких препятствий и возможные генотоксичные последствия образования нековалентных ДНК-белковых комплексов требуют дальнейшего изучения.

### *4.3. Активность ДНК-полимераз в присутствии полиоксометаллатов платины*

Аддукты ДНК с низкомолекулярными соединениями — а также механизмы их возникновения, репарации и взаимодействия с ДНК-полимеразами — в целом изучены гораздо лучше, чем ДНК-белковые аддукты. Модификация ДНК низкомолекулярными соединениями лежит в основе многих современных методов химиотерапии злокачественных новообразований [35]. Несмотря на очевидную важность исследований в этой области, основное внимание до сих пор уделяется лишь нескольким соединениям, образующим аддукты с ДНК. В связи с этим

особый интерес представляет изучение как уже известных соединений с не до конца охарактеризованным механизмом действия, так и новых повреждающих ДНК агентов.

### *4.3.1. Подавление активности ДНК-полимераз полиоксониобатом платины*

В связи с высокой эффективностью противоопухолевого действия соединений платины [70,71] активно продолжается разработка новых средств на их основе, в которых были бы устранены недостатки традиционных платиновых препаратов с сохранением сильного противоопухолевого эффекта [99,345–347]. В качестве многообещающих соединений с потенциальным противоопухолевым действием в данной работе изучены свойства полиоксометаллатов платины — ранее не исследованного класса соединений, которые могут обладать рядом преимуществ как генотоксичные агенты. Для многих полиоксометаллатов показана достаточно высокая цитотоксичность, не связанная с повреждением ДНК [102,106]. Способность проникновения этих соединений в клетки не зависит от транспортеров, экспрессию которых клетка может снизить, а основана на взаимодействии полиоксометаллатных кластеров с мембраной с дальнейшим эндоцитозом и макропиноцитозом — процессами, которые идут в клетке постоянно [109]. С другой стороны, наличие металлоцентров Pt позволяет надеяться на проявление цитотоксичности, связанной с повреждениями ДНК.

В качестве модельного полиоксометаллата платины был исследован полиоксониобат платины структуры $[(Nb_6O_{19})_2\{Pt(OH)_2\}_2]^{12-}$ (далее Pt-ПОН) (Рисунок 40А), содержащий два атома платины и два координирующих кластера типа Линквиста, которые были предоставлены Лабораторией синтеза комплексных соединений ИНХ СО РАН [113]. Для установления возможных молекулярных мишеней полиоксониобатов платины в первую очередь представляет интерес установить их действие на системы матричного биосинтеза, так как известны примеры ингибирования некоторых обратных транскриптаз вирусов полиоксометаллатами [115–117]. Поэтому прежде всего была изучена возможность подавления данными соединениями активности ДНК-зависимых ДНК-полимераз, принадлежащих к разным структурным семействам.

Элонгация праймера была исследована на субстрате вида праймер–матрица (Gp-pri*//Temp1) (Рисунок 40Б) следующими ДНК-полимеразами: фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* (семейство A ДНК-полимераз), ДНК-полимераза бактериофага RB69 (семейство B), ДНК-полимераза β человека (семейство X), ДНК-полимераза IV *Sulfolobus solfataricus* и ДНК-полимераза κ человека (семейство Y). Изучение ДНК-полимераз бактериального и вирусного происхождения представляется полезным, во-первых, для понимания общности механизма ингибирования полимераз [116], и, во-вторых, в случаях, когда человеческие полимеразы конкретного суперсемейства малодоступны (как, например, ДНК-

полимеразы δ и ε, принадлежащие к семейству B). Pt-ПОН в реакциях был использован в концентрациях от 1 мкМ до 1 мМ, растворы готовились непосредственно перед проведением эксперимента, чтобы минимизировать возможность замещения объемных полиоксониобатных лигандов молекулами воды и перехода бицентрового комплекса $[Nb_6O_{19}\{Pt(OH)_2\}]_2$ в моноцентровый $[Pt(Nb_6O_{19})_2]$ [113].

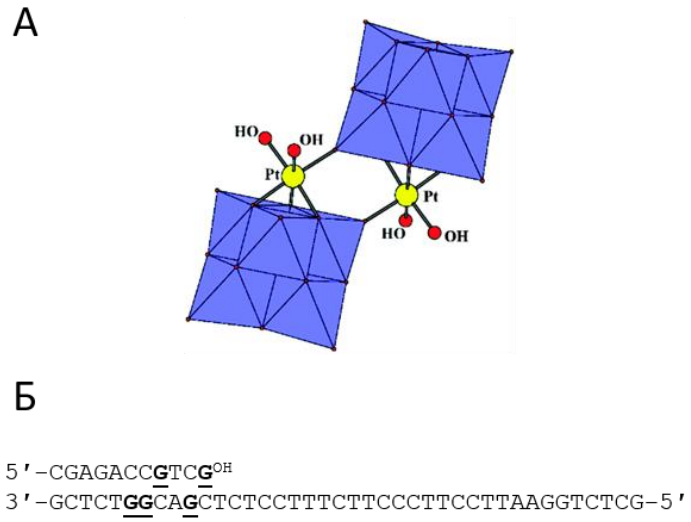


**Рисунок 40.** А — полиоксометаллаты платины (Pt–ПОН) структуры $[(Nb_6O_{19})_2\{Pt(OH)_2\}_2]^{12-}$, исследуемые в работе. Б — субстрат Gp-pri*//Temp1 для изучения взаимодействия ДНК-полимераз с Pt–ПОН.

При близком к эквимолярному соотношении концентрации ДНК-полимераз и ДНК-субстрата наблюдалось значительное уменьшение продукта включения dNMP в присутствии возрастающих количеств Pt-ПОН (Рисунок 41). Сходная картина наблюдалась для всех исследованных ДНК-полимераз, что говорит о возможности подавления этим соединением процессов матричного синтеза ДНК.

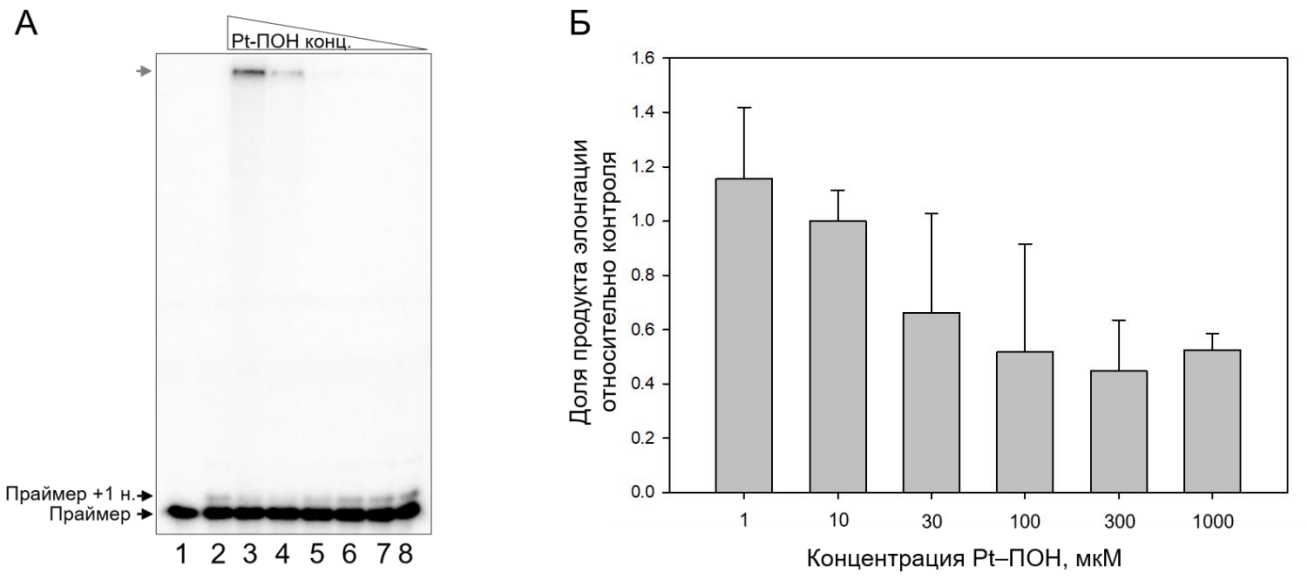


**Рисунок 41.** А — радиоавтограф геля, иллюстрирующий образование аддуктов с низкой электрофоретической подвижностью (показаны серой стрелкой) при инкубации ОДН с Pt-ПОН и dATP. Инкубировалась ДНК-полимераза KF(exo$^-$) (10 нМ) с субстратом вида праймер–матрица (100 нМ) в отсутствии Pt-ПОН (дорожка 2) или в присутствии Pt-ПОН в концентрации 1000, 300, 100, 30, 10 и 1 мкМ Pt-ПОН (дорожки 3–8 соответственно). Дорожка 1 — субстрат в отсутствии Pt-ПОН и KF(exo$^-$). Б — Гистограмма, отображающая уменьшение количества продукта реакции полимеризации KF (exo$^-$) с увеличением концентрации полиоксониобатов платины.

### *4.3.2. ДНК-полимеразы как возможная мишень полиоксониобата платины*

Для изучения возможности ингибирования ДНК-полимераз при непосредственном связывании с ними Pt-ПОН были подобраны условия стационарной кинетики, при которых ДНК-полимеразы катализируют присоединение следующего нуклеотида не более чем на 20% за время реакции. По результатам трех независимых экспериментов для перечисленных выше ДНК-полимераз было показано, что в этих условиях не происходит уменьшения количества продукта реакции элонгации праймера в присутствии полиоксониобатов платины даже при самых высоких концентрациях (Рисунок 42). Это позволяет сделать вывод о том, что полиоксониобаты платины не вызывают уменьшения доли активного фермента, и, следовательно, не взаимодействуют непосредственно с ДНК-полимеразами. Это отличает действие исследуемого Pt-ПОН от действия полиоксовольфраматных кластеров структуры $[(O_3POPO_3)_4W_{12}O_{36}]^{16-}$ и $[(O_3PCH_2PO_3)_4W_{12}O_{36}]^{16-}$ на обратную транскриптазу вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), которые пока представляют собой единственной случай доказанного конкурентного характера ингибирования ферментов синтеза нуклеиновых кислот полиоксометаллатами [116]. Другие работы, рассматривающие снижение активности вирусных обратных транкриптаз в присутствии полиоксометаллатов вольфрама, не исследовали природу ингибирования [115,117].

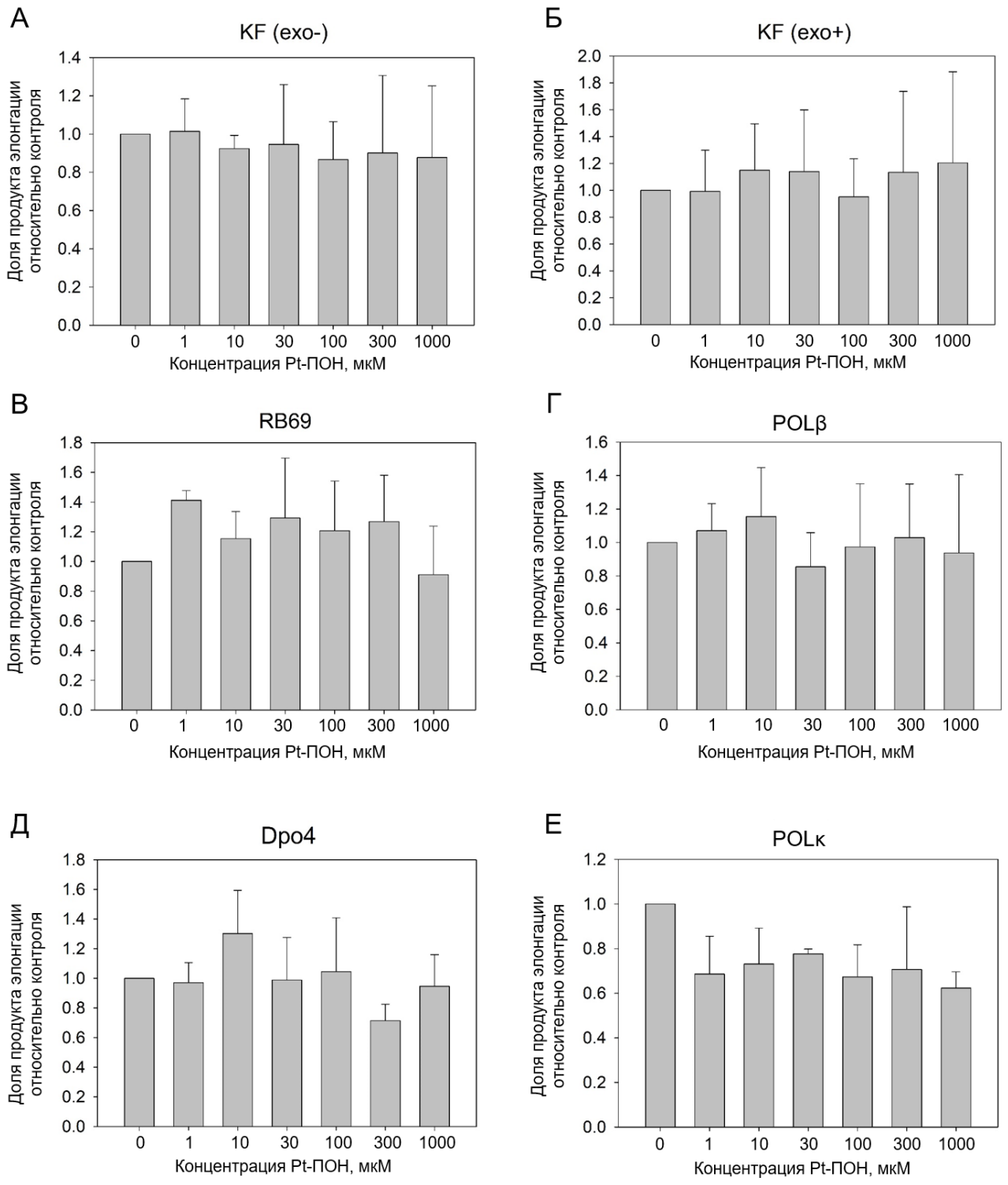


**Рисунок 42.** Графики, отражающие долю продукта элонгации праймера ДНК-полимеразами в условиях стационарной кинетики после реакции в зависимости от концентрации полиоксониобатов платины. Данные получены по результатам трех независимых экспериментов. А — фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. Coli* (exo$^{-}$); Б — фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. Coli* (exo$^{+}$); В — ДНК-полимераза бактериофага RB69; Г — ДНК-полимераза β человека; Д — ДНК-полимераза IV *Sulfolobus solfataricus*; Е — ДНК-полимераза κ человека.

### *4.3.3. ДНК как потенциальная молекулярная мишень полиоксониобатов платины*

Еще одна возможная причина снижения активности ДНК-полимераз в присутствии Pt-ПОН может быть связана с образованием ковалентных аддуктов комплекса Pt с матрицей или сшивок между матрицей и белком. Производные платины, традиционно используемые в качестве противоопухолевых агентов, образуют как внутри- и межцепочечные сшивки ДНК, так и моноаддукты с ДНК, и ДБС. Именно формирование аддуктов платиновых соединений с ДНК блокирует репликацию и запускает процессы клеточной гибели, обуславливая их цитотоксичность и противоопухолевый эффект.

В экспериментах с ДНК-полимеразами на субстратах вида праймер–матрица наблюдалось образование продукта с крайне низкой подвижностью в 20% ПААГ (Рисунок 41). Предположительно, он может соответствовать ДБС; формирование сшивок ДНК–ДНК менее вероятно, так как таких продуктов не наблюдалось в условиях стационарной кинетики при такой же концентрации субстрата. Чтобы подробнее изучить природу образуемых аддуктов была исследована способность полиоксониобатов платины в разных концентрациях образовывать аддукты с модельными субстратами, содержащих один нуклеотид dG в последовательности из нескольких dT. Такие субстраты часто используются для анализа повреждения ДНК, поскольку основание G является наиболее реакционноспособным, а T — наименее реакционноспособным из всех азотистых оснований в составе ДНК, что облегчает трактовку аналитических результатов [348]. Цисплатин и другие платиновые комплексы чаще всего присоединяются по положению N7 Gua. Их активные производные — диаква-комплексы могут взаимодействовать с двумя основаниями в ДНК, образуя внутри- и межцепочечные сшивки, а также с основанием ДНК и нуклеофильной группой в составе белка, формируя ДБС [35,72,74]. В нашем случае модельная система праймер–матрица содержала несколько оснований гуанина в области контакта с полимеразой, которые могли послужить сайтами для формирования аддуктов с Pt-ПОН (Рисунок 43).

Исходя из этих соображений, была проведена реакция олигонуклеотидов, содержащих единственный остаток dG — 5′-TTGTT-3′ (Cr-link1) и 5′-TTTTGTT-3′ (Cr-link2) — с Pt-ПОН в концентрации 1 мМ и 300 мкМ. Продукты с низкой мобильностью в геле возникали во всех реакциях, содержащих ДНК и Pt-ПОН (Рисунок 43). Образуемые продукты разрушались под воздействием NaOH или гидроксиламина, конкурирующих с гуанином за связывание атома Pt. Эти данные согласуются с предположительным механизмом образования аддукта ДНК с Pt-ПОН: замещением гидроксигруппы при центральном атоме Pt нуклеофильной группой гуанина в составе ДНК.

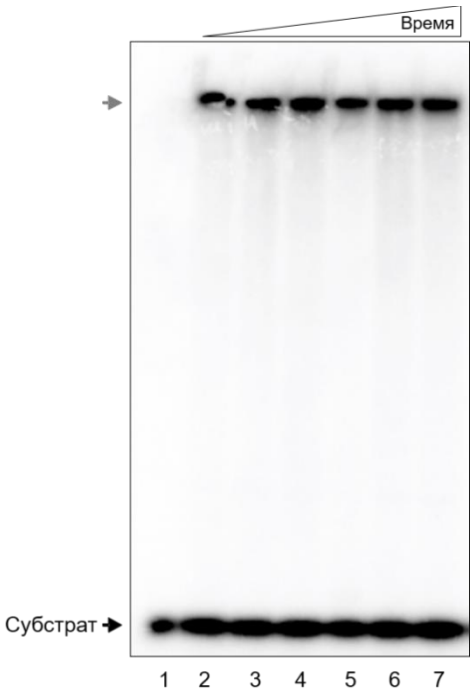


**Рисунок 43.** Радиоавтограф геля, иллюстрирующий образование продуктов с низкой электрофоретической подвижностью (серая стрелка) при инкубации ОДН 5′-TTTTGTT-3′ (Cr-link2) в отсутствие Pt-ПОН (дорожка 1) или в присутствии Pt-ПОН в концентрации 1 мМ в течении 1, 2, 5, 20, 60 и 120 мин. (дорожки 2–7 соответственно).

Для более детального изучения природы предполагаемых аддуктов на базе Объединенного Центра геномных, протеомных и метаболомных исследований ИХБФМ СО РАН был проведен их масс-спектрометрический анализ (Рисунок 44). По результатам анализа методом MALDI-TOF пик на 1483 Да соответствует немодифицированному олигонуклеотиду Cr-link1 (Рисунок 44А). Продукты с молекулярными массами 3370, 3440 и 3483 Да были легче ожидаемого Pt-ПОН комплекса с гидроксильным лигандом, замененным на гуанин (3648 Да) (Рисунок 44Б). По-видимому, после связывания с ДНК, комплекс Pt-ПОН может подвергаться реорганизации, приводящей к потере одного атома Pt (195 Да) и перестройке координационной сферы оставшегося атома, аналогично тем процессам, которые могут происходить в водном растворе при длительном хранении [113].

Известно, что некоторые полиоксометаллаты с лигандами типа Кеггина могут нековалентно взаимодействовать с двуцепочечной ДНК, вероятно, связываясь с бороздками ДНК [349]. Возможность связывания с ДНК полиоксометаллатов, содержащих анионные лиганды типа Линдквиста, не было исследовано. Так как аддукт, формируемый $[Nb_6O_{19}\{Pt(OH)_2\}]_2$, был стабилен в ионизирующих условиях MALDI масс-спектрометрии, взаимодействие с ДНК данного соединения логично считать ковалентным. Остается открытым вопрос, способны ли полиоксометаллаты платины формировать межцепочечные сшивки ДНК, как традиционные цитотоксические соединения цисплатинового типа. Однако известно, что, помимо

межцепочечных сшивок ДНК, цисплатин с легкостью формирует моноаддукты и ДБС, которые вносят значительный вклад в цитотоксичность. Есть вероятность, что аддукты, образуемые Pt-ПОН, будут влиять на геном схожим образом. Тем не менее, цитотоксическое действие полиоксониобатов платины на клетки еще предстоит изучить.

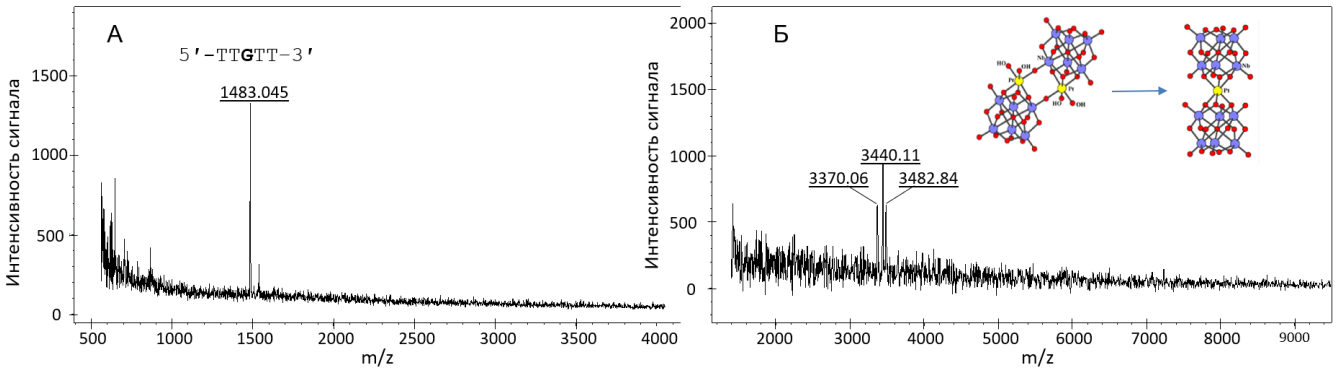


**Рисунок 44.** Данные анализа аддуктов, образованных Pt-ПОН, методом MALDI-TOF. А — спектр MALDI-TOF ОДН вида 5′-TTGTT-3′ (ожидаемая молекулярная масса 1484 Да). Б — спектр MALDI-TOF того же ОДН после инкубации в присутствии 1 мМ Pt-ПОН.

## *4.4. Исследование взаимодействия ферментов метаболизма ДНК с аддуктом АП-сайта с метоксиамином*

Апурин-апиримидиновые сайты и их производные представляют собой пример повреждений с двойным действием на системы синтеза ДНК. С одной стороны, отсутствие азотистого основания обуславливает их мутагенность; включение конкретных dNMP напротив АП-сайтов зависит от природы ДНК-полимеразы и определяется взаимодействиями аминокислот, входящего dNTP и окружающих нуклеотидов в активном центре фермента. С другой стороны, эффективность включения dNMP напротив АП-сайтов даже в лучшем случае гораздо ниже, чем напротив канонических нуклеотидов, и по своим биологическим последствиям АП-сайты больше похожи на блокирующие, чем на предмутагенные повреждения.

Из многих возможных производных альдегидного АП-сайта (разд. 2.1.1) особое внимание привлекает его конъюгат с метоксиамином (АП-МОХ). Хотя модификация АП-сайтов МОХ была открыта более 30 лет назад [41,42] и неспособность АП-эндонуклеаз расщеплять такой аддукт послужила основой интереса к МОХ с точки зрения терапевтического применения в комбинации с повреждающими ДНК агентами [40,41], до сих пор остаются неисследованными многие аспекты биологического действия этих производных. В частности, в литературе отсутствуют сообщения о способности ДНК-полимераз вести синез при наличии в матрице АП-МОХ.

### *4.4.1. Получение и характеристика аддукта АП-сайта с метоксиамином*

Для получения модельных систем, содержащих аддукт с МОХ, были синтезированы олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие остаток урацила, которые были впоследствии обработаны урацил-ДНК-гликозилазой (Ung) *E. coli* для получения АП-сайта в заданной позиции. Образование АП-сайта проверяли обработкой NaOH. Далее проводили реакцию полученного олигонуклеотида с МОХ. Так как известно, что конъюгация с МОХ предотвращает расщепление АП-сайтов АП-эндонуклеазой APEX1 [40], это свойство использовали для оценки полноты превращения АП-сайта в аддукт АП-МОХ (Рисунок 45).

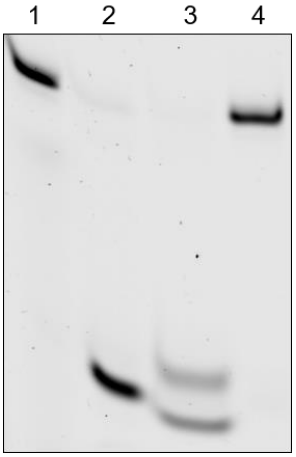


**Рисунок 45.** Электрофореграмма геля после разделения продуктов реакции расщепления ДНК, содержащей АП-сайт или АП-МОХ, ферментом APEX1. Дорожка 1 — ДНК, содержащая АП-сайт, полученная обработкой Ung; дорожка 2 — эта же ДНК, полностью расщепленная APEX1; дорожка 3 — эта же ДНК, обработанная 100 мМ NaOH в течение 2 мин; дорожка 4 —ДНК, содержащая АП-МОХ, обработанная APEX1.

Формирование аддукта с МОХ происходило с высокой эффективностью, и при pH 7.0 весь субстрат содержал АП-МОХ уже через 30 мин инкубации при комнатной температуре, что полностью согласуется с литературными данными (Рисунок 45). Образование аддукта с МОХ резко повышало стабильность АП-сайта. Хорошо известно, что альдегидные АП-сайты химически нестабильны — характерное время существования АП-сайта, измеренное при 37°C и pH ~7.0 в апуринизированной высокомолекулярной ДНК и в синтетических олигонуклеотидах, составляет около недели [10,350]. Ранее было показано, что конъюгация с МОХ стабилизирует АП-сайт, препятствуя спонтанному β-элиминированию, однако максимальное время, в течение которого была изучена стабилизиция АП-сайта по литературным данным, составляет 4 часа [42]. Поэтому в настоящей работе была изучена стабильность олигонуклеотидов, содержащих альдегидный АП-сайт и АП-МОХ, в течение 11 суток (Рисунок 46). После 3 суток количество остаточного АП-МОХ составляло >80%, в то время как альдегидный АП-сайт сохранялся только

на 60%. По истечении 6 суток, аддукт с MOX оставался более чем на 70% интактным, а через 11 суток, когда АП-сайт практически полностью исчез, количество остаточного АП-MOX было около 50% (Рисунок 46). Таким образом, конъюгаты АП-MOX не только эффективно подавляют активность системы ЭРО, но и существуют достаточно долго, чтобы любое оказываемое ими действие было биологически значимым.

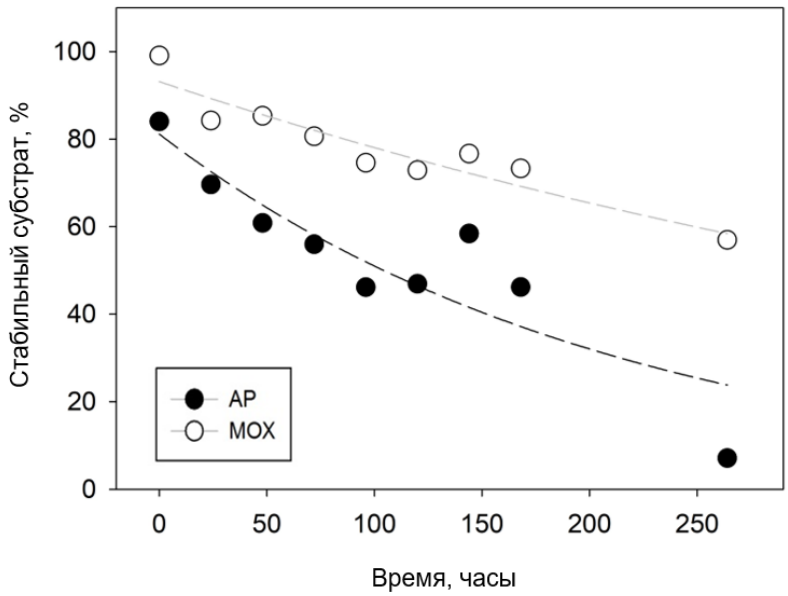


**Рисунок 46.** Стабильность субстратов, содержащих АП-сайт и аддукт АП-сайта с MOX в течение 11 суток. Нижняя кривая (черные кружки) — ДНК, содержащая АП-сайт; верхняя кривая (белые кружки) — ДНК, содержащая аддукт с MOX.

Для подтверждения природы полученного аддукта был проведен его масс-спектрометрический анализ методом MALDI-TOF (Рисунок 47). Для этого использовали более короткий олигонуклеотид 5′-CTCTCUCCTTCC-3′, обработанный таким же образом. Основной пик спектра соответствовал ожидаемой молекулярной массе олигонуклеотида, содержащего остаток АП-MOX (3404 Да). В спектре также присутствовали минорные пики, которые по молекулярной массе (1621, 1702 и 1783 Да) соответствовали продуктам β-элиминирования основного олигонуклеотида.

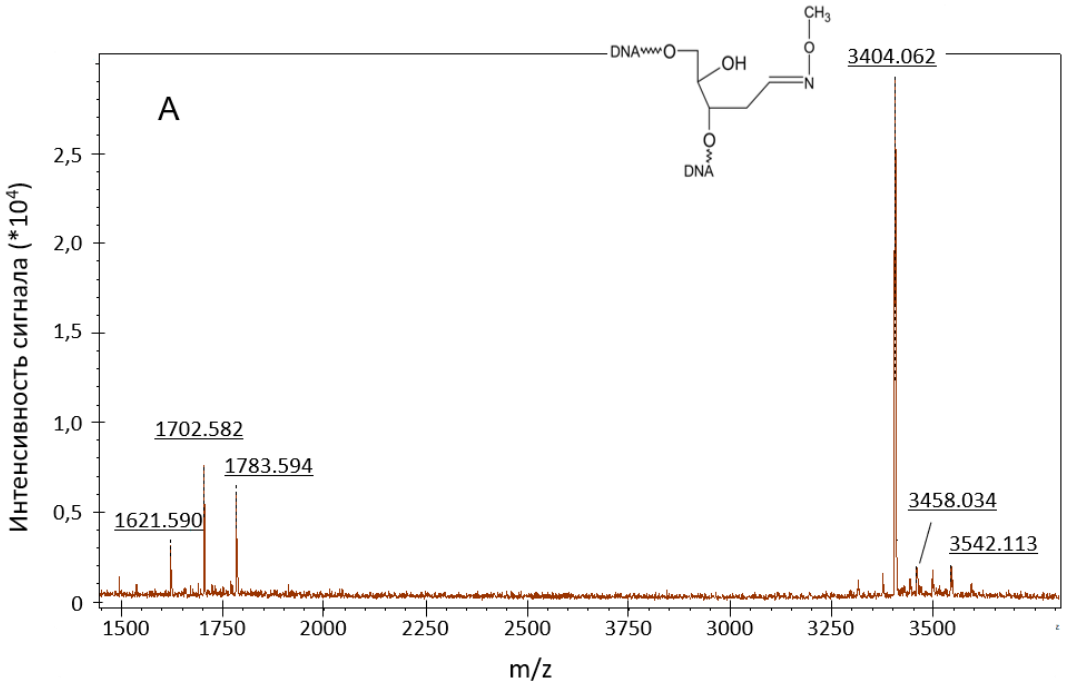


**Рисунок 47.** Данные MALDI-TOF анализа аддуктов, сформированных МОХ. А — MALDI-TOF ОДН, содержащего аддукт АП-сайта с МОХ (ожидаемая молекулярная масса 3404 Да).

### *4.4.2. Кинетические параметры включения dNMP напротив АП-сайта и аддукта АП-сайта с метоксиамином ДНК-полимеразами в условиях стационарной кинетики*

Для изучения влияния присутствия АП-МОХ на синтез ДНК была исследована элонгация праймера ДНК-полимеразами на матрицах, содержащих АП-МОХ. Эффективность прохождения изучаемого аддукта была исследована для ДНК-полимераз, принадлежащих к разным семействам, обладающих разной точностью, разной процессивностью и разной способностью к транслезионному синтезу. Были исследованы фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* (дефицитный по 3′→5′-экзонуклеазной активности) из семейства A; ДНК-полимераза бактериофага RB69 из семейства B; ДНК-полимераза β и ДНК-полимераза λ человека семейства X и транслезионная ДНК-полимераза κ человека из семейства Y.

Каталитические параметры включения dNMP были изучены в реакциях с субстратами, содержащими альдегидный АП-сайт либо АП-МОХ и праймер, заканчивающийся за 1 нуклеотид до места аддукта и несущий флуоресцентную метку (Рисунок 48Б). В некоторых случаях присутствовал также запирающий праймер. Вследствие химической нестабильности альдегидного АП-сайта и сложности работы с ним, кинетические параметры для ДНК-полимераз чаще всего получают с использованием аналогов, не склонных к спонтанному β-элиминированию, в частности, THF ((3-гидроксителтрагидрофуран-2-ил)метилфосфата)

(Рисунок 1). Однако показано, что репликативный и репаративный синтез ДНК через остаток THF *in vivo* отличается от синтеза через АП-сайт [351], поэтому представляется, что корректное сравнение свойств АП-MOX как субстрата должно проводиться именно с альдегидным АП-сайтом. АП-MOX получали непосредственно перед экспериментом, для доказательства образования аддукта проводили обработку APEX1, в связи с чем матричная цепь также несла флуоресцентную метку и видна на изображениях гелей как полоса с подвижностью, соответствующей длине 23 н. Концентрацию dNTP варьировали от 0,5 до 1000 мкМ. Реакцию проводили при 25°C для стабилизации комплексов праймер–матрица и для минимизации спонтанного разрыва ДНК по АП-сайту.

Ранее было показано, что фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* способен с невысокой эффективностью (около 3% от нормальной пары) проходить THF-аналог АП-сайта [285]. KF (exo$^-$) демонстрирует более эффективное преодоление АП-сайта по сравнению KF (exo$^+$), а расстояние от 3′-конца праймера до аналога АП-сайта не влияет на эффективность его прохождения [327]. KF следует «правилу A»: константа специфичности для включения dAMP напротив THF в 6,6 раз больше, чем для dGMP и в 110 раз больше, чем для dTMP [327].

Полученные данные о предпочтительных для KF субстратах при включении напротив альдегидного АП-сайта хорошо согласуются с литературными данными, полученными для THF-аналога АП-сайта. Видно, как в целом падает эффективность синтеза на таких матрицах даже для более эффективного варианта фрагмента Кленова KF (exo$^-$) (Рисунок 48A). Медленное включение нуклеотида напротив АП-сайта или возможная быстрая диссоциация комплекса полимеразы с таким субстратом приводят к низкой эффективности прохода такого малого повреждения. Эффективность синтеза KF (exo$^-$) на матрицах, содержащих АП-MOX, показывает еще большее, хоть и незначительное по сравнению с АП-сайтом, снижение эффективности синтеза, при этом предпочтение к включаемому нуклеотиду остается таким же, как и для АП-сайта: в обоих случаях наблюдалось предпочтение A >> G >> C,T (Рисунок 48A). В таблице 4 показаны кинетические параметры включения разных dNMP фрагментом Кленова напротив повреждения.

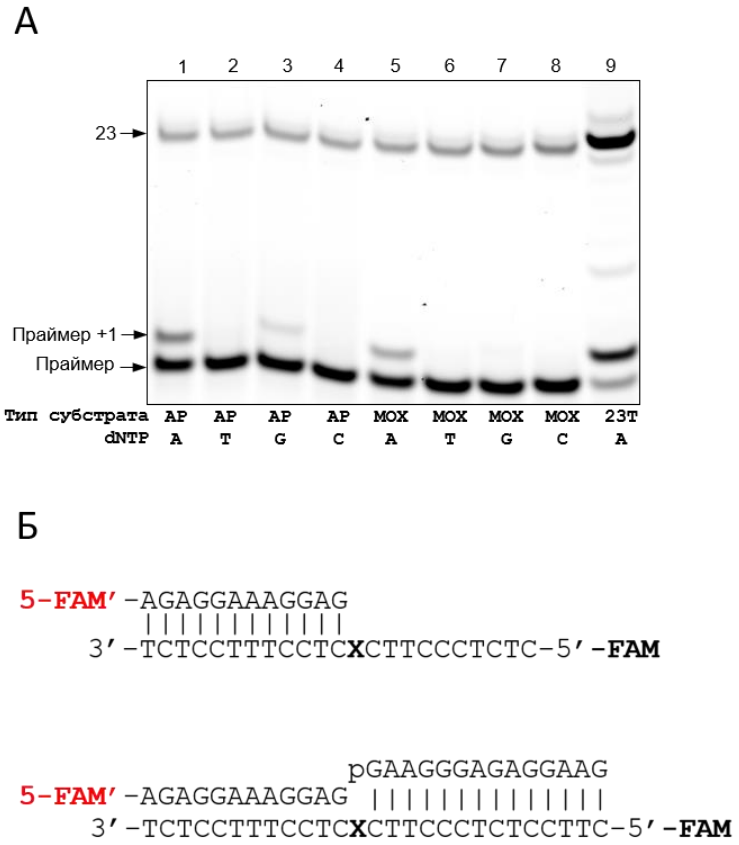


**Рисунок 48.** А — предпочтение включения ДНК-полимеразой KF конкретного dNMP на матрицах, содержащих АП-сайт (дорожки 1–4) и АП-МОХ (дорожки 5–8). Концентрация ДНК-субстрата — 100 нМ; концентрация dNTP субстрата — 100 мкМ; концентрация ДНК-полимеразы 10 нМ. Дорожка 9 — синтез KF на неповрежденной матрице, включение dAMP напротив T. Полоса, соответствующая 23-звенному олигонуклеотиду, представляет собой меченую матричную цепь. Б — субстраты для изучения кинетических параметров ДНК-полимераз при синтезе на матрицах, содержащих АП-сайт или АП-МОХ. Место образования повреждения обозначено X. Верхняя конструкция — субстрат вида праймер–матрица; нижняя конструкция — субстрат вида праймер–матрица–запирающий праймер.

**Таблица 4.** Кинетические параметры реакции включения dNTP ДНК-полимеразой KF (exo$^-$) на субстратах, содержащих АП-сайт и АП-МОХ.

| ДНК-субстрат | dNTP субстрат | $K_M$, мкМ | $k_{cat}$, с$^{-1}$ | $k_{sp}$, мкМ$^{-1}$×с$^{-1}$ |
|---|---|---|---|---|
| АП-сайт | dATP | 19,2±4,8 | (21,4±1,4)×10$^{-4}$ | (11,1±2,8)×10$^{-5}$ |
| АП-сайт | dGTP | не насыщ. | не насыщ. | (6,05±0,96)×10$^{-7}$ |
| АП-сайт | dTTP | не насыщ. | не насыщ. | (5,57±2,10)×10$^{-8}$ |
| АП-сайт | dCTP | не детект. | не детект. | не детект. |
| АП-МОХ | dATP | 40,7±8,5 | (12,2±0,9)×10$^{-4}$ | (2,99±0.66)×10$^{-5}$ |
| АП-МОХ | dGTP | не насыщ. | не насыщ. | (2,25±0,49)×10$^{-7}$ |
| АП-МОХ | dTTP | не насыщ. | не насыщ. | (5,34±3,97)×10$^{-8}$ |
| АП-МОХ | dCTP | не детект. | не детект. | не детект. |

«не детект.» — включение ниже предела детекции методом флуоресцетного сканирования.
«не насыщ.» — насыщение субстратом не достигается, не удается определить в виде отдельного кинетического параметра.

ДНК-полимераза RB69 входит в семейство B и обладает 3′→5′ корректирующей активностью. Поведение ДНК-полимеразы RB69 на модельных субстратах, содержащих АП-сайт или АП-MOX, было в целом схоже с поведением KF из семейства A, однако включение было в целом более эффективным, и предпочтение субстрата dATP над dGTP было менее выражено. Специфичность по отношению к обоим субстратам убывала в ряду A > G >> T >> C. Как и для KF, наблюдается падение эффективности синтеза при переходе от АП-сайт-содержащих субстратов к субстратам, содержащим аддукты с MOX, в 2–3 раза для dATP и dGTP (Таблица 5).

**Таблица 5.** Кинетические параметры реакции включения dNTP ДНК-полимеразой RB69 на субстратах, содержащих АП-сайт и аддукт с MOX.

| ДНК-субстрат | dNTP субстрат | $K_M$, мкМ | $k_{cat}$, $c^{-1}$ | $k_{sp}$, мкМ$^{-1}$×$c^{-1}$ |
|---|---|---|---|---|
| АП-сайт | dATP | 109±30 | (2,74±0,26)×$10^{-2}$ | (25,1±7,4)×$10^{-5}$ |
| АП-сайт | dGTP | 112±37 | (1,52±0,14)×$10^{-2}$ | (13,6±4,7)×$10^{-5}$ |
| АП-сайт | dTTP | не насыщ. | не насыщ. | (1,01±0,11)×$10^{-6}$ |
| АП-сайт | dCTP | не детект. | не детект. | не детект. |
| АП-MOX | dATP | 75,8±19,7 | (8,60±0,85)×$10^{-3}$ | (11,4±3,2)×$10^{-5}$ |
| АП-MOX | dGTP | 60,1±12,0 | (2,58±0,16)×$10^{-3}$ | (4,29±0,89)×$10^{-5}$ |
| АП-MOX | dTTP | не насыщ. | не насыщ. | (1,01±0,10)×$10^{-6}$ |
| АП-MOX | dCTP | не детект. | не детект. | не детект. |

«не детект.» — включение ниже предела детекции методом флуоресцетного сканирования.
«не насыщ.» — насыщение субстратом не достигается, не удается определить в виде отдельного кинетического параметра.

Аналогичная серия экспериментов была проведена для ДНК-полимераз β и λ, принадлежащих семейству X. Обе эти ДНК-полимеразы обладают невысокой процессивностью, и предпочитают однонуклеотидные бреши в качестве субстратов. Однако они способны с некоторой эффективностью вести синтез и на субстратах без запирающего праймера, и в первую очередь сравнивались кинетические параметры на субстратах такого вида, содержащих АП-сайт и АП-MOX. В случае использования в реакции POLβ, включения напротив повреждения не наблюдалось вообще. Для POLλ наблюдалась совершенно иная картина — ярко выраженное предпочтение включения dGMP как в случае АП-сайта, так и в случае АП-MOX. Наблюдалось небольшое снижение эффективности синтеза на субстратах, содержащих АП-MOX, проявляющееся на уровне $K_M$ (Таблица 6). Таким образом, наличие в матрице АП-MOX, равно как и наличие АП-сайта, для POLλ должно быть высокомутагенно. Известно, что POLλ характеризуется низкой точностью (частота ошибок ~$10^{-3}$–$10^{-5}$), причем бóльшую часть мутаций составляют делеции за счет выпетливания 1–2 нуклеотидов ДНК-матрицы при наличии микрогомологии с 3′-концом праймера [312,352]. В использованной модельной конструкции в

матричной ДНК после повреждения находился остаток цитозина, поэтому, вероятно, POLλ «проскальзывает» через повреждение и включает dGMP, комплементарный положению +1.

Аналогичная картина предпочтительного включения dGMP наблюдалась и в экспериментах на канонических для POLλ субстратах с однонуклеотидной брешью, однако эффективность синтеза была значительно ниже по сравнению с субстратом вида праймер–матрица, что не позволило надежно определить кинетические параметры. Вероятно, присутствие в субстрате запирающего праймера и необходимость вытеснять комплементарную цепь усложняет выпетливание матрицы при транслезионном синтезе POLλ. Кроме того, по литературным данным известно, что АП-сайты сильно дестабилируют дуплекс и искажают структуру цепи, находясь преимущественно вне двойной спирали [353–356]. Возможно, что АП-сайт и АП-MOX также влияют на конформацию ДНК с однонуклеотидной брешью. Например, легкое выпетливание АП-сайта и АП-MOX может стабилизировать непрерывный стэкинг ДНК-дуплекса, маскируя разрыв и мешая POLλ связаться с таким субстратом. В связи с этим интересно посмотреть на поведение другого представителя семейства X, ДНК-полимеразы β, которая также предпочитает бреши в качестве субстрата.

**Таблица 6.** Кинетические параметры реакции включения dNTP ДНК-полимеразами POLλ и POLβ на субстратах вида праймер–матрица (А) и субстратах вида праймер–матрица–запирающий праймер (Б), содержащих АП-сайт и аддукт с MOX.

| | ДНК- | **ДНК-субстрат** | **dNTP** | $K_M$, **мкМ** | $k_{cat}$, **с$^{-1}$** | $k_{sp}$, **мкМ$^{-1}$×с$^{-1}$** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| А | POLλ | АП-сайт | dATP | не детект. | не детект. | не детект. |
| А | POLλ | АП-сайт | dGTP | 0,340±0,040 | (8,30±0,20)×10$^{-4}$ | (2,41±0,29)×10$^{-3}$ |
| А | POLλ | АП-сайт | dTTP | не детект. | не детект. | не детект. |
| А | POLλ | АП-сайт | dCTP | не детект. | не детект. | не детект. |
| А | POLλ | АП-MOX | dATP | не детект. | не детект. | не детект. |
| А | POLλ | АП-MOX | dGTP | 0,650±0,160 | (9,40±0,40)×10$^{-4}$ | (1,45±0,36)×10$^{-3}$ |
| А | POLλ | АП-MOX | dTTP | не детект. | не детект. | не детект. |
| А | POLλ | АП-MOX | dCTP | не детект. | не детект. | не детект. |
| Б | POLβ | АП-сайт | dATP | 2,88±1,48 | (4,40±0,20)×10$^{-4}$ | (1,52±0,78)×10$^{-4}$ |
| Б | POLβ | АП-сайт | dGTP | не насыщ. | не насыщ. | (2,36±0,75)×10$^{-7}$ |
| Б | POLβ | АП-сайт | dTTP | не насыщ. | не насыщ. | (1,01±0,33)×10$^{-7}$ |
| Б | POLβ | АП-сайт | dCTP | 2,83±1,42 | (6,70±0,50)×10$^{-4}$ | (2,36±1,19)×10$^{-4}$ |
| Б | POLβ | АП-MOX | dATP | 6,27±2,36 | (5,20±0,30)×10$^{-4}$ | (8,29±3,16)×10$^{-5}$ |
| Б | POLβ | АП-MOX | dGTP | не насыщ. | не насыщ. | (1,88±0,61)×10$^{-7}$ |
| Б | POLβ | АП-MOX | dTTP | не насыщ. | не насыщ. | (1,11±0,19)×10$^{-7}$ |
| Б | POLβ | АП-MOX | dCTP | 18,2±7,3 | (7,30±0,60)×10$^{-4}$ | (4,02±1,64)×10$^{-5}$ |

«не детект.» — включение ниже предела детекции методом флуоресцетного сканирования.
«не насыщ.» — насыщение субстратом не достигается, не удается определить в виде отдельного кинетического параметра.

В отличие от ситуации в системе праймер–матрица, POLβ достаточно эффективно включала dNMP напротив АП-сайта и АП-MOX в субстрат с запирающим праймером (Таблица 6). Интересно, что по спектру предпочтения POLβ отличается и от POLλ, и от ДНК-полимераз семейств A и B, включая dCMP, наряду с dAMP, напротив АП-сайта и АП-MOX (A,C >> G,T в обоих случаях). При этом известная особенность POLβ при синтезе на матрицах, содержащих АП-сайт, а именно ее способность выпетливать 1–2 нуклеотида матрицы [352,357], может облегчать включение dAMP за счет микрогомологии с позицией +2 (Рисунок 42Б), однако не объясняет предпочтительного включения dCMP. АП-MOX вновь был худшим субстратом, чем АП-сайт, причем если напротив АП-сайта наблюдалось некоторое предпочтение включения dCMP, то напротив АП-MOX dAMP включался примерно в 2 раза лучше, чем dCMP (Таблица 6).

ДНК-полимераза κ — одна из 4 известных транслезионных ДНК-полимераз человека. Известно, что транслезионные ДНК-полимеразы на неповрежденных ДНК-матрицах ведут синтез даже менее эффективно, чем на матрицах, содержащих некоторые повреждения, что необходимо для выполнения их природных функций. Однако АП-сайт блокирует и транслезионные ДНК-полимеразы, наряду с ДНК-полимеразами других семейств. Согласно литературным данным, характерное время прохождения THF-АП-сайтов ДНК-полимеразами η, ι и κ составляет 4,6; 112 и 1823 с соответственно, что может свидетельствовать о том, что POLη обладает наибольшим потенциалом к прохождению АП-сайтов, а значит, возможно, участвует в прохождении АП-сайтов *in vivo* [241]. Несмотря на принадлежность этих ДНК-полимераз к одному структурному семейству, спектры dNMP, включаемых ими напротив THF-АП-сайта, сильно варьируют, в том числе и в зависимости от метода определения (кинетика или мутагенез *in vitro*): для POLη сообщалось о предпочтении в ряду A > G > T >> C или A,T > C,G, для POLι — T,G,A > C, для POLκ — A >> T >> C,G и A,C >> G,T [241,358]. При этом POLκ чаще других полимераз приводит к сдвигу рамки считывания из-за образования делеций [241].

В настоящей работе при изучении поведения POLκ на субстратах, содержащих АП-сайт, наблюдалось сильное предпочтение включения dATP напротив АП-сайта, а в целом предпочтение менялось в следующем ряду A > C > G,T, что согласуется с литературными данными по кинетике *in vitro* на THF-аналоге АП-сайта [358]. Если предпочтение к dAMP обуславливается «правилом A», которое отражает взаимодействия в активном центре полимеразы, то некоторые авторы объясняют предпочтение к dCMP «проскальзыванием» ДНК-полимеразы при наличии микрогомологии с концом праймера [359]. Однако в системе, использованной в настоящей работе, за повреждением следует Cyt, а значит, предпочтение POLκ включения dCMP напротив АП-сайта имеет другой механизм. Предпочтения на матрице,

содержащей АП-МОХ, сохранялось в этом же ряду, но эффективность включения dAMP была выше более чем в 5 раз (Таблица 7).

**Таблица 7.** Кинетические параметры реакции включения dNTP ДНК-полимеразой κ на субстратах, содержащих АП-сайт и аддукт с МОХ.

| ДНК-субстрат | dNTP | $K_M$, мкМ | $k_{cat}$, $c^{-1}$ | $k_{sp}$, мкМ$^{-1}$×с$^{-1}$ |
|---|---|---|---|---|
| АП-сайт | dATP | не насыщ. | не насыщ. | (3,49±0,35)×10$^{-6}$ |
| АП-сайт | dGTP | не насыщ. | не насыщ. | (1,43±0,39)×10$^{-7}$ |
| АП-сайт | dTTP | не насыщ. | не насыщ. | (1,63±0,33)×10$^{-7}$ |
| АП-сайт | dCTP | не насыщ. | не насыщ. | (7,29±0,92)×10$^{-7}$ |
| АП-МОХ | dATP | 157±48 | (3,06±0,44)×10$^{-3}$ | (19,5±6,59)×10$^{-6}$ |
| АП-МОХ | dGTP | не насыщ. | не насыщ. | (2,23±0,37)×10$^{-7}$ |
| АП-МОХ | dTTP | не насыщ. | не насыщ. | (1,73±0,44)×10$^{-7}$ |
| АП-МОХ | dCTP | не насыщ. | не насыщ. | (11,00±0,77)×10$^{-7}$ |

«не детект.» — включение ниже предела детекции методом флуоресцетного сканирования.
«не насыщ.» — насыщение субстратом не достигается, не удается определить в виде отдельного кинетического параметра.

Таким образом, исследованные ДНК-полимеразы не меняют специфичность по отношению к включаемым dNTP-субстратам при переходе с матриц, содержащих АП-сайт, на матрицы, содержащие АП-МОХ. В целом, происходит примерно двукратное падение эффективности синтеза на субстратах, содержащих аддукт с МОХ для ДНК-полимераз семейства A, B и X, однако POLκ из семейства Y напротив, ведет синтез эффективнее на субстрате, содержащем АП-МОХ.

### *4.4.3. Спектр включения dNMP напротив АП-сайта и аддукта АП-сайта с метоксиамином ДНК-полимеразами в ходе процессивного синтеза*

Изучение включения dNMP напротив повреждений с использованием единственного dNTP-субстрата и праймера, 3′-конец которого находится непосредственно перед повреждением, имеет определенные недостатки, основной из которых — влияние сродства ДНК-полимеразы к такому ДНК-субстрату на эффективность включения. Многие ДНК-полимеразы ведут процессивный синтез, и поврежденное звено матрицы попадает в их активный центр не при связывании субстрата из раствора, а при перемещении по уже связанной ДНК, что зачастую влияет на относительную эффективность включения разных dNMP.

Для определения возможности ДНК-полимераз проходить АП-МОХ и АП-сайт, а также для оценки спектра включения dNMP, были проведены реакции в условиях процессивного синтеза для каждой ДНК-полимеразы. В качестве модельного субстрата использовали матрицу, содержащую АП-сайт либо его аддукт с МОХ в заданной позиции, и праймер, заканчивающийся

за 4 нуклеотида до места повреждения; реакционная смесь содержала dNTP в эквимолярном соотношении. Все ферменты вели элонгацию праймера до тех пор, пока ДНК-полимераза не встречала повреждение. Далее наблюдались две выраженных точки паузы за 1 н. до места повреждения и непосредственно напротив повреждения. Эти последовательные сайты остановки ДНК-полимераз указывают на сложность включения dNMP напротив повреждения и на низкую эффективность следующего шага — включения нормального нуклеотида при расположении 3′-конца праймера напротив АП-сайта или АП-MOX. Тем не менее, АП-сайт проходился относительно эффективно ДНК-полимеразами KF и RB69, которые включали напротив него dAMP (Рисунок 49А, Рисунок 49Б). В литературе показано прохождение THF-аналога АП-сайта ДНК-полимеразами семейства B, в частности, комплексом POLδ/PCNA [358] и дефицитной по экзонуклеазной активности ДНК-полимеразой бактериофага T4 [360], однако детальные кинетические параметры синтеза на АП-содержащих матрицах ДНК-полимеразами семейства B еще не до конца изучены. Интересно, что KF напротив АП-сайта включает не только dAMP, но и, вероятно, dGMP, что видно из двойной полосы продукта на электрофорезе (Рисунок 49А, дорожки 7–8). При этом на субстрате с аддуктом с MOX ДНК-полимераза предпочитает включать dAMP (Рисунок 49А, дорожки 9–11). ДНК-полимераза RB69 в целом вела себя так же, однако была более избирательна по отношению к dAMP в случае АП-сайта (Рисунок 49Б, дорожки 6–7). Однако в то время как элонгация матрицы KF после прохода обоих повреждений проходила эффективно, ДНК-полимераза RB69 практически не включала следующий dNMP после повреждения.

ДНК-полимераза β была неспособна преодолевать повреждения в условиях реакции — наблюдалась остановка ДНК-полимераз за 1 н. до АП-сайта или АП-MOX (Рисунок 49В). Аналогичный эксперимент был проведен для POLλ, однако концентрация фермента была увеличена вследствие низкой процессивности фермента. Интересно, что в отличие от ситуации с праймером, заканчивающимся перед местом повреждения, где наблюдалось четкое предпочтение POLλ включать dGMP предположительно по механизму выпетливания матрицы, в условиях процессивного синтеза имело место включение dAMP напротив обоих повреждений (Рисунок 49Г). Это лишний раз демонстрирует важность использования дополнительных методов, а не только стационарной кинетики, при изучении предпочтения включаемых ДНК-полимеразами нуклеотидов.

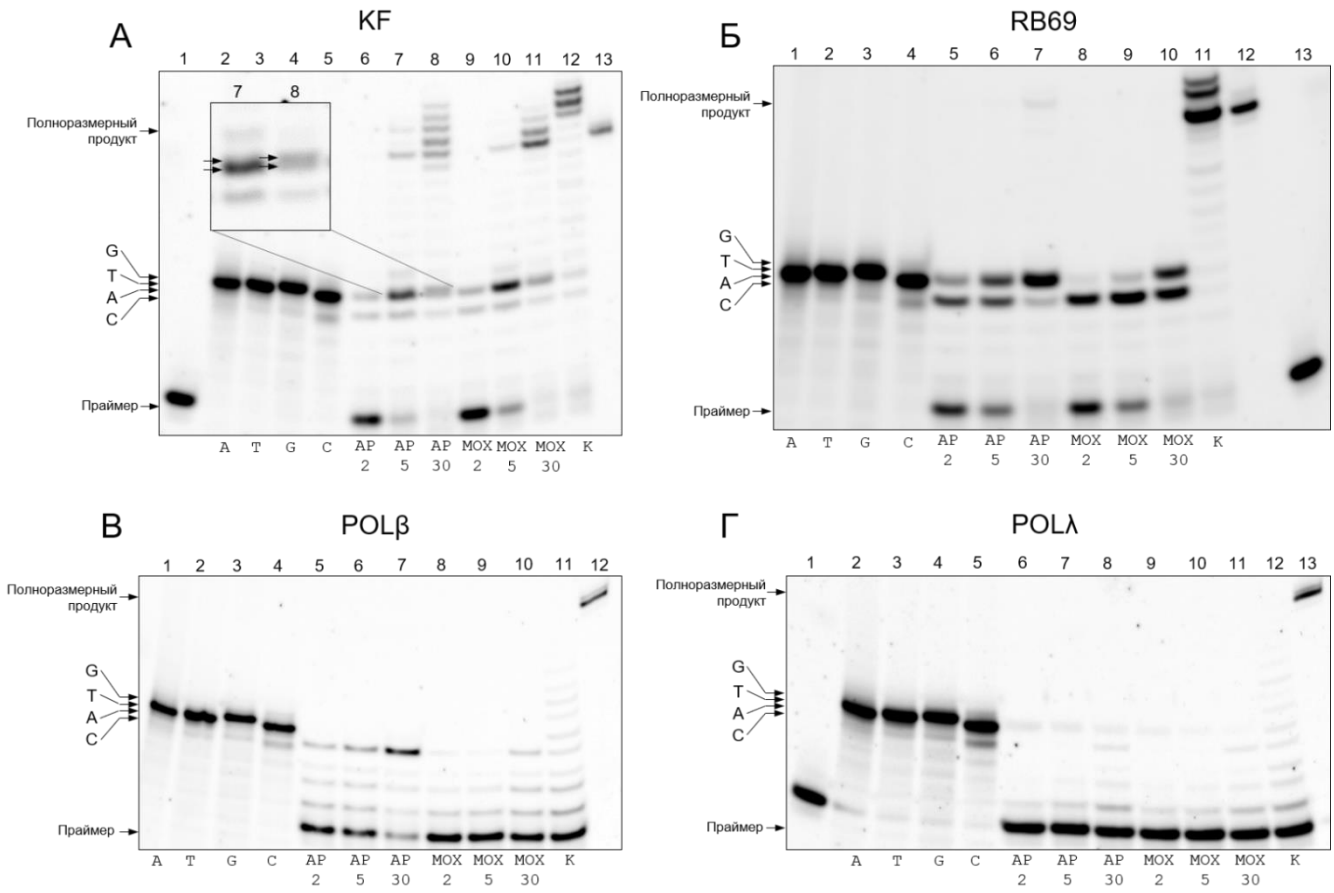


**Рисунок 49**. Электрофореграммы гелей после разделения продуктов синтеза ДНК ДНК-полимеразами на матрицах, содержащих АП-сайт или аддукт с МОХ. А — синтез ДНК-полимеразой KF на матрицах, содержащих АП-сайт или аддукт с МОХ. Б — синтез ДНК-полимеразой RB69 на матрицах, содержащих АП-сайт или аддукт с МОХ. В — синтез ДНК-полимеразой β на матрицах, содержащих АП-сайт или аддукт с МОХ. Г — синтез ДНК-полимеразой λ на матрицах, содержащих АП-сайт или аддукт с МОХ. Нумерация на А и Г одинаковая: дорожка 1 — маркер соответствующий длине исходного праймера; дорожки 2–5 — маркеры подвижности соответствующие длине до места повреждения, оканчивающиеся на A, T, G и C соответственно; дорожки 6–8 — реакция синтеза ДНК-полимеразой на матрице, содержащей АП-сайт, время инкубации 2, 5, 30 мин соответственно; дорожки 9–11 — реакция синтеза ДНК-полимеразой на матрице, содержащей аддукт с МОХ, время инкубации 2, 5, 30 мин соответственно; дорожка 12 — синтез ДНК-полимеразой на неповрежденном субстрате; дорожка 13 — маркер длиной 23, соответствующий полноразмерному продукту. Нумерация на Б и В одинаковая: дорожки 1–4 — маркеры подвижности соответствующие длине до места повреждения, оканчивающиеся на A, T, G и C соответственно; дорожки 5–7 — реакция синтеза ДНК-полимеразой на матрице, содержащей АП-сайт, время инкубации 2, 5, 30 мин соответственно; дорожки 8–10 — реакция синтеза ДНК-полимеразой на матрице, содержащей аддукт с МОХ, время инкубации 2, 5, 30 мин соответственно; дорожка 11 — синтез ДНК-полимеразой на неповрежденном субстрате; дорожка 12 — маркер длиной 23, соответствующий полноразмерному продукту; дорожка 13 — маркер соответствующий длине исходного праймера.

ДНК-полимераза κ была способна включать dAMP напротив АП-МОХ, хотя в основном синтез ДНК обрывался за один нуклеотид до места повреждения. При этом не наблюдается полноразмерного продукта реакции (Рисунок 50). Известно, что транслезионные ДНК-полимеразы обычно катализируют лишь включение dNMP напротив повреждения с ограниченной способностью к дальнейшей элонгации, которая обеспечивается следующей ДНК-полимеразой, сменяющей транслезионную. Например, ДНК-полимераза ι может эффективно

включать dNMP напротив определенных типов повреждений, таких как CPD-фотопродукты, но не способна элонгировать получившийся в результате праймер [361]. Таким образом, часто для преодоления повреждения необходимо присутствие двух (или более) ДНК-полимераз [362,363]. Интересно, что Dpo4, архейный гомолог эукариотической POLκ, способен проходить АП-сайт, хотя и с паузой напротив повреждения [359]. По этому свойству Dpo4 оказывается ближе к POLη. Исходя из этих соображений, были проведены эксперименты в схожих условиях, но в присутствии двух ДНК-полимераз, принадлежащих к разным семействам. В случае синтеза на субстратах, содержащих АП-сайт или АП-МОХ, парами ДНК-полимераз POLκ–POLβ, POLκ–KF и POLκ–RB69 эффективность синтеза значительно увеличивалась по сравнению с синтезом одной ДНК-полимеразой, и во всех реакциях присутствовал полноразмерный продукт синтеза независимо от типа повреждения (Рисунок 50Б). Тем не менее, обе точки паузы (в положении за 1 нуклеотид до места повреждения и непосредственно напротив повреждения) сохранялись, при этом при синтезе на матрицах, содерждащих аддукт с МОХ, наблюдалось менее гетерогенное включение dNMP напротив повреждения, чем в случае АП-сайта.

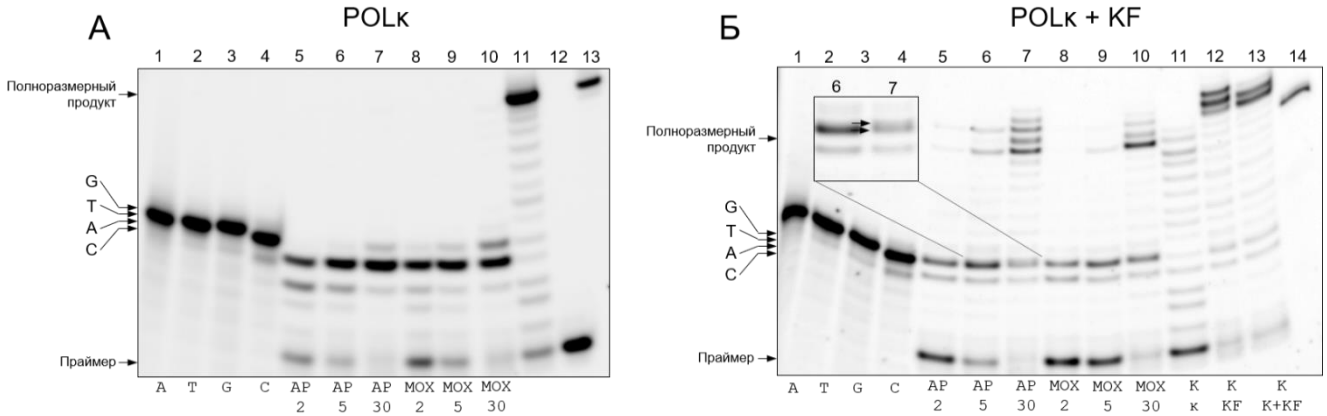


**Рисунок 50.** Электрофореграммы гелей после разделения продуктов синтеза ДНК ДНК-полимеразой κ (А) и совместно ДНК-полимеразами κ и KF (Б) на матрицах, содержащих АП-сайт или аддукт с МОХ. Нумерация на А — дорожки 1–4 — маркеры подвижности соответствующие длине до места повреждения, оканчивающиеся на A, T, G и C соответственно; дорожки 5–7 — реакция синтеза POLκ на матрице, содержащей АП-сайт, время инкубации 2, 5, 30 мин соответственно; дорожки 8–10 — реакция синтеза POLκ на матрице, содержащей аддукт с МОХ, время инкубации 2, 5, 30 мин соответственно; дорожка 11 — синтез POLκ на неповрежденном субстрате; дорожка 12 — маркер, соответствующей длине исходного праймера; дорожка 13 — маркер длиной 23, соответствующий полноразмерному продукту. Нумерация на Б — дорожки 1–4 — маркеры подвижности соответствующие длине до места повреждения, оканчивающиеся на A, T, G и C соответственно; дорожки 5–7 — реакция синтеза ДНК-полимеразами на матрице, содержащей АП-сайт, время инкубации 2, 5, 30 мин соответственно; дорожки 8–10 — реакция синтеза ДНК-полимеразами на матрице, содержащей аддукт с МОХ, время инкубации 2, 5, 30 мин соответственно дорожка 11 — синтез POLκ на неповрежденном субстрате; дорожка 12 — синтез KF на неповрежденном субстрате; дорожка 13 — синтез POLκ совместно с KF на неповрежденном субстрате; дорожка 14 — маркер длиной 23, соответствующий полноразмерному продукту.

Таким образом, предпочтения ДНК-полимераз к включению dNMP напротив повреждения в целом близки для АП-сайта и АП-МОХ, однако напротив АП-МОХ ДНК-

полимеразы более селективно включают dAMP (Таблица 8), хотя общая эффективность синтеза на таких матрицах несколько снижена. Тем не менее, в реакциях, где присутствовало две ДНК-полимеразы, разница в эффективности синтеза практически полностью нивелировалась.

**Таблица 8.** Предпочтения ДНК-полимераз к нуклеотиду, включаемому напротив повреждения в условиях процессивного синтеза.

| ДНК-полимераза | Предпочтение на субстрате, содержащем АП-сайт | Предпочтение на субстрате, содержащем АП-МОХ |
|---|---|---|
| KF | dAMP/dGMP | dAMP |
| RB69 | dAMP/dGMP | dAMP |
| POLβ | не вкл. | не вкл. |
| POLλ | dAMP | dAMP |
| POLκ | dAMP | dAMP |

“не вкл.» — ДНК-полимераза не включала нуклеотид напротив повреждения.

### *4.4.4. Влияние аддукта АП-сайта с метоксиамином на активность некоторых ДНК-гликозилаз*

Как известно, АП-сайт представляет собой субстрат не только для APEX1, но и для других участников пути ЭРО, в частности ДНК-гликозилаз с ассоциированной АП-лиазной активностью. Однако способность последних расщеплять субстрат с аддуктом с МОХ изучалась лишь в очень немногих работах с бактериальными и фаговыми ферментами [364,365]. Была проверена способность бифункциональных ДНК-гликозилаз Fpg и Nei *E. coli* и гомологичной последней ДНК-гликозилазы человека NEIL1 расщеплять аддукты АП-МОХ в двуцепочечном олигонуклеотидном субстрате (Рисунок 51). Активность всех исследованных ферментов на субстрате АП-МОХ была значительно ниже, чем на АП-сайте. Причем для ДНК-гликозилазы Nei снижение активности было выражено в той же степени, что и для гидролитической АП-эндонуклеазы APEX1. Снижение активности ДНК-гликозилаз, скорее всего, связано с меньшим положительным зарядом на атоме C1′ при замене альдегидного атома O на гидроксилиминную группу =N−O−$CH_3$, что делает атом C1′ менее выгодным для нуклеофильной атаки каталитической аминогруппой остатка Pro1 в активном центре фермента.

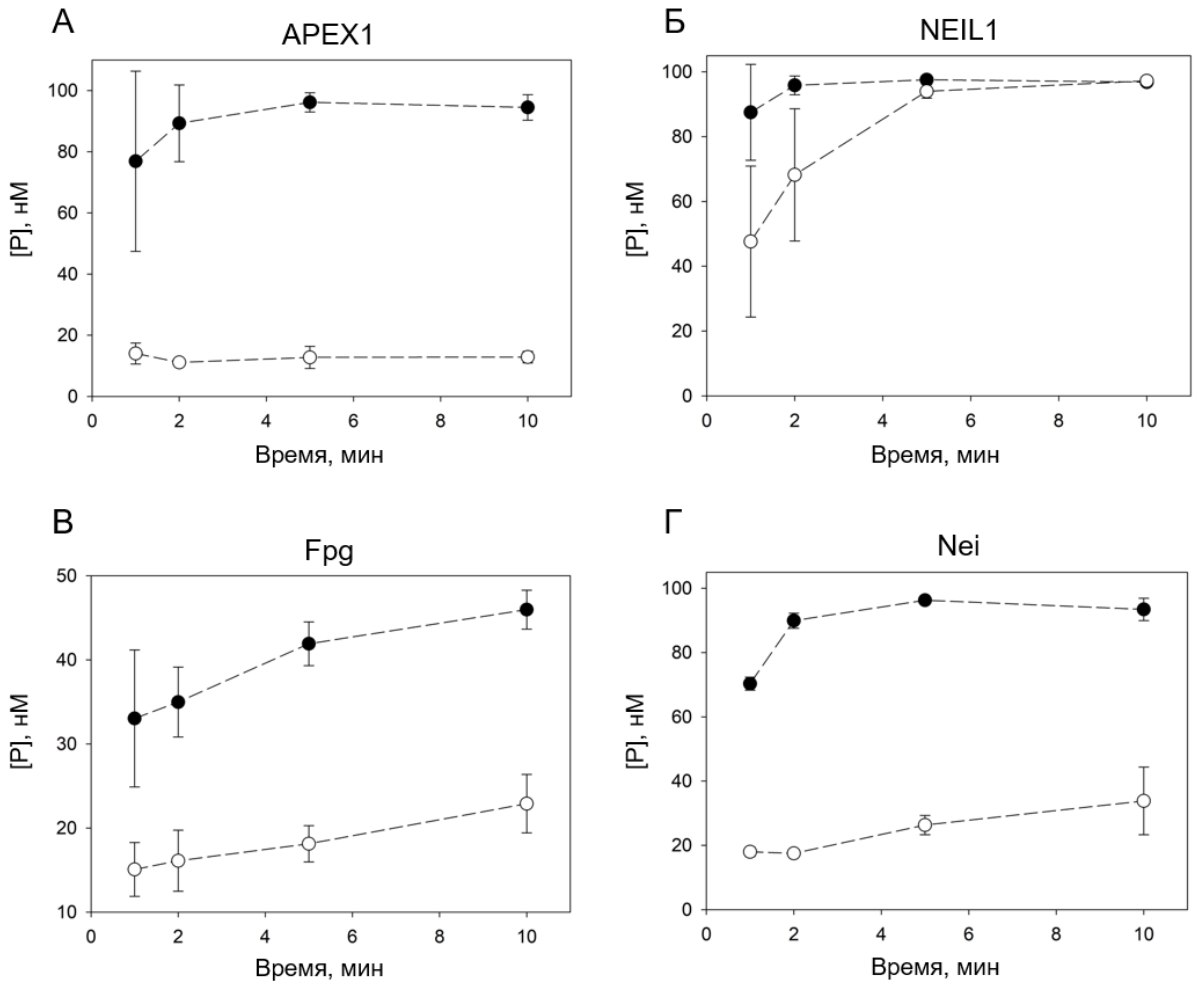


**Рисунок 51.** Графики зависимости концентрации продукта реакции расщепления от времени АП-сайт содержащих субстратов или субстратов, содержащих аддукт АП-сайта с МОХ АП-эндонуклеазой APEX1 (А) и ДНК-гликозилазами NEIL1 (Б), Fpg (В), Nei (Г). Черные кружки — АП-сайт содержащий субстрат; белые кружки — субстрат, содержащий аддукт АП-сайта с МОХ. Данные получены по результатам трех независимых экспериментов.

Таким образом, можно считать, что аддукт метоксиамина с АП-сайтом, будучи устойчивым к репарации ДНК, не будет обладать повышенными мутагенными свойствами по сравнению с исходным повреждением — альдегидным АП-сайтом. Отсутствие дополнительной генотоксичности увеличивает перспективность метоксиамина как потенциального противоопухолевого соединения, действующего синергично с агентами, повреждающими ДНК [56].

# 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа представляет собой первое исследование, в котором проведено сравнение процесса остановки ДНК-полимераз, принадлежащих к разным структурным семействам, в присутствии блокирующих повреждений разного размера и разной химической структуры. Такое сравнение позволяет выделить ряд закономерностей в процессе остановки синтеза ДНК и сформулировать некоторые гипотезы для дальнейшей работы.

Впервые, на основании картирования сайтов остановок ДНК-полимераз при взаимодействии с ДНК-белковыми сшивками, предложена модель взаимодействия ДНК-полимераз с объемными препятствиями, которая названа автором «kiss-and-push». Она описывает взаимодействие в терминах соприкосновения поверхностей белковых глобул («kiss») и их дальнейшей деформации («push»). Данная модель имеет возможность прямой экспериментальной проверки: например, возможна идентификация экспонированных в раствор пептидов масс-спектрометрическими методами, анализ деформации белковых глобул флуоресцентной спектроскопией и непосредственный структурный анализ методами рентгеновской кристаллографии или криоэлектронной микроскопии. Очевидно, что такая же логика последовательных структурных событий может быть применима не только к ДНК-полимеразам и ДНК-белковым сшивкам, но и к другим белковым комплексам, связанным с ДНК и препятствующим движению других белков вдоль ее контура. Процессы диффузии белков по контуру ДНК в условиях конкуренции за ее связывание сейчас изучены очень слабо, и предложено несколько механизмов, описывающих вытеснение одного белка другим: активное вытеснение с непосредственным контактом между белками, активное вытеснение за счет деформации ДНК, передающейся через ДНК-белковый футпринт, пассивная конкуренция за связывание определенных сайтов ДНК, передача заряда по ДНК между редокс-активными белками и т. п. Данные, полученные в настоящей работе при изучении взаимодействия ковалентных сшивок и прочно связанных белков, поддерживают первый из этих механизмов. Модель с пришивкой ДНК-гликозилаз к ДНК может быть расширена с использованием других ферментов этого класса, способных образовывать основания Шиффа; некоторые из них (например, OGG1) можно параллельно изучать как в виде ковалентных сшивок, так и прочно связанных белков.

Соединения на основе платины с полиоксометаллатными лигандами, рассматриваемые как потенциальные противоопухолевые соединения, представляют интерес с точки зрения своей способности образовывать крупные аддукты небелковой природы. Полиоксониобат платины, использованный в данной работе, давал моноаддукт с ДНК с молекулярной массой ~1.5 кДа. Вполне вероятно, что аддукты такого размера способны деформировать глобулу

продвигающейся ДНК-полимеразы, и взаимодействие полимераз с ними может быть описано моделью «kiss-and-push». К тому же, наличие полиоксометаллатного аддукта в непосредственном окружении ДНК-полимеразы может индуцировать ее ковалентный захват при наличии подходящего электрофильного центра наподобие координирующего иона платины. Дальнейшее изучение подробного механизма взаимодействия ДНК-полимераз с полиоксометаллатами платины представляет значительный интерес, поскольку эти комплексные соединения могут обладать рядом фармакодинамических преимуществ по сравнению с классическими терапевтическими средствами на основе платины.

Метоксиамин — еще одно изученное в ходе работы соединение, способное образовывать ковалентные аддукты с ДНК, но не с каноническими нуклеотидами, а с АП-сайтами. Устойчивость таких аддуктов к репарации вызывает интерес с точки зрения использования метоксиамина в комбинации с повреждающими ДНК агентами, и в настоящее время он проходит клинические испытания. Однако его влияние на системы матричного синтеза и в целом его токсичность для нормальных клеток еще не изучены. В настоящей работе впервые исследован спектр включения dNMP напротив аддуктов, образованных метоксиамином с АП-сайтом, а также их способность ингибировать другие компоненты эксцизионной репарации оснований. Выяснилось, что по своей потенциальной мутагенности аддукты с метоксиамином не более опасны, чем неконъюгированный АП-сайт. Подобные результаты крайне важны для характеристики биохимических свойств соединения, которое, возможно, в скором времени будет внедрено в клиническую практику. Как ни странно, в литературе описано очень мало результатов по биологическим свойствам метоксиаминовых аддуктов, и результаты работы уже легли в основу совместных исследований между ИХБФМ СО РАН и Майнцским университетом (Германия), посвященных изучению механизмов цитотоксичности и мутагенности метоксиамина в клетках человека.

Подытоживая сказанное, можно с уверенностью утверждать, что настоящая работа даст толчок исследованиям в нескольких направлениях, связанных с взаимодействием ДНК-полимераз и препятствий в ДНК, имеющих как фундаментальный, так и практический интерес.

# 6. ВЫВОДЫ

1. На основе стабилизированного восстановлением $NaBH_4$ конъюгата белка Fpg с ДНК созданы модели олигонуклеотидных дуплексов, содержащих ДНК-белковую сшивку в одноцепочечной ДНК, в матричной и нематричной цепях в составе двуцепочечной ДНК. Фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *Escherichia coli*, ДНК-полимераза I *Thermus aquaticus*, ДНК-полимераза *Pyrococcus furiosus*, ДНК-полимераза IV *Sulfolobus solfataricus*, ДНК-полимеразы β, λ и κ человека, ДНК-полимеразы бактериофагов T4 и RB69 не способны пройти сшивку, находящуюся в ДНК в любом контексте. ДНК-полимеразы семейства B способны вести синтез до точки сшивки при ее наличии в одноцепочечной ДНК или в вытесняемой цепи. Прочие ДНК-полимеразы в основном останавливаются за 4–5 нуклеотидов до точки сшивки в одноцепочечной ДНК. Те из них, которые способны вытеснять впереди лежащую цепь, также останавливаются за 4–5 нуклеотидов до точки сшивки при ее наличии в вытесняемой цепи.
2. Как белки, активно передвигающиеся по ДНК с затратой энергии (фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, ДНК-полимераза β человека, ДНК-полимераза бактериофага RB69), так и белки, пассивно диффундирующие по контуру ДНК (белок D4 вируса осповакцины), способны вытеснять белки OGG1 и NEIL1 из высокоаффинных комплексов с ДНК, но большинство из них неспособно вытеснять рибонуклеопротеин Cas9, комплекс которого дополнительно стабилизирован взаимодействиями РНК–ДНК.
3. Полиоксониобат платины структуры $[(Nb_6O_{19})_2\{Pt(OH)_2\}_2]^{12-}$ образует аддукты с ДНК, которые подавляют синтез ДНК фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, ДНК-полимеразой IV *S. solfataricus*, ДНК-полимеразами β и κ человека и ДНК-полимеразой бактериофага RB69.
4. ДНК-полимеразы различаются по способности включать dNMP напротив апурин-апиримидинового (АП-) сайта и его аддукта с метоксиамином. Фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, принадлежащий к структурному семейству A, следует «правилу A», преимущественно включая dAMP в обоих случаях. Репликативная ДНК-полимераза бактериофага RB69 из семейства B включает dAMP и dGMP со сходной эффективностью. Репаративные ДНК-полимеразы β и λ семейства X отличаются друг от друга: первая включает dAMP и dCMP, а вторая — dGMP. Транслезионная ДНК-полимераза κ семейства Y включает в основном dAMP, при этом она использует субстрат с метоксиаминовым аддуктом значительно более эффективно, чем субстрат с АП-сайтом.

# 7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

| | |
|---|---|
| γ-HOPdG | 1,$N^2$-γ-гидроксипропано-dG |
| 8-oxoGua | 8-оксогуанин; 2-амино-7,9-дигидро-1*H*-пурин-6,8-дион |
| APEX1 | apurinic/apyrimidinic endonuclease 1, апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 |
| C2-AP | C2′-окисленный АП-сайт (2,3-дигидрокси 5-оксобутилфосфат) |
| C4-AP | C4′-окисленный АП-сайт ((3R)-2-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2,3,5-триолметилфосфат) |
| CPD | циклобутановые пиримидиновые димеры |
| DOB | C5′-окисленный АП-сайт ((3R)-тетрагидрофуран-2,3,5-триол) |
| DRL | 2-дезоксириболактонфосфат |
| dRP | deoxyribose phosphate, дезоксирибозофосфатная группа |
| FEN1 | flap endonuclease 1, флэп-эндонуклеаза 1 |
| HEPES | 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота |
| KF | Фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E.coli* |
| MOX | метоксиамин |
| POL | ДНК-полимераза |
| Pt-ПОН | полиоксониобат платины вида $[(Nb_6O_{19})_2\{Pt(OH)_2\}_2]^{12-}$ |
| SDS | додецилсульфат натрия |
| THF | стабильный циклический аналог АР-сайта, (3-гидроксителрагидрофуран-2-ил)метилфосфат |
| а. к. о. | аминокислотные остатки |
| АП | апуриновый-апиримидиновый |
| АП-MOX | 2,3-дигидрокси-5-(метоксиимино)пентилфосфат; аддукт АП-сайта с метоксиамином |
| АФК | активные формы кислорода |
| БСА | бычий сывороточный альбумин |
| ГР | гомологичная рекомбинация |
| ДБС | ДНК-белковая сшивка (ДНК-белковые сшивки) |
| ДРФаза | дезоксирибофосфатлиаза |
| ДРФазная | дезоксирибофосфатлиазная |
| ДТТ | 1,4-дитиотреит |
| дц | двухцепочечный(ая) |
| ДЦР | двуцепочечный разрыв |
| е.а. | единица активности фермента |

| | |
|---|---|
| н. | нуклеотид |
| ОДН | олигодезоксирибонуклеотид(ы), олигодезоксирибонуклеотидный |
| оц | одноцепочечный(ая) |
| ОЦР | одноцепочечный разрыв |
| ПААГ | полиакриламидный гель |
| п. н. | пар нуклеотидов |
| Трис | 2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол |
| ТТ | тимин-тиминовый |
| ЭДТА | этилендиамин-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота |
| ЭРН | эксцизионная репарация нуклеотидов |
| ЭРО | эксцизионная репарация оснований |

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

# 8. СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ


1. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // Nature. – 1993. – V. 362. – № 6422. – P. 709–715.
2. Lindahl T., Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid // Biochemistry. – 1972. – V. 11. – № 19. – P. 3610–3618.
3. Atamna H., Cheung I., Ames B.N. A method for detecting abasic sites in living cells: age-dependent changes in base excision repair // Proc. Natl Acad. Sci. U S A. – 2000. – V. 97. – № 2. – P. 686–691.
4. Zoltewicz J.A., Clark D.F., Sharpless T.W., Grahe G. Kinetics and mechanism of the acid-catalyzed hydrolysis of some purine nucleosides // J. Am. Chem. Soc. – 1970. – V. 92. – № 6. – P. 1741–1749.
5. Greenberg M.M. Abasic and oxidized abasic site reactivity in DNA: enzyme inhibition, cross-linking, and nucleosome catalyzed reactions // Acc. Chem. Res. – 2014. – V. 47. – № 2. – P. 646–655.
6. Guan L., Greenberg M.M. DNA interstrand cross-link formation by the 1,4-dioxobutane abasic lesion // J. Am. Chem. Soc. – 2009. – V. 131. – № 42. – P. 15225–15231.
7. Ghosh S., Greenberg M.M. Correlation of thermal stability and structural distortion of DNA interstrand cross-links produced from oxidized abasic sites with their selective formation and repair // Biochemistry. – 2015. – V. 54. – № 40. – P. 6274–6283.
8. DeMott M.S., Beyret E., Wong D., Bales B.C., Hwang J.-T., Greenberg M.M., Demple B. Covalent trapping of human DNA polymerase β by the oxidative DNA lesion 2-deoxyribonolactone // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277. – № 10. – P. 7637–7640.
9. Sczepanski J.T., Wong R.S., McKnight J.N., Bowman G.D., Greenberg M.M. Rapid DNA-protein cross-linking and strand scission by an abasic site in a nucleosome core particle // Proc. Natl Acad. Sci. U S A. – 2010. – V. 107. – № 52. – P. 22475–22480.
10. Lindahl T., Andersson A. Rate of chain breakage at apurinic sites double-stranded deoxyribonucleic acid // Biochemistry. – 1972. – V. 11. – № 19. – P. 3618–3623.
11. Caldecott K.W. Single-strand break repair and genetic disease // Nat. Rev. Genet. – 2008. – V. 9. – № 8. – P. 619–631.
12. Abbotts R., Wilson D.M. Coordination of DNA single strand break repair // Free Radic. Biol. Med. – 2017. – V. 107. – P. 228–244.
13. Greenberg M.M., Weledji Y.N., Kroeger K.M., Kim J. In vitro replication and repair of DNA containing a C2′-oxidized abasic site // Biochemistry. – 2004. – V. 43. – № 48. – P. 15217–15222.
14. Wong R.S., Sczepanski J.T., Greenberg M.M. Excision of a lyase-resistant oxidized abasic lesion from DNA // Chem. Res. Toxicol. – 2010. – V. 23. – № 4. – P. 766–770.
15. Kow Y.W., Wallace S.S. Mechanism of action of *Escherichia coli* endonuclease III // Biochemistry. – 1987. – V. 26. – № 25. – P. 8200–8206.
16. Hashimoto M., Greenberg M.M., Kow Y.W., Hwang J.-T., Cunningham R.P. The 2-deoxyribonolactone lesion produced in DNA by neocarzinostatin and other damaging agents forms cross-links with the base-excision repair enzyme endonuclease III // J. Am. Chem. Soc. – 2001. – V. 123. – № 13. – P. 3161–3162.
17. Kroeger K.M., Hashimoto M., Kow Y.W., Greenberg M.M. Cross-linking of 2-deoxyribonolactone and its β-elimination product by base excision repair enzymes // Biochemistry. – 2003. – V. 42. – № 8. – P. 2449–2455.
18. Nakano T., Terato H., Asagoshi K., Masaoka A., Mukuta M., Ohyama Y., Suzuki T., Makino K., Ide H. DNA-protein cross-link formation mediated by oxanine // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – № 27. – P. 25264–25272.
19. Guan L., Greenberg M.M. Irreversible inhibition of DNA polymerase β by an oxidized abasic lesion // J. Am. Chem. Soc. – 2010. – V. 132. – № 14. – P. 5004–5005.
20. Guan L., Bebenek K., Kunkel T.A., Greenberg M.M. Inhibition of short-patch and long-patch

base excision repair by an oxidized abasic site // Biochemistry. – 2010. – V. 49. – № 45. – P. 9904–9910.
21. Goodman M.F., Cai H., Bloom L.B., Eritja R. Nucleotide insertion and primer extension at abasic template sites in different sequence contexts // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1994. – V. 726. –P. 132–143.
22. Cuniasse P., Fazakerley G. V, Guschlbauer W., Kaplan B.E., Sowers L.C. The abasic site as a challenge to DNA polymerase. A nuclear magnetic resonance study of G, C and T opposite a model abasic site // J. Mol. Biol. – 1990. – V. 213. – P. 303–314.
23. Sagher D., Strauss B. Insertion of nucleotides opposite apurinic apyrimidinic sites in deoxyribonucleic acid during in vitro synthesis: uniqueness of adenine nucleotides // Biochemistry. – 1983. – V. 22. – № 19. – P. 4518–4526.
24. Schaaper R.M., Kunkel T.A., Loeb L.A. Infidelity of DNA synthesis associated with bypass of apurinic sites // Proc. Natl Acad. Sci. U S A.– 1983. – V. 80. – № 2. – P. 487–491.
25. Taylor J.S. New structural and mechanistic insight into the A-rule and the instructional and non-instructional behavior of DNA photoproducts and other lesions // Mutat. Res. – 2002. – V. 510. – № 1–2. – P. 55–70.
26. Neto J.B.C., Gentil A., Cabral R.E.C., Sarasin A. Mutation spectrum of heat-induced abasic sites on a single-stranded shuttle vector replicated in mammalian cells // J. Biol. Chem. – 1992. – V. 267. – № 27. – P. 19718–19723.
27. Neto J.B.C., Cabral R.E.C., Margot A., Le Page F., Sarasin A., Gentil A. Coding properties of a unique apurinic/apyrimidinic site replicated in mammalian cells // J. Mol. Biol. – 1994. – V. 240. – № 5. – P. 416–420.
28. Kunz B.A., Henson E.S., Roche H., Ramotar D., Nunoshiba T., Demple B. Specificity of the mutator caused by deletion of the yeast structural gene (*APN1*) for the major apurinic endonuclease // Proc. Natl Acad. Sci. U S A. – 1994. – V. 91. – № 17. – P. 8165–8169.
29. Kamiya H., Suzuki M., Ohtsuka E. Mutation-spectrum of a true abasic site in codon 12 of a c-Ha-*ras* gene in mammalian cells // FEBS Lett. – 1993. – V. 328. – № 1–2. – P. 125–129.
30. Auerbach P., Bennett R.A.O., Bailey E.A., Krokan H.E., Demple B. Mutagenic specificity of endogenously generated abasic sites in *Saccharomyces cerevisiae* chromosomal DNA // Proc. Natl Acad. Sci. U S A. – 2005. – V. 102. – № 49. – P. 17711–17716.
31. Fleck O., Schär P. Translesion DNA synthesis: little fingers teach tolerance // Curr. Biol. – 2004. – V. 14. – № 10. – P. 389–391.
32. Cai H., Bloom L.B., Eritja R., Goodman M.F. Kinetics of deoxyribonucleotide insertion and extension at abasic template lesions in different sequence contexts using HIV-1 reverse transcriptase // J. Biol. Chem. – 1993. – V. 268. – № 31. – P. 23567–23572.
33. Hogg M., Wallace S.S., Doublié S. Crystallographic snapshots of a replicative DNA polymerase encountering an abasic site // EMBO J. – 2004. – V. 23. – № 7. – P. 1483–1493.
34. Mohni K.N., Wessel S.R., Zhao R., Wojciechowski A.C., Luzwick J.W., Layden H., Eichman B.F., Thompson P.S., Mehta K.P.M., Cortez D. HMCES maintains genome integrity by shielding abasic sites in single-strand DNA // Cell. – 2019. – V. 176. – № 1–2. – P. 144–153.
35. Lawley P.D., Phillips D.H. DNA adducts from chemotherapeutic agents // Mutat. Res. – 1996. – V. 355. – № 1–2. – P. 13–40.
36. Bryant H.E., Schultz N., Thomas H.D., Parker K.M., Flower D., Lopez E., Kyle S., Meuth M., Curtin N.J., Helleday T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase // Nature. – 2005. – V. 434. – № 7035. – P. 913–917.
37. Farmer H., McCabe N., Lord C.J., Tutt A.N.J., Johnson D.A., Richardson T.B., Santarosa M., Dillon K.J., Hickson I., Knights C., Martin N.M.B., Jackson S.P., Smith G.C.M., Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy // Nature. – 2005. – V. 434. – № 7035. – P. 917–921.
38. Lord C.J., Tutt A.N.J., Ashworth A. Synthetic lethality and cancer therapy: lessons learned from the development of PARP inhibitors // Annu. Rev. Med. – 2015. – V. 66. – P. 455–470.

39. Madhusudan S., Middleton M.R. The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer // Cancer Treat. Rev. – 2005. – V. 31. – № 8. – P. 603–617.
40. Liu L., Gerson S.L. Therapeutic impact of methoxyamine: blocking repair of abasic sites in the base excision repair pathway // Curr. Opin. Investig. Drugs. – 2004. – V. 5. – № 6. – P. 623–627.
41. Liuzzi M., Talpaert-Borle M. A new approach to the study of the base-excision repair pathway using methoxyamine // J. Biol. Chem. – 1985. – V. 260. – № 9. – P. 5252–5258.
42. Talpaert-Borle M., Liuzzi M. Reaction of apurinic/apyrimidinic sites with [$^{14}$C]methoxyamine. A method for the quantitative assay of AP sites in DNA // Biochim. Biophys. Acta. – 1983. – V. 740. – № 4. – P. 410–416.
43. Avendaño C., Menéndez J.C. Drugs that modulate resistance to antitumor agents / Avendaño C., Menéndez J.C. Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs. – Amsterdam: Elsevier Science, 2015. – P. 655–700.
44. Taverna P., Liu L., Hwang H.S., Hanson A.J., Kinsella T.J., Gerson S.L. Methoxyamine potentiates DNA single strand breaks and double strand breaks induced by temozolomide in colon cancer cells // Mutat. Res. – 2001. – V. 485. – № 4. – P. 269–281.
45. Liu L., Nakatsuru Y., Gerson S.L. Base excision repair as a therapeutic target in colon cancer // Clin. Cancer Res. – 2002. – V. 8. – № 9. – P. 2985–2991.
46. Bulgar A.D., Weeks L.D., Miao Y., Yang S., Xu Y., Guo C., Markowitz S., Oleinick N., Gerson S.L., Liu L. Removal of uracil by uracil DNA glycosylase limits pemetrexed cytotoxicity: Overriding the limit with methoxyamine to inhibit base excision repair // Cell Death Dis. – 2012. – V. 3. – e252.
47. Taverna P., Hwang H. shin, Schupp J.E., Radivoyevitch T., Session N.N., Reddy G., Zarling D.A., Kinsella T.J. Inhibition of base excision repair potentiates iododeoxyuridine-induced cytotoxicity and radiosensitization // Cancer Res. – 2003. – V. 63. – № 4. – P. 838–846.
48. Guerreiro P.S., Fernandes A.S., Costa J.G., Castro M., Miranda J.P., Oliveira N.G. Differential effects of methoxyamine on doxorubicin cytotoxicity and genotoxicity in MDA-MB-231 human breast cancer cells // Mutat. Res. – 2013. – V. 757. – № 2. – P. 140–147.
49. Yan T. Methoxyamine potentiates iododeoxyuridine-induced radiosensitization by altering cell cycle kinetics and enhancing senescence // Mol. Cancer Ther. – 2006. – V. 5. – № 4. – P. 893–902.
50. Liu L., Taverna P., Whitacre C.M., Chatterjee S., Gerson S.L. Pharmacologic disruption of base excision repair sensitizes mismatch repair-deficient and -proficient colon cancer cells to methylating agents // Clin. Cancer Res. – 1999. – V. 5. – № 10. – P. 2908–2917.
51. Oleinick N.L., Biswas T., Patel R., Tao M., Patel R., Weeks L., Sharma N., Dowlati A., Gerson S.L., Fu P., Zhang J., Machtay M. Radiosensitization of non-small-cell lung cancer cells and xenografts by the interactive effects of pemetrexed and methoxyamine // Radiother. Oncol. – 2016. – V. 121. – № 2. – P. 335–341.
52. She M., Pan J., Sun L., Yeung S.C.J. Enhancement of manumycin A-induced apoptosis by methoxyamine in myeloid leukemia cells // Leukemia. – 2005. – V. 19. – № 4. – P. 595–602.
53. Yan L., Bulgar A., Miao Y., Mahajan V., Donze J.R., Gerson S.L., Liu L. Combined treatment with temozolomide and methoxyamine: blocking apurininc/apyrimidinic site repair coupled with targeting topoisomerase II // Clin. Cancer Res. – 2007. – V. 13. – № 5. – P. 1532–1539.
54. Fishel M.L., He Y., Smith M.L., Kelley M.R. Manipulation of base excision repair to sensitize ovarian cancer cells to alkylating agent temozolomide // Clin. Cancer Res. – 2007. – V. 13. – № 1. – P. 260–267.
55. Montaldi A.P., Sakamoto-Hojo E.T. Methoxyamine sensitizes the resistant glioblastoma T98G cell line to the alkylating agent temozolomide // Clin. Exp. Med. – 2013. – V. 13. – № 4. – P. 279–288.
56. Caimi P.F., Cooper B.W., William B.M., Dowlati A., Barr P.M., Fu P., Pink J., Xu Y., Lazarus H.M., de Lima M., Gerson S.L. Phase I clinical trial of the base excision repair inhibitor

methoxyamine in combination with fludarabine for patients with advanced hematologic malignancies // Oncotarget. – 2017. – V. 8. – № 45. – P. 79864–79875.
57. Gdaniec Z., Ban B., Sowers L.C., Fazakerley G.V. Methoxyamine-induced mutagenesis of nucleic acids // Eur. J. Biochem. – 1996. – V. 242. – № 2. – P. 271–279.
58. Das A., Wiederhold L., Leppard J.B., Kedar P., Prasad R., Wang H., Boldogh I., Karimi-Busheri F., Weinfeld M., Tomkinson A.E., Wilson S.H., Mitra S., Hazra T.K. NEIL2-initiated, APE-independent repair of oxidized bases in DNA: Evidence for a repair complex in human cells // DNA Repair. – 2006. – V. 5. – № 12. – P. 1439–1448.
59. Wiederhold L., Leppard J.B., Kedar P., Karimi-Busheri F., Rasouli-Nia A., Weinfeld M., Tomkinson A.E., Izumi T., Prasad R., Wilson S.H., Mitra S., Hazra T.K. AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells // Mol. Cell. – 2004. – V. 15. – № 2. – P. 209–220.
60. Takeshita M., Chang C.N., Johnson F., Will S., Grollman A.P. Oligodeoxynucleotides containing synthetic abasic sites. Model substrates for DNA polymerases and apurinic/apyrimidinic endonucleases // J. Biol. Chem. – 1987. – V. 262. – № 21. – P. 10171–10179.
61. Strauss P.R., Beard W.A., Patterson T.A., Wilson S.H. Substrate binding by human apurinic/apyrimidinic endonuclease indicates a Briggs-Haldane mechanism // J. Biol. Chem. – 1997. – V. 272. – № 2. – P. 1302–1307.
62. Jung Y., Lippard S.J. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage // Chem. Rev. – 2007. – V. 107. – № 5. – P. 1387–1407.
63. Cimino G.D., Gamper H.B., Isaacs S.T., Hearst J.E. Psoralens as photoactive probes of nucleic acid structure and function: organic chemistry, photochemistry, and biochemistry // Annu. Rev. Biochem. – 1985. – V. 54. – P. 1151–1193.
64. Tessman J.W., Isaacs S.T., Hearst J.E. Photochemistry of the furan-side 8-methoxypsoralen-thymidine monoadduct inside the DNA helix. Conversion to diadduct and to pyrone-side monoadduct // Biochemistry. – 1985. – V. 24. – № 7. – P. 1669–1676.
65. Yeung A.T., Jones B.K., Chu C.T. Photoreactivities and thermal properties of psoralen cross-links // Biochemistry. – 1988. – V. 27. – № 9. – P. 3204–3210.
66. Tomasz M. $H_2O_2$ generation during the redox cycle of mitomycin C and DNA-bound mitomycin C // Chem. Biol. Interact. – 1976. – V. 13. – № 1. – P. 89–97.
67. Tomasz M., Lipman R. Reductive metabolism and alkylating activity of mitomycin C induced by rat liver microsomes // Biochemistry. – 1981. – V. 20. – № 17. – P. 5056–5061.
68. Stone M.P., Cho Y.-J., Huang H., Kim H.-Y., Kozekov I.D., Kozekova A., Wang H., Minko I.G., Lloyd R.S., Harris T.M., Rizzo C.J. Interstrand DNA cross-links induced by α,β-unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation and environmental sources // Acc. Chem. Res. – 2008. – V. 41. – № 7. – P. 793–804.
69. Ефимов В.А., Федюнин С.В. Кросс-сшитые нуклеиновые кислоты: получение, структура и биологическая роль // Успехи биологической химии. – 2010. – Т. 50. – С. 259–302.
70. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy // Nat. Rev. Cancer. – 2007. – V. 7. – № 8. – P. 573–584.
71. Florea A.-M., Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects // Cancers. – 2011. – V. 3. – № 1. – P. 1351–1371.
72. Jamieson E.R., Lippard S.J. Structure, recognition, and processing of cisplatin−DNA adducts // Chem. Rev. – 1999. – V. 99. – № 9. – P. 2467–2498.
73. Roy U., Schärer O.D. Involvement of translesion synthesis DNA polymerases in DNA interstrand crosslink repair // DNA Repair. – 2016. – V. 44. – P. 33–41.
74. Wang D., Lippard S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs // Nat. Rev. Drug Discov. – 2005. – V. 4. – № 4. – P. 307–320.
75. Dasari S., Tchounwou P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action // Eur. J. Pharmacol. – 2014. – V. 740. – P. 364–378.
76. Chaney S.G., Campbell S.L., Bassett E., Wu Y. Recognition and processing of cisplatin- and

oxaliplatin-DNA adducts // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2005. – V. 53. – № 1. – P. 3–11.
77. Fuertes M., Castilla J., Alonso C., Pérez J. Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways // Curr. Med. Chem. – 2003. – V. 10. – № 3. – P. 257–266.
78. Coste F., Malinge J.M., Serre L., Shepard W., Roth M., Leng M., Zelwer C. Crystal structure of a double-stranded DNA containing a cisplatin interstrand cross-link at 1.63 Å resolution: Hydration at the platinated site // Nucleic Acids Res. – 1999. – V. 27. – № 8. – P. 1837–1846.
79. Todd R.C., Lippard S.J. Structure of duplex DNA containing the cisplatin 1,2-$\{Pt(NH_3)_2\}^{2+}$-d(GpG) cross-link at 1.77 Å resolution // J. Inorg. Biochem. – 2010. – V. 104. – № 9. – P. 902–908.
80. Ishikawa T., Ali-Osman F. Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance // J. Biol. Chem. – 1993. – V. 268. – № 27. – P. 20116–20125.
81. Goekkurt E., Hoehn S., Wolschke C., Wittmer C., Stueber C., Hossfeld D.K., Stoehlmacher J. Polymorphisms of glutathione S-transferases (GST) and thymidylate synthase (TS) – novel predictors for response and survival in gastric cancer patients // Br. J. Cancer. – 2006. – V. 94. – № 2. – P. 281–286.
82. Oldenburg J., Kraggerud S.M., Cvancarova M., Lothe R.A., Fossa S.D. Cisplatin-induced long-term hearing impairment is associated with specific glutathione *S*-transferase genotypes in testicular cancer survivors // J. Clin. Oncol. – 2007. – V. 25. – № 6. – P. 708–714.
83. Oldenburg J., Kraggerud S.M., Brydøy M., Cvancarova M., Lothe R.A., Fossa S.D. Association between long-term neuro-toxicities in testicular cancer survivors and polymorphisms in glutathione-S-transferase-P1 and -M1, a retrospective cross sectional study // J. Transl. Med. – 2007. – V. 5. – 70.
84. Shimoyama S. Pharmacogenetics of fluoropyrimidine and cisplatin. A future application to gastric cancer treatment // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2009. – V. 24. – № 6. – P. 970–981.
85. Peters U., Preisler-Adams S., Hebeisen A., Hahn M., Seifert E., Lanvers C., Heinecke A., Horst J., Jürgens H., Lamprecht-Dinnesen A. Glutathione S-transferase genetic polymorphisms and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin // Anticancer. Drugs. – 2000. – V. 11. – № 8. – P. 639–643.
86. Riedemann L., Lanvers C., Deuster D., Peters U., Boos J., Jürgens H., am Zehnhoff-Dinnesen A. Megalin genetic polymorphisms and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin // Pharmacogenomics J. – 2008. – V. 8. – № 1. – P. 23–28.
87. Ross C.J.D., Katzov-Eckert H., Dubé M.-P., Brooks B., Rassekh S.R., Barhdadi A., Feroz-Zada Y., Visscher H., Brown A.M.K., Rieder M.J., Rogers P.C., Phillips M.S., Carleton B.C., Hayden M.R. Genetic variants in *TPMT* and *COMT* are associated with hearing loss in children receiving cisplatin chemotherapy // Nat. Genet. – 2009. – V. 41. – № 12. – P. 1345–1349.
88. Caronia D., Patiño-García A., Milne R.L., Zalacain-Díez M., Pita G., Alonso M.R., Moreno L.T., Sierrasesumaga-Ariznabarreta L., Benítez J., González-Neira A. Common variations in *ERCC2* are associated with response to cisplatin chemotherapy and clinical outcome in osteosarcoma patients // Pharmacogenomics J. – 2009. – V. 9. – № 5. – P. 347–353.
89. Lin X., Okuda T., Holzer A., Howell S.B. The copper transporter *CTR1* regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Pharmacol. – 2002. – V. 62. – № 5. – P. 1154–1159.
90. Blair B.G., Larson C.A., Safaei R., Howell S.B. Copper transporter 2 regulates the cellular accumulation and cytotoxicity of cisplatin and carboplatin // Clin. Cancer Res. – 2009. – V. 15. – № 13. – P. 4312–4321.
91. Kuo M.T., Chen H.H.W., Song I.-S., Savaraj N., Ishikawa T. The roles of copper transporters in cisplatin resistance // Cancer Metastasis Rev. – 2007. – V. 26. – № 1. – P. 71–83.
92. Fukushima-Uesaka H., Saito Y., Maekawa K., Kurose K., Sugiyama E., Katori N., Kaniwa N., Hasegawa R., Hamaguchi T., Eguchi-Nakajima T., Kato K., Yamada Y., Shimada Y., Yoshida

T., Yamamoto N., Nokihara H., Kunitoh H., Ohe Y., Tamura T., Ura T., Saito M., Muro K., Doi T., Fuse N., Yoshino T., Ohtsu A., Saijo N., Matsumura Y., Okuda H., Sawada J.-I. Genetic polymorphisms of copper-and platinum drug-efflux transporters *ATP7A* and *ATP7B* in Japanese cancer patients // Drug Metab. Pharmacokinet. – 2009. – V. 24. – № 6. – P. 565–574.

93. Rabik C.A., Maryon E.B., Kasza K., Shafer J.T., Bartnik C.M., Dolan M.E. Role of copper transporters in resistance to platinating agents // Cancer Chemother. Pharmacol. – 2009. – V. 64. – № 1. – P. 133–142.
94. Taniguchi K., Wada M., Kohno K., Nakamura T., Kawabe T., Kawakami M., Kagotani K., Okumura K., Akiyama S.I., Kuwano M. A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation // Cancer Res. – 1996. – V. 56. – № 18. – P. 4124–4129.
95. Yoh K. Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer // Clin. Cancer Res. – 2004. – V. 10. – № 5. – P. 1691–1697.
96. Li J., Li Z.-N., Du Y.-J., Li X.-Q., Bao Q.-L., Chen P. Expression of *MRP1*, *BCRP*, *LRP*, and *ERCC1* in advanced non–small-cell lung cancer: correlation with response to chemotherapy and survival // Clin. Lung Cancer. – 2009. – V. 10. – № 6. – P. 414–421.
97. Chen S., Huo X., Lin Y., Ban H., Lin Y., Li W., Zhang B., Au W.W., Xu X. Association of *MDR1* and *ERCC1* polymorphisms with response and toxicity to cisplatin-based chemotherapy in non-small-cell lung cancer patients // Int. J. Hyg. Environ. Health. – 2010. – V. 213. – № 2. – P. 140–145.
98. Sun N., Sun X., Chen B., Cheng H., Feng J., Cheng L., Lu Z. MRP2 and GSTP1 polymorphisms and chemotherapy response in advanced non-small cell lung cancer // Cancer Chemother. Pharmacol. – 2010. – V. 65. – № 3. – P. 437–446.
99. Li X., Liu Y., Tian H. Current developments in Pt(IV) prodrugs conjugated with bioactive ligands // Bioinorg. Chem. Appl. – 2018. – V. 2018. – P. 1–18.
100. Carr J.L., Tingle M.D., McKeage M.J. Satraplatin activation by haemoglobin, cytochrome C and liver microsomes in vitro // Cancer Chemother. Pharmacol. – 2006. – V. 57. – № 4. – P. 483–490.
101. Rhule J.T., Hill C.L., Judd D.A., Schinazi R.F. Polyoxometalates in medicine // Chem. Rev. – 1998. – V. 98. – № 1. – P. 327–358.
102. Van Rompuy L.S., Parac-Vogt T.N. Interactions between polyoxometalates and biological systems: from drug design to artificial enzymes // Curr. Opin. Biotechnol. – 2019. – V. 58. – P. 92–99.
103. Hasenknopf B. Polyoxometalates: introduction to a class of inorganic compounds and their biomedical applications // Front. Biosci. – 2005. – V. 10. – № 1. – P. 275–287.
104. Shigeta S., Mori S., Yamase T., Yamamoto N., Yamamoto N. Anti-RNA virus activity of polyoxometalates // Biomed. Pharmacother. – 2006. – V. 60. – № 5. – P. 211–219.
105. Wang S., Sun W., Hu Q., Yan H., Zeng Y. Synthesis and evaluation of pyridinium polyoxometalates as anti-HIV-1 agents // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2017. – V. 27. – № 11. – P. 2357–2359.
106. Bijelic A., Aureliano M., Rompel A. Polyoxometalates as potential next-generation metallodrugs in the combat against cancer // Angew. Chem. Int. Ed. – 2019. – V. 58. – № 10. – P. 2980–2999.
107. Gao N., Sun H., Dong K., Ren J., Duan T., Xu C., Qu X. Transition-metal-substituted polyoxometalate derivatives as functional anti-amyloid agents for Alzheimer’s disease // Nat. Commun. – 2014. – V. 5. – 3422.
108. Yanagie H., Ogata A., Mitsui S., Hisa T., Yamase T., Eriguchi M. Anticancer activity of polyoxomolybdate // Biomed. Pharmacother. – 2006. – V. 60. – № 7. – P. 349–352.
109. Gumerova N., Krivosudský L., Fraqueza G., Breibeck J., Al-Sayed E., Tanuhadi E., Bijelic A., Fuentes J., Aureliano M., Rompel A. The P-type ATPase inhibiting potential of polyoxotungstates // Metallomics. – 2018. – V. 10. – № 2. – P. 287–295.
110. Sakamoto A., Unoura K., Nabika H. Molecular scale insights into activity of polyoxometalate as

membrane-targeting nanomedicine from single-molecule observations // J. Phys. Chem. C. – 2018. – V. 122. – № 2. – P. 1404–1411.
111. Yang H.-K., Cheng Y.-X., Su M.-M., Xiao Y., Hu M.-B., Wang W., Wang Q. Polyoxometalate–biomolecule conjugates: a new approach to create hybrid drugs for cancer therapeutics // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2013. – V. 23. – № 5. – P. 1462–1466.
112. Fu L., Gao H., Yan M., Li S., Li X., Dai Z., Liu S. Polyoxometalate-based organic-inorganic hybrids as antitumor drugs // Small. – 2015. – V. 11. – № 24. – P. 2938–2945.
113. Abramov P.A., Vicent C., Kompankov N.B., Gushchin A.L., Sokolov M.N. Platinum polyoxoniobates // Chem. Commun. – 2015. – V. 51. – № 19. – P. 4021–4023.
114. Stephan H., Kubeil M., Emmerling F., Müller C.E. Polyoxometalates as versatile enzyme inhibitors // Eur. J. Inorg. Chem. – 2013. – V. 2013. – № 10–11. – P. 1585–1594.
115. Inouye Y., Tokutake Y., Kunihara J., Yoshida T., Yamase T., Nakata A., Nakamura S. Suppressive effect of polyoxometalates on the cytopathogenicity of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) *in vitro* and their inhibitory activity against HIV-1 reverse transcriptase // Chem. Pharm. Bull. – 1992. – V. 40. – № 3. – P. 805–807.
116. Sarafianos S.G., Kortz U., Pope M.T., Modak M.J. Mechanism of polyoxometalate-mediated inactivation of DNA polymerases: an analysis with HIV-1 reverse transcriptase indicates specificity for the DNA-binding cleft // Biochem. J. – 1996. – V. 319. – № 2. – P. 619–626.
117. Schoeberl C., Boehner R., Krebs B., Mueller C., Barnekow A. A new polyoxometalate complex inhibits retrovirus encoded reverse transcriptase activity *in vitro* and *in vivo* // Int. J. Oncol. – 1998. – V. 12. – № 1. – P. 153–159.
118. Sun T., Cui W., Yan M., Qin G., Guo W., Gu H., Liu S., Wu Q. Target delivery of a novel antitumor organoplatinum(IV)-substituted polyoxometalate complex for safer and more effective colorectal cancer therapy in vivo // Adv. Mater. – 2016. – V. 28. – № 34. – P. 7397–7404.
119. Barker S., Weinfeld M., Zheng J., Li L., Murray D. Identification of mammalian proteins cross-linked to DNA by ionizing radiation // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280. – № 40. – P. 33826–33838.
120. Xu X., Muller J.G., Ye Y., Burrows C.J. DNA−protein cross-links between guanine and lysine depend on the mechanism of oxidation for formation of C5 vs C8 guanosine adducts // J. Am. Chem. Soc. – 2008. – V. 130. – № 2. – P. 703–709.
121. Olinski R., Nackerdien Z., Dizdaroglu M. DNA-protein cross-linking between thymine and tyrosine in chromatin of γ-irradiated or $H_2O_2$-treated cultured human cells // Arch. Biochem. Biophys. – 1992. – V. 297. – № 1. – P. 139–143.
122. Kuo H.K., Griffith J.D., Kreuzer K.N. 5-Azacytidine-induced methyltransferase-DNA adducts block DNA replication *in vivo* // Cancer Res. – 2007. – V. 67. – № 17. – P. 8248–8254.
123. Dizdaroglu M., Gajewski E., Reddy P., Margolis S.A. Structure of a hydroxyl radical induced DNA-protein cross-link involving thymine and tyrosine in nucleohistone // Biochemistry. – 1989. – V. 28. – № 8. – P. 3625–3628.
124. Dizdaroglu M., Gajewski E. Structure and mechanism of hydroxyl radical-induced formation of a DNA-protein cross-link involving thymine and lysine in nucleohistone // Cancer Res. – 1989. – V. 49. – № 13. – P. 3463–3467.
125. Izzotti A., Cartiglia C., Taningher M., De Flora S., Balansky R. Age-related increases of 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine and DNA–protein crosslinks in mouse organs // Mutat. Res. – 1999. – V. 446. – № 2. – P. 215–223.
126. Falandry C., Bonnefoy M., Freyer G., Gilson E. Biology of cancer and aging: a complex association with cellular senescence // J. Clin. Oncol. – 2014. – V. 32. – № 24. – P. 2604–2610.
127. Murali G., Panneerselvam C. Age-associated oxidative macromolecular damages in rat brain regions: role of glutathione monoester // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. – 2007. – V. 62. – № 8. – P. 824–830.
128. Mecocci P., MacGarvey U., Beal M.F. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer’s disease // Ann. Neurol. – 1994. – V. 36. – № 5. – P. 747–751.

129. Abdul Sani N.F., Ahmad Damanhuri M.H., Amir Hamzah A.I.Z., Abu Bakar Z.H., Tan J.-K., Nor Aripin K.N., Mohd Rani M.D., Noh N.A., Shamaan N.A., Razali R., Mohd Yusof Y.A., Mazlan M., Makpol S., Wan Ngah W.Z. DNA damage and protein oxidation associated with ageing correlate with cognitive dysfunction in a Malaysian population // Free Radic. Res. – 2018. – V. 52. – № 9. – P. 1000–1009.
130. Ames B.N., Gold L.S. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer // Mutat. Res. – 1991. – V. 250. – № 1–2. – P. 3–16.
131. Barker S., Weinfeld M., Murray D. DNA-protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences // Mutat. Res. – 2005. – V. 589. – № 2. – P. 111–135.
132. Zhitkovich A., Voitkun V., Costa M. Formation of the amino acid−DNA complexes by hexavalent and trivalent chromium in vitro: importance of trivalent chromium and the phosphate group // Biochemistry. – 1996. – V. 35. – № 22. – P. 7275–7282.
133. Quievryn G., Zhitkovich A. Loss of DNA-protein crosslinks from formaldehyde-exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and an active repair process linked to proteosome function // Carcinogenesis. – 2000. – V. 21. – № 8. – P. 1573–1580.
134. Voitkun V., Zhitkovich A. Analysis of DNA–protein crosslinking activity of malondialdehyde in vitro // Mutat. Res. – 1999. – V. 424. – № 1–2. – P. 97–106.
135. Reardon J.T., Sancar A. Repair of DNA-polypeptide crosslinks by human excision nuclease // Proc. Natl Acad. Sci. U S A. – 2006. – V. 103. – № 11. – P. 4056–4061.
136. Ide H., Shoulkamy M.I., Nakano T., Miyamoto-Matsubara M., Salem A.M.H. Repair and biochemical effects of DNA–protein crosslinks // Mutat. Res. – 2011. – V. 711. – № 1–2. – P. 113–122.
137. Murai J., Huang S.Y.N., Das B.B., Renaud A., Zhang Y., Doroshow J.H., Ji J., Takeda S., Pommier Y. Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors // Cancer Res. – 2012. – V. 72. – № 21. – P. 5588–5599.
138. Ide H., Nakano T., Salem A.M.H., Shoulkamy M.I. DNA–protein cross-links: Formidable challenges to maintaining genome integrity // DNA Repair. – 2018. – V. 71. – P. 190–197.
139. Zhang H., Xiong Y., Chen J. DNA-protein cross-link repair: What do we know now? // Cell Biosci.– 2020. – V. 10. – № 1. – P. 1–10.
140. Chválová K., Brabec V., Kašpárková J. Mechanism of the formation of DNA–protein cross-links by antitumor cisplatin // Nucleic Acids Res. – 2007. – V. 35. – № 6. – P. 1812–1821.
141. Yeo J.E., Wickramaratne S., Khatwani S., Wang Y.C., Vervacke J., Distefano M.D., Tretyakova N.Y. Synthesis of site-specific DNA-protein conjugates and their effects on DNA replication // ACS Chem. Biol. – 2014. – V. 9. – № 8. – P. 1860–1868.
142. Wickramaratne S., Ji S., Mukherjee S., Su Y., Pence M.G., Lior-Hoffmann L., Fu I., Broyde S., Guengerich F.P., Distefano M., Schãrer O.D., Sham Y.Y., Tretyakova N. Bypass of DNA-protein cross-links conjugated to the 7-deazaguanine position of DNA by translesion synthesis polymerases // J. Biol. Chem. – 2016. – V. 291. – № 45. – P. 23589–23603.
143. Minko I.G., Yamanaka K., Kozekov I.D., Kozekova A., Indiani C., O'Donnell M.E., Jiang Q., Goodman M.F., Rizzo C.J., Lloyd R.S. Replication bypass of the acrolein-mediated deoxyguanine DNA-peptide cross-links by DNA polymerases of the DinB family // Chem. Res. Toxicol. – 2008. – V. 21. – № 10. – P. 1983–1990.
144. Yamanaka K., Minko I.G., Takata K.I., Kolbanovskiy A., Kozekov I.D., Wood R.D., Rizzo C.J., Lloyd R.S. Novel enzymatic function of DNA polymerase ν in translesion DNA synthesis past major groove DNA-peptide and DNA-DNA cross-links // Chem. Res. Toxicol. – 2010. – V. 23. – № 3. – P. 689–695.
145. Wickramaratne S., Boldry E.J., Buehler C., Wang Y.C., Distefano M.D., Tretyakova N.Y. Error-prone translesion synthesis past DNA-peptide cross-links conjugated to the major groove of DNA via C5 of thymidine // J. Biol. Chem. – 2015. – V. 290. – № 2. – P. 775–787.
146. Stingele J., Jentsch S. DNA-protein crosslink repair // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2015. – V. 16. – № 8. – P. 455–460.

147. Dabney J., Meyer M., Paabo S. Ancient DNA damage // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2013. – V. 5. – № 7. – a012567.
148. Do H., Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: Causes and strategies for minimization // Clin. Chem. – 2015. – V. 61. – № 1. – P. 64–71.
149. Baker D.J., Wuenschell G., Xia L., Termini J., Bates S.E., Riggs A.D., O'Connor T.R. Nucleotide excision repair eliminates unique DNA-protein cross-links from mammalian cells // J. Biol. Chem. – 2007. – V. 282. – № 31. – P. 22592–22604.
150. Schwöbel J.A.H., Koleva Y.K., Enoch S.J., Bajot F., Hewitt M., Madden J.C., Roberts D.W., Schultz T.W., Cronin M.T.D. Measurement and estimation of electrophilic reactivity for predictive toxicology // Chem. Rev. – 2011. – V. 111. – № 4. – P. 2562–2596.
151. Xie M.Z., Shoulkamy M.I., Salem A.M.H., Oba S., Goda M., Nakano T., Ide H. Aldehydes with high and low toxicities inactivate cells by damaging distinct cellular targets // Mutat. Res. – 2016. – V. 786. – P. 41–51.
152. McGhee J.D., von Hippel P.H. Formaldehyde as a probe of DNA structure. II. Reaction with endocyclic imino groups of DNA bases // Biochemistry. – 1975. – V. 14. – № 6. – P. 1297–1303.
153. She Y., Li Y., Liu Y., Asai G., Sun S., He J., Pan Z., Cui Y. Formaldehyde induces toxic effects and regulates the expression of damage response genes in BM-MSCs // Acta Biochim. Biophys. Sin. – 2013. – V. 45. – № 12. – P. 1011–1020.
154. McGhee J.D., von Hippel P.H. Formaldehyde as a probe of DNA structure. I. Reaction with exocyclic amino groups of DNA bases // Biochemistry. – 1975. – V. 14. – № 6. – P. 1281–1296.
155. Emri G., Schaefer D., Held B., Herbst C., Zieger W., Horkay I., Bayerl C. Low concentrations of formaldehyde induce DNA damage and delay DNA repair after UV irradiation in human skin cells // Exp. Dermatol. – 2004. – V. 13. – № 5. – P. 305–315.
156. Craft T.R., Bermudez E., Skopek T.R. Formaldehyde mutagenesis and formation of DNA-protein crosslinks in human lymphoblasts in vitro // Mutat. Res. – 1987. – V. 176. – № 1. – P. 147–155.
157. Merk O., Speit G. Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis // Environ. Mol. Mutagen. – 1998. – V. 32. – № 3. – P. 260–268.
158. Brooks P.J., Zakhari S. Acetaldehyde and the genome: Beyond nuclear DNA adducts and carcinogenesis // Environ. Mol. Mutagen. – 2014. – V. 55. – № 2. – P. 77–91.
159. Mattagajasingh S.N., Misra H.P. Analysis of EDTA-chelatable proteins from DNA-protein crosslinks induced by a carcinogenic chromium(VI) in cultured intact human cells // Mol. Cell. Biochem. – 1999. – V. 199. – № 1–2. – P. 149–162.
160. Nietert W.C., Kellicutt L.M., Kubinski H. DNA-protein complexes produced by a carcinogen, β-propiolactone // Cancer Res. – 1974. – V. 34. – № 4. – P. 859–864.
161. Zhang H., Wheeler K.T. Radiation-induced DNA damage in tumors and normal tissues. II. Influence of dose, residual DNA damage and physiological factors in oxygenated cells // Radiat. Res. – 1994. – V. 140. – № 3. – P. 321–326.
162. Meyn R.E., vanAnkeren S.C., Jenkins W.T. The induction of DNA-protein crosslinks in hypoxic cells and their possible contribution to cell lethality // Radiat. Res. – 1987. – V. 109. – № 3. – P. 419–429.
163. Murray D., Macann A., Hanson J., Rosenberg E. ERCC1/ERCC4 5′-endonuclease activity as a determinant of hypoxic cell radiosensitivity // Int. J. Radiat. Biol. – 1996. – V. 69. – № 3. – P. 319–327.
164. Pommier Y., Leo E., Zhang H., Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs // Chem. Biol. – 2010. – V. 17. – № 5. – P. 421–433.
165. Pommier Y., Huang S. Yin N., Gao R., Das B.B., Murai J., Marchand C. Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2) // DNA Repair. – 2014. – V. 19. – P. 114–129.
166. Neale M.J., Pan J., Keeney S. Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks // Nature. – 2005. – V. 436. – P. 1053–1057.
167. Salem A.M.H., Nakano T., Takuwa M., Matoba N., Tsuboi T., Terato H., Yamamoto K., Yamada M., Nohmi T., Ide H. Genetic analysis of repair and damage tolerance mechanisms for DNA-

protein cross-links in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. – 2009. – V. 191. – № 18. – P. 5657–5668.
168. Fang Q. DNA-protein crosslinks processed by nucleotide excision repair and homologous recombination with base and strand preference in *E. coli* model system // Mutat Res. – 2013. – V. 29. – № 6. – P. 997–1003.
169. Nakano T., Morishita S., Katafuchi A., Matsubara M., Horikawa Y., Terato H., Salem A.M.H., Izumi S., Pack S.P., Makino K., Ide H. Nucleotide excision repair and homologous recombination systems commit differentially to the repair of DNA-protein crosslinks // Mol. Cell. – 2007. – V. 28. – № 1. – P. 147–158.
170. Woodworth D.L., Kreuzer K.N. Bacteriophage T4 mutants hypersensitive to an antitumor agent that induces topoisomerase-DNA cleavage complexes // Genetics. – 1996. – V. 143. – № 3. – P. 1081–1090.
171. Stingele J., Schwarz M.S., Bloemeke N., Wolf P.G., Jentsch S. A DNA-dependent protease involved in DNA-protein crosslink repair // Cell. – 2014. – V. 158. – № 2. – P. 327–338.
172. Serbyn N., Noireterre A., Bagdiul I., Plank M., Michel A.H., Loewith R., Kornmann B., Stutz F. The aspartic protease Ddi1 contributes to DNA-protein crosslink repair in yeast // Mol. Cell. – 2020. – V. 77. – № 5. – P. 1066-1079.
173. Duxin J.P., Dewar J.M., Yardimci H., Walter J.C. Repair of a DNA-protein crosslink by replication-coupled proteolysis // Cell. – 2014. – V. 159. – № 2. – P. 346–357.
174. Finkelstein I.J., Greene E.C. Molecular traffic jams on DNA // Annu. Rev. Biophys. – 2013. – V. 42. – P. 241–263.
175. Hawkins M., Dimude J.U., Howard J.A.L., Smith A.J., Dillingham M.S., Savery N.J., Rudolph C.J., McGlynn P. Direct removal of RNA polymerase barriers to replication by accessory replicative helicases // Nucleic Acids Res.– 2019. – V. 47. – № 10. – P. 5100–5113.
176. Bellush J.M., Whitehouse I. DNA replication through a chromatin environment // Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. – 2017. – V. 372. – № 1731. – 20160287.
177. MacAlpine D.M., Almouzni G. Chromatin and DNA replication // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2013. – V. 5. – № 8. – a010207.
178. Cerrón F., De Lorenzo S., Lemishko K.M., Ciesielski G.L., Kaguni L.S., Cao F.J., Ibarra B. Replicative DNA polymerases promote active displacement of SSB proteins during lagging strand synthesis // Nucleic Acids Res. – 2019. – V. 47. – № 11. – P. 5723–5734.
179. Пестряков П., Лаврик О. Механизмы функционирования Ssb белков в процессах клеточного метаболизма ДНК // Успехи биологической химии. – 2008. – Т. 48. – С. 65–104.
180. Goodman M.F. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes // Annu. Rev. Biochem. – 2002. – V. 71. – P. 17–50.
181. Frank E.G., Cheng N., Do C.C., Cerritelli M.E., Bruck I., Goodman M.F., Egelman E.H., Woodgate R., Steven A.C. Visualization of two binding sites for the *Escherichia coli* UmuD′$_2$C complex (DNA pol V) on RecA-ssDNA filaments // J. Mol. Biol. – 2000. – V. 297. – № 3. – P. 585–597.
182. Hang B., Singer B. Protein-protein interactions involving DNA glycosylases // Chem. Res. Toxicol. – 2003. – V. 16. – № 10. – P. 1181–1195.
183. Raper A.T., Stephenson A.A., Suo Z. Functional insights revealed by the kinetic mechanism of CRISPR/Cas9 // J. Am. Chem. Soc. – 2018. – V. 140. – № 8. – P. 2971–2984.
184. Demple B. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology // Annu. Rev. Biochem. – 1994. – V. 63. – P. 915–948.
185. Zharkov D.O. Base excision DNA repair // Cell. Mol. Life Sci. – 2008. – V. 65. – № 10. – P. 1544–1565.
186. Friedberg E. C., Walker G. C., Siede W., Wood R. D., Schultz R. A., Ellenberger T. DNA Repair and Mutagenesis. – Washington, D.C.: ASM Press, 2006. – 1118 pp.
187. Fortini P., Dogliotti E. Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways // DNA Repair. – 2007. – V. 6. – № 4. – P. 398–409.

188. Parikh S.S. Base excision repair initiation revealed by crystal structures and binding kinetics of human uracil-DNA glycosylase with DNA // EMBO J. – 1998. – V. 17. – № 17. – P. 5214–5226.
189. Fan J., Wilson D.M., III. Protein-protein interactions and posttranslational modifications in mammalian base excision repair // Free Radic. Biol. Med. – 2005. – V. 38. – № 9. – P. 1121–1138.
190. Hill J.W., Hazra T.K., Izumi T., Mitra S. Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair // Nucleic Acids Res. – 2001. – V. 29. – № 2. – P. 430–438.
191. Vidal A.E., Hickson I.D., Boiteux S., Radicella J.P. Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step // Nucleic Acids Res. – 2001. – V. 29. – № 6. – P. 1285–1292.
192. Saitoh T., Shinmura K., Yamaguchi S., Tani M., Seki S., Murakami H., Nojima Y., Yokota J. Enhancement of OGG1 protein AP lyase activity by increase of APEX protein // Mutat. Res. – 2001. – V. 486. – № 1. – P. 31–40.
193. Sidorenko V.S., Nevinsky G.A., Zharkov D.O. Mechanism of interaction between human 8-oxoguanine-DNA glycosylase and AP endonuclease // DNA Repair. – 2007. – V. 6. – № 3. – P. 317–328.
194. Sidorenko V.S., Nevinsky G.A., Zharkov D.O. Specificity of stimulation of human 8-oxoguanine–DNA glycosylase by AP endonuclease // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2008. – V. 368. – № 1. – P. 175–179.
195. Kasymov R.D., Grin I.R., Endutkin A. V., Smirnov S.L., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Zharkov D.O. Excision of 8-oxoguanine from methylated CpG dinucleotides by human 8-oxoguanine DNA glycosylase // FEBS Lett. – 2013. – V. 587. – № 18. – P. 3129–3134.
196. Zharkov D.O., Rosenquist T.A., Gerchman S.E., Grollman A.P. Substrate specificity and reaction mechanism of murine 8-oxoguanine-DNA glycosylase // J. Biol. Chem. – 2000. – V. 275. – № 37. – P. 28607–28617.
197. Kuznetsov N.A. Kinetics of substrate recognition and cleavage by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase // Nucleic Acids Res. – 2005. – V. 33. – № 12. – P. 3919–3931.
198. Kuznetsov N.A., Koval V. V., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Zharkov D.O., Fedorova O.S. Kinetic conformational analysis of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase // J. Biol. Chem. – 2007. – V. 282. – № 2. – P. 1029–1038.
199. Esadze A., Rodriguez G., Cravens S.L., Stivers J.T. AP-endonuclease 1 accelerates turnover of human 8-oxoguanine DNA glycosylase by preventing retrograde binding to the abasic-site product // Biochemistry. – 2017. – V. 56. – № 14. – P. 1974–1986.
200. Sorek R., Lawrence C.M., Wiedenheft B. CRISPR-mediated adaptive immune systems in Bacteria and Archaea // Annu. Rev. Biochem. – 2013. – V. 82. – P. 237–266.
201. Komor A.C., Badran A.H., Liu D.R. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes // Cell. – 2017. – V. 168. – № 1–2. – P. 20–36.
202. Knott G.J., Doudna J.A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering // Science. – 2018. – V. 361. – № 6405. – P. 866–869.
203. Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria // Proc. Natl Acad. Sci. U S A. – 2012. – V. 109. – № 39. – P. 2579–2586.
204. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // Science. – 2012. – V. 337. – № 6096. – P. 816–821.
205. Heler R., Samai P., Modell J.W., Weiner C., Goldberg G.W., Bikard D., Marraffini L.A. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation // Nature. – 2015. – V. 519. – № 7542. – P. 199–202.
206. Rath D., Amlinger L., Rath A., Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications // Biochimie. – 2015. – V. 117. – P. 119–128.

207. Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Rebecca M., Terns M.P., White M.F., Yakunin A.F., Garrett R.A. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems // Nat. Rev. Microbiol. – 2017. – V. 13. – № 11. – P. 722–736.
208. Смирнов А.В., Юнусова А.М., Лукьянчикова В.А., Баттулин Н.Р. Система CRISPR/Cas9 — универсальный инструмент геномной инженерии // ВЖГиС. – 2016. – Т. 20. – № 4. – С. 493–510.
209. Cradick T.J., Fine E.J., Antico C.J., Bao G. CRISPR/Cas9 systems targeting β-globin and CCR5 genes have substantial off-target activity // Nucleic Acids Res. – 2013. – V. 41. – № 20. – P. 9584–9592.
210. Wright A. V., Nuñez J.K., Doudna J.A. Biology and applications of CRISPR systems: harnessing Nature's toolbox for genome engineering // Cell. – 2016. – V. 164. – № 1–2. – P. 29–44.
211. Huai C., Li G., Yao R., Zhang Y., Cao M., Kong L., Jia C., Yuan H., Chen H., Lu D., Huang Q. Structural insights into DNA cleavage activation of CRISPR-Cas9 system // Nat. Commun. – 2017. – V. 8. – № 1. – P. 1375.
212. Вохтанцев И.П., Ким Д.В., Жарков Д.О. Структурные основы специфичности белка Cas9 / Редактирование генов и геномов : в 3-х т. Т. 1 / отв. ред. С.М. Закиян, С.П. Медведев, Е.В. Дементьева, Е.А. Покушалов, В.В. Власов. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2018. – С. 177–198.
213. Anders C., Bargsten K., Jinek M. Structural plasticity of PAM recognition by engineered variants of the RNA-guided endonuclease Cas9 // Mol. Cell. – 2016. – V. 61. – № 6. – P. 895–902.
214. Anders C., Niewoehner O., Duerst A., Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease // Nature. – 2014. – V. 513. – № 7519. – P. 569–573.
215. Jinek M., Jiang F., Taylor D.W., Sternberg S.H., Kaya E., Ma E., Anders C., Hauer M., Zhou K., Lin S., Kaplan M., Iavarone A.T., Charpentier E., Nogales E., Doudna J.A. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation // Science. – 2014. – V. 343. – № 6176. – 1247997.
216. Jiang F., Zhou K., Ma L., Gressel S., Doudna J.A. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition // Science. – 2015. – V. 348. – № 6242. – P. 1477–1481.
217. Hirano S., Nishimasu H., Ishitani R., Nureki O. Structural basis for the altered PAM specificities of engineered CRISPR-Cas9 // Mol. Cell. – 2016. – V. 61. – № 6. – P. 886–894.
218. Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P., Konermann S., Shehata S., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA // Cell. – 2014. – V. 156. – № 5. – P. 935–949.
219. Jiang F., Taylor D.W., Chen J.S., Kornfeld J.E., Zhou K., Thompson A.J., Nogales E., Doudna J.A. Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage // Science. – 2016. – V. 351. – № 6275. – P. 867–871.
220. Olieric V., Weinert T., Finke A.D., Anders C., Li D., Olieric N., Borca C.N., Steinmetz M.O., Caffrey M., Jinek M., Wang M. Data-collection strategy for challenging native SAD phasing // Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol. – 2016. – V. 72. – № 3. – P. 421–429.
221. Szczelkun M.D., Tikhomirova M.S., Sinkunas T., Gasiunas G., Karvelis T., Pschera P., Siksnys V., Seidel R. Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and cascade effector complexes // Proc. Natl Acad. Sci. U S A. – 2014. – V. 111. – № 27. – P. 9798–9803.
222. Shibata M., Nishimasu H., Kodera N., Hirano S., Ando T., Uchihashi T., Nureki O. Real-space and real-time dynamics of CRISPR-Cas9 visualized by high-speed atomic force microscopy // Nat. Commun. – 2017. – V. 8. – 1430.
223. Zharkov D.O., Grollman A.P. The DNA trackwalkers: Principles of lesion search and recognition by DNA glycosylases // Mutat. Res. – 2005. – V. 577. – № 1–2. – P. 24–54.
224. Singh D., Sternberg S.H., Fei J., Doudna J.A., Ha T. Real-time observation of DNA recognition and rejection by the RNA-guided endonuclease Cas9 // Nat. Commun. – 2016. – V. 7. – № 1. – P. 12778.

225. Palermo G., Miao Y., Walker R.C., Jinek M., McCammon J.A. Striking plasticity of CRISPR-Cas9 and key role of non-target DNA, as revealed by molecular simulations // ACS Cent. Sci. – 2016. – V. 2. – № 10. – P. 756–763.
226. Cencic R., Miura H., Malina A., Robert F., Ethier S., Schmeing T.M., Dostie J., Pelletier J. Protospacer adjacent motif (PAM)-distal sequences engage CRISPR Cas9 DNA target cleavage // PLoS ONE. – 2014. – V. 9. – № 10. – e109213.
227. Josephs E.A., Kocak D.D., Fitzgibbon C.J., McMenemy J., Gersbach C.A., Marszalek P.E. Structure and specificity of the RNA-guided endonuclease Cas9 during DNA interrogation, target binding and cleavage // Nucleic Acids Res. – 2015. – V. 43. – № 18. – P. 8924–8941.
228. Sternberg S.H., Redding S., Jinek M., Greene E.C., Doudna J.A. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9 // Nature. – 2014. – V. 507. – № 7490. – P. 62–67.
229. Johnson A., O'Donnell M. Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork // Annu. Rev. Biochem. – 2005. – V. 74. – P. 283–315.
230. Hamdan S.M., Richardson C.C. Motors, switches, and contacts in the replisome // Annu. Rev. Biochem. – 2009. – V. 78. – P. 205–243.
231. Alabert C., Groth A. Chromatin replication and epigenome maintenance // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. – 2012. – V. 13. – № 3. – P. 153–167.
232. Yancey-Wrona J.E., Matson S.W. Bound Lac repressor protein differentially inhibits the unwinding reactions catalyzed by DNA helicases // Nucleic Acids Res. – 1992. – V. 20. – № 24. – P. 6713–6721.
233. Shin J.H., Santangelo T.J., Xie Y., Reeve J.N., Kelman Z. Archaeal minichromosome maintenance (MCM) helicase can unwind DNA bound by archaeal histones and transcription factors // J. Biol. Chem. – 2007. – V. 282. – № 7. – P. 4908–4915.
234. Kaplan D.L., O'Donnell M. DnaB drives DNA branch migration and dislodges proteins while encircling two DNA strands // Mol. Cell. – 2002. – V. 10. – № 3. – P. 647–657.
235. Kumari A., Minko I.G., Smith R.L., Lloyd R.S., McCullough A.K. Modulation of UvrD helicase activity by covalent DNA-protein cross-links // J. Biol. Chem. – 2010. – V. 285. – № 28. – P. 21313–21322.
236. Nakano T., Miyamoto-Matsubara M., Shoulkamy M.I., Salem A.M.H., Pack S.P., Ishimi Y., Ide H. Translocation and stability of replicative DNA helicases upon encountering DNA-protein cross-links // J. Biol. Chem. – 2013. – V. 288. – № 7. – P. 4649–4658.
237. Steitz T.A. DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms // J. Biol. Chem. – 1999. – V. 274. – № 25. – P. 17395–17398.
238. Ito J., Braithwaite D.K. Compilation and alignment of DNA polymerase sequences // Nucleic Acids Res. – 1991. – V. 19. – № 15. – P. 4045–4057.
239. Braithwaite D.K., Ito J. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases // Nucleic Acids Res. – 1993. – V. 21. – № 4. – P. 787–802.
240. Johnson R.E., Prakash S., Prakash L. Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Polη // Science. – 1999. – V. 283. – № 5404. – P. 1001–1004.
241. Sherrer S.M., Fiala K.A., Fowler J.D., Newmister S.A., Pryor J.M., Suo Z. Quantitative analysis of the efficiency and mutagenic spectra of abasic lesion bypass catalyzed by human Y-family DNA polymerases // Nucleic Acids Res. – 2011. – V. 39. – № 2. – P. 609–622.
242. Haracska L., Yu S.-L., Johnson R.E., Prakash L., Prakash S. Efficient and accurate replication in the presence of 7,8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase η // Nat. Genet. – 2000. – V. 25. – № 4. – P. 458–461.
243. Zhang Y., Yuan F., Wu X., Rechkoblit O., Taylor J.-S., Geacintov N.E., Wang Z. Error-prone lesion bypass by human DNA polymerase η // Nucleic Acids Res. – 2000. – V. 28. – № 23. – P. 4717–4724.
244. Levine R.L., Miller H., Grollman A., Ohashi E., Ohmori H., Masutani C., Hanaoka F., Moriya M. Translesion DNA synthesis catalyzed by human pol η and pol κ across 1,$N^6$-ethenodeoxyadenosine // J. Biol. Chem. – 2001. – V. 276. – № 22. – P. 18717–18721.

245. Haracska L., Prakash S., Prakash L. Replication past $O^6$-methylguanine by yeast and human DNA polymerase η // Mol. Cell. Biol. – 2000. – V. 20. – № 21. – P. 8001–8007.
246. Masutani C., Kusumoto R., Iwai S., Hanaoka F. Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase η // EMBO J. – 2000. – V. 19. – № 12. – P. 3100–3109.
247. Zhang Y., Yuan F., Wu X., Wang Z. Preferential incorporation of G opposite template T by the low-fidelity human DNA polymerase ι // Mol. Cell. Biol. – 2000. – V. 20. – № 19. – P. 7099–7108.
248. Haracska L., Johnson R.E., Unk I., Phillips B.B., Hurwitz J., Prakash L., Prakash S. Targeting of human DNA polymerase to the replication machinery via interaction with PCNA // Proc. Natl Acad. Sci. U S A.– 2001. – V. 98. – № 25. – P. 14256–14261.
249. Zhang Y., Yuan F., Wu X., Taylor J.-S., Wang Z. Response of human DNA polymerase ι to DNA lesions // Nucleic Acids Res. – 2001. – V. 29. – № 4. – P. 928–935.
250. Johnson R.E., Washington M.T., Haracska L., Prakash S., Prakash L. Eukaryotic polymerases ι and ζ act sequentially to bypass DNA lesions // Nature. – 2000. – V. 406. – № 6799. – P. 1015–1019.
251. Sale J.E. Translesion DNA synthesis and mutagenesis in eukaryotes // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2013. – V. 5. – № 3. – a012708.
252. Menéndez-Arias L., Sebastián-Martín A., Álvarez M. Viral reverse transcriptases // Virus Res. – 2017. – V. 234. – P. 153–176.
253. Eom S.H., Wang J., Steitz T.A. Structure of *Taq* polymerase with DNA at the polymerase active site // Nature. – 1996. – V. 382. – № 6588. – P. 278–281.
254. Xia S., Wood M., Bradley M.J., De La Cruz E.M., Konigsberg W.H. Alteration in the cavity size adjacent to the active site of RB69 DNA polymerase changes its conformational dynamics // Nucleic Acids Res. – 2013. – V. 41. – № 19. – P. 9077–9089.
255. Vyas R., Reed A.J., Tokarsky E.J., Suo Z. Viewing human DNA polymerase β faithfully and unfaithfully bypass an oxidative lesion by time-dependent crystallography // J. Am. Chem. Soc. – 2015. – V. 137. – № 15. – P. 5225–5230.
256. Xu W., Ouellette A.M., Wawrzak Z., Shriver S.J., Anderson S.M., Zhao L. Kinetic and structural mechanisms of (5′S)-8,5′-cyclo-2′-deoxyguanosine-induced DNA replication stalling // Biochemistry. – 2015. – V. 54. – № 3. – P. 639–651.
257. Ren J., Esnouf R., Garman E., Somers D., Ross C., Kirby I., Keeling J., Darby G., Jones Y., Stuart D. High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes // Nat. Struct. Biol. – 1995. – V. 2. – № 4. – P. 293–302.
258. Patel P.H., Suzuki M., Adman E., Shinkai A., Loeb L.A. Prokaryotic DNA polymerase I: evolution, structure, and “base flipping” mechanism for nucleotide selection // J. Mol. Biol. – 2001. – V. 308. – № 5. – P. 823–837.
259. Miller H., Grollman A.P. Kinetics of DNA polymerase I (Klenow fragment exo$^-$) activity on damaged DNA templates: Effect of proximal and distal template damage on DNA synthesis // Biochemistry. – 1997. – V. 36. – № 49. – P. 15336–15342.
260. Bailey S., Wing R.A., Steitz T.A. The structure of *T. aquaticus* DNA polymerase III is distinct from eukaryotic replicative DNA polymerases // Cell. – 2006. – V. 126. – № 5. – P. 893–904.
261. Xia S., Konigsberg W.H. RB69 DNA polymerase structure, kinetics, and fidelity // Biochemistry. – 2014. – V. 53. – № 17. – P. 2752–2767.
262. Bloom L.B., Otto M.R., Eritja R., Reha-Krantz L.J., Goodman M.F., Beechem J.M. Pre-steady-state kinetic analysis of sequence-dependent nucleotide excision by the 3′-exonuclease activity of bacteriophage T4 DNA polymerase // Biochemistry. – 1994. – V. 33. – № 24. – P. 7576–7586.
263. Lundberg K.S., Shoemaker D.D., Adams M.W.W., Short J.M., Sorge J.A., Mathur E.J. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus* // Gene. – 1991. – V. 108. – № 1. – P. 1–6.
264. Beard W.A., Osheroff W.P., Prasad R., Sawaya M.R., Jaju M., Wood T.G., Kraut J., Kunkel T.A., Wilson S.H. Enzyme-DNA interactions required for efficient nucleotide incorporation and

discrimination in human DNA polymerase β // J. Biol. Chem. – 1996. – V. 271. – № 21. – P. 12141–12144.
265. Ahn J., Kraynov V.S., Zhong X., Werneburg B.G., Tsai M.-D. DNA polymerase β: effects of gapped DNA substrates on dNTP specificity, fidelity, processivity and conformational changes // Biochem. J. – 1998. – V. 331. – № 1. – P. 79–87.
266. Zhang H., Eoff R.L., Kozekov I.D., Rizza C.J., Egli M, Guengerich P.F. Versatility of Y-family *Sulfolobus solfataricus* DNA polymerase Dpo4 in translesion synthesis past bulky $N^2$-alkylguanine adducts // J. Biol. Chem. – 2009. – V. 284. – № 6. – P. 3563–3576.
267. Bétous R., Pillaire M.-J., Pierini L., van der Laan S., Recolin B., Ohl-Séguy E., Guo C., Niimi N., Grúz P., Nohmi T., Friedberg E., Cazaux C., Maiorano D., Hoffmann J.-S. DNA polymerase κ-dependent DNA synthesis at stalled replication forks is important for CHK1 activation // EMBO J. – 2013. – V. 32. – № 15. – P. 2172–2185.
268. Pence M.G., Blans P., Zink C.N., Fishbein J.C., Perrino F.W. Bypass of $N^2$-ethylguanine by human DNA polymerase κ // DNA Repair. – 2011. – V. 10. – № 1. – P. 56–64.
269. Bębenek A., Ziuzia-Graczyk I. Fidelity of DNA replication—a matter of proofreading // Curr Genet. – 2018. – V. 64. – № 5. – P. 985–996.
270. McCulloch S.D., Kunkel T.A. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases // Cell Res. – 2008. – V. 18. – № 1. – P. 148–161.
271. Pham P., Rangarajan S., Woodgate R., Goodman M.F. Roles of DNA polymerases V and II in SOS-induced error-prone and error-free repair in *Escherichia coli* // Proc. Natl Acad. Sci. U S A. – 2001. – V. 98. – № 15. – P. 8350–8354.
272. Hübscher U., Maga G. DNA replication and repair bypass machines // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2011. – V. 15. – № 5. – P. 627–635.
273. Kai M., Wang T.S.-F. Checkpoint responses to replication stalling: inducing tolerance and preventing mutagenesis // Mutat. Res. – 2003. – V. 532. – № 1–2. – P. 59–73.
274. Parrilla-Castellar E.R., Arlander S.J.H., Karnitz L. Dial 9–1–1 for DNA damage: the Rad9–Hus1–Rad1 (9–1–1) clamp complex // DNA Repair. – 2004. – V. 3. – № 8–9. – P. 1009–1014.
275. Sage E., Harrison L. Clustered DNA lesion repair in eukaryotes: relevance to mutagenesis and cell survival // Mutat. Res. – 2011. – V. 711. – № 1–2. – P. 123–133.
276. Johnson R.E., Washington M.T., Prakash S., Prakash L. Bridging the gap: A family of novel DNA polymerases that replicate faulty DNA // Proc. Natl Acad. Sci. U S A. – 1999. – V. 96. – № 22. – P. 12224–12226.
277. Friedberg E.C., Gerlach V.L. Novel DNA polymerases offer clues to the molecular basis of mutagenesis // Cell. – 1999. – V. 98. – № 4. – P. 413–416.
278. Friedberg E.C., Feaver W.J., Gerlach V.L. The many faces of DNA polymerases: strategies for mutagenesis and for mutational avoidance // Proc. Natl Acad. Sci. U S A. – 2000. – V. 97. – № 11. – P. 5681–5683.
279. Groth A., Rocha W., Verreault A., Almouzni G. Chromatin challenges during DNA replication and repair // Cell. – 2007. – V. 128. – № 4. – P. 721–733.
280. Kurth I., O'Donnell M. New insights into replisome fluidity during chromosome replication // Trends Biochem. Sci. – 2013. – V. 38. – № 4. – P. 195–203.
281. Helmrich A., Ballarino M., Nudler E., Tora L. Transcription-replication encounters, consequences and genomic instability // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2013. – V. 20. – № 4. – P. 412–418.
282. Whinn K.S., Kaur G., Lewis J.S., Schauer G.D., Mueller S.H., Jergic S., Maynard H., Gan Z.Y., Naganbabu M., Bruchez M.P., O'Donnell M.E., Dixon N.E., van Oijen A.M., Ghodke H. Nuclease dead Cas9 is a programmable roadblock for DNA replication // Sci. Rep. – 2019. – V. 9. – № 1. – P. 13292.
283. Norman D.P.G., Chung S.J., Verdine G.L. Structural and biochemical exploration of a critical amino acid in human 8-oxoguanine glycosylase // Biochemistry. – 2003. – V. 42. – № 6. – P. 1564–1572.
284. Freisinger E., Grollman A.P., Miller H., Kisker C. Lesion (in)tolerance reveals insights into DNA

replication fidelity // EMBO J. – 2004. – V. 23. – № 7. – P. 1494–1505.
285. Miller H., Grollman A.P. Kinetics of DNA polymerase I (Klenow fragment exo⁻) activity on damaged DNA templates: effect of proximal and distal template damage on DNA synthesis // Biochemistry. – 1997. – V. 36. – № 49. – P. 15336–15342.
286. Gening L.V., Klincheva S.A., Reshetnjak A., Grollman A.P., Miller H. RNA aptamers selected against DNA polymerase β inhibit the polymerase activities of DNA polymerases β and κ // Nucleic Acids Res. – 2006. – V. 34. – № 9. – P. 2579–2586.
287. Scaramozzino N., Sanz G., Crance J. M., Saparbaev M., Drillien R., Laval J., Kavli B., Garin D. Characterisation of the substrate specificity of homogeneous vaccinia virus uracil-DNA glycosylase // Nucleic Acids Res. – 2003. – V. 31. – № 16. – P. 4950–4957.
288. Gilboa R., Zharkov D.O., Golan G., Fernandes A.S., Gerchman S.E., Matz E., Kycia J.H., Grollman A.P., Shoham G. Structure of formamidopyrimidine-DNA glycosylase covalently complexed to DNA // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277. – № 22. – P. 19811–19816.
289. Garcia-Diaz M., Bebenek K., Krahn J.M., Blanco L., Kunkel T.A., Pedersen L.C. A structural solution for the DNA polymerase λ-dependent repair of DNA gaps with minimal homology // Mol. Cell. – 2004. – V. 13. – № 4. – P. 561–572.
290. Rieger R.A., McTigue M.M., Kycia J.H., Gerchman S.E., Grollman A.P., Iden C.R. Characterization of a cross-linked DNA-endonuclease VIII repair complex by electrospray ionization mass spectrometry // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 2000. – V. 11. – № 6. – P. 505–515.
291. Grin I.R., Khodyreva S.N., Nevinsky G.A., Zharkov D.O. Deoxyribophosphate lyase activity of mammalian endonuclease VIII-like proteins // FEBS Lett. – 2006. – V. 580. – № 20. – P. 4916–4922.
292. Miller H., Prasad R., Wilson S.H., Johnson F., Grollman A.P. 8-OxodGTP incorporation by DNA polymerase β is modified by active-site residue Asn279 // Biochemistry. – 2000. – V. 39. – № 5. – P. 1029–1033.
293. Moon A.F., Garcia-Diaz M., Bebenek K., Davis B.J., Zhong X., Ramsden D.A., Kunkel T.A., Pedersen L.C. Structural insight into the substrate specificity of DNA polymerase μ // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2007. – V. 14. – № 1. – P. 45–53.
294. Sambrook J., Russell D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. – Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2001 pp.
295. Shubsda M.F., Goodisman J., Dabrowiak J.C. Quantitation of ethidium-stained closed circular DNA in agarose gels // J. Biochem. Biophys. Methods. – 1997. – V. 34. – № 1. – P. 73–79.
296. Tovchigrechko A., Vakser I.A. GRAMM-X public web server for protein-protein docking // Nucleic Acids Res. – 2006. – V. 34. – P. 310–314.
297. Bruner S.D., Norman D.P.G., Verdine G.L. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA // Nature. – 2000. – V. 403. – № 6772. – P. 859–866.
298. Batra V.K., Beard W.A., Shock D.D., Krahn J.M., Pedersen L.C., Wilson S.H. Magnesium-induced assembly of a complete DNA polymerase catalytic complex // Structure. – 2006. – V. 14. – № 4. – P. 757–766.
299. Brautigam C.A., Steitz T.A. Structural principles for the inhibition of the 3′-5′ exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I by phosphorothioates // J. Mol. Biol. – 1998. – V. 277. – № 2. – P. 363–377.
300. Popov A. V., Vorobjev Y.N., Zharkov D.O. MDTRA: A molecular dynamics trajectory analyzer with a graphical user interface // J. Comput. Chem. – 2013. – V. 34. – № 4. – P. 319–325.
301. Sun B., Latham K.A., Dodson M.L., Lloyd R.S. Studies of the catalytic mechanism of five DNA glycosylases: Probing for enzyme-DNA imino intermediates // J. Biol. Chem. – 1995. – V. 270. – № 33. – P. 19501–19508.
302. Ishchenko A.A., Vasilenko N.L., Sinitsina O.I., Yamkovoy V.I., Fedorova O.S., Douglas K.T., Nevinsky G.A. Thermodynamic, kinetic, and structural basis for recognition and repair of 8-oxoguanine in DNA by Fpg protein from *Escherichia coli* // Biochemistry. – 2002. – V. 41. –

№ 24. – P. 7540–7548.
303. Yamanaka K., Minko I.G., Finkel S.E., Goodman M.F., Lloyd R.S. Role of high-fidelity *Escherichia coli* DNA polymerase I in replication bypass of a deoxyadenosine DNA-peptide cross-link // J. Bacteriol. – 2011. – V. 193. – № 15. – P. 3815–3821.
304. Young M.C., Reddy M.K., von Hippel P.H. Structure and function of the bacteriophage T4 DNA polymerase holoenzyme // Biochemistry. – 1992. – V. 31. – № 37. – P. 8675–8690.
305. Komori K., Ishino Y. Functional interdependence of DNA polymerizing and 3′→5′ exonucleolytic activities in *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase I // Protein Eng. Des. Sel. – 2000. – V. 13. – № 1. – P. 41–47.
306. Sobol R.W., Horton J.K., Kühn R., Gu H., Singhal R.K., Prasad R., Rajewsky K., Wilson S.H. Requirement of mammalian DNA polymerase-β in base-excision repair // Nature. – 1996. – V. 379. – № 6561. – P. 183–186.
307. Podlutsky A.J., Dianova I.I., Wilson S.H., Bohr V.A., Dianov G.L. DNA synthesis and dRPase activities of polymerase β are both essential for single-nucleotide patch base excision repair in mammalian cell extracts // Biochemistry. – 2001. – V. 40. – № 3. – P. 809–813.
308. Daley J.M., Vander Laan R.L., Suresh A., Wilson T.E. DNA joint dependence of Pol X family polymerase action in nonhomologous end joining // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280. – № 32. – P. 29030–29037.
309. Lee J.W., Blanco L., Zhou T., Garcia-Diaz M., Bebenek K., Kunkel T.A., Wang Z., Povirk L.F. Implication of DNA polymerase λ in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279. – № 1. – P. 805–811.
310. Prasad R., Beard W.A., Wilson S.H. Studies of gapped DNA substrate binding by mammalian DNA polymerase β. Dependence on 5′-phosphate group // J. Biol. Chem. – 1994. – V. 269. – № 27. – P. 18096–18101.
311. Wilson S.H. Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta // Mutat. Res. – 1998. – V. 407. – № 3. – P. 203–215.
312. García-Díaz M., Bebenek K., Sabariegos R., Domínguez O., Rodríguez J., Kirchhoff T., García-Palomero E., Picher A.J., Juárez R., Ruiz J.F., Kunkel T.A., Blanco L. DNA polymerase λ, a novel DNA repair enzyme in human cells // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277. – № 15. – P. 13184–13191.
313. Sale J.E., Lehmann A.R., Woodgate R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2012. – V. 13. – № 3. – P. 141–152.
314. Yang W. Portraits of a Y-family DNA polymerase // FEBS Lett. – 2005. – V. 579. – № 4. – P. 868–872.
315. Boudsocq F., Iwai S., Hanaoka F., Woodgate R. Sulfolobus solfataricus P2 DNA polymerase IV (Dpo4): an archaeal DinB-like DNA polymerase with lesion-bypass properties akin to eukaryotic poleta // Nucleic Acids Res. – 2001. – V. 29. – № 22. – P. 4607–4616.
316. Lyamichev V., Brow M., Dahlberg J. Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases // Science. – 1993. – V. 260. – № 5109. – P. 778–783.
317. Hacker K.J., Alberts B.M. The rapid dissociation of the T4 DNA polymerase holoenzyme when stopped by a DNA hairpin helix. A model for polymerase release following the termination of each Okazaki fragment // J. Biol. Chem. – 1994. – V. 269. – № 39. – P. 24221–24228.
318. Kamtekar S., Berman A.J., Wang J., Lázaro J.M., De Vega M., Blanco L., Salas M., Steitz T.A. Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage φ29 // Mol. Cell. – 2004. – V. 16. – № 4. – P. 609–618.
319. Steitz T.A, Yin Y.W. Accuracy, lesion bypass, strand displacement and translocation by DNA polymerases // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 2004. – V. 359. – № 1441. – P. 17–23.
320. Sukhanova M.V., Khodyreva S.N., Lebedeva N.A., Prasad R., Wilson S.H., Lavrik O.I. Human base excision repair enzymes apurinic/apyrimidinic endonuclease1 (APE1), DNA polymerase β and poly(ADP-ribose) polymerase 1: Interplay between strand-displacement DNA synthesis and proofreading exonuclease activity // Nucleic Acids Res. – 2005. – V. 33. – № 4. – P. 1222–1229.
321. Kubota Y., Nash R.A., Klungland A., Schär P., Barnes D.E., Lindahl T. Reconstitution of DNA

base excision-repair with purified human proteins: Interaction between DNA polymerase β and the XRCC1 protein // EMBO J. – 1996. – V. 15. – № 23. – P. 6662–6670.
322. Dorjsuren D., Wilson D.M., Beard W.A., McDonald J.P., Austin C.P., Woodgate R., Wilson S.H., Simeonov A. A real-time fluorescence method for enzymatic characterization of specialized human DNA polymerases // Nucleic Acids Res. – 2009. – V. 37. – № 19. – e128.
323. Pomerantz R.T., Kurth I., Goodman M.F., O'Donnell M.E. Preferential D-loop extension by a translesion DNA polymerase underlies error-prone recombination // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2013. – V. 20. – № 6. – P. 748–755.
324. Krahn J.M., Beard W.A., Miller H., Grollman A.P., Wilson S.H. Structure of DNA polymerase β with the mutagenic DNA lesion 8-oxodeoxyguanine reveals structural insights into its coding potential // Structure. – 2003. – V. 11. – № 1. – P. 121–127.
325. Zahn K.E., Belrhali H., Wallace S.S., Doublié S. Caught bending the A-rule: crystal structures of translesion DNA synthesis with a non-natural nucleotide // Biochemistry. – 2007. – V. 46. – № 37. – P. 10551–10561.
326. Ringquist S., Gold L. Toeprinting assays: mapping by blocks to reverse transcriptase primer extension // Methods Mol Biol. – 1998. – V. 77. – P. 283–296.
327. Paz-Elizur T., Takeshita M., Livneh Z. Mechanism of bypass synthesis through an abasic site analog by DNA polymerase I // Biochemistry. – 1997. – V. 36. – № 7. – P. 1766–1773.
328. Kokoska R.J., McCulloch S.D., Kunkel T.A. The Efficiency and specificity of apurinic/apyrimidinic site bypass by human DNA polymerase η and *Sulfolobus solfataricus* Dpo4 // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – № 50. – P. 50537–50545.
329. Villani G., Hubscher U., Gironis N., Parkkinen S., Pospiech H., Shevelev I., Di Cicco G., Markkanen E., Syväoja J.E., Le Gac N.T. In vitro gap-directed translesion DNA synthesis of an abasic site involving human DNA polymerases ε, λ, and β // J. Biol. Chem. – 2011. – V. 286. – № 37. – P. 32094–32104.
330. Rodriguez I., Lazaro J.M., Blanco L., Kamtekar S., Berman A.J., Wang J., Steitz T.A., Salas M., de Vega M. A specific subdomain in 29 DNA polymerase confers both processivity and strand-displacement capacity // Proc. Natl Acad. Sci. U S A. – 2005. – V. 102. – № 18. – P. 6407–6412.
331. Stingele J., Bellelli R., Alte F., Hewitt G., Sarek G., Maslen S.L., Tsutakawa S.E., Borg A., Kjær S., Tainer J.A., Skehel J.M., Groll M., Boulton S.J. Mechanism and regulation of DNA-protein crosslink repair by the DNA-dependent metalloprotease SPRTN // Mol. Cell. – 2016. – V. 64. – № 4. – P. 688–703.
332. Vaz B., Popovic M., Newman J.A., Fielden J., Aitkenhead H., Halder S., Singh A.N., Vendrell I., Fischer R., Torrecilla I., Drobnitzky N., Freire R., Amor D.J., Lockhart P.J., Kessler B.M., McKenna G.W., Gileadi O., Ramadan K. Metalloprotease SPRTN/DVC1 orchestrates replication-coupled DNA-protein crosslink repair // Mol. Cell. – 2016. – V. 64. – № 4. – P. 704–719.
333. Lessel D., Vaz B., Halder S., Lockhart P.J., Marinovic-Terzic I., Lopez-Mosqueda J., Philipp M., Sim J.C.H., Smith K.R., Oehler J., Cabrera E., Freire R., Pope K., Nahid A., Norris F., Leventer R.J., Delatycki M.B., Barbi G., von Ameln S., Högel J., Degoricija M., Fertig R., Burkhalter M.D., Hofmann K., Thiele H., Altmüller J., Nürnberg G., Nürnberg P., Bahlo M., Martin G.M., Aalfs C.M., Oshima J., Terzic J., Amor D.J., Dikic I., Ramadan K., Kubisch C. Mutations in SPRTN cause early onset hepatocellular carcinoma, genomic instability and progeroid features // Nat. Genet. – 2014. – V. 46. – № 11. – P. 1239–1244.
334. Maskey R.S., Kim M.S., Baker D.J., Childs B., Malureanu L.A., Jeganathan K.B., Machida Y., van Deursen J.M., Machida Y.J. Spartan deficiency causes genomic instability and progeroid phenotypes // Nat. Commun. – 2014. – V. 5. – № 1. – P. 5744.
335. Maskey R.S., Flatten K.S., Sieben C.J., Peterson K.L., Baker D.J., Nam H.-J., Kim M.S., Smyrk T.C., Kojima Y., Machida Y., Santiago A., van Deursen J.M., Kaufmann S.H., Machida Y.J. Spartan deficiency causes accumulation of Topoisomerase 1 cleavage complexes and tumorigenesis // Nucleic Acids Res. – 2017. – V. 45. – № 8. – P. 4564–4576.

336. Shibata Y., Morimoto R.I. How the nucleus copes with proteotoxic stress // Curr. Biol. – 2014. – V. 24. – № 10. – P. 463–474.
337. Belousova E.A., Lavrik O.I. DNA polymerases β and λ and their roles in cell // DNA Repair. – 2015. – V. 29. – P. 112–126.
338. Belotserkovskii B.P., Zarling D.A. Duration time of a one-dimensional random walk as a function of the energies of the intermediate states: Application for dissociation and relaxation processes in dna hybrids // J. Biomol. Struct. Dyn. – 2001. – V. 19. – № 2. – P. 315–332.
339. Мечетин Г.В., Дятлова Е.А., Синяков А.Н., Рябинин В.А., Воробьев П.Е., Жарков Д.О. Коррелированный поиск мишени урацил-ДНК-гликозилазой в присутствии объемных аддуктов и ДНК-связывающих лигандов // Биоорган. химия. – 2017. — №. 1. – С. 29–34.
340. Kladova O.A., Grin I.R., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A., Zharkov D.O. Conformational dynamics of damage processing by human DNA glycosylase NEIL1 // J. Mol. Biol. – 2019. – V. 431. – № 6. – P. 1098–1112.
341. Jiang D., Hatahet Z., Melamede R.J., Kow Y.W., Wallace S.S. Characterization of *Escherichia coli* endonuclease VIII // J. Biol. Chem. – 1997. – V. 272. – № 51. – P. 32230–32239.
342. Anders C., Jinek M. *In vitro* enzymology of Cas9 // Methods Enzymol. – 2014. – V. 546. – P. 1–20.
343. Piatek A., Ali Z., Baazim H., Li L., Abulfaraj A., Al-Shareef S., Aouida M., Mahfouz M.M. RNA-guided transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9-based transcription factors // Plant Biotechnol. J. – 2015. – V. 13. – № 4. – P. 578–589.
344. Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., Doudna J.A., Weissman J.S., Arkin A.P., Lim W.A. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression // Cell. – 2013. – V. 152. – № 5. – P. 1173–1183.
345. Wheate N.J., Walker S., Craig G.E., Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials // Dalton Trans. – 2010. – V. 39. – № 35. – P. 8113–8127.
346. Apps M.G., Choi E.H.Y., Wheate N.J. The state-of-play and future of platinum drugs // Endocr. Relat. Cancer. – 2015. – V. 22. – № 4. – P. R219–R233.
347. Hu X., Li F., Noor N., Ling D. Platinum drugs: from Pt(II) compounds, Pt(IV) prodrugs, to Pt nanocrystals/nanoclusters // Sci. Bull. – 2017. – V. 62. – № 8. – P. 589–596.
348. Torres M.C., Varaprasad C. V., Johnson F., Iden C.R. Formation of s-triazines during aerial oxidation of 8-oxo-7,8-dihydro-2′-deoxyguanosine in concentrated ammonia // Carcinogenesis. – 1999. – V. 20. – № 1. – P. 167–172.
349. Dianat S., Bordbar A.K., Tangestaninejad S., Yadollahi B., Zarkesh-Esfahani S.H., Habibi P. ctDNA binding affinity and in vitro antitumor activity of three Keggin type polyoxotungestates // J. Photochem. Photobiol. B Biol. – 2013. – V. 124. – P. 27–33.
350. Shishkina I.G., Johnson F. A new method for the postsynthetic generation of abasic sites in oligomeric DNA // Chem. Res. Toxicol. – 2000. – V. 13. – № 9. – P. 907–912.
351. Kroeger K.M. A comprehensive comparison of DNA replication past 2-deoxyribose and its tetrahydrofuran analog in *Escherichia coli* // Nucleic Acids Res. – 2004. – V. 32. – № 18. – P. 5480–5485.
352. Blanca G., Villani G., Shevelev I., Ramadan K., Spadari S., Hübscher U., Maga G. Human DNA polymerases λ and β show different efficiencies of translesion DNA synthesis past abasic sites and alternative mechanisms for frameshift generation // Biochemistry. – 2004. – V. 43. – № 36. – P. 11605–11615.
353. Vesnaver G., Chang C.N., Eisenberg M., Grollman A.P., Breslauer K.J. Influence of abasic and anucleosidic sites on the stability, conformation, and melting behavior of a DNA duplex: correlations of thermodynamic and structural data // Proc. Natl Acad. Sci. U S A. – 1989. – V. 86. – № 10. – P. 3614–3618.
354. Gelfand C.A., Plum G.E., Grollman A.P., Johnson F., Breslauer K.J. Thermodynamic consequences of an abasic lesion in duplex DNA are strongly dependent on base sequence // Biochemistry. – 1998. – V. 37. – № 20. – P. 7321–7327.

355. Goljer I., Withka J.M., Kao J.Y., Bolton P.H. Effects of the presence of an aldehydic abasic site on the thermal stability and rates of helix opening and closing of duplex DNA // Biochemistry. – 1992. – V. 31. – № 46. – P. 11614–11619.
356. Hoehn S.T., Turner C.J., Stubbe J. Solution structure of an oligonucleotide containing an abasic site: evidence for an unusual deoxyribose conformation // Nucleic Acids Res. – 2001. – V. 29. – № 16. – P. 3413–3423.
357. Efrati E., Tocco G., Eritja R., Wilson S.H., Goodman M.F. Abasic translesion synthesis by DNA polymerase β violates the “A-rule” // J. Biol. Chem. – 1997. – V. 272. – № 4. – P. 2559–2569.
358. Choi J.-Y., Lim S., Kim E.-J., Jo A., Guengerich F.P. Translesion synthesis across abasic lesions by human B-family and Y-family DNA polymerases α, δ, η, ι, κ, and REV1 // J. Mol. Biol. – 2010. – V. 404. – № 1. – P. 34–44.
359. Fiala K.A., Hypes C.D., Suo Z. Mechanism of abasic lesion bypass catalyzed by a Y-family DNA polymerase // J. Biol. Chem. – 2007. – V. 282. – № 11. – P. 8188–8198.
360. Le Gac N.T., Delagoutte E., Germain M., Villani G. Inactivation of the 3′-5′ exonuclease of the replicative T4 DNA polymerase allows translesion DNA synthesis at an abasic site // J. Mol. Biol. – 2004. – V. 336. – № 5. – P. 1023–1034.
361. Tissier A., Frank E.G., McDonald J.P., Iwai S., Hanaoka F., Woodgate R. Misinsertion and bypass of thymine–thymine dimers by human DNA polymerase ι // EMBO J. – 2000. – V. 19. – № 19. – P. 5259–5266.
362. Maor-Shoshani A., Reuven N.B., Tomer G., Livneh Z. Highly mutagenic replication by DNA polymerase V (UmuC) provides a mechanistic basis for SOS untargeted mutagenesis // Proc. Natl Acad. Sci. U S A. – 2000. – V. 97. – № 2. – P. 565–570.
363. Livneh Z., Ziv O., Shachar S. Multiple two-polymerase mechanisms in mammalian translesion DNA synthesis // Cell Cycle. – 2010. – V. 9. – № 4. – P. 729–735.
364. Purmal A.A., Rabow L.E., Lampman G.W., Cunningham R.P., Kow Y.W. A common mechanism of action for the N-glycosylase activity of DNA N-glycosylase/AP lyases from *E. coli* and T4 // Mutat. Res. – 1996. – V. 364. – № 3. – P. 193–207.
365. Liuzzi M., Weinfeld M., Paterson M.C. Selective inhibition by methoxyamine of the apurinic/apyrimidinic endonuclease activity associated with pyrimidine dimer-DNA glycosylases from *Micrococcus luteus* and bacteriophage T4 // Biochemistry. – 1987. – V. 26. – № 12. – P. 3315–3321