СОДЕРЖАНИЕ

Том 55, номер 2, 2021

Системы репарации ДНК в обеспечении стабильности генома человека, преодолении процессов старения и как стратегические платформы для новых методов онкотерапии и лечения нейродегенеративных заболеваний

Специальный выпуск

Редактор-составитель – О.И. Лаврик

Репарация ДНК как ключевой механизм обеспечения стабильности генома и преодоления болезней человека (от редактора-составителя)

О. И. Лаврик 179

ОБЗОРЫ

Интерактом систем репарации оснований и нуклеотидов

Н. И. Речкунова, Ю. С. Красикова, О. И. Лаврик 181

Начальные стадии эксцизионной репарации оснований ДНК в нуклеосомах

О. А. Кладова, Н. А. Кузнецов, О. С. Федорова 194

Клеточный ответ на повреждения ДНК, возникающие в рибосомных генах

А. К. Величко, С. В. Разин, О. Л. Кантидзе 210

GO-система: путь репарации ДНК для борьбы с окислительными повреждениями

А. В. Ендуткин, Д. О. Жарков 223

ЭНЗИМОЛОГИЯ СИСТЕМ РЕПАРАЦИИ ДНК

Мутационный и кинетический анализ эндорибонуклеазной активности APE1

А. А. Кузнецова, А. А. Гаврилова, Д. С. Новопашина, О. С. Федорова, Н. А. Кузнецов 243

Изучение свойств рекомбинантной эндонуклеазы IV *Mycobacterium tuberculosis*

М. А. Дымова, А. В. Ендуткин, В. В. Полуновский, А. И. Закабунин, Е. А. Храпов, Н. А. Торгашева, А. В. Юдкина, Г. В. Мечетин, М. Л. Филипенко, Д. О. Жарков 258

5'-Дезоксирибозофосфатлиазная активность апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы 1

Е. С. Ильина, О. И. Лаврик, С. Н. Ходырева 269

Сравнительный анализ активности полиморфных вариантов урацил-ДНК-гликозилаз человека SMUG1 и MBD4

И. В. Алексеева, А. С. Бакман, Д. А. Яковлев, Н. А. Кузнецов, О. С. Федорова 277

Белок MutL из системы репарации мисматчей бактерии *Neisseria gonorrhoeae*: взаимодействие с ATP и ДНК

М. В. Монахова, М. А. Милакина, В. Ю. Савицкая, Е. А. Романова, Desirazu N. Rao, Е. А. Кубарева 289

Матричные свойства 5-метил-2'-дезоксицитидина и 5-гидроксиметил-2'-дезоксицитидина в реакциях с транслезионными и репаративными ДНК-полимеразами человека

Е. С. Шилкин, Д. В. Петрова, В. А. Полтораченко, Е. О. Болдинова, Д. О. Жарков, А. В. Макарова 305

СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ И ТРАНСКРИПЦИИ В РАЗВИТИИ МЕТОДОВ ОНКОТЕРАПИИ И ЛЕЧЕНИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Противоопухолевая активность комбинации топотекана и ингибитора тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 на модели асцитной карциномы Кребс-2 мыши

Н. С. Дырхеева, А. Л. Захаренко, Е. С. Новоселова, А. А. Чепанова, Н. А. Попова, В. П. Николин, О. А. Лузина, Н. Ф. Салахутдинов, Е. И. Рябчикова, О. И. Лаврик 312

ОБЗОРЫ

Вовлеченность генов белков BRCA1-ассоциированного комплекса наблюдения за геномом (BASC) в развитие многофакторной патологии

Н. П. Бабушкина, А. Е. Постригань, А. Н. Кучер 318

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Экзосомы плазмы крови при наследственных формах болезни Паркинсона

Д. Г. Кулабухова, Л. А. Гараева, А. К. Емельянов, К. А. Сенкевич, Е. В. Грачева, И. В. Милюхина, Е. Ю. Варфоломеева, А. А. Тимофеева, А. Л. Шварцман, Т. А. Штам, С. Н. Пчелина 338

Александр Сергеевич Спирин (4 сентября 1931–30 декабря 2020) 346

Правила для авторов 347

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 2, с. 179–180

РЕПАРАЦИЯ ДНК КАК КЛЮЧЕВОЙ МЕХАНИЗМ ОБЕСПЕЧЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА И ПРЕОДОЛЕНИЯ БОЛЕЗНЕЙ ЧЕЛОВЕКА (ОТ РЕДАКТОРА-СОСТАВИТЕЛЯ)

DOI: 10.31857/S0026898421020105

В данном выпуске журнала представлены обзорные и экспериментальные статьи российских ученых, ведущих исследования механизмов репарации ДНК и их роли в обеспечении стабильности генома и преодолении болезней. ДНК всех организмов постоянно повреждается эндогенными и экзогенными факторами. Механизмы репарации осуществляют исправление повреждений ДНК и обеспечивают сохранение генетической информации. Важнейшим эндогенным фактором, приводящим к повреждениям ДНК, являются активные формы кислорода, образующиеся в живой клетке как продукты нормального метаболизма кислорода, а также при ионизирующей радиации. Эти метаболиты могут повреждать ДНК, белки и другие органические соединения в живых клетках. К экзогенным источникам относятся ионизирующее и ультрафиолетовое излучения, канцерогенные соединения, такие как продукты неполного сгорания топлива, продукты табакокурения и экологические токсины. Неуклонный рост таких воздействий приводит к увеличению частоты онкологических и нейродегенеративных заболеваний и к преждевременному старению.

В процессе эволюции возникло несколько частично перекрывающихся систем, которые исправляют большинство изменений в генетических “текстах” клеток, устраняя повреждения в ДНК. К таким механизмам относятся прямая репарация, эксцизионная репарация оснований, эксцизионная репарация нуклеотидов, репарация двойных разрывов в ДНК (гомологичная рекомбинация и негомологичное соединение концов ДНК), механизм удаления ошибок, возникающих в ДНК в процессе репликации (mismatch repair). В статьях этого выпуска журнала рассмотрены механизмы работы некоторых из этих систем и способы их регуляции, а также репликативный синтез ДНК на матрицах, содержащих повреждения. К настоящему времени установлено, что работа некоторых систем репарации ДНК взаимосвязана и это обеспечивает их дополнительную эффективность. Кроме того, в клетке существует универсальная регуляция активности этих систем с помощью поли(АДФ-рибозил)ирования белков и ДНК, катализируемого ферментами семейства поли(АДФ-рибозо)полимераз (PARP), а именно PARP1 и PARP2. PARP1 и PARP2 катализируют синтез “третьей нуклеиновой кислоты” – поли(АДФ-рибозы (PAR). Система PARP – ключевая для регуляции процессов репарации и организации комплексов репарации ДНК на уровне хроматина. Одним из важнейших открытий последних лет стало установление роли в регуляции процессов репарации ДНК ядерных РНК-связывающих белков, содержащих участки неупорядоченной структуры, которые взаимодействуют с поли(АДФ-рибозой), и следует ожидать, что новые открытия роли РНК/PAR-связывающих белков в этих процессах не заставят себя ждать.

Исследование механизмов репарации, репликации ДНК, а также регуляции этих процессов – передовой фронт развития мировой науки. За открытие механизмов репарации ДНК была присуждена Нобелевская премия по химии в 2015 году Томасу Линдаллу, Полу Модричу и Азизу Санкару. Эта область молекулярной биологии напрямую связана как с поиском путей выживания организмов, так и с разработкой наиболее оптимальных способов лечения онкологических и нейродегенеративных заболеваний человека. При лечении онкозаболеваний используются препараты, направленно повреждающие ДНК. К числу широко применяемых воздействий относится также ионизирующая радиация. Терапевтический эффект таких воздействий зависит от эффективности систем репарации ДНК, поскольку системы репарации удаляют повреждения из ДНК, что ослабляет действие химиотерапевтических препаратов и радиотерапии. В связи с этим исследование систем репарации ДНК и определение их статуса в клетках здоровых и больных людей, а также разработка ингибиторов систем репарации ДНК в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов имеют большую медицинскую значимость.

Исследование механизмов репарации ДНК, а также практических аспектов, связанных с разработкой ингибиторов и активаторов этих систем, очень успешно развивается в целом ряде научно-исследовательских организаций России, и интерес к этим исследованиям постоянно нарастает. В том числе это направление исследований – одно из магистральных в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Статьи и обзоры данного выпуска, написанные ведущими российскими учеными, позволят читателям ознакомиться с самыми последними достижениями и наиболее актуальными проблемами в изучении процессов репарации и репликации поврежденной ДНК.

© 2021 г. О.И. Лаврик

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 2, с. 181–193

ОБЗОРЫ

УДК 577.24

ИНТЕРАКТОМ СИСТЕМ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ И НУКЛЕОТИДОВ

© 2021 г. Н. И. Речкунова[a], *, Ю. С. Красикова[a], О. И. Лаврик[a, b]

[a] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия*

[b] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия*

**e-mail: nadyarec@niboch.nsc.ru*

Поступила в редакцию 12.08.2020 г.
После доработки 12.08.2020 г.
Принята к публикации 24.08.2020 г.

Системы эксцизионной репарации оснований и нуклеотидов (BER и NER) специфично удаляют повреждения ДНК определенного типа. BER удаляет модифицированные основания (окисленные, алкилированные, дезаминированные), а NER – объемные повреждения, вызванные УФ-облучением или химическими канцерогенами. Однако в ряде случаев процесс исправления проходит по более сложному сценарию, при котором пути репарации обмениваются белками и взаимодействуют друг с другом, формируя общий интерактом. В настоящем обзоре представлены основные сведения о механизмах BER и NER, рассмотрены данные, показывающие участие белков NER в восстановлении повреждений ДНК, вызванных окислительным стрессом, и белков BER в удалении объемных аддуктов ДНК. Обсуждается также роль поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 в регуляции процессов BER и NER и их координации при исправлении сложных повреждений.

Ключевые слова: репарация ДНК, белок-белковые взаимодействия, регуляция процессов репарации

DOI: 10.31857/S0026898421020129

ВВЕДЕНИЕ

В геномной ДНК постоянно возникают повреждения, обусловленные как внутренней неустойчивостью, так и воздействием эндогенных факторов и экзогенных генотоксических агентов. Повреждения могут вызывать нарушения основных процессов метаболизма ДНК, таких как репликация и транскрипция, что приводит к возникновению мутаций, хромосомных аберраций, а также к остановке клеточного цикла и гибели клеток. Последствия повреждений ДНК могут быть причиной различных патологий человека, включая рак и нейродегенеративные заболевания. Для противостояния этим неблагоприятным последствиям в ходе эволюции возникло несколько механизмов репарации ДНК [1].

Эксцизионная репарация оснований (BER – base excision repair) – одна из основных систем репарации ДНК, действие которой направлено на исправление наиболее многочисленных повреждений ДНК – модифицированных оснований. Такие повреждения возникают в результате спонтанных реакций (дезаминирование, метилирование, окисление) или под действием продуктов метаболизма клетки (активные формы кислорода), а также таких экзогенных источников, как алкилирующие агенты (метилметансульфонат) и ионизирующее излучение [2].

Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER – nucleotide excision repair) наиболее универсальный путь репарации, с помощью которого происходит удаление широкого спектра повреждений, дестабилизирующих дуплексную структуру ДНК. Субстратами NER служат индуцированные ультрафиолетовым (УФ) излучением фотопродукты – циклобутанпиримидиновые димеры (CPD) и пиримидин-пиримидон-(6-4)-фотопродукты (6-4PP), а также внутрицепочечные сшивки и объемные аддукты оснований ДНК с реакционноспособными метаболитами некоторых химических канцерогенов или химиотерапевтическими агентами [3].

В ходе многолетних исследований процессов BER и NER накопилось достаточно данных, показывающих, что эти системы репарации работают не как изолированные пути, а динамически взаимодействуют друг с другом, формируя общий

Сокращения: BER – эксцизионная репарация оснований; OGG1 – 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза; XRCC1 – фактор устойчивости к рентгеновскому излучению; NER – эксцизионная репарация нуклеотидов; XP – пигментная ксеродерма (xeroderma pigmentosum); CPD – циклобутанпиримидиновые димеры; CS – синдром Кокейна (Cockayne syndrome); TFIIH – фактор транскрипции IIH; PARP – поли(ADP-рибоза)полимераза; PAR – полимер ADP-рибозы.

интерактом, что позволяет осуществлять модуляцию и координацию функций этих процессов [4, 5]. С одной стороны, показано влияние белков NER на активность ключевых ферментов BER, ДНК-гликозилаз и апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы 1 (APE1) [6–9], а также взаимодействие белков NER с окислительными повреждениями ДНК *in vivo* [10, 11]. С другой стороны, ключевой фермент BER – APE1, регулирует удаление аддуктов ДНК с производными платины в процессе NER [12, 13].

Некоторые генотоксические факторы вызывают образование в ДНК повреждений нескольких типов. Так, УФ-излучение приводит к образованию не только пиримидиновых димеров, но и окисленных оснований, а также к разрывам цепи ДНК. В результате интенсивного воздействия одного или нескольких факторов в ДНК могут возникать кластерные повреждения, включающие модифицированные основания, разрывы цепи и объемные аддукты, расположенные в пределах одного–двух витков спирали в одной или обеих цепях дуплекса. При репарации таких повреждений особенно необходимы согласованные действия разных систем репарации, их взаимодействие и взаимная регуляция активности, чтобы предотвратить образование наиболее токсичных для клетки двухцепочечных разрывов ДНК. Взаимное влияние белков-участников разных систем может осуществляться путем белок-белковых взаимодействий, в том числе опосредованных посттрансляционными модификациями белков одной или обеих систем репарации [4]. В настоящем обзоре представлены основные сведения о механизмах BER и NER, рассмотрены известные к настоящему времени данные, показывающие участие белков NER в восстановлении повреждений ДНК, вызванных окислительным стрессом, и белков BER в удалении объемных аддуктов ДНК. Обсуждается также роль поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 (PARP1) в регуляции процессов BER и NER и их координации при исправлении сложных повреждений ДНК.

ЭКСЦИЗИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ ОСНОВАНИЙ

Процесс BER инициируется ДНК-гликозилазами, узнающими поврежденное основание и катализирущими гидролиз N-гликозидной связи. ДНК-гликозилазы специфичны к определенным повреждениям оснований, в зависимости от выполняемых функций они делятся на две группы – моно- и бифункциональные. В результате действия монофункциональных ДНК-гликозилаз, из которых наиболее известна урацил-ДНК-гликозилаза, удаляющая из ДНК урацил, образовавшийся в результате спонтанного дезаминирования цитозина, в ДНК образуются апуриновые/апиримидиновые (AP) сайты. Бифункциональные ДНК-гликозилазы, действие которых направлено на окисленные основания, не только удаляют поврежденные основания, но и способны вносить разрыв с 3'-стороны от образовавшегося AP-сайта. В результате реакции в ДНК возникают разрывы, фланкированные 3'-α,β-4-гидроксипентен-2-алем (3'-PUA) и 5'-концевым фосфатом (β-элиминирование) или с 3'- и 5'-фосфатными группами (β,δ-элиминирование) [14]. Эффективность расщепления сахарофосфатного остова бифункциональными ДНК-гликозилазами значительно отличается, так, например, OGG1, удаляющая наиболее распространенное окисленное основание – 8-оксогуанин (8-oxoG), функционирует преимущественно как монофункциональный фермент [15].

AP-сайты могут возникать также за счет спонтанного гидролиза N-гликозидной связи в нуклеотидах, в основном пуриновых [16]. Основной фермент, гидролизующий AP-сайты в клетках высших эукариот, – апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 (APE1) [17]. В результате гидролиза AP-сайта образуется одноцепочечный разрыв, фланкированный гидроксильной группой на 3'-конце и остатком 2'-дезоксирибозо-5'-фосфата (dRP) на 5'-конце. APE1 необходима не только для гидролиза AP-сайтов, но и для удаления остатка 3'-PUA в разрыве, возникающем под действием бифункциональных ДНК-гликозилаз, катализирующих β-элиминирование, а также при спонтанном расщеплении AP-сайтов, при котором также образуется разрыв, содержащий 3'-PUA-группу [18].

При расщеплении AP-сайта бифункциональными ДНК-гликозилазами, функционирующими по механизму β,δ-элиминирования, продукт расщепления содержит 3'-фосфатную группу, которую также необходимо удалять с помощью фосфатазы. Основным ферментом, осуществляющим эту реакцию в клетках млекопитающих, является бифункциональная полинуклеотидкиназа-фосфатаза (PNKP), которая, кроме фосфорилирования 5'-концевой гидроксильной группы цепи ДНК, обладает способностью выщеплять 3'-концевую фосфатную группу, генерируя 3'-гидроксильную группу [19]. Недавно мы показали, что расщепление AP-сайта способен катализировать еще один фермент – тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1) [20], в результате действия которого также образуется разрыв с 3'-фосфатной группой [21], удаление которой осуществляет PNKP. Таким образом, последовательное действие бифункциональных ДНК-гликозилаз, расщепляющих AP-сайт по механизму β,δ-элиминирования, либо TDP1 и PNKP приводит концы цепи ДНК на месте расщепленного AP-сайта в состояние, пригодное для включения нуклеотидных звеньев ДНК-полимеразами и последующего лигирования разрыва. Та-

кую последовательность событий можно рассматривать как APE1-независимый путь BER [19, 21].

Следующая стадия процесса BER – включение нуклеотида в 3'-конец цепи ДНК. На этой стадии происходит разделение процесса BER на пути, называемые "короткозаплаточной" и "длиннозаплаточной" BER, которые осуществляются с участием разных ферментов. В короткозаплаточной BER ДНК-полимераза β (Polβ) включает один dNMP на место поврежденного звена. Остаток dRP удаляется из ДНК под действием 2'-дезоксирибозо-5'-фосфатлиаз (dRP-лиаз), которые выщепляют dRP по механизму β-элиминирования. В клетках высших эукариот эта функция осуществляется преимущественно за счет лиазной активности Polβ, от эффективности удаления 5'-dRP зависит выбор пути BER [22, 23]. Затем происходит лигирование, катализируемое в клетках высших эукариот ДНК-лигазой III в комплексе с белком XRCC1 [24].

Если по какой-то причине (например, модификации остатка сахара) Polβ не может удалить dRP-остаток, то происходит переключение BER на длиннозаплаточный путь, в котором после включения первого dNMP продолжается репаративный синтез с заменой 2–20 нуклеотидных звеньев и вытеснением цепи ДНК. В клетках высших эукариот этот синтез осуществляется "репликативными" ДНК-полимеразами δ и/или ε с привлечением вспомогательных факторов (PCNA, RFC). Вытесненный участок ДНК удаляется флэп-эндонуклеазой (FEN1), и одноцепочечный разрыв лигируется ДНК-лигазой I [25]. Потенциально репаративный синтез с вытеснением цепи может осуществляться по механизму трансляции бреши с помощью FEN1 и Polβ [26]. Кроме того, в нашей лаборатории показано, что Polβ в сочетании с APE1 способна осуществлять синтез с вытеснением цепи с одновременной "коррекцией ошибок" с помощью 3' → 5'-экзонуклеазной активности APE1 [27]. Дальнейшие исследования показали, что Polβ физически взаимодействует с APE1 [28, 29].

Очевидно, что для эффективного восстановления поврежденной ДНК и предотвращения накопления токсичных для клетки разрывов ДНК требуется координация действий отдельных ферментов, катализирующих последовательные стадии процесса BER. Перенос ДНК-интермедиата от фермента, связанного с продуктом катализируемой им реакции, к следующему ферменту, аналогично передаче эстафетной палочки (passing the baton), рассматривается как основной механизм координации BER [30–32]. В то же время количественный анализ взаимодействий белков BER, выполненный в нашей лаборатории [29], показал, что многие белки образуют прочные комплексы друг с другом как в отсутствие, так и в присутствии ДНК-интермедиатов BER, и эти взаимодействия могут вносить вклад в координацию процесса BER (см. обзор [33]). Наиболее прочный комплекс образуют Polβ и XRCC1 [29], что согласуется с данными о ключевой роли взаимодействия этих белков в процессе BER [32, 34]. Интересно отметить, что связывание с XRCC1 защищает Polβ от убиквитинирования и последующей протеасомной деградации [35].

ЭКСЦИЗИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ НУКЛЕОТИДОВ

Процесс NER был открыт в клетках бактерий еще в начале 60-х годов прошлого столетия как способность к вырезанию поврежденных УФ-светом участков ДНК с последующим ресинтезом ДНК в образовавшихся брешах [36]. В клетках эукариот существуют два пути NER: общегеномная репарация (global genome repair, GG-NER), удаляющая повреждения во всей геномной ДНК, и репарация, связанная с транскрипцией (transcription coupled repair, TC-NER), с помощью которой происходит удаление повреждений в транскрибируемой цепи ДНК. Эти пути отличаются способом узнавания повреждения и набором белков, участвующих на начальных этапах процесса. В TC-NER узнавание повреждения сопряжено с остановкой на нем РНК-полимеразы II (RNAP II) [37], что служит сигналом к сборке инициирующего репарацию комплекса, в состав которого входят белки CSA и CSB [38]. Мутации в генах этих белков вызывают синдром Кокейна (Cockayne syndrome, CS).

В случае GG-NER повреждение узнает фактор пигментной ксеродермы C (XPC) в комплексе с белками RAD23B и центрин-2 (Cen2). Комплекс XPC-RAD23B-Cen2 (далее комплекс XPC) определяет нарушение комплементарности в парах оснований и/или дестабилизацию ДНК-дуплекса, вызванную повреждением, а не конкретное повреждение [39, 40], и взаимодействует с неповрежденным участком противоположной цепи [41–44]. Этот механизм обеспечивает широкую субстратную специфичность процесса GG-NER, однако не позволяет узнавать УФ-индуцированные фотопродукты, особенно CPD, которые практически не дестабилизируют ДНК-дуплекс. Узнавание таких повреждений осуществляет специализированный белок – гетеродимер UV-DDB (UV-damaged DNA-binding protein), который специфически взаимодействует с CPD и 6-4PP и привлекает к ним XPC [45, 46]. Далее комплекс XPC (либо комплекс факторов TC-NER) взаимодействует с мультифункциональным 10-субъединичным белком – фактором транскрипции IIH (transcription factor IIH, TFIIH), который осуществляет частичное раскручивание ДНК-дуплекса за счет геликазной активности субъединицы XPD и

одновременно проверку повреждения ДНК, останавливаясь на нем [47, 48]. На частично открытом дуплексе формируется так называемый "предрасщепляющий" комплекс, в состав которого входят репликативный белок А (RPA), фактор пигментной ксеродермы А (XPA), а также структуроспецифичные эндонуклеазы XPF-ERCC1 и XPG, расщепляющие поврежденную цепь ДНК с 5'- и 3'-стороны от повреждения соответственно [48–50]. Ресинтез удаленного участка осуществляет репликативный комплекс, лигирование ника – ДНК-лигаза I или комплекс ДНК-лигазы III с XRCC1 [51].

Таким образом, исправление повреждений системой NER – сложный многостадийный процесс, протекающий с образованием множества промежуточных комплексов, сборка и функционирование которых осуществляются за счет ДНК-белковых и белок-белковых взаимодействий, требующих четкой координации и регуляции. Как оказалось, помимо факторов NER в этот процесс вовлечены белки других процессов репарации, в том числе BER, а также регуляторные белки, в частности PARP1.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПУТЕЙ BER И NER УВЕЛИЧИВАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕПАРАЦИИ ДНК

Предположение о возможном участии белков NER в восстановлении окислительных повреждений ДНК впервые было высказано в работе, выполненной в лаборатории будущего нобелевского лауреата Aziz Sancar [52]. Оказалось, что в экстрактах линий клеток человека, дефектных по белкам NER (XP-A, XP-B, XP-C, XP-D, XP-F и XP-G), заметно снижена способность к репарации окисленных оснований, 8-охоG и тимингликоля [52]. В реконструированной из очищенных белков (XPA, RPA, TFIIH (в состав которого входят XPB и XPD), XPC-RAD23B, XPG и ERCC1-XPF) системе NER наблюдалось выщепление фрагментов поврежденной ДНК, характерных для этой системы репарации, поэтому предположили, что NER может участвовать в исправлении повреждений, репарируемых по механизму BER, в качестве резервной системы, либо белки NER вовлечены в процесс BER.

Прямые доказательства участия факторов NER в исправлении окисленных оснований получены группой исследователей под руководством Eugenia Dogliotti. В экспериментах на клетках человека они обнаружили, что линии клеток с мутациями в гене, кодирующем XPC, чрезвычайно чувствительны к окислительным агентам, что свидетельствует о важной роли XPC в защите от окислительного стресса [53]. Кроме того, с использованием очищенных белков показана стимуляция активности ДНК-гликозилазы OGG1 белком XPC-RAD23B, а также непосредственное взаимодействие этих белков. В отличие от XPC, XPA в исследованных концентрациях не стимулировал OGG1. Таким образом показано, что XPC-RAD23B стимулирует OGG1-зависимый процесс BER. Роль XPC в процессинге 8-охоG подтверждена в [54]. Следует заметить, что несколько ранее способность XPC-RAD23B стимулировать активность тимин-ДНК-гликозилазы, субстратом которой является дезаминированный 5-метилцитозин, была показана группой японских авторов [6]. В более позднем исследовании этой группы установлено, что XPC стимулирует не только активность TDG, но и гликозилазу SMUG1, удаляющую урацил в паре G/U, а также в оцДНК. Кроме того, стимулирующий эффект XPC обеспечивается за счет белок-белковых взаимодействий и сохраняется при сумоилировании гликозилаз [55].

Дальнейшие исследования роли факторов NER в репарации окисленных оснований были проведены в лаборатории Dogliotti с использованием эмбриональных фибробластов мыши с дефицитом белков NER ($Csb^{m/m}$, $Csa^{-/-}$, $Xpa^{-/-}$, $Xpc^{-/-}$ и их комбинации) и/или OGG1 ($Ogg1^{-/-}$) [56]. Анализ содержания 8-охоG в клетках, обработанных окислительным агентом (бромат калия), выявил снижение скорости удаления 8-охоG из ДНК в клетках с дефицитом белков NER по сравнению с клетками дикого типа, хотя и в меньшей степени, чем в клетках $Ogg1^{-/-}$. Кроме того, в клетках с двойными мутациями $Csb^{-/-}$ $Xpa^{-/-}$ и $Csb^{-/-}$ $Xpc^{-/-}$ удаление 8-охоG происходило медленнее, чем с одиночными мутациями, а снижение скорости было сопоставимо с клетками $Ogg1^{-/-}$. В то же время эффективность репарации 8-охоG в клетках с двойными мутациями $Xpa^{-/-}$ $Xpc^{-/-}$ практически не отличалась от эффективности в клетках с одиночными мутациями. На основании полученных результатов предположили, что повышенный уровень окислительных повреждений ДНК в клетках с комбинацией мутаций в CSB и XPA/XPC свидетельствует об участии этих белков в разных путях репарации. Данные, полученные на клетках мыши, подтверждены на первичных фибробластах человека XP-A, которые оказались более чувствительными к бромату калия по сравнению с нормальными фибробластами. Проблемы с исправлением окислительных повреждений в клетках с дефицитом факторов NER XPA и XPC [57], а также в клетках XP-G/CS [58] обнаружены и другими исследователями. Участие XPA и CSB в удалении 8-охоG связано преимущественно с TC-NER [59].

Привлечение факторов NER к местам окислительных повреждений показано также в живых клетках, экспрессирующих химерные флуоресцентные белки XPC-GFP и CSB-GFP [60]. После локального лазерного облучения клеточного ядра наблюдалось накопление флуоресцентных белков в определенных местах: CSB рекрутировался в

ядрышко, а XPC накапливался в области гетерохроматина, что соответствует роли этих белков в TC-NER и GG-NER соответственно. Участие CSB в репарации 8-oxoG получило дальнейшее подтверждение в более позднем исследовании, проведенном той же группой [61]. Используя, как и в предыдущей работе, метод визуализации флуоресцентных белков в живых клетках, показано, что рекрутирование OGG1 к повреждению не зависит от CSB, тогда как привлечение XRCC1, белка-платформы BER, стимулируется CSB транскрипционно-зависимым способом. Предполагается, что в качестве белка, ремоделирующего хроматин, CSB помогает загрузке XRCC1 в труднодоступные участки транскрибируемых генов, тем самым обеспечивая доступ для последующих белков BER.

Недавно показали, что UV-DDB, один из ключевых факторов GG-NER, функционирующий как сенсор УФ-индуцированных повреждений и ремоделирующий хроматин фактор, увеличивает эффективность OGG1 и APE1, а также значительно стимулирует активность Polβ в заполнении бреши [62]. Визуализация на уровне одной молекулы в режиме реального времени показала, что UV-DDB образует временные комплексы с OGG1 или APE1, облегчая их диссоциацию из комплекса с ДНК. Кроме того, UV-DDB перемещается в клетке к местам репарации 8-oxoG, а истощение UV-DDB повышает чувствительность клеток к окислительному повреждению ДНК. Предполагается, что UV-DDB служит основным сенсором повреждений ДНК не только в NER, но и в BER, способствуя распознаванию повреждений в контексте хроматина.

Поврежденное основание 8-oxoG может подвергаться дальнейшему окислению, что приводит к образованию спироиминодигидантоина (Sp) и 5-гуанидиногидантоина (Gh), которые узнаются ДНК-гликозилазой NEIL1 [63–67], а также служат субстратами системы NER [68]. Недавно группа исследователей из университета Нью-Йорка, возглавляемая N.E. Geacintov, проанализировала репарацию ДНК, содержащих эти повреждения, в клетках человека (интактных и дефектных по BER (NEIL1$^{-/-}$) и NER (XPA$^{-/-}$)) и оценили относительный вклад BER и NER в их удаление [69]. Клетки трансфицировали ДНК, содержащими радиоактивную метку вблизи Gh или Sp, инкубировали в течение определенных промежутков времени, затем лизировали, выделяли низкомолекулярную ДНК и оценивали присутствие продуктов процессинга повреждений по пути BER и NER. Показано, что оба повреждения удаляются как по пути BER, так и с помощью NER, при этом количество образующихся продуктов прямо коррелировало с активностью системы. В клетках NEIL1$^{-/-}$ репарация проходила преимущественно по механизму NER, тогда как дефект в системе NER приводил к повышению количества продуктов BER. Полученные данные свидетельствуют о конкуренции между двумя путями репарации, которые узнают и связывают одни и те же повреждения, при этом вклад каждого из путей зависит от концентрации белков-участников процесса. Влияние факторов NER на различные стадии процесса BER схематично представлено на рис. 1.

Система NER вносит основной вклад в репарацию аддуктов ДНК с платиной, возникающих под действием препаратов, используемых в химиотерапии (цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин). В результате ковалентного связывания Pt с двумя нуклеотидными остатками в одной или в противоположных цепях ДНК-дуплекса образуются внутри- или межцепочечные сшивки (ICL) соответственно. Хотя эти повреждения удаляются главным образом в процессе NER, обнаружено, что удаление 1,2-(GpG)-аддуктов из ДНК зависит от уровня экспрессии ключевого фермента BER – APE1 [12, 13]. Подавление экспрессии APE1 с помощью РНК-интерференции приводило к ингибированию репарации аддуктов ДНК-Pt, а инфицирование клеток лентивирусом, несущим ген *APE1*, восстанавливало эффективность репарации [13]. Кроме того, изменение экспрессии *APE1* влияло на уровни экспрессии белков NER, RPA и XPA, что свидетельствует о взаимодействии между двумя путями репарации.

Дальнейшее изучение репарации ICL, индуцированных воздействием цисплатина и оксиплатина, с применением технологии CRISPR/Cas9 подтвердило, что в исправление этих повреждений вовлечены белки не только NER, но и BER [70]. Аналогичные данные получены при изучении репарации повреждений, индуцированных производными псоралена, которые при облучении УФ-светом образуют моноаддукты как с ДНК, так и с ICL. Показано, что в репарацию таких повреждений вовлечена гликозилаза NEIL1, хотя данные, касающиеся вклада этого фермента в удаление каждого из повреждений, противоречивы. Сначала получили результаты, свидетельствующие об участии NEIL1 в репарации моноаддуктов [71], но не ICL, а позднее обнаружили способность NEIL1 удалять оба вида аддуктов [72, 73], тогда как другими исследователями показано, что в обработанных триоксаленом клетках NEIL1 привлекается только к ICL и не обнаруживается в местах образования моноаддуктов [74]. Таким образом, полученные результаты, несмотря на некоторую их противоречивость, показывают, что системы NER и BER взаимодействуют и дополняют друг друга, что обеспечивает более эффективную защиту ДНК при генотоксическом стрессе.

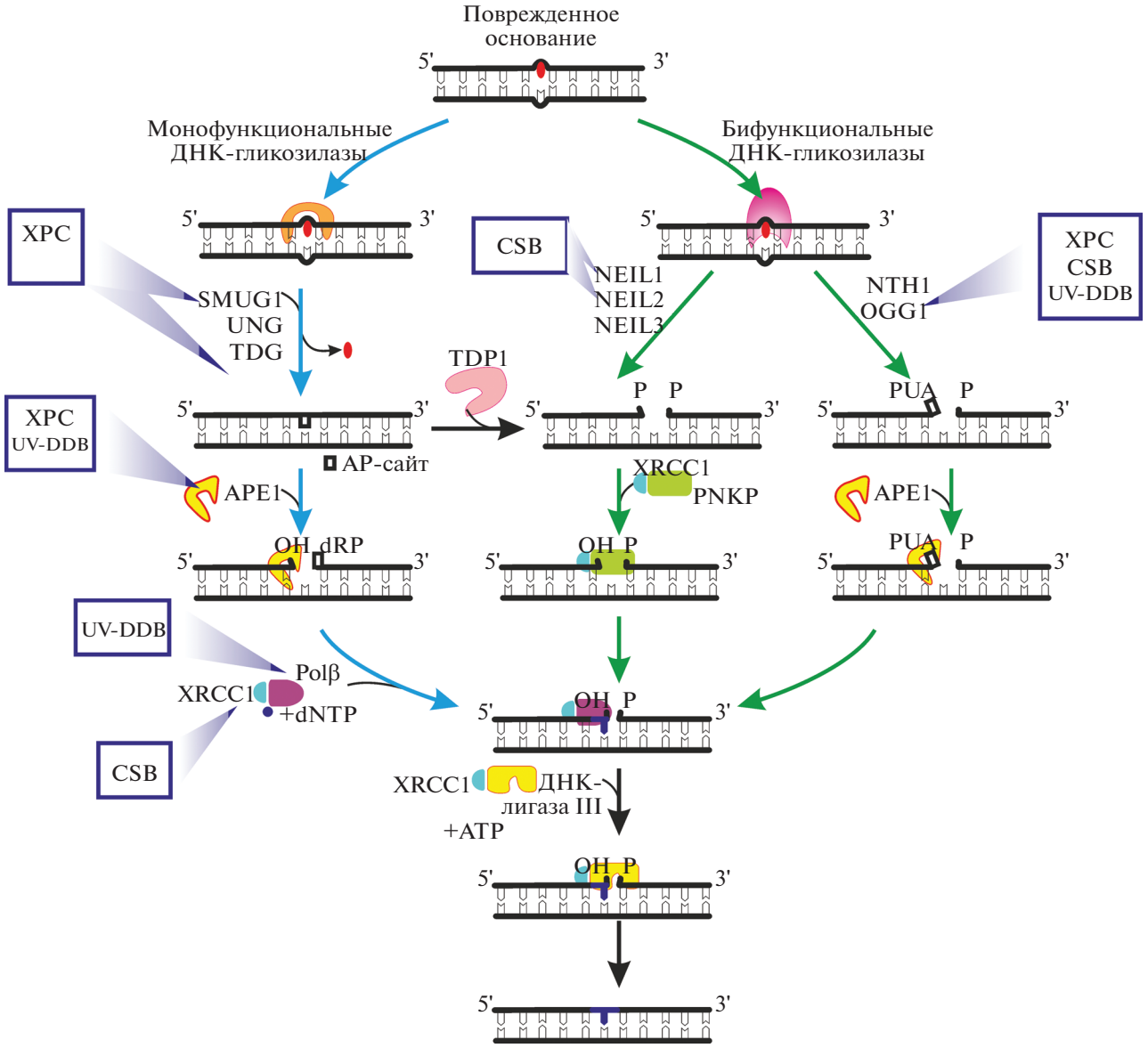


Рис. 1. Схема короткозаплаточного пути BER, инициируемого моно- и бифункциональными ДНК-гликозилазами. Белки NER, влияющие на активность ферментов BER, и катализируемые ими стадии процесса, приведены в рамках со стрелками.

Значительный прогресс в понимании физических и функциональных взаимодействий путей NER и BER может обеспечить применение биоинформатических методов. База данных STRING содержит информацию о белок-белковых взаимодействиях, объединяющую известные данные о межбелковых ассоциациях у большого числа организмов [75]. В опубликованном недавно обзоре [76] представлены результаты анализа на основе STRING взаимодействий 32 белков, относящихся к NER, и 23 белков, ассоциированных с BER. Построенная сеть взаимодействий (интерактом) белков NER и BER выявляет значительную связь между этими путями репарации. Дальнейшие исследования могут выявить новые функции, общие для этих путей репарации, и их взаимодействия в поддержании стабильности генома.

ПОЛИ(ADP-РИБОЗА)ПОЛИМЕРАЗА 1 – РЕГУЛЯТОР ПРОЦЕССОВ BER И NER

В ответ на повреждение ДНК в клетках высших эукариот происходит модификация ядерных белков с помощью полимера ADP-рибозы (PAR). Поли(ADP-рибозил)ирование (PAR-илирование) белков катализируется несколькими PARP, которые постоянно и в значительном количестве присут-

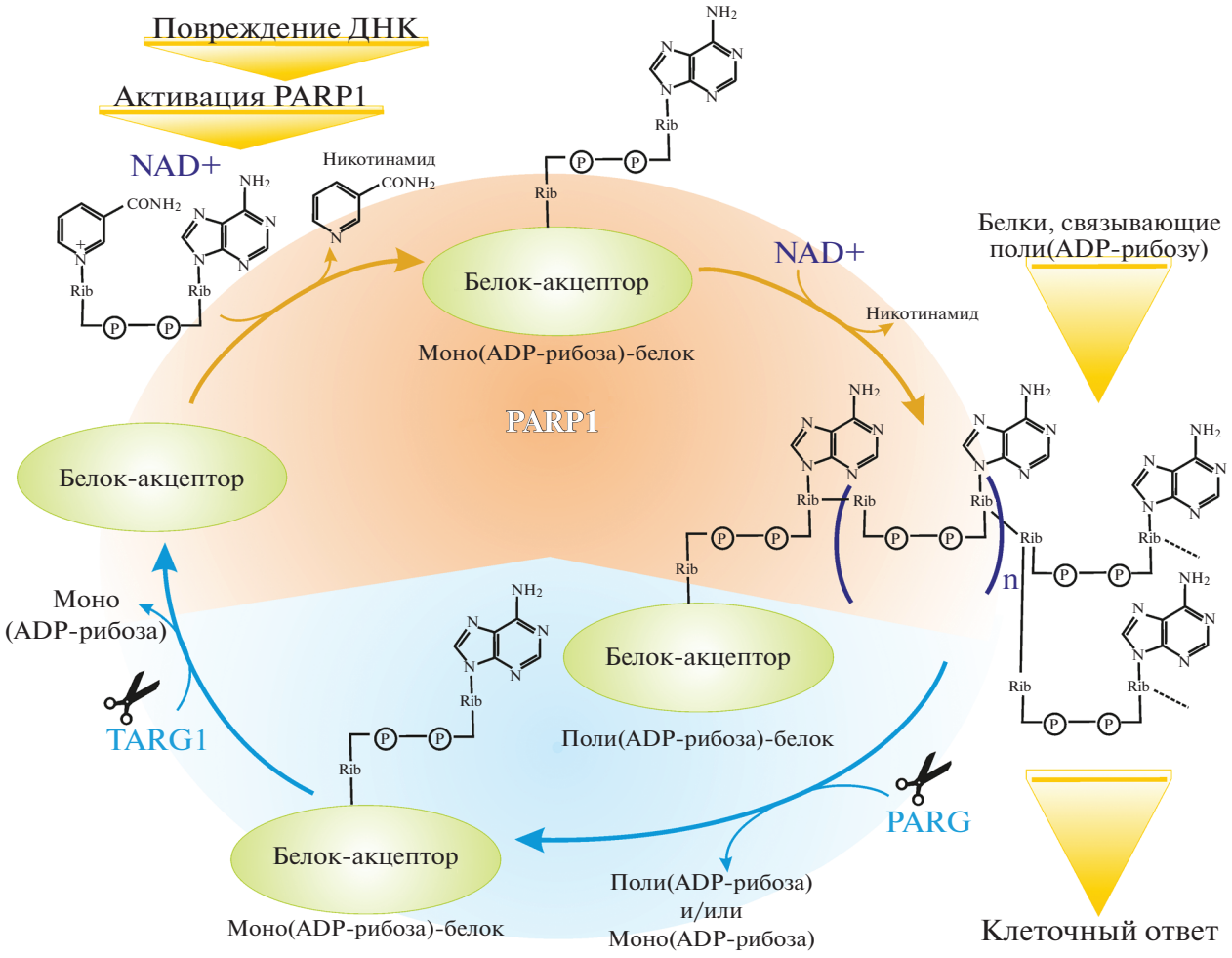


Рис. 2. Регуляция синтеза поли(ADP-рибозы). В ответ на повреждение ДНК PARP1 катализирует поли(ADP-рибозил)ирование белков (включая автомодификацию), используя в качестве субстрата NAD^+. PAR-связывающие белки участвуют в клеточном ответе на повреждение ДНК. Поли(ADP-рибоза)гликогидролаза (PARG) расщепляет PAR, регулируя уровень PAR-илирования белков и синтеза PAR в клетке. Остаток ADP-рибозы, присоединенный к белку, удаляется с помощью терминальной (ADP-рибоза)гликогидролазы 1 (TARG1).

ствуют в клетке. Белки PARP образуют суперсемейство, включающее 17 представителей, объединенных по характерному признаку – наличию консервативного домена, содержащего мотив “PARP signature” – высококонсервативную последовательность, которая участвует в формировании активного центра [77]. В качестве источника ADP-рибозы PARP использует NAD^+ и переносит эту группу на белок-акцептор.

Из 17 белков семейства PARP в клеточном ответе на повреждение ДНК участвуют три – PARP1, PARP2 и PARP3 [78, 79]. Их мишенями преимущественно служат белки, участвующие в укладке хроматина и метаболизме ДНК, включая гистоны, белки репарации ДНК и транскрипционные факторы, а также сами PARP. Из трех ферментов PARP, активируемых поврежденной ДНК, наиболее хорошо изучен PARP1, на долю которого приходится до 90% синтезируемой в клетке PAR [79]. Реакция PAR-илирования обратима: PAR подвергается расщеплению с помощью фермента поли(ADP-рибоза)гликогидролазы, что обеспечивает дополнительную регуляцию уровня PAR-илирования белков и синтеза PAR в клетке. Остаток ADP-рибозы, присоединенный к акцепторному аминокислотному остатку белка, удаляется с помощью специальных ферментов, в частности терминальной (ADP-рибоза)гликогидролазы 1 [80], в результате чего PARP1 и другие белки-акцепторы могут участвовать в следующем раунде PAR-илирования (рис. 2).

PARP1 считается одним из ключевых регуляторов репарации ДНК и других клеточных процессов [81–84]. Участие PARP1 в процессе BER изучено достаточно подробно (полученные результаты систематизированы в обзорах [85, 86]). Показано, что PARP1 взаимодействует с белками BER и модулирует их активность [27, 87], ряд бел-

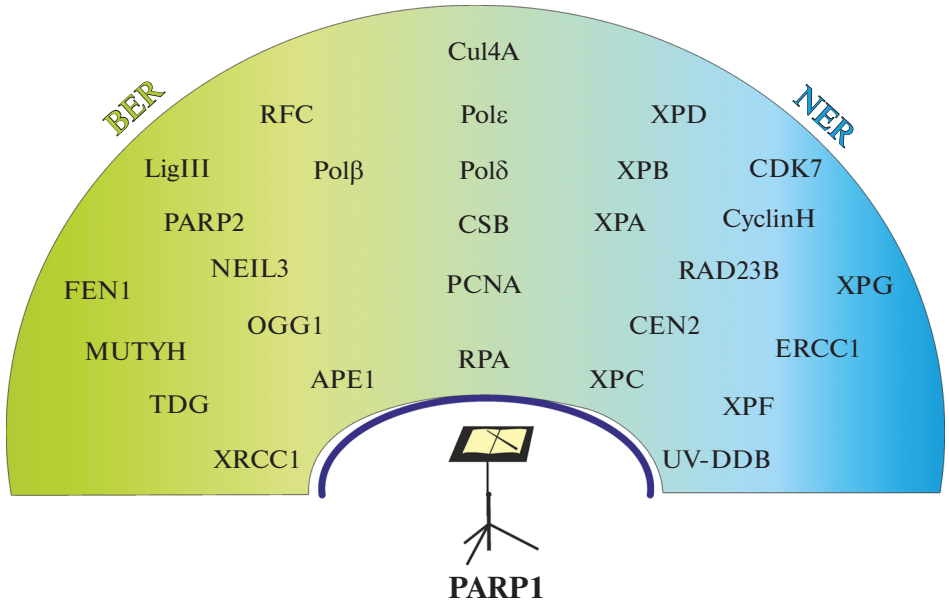


Рис. 3. PARP1 регулирует интерактом процессов BER и NER, взаимодействуя с белками-участниками.

ков BER подвергается PAR-илированию [88, 89]. В последнее время роль PARP1 и катализируемого им PAR-илирования в процессе NER активно изучается. Известные к настоящему времени данные обсуждены нами в обзорной статье [90]. Некоторые белки репарации способны связывать как свободный PAR, так и присоединенный к PARP1 и/или другим белкам-акцепторам (рис. 2), что рассматривается как один из механизмов вовлечения этих белков в соответствующие процессы и их регуляцию [78]. Взаимодействие осуществляется через PAR-связывающие домены, либо в нем участвуют РНК- или ДНК-связывающие домены белков. В этом случае возможна конкуренция между нуклеиновыми кислотами (PAR – полимер нуклеотидной природы, “третья нуклеиновая кислота”) за связывание с белком.

Развитие протеомных методов привело к обнаружению большого массива белков, подвергающихся PAR-илированию в ответ на генотоксический стресс и/или взаимодействующих с PAR, среди которых белки BER и NER [91, 92]. Известные к настоящему времени взаимодействия PARP1 с белками этих процессов репарации ДНК представлены на рис. 3.

И PARP1, и катализируемый этим ферментом синтез PAR могут участвовать в пространственно-временной регуляции процессов репарации при возникновении в ДНК множественных повреждений различной природы. Недавно опубликовали результаты масштабного исследования кинетики рекрутирования и диссоциации 70 белков репарации на индуцированные лазером сайты повреждения ДНК в клетках HeLa [93]. Эти белки в зависимости от времени их появления на поврежденном участке сгруппировали в семь групп. Белки-сенсоры повреждений NER (XPC, DDB2) и BER (NEIL3), а также PARP1, некоторые PAR-связывающие белки, в том числе PARG и XRCC1, факторы деконденсации хроматина вошли в первые две группы (полупериод рекрутирования 1.8–3.7 и 4.2–9.4 с соответственно). Анализ кинетики диссоциации выявил четыре группы белков, причем в первую группу (полупериод диссоциации с ДНК 24.7–110.5 с) вошли PARP1, PAR-связывающие и PAR-гидролизующие белки, что согласуется с предполагаемой ролью диссоциации PARP1 и гидролиза PAR в высвобождении белков репарации из комплексов с ДНК после исправления повреждения [94]. Изучено также изменение динамики ассоциации/диссоциации белков репарации при ингибировании PARP. Полученные данные свидетельствуют, что присутствие ингибитора PARP приводит к значительной перестройке порядка рекрутирования белков, что может изменить механизм и результат процесса репарации ДНК. Таким образом, исследование динамики белков репарации при множественных повреждениях ДНК выявляет многогранность взаимодействий и координацию путей репарации и может быть использовано для изучения нестабильности генома и влияния на эти процессы противоопухолевых препаратов – ингибиторов PARP.

В заключение хотелось бы подчеркнуть, что исследование интерактома репарации, взаимного влияния белков разных систем, выявление перекрывающихся или дополняющих функций этих белков имеет не только фундаментальное значение для понимания механизмов поддержания

стабильности генома, но и актуальны для развития новых подходов к терапии онкологических заболеваний. Такие исследования необходимы в связи с известным фактом существования и формирования дополнительных путей репарации повреждений ДНК в раковых клетках, обеспечивающих лекарственную устойчивость. Особый интерес представляют взаимодействия белков BER и NER при исправлении множественных (кластерных) повреждений ДНК, возникающих при интенсивном генотоксическом стрессе, а также при радиотерапии. Регуляция активности процессов репарации при исправлении таких повреждений необходима для предотвращения образования двухцепочечных разрывов ДНК, возникновения мутаций и генетической нестабильности. С другой стороны, понимание механизмов регуляции процессов репарации ДНК может быть полезным для направленной дисрегуляции этих процессов в раковых клетках с целью усиления действия ДНК-повреждающих агентов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00107) и Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. (№ АААА-А17-117020210022-4).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Friedberg E.C. (2003) DNA damage and repair. *Nature*. **421**, 436–440. https://doi.org/10.1038/nature01408
2. Krokan H.E., Bjørås M. (2013) Base excision repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. **5**, a012583. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583
3. Gillet L.C., Scharer O.D. (2006) Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem. Rev*. **106**, 253–276. https://doi.org/10.1021/cr040483f.1
4. Limpose K.L., Corbett A.H., Doetsch P.W. (2017) BERing the burden of damage: pathway crosstalk and posttranslational modification of base excision repair proteins regulate DNA damage management. *DNA Repair*. **56**, 51–64. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.06.007
5. Kumar N., Moreno N.C., Feltes B.C., Menck C.F., Van Houten B. (2020) Cooperation and interplay between base and nucleotide excision repair pathways: from DNA lesions to proteins. *Genet. Mol. Biol*. **43**(1 suppl. 1), e20190104. https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0104
6. Shimizu Y., Iwai S., Hanaoka F., Sugasawa K. (2003) Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase. *EMBO J*. **22**, 164–173. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg016
7. Muftuoglu M., de Souza-Pinto N.C., Dogan A., Aamann M., Stevnsner T., Rybanska I., Kirkali G., Dizdaroglu M., Bohr V.A. (2009) Cockayne syndrome group B protein stimulates repair of formamidopyrimidines by NEIL1 DNA glycosylase. *J. Biol. Chem*. **284**, 9270–9279. https://doi.org/10.1074/jbc.M807006200
8. Aamann M.D., Hvitby C., Popuri V., Muftuoglu M., Lemminger L., Skeby C.K., Keijzers G., Ahn B., Bjørås M., Bohr V.A., Stevnsner T. (2014) Cockayne syndrome group B protein stimulates NEIL2 DNA glycosylase activity. *Mech. Ageing Dev*. **135**, 1–14. https://doi.org/10.1016/j.mad.2013.12.008
9. Старостенко Л.В., Мальцева Е.А., Лебедева Н.А., Пестряков П.Е., Лаврик О.И., Речкунова Н.И. (2016) Взаимодействие фактора эксцизионной репарации нуклеотидов XPC–RAD23B с ДНК, содержащей кластерное повреждение – производное бенз[*a*]пирена и апуриновый/апиримидиновый сайт. *Биохимия*. **81**, 350–360.
10. Menoni H., Hoeijmakers J.H., Vermeulen W. (2012) Nucleotide excision repair-initiating proteins bind to oxidative DNA lesions *in vivo*. *J. Cell. Biol*. **199**, 1037–1046. https://doi.org/10.1083/jcb.201205149
11. Menoni H., Wienholz F., Theil A.F., Janssens R.C., Lans H., Campalans A., Radicella J.P., Marteijn J.A., Vermeulen W. (2018) The transcription-coupled DNA repair-initiating protein CSB promotes XRCC1 recruitment to oxidative DNA damage. *Nucl. Acids Res*. **46**, 7747–7756. https://doi.org/10.1093/nar/gky579
12. Kelley M.R., Jiang Y., Guo C., Reed A., Meng H., Vasko M.R. (2014) Role of the DNA base excision repair protein, APE1 in cisplatin, oxaliplatin, or carboplatin induced sensory neuropathy. *PLoS One*. **9**, e106485. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106485
13. Kim H.-S. Guo C., Thompson E.L., Jiang Y., Kelley M.R., Vasko M.R., Lee S.-H. (2015) APE1, the DNA base excision repair protein, regulates the removal of platinum adducts in sensory neuronal cultures by NER. *Mutat. Res*. **779**, 96–104. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.06.010
14. Fromme J.C., Verdine G.L. (2004) Base excision repair. *Adv. Protein Chem*. **69**, 1–41. https://doi.org/10.1016/S0065-3233(04)69001-2
15. Boiteux S., Coste F., Castaing B. (2017) Repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N-glycosylases. *Free Radic. Biol. Med*. **107**, 179–201. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.042
16. Lindahl T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. **362**, 709–715. https://doi.org/10.1038/362709a0
17. Wilson 3rd D.M., Barsky D. (2001) The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat. Res*. **485**, 283–307. https://doi.org/10.1016/s0921-8777(01)00063-5

18. Lhomme J., Constant J.F., Demeunynck M. (1999) Abasic DNA structure, reactivity, and recognition. *Biopolymers*. **52**, 65–83. https://doi.org/10.1002/1097-0282

19. 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. (2004) AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. *Mol. Cell*. **15**, 209–220. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.003

20. Lebedeva N.A., Rechkunova N.I, Lavrik O.I. (2011) AP-site cleavage activity of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. *FEBS Lett*. **585**, 683–686. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.01.032

21. Lebedeva N.A., Rechkunova N.I., Ishchenko A.A., Saparbaev M., Lavrik O.I. (2013) The mechanism of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 in the cleavage of AP site and its synthetic analogs. *DNA Repair (Amst.)*. **12**, 1037–1042. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.09.008

22. Srivastava D.K., Berg B.J., Prasad R., Molina J.T., Beard W.A., Tomkinson A.E., Wilson S.H. (1998) Mammalian abasic site base excision repair. identification of the reaction sequence and rate-determining steps. *J. Biol. Chem*. **273**, 21203–21209. https://doi.org/10.1074/jbc.273.33.21203

23. Horton J.K., Prasad R., Hou E., Wilson S.H. (2000) Protection against methylation-induced cytotoxicity by DNA polymerase beta-dependent long patch base excision repair. *J. Biol. Chem*. **275**, 2211–2218. https://doi.org/10.1074/jbc.275.3.2211

24. Hoeijmakers J.H. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. **411**, 366–374. https://doi.org/10.1038/35077232

25. Fortini P., Dogliotti E. (2007) Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst.)*. **6**, 398–409. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.008

26. Liu Y., Beard W.A., Shock D.D., Prasad R., Hou E.W., Wilson S.H. (2005) DNA polymerase beta and flap endonuclease 1 enzymatic specificities sustain DNA synthesis for long patch base excision repair. *J. Biol. Chem*. **280**, 3665–3674. https://doi.org/10.1074/jbc.M412922200

27. Sukhanova M.V., Khodyreva S.N., Lebedeva N.A., Prasad R., Wilson S.H., Lavrik O.I. (2005) Human base excision repair enzymes apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1), DNA polymerase beta and poly(ADP-ribose) polymerase 1: interplay between strand-displacement DNA synthesis and proofreading exonuclease activity. *Nucl. Acids Res*. **33**, 1222–1229. https://doi.org/10.1093/nar/gki266

28. Prasad R., Williams J.G., Hou E.W., Wilson S.H. (2012) Polβ associated complex and base excision repair factors in mouse fibroblasts. *Nucl. Acids Res*. **40**, 11571–11582. https://doi.org/10.1093/nar/gks898

29. Moor N.A., Vasil'eva I.A., Anarbaev R.O., Antson A.A., Lavrik O.I. (2015) Quantitative characterization of protein-protein complexes involved in base excision DNA repair. *Nucl. Acids Res*. **43**, 6009–6022. https://doi.org/10.1093/nar/gkv569

30. Prasad R., Shock D.D., Beard W.A., Wilson S.H. (2010) Substrate channeling in mammalian base excision repair pathways: passing the baton. *J. Biol. Chem*. **285**, 40479–40488. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.155267

31. Caldecott K.W. (2020) Mammalian DNA base excision repair: dancing in the moonlight. *DNA Repair (Amst.)*. **93**, 102921. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102921

32. Saville K.M., Clark J., Wilk A., Rogers G.D., Andrews J.F., Koczor C.A., Sobol R.W. (2020) NAD^+-mediated regulation of mammalian base excision repair. *DNA Repair (Amst.)*. **93**, 102930. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102930

33. Moor N.A., Lavrik O.I. (2019) Coordination of DNA base excision repair by protein-protein interactions. In: *DNA Repair. An Update*. Ed. Mognato M. p., 184–217. https://doi.org/10.5772/intechopen.82642

34. London R.E. (2015) The structural basis of XRCC1-mediated DNA repair. *DNA Repair (Amst.)*. **30**, 90–103. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.02.005

35. Fang Q., Inanc B., Schamus S., Wang X.H., Wei L., Brown A.R., Svilar D., Sugrue K.F., Goellner E.M., Zeng X., Yates N.A., Lan L., Vens C., Sobol R.W. (2014) HSP90 regulates DNA repair via the interaction between XRCC1 and DNA polymerase beta. *Nat. Commun*. **5**, 5513. https://doi.org/10.1038/ncomms6513

36. Pettijohn D., Hanawalt P. (1964) Evidence for repair-replication of ultraviolet damaged DNA in bacteria. *J. Mol. Biol*. **9**, 395–410. https://doi.org/10.1016/s0022-2836(64)80216-3

37. Tornaletti S., Hanawalt P.C. (1999) Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimie*. **81**, 139–146. https://doi.org/10.1016/s0300-9084(99)80046-7

38. Fousteri M., Mullenders L.H. (2008) Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res*. **18**, 73–84. https://doi.org/10.1038/cr.2008.6

39. Sugasawa K., Shimizu Y., Iwai S., Hanaoka F. (2002) A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair (Amst.)*. **1**, 95–107.

40. Maillard O., Camenisch U., Clement F.C., Blagoev K.B., Naegeli H. (2007) DNA repair triggered by sensors of helical dynamics. *Trends Biochem. Sci*. **32**, 494–499. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.08.008

41. Min J.H., Pavletich N.P. (2007) Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein. *Nature*. **449**, 570–575. https://doi.org/10.1038/nature06155

42. Maltseva E.A., Rechkunova N.I., Petruseva I.O., Vermeulen W., Scharer O.D., Lavrik, O.I. (2008) Cross-linking of nucleotide excision repair proteins with DNA containing photoreactive damages. *Bioorg. Chem*. **36**, 77–84. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2007.11.004

43. Rechkunova N.I., Lavrik O.I. (2010) Nucleotide excision repair in higher eukaryotes: mechanism of primary damage recognition in global genome repair. *Subcell. Biochem*. **50**, 251–277. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3471-7_13

44. Krasikova Y.S., Rechkunova N.I., Maltseva E.A., Pestryakov P.E., Petruseva I.O., Sugasawa K., Chen X., Min J.H., Lavrik O.I. (2013) Comparative analysis of interaction of human and yeast DNA damage recognition complexes with damaged DNA in nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem*. **288**, 10936–10947. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.444026

45. Fitch M.E., Nakajima S., Yasui A., Ford J.M. (2003) *In vivo* recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. *J. Biol. Chem*. **278**, 46906–46910. https://doi.org/10.1074/jbc.M307254200

46. Moser J., Volker M., Kool H., Alekseev S., Vrieling H., Yasui A., van Zeeland A.A., Mullenders L.H. (2005) The UV-damaged DNA binding protein mediates efficient targeting of the nucleotide excision repair complex to UV-induced photo lesions. *DNA Repair (Amst.)*. **4**, 571–582. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.01.001

47. Houten B.V., Kuper J., Kisker C. (2016) Role of XPD in cellular functions: to TFIIH and beyond. *DNA Repair (Amst.)*. **44**, 136–142. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.019

48. Evans E., Moggs J.G., Hwang J.R., Egly J.M., Wood R.D. (1997) Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *EMBO J*. **16**, 6559–6573. https://doi.org/10.1093/emboj/16.21.6559

49. Staresincic L., Fagbemi A.F., Enzlin J.H., Gourdin A.M., Wijgers N., Dunand-Sauthier I., Giglia-Mari G., Clarkson S.G., Vermeulen W., Scharer O.D. (2009) Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *EMBO J*. **28**, 1111–1120. https://doi.org/10.1038/emboj.2009.49

50. Krasikova Y.S., Rechkunova N.I., Maltseva E.A., Petruseva I.O., Lavrik O.I. (2010) Localization of xeroderma pigmentosum group A protein and replication protein A on damaged DNA in nucleotide excision repair. *Nucl. Acids Res*. **38**, 8083–8094. https://doi.org/10.1093/nar/gkq649

51. Kemp M.G., Gaddameedhi S., Choi J.H., Hu J., Sancar A. (2014) DNA repair synthesis and ligation affect the processing of excised oligonucleotides generated by human nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem*. **289**, 26574–26583. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.597088

52. Reardon J.T., Bessho T., Kung H.C., Bolton P.H., Sancar A. (1997) *In vitro* repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 9463–9468. https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9463

53. D'Érrico M., Parlani E., Teson M., Jesus B.M.B., Degan P., Calcagnile A., Jaruga P., Bjøras M., Crescenzi B., Pedrini A.M., Egly J.-M., Zambruno G., Stefanini M., Dizdaroglu M., Dogliotti E. (2006) New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *EMBO J*. **25**, 4305–4315.

54. Kassam S.N., Rainbow A.J. (2007) Deficient base excision repair of oxidative DNA damage induced by methylene blue plus visible light in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **359**, 1004–1009. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.005

55. Shimizu Y., Uchimura Y., Dohmae N., Saitoh H., Hanaoka F., Sugasawa K. (2010) Stimulation of DNA glycosylase activities by XPC protein complex: roles of protein-protein interactions. *J. Nucl. Acids*. 2010, **805698**. https://doi.org/10.4061/2010/805698

56. Parlanti E., D'Errico M., Degan P., Calcagnile A., Zijno A., van der Pluijm I., van der Horst G.T., Biard D.S., Dogliotti E. (2012) The cross talk between pathways in the repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mouse and human cells. *Free Radic. Biol. Med*. **53**, 2171–2177. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.593

57. Berra C.M., Oliveira C.S., Garcia C.C.M., Rocha C.R., Lerner L.K., Lima L.C., Baptista M.S., Menck C.F.M. (2013) Nucleotide excision repair activity on DNA damage induced by photoactivated methylene blue. *Free Radic. Biol. Med*. **61**, 343–356. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.026

58. Soltys D.T., Rocha C.R., Lerner L.K., Souza T.A., Munford V., Cabral F., Nardo T., Stefanini M., Sarasin A., Cabral-Neto J.B., Menck C.F. (2013) Novel XPG (ERCC5) mutations affect DNA repair and cell survival after ultraviolet but not oxidative stress. *Hum. Mutat*. **34**, 481–489. https://doi.org/10.1002/humu.22259

59. Guo J., Hanawalt P.C., Spivak G. (2013) Comet-FISH with strand-specific probes reveals transcription-coupled repair of 8-oxoGuanine in human cells. *Nucl. Acids Res*. **41**, 7700–7712. https://doi.org/10.1093/nar/gkt524

60. Menoni H., Hoeijmakers J.H., Vermeulen W. (2012) Nucleotide excision repair-initiating proteins bind to oxidative DNA lesions *in vivo. J. Cell. Biol*. **199**, 1037–1046. https://doi.org/10.1083/jcb.201205149

61. Menoni H., Wienholz F., Theil A.F., Janssens R.C., Lans H., Campalans A., Radicella J.P., Marteijn J.A., Vermeulen W. (2018) The transcription-coupled DNA repair-initiating protein CSB promotes XRCC1 recruitment to oxidative DNA damage. *Nucl. Acids Res*. **46**, 7747–7756. https://doi.org/10.1093/nar/gky579

62. Jang S., Kumar N., Beckwitt E.C., Kong M., Fouquerel E., Rapić-Otrin V., Prasad R., Watkins S.C., Khuu C., Majumdar C., David S.S., Wilson S.H., Bruchez M.P., Opresko P.L., van Houten B. (2019) Damage sensor role of UV-DDB during base excision repair. *Nat. Struct. Mol. Biol*. **26**, 695–703. https://doi.org/10.1038/s41594-019-0261-7

63. Hailer M.K., Slade P.G., Martin B.D., Rosenquist T.A., Sugden K.D. (2005) Recognition of the oxidized base damage spiroiminodihydantoin and guanidinohydantoin in DNA by the mammalian base excision repair glycosylases NEIL1 and NEIL2. *DNA Repair*. **4**, 41–50. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.07.006

64. Krishnamurthy N., Zhao X., Burrows C.J., David S.S. (2008) Superior removal of hydantoin lesions relative to other oxidized bases by the human DNA glycosylase hNEIL1. *Biochemistry*. **47**, 7137–7146. https://doi.org/10.1021/bi800160s

65. Luo W., Muller J.G., Rachlin E.M., Burrows C.J. (2000) Characterization of spiroiminodihydantoin as a product of one electron oxidation of 8-Oxo-7,8-dihydroguanosine. *Org. Lett*. **2**, 613–616. https://doi.org/10.1021/ol9913643

66. Niles J.C., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. (2001) Spiroiminodihydantoin is the major product of the 8-oxo-7,8-dihydroguanosine reaction with peroxynitrite in the presence of thiols and guanosine photooxidation by methylene blue. *Org. Lett*. **3**, 963–966.

67. Zhao X., Krishnamurthy N., Burrows C.J., David S.S. (2010) Mutation versus repair: NEIL1 removal of hydantoin lesions in single-stranded, bulge, bubble, and duplex DNA contexts. *Biochemistry*. **49**, 1658–1666. https://doi.org/10.1021/bi901852q

68. Shafirovich V., Kropachev K., Anderson T., Liu Z., Kolbanovskiy M., Martin B.D., Sugden K., Shim Y., Chen X., Min J.H., Geacintov N.E. (2016) Base and nucleotide excision repair of oxidatively generated guanine lesions in DNA. *J. Biol. Chem*. **291**, 5309–5319. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.693218

69. Shafirovich V., Kropachev K., Kolbanovskiy M., Geacintov N.E. (2019) Excision of oxidatively generated guanine lesions by competing base and nucleotide excision repair mechanisms in human cells. *Chem. Res. Toxicol*. **32**, 753–761. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00411

70. Slyskova J., Sabatella M., Ribeiro-Silva C., Stok C., Theil A.F., Vermeulen W., Lans H. (2018) Base and nucleotide excision repair facilitate resolution of platinum drugs-induced transcription blockage. *Nucl. Acids Res*. **46**, 9537–9549. https://doi.org/10.1093/nar/gky764

71. Couve-Privat S., Mace G., Rosselli F., Saparbaev M.K. (2007) Psoralen-induced DNA adducts are substrates for the base excision repair pathway in human cells. *Nucl. Acids Res.*, **35**, 5672–5682. https://doi.org/10.1093/nar/gkm592

72. Couve S., Mace-Aim G., Rosselli F., Saparbaev M.K. (2009) The human oxidative DNA glycosylase NEIL1 excises psoralen-induced interstrand DNA cross-links in a three-stranded DNA structure. *J. Biol. Chem*. **284**, 11963–11970. https://doi.org/10.1074/jbc.M900746200

73. Martin P.R., Couve S., Zutterling C., Albelazi M.S., Groisman R., Matkarimov B.T., Parsons J.L., Elder R.H., Saparbaev M.K. (2017) The human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL3 excise psoralen-induced DNA-DNA cross-links in a four stranded DNA structure. *Sci. Rep*. **7**, 17438. https://doi.org/10.1038/s41598-017-17693-4

74. McNeill D.R., Paramasivam M., Baldwin J., Huan J., Vyjayanti V.N., Seidman M.M., Wilson D.M. 3rd (2013) NEIL1 responds and binds to psoralen-induced DNA interstrand crosslinks. *J. Biol. Chem*. **288**, 12426–12436. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.456087

75. Szklarczyk D., Morris J.H., Cook H., Kuhn M., Wyder S., Simonovic M., Santos A., Doncheva N.T., Roth A., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. (2017) The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucl. Acids Res*. **45**, D362–D368. https://doi.org/10.1093/nar/gkw937

76. Kumar N., Moreno N.C., Feltes B.C., Menck C.F.M., Van Houten B. (2020) Cooperation and interplay between base and nucleotide excision repair pathways: from DNA lesions to proteins. *Genet. Mol. Biol*. **43**(1 suppl. 1), e20190104. https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0104

77. Ame J.C., Spenlehauer C., de Murcia G. (2004) The PARP superfamily. *Bioessays*. **26**, 882–893. https://doi.org/10.1002/bies.20085

78. Schreiber V., Dantzer F., Ame J.C., de Murcia G. (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. **7**, 517–528. https://doi.org/10.1038/nrm1963

79. Shieh W.M., Ame J.C., Wilson M.V., Wang Z.Q., Koh D.W., Jacobson M.K., Jacobson E.L. (1998) Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J. Biol. Chem*. **273**, 30069–30072. https://doi.org/10.1074/jbc.273.46.30069

80. Sharifi R., Morra R., Appel C.D., Tallis M., Chioza B., Jankevicius G., Simpson M.A., Matic I., Ozkan E., Golia B., et al. (2013) Deficiency of terminal ADP-ribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease. *EMBO J*. **32**, 1225–1237. https://doi.org/10.1038/emboj.2013.51

81. Burkle A., Virag L. (2013) Poly(ADP-ribose): PARadigms and PARadoxes. *Mol. Aspects Med*. **34**, 1046–1065. https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.12.010

82. Kraus W.L., Hottiger M.O. (2013) PARP-1 and gene regulation: progress and puzzles, *Mol. Aspects Med*. **34**, 1109–1123. https://doi.org/10.1016/j.mam.2013.01.005

83. Bock F.J., Todorova T.T., Chang P. (2015) RNA regulation by poly(ADP-ribose) polymerases. *Mol. Cell*. **58**, 959–969. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.037

84. Liu C., Vyas A., Kassab M.A., Singh A.K., Yu X. (2017) The role of poly ADP-ribosylation in the first wave of DNA damage response. *Nucl. Acids Res*. **45**, 8129–8141. https://doi.org/10.1093/nar/gkx565

85. Ходырева С.Н., Лаврик О.И. (2016) Поли(ADP-рибоза)полимераза 1 – ключевой регулятор репарации ДНК. *Молекуляр. биология*. **50**, 655–673.

86. Lavrik O.I. (2020) PARPs' impact on base excision DNA repair. *DNA Repair (Amst.)*. **93**, 102911. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102911

87. Суханова М.В., Ходырева С.Н., Лаврик О.И. (2004) Поли(ADP-рибоза)полимераза 1 ингибирует синтез ДНК с вытеснением цепи, катализируемый ДНК-полимеразой β. *Биохимия*. **69**, 686–698.

88. Schreiber V., Ame J.C., Dolle P., Schultz I., Rinaldi B., Fraulob V., Menissier-de Murcia J., de Murcia G. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is

required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J. Biol. Chem*. **277**, 23028–23036.
https://doi.org/10.1074/jbc.M202390200

89. Moor N.A., Vasil'eva I.A., Kuznetsov N.A., Lavrik O.I. (2020) Human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 is modified *in vitro* by poly(ADP-ribose) polymerase 1 under control of the structure of damaged DNA. *Biochimie*. **168**, 144–155.
https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.10.011

90. Речкунова Н.И., Мальцева Е.А., Лаврик О.И. (2019) Посттрансляционные модификации белков эксцизионной репарации нуклеотидов и их роль в регуляции процесса. *Биохимия*. **84**, 1244–1258.

91. Gagne J.P., Isabell M., Lo K.S., Bourassa S., Hendzel M.J., Dawson V.L., Dawson T.M., Poirier G.G. (2008) Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. *Nucl. Acids Res*. **36**, 6959–6976,
https://doi.org/10.1093/nar/gkn771

92. Jungmichel S., Rosenthal F., Altmeyer M., Lukas J., Hottiger M.O., Nielsen M.L. (2013) Proteome-wide identification of poly(ADP-ribosyl)ation targets in different genotoxic stress responses. *Mol. Cell*. **52**, 272–285.
https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.026

93. Aleksandrov R., Dotchev A., Poser I., Krastev D., Georgiev G., Panova G., Babukov Y., Danovski G., Dyankova T., Hubatsch L., Ivanova A., Atemin A., Nedelcheva-Veleva M.N., Hasse S., Sarov M., Buchholz F., Hyman A.A., Grill S.W., Stoynov S.S. (2018) Protein dynamics in complex DNA lesions. *Mol. Cell*. **69**, 1046–1061.e5.
https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.016

94. Gibson B.A., Kraus W.L. (2012) New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **13**, 411–424.
https://doi.org/10.1038/nrm3376

INTERACTOME OF BASE AND NUCLEOTIDE EXCISION DNA REPAIR SYSTEMS

N. I. Rechkunova[1], *, Yu. S. Krasikova[1], and O. I. Lavrik[1, 2]

[1]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

[2]Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

**e-mail: nadyarec@niboch.nsc.ru*

Base and nucleotide excision DNA repair (BER and NER) systems are aimed at removing specific types of damaged DNA, namely, oxidized, alkylated or deaminated bases in case of BER and bulky damages caused by UV radiation or chemical carcinogens in case of NER. However, in some cases the repair process follows a more complex scenario, in which the repair pathways exchange proteins and interact with each other, forming a common interactome. This review describes the mechanisms of BER and NER and discusses the current state of knowledge concerning involvement of NER proteins in the repair of DNA damage caused by oxidative stress and BER proteins in the removal of bulky DNA adducts. We also discuss a role of poly (ADP-ribose)polymerase 1 in the regulation of BER and NER processes and their coordination in the repair of complex (cluster) lesions.

Keywords: DNA repair, protein-protein interactions, regulation of DNA repair processes

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 2, с. 194–209

ОБЗОРЫ

УДК 577.151.42/45

НАЧАЛЬНЫЕ СТАДИИ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ ДНК В НУКЛЕОСОМАХ

© 2021 г. О. А. Кладова[a], Н. А. Кузнецов[a], О. С. Федорова[a, *]

[a] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия*

**e-mail: fedorova@niboch.nsc.ru*

Поступила в редакцию 29.07.2020 г.
После доработки 21.08.2020 г.
Принята к публикации 26.08.2020 г.

Эксцизионная репарация оснований – основной путь, ответственный за коррекцию большого числа химически модифицированных оснований ДНК в клетках млекопитающих. Упаковка ДНК в хроматине влияет на доступность поврежденных участков для ферментов, вовлеченных в процессы репарации. В обзоре представлены данные о ферментах, участвующих в эксцизионной репарации оснований, свидетельствующие о том, что в коровой частице нуклеосомы доступность поврежденной ДНК затрудняет октамер гистонов. При этом исправление повреждений в ДНК в значительной степени зависит от их ротационного и трансляционного позиционирования в коровой частице нуклеосомы, а также от особенностей действия ферментов.

Ключевые слова: репарация ДНК, нуклеосома, ДНК-гликозилаза, АР-эндонуклеаза

DOI: 10.31857/S0026898421020087

СТРОЕНИЕ НУКЛЕОСОМ

В клетках эукариот ДНК находится в плотно упакованном состоянии в комплексе с белками-гистонами в составе хроматина. Структурная единица хроматина – нуклеосома, содержит кор, образованный двумя копиями четырех гистоновых белков (H2A, H2B, H3 и H4), т.е. восемью молекулами белка. Каждый гистоновый белок, состоящий из ~100–150 аминокислотных остатков (10–15 кДа), содержит структурированный домен и неструктурированный N-концевой “хвост” (иногда С-концевой хвост). Структурированные домены гистоновых белков попарно взаимодействуют друг с другом, образуя октамер, обладающий осью псевдосимметрии 2-го порядка (диадная ось), на который ~1.67 раза наматывается цепь ДНК длиной 145–147 п.н. с образованием коровой частицы нуклеосомы (nucleosome core particle, NCP) [1, 2] (рис. 1).

В 1977 году Finch и соавт. [3] показали, что NCP представляет собой диск диаметром 110 Å и высотой 57 Å. В кристаллической структуре NCP, определенной в 1984 году с разрешением 7 Å [4], ДНК в нуклеосоме намотана на гистоновый октамер, образуя плоскую левозакрученную суперспираль. В 1997 году Luger и соавт. [1] установили кристаллическую структуру гистонового кора с разрешением 2.8 Å. Детали структуры NCP выявили при более высоком разрешении (1.9 Å) [5, 6]. В дальнейшем определили структуры нуклеосом у таких видов, как *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Drosophila melanogaster* и *Saccharomyces cerevisiae* [7–12]. В большинстве случаев структуры нуклеосом, полученные с помощью рентгеновской кристаллографии, созданы с использованием ДНК Widom 601 [2, 13]. Эта ДНК, полученная путем отбора из комбинаторной библиотеки фрагментов ДНК, предназначена для фиксации положения ДНК в нуклеосоме, поскольку имеет наибольшее сродство к гистоновому октамеру [14]. В составе нуклеосомы ДНК Widom 601 обладает наименьшей подвижностью из всех других случайных последовательностей ДНК и поэтому менее доступна для ферментов рестрикции [15]. Другая позиционирующая нуклеосомы последовательность ДНК, часто используемая в экспериментальных работах, это фрагмент гена, кодирующего 5S рРНК морского ежа *Lytechinus variegatus* [16], консервативного у многих организмов [17].

В NCP в отличие от нуклеосом отсутствует линкерный участок длиной 10–90 п.н., который может быть связан с гистоном H1. Расположение ДНК в NCP определяется в основном 14 электростатическими контактами. Основными среди них являются контакты с боковыми заместителями остатков аргинина на поверхности гистонов, которые вставляются в малую бороздку ДНК [18, 19]. При этом N-хвосты гистонов также участвуют

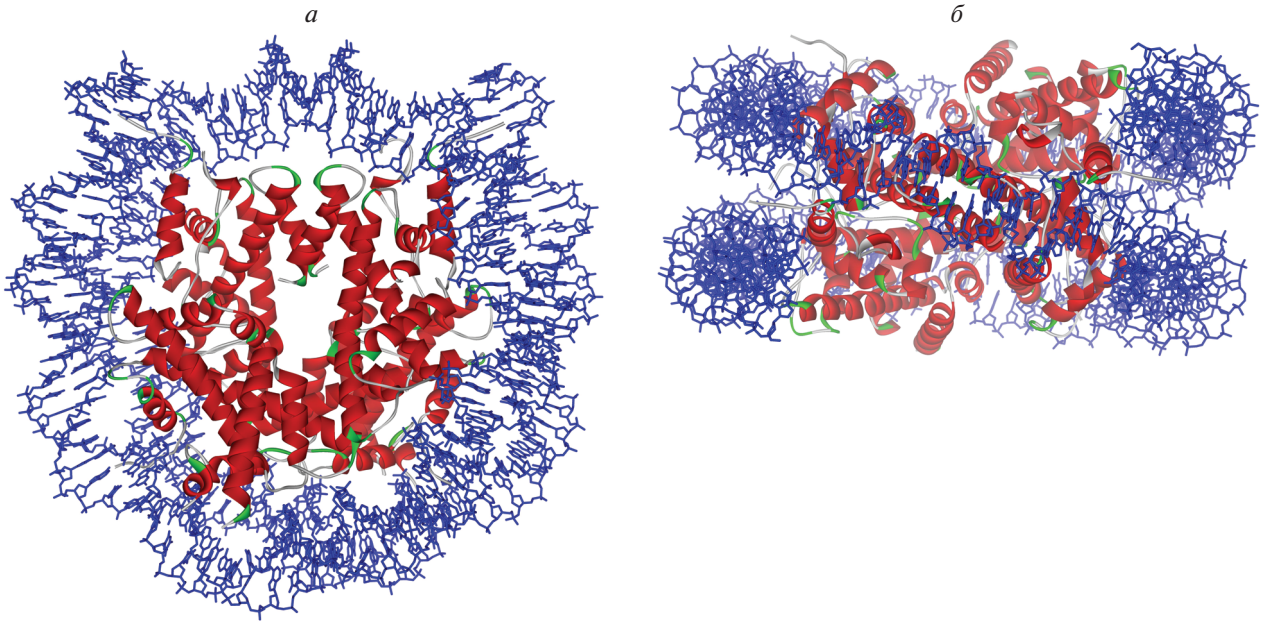


Рис. 1. Строение коровой частицы нуклеосомы. Вид сверху (*а*) и сбоку (*б*). ДНК выделена синим цветом, гистоновый октамер красным (PDB ID: 3LEL).

во внутри- и межнуклеосомных взаимодействиях с ДНК [6, 18]. Кроме того, они играют важную регуляторную роль, поскольку содержат различные модификации, служащие сигналами к началу процессов транскрипции и репарации [19].

С внешней стороны нуклеосомы расположен линкерный гистон H1, который фиксирует в нуклеосоме цепь ДНК. Нуклеосомы являются мобильными структурами, позволяющими белкам извне взаимодействовать с внутренними участками ДНК *in vitro*. Так, РНК-полимераза способна транскрибировать нуклеосомную ДНК без ее диссоциации из комплекса с гистоновым октамером [20–22]. *In vivo* транскрипция ДНК протекает при участии ремоделирующих факторов, направляемых с помощью регуляторных белков и действующих непосредственно на гистоновый октамер, увеличивая мобильность нуклеосом. По-видимому, такие процессы протекают благодаря способности нуклеосом “скользить” по ДНК без ее диссоциации [19].

СТРУКТУРНОЕ ПОЛОЖЕНИЕ ПОВРЕЖДЕННЫХ НУКЛЕОТИДОВ В СОСТАВЕ НУКЛЕОСОМЫ

Клеточная ДНК постоянно повреждается в результате негативного воздействия различных внешних и внутренних факторов, включая активные клеточные метаболиты, УФ- и ионизирующее излучение, загрязняющие агенты окружающей среды, лекарственные средства. Среди повреждений ДНК наиболее распространены модификации гетероциклических оснований, обусловленные их окислением, алкилированием и дезаминированием, а также одноцепочечные разрывы и апуриновые/апиримидиновые (AP) сайты, возникающие как спонтанно, так и под действием ДНК-гликозилаз. Эти повреждения исправляются с помощью системы эксцизионной репарации оснований (BER, base excision repair), которая протекает по короткозаплаточному (short-patch, SP) или длиннозаплаточному пути (long-patch, LP) [23]. Процесс BER включает несколько последовательных ферментативных реакций. На первой стадии специфические ДНК-гликозилазы находят и удаляют модифицированные основания. Поиск ДНК-гликозилазами таких оснований происходит путем как 3D-диффузии, так и “ускоренной” 1D-диффузии фермента по цепи ДНК [24]. Узнавание модифицированного основания инициирует протекание N-гликозилазной реакции, в ходе которой происходит гидролиз N–C1'-гликозидной связи между основанием и остатком рибозы и образование AP-сайта. Далее, в случае монофункциональных ДНК-гликозилаз, AP-эндонуклеаза (APE1 у человека) катализирует гидролиз 5'-фосфодиэфирной связи с образованием на концах разрыва рибозофосфатного остова 3'-гидроксила и 5'-дезоксирибозофосфата (5'-dRP). Бифункциональные ДНК-гликозилазы обладают собственной AP-лиазной активностью, поэтому после гликозилазной реакции они катализируют реакцию, приводящую к разрыву рибозофосфатного остова с 3'-стороны от AP-сайта с образованием 5'-фосфата и 3'-производного рибозы.

В SP-пути BER остаток 5'-dRP может быть удален с помощью полимеразы β (Polβ), а 3'-производное

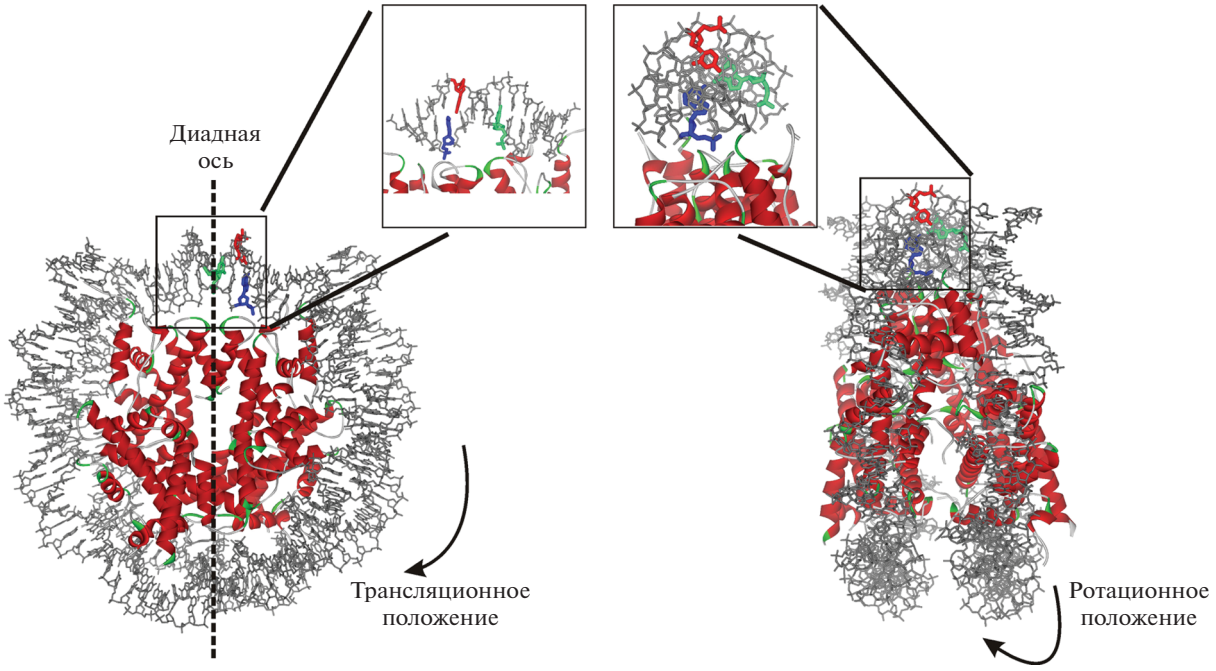


Рис. 2. Ротационное положение гетероциклических оснований ДНК по отношению к гистоновому октамеру. Красным выделено положение Out – наружу, зеленым – Mid – промежуточное, синим – In – внутрь.

рибозы, оставшееся после АР-лиазной реакции, расщепляется с помощью 3'-экзонуклеазной активности АР-эндонуклеазы с образованием 3'-ОН на конце. Затем Polβ заполняет образовавшуюся однонуклеотидную брешь (gap), а ДНК-лигаза I (LigI) или комплекс ДНК-лигазы III (LigIII) с XCCR1 (X-ray cross complementation group protein 1) сшивают разорванную цепь.

В LP-пути BER принимают участие такие дополнительные факторы, как FEN1, PCNA и RSC. После образования АР-сайта АР-эндонуклеаза, Polδ или Polε достраивают цепь ДНК с 3'-ОН-стороны, замещая цепь, содержащую 5'-dRP, несколькими нуклеотидами. Образующийся флэп (flap = откидная заслонка) удаляется с помощью FEN1, а получившийся разрыв цепи сшивается с помощью LigI. Активность Polδ и Polε в этом пути репарации может быть усилена дополнительными факторами PCNA и RFC [25, 26].

Повреждение ДНК в составе хроматина должно приводить к возникновению модифицированных оснований в различных участках ДНК. Положение азотистых оснований по отношению к гистоновому октамеру в NCP различают по их ориентации в спирали ДНК – в сторону раствора или в сторону гистона (ротационное положение: Out, Mid и In), а также по положению относительно диадной оси (трансляционное) (рис. 2).

В нуклеосомах фрагмент ДНК по-разному связывается с разными участками гистонового октамера. Например, тетрамер H3-H4, фланкированный двумя димерами H2A и H2B, связывается с 60 п.н. фрагмента ДНК более прочно, чем два димера H2A и H2B с концами ДНК [1, 5]. Поэтому ДНК на концах фрагмента обладает большей подвижностью, за счет чего она способна перемещаться относительно поперечной оси симметрии и спонтанно разматываться из гистонового октамера [27, 28]. При этом доступность ранее закрытых районов ДНК возрастает на порядок, что также зависит от посттрансляционной модификации гистонов [29, 30]. Это имеет большое значение для протекания процессов репарации ДНК по пути BER.

УДАЛЕНИЕ УРАЦИЛА

К появлению остатков урацила в составе молекулы ДНК может приводить как внедрение dUMP в процессе репликации, так и спонтанное дезаминирование цитозина [31–33]. Несмотря на достаточно малое количество остатков урацила в геномной ДНК [34], образующиеся пары U:G являются мутагенными, поскольку в ходе репликации приводят к трансверсии C:G в T:A [33].

В клетках человека удаление урацила из ДНК осуществляют несколько монофункциональных ДНК-гликозилаз: UNG, TDG, SMUG1 и MBD4 (рис. 3). Монофункциональные ДНК-гликозилазы способны гидролизовать N-гликозидную связь, используя активированную молекулу воды для нуклеофильной атаки с образованием АР-сайта в качестве конечного продукта, который в дальнейшем узнается АР-эндонуклеазами.

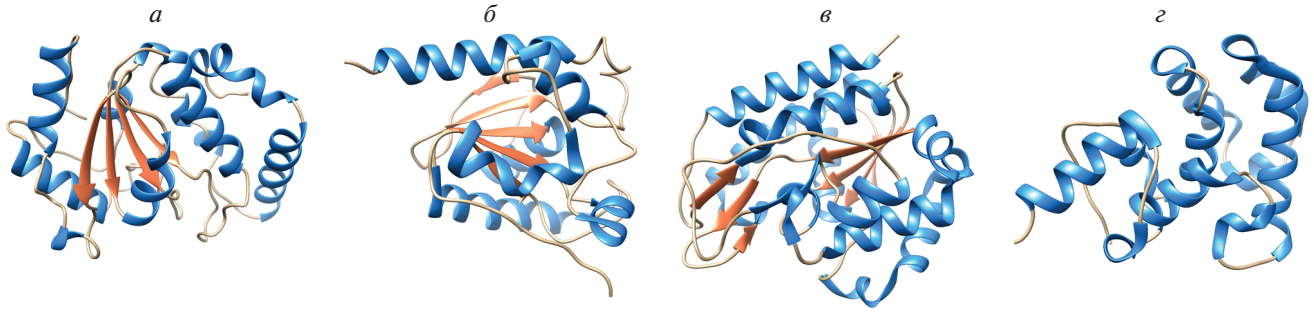


Рис. 3. Структуры ферментов: hUNG (PDB ID: 1AKZ) (*а*), hTDG (PDB ID: 3UFJ) (*б*), xSMUG1 (PDB ID: 1OE4) (*в*), hMBD4 (каталитический домен, PDB ID: 4E9G) (*г*).

Основная урацил-ДНК-гликозилаза человека – фермент UNG, представлена двумя формами: митохондриальной (UNG1) и ядерной (UNG2). В отличие от UNG, способной удалять урацил, расположенный напротив любого азотистого основания, фермент TDG работает только с остатками урацила и тимина, расположенными напротив гуанина [35]. Показано, что TDG человека способен удалять тимин из пар T:G, T:C и T:T [36], а также бромурацил из пары с гуанином [37]. Фермент SMUG1 (single-strand specific monofunctional uracil-DNA-glycosylase) обнаружен только в клетках эукариот. Первоначально SMUG1 описали как фермент, специфичный к урацилу, расположенному в оцДНК. Позднее показали, что в качестве субстрата SMUG1 предпочитает дцДНК, если в системе присутствует АР-эндонуклеаза, способная стимулировать число оборотов фермента [33, 38]. SMUG1 также удаляет 5-гидроксиметилурацил, 5-формилурацил и 5-гидроксиурацил (5-OHU) из ДНК [39]. Фермент MBD4 впервые охарактеризовали как белок, связывающийся с метилированными CpG в ДНК [40], а затем показали, что MBD4 способен удалять урацил из ДНК [41].

Изучено действие урацил-ДНК-гликозилаз человека UNG2 и SMUG1, а также других ферментов, принимающих участие в процессе BER (APE1, Polβ и LigIII), на удаление остатка урацила из ДНК в составе реконструированных нуклеосом *in vitro* [42]. Гистоновые октамеры выделяли из эритроцитов курицы, а в качестве ДНК-субстрата использовали участок гена 5S рРНК *L. variegatus* длиной 146 п.н. Урацил-ДНК-гликозилазы UNG2 и SMUG1 удаляли остатки урацила из такой ДНК, однако их активность была в 3–9 раз ниже, чем на свободной ДНК, и практически не зависела от ротационного положения остатка урацила относительно гистонового октамера (т.е. In или Out). Кроме того, оказалось, что и другие участники BER (APE1, Polβ и LigIII) активны по отношению к ДНК-субстрату, входящему в состав нуклеосом. Присутствие белка XRCC1 не приводило к возрастанию активности Polβ и LigIII.

Используя модельные нуклеосомы, полученные из эритроцитов курицы и содержащие в составе ДНК участок GRE (glucocorticoid hormone receptor response element), Smerdon и соавт. [43] изучили влияние ротационного положения остатка уридина в нуклеосомной ДНК на активность ферментов, участвующих в BER, а именно, урацил-ДНК-гликозилазы UNG, АР-эндонуклеазы APE1 и ДНК-полимеразы Polβ. Установлено, что активность и UNG, и APE1 в отношении нуклеосомного субстрата, содержащего пару G:U, составляет лишь ~10% от активности в отношении свободной ДНК, что согласуется с данными [42]. Однако в отличие от [42] два ротационно различающихся положения остатка уридина (т.е. “внутрь” и “наружу” по отношению к гистоновому октамеру) удаляются с разными скоростями, которые отличаются в 2–3 раза и возрастают с увеличением концентрации фермента. Скорость удаления урацила ферментом UNG возрастала в присутствии APE1. В отличие от UNG и APE1 фермент Polβ был полностью неактивен в отношении ДНК, связанной с нуклеосомой. Поэтому сделан вывод [43], что первые стадии BER с участием UNG и APE1 могут протекать на ДНК, входящей в состав хроматина, тогда как чтобы сделать участки ДНК, требующие репарации, доступными для Polβ, на следующих стадиях BER необходимы хроматин-ремоделирующие факторы.

В ходе дальнейших исследований установлено [44], что удаление N-концевых хвостов гистоновых белков в составе нуклеосом не влияет значительно на эффективность удаления остатков уридина из ДНК с помощью UNG и APE1. Однако в этом случае эффект ингибирования активности Polβ нуклеосомами не исчезает, хотя N-концевые хвосты гистоновых белков могут взаимодействовать с ДНК в области мисматча G:U. Более того, присутствие белков XRCC1 или WRN (Werner syndrome protein) также не оказывало влияния на процесс BER. Поэтому был сделан вывод, что какие-то другие факторы должны иметь значение для репарации ДНК в составе хроматина.

Различие результатов, полученных в работах [42, 43], касается активности Polβ. Если в [42] обнаружено лишь уменьшение активности Polβ, то в [43] наблюдали полное ингибирование Polβ нуклеосомными частицами независимо от ротационной ориентации урацила относительно гистонового октамера. Это различие могло быть связано со структурой использованных субстратов. Кроме разницы в общей последовательности нуклеотидов, имелись различия и в структуре специфической пары: в [42] это уотсон-криковская пара U:A, аналогичная паре T:A, у которой отсутствует лишь 5-CH_3-группа. Поэтому пара U:A не должна влиять на структуру и стабильность ДНК. Использовали также ДНК-субстрат, содержащий неканоническую пару G:U, в которой остаток урацила сдвинут в сторону большой бороздки, что нарушает стэкинг-взаимодействие и, вероятно, влияет на доступность остатка урацила в процессах его репарации [43].

В этих исследованиях показано, что первые стадии BER могут протекать в нуклеосомах, однако для завершения процесса необходима какая-либо дестабилизация структуры, ремоделирование или частичное разрушение нуклеосом. При этом непонятно, каким образом ДНК-гликозилазы получают доступ к стерически закрытым повреждениям. Ранее предполагалось (см., например [28]), что частичное разматывание ДНК с гистонового октамера помогает факторам транскрипции и другим факторам связываться со своими сайтами на ДНК.

Активность фермента MBD4 в нуклеосомных частицах изучали с использованием фрагмента гена 5S рРНК *L. variegatus*, содержащего мисматч T:G [45]. Гистоновые белки выделяли из эритроцитов курицы. Активность MBD4 при взаимодействии со свободной ДНК была выше, чем с ДНК в составе NCP. Когда же мисматч T:G помещали в два разных положения относительно диадной оси на противоположных концах ДНК, то не обнаруживали различий в изменении активности MBD4. Показано также, что активность MBD4 возрастает при взаимодействии с нуклеосомными частицами, содержащими ацетилированные гистоновые белки.

Подробно изучено влияние расположения модифицированного основания в нуклеосоме на скорость его удаления ДНК-гликозилазой Udg *E. coli* [46]. Субстратами фермента служили фрагменты ДНК длиной 154 п.н., содержащие нуклеосом-позиционирующий элемент гена 5S РНК *Xenopus borealis*. Остатки уридина располагались в одном из положений фрагмента ДНК (–78...+76), считая от диадной оси, в составе пары U:A, причем их ориентация была “внутрь, In” или “наружу, Out” относительно поверхности гистонов. Гистоновые белки H3/H4 и H2A/H2B были выделены из эритроцитов курицы. Обнаружено, что скорость удаления остатков уридина из ДНК в составе нуклеосом составляла $(1.1–3.6) \times 10^{-4}$ $с^{-1}$ в случае ориентации “внутрь” и 0.16–0.33 $с^{-1}$ при ориентации “наружу”. Эти величины возрастали по мере удаления остатка U от диадной оси в сторону концов ДНК в пределах каждого диапазона. Если же в более длинном фрагменте ДНК (227 п.н.) U находится за пределами нуклеосомы в составе линкерной области, то он удалялся с такой же скоростью, как и при взаимодействии со свободной ДНК. При этом в присутствии линкерного гистона H1 скорость ферментативного процесса уменьшается. Несмотря на то, что при ферментативном удалении остатков U из ДНК, находящейся в составе нуклеосом, скорость процесса могла быть снижена в 3000–10000 раз, репарация таких повреждений в клетке возможна при более высоких концентрациях Udg. Большое отличие от данных [43] может быть обусловлено тем, что используемая ранее ДНК не имела прочно связывающегося с гистоновым октамером участка, который позволял строго фиксировать ее. Поэтому для основания, ориентированного “внутрь”, возможна и другая ориентация вследствие перемещения цепи ДНК относительно гистонового октамера.

Чтобы надежнее оценить влияние ротационной динамики ДНК на поверхности нуклеосом на стадию узнавания повреждения в процессе BER, Smerdon и соавт. [47] изучали взаимодействие фермента UNG человека с ДНК (в присутствии и в отсутствие APE1), содержащей остатки U, строго позиционированные в трех ориентациях относительно диадной оси нуклеосомной частицы: U-In (в сторону гистонового ядра), U-Out (в сторону растворителя) и U-Mid (промежуточная). Гистоновые белки выделяли из эритроцитов курицы. Чтобы обеспечить строгое позиционирование, ДНК длиной 150 п.н. содержала каноническую последовательность GRE, фланкированную хорошо охарактеризованными TG-мотивами, позиционирующими нуклеосомы [48]. Ориентация остатков U подтверждена с помощью футпринтинга гидроксильными радикалами. Установлено, что при положении субстрата U-Out скорость каталитической реакции была почти такой же, как на свободной ДНК, и существенно более низкой при положениях U-In и U-Mid. ДНК, с целью выяснения роли ее ротационной динамики в составе нуклеосом, сшивали с гистонами с помощью формальдегида, что также предотвращало ее перемещение относительно гистонового октамера. Сшивание U-In ДНК с гистонами приводило к еще более сильному снижению скорости реакции, тогда как в положения U-Out скорость даже возрастала. Кроме того, фермент APE1, следующий за UNG в процессе BER, стимулировал активность UNG в отношении уридина в составе как свободной ДНК, так и в положении Out в нуклеосомной ДНК. При этом стимуляция активности UNG ферментом APE1 была примерно в 2 раза ниже, чем при взаимодействии с ДНК в

составе нуклеосомной частицы. Не обнаружено стимуляции активности UNG ферментом APE1 при взаимодействии с уридином в положениях Mid и In. Эти данные свидетельствуют о том, что UNG взаимодействует с U на поверхности нуклеосом. Сделан вывод, что, по меньшей мере, вблизи диадной оси, доступ UNG к урацилу обеспечивается за счет ротационной динамики ДНК на поверхности гистонов, а не за счет кратковременного разматывания. При этом благодаря ротационной динамике ДНК происходит образование промежуточного состояния, ориентация U в котором делает его доступным для связывания с ферментом.

Изучение влияния трансляционной и ротационной динамики ДНК в нуклеосомах на скорость протекания отдельных стадий процесса BER продолжили Rodriguez и Smerdon [49]. Ранее эти авторы показали, что UNG взаимодействует с U на поверхности нуклеосом. Сделан вывод о том, что доступность урацила для UNG (по меньшей мере вблизи диадной оси) обеспечивается за счет ротационной динамики ДНК на поверхности гистонов, а не за счет кратковременного разматывания ДНК. При этом благодаря ротационной динамике ДНК образуется промежуточное состояние, в котором ориентация U делает его доступным для связывания с ферментом. На примере позиционирующей нуклеосому ДНК Widom 601, содержащей в разных положениях остаток U или AP-сайт, показано, что скорость удаления ориентированного “наружу” урацила ДНК-гликозилазой UNG в 210 раз больше, чем при ориентации “внутрь”. При ориентации “внутрь” ферментам более доступны основания, находящиеся как можно дальше от диадной оси. Ключевым фактором является трансляционное положение ориентированных наружу брешей цепи ДНК. Ориентированная наружу брешь, расположенная вблизи концов ДНК, заполняется в 3 раза быстрее, чем брешь вблизи диадной оси, имеющая то же ротационное положение. Удаление ориентированного “наружу” остатка уридина вблизи диадной оси в присутствии ферментов UNG и APE1 происходит очень эффективно, однако активность Polβ значительно подавлена. Таким образом, динамика NCP очень важна для процессов репарации в присутствии UNG/APE1.

Чтобы лучше понять, как влияют структурные свойства фермента и субстрата на каталитическую активность, изучено поведение трех урацил-ДНК-гликозилаз одного структурного суперсемейства – Udg *E. coli*, SMUG1 и TDG, в отношении нуклеосом, содержащих поврежденный сайт U:G [50]. Вместо UNG человека использовали его бактериальный гомолог Udg, сходный как по аминокислотной последовательности, так и по общему строению белковой глобулы [51, 52]. Субстратом служила ДНК Widom 601 длиной 145 п.н., содержащая пару U:G в позиции 75, т.е. вблизи диадной оси, в ориентации Out. Согласно [13, 53], ДНК Widom 601 связывается с гистоновым октамером в единственной ориентации. Нуклеосомные частицы получали с использованием рекомбинантных гистоновых белков *X. laevis*. Чтобы предотвратить ингибирование реакции продуктом, наблюдаемое в случае SMUG1 и TDG, эксперименты проводили в условиях “одного оборота фермента”, т.е. при избытке фермента. В этих условиях наблюдаемая константа скорости (k_{obs}), соответствующая самой медленной кинетической стадии, отражает химическую реакцию разрыва гликозидной связи. Обнаружено, что Udg проявляет высокую активность в процессе удаления урацила из пары U:G, SMUG1 почти неактивен на NCP, тогда как TDG имеет промежуточную активность, однако она пропадает в случае пары T:G.

Кинетика накопления продукта в случае Udg была однофазной, и наблюдаемая константа скорости была только в 4 раза ниже регистрируемой для ДНК-дуплекса, не связанного с гистоновым октамером. У TDG и SMUG1 кинетика была двухфазной, что, возможно, указывало на присутствие в субстрате двух типов сайтов, различающихся доступностью для фермента. Причиной разной активности этих трех гликозилаз могут быть разные факторы. Хотя Udg, SMUG1 и TDG содержат в структуре интеркалирующую петлю, SMUG1 уникален тем, что он имеет дополнительную спираль, которая действует как “клин”, который способствует деформации ДНК-цепи и выворачиванию из нее остатка U. В отличие от Udg и TDG, которые нарушают структуру ДНК только в районе урацил-содержащего нуклеотида, SMUG1 нарушает также пару оснований с 5'-стороны от U, внося тем самым большее возмущение в структуру спирали ДНК. Это может быть причиной снижения торсионной подвижности ДНК по сравнению с реакцией в растворе и служить барьером для дестабилизации двойной спирали ДНК, необходимой для протекания гликозилазной реакции.

Позднее S. Delaney и E.D. Olmon [54] проверили способность Udg удалять остатки урацила и 5-гидроксиурацила (5-OHU), расположенные в разных ротационных положениях в составе нуклеосомных частиц. Оказалось, что при наиболее доступном для растворителя положении остатка U-Out, фермент Udg удаляет это повреждение всего на порядок медленнее, чем из несвязанного с NCP ДНК-дуплекса, практически со 100% эффективностью. Если остаток урацила находился в стерически затрудненных положениях Mid и In, то наблюдалась двухфазная кинетика накопления продукта, а общая эффективность удаления урацила составляла 19 и 15% соответственно. Появление двух фаз при накоплении продукта реакции связывают с возможным нахождением в системе небольшого остаточного количества ДНК, не

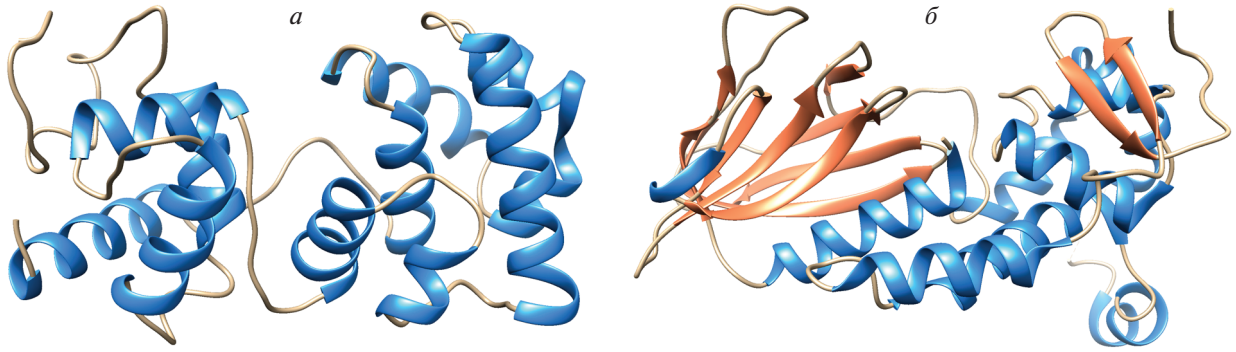


Рис. 4. Структуры ферментов EndoIII (Nth) из *E. coli* (*а*), PBD ID: 2ABK, NEIL1, PDB ID: 5ITQ (*б*).

связанной с гистоновым октамером [54]. При взаимодействии Udg с 5-OHU эффективность удаления поврежденного основания не зависела от его ротационного положения в нуклеосомной частице и составляла около 10%.

УДАЛЕНИЕ ТИМИНГЛИКОЛЯ

В клетках человека удаление поврежденных пиримидиновых оснований из ДНК катализирует несколько ферментов. NTHL1 и NEIL1 узнают и удаляют такие повреждения, как 5,6-дигидроурацил, 5-гидроксиурацил, тимингликоль (Tg) и другие [55–60] (рис. 4).

С использованием гистонов, выделенных из эритроцитов курицы, и позиционирующей нуклеосому последовательности, содержащей фрагмент 5S рДНК из *L. variegatus*, показано, что фермент NTHL1 может взаимодействовать с остатками Tg, которые располагаются снаружи гистонового октамера [61]. Процесс взаимодействия проходит без значительного разрушения нуклеосом, но если остатки Tg располагаются со стороны гистонов, то их процессинг протекает значительно хуже и усиливается при возрастании концентрации фермента до физиологического значения, равного в ядрах ~2.3 мкМ [62]. При этом эффективность удаления поврежденных оснований была ниже, если они располагались ближе к центру (т.е. к диадной оси), чем к концевому участку ДНК на нуклеосоме. Поэтому сделано заключение, что репарация таких повреждений ферментом NTH1 включает спонтанное, обратимое, частичное разматывание ДНК с гистонового октамера (рис. 5).

Аналогичное исследование выполнено для ДНК-гликозилазы человека NEIL1 [63]. В отличие от NTHL1 фермент NEIL1 (human Endonuclease III like) принадлежит к другому структурному суперсемейству – Fpg/Nei. Хотя NEIL1, как и NTHL1, способен удалять из ДНК остатки Tg, между ними имеются различия. Во-первых, только NEIL1 удаляет основания из одноцепочечной или содержащей расплетенный участок (“пузырь”, bubble) ДНК [64]. Это делает NEIL1 ферментом, наиболее подходящим для удаления повреждений, блокирующих ДНК-полимеразы, таких как Tg, в вилке репликации. Во-вторых, после действия NTHL1 остаток рибозы удаляется с 3'-концевого нуклеотида с помощью APE1, тогда как в случае NEIL1 он удаляется с помощью полинуклеотидкиназы (PNK). NEIL1 взаимодействует с факторами PCNA и FEN1, участвующими как в репликации ДНК, так и в LP-пути BER [65, 66]. Следовательно, эти две ДНК-гликозилазы катализируют различные каналы BER. В-третьих, количество NTHL1 не изменяется в течение клеточного цикла, тогда как содержание NEIL1 увеличивается в S-фазе [55]. Поэтому высказана гипотеза о том, что NEIL1 участвует в удалении повреждений в репликационной вилке, тогда как действие NTHL1 является более глобальным и не зависит от репликации [63].

Эти ДНК-гликозилазы, несмотря на различия в функциях, обладают одинаковой каталитической активностью по отношению к Tg, а их концентрация в ядрах клеток тоже примерно одинакова и составляет 25–80 нМ [63]. Однако эти ферменты по-разному связываются с неспецифической ДНК – NEIL1 намного более прочно, чем NTHL1. Поэтому сделан вывод, что у NEIL1 гораздо меньше возможности, чем у NTHL1, обнаружить поврежденное основание в хроматине без помощи других белков-партнеров, которые будут либо способствовать связыванию NEIL1 с повреждением, либо снизят эффективность неспецифического связывания с ДНК [63]. В противоположность этому NTHL1, вероятно, способен узнавать повреждения в хроматине без помощи дополнительных факторов.

Изучено также влияние нуклеосомных частиц на протекание каждой из четырех стадий “короткозаплаточного” пути BER [67]. Используя в качестве ДНК-субстратов последовательности ДНК Widom 601, позиционирующие нуклеосомы [14], и 5S рДНК *L. variegatus*, содержащие специфический сайт Tg, показано, что участники первых трех стадий процесса BER (ДНК-гликозилаза NTHL1, АР-эндонуклеаза APE1 и Polβ)

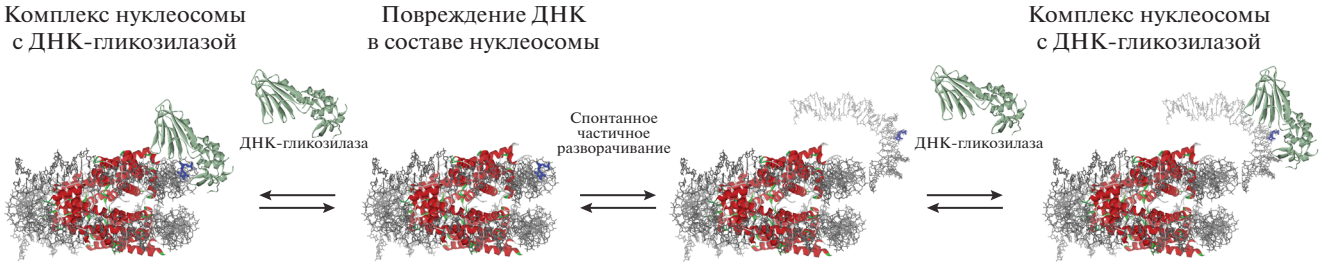


Рис. 5. Схематичное изображение путей удаления поврежденного основания в составе NCP при прямом взаимодействии с ДНК-гликозилазой или частичном разворачивании ДНК для эффективного удаления повреждения. ДНК показана серым, гистоновый октамер красным, поврежденный нуклеотид синим, ДНК-гликозилаза зеленым.

способны процессировать свои субстраты, входящие в состав нуклеосом. В целом, полагают [67], что первые две стадии "короткозаплаточного" пути BER протекают в интактных нуклеосомах, когда специфический сайт Tg кратковременно экспонирован в раствор в результате разматывания ДНК с гистонового октамера. Polβ, катализирующая третью стадию BER, также активна по отношению к сайту, ориентированному наружу нуклеосомы. Этот фермент в каталитически активном комплексе изгибает ДНК на 90°. Вследствие этого для протекания ферментативной реакции ДНК вблизи бреши должна отсоединяться от гистонового октамера. Все три участника BER последовательно замещают друг друга в ходе процесса. В отличие от них LigIIIα и XRCC1, которые участвуют на четвертой стадии и заканчивают процесс BER, проявляют активность при достаточно высоких концентрациях, приводящих к разрушению нуклеосом. Следует отметить, что в результате разрушения нуклеосом происходит также ускорение реакции с участием Polβ.

Проведено количественное измерение скоростей разматывания ДНК в нуклеосомах и репарации повреждений, а также их сравнение [68]. В случае взаимодействия фермента NTHL1 с нуклеосомными частицами, содержащими ДНК Widom 601 или 5S рДНК, в которые вводили остаток Tg в стерически недоступное для фермента положение, значения наблюдаемой константы скорости реакции k_{obs} составили 0.0014 ± 0.0004 и 0.003 ± ± 0.0009 $с^{-1}$ соответственно, что в ~100 раз меньше каталитической константы скорости $k_{cat} = 0.19$ $с^{-1}$ и в 10 раз меньше наблюдаемой константы скорости для свободной ДНК Widom 601, равной 0.03 ± ± 0.005 $с^{-1}$. Поскольку скорость каталитической стадии гидролиза N-гликозидной связи больше наблюдаемой константы скорости ($k_{cat} > k_{obs}$), сделан вывод, что k_{obs} характеризует стадию спонтанного разматывания ДНК, при которой поврежденное основание экспонировано наружу и стерически доступно для взаимодействия с ферментом. Однако скорость спонтанного разматывания ДНК была недостаточной для того, чтобы получить наблюдаемую скорость репарации *in vivo*. Поэтому эффективное протекание процесса BER в клетках требует участия факторов, ремоделирующих хроматин и специфичных для BER или принимающих участие в транскрипции, репликации, или других процессах репарации.

Поскольку в процессах BER происходит согласованная "передача" каждого ДНК-интермедиата от одного фермента к другому, то в случае взаимодействия ДНК-гликозилазы NTHL1 с АР-эндонуклеазой APE1 такой процесс изучали на нуклеосомных частицах [69]. В отличие от свободного ДНК-субстрата, интермедиат которого, образующийся в гликозилазной реакции, быстро утилизируется в реакции с APE1, в реакции на NCP такой интермедиат накапливается до значительно более высокого уровня и продолжает какое-то время существовать. Это связано с более высокой активностью APE1 по сравнению с NTHL1 при взаимодействии со свободной ДНК, тогда как в случае ДНК, связанной с нуклеосомой, активность APE1 снижается настолько, что становится заметной АР-лиазная активность NTHL1. При этом APE1 взаимодействует с продуктом АР-лиазной реакции в качестве 3'-диэстеразы. Проверена способность двух бактериальных ферментов (EndoIII и Fpg) удалять 5-гидроксиурацил (5-OHU) из различных положений (In, Mid, Out) в составе нуклеосомных частиц [54]. EndoIII является функциональным и структурным гомологом NTHL1, в то время как Fpg – это структурный гомолог NEIL1, но их субстратная специфичность во многом различна. Показано, что при взаимодействии EndoIII и Fpg с нуклеосомами, содержащими 5-OHU, образуется лишь 10% продукта, причем эффективность расщепления не зависит от ротационного положения поврежденного основания. Такой небольшой процент расщепленного субстрата может быть связан с особенностями действия этих ДНК-гликозилаз. Из рентгеноструктурных данных известно, что EndoIII и Fpg значительно изгибают ДНК-субстрат при связывании – примерно на 55° и 66° соответственно [70, 71], что становится стерически за-

трудненным для ДНК в прочном комплексе с гистоновыми белками.

УДАЛЕНИЕ 1,N^6-ЭТЕНОАДЕНИНА

Алкилирующие агенты присутствуют в окружающей среде, возникают внутри клетки и могут вызывать различные повреждения в ДНК [72–75], например такие, как этенопроизводные гетероциклических оснований: 1,N^6-этеноаденин, 3,N^4-этеноцитозин, N^2,3-этеногуанин и 1,N^2-этеногуанин. В клетках эукариот подобные повреждения из ДНК удаляет алкиладенин-ДНК-гликозилаза AAG [76, 77] (рис. 6).

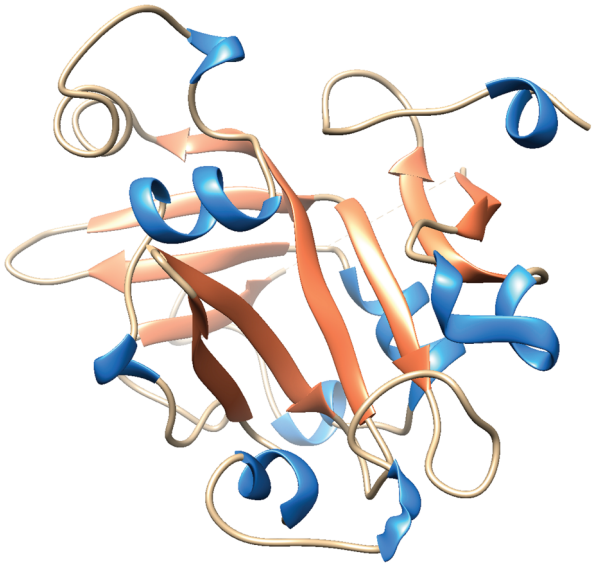


Рис. 6. Строение алкиладенин-ДНК-гликозилазы AAG, PDB ID: 1BNK.

Изучена активность AAG в отношении нуклеосомных частиц, реконструированных из гистоновых белков *X. laevis* и содержащих остаток 1,N^6-этеноаденина (εA) и гипоксантина (Hx) в различных ротационных положениях (In, Mid и Out) [54]. В качестве последовательности, позиционирующей нуклеосомы, использовали ДНК Widom 601 длиной 145 п.н. Как и у некоторых других ДНК-гликозилаз, константы скорости гидролиза N-гликозидной связи были выше на свободной ДНК, не связанной с гистоновым октамером. В случае NCP, содержащих остаток Hx в положении Out, образовывалось 10% продукта реакции, в положении Mid и In – примерно одинаковое количество продукта – 6 и 5% соответственно. При взаимодействии AAG с NCP, содержащей остаток εA в положении Out, образовывалось 84% продукта, в положении Mid – 16%. При этом не удалось зарегистрировать образование продукта реакции, когда остаток εA находился в позиции In. Это позволяет заключить, что чем менее поврежденное основание доступно для растворителя, а значит и для фермента, тем ниже скорость образования продукта реакции.

Хорошо изучена эффективность гликозилазной реакции, катализируемой алкиладенин-ДНК-гликозилазой AAG, в случае ДНК-субстратов в составе NCP, реконструированных из гистонов *X. laevis* и содержащих остаток 1,N^6-этеноаденина (εA) в одном из 49 положений ДНК Widom 601 длиной 145 п.н. [78]. Доступность каждого из оснований ДНК для взаимодействия в водном растворе определяли с помощью футпринтинга гидроксильными радикалами. Определена наблюдаемая константа скорости N-гликозилазной реакции для каждого из положений εA. В целом активность AAG по отношению к отдельным сайтам коррелировала с их доступностью для раствора. Однако некоторые легкодоступные для растворителя положения εA подвергались репарации хуже, чем другие. Возможно, они находились в тех участках ДНК, в которых имелись структурные искажения спирали из-за взаимодействия с гистонами [2, 13]. Кроме того, в некоторых положениях цепи ДНК εA могли экранироваться неструктурированными хвостами гистонов, например H2A и/или H2B. В то же время показано, что в NCP концы ДНК могли спонтанно на короткое время разматываться с гистонового октамера, делая их доступными для взаимодействия [29].

УДАЛЕНИЕ 8-ОКСОГУАНИНА

Пуриновые и пиримидиновые основания в ДНК окисляются активными формами кислорода, которые образуются внутри клетки как в ходе собственного метаболизма, так и под действием различных факторов, например ионизирующей радиации или некоторых химических агентов [79–82]. Из четырех оснований ДНК самый низкий окислительно-восстановительный потенциал имеет гуанин, поэтому он легко окисляется с образованием 8-оксогуанина (8-oxoG). Несмотря на то, что это повреждение практически не блокирует репликативные ДНК-полимеразы, за исключением ДНК-полимеразы-йота [83], его образование может приводить к возникновению мутаций, чаще всего трансверсии G:C в T:A, поскольку при синтезе ДНК репликативные либо репаративные ДНК-полимеразы встраивают напротив 8-oxoG дезоксиаденозинмонофосфат либо дезоксицитидинмонофосфат [84]. В клетках млекопитающих 8-oxoG удаляется с помощью 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы OGG1 (рис. 7).

На более приближенной к хроматину модельной системе изучены динуклеосомы, полученные из рекомбинантных гистоновых белков *X. laevis*, ассоциированные с линкерным гистоном H1 и содержащие строго позиционированную ДНК, сконструированную на основе ДНК Widom 601 [85]. Специфический сайт 8-oxoG помещали ли-

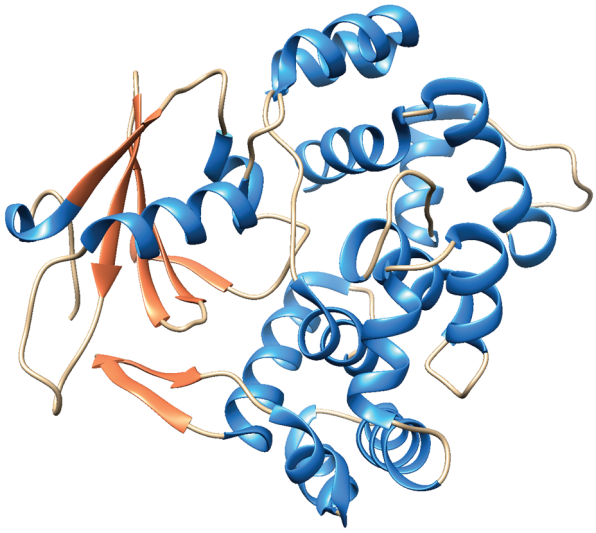


Рис. 7. Строение 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы hOGG1, PDB ID: 1KO9.

бо в NCP, либо в линкерный район ДНК (рис. 8). Показано, что в отсутствие гистона H1 ДНК-гликозилаза человека OGG1 удаляет 8-oxoG из линкерного района ДНК и разрывает ДНК с такой же эффективностью, как и свободную ДНК. В присутствии гистона H1 эффективность инициации репарации 8-oxoG уменьшается в 10 раз независимо от длины линкера. В присутствии шаперона NAP1, индуцирующего связывание H1, эффективность удаления 8-oxoG восстанавливается до прежнего значения, если повреждение находилось в линкере, или остается низкой, если 8-oxoG находится в NCP. Удаление 8-oxoG из NCP возможно только тогда, когда кроме NAP1 присутствует белок RSC, ремоделирующий нуклеосомы. Предложена модель протекания BER при удалении остатков 8-oxoG в хроматине (рис. 8).

Показано, что фермент OGG1 удаляет 8-oxoG из мононуклеосомных частиц с эффективностью примерно 10% вне зависимости от того, в каком ротационном положении находится поврежденное основание (In, Mid или Out) [54]. Предполагается, что репарация 8-oxoG может полностью ингибироваться нуклеосомными частицами, а небольшая степень накопления продукта связана с присутствием остаточной ДНК, не связанной с гистоновым октамером. Такие же данные получены и для бактериального фермента Fpg, функционального гомолога OGG1.

Помимо одиночных повреждений в ДНК могут возникать кластерные окислительные повреждения, например, вызванные ионизирующим излучением. Если эти повреждения находятся в обеих цепях ДНК и репарируются ферментами системы BER (ДНК-гликозилазами и AP-эндонуклеазами), то образуются двойные разрывы цепей (DSB, double strand breaks), что может привести к лабилизации и распаду нуклеосом. На примере ДНК-гликозилаз NTHL1 (и NTHL1Δ55) и OGG1 установлено [86], что нуклеосомы способны частично подавлять образование двухцепочечных разрывов ДНК, однако эффективность подавления зависит от: 1) типа повреждения и ДНК-гликозилазы; 2) нуклеотидного контекста вблизи повреждений и их взаимного расположения в обеих цепях; 3) ориентации повреждений относительно гистонового октамера; 4) расстояния между кластером повреждений и краем нуклеосом. Если два повреждения расположены в обеих цепях напротив друг друга, то одно из них может иметь ориентацию, благоприятную для взаимодействия с ферментами системы BER, а другое – неблагоприятную. Образование двухцепочечных разрывов не обязательно должно приводить к разрушению нуклеосомы. В некоторых случаях разорванные концы ДНК остаются связанными с гистоновым октамером. Таким образом, можно предположить,

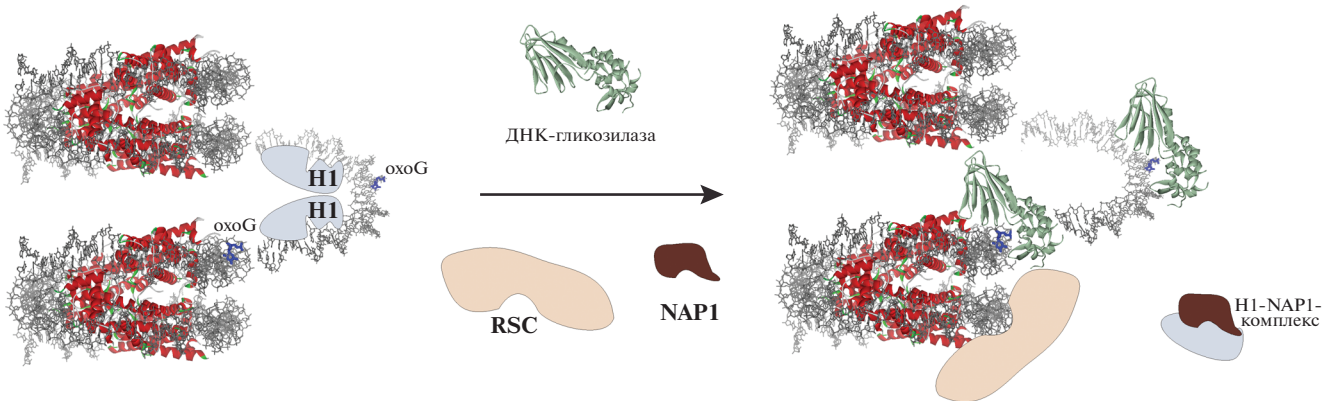


Рис. 8. Модель удаления поврежденного основания в составе динуклеосомы. ДНК показана серым, гистоновый октамер красным, поврежденный нуклеотид синим, ДНК-гликозилаза зеленым. Схематично изображены гистон H1, шаперон NAP1 и белок RSC, ремоделирующий нуклеосомы.

что большинство двухцепочечных разрывов, сгенерированных в процессе BER, должно образовываться в линкерных областях, а также в районах ДНК, ассоциированных с повышенными скоростями ремоделирования нуклеосом.

РАСЩЕПЛЕНИЕ АР-САЙТА

Изучена также способность АР-эндонуклеазы APE1 дикого типа (WT) и мутантных форм (Q51H, I64V, P112L, D148E, R237C, G241R, P311S, и A317V) расщеплять АР-сайты в составе свободной ДНК и NCP (рис. 9) [87].

С этой целью использовали последовательность ДНК Widom 601 и нуклеосомы, полученные из эритроцитов курицы. Активность APE1 по отношению к NCP-связанной ДНК была в ~10 раз ниже, чем у свободной ДНК. Такое заметное снижение активности APE1 дикого типа при взаимодействии с ДНК в составе NCP, вероятно, вызвано тем, что в фермент-субстратном комплексе цепь ДНК должна сильно изогнуться, что стерически затруднено. Эффективность удаления АР-сайта в положении Out была в 10 раз выше, чем в положении In. Инцизионная активность опухолеассоциированного варианта R237C и редкого варианта G241R в составе NCP была ниже, чем у APE1 дикого типа, и не зависела от ориентации АР-сайта (In или Out). Активность APE1 также оказалась сверхчувствительной к свойствам нуклеосомного комплекса вблизи АР-сайта. Более часто встречающиеся варианты Q51H, I64V и D148E APE1 проявляли активность, близкую к активности фермента дикого типа. Полагают, что существует механизм взаимодействия APE1 с ДНК в составе нуклеосом, не зависящий от классического ремоделирования хроматина [87]. Этот механизм состоит в том, что во взаимодействие APE1 с нуклеосомной ДНК вовлекается участок поверхности фермента, содержащий определенные аминокислоты, среди которых наиболее важную роль играют R237 и G241, и который способствует связыванию с ДНК в составе комплексов с белками.

Ранее показали, что первые три стадии SP-пути BER могут протекать на ДНК в составе хроматина без участия ремоделирующих факторов и без разрушения нуклеосом. Этот же вывод сделан и для четвертой стадии [88], в которой участвуют белок XRCC1 и LigIIIα. LigIIIα отличается от ферментов, катализирующих первые три стадии (ДНК-гликозилазы, АР-эндонуклеазы и Polβ), тем, что в комплексе с ДНК он полностью охватывает одноцепочечный разрыв, что должно нарушить взаимодействие ДНК с гистонами и разрушить нуклеосому. Однако доказано, что комплекс LigIIIα-XRCC1 связывает ник в ДНК, когда происходит периодическое спонтанное разматывание ДНК из нуклеосомы [88]. Этот комплекс распадается после завершения лигирования ДНК, и нуклеосома возвращается в свое исходное состояние.

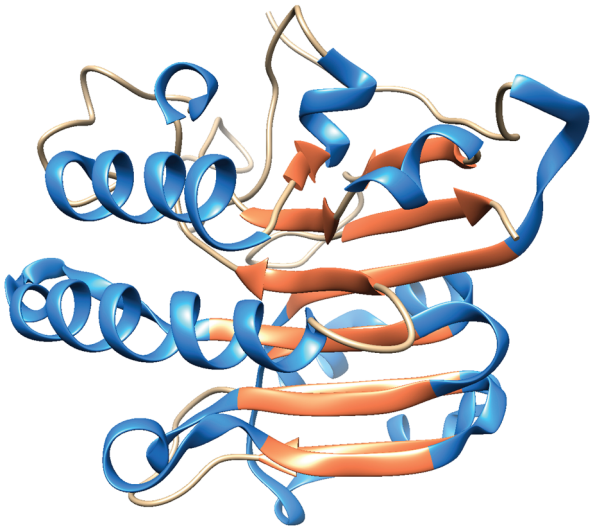


Рис. 9. Строение АР-эндонуклеазы APE1 человека, PDB ID: 1DE8.

МОДИФИКАЦИИ ГИСТОНОВ

Известно [89], что в составе нуклеосом гистоновые белки могут подвергаться модификациям, таким как ацетилированиие лизинов, метилирование лизина и аргинина, фосфорилирование серина, треонина и тирозина, убиквитинирование и SUMO-илирование лизина (SUMO = Small Ubiquitin-like Modifier). ДНК подвергается метилированию метилтрансферазами по С5-атомам цитозина. Кроме того, в гистоновых белках могут возникать мутации. Большинство этих модификаций служат сигналами регуляции активности генов. Некоторые модификации влияют на кинетические и термодинамические параметры связывания ДНК с гистоновыми белками, структуру нуклеосом и вызывают их ремоделирование.

Изучено влияние мутаций в гистоне H2A на процесс BER [90]. Семейство белков H2A содержит наибольшее число вариантов. В структуру H2A входят три области, важные для интра- и интермолекулярной ассоциации: это докинг-домен, находящийся на С-конце; L1-петля и кислотный участок (the acidic patch). Один из самых изученных вариантов гистона H2A – H2A.Z, найден почти у всех эукариот. Хотя этот вариант только на 60% идентичен каноническому H2A, он высококонсервативен у различных организмов, что указывает на его значимость. H2A.Z вовлечен в различные биологические процессы, включая транскрипцию, репарацию двойных разрывов, эксцизионную репарацию нуклеотидов (NER) и прохождение клеточного цикла [91–93]. МакроH2A – это другой вариант H2A, который представляет особый

интерес. МакроH2A содержит H2A-подобный гистоновый домен, связанный лизин-богатым линкером с С-концевым макродоменом, и участвует в инактивации Х-хромосомы, регуляции экспрессии генов и репарации двухцепочечных разрывов. Изучена также роль H2A.Z и макроH2A в процессах BER, а именно, в удалении остатков уридина урацил-ДНК-гликозилазами UDG и SMUG1 [90]. Активность UDG в отношении остатков U, малодоступных для растворителя, была ограниченной в канонических NCP и более высокой в NCP, содержащих варианты H2A. Тем самым можно заключить, что варианты гистоновых белков способствуют удалению модифицированных оснований из малодоступных положений. В случае макроH2A в пределах концевых участков ДНК длиной 35–40 п.н. активность обеих ДНК-гликозилаз была сравнимой с активностью, наблюдаемой в случае свободных ДНК-дуплексов.

Как уже отмечено, модификация гистонов повышает доступность поврежденных оснований для ферментов репарации [94]. Как показано ранее, ацетилирование лизина-56 в гистоне H3 влияет на стабильность NCP [95]. Если в клеточной ДНК нет повреждений, то фермент SIRT6 деацетилирует этот сайт на стадии G2 и более поздних стадиях клеточного цикла [96]. Если же ДНК содержит повреждения, то уровень K56Ac в H3 сохраняется. Это может способствовать репарации ДНК благодаря нейтрализации заряда на входе/выходе NCP [97]. Для подтверждения этого предположения в лаборатории S.H. Wilson проведено кинетическое исследование активности APE1 при взаимодействии с NCP, содержащей H3K56Ac и H3K14Ac [98], и с ДНК Widom 601. Показано, что в H33K56Ac-NCP разрезание цепи ДНК ферментом APE1 протекает более эффективно, чем в неацетилированных NCP. Ацетилирование же альтернативного сайта H3K14Ac никак не влияло на активность APE1. Ассоциированный с хроматином фактор HMGB1 (the high-mobility group box 1 protein) также усиливал действие APE1. HMGB1 на порядок увеличивает активность APE1 при взаимодействии со свободной ДНК в стационарных условиях [99]. Таким образом, этот белок выполняет двойственную функцию, влияя как на сам процесс BER, так и на структуру хроматина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение процессов BER на нуклеосомах позволяет понять, какую роль играют позиционирование и природа повреждения, динамические свойства NCP и свойства фермента в репарации ДНК в составе хроматина. Репарация большинства повреждений в BER определяется их ротационной ориентацией и трансляционным положением, которые влияют на доступность поврежденного сайта для с фермента. Во многих работах показано, что большинство ДНК-гликозилаз наиболее эффективно удаляют поврежденное основание, ориентированное “наружу”, т.е. наиболее доступное для растворителя. Такие заключения сделаны для ферментов Udg, EndoIII и Fpg *E. coli*, UNG, NTHL1, NEIL1, AAG, APE1 человека. Изучена реакционная способность различных ДНК-гликозилаз, принадлежащих к четырем структурным суперсемействам из известных шести [54], в том числе как монофункциональных, так и бифункциональных, имеющих различную молекулярную массу. Показано, что некоторые из перечисленных ДНК-гликозилаз проявляли высокую активность по отношению к повреждениям, доступным для растворителя, другие были полностью неактивны. Чтобы понять причину таких различий в активности ДНК-гликозилаз при взаимодействии с нуклеосомами, сравнили их размеры, структуру и механизм действия [54]. Можно предположить возможность существования обратно пропорциональной зависимости между эффективностью удаления поврежденного основания и размером фермента, обусловленной стерическими причинами. Действительно, среди исследованных ферментов наиболее активно с NCP взаимодействуют небольшие ферменты Udg и AAG, имеющие массу 25.6 [100] и 24.3 кДа [101] соответственно. Меньше был только EndoIII – 23.5 кДа [102]. Форма и размеры ДНК-гликозилаз также могут быть важны для взаимодействия с NCP, поскольку гистоновый кор способен стерически препятствовать связыванию фермента со специфическим сайтом даже при Out-ориентации поврежденного основания. Моделирование возможных структур комплексов ДНК-гликозилаз с нуклеосомами и расчет расстояний между гистоновым октамером и ферментами выявили отсутствие ближних контактов между белками в случае Udg и AAG. Например, в UNG человека наименьшее расстояние (~10 Å) наблюдается между аминокислотными остатками Y275, R276 и гистонами. В AAG наименьшее расстояние было между остатком M164 и гистоном H3 (7.8 Å). В другом предельном случае расстояние между K88 в ферменте Fpg и С-концом гистона H2A составляет 2 Å, а между R31 и H4 – 4.2 Å. Такие короткие расстояния свидетельствуют о возможном влиянии гистонового кора на взаимодействие Fpg со своим специфическим сайтом узнавания, что приводит к низкой активности фермента.

Эффективность взаимодействия ДНК-гликозилаз с NCP может зависеть не только от структурных характеристик фермента, но и от особенностей механизма катализа. Например, AAG и Udg, проявляющие высокую активность на NCP, изгибают свои ДНК-субстраты на 22° и 45°, тогда как малоактивные либо совсем неактивные EndoIII, Fpg и OGG1 изгибают ДНК на 55°, 66° и 70° соответственно. Очевидно, что чем больше угол изгиба, тем большее число связей между остовом ДНК и гистоновым кором нужно дестабилизиро-

вать. Поэтому ферментам Fpg и OGG1 для осуществления каталитического процесса требуется затратить больше энергии, чем AAG и UDG, которые изгибают ДНК-дуплекс не столь значительно. Это обстоятельство можно рассматривать как одну из причин различий в активности ферментов этих двух групп.

Кроме того, большое значение имеет собственная динамика нуклеосом и возможность их ремоделирования. Динамические свойства нуклеосом зависят как от свойств ДНК (нуклеотидной последовательности, природы повреждения), так и от свойств гистоновых белков (посттрансляционных модификаций, наличия мутаций) и влияния N-хвостов гистоновых белков на эффективность процессов, протекающих с участием ДНК, связанной с нуклеосомами [87, 103, 104].

Структура и принцип связывания BER-ферментов с ДНК определяют их способность узнавать и удалять повреждения в NCP. ДНК-гликозилазы и АР-эндонуклеаза APE1 взаимодействуют преимущественно с одной цепью ДНК. Поэтому их активность зависит от ротационной ориентации поврежденного основания. Собственная динамика нуклеосом может иметь существенное значение при репарации повреждений вблизи концов ДНК. Для удаления повреждений, расположенных около диадной оси, ДНК-гликозилазами, эндонуклеазой APE1 и полимеразой Polβ требуются ремоделирующие факторы. Активность этих ферментов на первых трех стадиях BER ниже, чем при взаимодействии со свободной ДНК, но при этом они способны "работать" с минимальным нарушением NCP. Однако лигирование рибозофосфатного остова LigIII-XRCC1, не столь сильно зависящее от ротационной ориентации, требует разрушения NCP [67].

Поскольку перечисленные параметры, определяющие доступность нуклеосомной ДНК, не являются взаимоисключающими, общая эффективность репарации каждого данного повреждения определяется совокупностью всех параметров.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования MD-3775.2019.4 и при частичной поддержке бюджетного финансирования (№ АААА-А17-117020210022-4).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. **389**, 251–260.
2. Vasudevan D., Chua E.Y.D., Davey C.A. (2010) Crystal structures of nucleosome core particles containing the "601" strong positioning sequence. *J. Mol. Biol.* **403**, 1–10.
3. Finch J.T., Lutter L.C., Rhodes D., Brown R.S., Rushton B., Levitt M., Klug A. (1977) Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature*. **269**, 29–36.
4. Richmond T.J., Finch J.T., Rushton B., Rhodes D., Klug A. (1984) Structure of the nucleosome core particle at 7 resolution. *Nature*. **311**, 532–537.
5. Davey C.A., Sargent D.F., Luger K., Maeder A.W., Richmond T.J. (2002) Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **319**, 1097–1113.
6. Richmond T.J., Davey C.A. (2003) The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*. **423**, 145–150.
7. Tsunaka Y., Kajimura N., Tate S., Morikawa K. (2005) Alteration of the nucleosomal DNA path in the crystal structure of a human nucleosome core particle. *Nucl. Acids Res.* **33**, 3424–3434.
8. Tachiwana H., Kagawa W., Osakabe A., Kawaguchi K., Shiga T., Hayashi-Takanaka Y., Kimura H., Kurumizaka H. (2010) Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 10454–10459.
9. Ueda J., Harada A., Urahama T., Machida S., Maehara K., Hada M., Makino Y., Nogami J., Horikoshi N., Osakabe A., Taguchi H., Tanaka H., Tachiwana H., Yao T., Yamada M., Iwamoto T., Isotani A., Ikawa M., Tachibana T., Okada Y., Kimura H., Ohkawa Y., Kurumizaka H., Yamagat K. (2017) Testis-specific histone variant H3t gene is essential for entry into spermatogenesis. *Cell Rep.* **18**, 593–600.
10. Harp J.M., Hanson B.L., Timm D.E., Bunick G.J. (2000) Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **56**, 1513–1534.
11. White C.L., Suto R.K., Luger K. (2001) Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *EMBO J.* **20**, 5207–5218.
12. Clapier C.R., Chakravarthy S., Petosa C., Fernández-Tornero C., Luger K., Müller C.W. (2008) Structure of the *Drosophila* nucleosome core particle highlights evolutionary constraints on the H2A-H2B histone dimer. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **71**, 1–7.
13. Chua E.Y.D., Vasudevan D., Davey G.E., Wu B., Davey C.A. (2012) The mechanics behind DNA sequence-dependent properties of the nucleosome. *Nucl. Acids Res.* **40**, 6338–6352.
14. Lowary P.T., Widom J. (1998) New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. *J. Mol. Biol.* **276**, 19–42.
15. Polach K.J., Widom J. (1999) Restriction enzymes as probes of nucleosome stability and dynamics. *Methods Enzymol.* **304**, 278–298.
16. Simpson R.T., Stafford D.W. (1983) Structural features of a phased nucleosome core particle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **80**, 51–55.
17. Long E.O., Dawid I.B. (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem*. **49**, 727–764.

18. Pepenella S., Murphy K.J., Hayes J.J. (2014) Intra- and inter-nucleosome interactions of the core histone tail domains in higher-order chromatin structure. *Chromosoma*. **123**, 3–13.
19. Mellor J. (2006) Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends Genet.* **22**(6), 320–329. https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.03.008
20. Studitsky V.M., Kassavetis G.A., Geiduschek E.P., Felsenfeldt G. (1997) Mechanism of transcription through the nucleosome by eukaryotic RNA polymerase. *Science*. **278**, 1960–1963.
21. Kulaeva O.I., Gaykalova D.A., Pestov N.A., Golovastov V.V., Vassylyev D.G., Artsimovitch I., Studitsky V.M. (2009) Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1272–1278.
22. Nacheva G.A., Guschin D.Y., Preobrazhenskaya O.V., Karpov V.L., Ebralidse K.K., Mirzabekov A.D. (1989) Change in the pattern of histone binding to DNA upon transcriptional activation. *Cell*. **58**, 27–36.
23. Liu Y., Wilson S.H. (2012) DNA base excision repair: A mechanism of trinucleotide repeat expansion. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 162–172.
24. Esadze A., Stivers J.T. (2018) Facilitated diffusion mechanisms in DNA base excision repair and transcriptional activation. *Chem. Rev.* **118**, 11298–11323.
25. Rodriguez Y., Hinz J.M., Smerdon M.J. (2015) Accessing DNA damage in chromatin: Preparing the chromatin landscape for base excision repair. *DNA Repair (Amst)*. **32**, 113–119.
26. Jagannathan I., Cole H.A., Hayes J.J. (2006) Base excision repair in nucleosome substrates. *Chromosom. Res.* **14**, 27–37.
27. Polach K.J., Widom J. (1995) Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin: a dynamic equilibrium model for gene regulation. *J. Mol. Biol.* **254**, 130–149.
28. Li G., Levitus M., Bustamante C., Widom J. (2005) Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 46–53.
29. Anderson J.D., Widom J. (2000) Sequence and position-dependence of the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *J. Mol. Biol.* **296**, 979–987.
30. Tims H.S., Gurunathan K., Levitus M., Widom J. (2011) Dynamics of nucleosome invasion by DNA binding proteins. *J. Mol. Biol.* **411**, 430–448.
31. Krokan H.E., Drabløs F., Slupphaug G. (2002) Uracil in DNA – occurrence, consequences and repair. *Oncogene*. **21**, 8935–8948.
32. Andersen S., Heine T., Sneve R., König I., Krokan H.E., Epe B., Nilsen H. (2004) Incorporation of dUMP into DNA is a major source of spontaneous DNA damage, while excision of uracil is not required for cytotoxicity of fluoropyrimidines in mouse embryonic fibroblasts. *Carcinogenesis*. **26**, 547–555.
33. Kavli B., Otterlei M., Slupphaug G., Krokan H. (2007) Uracil in DNA–general mutagen, but normal intermediate in acquired immunity. *DNA Repair (Amst.)*. **6**, 505–516.
34. Lindahl T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. **362**, 709–715.
35. Cortazar D., Kunz C., Saito Y., Steinacher R., Schar P. (2007) The enigmatic thymine DNA glycosylase. *DNA Repair (Amst.)*. **6**, 489–504.
36. Neddermann P., Jiricny J. (1993) The purification of a mismatch-specific thymine-DNA glycosylase from HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 21218–21224.
37. Neddermann P., Jiricny J. (1994) Efficient removal of uracil from G.U mispairs by the mismatch-specific thymine DNA glycosylase from HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 1642–1646.
38. Wibley J.E.A., Waters T.R., Haushalter K., Verdine G.L., Pearl L.H. (2003) Structure and specificity of the vertebrate anti-mutator uracil-DNA glycosylase SMUG1. *Mol. Cell.* **11**, 1647–1659.
39. Masaoka A., Matsubara M., Hasegawa R., Tanaka T., Kurisu S., Terato H., Ohyama Y., Karino N., Matsuda A., Ide H. (2003) Mammalian 5-formyluracil-DNA glycosylase. 2. role of SMUG1 uracil-DNA glycosylase in repair of 5-formyluracil and other oxidized and deaminated base lesions. *Biochemistry*. **42**, 5003–5012.
40. Hendrich B., Bird A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6538–6547.
41. Hendrich B., Hardeland U., Ng H.H., Jiricny J., Bird A. (1999) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature*. **401**, 301–304.
42. Nilsen H., Lindahl T., Verreault A. (2002) DNA base excision repair of uracil residues in reconstituted nucleosome core particles. *EMBO J.* **21**, 5943–5952.
43. Beard B.C., Wilson S.H., Smerdon M.J. (2003) Suppressed catalytic activity of base excision repair enzymes on rotationally positioned uracil in nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 7465–7470.
44. Beard B.C., Stevenson J.J., Wilson S.H., Smerdon M.J. (2005) Base excision repair in nucleosomes lacking histone tails. *DNA Repair (Amst.)*. **4**, 203–209.
45. Ishibashi T., So K., Cupples C.G., Ausio J. (2008) MBD4-mediated glycosylase activity on a chromatin template is enhanced by acetylation. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 4734–4744.
46. Cole H.A., Tabor-Godwin J.M., Hayes J.J. (2010) Uracil DNA glycosylase activity on nucleosomal DNA depends on rotational orientation of targets. *J. Biol. Chem.* **285**, 2876–2885
47. Hinz J.M., Rodriguez Y., Smerdon M.J. (2010) Rotational dynamics of DNA on the nucleosome surface markedly impact accessibility to a DNA repair enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 4646–4651.
48. Kosmoski J.V., Smerdon M.J. (1999) Synthesis and nucleosome structure of DNA containing a UV photoproduct at a specific site. *Biochemistry*. **38**, 9485–9494.
49. Rodriguez Y., Smerdon M.J. (2013) The structural location of DNA lesions in nucleosome core particles determines accessibility by base excision repair enzymes. *J. Biol. Chem.* **288**, 13863–13875.
50. Tarantino M.E., Dow B.J., Drohat A.C., Delaney S. (2018) Nucleosomes and the three glycosylases: high, medium, and low levels of excision by the uracil DNA glycosylase superfamily. *DNA Repair (Amst.)*. **72**, 56–63.
51. Olsen L.C., Aasland R., Wittwer C.U., Krokan H.E., Helland D.E. (1989) Molecular cloning of human ura-

cil-DNA glycosylase, a highly conserved DNA repair enzyme. *EMBO J.* **8**, 3121–3125.

52. Xiao G., Tordova M., Jagadeesh J., Drohat A.C., Stivers J.T., Gilliland G.L. (1999) Crystal structure of *Escherichia coli* uracil DNA glycosylase and its complexes with uracil and glycerol: Structure and glycosylase mechanism revisited. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **35**, 13–24.
53. Wu B., Mohideen K., Vasudevan D., Davey C.A. (2010) Structural insight into the sequence dependence of nucleosome positioning. *Structure*. **18**, 528–536.
54. Olmon E.D., Delaney S. (2017) Differential ability of five DNA glycosylases to recognize and repair damage on nucleosomal DNA. *ACS Chem. Biol.* **12**, 692–701.
55. Hazra T.K., Izumi T., Boldogh I., Imhoff B., Kow Y.W., Jaruga P., Dizdaroglu M., Mitra S. (2002) Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 3523–3528.
56. Bandaru V., Sunkara S., Wallace S.S., Bond J.P. (2002) A novel human DNA glycosylase that removes oxidative DNA damage and is homologous to *Escherichia col*i endonuclease VIII. *DNA Repair (Amst.)*. **1**, 517–529.
57. Doublie S., Bandaru V., Bond J.P., Wallace S.S. (2004) The crystal structure of human endonuclease VIII-like 1 (NEIL1) reveals a zincless finger motif required for glycosylase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**, 10284–10289.
58. Yang N., Chaudhry M.A., Wallace S.S. (2006) Base excision repair by hNTH1 and hOGG1: a two edged sword in the processing of DNA damage in γ-irradiated human cells. *DNA Repair (Amst.)*. **5**, 43–51.
59. Ide H., Kotera M. (2004) Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 480–485.
60. Miyabe I., Zhang Q.-M., Kino K., Sugiyama H., Takao M., Yasui A., Yonei S. (2002) Identification of 5-formyluracil DNA glycosylase activity of human hNTH1 protein. *Nucl. Acids Res.* **30**, 3443–3448.
61. Prasad A., Wallace S.S., Pederson D.S. (2007) Initiation of base excision repair of oxidative lesions in nucleosomes by the human, bifunctional DNA glycosylase NTH1. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8442–8453.
62. Liu X., Choudhury S., Roy R. (2003) *In vitro* and *in vivo* dimerization of human endonuclease III stimulates its activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 50061–50069.
63. Odell I.D., Newick K., Heintz N.H., Wallace S.S., Pederson D.S. (2010) Non-specific DNA binding interferes with the efficient excision of oxidative lesions from chromatin by the human DNA glycosylase, NEIL1. *DNA Repair (Amst.)*. **9**, 134–143.
64. Dou H., Mitra S., Hazra T.K. (2003) Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human dNA glycosylases NEIL1 and NEIL2. *J. Biol. Chem.* **278**, 49679–49684.
65. Dou H., Theriot C.A., Das A., Hegde M.L., Matsumoto Y., Boldogh I., Hazra T.K., Bhakat K.K., Mitra S. (2008) Interaction of the human DNA glycosylase NEIL1 with proliferating cell nuclear antigen: the potential for replication-associated repair of oxidized bases in mammalian genomes. *J. Biol. Chem.* **283**, 3130–3140.
66. Hegde M.L., Theriot C.A., Das A., Hegde P.M., Guo Z., Gary R.K., Hazra T.K., Shen B., Mitra S. (2008) Physical and functional interaction between human oxidized base-specific DNA glycosylase NEIL1 and flap endonuclease. *J. Biol. Chem.* **283**, 27028–27037.
67. Odell I.D., Barbour J.-E., Murphy D.L., Della-Maria J.A., Sweasy J.B., Tomkinson A E., Wallace S.S., Pederson D.S. (2011) Nucleosome disruption by DNA ligase III-XRCC1 promotes efficient base excision repair. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 4623–4632.
68. Maher R.L., Prasad A., Rizvanova O., Wallace S.S., Pederson D.S. (2013) Contribution of DNA unwrapping from histone octamers to the repair of oxidatively damaged DNA in nucleosomes. *DNA Repair (Amst.)*. **12**, 964–971.
69. Maher R.L., Wallace S.S., Pederson D.S. (2019) The lyase activity of bifunctional DNA glycosylases and the 3'-diesterase activity of APE1 contribute to the repair of oxidized bases in nucleosomes. *Nucl. Acids Res.* **47**, 2922–2931.
70. Fromme J.C., Bruner S.D., Yang W., Karplus M., Verdine G.L. (2003) Product-assisted catalysis in base-excision DNA repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **10**, 204–211.
71. Fromme J.C., Verdine G.L. (2003) DNA lesion recognition by the bacterial repair enzyme MutM. *J. Biol. Chem.* **278**, 51543–51548.
72. Rydberg B., Lindahl T. (1982) Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction. *EMBO J.* **1**, 211–216.
73. Marnett L.J. (2002) Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. Toxicology. **181–182**, 219–222.
74. Dosanjh M.K., Chenna A., Kim E., Fraenkel-Conrat H., Samson L., Singer B. (1994) All four known cyclic adducts formed in DNA by the vinyl chloride metabolite chloroacetaldehyde are released by a human DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 1024–1028.
75. Rydberg B., Qiu Z.H., Dosanjh M.K., Singer B. (1992) Partial purification of a human DNA glycosylase acting on the cyclic carcinogen adduct 1,N^6-ethenodeoxyadenosine. *Cancer Res.* **52**, 1377–1179.
76. O'Brien P.J., Ellenberger T. (2004) Dissecting the broad substrate specificity of human 3-methyladenine-DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.* **279**, 9750–9757.
77. O'Connor T.R. (1993) Purification and characterization of human 3-methyladenine-DNA glycosylase. *Nucl. Acids Res.* **21**, 5561–5569.
78. Kennedy E.E., Li C., Delaney S. (2019) Global repair profile of human alkyladenine DNA glycosylase on nucleosomes reveals DNA packaging effects. *ACS Chem. Biol.* **14**, 1687–1692.
79. Wang Y. (2008) Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 276–281.
80. Zuo S., Boorstein R.J., Teebor G.W. (1995) Oxidative damage to 5-methylcytosine in DNA. *Nucl. Acids Res.* **23**, 3239–3243.
81. Douki T., Delatour T., Paganon F., Cadet J. (1996) Measurement of oxidative damage at pyrimidine bases in γ-irradiated DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 1145–1151.
82. Bjelland S., Seeberg E. (2003) Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat. Res.* **531**, 37–80.

83. Zhang Y., Yuan F., Wu X., Taylor J.S., Wang Z. (2001) Response of human DNA polymerase iota to DNA lesions. *Nucl. Acids Res.* **29**, 928–935.
84. Hanes J.W., Thal D.M., Johnson K.A. (2006) Incorporation and replication of 8-oxo-deoxyguanosine by the human mitochondrial DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **281**, 36241–36248.
85. Menoni H., Shukla M.S., Gerson V., Dimitrov S., Angelov D. (2012) Base excision repair of 8-oxoG in dinucleosomes. *Nucl. Acids Res.* **40**, 692–700.
86. Cannan W.J., Tsang B.P., Wallace S.S., Pederson D.S. (2014) Nucleosomes suppress the formation of double-strand DNA breaks during attempted base excision repair of clustered oxidative damages. *J. Biol. Chem.* **289**, 19881–19893.
87. Hinz J.M., Mao P., McNeill D.R., Wilson D.M. (2015) Reduced nuclease activity of apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) variants on nucleosomes: identification of access residues. *J. Biol. Chem.* **290**, 21067–21075.
88. Cannan W.J., Rashid I., Tomkinson A.E., Wallace S.S., Pederson D.S. (2017) The human ligase IIIα-XRCC1 protein complex performs DNA nick repair after transient unwrapping of nucleosomal DNA. *J. Biol. Chem.* **292**, 5227–5238.
89. Lee T.H. (2019) Physical chemistry of epigenetics: single-molecule investigations. *J. Phys. Chem. B.* **123**, 8351–8362.
90. Li C., Delaney S. (2019) Histone H2A variants enhance the initiation of base excision repair in nucleosomes. *ACS Chem. Biol.* **14**, 1041–1050.
91. Zlatanova J., Thakar A. (2008) H2A.Z: view from the top. *Structure*. **16**, 166–179.
92. Billon P., Côté J. (2012) Precise deposition of histone H2A.Z in chromatin for genome expression and maintenance. *Biochim. Biophys. Acta – Gene Regul. Mech.* **1819**, 290–302.
93. Yu Y., Deng Y., Reed S.H., Millar C.B., Waters R. (2013) Histone variant Htz1 promotes histone H3 acetylation to enhance nucleotide excision repair in Htz1 nucleosomes. *Nucl. Acids Res.* **41**, 9006–9019.
94. Bowman G.D., Poirier M.G. (2015) Post-translational modifications of histones that influence nucleosome dynamics. *Chem. Rev.* **115**, 2274–2295.
95. North J.A., Shimko J.C., Javaid S., Mooney A.M., Shoffner M.A., Rose S.D., Bundschuh R., Fishel R., Ottesen J.J., Poirier M.G. (2012) Regulation of the nucleosome unwrapping rate controls DNA accessibility. *Nucl. Acids Res.* **40**, 10215–10227.
96. Michishita E., McCord R.A., Boxer L.D., Barber M.F., Hong T., Gozani O., Chua K.F. (2009) Cell cycle-dependent deacetylation of telomeric histone H3 lysine K56 by human SIRT6. *Cell Cycle*. **8**, 2664–2666.
97. Maas N.L., Miller K.M., DeFazio L.G., Toczyski D.P. (2006) Cell cycle and checkpoint regulation of histone H3 K56 acetylation by Hst3 and Hst4. *Mol. Cell*. **23**, 109–119.
98. Rodriguez Y., Horton J.K., Wilson S.H. (2019) Histone H3 lysine 56 acetylation enhances AP endonuclease 1-mediated repair of AP sites in nucleosome core particles. *Biochemistry*. **58**, 3646–3655.
99. Prasad R., Liu Y., Deterding L.J., Poltoratsky V.P., Kedar P.S., Horton J.K., Kanno S.I., Asagoshi K., Hou E.W., Khodyreva S.N., Lavrik O.I., Tomer K.B., Yasui A., Wilson S.H. (2007) HMGB1 is a cofactor in mammalian base excision repair. *Mol. Cell*. **27**, 829–841.
100. Bennett S.E., Sanderson R.J., Mosbaugh D.W. (1995) Processivity of *Escherichia coli* and rat liver mitochondrial uracil-DNA glycosylase is affected by NaCl concentration. *Biochemistry*. **34**, 6109–6119.
101. Lau A.Y., Wyatt M.D., Glassner B.J., Samson L.D., Ellenberger T. (2000) Molecular basis for discriminating between normal and damaged bases by the human alkyladenine glycosylase AAG. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 13573–13578.
102. Asahara H., Wistort P.M., Bank J.F., Bakerian R.H., Cunningham R.P. (1989) Purification and characterization of *Escherichia coli* endonuclease III from the cloned *nth* gene. *Biochemistry*. https://doi.org/10.1021/bi00436a048
103. Widlund H.R., Vitolo J.M., Thiriet C., Hayes J.J. (2000) DNA sequence-dependent contributions of core histone tails to nucleosome stability: differential effects of acetylation and proteolytic tail removal. *Biochemistry*. **39**, 3835–3841.
104. Yang Z., Zheng C., Hayes J.J. (2007) The core histone tail domains contribute to sequence-dependent nucleosome positioning. *J. Biol. Chem.* **282**, 7930–7938.

BASE EXCISION REPAIR OF THE NUCLEOSOME BOUND DNA

O. A. Kladova[1], N. A. Kuznetsov[1], and O. S. Fedorova[1, *]

[1]*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: fedorova@niboch.nsc.ru*

In mammalian cells, base excision repair (BER) is the main pathway responsible for the correction of a variety of chemically modified DNA bases. DNA packaging in chromatin affects the availability of damaged sites for the enzymes involved in repair processes. This review presents the data concerning the enzymes involved in the BER. Even within the nucleosome core particle (NCP), the availability of damaged DNA to enzymes is hindered by the presence of a histone octamer. In this case, the removal of DNA lesions largely depends on their rotational and translational positioning in the NCP, as well as on the particular properties of the enzyme.

Keywords: DNA repair, nucleosome, DNA glycosylase, AP-endonuclease

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 2, с. 210–222

ОБЗОРЫ

УДК 577.2

КЛЕТОЧНЫЙ ОТВЕТ НА ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК, ВОЗНИКАЮЩИЕ В РИБОСОМНЫХ ГЕНАХ

© 2021 г. А. К. Величко[a, b, c], С. В. Разин[a], О. Л. Кантидзе[a, *]

[a]*Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия*

[b]*Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119146 Россия*

[c]*Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия*

**e-mail: kantidze@gmail.com*

Поступила в редакцию 05.08.2020 г.
После доработки 05.08.2020 г.
Принята к публикации 12.08.2020 г.

Ядрышки в клетках эукариот представляют собой места биосинтеза рибосом. Они формируются вокруг тандемно повторяющихся рибосомных генов, наиболее активно транскрибируемых в клетках человека. Исследования последних лет показывают, что для поддержания геномной стабильности рибосомных повторов существуют особые механизмы клеточного ответа на повреждение ДНК. В обзоре охарактеризована структура и функции рибосомных повторов, их организация в ядрышковом компартменте. Рассмотрены методические аспекты изучения повреждения ДНК в ядрышке, проанализированы уникальные особенности ответа на повреждения рибосомной ДНК, включая транскрипционную репрессию и ядрышковую реорганизацию, а также особенности механизмов репарации повреждений в рибосомных генах.

Ключевые слова: репарация ДНК, транскрипция, рибосомная ДНК, ядрышко

DOI: 10.31857/S0026898421020142

КЛЕТОЧНЫЙ ОТВЕТ НА ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК

Появление молекулы ДНК и переход к ней функций основного носителя генетической информации стали не только важнейшим скачком в процессе молекулярной эволюции, но и обеспечили предпосылки к формированию и развитию современных форм жизни. Этот переход был обусловлен большей химической стабильностью и прочностью молекулы ДНК по сравнению с РНК, склонной к спонтанному гидролизу и, в силу этого, неспособной формировать цепи большой длины. Тем не менее, молекула ДНК, несмотря на ее очень высокую стабильность, не является неуязвимой. Многообразные агрессивные факторы внешней среды, такие как ионизирующее и ультрафиолетовое излучение и ксенобиотики, способны индуцировать различные повреждения ДНК, называемые экзогенными. В масштабе же клетки или целого организма более вероятны эндогенные повреждения, спонтанно возникающие в процессе нормального клеточного метаболизма, например при коллапсе репликативных вилок [1], при столкновении между транскрипционной и репликативной машинами [2], неполном разделении сестринских хроматид во время митоза [3] и др. В результате совокупного действия экзо- и эндогенных факторов в геномной ДНК образуются десятки и даже сотни тысяч повреждений в сутки [4]. По приблизительным оценкам в число этих повреждений входят лишь от десяти до пятидесяти двухцепочечных разрывов ДНК (ДЦР) [5, 6]. ДЦР, несмотря на их сравнительно небольшое количество, считаются одним из самых токсичных для клетки видов повреждений ДНК, имеющих бесспорную значимость в процессе эволюционной изменчивости. В то же время связанная с ДЦР геномная нестабильность является причиной различных патологий, о чем свидетельствует существование прямой корреляции между дефектами систем репарации ДЦР и частотой развития иммунных и неврологических заболеваний [7], а также злокачественной трансформации клеток [8].

Для обеспечения целостности и стабильности ДНК эволюция наделила клетки целым арсеналом разнообразных молекулярных механизмов, которые в совокупности называются ответом на повреждения ДНК (DDR, DNA Damage Response). Ответ на повреждение ДНК отнюдь не ограничивается только репарацией. Он включает, в первую оче-

редь, системы детекции повреждений, амплификацию сигналов о повреждении и привлечение в сайт разрыва необходимых репарационных белков, собственно репарацию, а также регуляцию клеточного цикла и механизмы запуска программируемой клеточной гибели при невозможности осуществления репарации, например при очень масштабных повреждениях [9]. В клетках высших эукариот используются два основных способа восстановления ДЦР. Во-первых, это гомологичная рекомбинационная репарация (HRR, *от англ.* “Homologous Recombination Repair”), обеспечивающая восстановление как физической целостности молекулы ДНК, так и ее нуклеотидной последовательности в сайте повреждения. Во-вторых, клетки могут использовать менее точный механизм соединения концов ДНК, который восстанавливает ее целостность, но не обязательно нуклеотидную последовательность. Эти механизмы включают классическое негомологичное соединение концов (c-NHEJ*, от англ.* “classic Non-Homologous End-Joining”), а также альтернативное соединение концов (alt-NHEJ). В отличие от системы NHEJ, активной на протяжении всего клеточного цикла, HRR работает предпочтительно в S/G2-фазах, поскольку в качестве донора гомологии ей требуется сестринская хроматида [10]. Однако выбор пути репарации не всегда зависит лишь от фазы клеточного цикла. Иногда он определяется типом повреждения ДНК [11], а также эпигенетическим контекстом и транскрипционным статусом региона [12]. Таким образом, ответ на повреждение отнюдь не одинаков для всей ядерной ДНК, и в некоторых геномных областях требуется определенная специализация. Это особенно актуально для тех регионов, в которых повреждения возникают значительно чаще, чем в других – так называемых горячих точках. К ним относятся различные участки генома, богатые повторяющимися последовательностями, такие как теломеры и центромеры [13], ломкие сайты, в частности поздно реплицирующиеся локусы [14], а также активно транскрибирующиеся области [15–17]. С этой точки зрения одним из главных источников нестабильности генома являются рибосомные гены (рДНК) [18, 19], что обусловлено несколькими причинами. Во-первых, это самые активно транскрибирующиеся в клеточном ядре гены, а высокая плотность РНК-полимеразы I в рДНК многократно увеличивает риск столкновения между транскрипционной и репликативной машинами. Еще одна связанная с транскрипцией уязвимость, типичная для рДНК – образование R-петель. Синтезируемая РНК может гибридизоваться с ДНК, которая кодирует ее в *цис*-положении, образуя при этом гибридную структуру РНК : ДНК, известную как R-петля [20]. Вытесненная в результате образования R-петли оцДНК служит предпочтительной мишенью для таких мутагенных процессов, как дезаминирование и депуринизация [21]. Будучи достаточно стабильными, R-петли создают препятствия для продвижения РНК- и ДНК-полимераз, что в конечном итоге приводит к ДЦР [22]. Во-вторых, геномные области с высоким содержанием GC или простых повторов, такие как рДНК, сложны для репликации [23]. Если репликативный стресс сохраняется в течение длительного времени, то специфичные к структуре эндонуклеазы будут генерировать одно- и двухцепочечные разрывы в попытке перезапустить остановленные вилки репликации [24]. В-третьих, регионы с высоким содержанием GC склонны к образованию неканонических форм ДНК, состоящих из четырех цепей. Эти структуры известны как G-квадруплексы. По мере движения РНК-полимеразы I нематричная цепь ДНК может формировать G-квадруплексы, которые также представляют собой препятствие для последующего движения вилок репликации [25].

Наконец, рибосомные гены формируют длинные тандемные повторы, обладающие повышенной рекомбиногенностью, что может приводить к грубым перестройкам при повреждении ДНК. Именно поэтому нестабильность рДНК часто сопровождает многие онкологические [26] и нейродегенеративные заболевания [27], а также фенотип преждевременного старения [28].

За последнее время появляется все больше работ, которые показывают уникальные особенности ответа на повреждения ДНК рибосомных генов [29–32]. Именно этому посвящен наш обзор. Мы начнем с характеристики структуры и функционирования рибосомных повторов и их организации в ядрышковом компартменте. Затем рассмотрим методические аспекты изучения повреждения ДНК в ядрышке, проанализируем уникальные особенности ответа на повреждения рДНК, включая транскрипционную репрессию и ядрышковую реорганизацию, а закончим механизмами репарации повреждений рДНК и их особенностями.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЯДРЫШКА

Ядрышко – это большой безмембранный субъядерный компартмент, присутствующий в эукариотических клетках всех типов. Основная функция ядрышка состоит в транскрипции рибосомных генов, процессинге рРНК и сборке субъединиц рибосом. Рибосомные гены организованы в тандемные повторы, называемые ядрышковым организатором (NOR*, от англ.* “Nucleolar Organization Regions”). Гаплоидный геном человека содержит в среднем 300 копий таких повторов длиной 43 т.п.н., кластеры которых локализованы на коротких плечах всех акроцентрических хромосом (хромосомы 13, 14, 15, 21 и 22) (рис. 1)

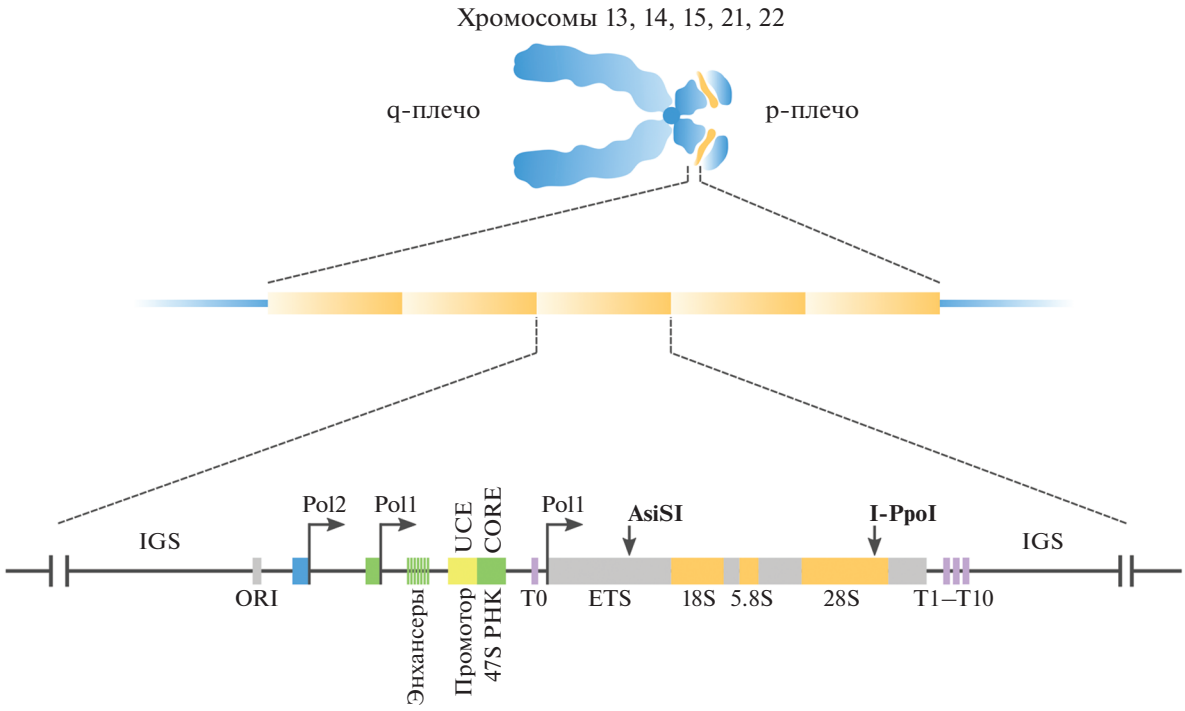


Рис. 1. Схема организации рибосомного повтора. Сокращения: 18S, 5.8S, 28S – кодирующие последовательности соответствующей РНК, AsiSI – сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции AsiSI, CORE – минимальный (кор-) промотор, ETS – внешний транскрибируемый спейсер, IGS – межгенный спейсер, I-PpoI – сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции I-PpoI, ORI – участок начала (ориджин) репликации, Pol1 – промотор РНК-полимеразы I, Pol2 – промотор РНК-полимеразы II, T0 – терминатор-подобный элемент, T1–T10 – терминаторы транскрипции, UCE – 5'-концевой регуляторный элемент.

[33, 34]. Длина кластера рибосомных генов характеризуется поразительной изменчивостью – она различается не только у разных индивидов, но и в клетках одного человека, и может варьировать от 50 тысяч до нескольких миллионов пар нуклеотидов. [35]. Подобная изменчивость определяет уникальный кариотип рДНК каждого человека. Установленный максимум количества повторов составляет около 400 копий на геном человека, при этом минимальное зарегистрированное их количество – всего 14 [36]. Большинство повторов рДНК расположены в направлении “голова к хвосту” и являются каноническими. Однако около трети повторов организованы в виде палиндромных, или неканонических повторов. Каждый из повторов длиной 43 т.п.н. включает в себя кодирующий рРНК сегмент размером 13 т.п.н., а также межгенный спейсер длиной 30 т.п.н. (IGS, *от англ.* “InterGenic Spacer”). Этот спейсер содержит различные регуляторные элементы, такие как промотор, энхансерные и терминаторные последовательности [37] (рис. 1).

Повторы рДНК существуют в двух формах: активно транскрибирующиеся повторы, представляющие собой открытый эухроматин, и неактивные, организованные в гетерохроматин. И те, и другие при этом локализуются в ядрышке. Таким образом, интенсивность синтеза рРНК может регулироваться не только за счет изменения суммарного количества копий рибосомных повторов, но и эпигенетически – путем изменения баланса между количеством активных и репрессированных копий повтора [38].

Транскрипция генов рРНК требует образования на промоторе рДНК преинициаторного комплекса, состоящего из РНК-полимеразы I, фактора активации транскрипции UBF и фактора селективности промотора SL1. Когда РНК-полимераза I начинает процесс синтеза рРНК, UBF и SL1 остаются связанными с промоторной областью, что позволяет непрерывно рекрутировать молекулы РНК-полимеразы I [38, 39]. Таким образом, каждый ген рРНК может транскрибироваться одновременно несколько раз. Это порождает структуру, напоминающую рождественскую елку, которую можно визуализировать с помощью электронной микроскопии [40]. Исходный 47S транскрипт-предшественник рРНК процессируется с образованием зрелых 18S, 5.8S и 28S рРНК, которые затем посттранскрипционно модифицируются при участии малых ядрышковых РНП и дополнительных факторов процессинга. Наконец, процессированные и модифицированные рРНК связываются с

рибосомными белками и экспортируются в цитоплазму [41].

В ядрышках высших эукариот рибосомные повторы организованы в три внутриядрышковых компартмента: фибриллярный центр (FC, *от англ.* "Fibrillar Centre"), плотный фибриллярный компонент (DFC*, от англ.* "Dense Fibrillar Component") и гранулярный компонент (GC, *от англ.* "Granular Component"). Каждый компонент можно легко идентифицировать по специфической морфологии с помощью электронной и световой микроскопии [41]. Ядрышко может иметь множество фибриллярных центров, каждый из которых организован вокруг одного–трех рибосомных генов [42, 43]. Фибриллярные центры содержат избыточный запас компонентов аппарата транскрипции – РНК-полимеразу I и транскрипционные факторы, такие как UBF, Treacle, SL1 и др. Тем не менее, транскрипция происходит не в самих фибриллярных центрах, а на границе между ними и плотным фибриллярным компонентом [43, 44]. Плотный фибриллярный компонент окружает каждый фибриллярный центр и содержит в основном факторы раннего процессинга рРНК. Плотный фибриллярный компонент, в свою очередь, окружен плотным гранулярным компонентом, куда перемещается транскрибированная рРНК для дальнейшего созревания и сборки рибосом. Таким образом, организация и структура этих внутриядрышковых компартментов тесно связана с последовательными шагами биогенеза рибосом и направленным транспортом рРНК.

Многие немембранные субъядерные компартменты, такие как центры сплайсинга (nuclear speckles) или тельца Кахаля, проявляют свойства жидких капель. Принцип, на котором основано образование таких органелл, получил название жидкость-жидкостное фазовое разделение (LLPS, от англ. "Liquid-Liquid Phase Separation"), и в настоящее время идея о том, что именно этот принцип лежит в основе внутренней организации клетки в целом, приобретает все большую популярность [45, 46]. Ядрышки также проявляют жидкостные свойства [47]. Показано, что неупорядоченные домены фибрилларина, нуклеофозмина и РНК-полимеразы I (ключевых структур плотного гранулярного компонента, гранулярного компонента и фибриллярного соответственно) необходимы для образования капель, а их мотивы связывания с РНК необходимы для поддержания LLPS [48, 49]. Именно за счет жидкостных свойств ядрышко обладает весьма динамической структурой. Так, например, ингибирование транскрипции рибосомных генов актиномицином D (ACD), который при низкой концентрации ингибирует преимущественно РНК-полимеразу I, приводит к крупномасштабной реорганизации ядрышка и образованию так называемых "ядрышковых кепов" [50]. Формирование кепов сопровождается транслокацией белков фибриллярного центра и плотного фибриллярного компонента вместе с рДНК на периферию ядрышка, при этом фибриллярный центр обращен к нуклеоплазме, а плотный фибриллярный компонент к внутренней части ядрышка. Одновременно с этим происходит перемещение многих рибосомных белков из ядрышка в нуклеоплазму. Высвобожденные рибосомные белки секвестрируют убиквитинлигазу MDM2 в нуклеоплазме и таким образом способствуют повышению уровня p53, что приводит к остановке клеточного цикла, старению или апоптозу [51]. Такой сценарий ядрышковой реорганизации реализуется не только при прямом ингибировании транскрипции рибосомных генов, но и при многих других типах стресса, в частности тепловом [52, 53], окислительном, осмотическом [31], и при повреждении ДНК, возникшем как непосредственно в рДНК [29, 30], так и в остальной части генома [32, 54]. Таким образом, изменение уровня транскрипции рибосомных генов в общем, как и их репрессия в частности, представляет собой универсальную реакцию клеток на стресс, а ядрышко считается сенсором и центром координации этой реакции [55].

СИСТЕМЫ ИНДУКЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ В рДНК

Системы репарации повреждений ядрышковой ДНК экспериментально изучают с использованием различных способов внесения таких повреждений. Каждый способ обладает рядом преимуществ и недостатков. Тем не менее, выбор того или иного способа зависит в первую очередь от исследовательских задач. В первых работах, посвященных изучению ответа на повреждение рДНК, клетки подвергали действию γ-излучения или ультрафиолетового излучения [54, 56, 57]. Однако эти типы воздействия не являются специфичными и повреждают не только рибосомные гены, но ДНК всего генома в целом. Лазерное микрооблучение и ионные микропучки позволяют получить более локальные повреждения, поскольку их можно сфокусировать непосредственно на ядрышке [54, 58]. Однако они также имеют свои ограничения и недостатки. Во-первых, эти подходы по-прежнему не являются сайт-специфичными. Во-вторых, лазерные и ионные пучки индуцируют не только ДЦР, но и множество других типов повреждений ДНК (так называемые кластерные повреждения), что значительно усложняет интерпретацию результатов относительно систем распознавания и репарации таких повреждений. В подходах, лишенных обозначенных недостатков, используются специфичные эндонуклеазы, позволяющие вносить повреждения известного типа в известный участок рДНК. Эктопическая экспрессия в клетках хоминг-эндонуклеазы I-PpoI из *Physarum*

polycephalum – система, которая регулярно используется для индукции ДЦР в рДНК при изучении ответа на повреждение ДНК в рибосомных генах [29–31, 59–61]. В кодирующем 28S РНК регионе рибосомного повтора находится отсутствующий в остальной части генома 13–15-нуклеотидный участок узнавания ДНК-нуклеазой I-PpoI (рис. 1), который на 100% идентичен у всех эукариот [62]. Экспрессируемая в клетках человека I-PpoI индуцирует повреждения приблизительно в 10% своих сайтов-мишеней рДНК, что составляет около 30 ДЦР на все рибосомные гены [63]. I-PpoI также атакует еще примерно 13 сайтов в геноме, большинство из которых, однако, представлены псевдогенами 28S рРНК [64].

Еще одна система индукции ДЦР в рДНК – эктопическая экспрессия эндонуклеазы AsiSI из *Arthrobacter* [29, 65], которая имеет 8-нуклеотидный сайт в кодирующем регионе 47S РНК (рис. 1). Однако AsiSI индуцирует повреждения не только в рибосомном повторе, но и еще в 174 сайтах генома человека [66]; поэтому для изучения повреждений именно рДНК AsiSI применяется значительно реже, чем I-PpoI. Кроме того, отсутствует даже приблизительный количественный анализ индуцированных AsiSI повреждений в рДНК. Стоит также отметить, что AsiSI не может расщеплять участки узнавания, содержащие метилированные CpG-динуклеотиды, а так как некоторая часть повторов рДНК инактивирована именно за счет метилирования [38], то AsiSI расщепляет, вероятно, только активные, деметилированные повторы.

Наконец, технология CRISPR/Cas9 также весьма эффективна для адресного внесения ДЦР в рДНК. С помощью этой технологии можно индуцировать ДЦР практически в любой части рибосомного повтора, конечно, при наличии подходящего PAM-сайта (мотив, смежный с протоспейсером). В исследованиях ответа на повреждение рДНК систему CRISPR/Cas9 успешно использовали для индукции ДЦР как в транскрибирующемся регионе рибосомного повтора, так и в его нетранскрибируемом межгенном спейсере [29, 60]. Тем не менее, надо иметь в виду, что длительная экспрессия I-PpoI, AsiSI или Cas9 в клетках приводит к повторным циклам разрезания-восстановления таргентных участков ДНК до тех пор, пока ошибки репарации не приведут к изменению целевой последовательности [63]. Это ограничение метода не относится к значительным, однако его стоит учитывать в долгосрочных экспериментах.

ПОВРЕЖДЕНИЯ РИБОСОМНОЙ ДНК ИНДУЦИРУЮТ PIK-ЗАВИСИМУЮ РЕПРЕССИЮ ЯДРЫШКОВОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Самые ранние результаты изучения ответа на повреждение ДНК в ядрышке получены в лаборатории R. Casellas в 2007 году. Kruhlak и соавт. показали, что при генотоксическом стрессе, индуцированном γ-излучением, лазерным микрооблучением или этопозидом (ингибитор ДНК-топоизомеразы II), в эмбриональных фибробластах мыши происходит масштабная репрессия транскрипции рибосомных генов [54]. Эта репрессия сопровождается реорганизацией ядрышка, в том числе формированием “ядрышковых кепов”, идентичных тем, которые образуются при ингибировании рибосомной транскрипции ACD [54]. В дальнейшем, изучая механизмы наблюдаемого эффекта, обнаружили поразительный факт: транскрипция в ядрышке была не просто пассивно заблокирована за счет повреждений ДНК. Наоборот, транскрипционная репрессия была регулируемым процессом и зависела от активности киназы ATM – одного из основных белков группы фосфатидилинозитол-3-киназа-подобных киназ (PIK-киназ), ответственных за распознавание и репарацию ДЦР [67, 68]. Впоследствии роль киназы ATM в индуцированной ДЦР репрессии ядрышковой транскрипции многократно подтвердили с использованием эндонуклеаз I-PpoI [29, 31, 59–61], AsiSI [65] и CRISPR/Cas9 [29, 60]. С помощью CRISPR/Cas9-индуцированных разрывов обнаружено, что ATM-зависимая репрессия транскрипции происходит вне зависимости от того, в кодирующей или некодирующей части рибосомного повтора возникают повреждения [60]. Это окончательно исключило возможность нерегулируемой физической остановки РНК-полимеразы I разрывами в матричной цепи ДНК.

Как выяснилось в дальнейшем, ATM – не единственный представитель PIK-киназ, регулирующий транскрипцию рДНК в ответ на повреждения. Оказалось, что PIK-киназа ATR также принимает участие в этом процессе. Несмотря на то, что ATR в меньшей степени вовлечена в репарацию ДЦР и, в основном, ответственна за поддержание стабильности репликации ДНК, в ряде работ показано, что ATR в равной степени с ATM обеспечивает репрессию ядрышковой транскрипции при индукции ДЦР различными агентами [29, 30]. В нашей лаборатории обнаружено, что киназа ATR совместно с ATM обеспечивает репрессию ядрышковой транскрипции в ответ на индуцированные гипоосмотическим стрессом котранскрипционные R-петли [31]. Однако осталось неясным, обусловлена ли активация ATR/ATM-зависимого сигнального пути конверсией R-петель в ДЦР, либо же сама структура R-петель является причиной его запуска.

Еще один представитель группы PIK-киназ – DNA-PKcs, которая, как и ATM, участвует в первую очередь в распознавании и репарации ДЦР. Известны всего две работы, показывающие возможность DNA-PKcs-зависимой репрессии РНК-полимеразы I. Первая работа выполнена с ис-

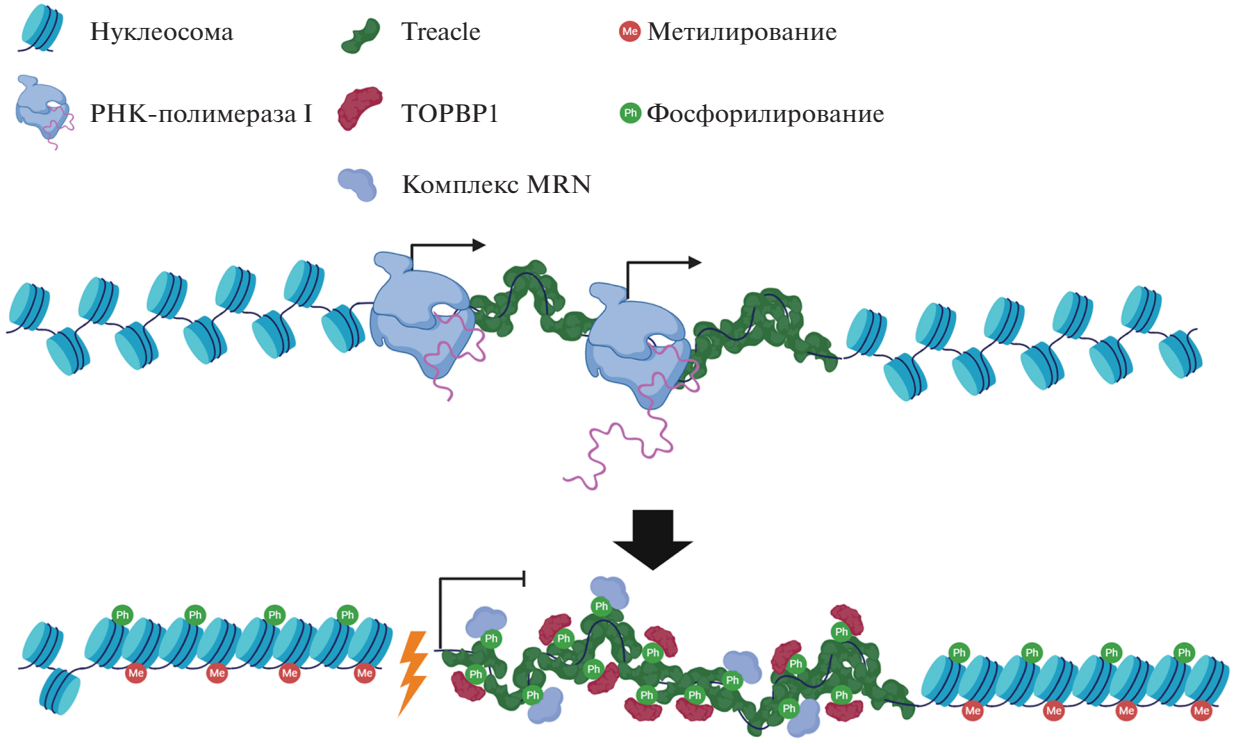


Рис. 2. Обобщенная схема механизмов репрессии РНК-полимераза I-зависимой транскрипции, индуцированной повреждением ДНК в рибосомных повторах. Повреждение рДНК индуцирует метилирование гистона H3 и фосфорилирование гистона H2B, что обеспечивает компактизацию хроматина и его транскрипционный сайленсинг. Кроме того, повреждение рДНК сопровождается ATM/ATR-зависимым фосфорилированием Treacle, что стимулирует его взаимодействие с комплексом MRN и белком TOPBP1. Это взаимодействие также является необходимым условием транскрипционной репрессии рибосомных генов.

пользованием *in vitro* систем [69], вторая выявляет участие DNA-PKcs в транскрипционной репрессии рДНК в ответ на повреждения, индуцируемые цисплатином и ультрафиолетовым излучением [70]. Тем не менее, в большинстве последующих работ с использованием CRISPR/Cas9, I-PpoI или ионизирующего излучения участие DNA-PKcs в репрессии транскрипции рДНК не подтвердилось [31, 54, 59]. Поэтому на сегодня главенствует мнение, что роль DNA-PKcs в ответе на повреждение рДНК ограничена только репарацией. Однако не исключено, что ATM, ATR, и DNA-PKcs, каждая из которых служит эффектором разного типа повреждений, в конечном итоге могут запускать одни и те же механизмы репрессии транскрипции.

МЕХАНИЗМЫ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ РЕПРЕССИИ РИБОСОМНОЙ ДНК

В условиях воздействия ионизирующего излучения репарационные белки Nbs1 и MDC1, а также ATM необходимы для эффективного ингибирования ядрышковой транскрипции, в то время как некоторые факторы репарации, включая Ku80, BRCA1, 53BP1 и гистон H2AX, необязательны. Используя методы FRAP-микроскопии, удалось показать, что ATM-зависимая репрессия ядрышковой транскрипции обусловлена подавлением инициации транскрипции РНК-полимеразой I, а также ее удалением с хроматина в момент элонгации [54]. Однако конкретный механизм индуцированной ДЦР репрессии рДНК до сих пор остается предметом исследований. Ключом к пониманию этого механизма может быть поиск и идентификация мишеней ATM в ядрышке. В ходе фосфопротеомных исследований обнаружено несколько таких мишеней [71, 72], среди которых субъединица РНК-полимеразы I RPA34, компонент SL1-инициаторного комплекса TAF1C, фактор терминации транскрипции 1 (TTF1), а также фактор транскрипции UBF и взаимодействующий с ним белок Treacle. Впоследствии прямую роль в индуцированной ДЦР репрессии рибосомных генов удалось доказать только для Treacle (рис. 2).

Treacle (также известный как TCOF1) – ядрышковый фосфопротеин, ген которого мутирован при синдроме Тричера–Коллинза, врожденном заболевании, характеризующемся черепно-лицевыми деформациями [73]. Treacle содержит 17 S/T-Q-мотивов – специфичных для ATM и

других PIK-киназ сайтов фосфорилирования. В работах S.J. Elledge, M. Stucki и D.H. Larsen показано, что при индукции ДЦР в рибосомных генах с помощью CRISPR/Cas9 или ионизирующей радиации ATM-зависимое фосфорилирование Ser-1199 в одном из S/T-Q-мотивов Treacle необходимо для его взаимодействия с белком Nbs1. В свою очередь, это взаимодействие необходимо для транскрипционной репрессии рДНК в ответ на повреждение [29, 32, 54, 74]. Кроме того, Nbs1 взаимодействует с Treacle в составе комплекса Mre11-Nbs1-Rad50 (MRN). Это взаимодействие может происходить и без участия Mre11, однако отсутствие этого компонента компрометирует транскрипционную репрессию, индуцированную повреждением рДНК (рис. 2) [29].

Позже две исследовательские группы независимо показали, что активатор ATR-киназы – TOPBP1, также связывается с Treacle в ответ на повреждение рДНК [30, 31]. В лаборатории M. Stuki обнаружили, что при индукции повреждений с помощью I-PpoI для репрессии рибосомной транскрипции требуется взаимодействие Treacle и TOPBP1, причем такое взаимодействие опосредуется активностями обеих киназ – ATR и ATM, а также Nbs1 [30]. Поскольку Nbs1 взаимодействует с N-концевым доменом Treacle, а TOPBP1 с C-концевым доменом, то эти взаимодействия не интерферируют друг с другом и могут быть реализованы одновременно. При этом связывание Treacle с TOPBP1 по всей видимости также контролируется ATM/ATR-зависимым фосфорилированием S/T-Q-мотивов в Treacle. В работе нашей лаборатории установлено, что стабилизация R-петель при гипоосмотическом стрессе также приводит к ATR-зависимому взаимодействию Treacle и TOPBP1, необходимому, в свою очередь, для активации ATM и репрессии ядрышковой транскрипции [31]. Кроме того, в работе еще одного коллектива показано, что сверхэкспрессии TOPBP1 достаточно для ATR-зависимой репрессии рибосомных генов без какого-либо их повреждения [75]. Таким образом, можно предположить, что ATM/ATR-зависимая модификация Treacle и его прямое взаимодействие с репарационными белками TOPBP1 и Nbs1 может приводить к временной утрате им транскрипционной функции, что и обеспечивает репрессию рибосомных генов (рис. 2).

Несмотря на то, что рибосомные гены имеют низкую плотность нуклеосом, модификации гистонов также регулируют транскрипцию рДНК при ответе на повреждение. При повреждениях рДНК, индуцированных ионизирующим излучением или I-PpoI, происходит фосфорилирование гистона H2B по Ser-14 (H2BS14p), что является репрессирующей модификацией. Фосфорилирование H2B в данном случае осуществляется киназой MST2, которую при участии адапторного белка RASSF1A активирует киназа ATM. Отсутствие любого из компонентов цепи ATM–ASSF1A–MST2 приводит к потере H2BS14p и препятствует индуцируемой ДЦР репрессии рибосомных генов [76]. В исследовании, представленном лабораторией G. Legube [65], обнаружено, что AsiSI-индуцируемое повреждение рДНК приводит к увеличению уровня гистона H3, триметилированного по Lys-9 (H3K9Me3), что также является фактором формирования неактивного хроматина. Метилирование при этом обеспечивается активностями репрессорного комплекса HUSH и гистонметилтрансферазs SUV39H1. Нокдаун любого из этих белков приводит к снижению уровня ДЦР-индуцируемой репрессии и предотвращает формирование ядрышковых кепов [65]. Таким образом, репрессия транскрипции рибосомных генов, индуцируемая повреждением ДНК, может управляться совокупностью механизмов, включающих не только модификацию компонентов самой транскрипционной машины, но и изменение эпигенетического статуса ядрышкового хроматина.

ДАЛЬНОДЕЙСТВИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ РЕПРЕССИИ рДНК

В последние годы активно изучается влияние повреждений ДНК на транскрипцию не только тех генов, которые непосредственно содержат ДЦР, но и на активность смежных с ними неповрежденных генов. Показано, что индукция ДЦР в генах, активно транскрибируемых РНК-полимеразой II, приводит к их ATM/DNA-PK-зависимой репрессии [77, 78]. Обнаружено снижение транскрипции или накопление репрессивных хроматиновых меток в генах, лежащих на расстоянии до нескольких тысяч пар нуклеотидов от специфического сайта разрыва [77, 79]. Отмечено отсутствие включения рибонуклеотидов и активной формы РНК-полимеразы II в регионах, маркированных γH2AX, при индукции ДЦР с помощью ионизирующего или лазерного излучения [80]. Таким образом, расстояние, на которое распространяется эффект, репрессирующий транскрипцию, скорее всего, ограничено размером репарационного компартмента. Однако реализуются ли подобные дистанционные эффекты при повреждении рДНК? Этот вопрос недостаточно изучен. Как далеко от сайта повреждения в рДНК могут распространяться репрессирующие транскрипцию сигнальные каскады? Действуют ли они только в пределах того рибосомного повтора, в котором индуцировано повреждение, или же транскрипционная репрессия действует также *in cis* на соседние неповрежденные повторы?

Для индукции ДЦР в единичном ядрышке Kruhlak и соавт. [54] использовали лазерное микрооблучение, мощность которого обеспечивала

внесение одного ДЦР на 1 млн.п.н. ДНК. С помощью этого подхода установлено, во-первых, что транскрипция репрессируется исключительно в том ядрышке, которое подвергается действию облучения, и не распространяется на остальные в пределах клеточного ядра. Во-вторых, транскрипционная репрессия ядрышка, его реорганизация и формирование "кепов" могут происходить при очень низкой плотности ДЦР – приблизительно один ДЦР на 23 рибосомных повтора. Тем не менее, количественная оценка частоты ДЦР, представленная в [54], является приблизительной и, скорее всего, занижена, поскольку основана не на прямом измерении количества разрывов, а на определении интенсивности фосфорилирования H2AX в ядрышке, для которого характерна низкая плотность нуклеосом [81].

Транскрипционную репрессию во всем ядрышке провоцирует также эндонуклеаза I-PpoI [59], хотя по некоторым оценкам I-PpoI индуцирует ДЦР всего лишь в 10% рибосомных повторов [63]. Однако эта величина также может быть заниженной, поскольку использованный метод оценки не учитывает ни эффективность трансфекции клеток I-PpoI, ни особенности распределения ДЦР между активными и неактивными повторами.

Более точный анализ количества ДЦР в рДНК выполнен в группе D. Larsen. ДЦР в межгенном спейсере рибосомного гена индуцировали с помощью CRISPR/Cas9, что приводило к транскрипционной репрессии и формированию кепов. Используя количественный ПЦР-анализ, обнаружили, что поврежденными оказываются около 30% всех повторов рДНК, что соответствует одному ДЦР на три повтора или одному ДЦР на один фибриллярный центр [29]. Принимая во внимание, что CRISPR/Cas9 индуцирует разрывы преимущественно в активно транскрибирующихся регионах [82], можно предполагать, что репрессирующий потенциал одного ДЦР может быть ограничен одним фибриллярным центром.

Показано также, что повреждения, индуцируемые лишь в части рибосомных повторов, провоцируют скорее локальную репрессию в поврежденной области, чем глобальную репрессию целого ядрышка. Так, с помощью эндонуклеазы AsiSI, которая индуцирует разрывы в меньшем количестве рибосомных повторов, чем I-PpoI или CRISPR/Cas9, установили, что лишь некоторая доля рибосомных повторов одного ядрышка оказывается репрессированной и перемещается в кепы, в то время как оставшаяся часть неповрежденных повторов продолжает транскрибироваться внутри ядрышка [65]. Недавно была предпринята попытка изучения реакции ядрышка на локальные повреждения рДНК, индуцированные микропучками ионов углерода [58]. Этот подход позволяет сфокусировать излучение в точке диаметром не более 1 мкм и облучать не все ядрышко, а лишь небольшую внутриядрышковую зону. Варьируя количество ионов в пучке, можно индуцировать от 0.2 до 20 ДЦР/мкм. С помощью этого подхода показано, что независимо от количества ДЦР транскрипционная репрессия происходит исключительно в зоне облучения и полностью совпадает с фосфорилированной формой H2AX, являющейся маркером ДЦР. При этом не обнаружено крупномасштабной транскрипционной репрессии и ядрышковой реорганизации [58].

Вероятность глобальной транскрипционной репрессии ядрышка коррелирует, по всей видимости, с количеством индуцированных в нем повреждений. Не исключено и распространение репрессии *in cis* от одного ДЦР на несколько соседних рибосомных повторов. Тем не менее, этот эффект пространственно ограничен, предположительно одним фибриллярным центром, что не позволяет локальному повреждению спровоцировать лавинообразную транскрипционную репрессию всего массива рДНК.

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ РЕПРЕССИЯ И ФОРМИРОВАНИЕ ЯДРЫШКОВЫХ КЕПОВ

Ингибирование ядрышковой транскрипции обычно коррелирует с реорганизацией ядрышек с образованием ядрышковых кепов, которые формируются как при прямом ингибировании РНК-полимеразы I ACD, так и при ATM/ATR-зависимой репрессии в условиях повреждения рДНК. При этом активные формы ATM и ATR локализуются непосредственно в кепах, а ингибирование киназ полностью блокирует их формирование с сохранением количества индуцированных в рДНК повреждений [29–31, 59]. Механизм формирования кепов вызывает много вопросов. Существуют две гипотезы, объясняющие этот механизм. Первая из них предполагает пассивный процесс, основанный на изменении свойств жидкой фазы ядрышек в условиях репрессии транскрипции. В активно транскрибирующем ядрышке фибриллярный центр и плотный фибриллярный компонент представлены в виде капель, слипание которых между собой ограничено за счет активной транскрипции и присутствия РНК. Остановка транскрипции приводит к локальному истощению компонента РНК, в результате чего капельные свойства компонентов фибриллярного центра начинают возобладать, что и приводит к их сливанию, агрегации и пассивной транслокации к периферии ядрышка [49, 83]. В соответствии с этой идеей формирование кепов обусловлено ингибированием транскрипции. Вторая гипотеза предполагает активное перемещение рДНК при участии моторных механизмов клетки. При ин-

дукции повреждений рДНК эндонуклеазой AsiSI транслокация части поврежденных повторов в кепы осуществляется за счет комплекса LINK (комплекс, связывающий ядерную ламину и цитоскелет) и актиновых филаментов [65], т.е. тех же факторов, которые, согласно ряду данных, обеспечивают перемещение и кластеризацию ДЦР в других геномных локусах [84–86]. Однако такая LINK/актинзависимая транслокация происходила только в S- и G2-фазах клеточного цикла, что указывало на зависимость этого процесса от специфики репарации разрывов, индуцированных AsiSI [65].

Таким образом, образование кепов может быть обусловлено сразу несколькими факторами. Например, при действии ACD, ионизирующей радиации, I-PpoI или CRISPR/Cas9, когда репрессии подвергается большинство рибосомных повторов, формирование кепов является прямым следствием репрессии транскрипции и обусловлено лишь силами LLPS. Если же поврежденной оказывается лишь небольшая доля повторов (как в случае эндонуклеазы AsiSI), и сил LLPS недостаточно, то транслокацию могут обеспечить LINK и актин. Однако в этом случае эффективность транслокации будет определяться типом повреждений и, как следствие, типом и скоростью их репарации.

Считается, что образование ядрышковых кепов решает две основные задачи. Во-первых, обеспечивает пространственное разделение рДНК, происходящей из разных хромосом, для предотвращения межхромосомной аберрантной рекомбинации. Во-вторых, обеспечивает собственно репарацию рДНК. Некоторые сигналы и факторы репарации (включая факторы HRR) при разрывах рДНК не обнаруживаются до тех пор, пока не образуются ядрышковые кепы [87]. К таким факторам относятся, например, белки MDC1, 53BP1 и BRCA1 [29, 87]. В настоящее время точная причина этого не установлена. Предполагается, что у этих белков могут отсутствовать необходимые домены, обеспечивающие их совместимость с жидкой фазой внутри ядрышка [49]. В то же время некоторые из этих белков привлекаются в сайт повреждений за счет модификаций гистонов, в частности фосфорилирования H2AX [88]. Как известно, рибосомные гены имеют низкую плотность нуклеосом, поэтому отсутствие перечисленных белков репарации внутри ядрышка также может отражать слабый уровень ответа на повреждение ДНК. С этой точки зрения формирование кепов необходимо не столько для обеспечения репарации, сколько для амплификации репарационного сигнального каскада.

РЕПАРАЦИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В ЯДРЫШКЕ

Репарация ДЦР в рибосомных генах, как и в остальных областях генома, происходит с помощью двух основных путей: NHEJ и HRR. Репарация по типу негомологичного соединения концов начинается с распознавания ДЦР гетеродимером Ku70-Ku80. Он выступает в качестве платформы для остальных факторов репарации, включая нуклеазы, полимеразы и лигазы. Комплекс Ku70-Ku80 связывается с киназой DNA-PKcs, что приводит к изменению ее конформации и активации. В дальнейшем к месту разрыва привлекается комплекс XLF/XRCC4/ДНК-лигаза IV, который обеспечивает лигирование концов ДНК. При индукции повреждений с помощью I-PpoI гетеродимер Ku70-80 связывается с рДНК еще внутри ядрышка задолго до формирования кепов [89]. Химическое ингибирование или нокдаун DNA-PK, а также нокдаун некоторых факторов NHEJ значительно повышают количество ДЦР, индуцированных в рДНК эндонуклеазами I-PpoI и AsiSI. Кроме того, отсутствие факторов NHEJ усугубляет индуцируемую I-PpoI и AsiSI репрессию транскрипции [59, 65]. Это явно указывает на функциональную зависимость репарации рДНК от NHEJ.

В ядрышковых кепах отсутствуют факторы NHEJ (за исключением 53BP1) [87]. При этом большинство факторов HRR, таких как RPA, MDC1, Rad51, BRCA1, наоборот, рекрутируются преимущественно в ядрышковые кепы. Именно поэтому считается, что HRR-репарация наиболее активна в кепах. Репарацию этим способом можно разделить на три основных этапа. На первом этапе с разрывом связывается комплекс MRE11–RAD50–NBS1 (MRN), нуклеазы Exo1, Dna2, CtIP и хеликаза BLM. Эти белки необходимы для резекции концов ДНК и формирования одноцепочечных участков, которые немедленно покрывает белок RPA. На втором этапе RPA замещается рекомбиназой RAD51 с образованием нуклеопротеинового филамента. Известно, что RPA обладает высокой аффинностью к оцДНК, поэтому для его замещения на RAD51 требуется участие специальных белков-медиаторов, один из которых BRCA1. Далее происходит поиск гомологии и инвазия репарируемой цепи ДНК в гомологичную цепь с образованием замещающей петли и структуры Холлидея. На третьем этапе синтезируется поврежденный участок ДНК [88].

Известно, что HRR реализуется преимущественно в S- и G2-фазах клеточного цикла, что обусловлено наличием сестринской хроматиды. Действительно, при индукции повреждений рДНК с помощью нуклеаз I-PpoI и AsiSI факторы HRR локализуются в ядрышковых кепах в основном в клетках в фазах S/G2 [30, 65]. Удивительно, но при репарации повреждений, индуцированных

CRISPR/Cas9, факторы HRR локализуются в кепах, даже если клетки находятся в G1-фазе, где еще нет сестринских хроматид. Предполагается, что в этом случае неповрежденные повторы рДНК могут служить матрицей для гомологичной рекомбинации *in cis*. Таким образом выбор HRR-репарации в рДНК может быть обусловлен не столько фазой клеточного цикла, сколько спецификой повреждения. I-PpoI и AsiSI вносят простые разрывы, которые быстро репарируются, и относительно небольшое их количество может быть восстановлено NHEJ непосредственно внутри ядрышка до момента транскрипционной репрессии и формирования кепов. Разрывы, индуцируемые CRISPR/Cas9, более сложные, они обладают относительно медленной кинетикой восстановления (до 10 ч) [90]. В этом случае NHEJ оказывается недостаточно, и рДНК перемещается в ядрышковые кепы, где репарация продолжается уже с помощью HRR [87]. Таким образом, выбор между путями репарации в рДНК может быть обусловлен, в первую очередь, типом и сложностью повреждения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основная функция ядрышка – крупнейшего субъядерного компартмента – биосинтез рибосом, который является одним из наиболее энергетически затратных метаболических процессов. Своевременная регуляция транскрипции в ядрышке необходима, во-первых, для поддержания стабильности рДНК при ее повреждении, а, во-вторых, для перераспределения энергетических ресурсов, обеспечивающих клеточный гомеостаз в условиях стресса. Полученные нами и другими исследовательскими группами результаты подтверждают, что ядрышко и РНК-полимераза I – это многофункциональные сенсоры клеточного стресса. Уровень транскрипции генов РНК-полимеразой I намного выше уровня транскрипции РНК-полимеразой II, что делает ядрышко более чувствительным к разным типам стрессовых факторов. Ядрышко-специфичный ответ на повреждение ДНК может запускать различные пути клеточного ответа на стресс. Активация ATR и ATM может приводить к активации p53 и киназ, регулирующих клеточный цикл, в результате чего индуцируется арест пролиферации либо программы клеточной смерти. Интересно, что остановка транскрипции в рДНК сама по себе может активировать p53. Так, остановка транскрипции в ядрышке приводит к высвобождению рибосомных белков, которые подавляют MDM2, что приводит к активации p53. Структурные изменения ядрышка вместе с ингибированием РНК-полимеразы I могут индуцировать перераспределение белков ядрышка (B23, фибрилларин, нуклеолин), которые участвуют в клеточном ответе на стресс. Тем не менее, несмотря на долгую историю исследований ядрышка, мы все еще далеки от полного понимания его функциональной роли в качестве сенсора клеточного стресса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-00-00098) и Российского научного фонда (грант № 19-74-10009).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pfeiffer P., Goedecke W., Obe G. (2000) Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*. **15**, 289–302.
2. García-Muse T., Aguilera A. (2016) Transcription-replication conflicts: how they occur and how they are resolved. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. **17**, 553–563.
3. Ganem N.J., Pellman D. (2012) Linking abnormal mitosis to the acquisition of DNA damage. *J. Cell. Biol*. **199**, 871–881.
4. Lindahl T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. **362**, 709–715.
5. Sonoda E., Morrison C., Yamashita Y.M., Takata M., Takeda S. (2001) Reverse genetic studies of homologous DNA recombination using the chicken B-lymphocyte line, DT40. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci*. **356**, 111–117.
6. Vilenchik M.M., Knudson A.G. (2003) Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 12871–12876.
7. Jackson S.P., Bartek J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. **461**, 1071–1078.
8. Bartkova J., Horejsí Z., Koed K., Krämer A., Tort F., Zieger K., Guldberg P., Sehested M., Nesland J.M., Lukas C., Ørntoft T., Lukas J., Bartek J. (2005) DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*. **434**, 864–870.
9. Harper J.W., Elledge S.J. (2007) The DNA damage response: ten years after. *Mol. Cell*. **28**, 739–745.
10. Ceccaldi R., Rondinelli B., D'Andrea A.D. (2016) Repair pathway choices and consequences at the double-strand break. *Trends Cell Biol*. **26**, 52–64.
11. Mladenov E., Magin S., Soni A., Iliakis G. (2016) DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: cell cycle and proliferation-dependent regulation. *Semin. Cancer Biol*. **37–38**, 51–64.
12. Clouaire T., Legube G. (2015) DNA double strand break repair pathway choice: a chromatin based decision? *Nucleus*. **6**, 107–113.
13. Bzymek M., Lovett S.T. (2001) Instability of repetitive DNA sequences: the role of replication in multiple

mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 8319–8325.

14. Durkin S.G., Glover T.W. (2007) Chromosome fragile sites. *Annu. Rev. Genet*. **41**, 169–192.
15. Crosetto N., Mitra A., Silva M.J., Bienko M., Dojer N., Wang Q., Karaca E., Chiarle R., Skrzypczak M., Ginalski K., Pasero P., Rowicka M., Dikic I. (2013) Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing. *Nat. Methods*. **10**, 361–365.
16. Lensing S.V., Marsico G., Hänsel-Hertsch R., Lam E.Y., Tannahill D., Balasubramanian S. (2016) DSB capture: *in situ* capture and sequencing of DNA breaks. *Nat. Methods*. **13**, 855–857.
17. Mourad R., Ginalski K., Legube G., Cuvier O. (2018) Predicting double-strand DNA breaks using epigenome marks or DNA at kilobase resolution. *Genome Biol*. **19**, 34.
18. Tchurikov N.A., Yudkin D.V., Gorbacheva M.A., Kulemzina A.I., Grischenko I.V., Fedoseeva D.M., Sosin D.V., Kravatsky Y.V., Kretova O.V. (2016) Hot spots of DNA double-strand breaks in human rDNA units are produced *in vivo*. *Sci. Rep*. **6**, 25866.
19. Lindström M.S., Jurada D., Bursac S., Orsolic I., Bartek J., Volarevic S. (2018) Nucleolus as an emerging hub in maintenance of genome stability and cancer pathogenesis. *Oncogene*. **37**, 2351–2366.
20. Santos-Pereira J.M., Aguilera A. (2015) R loops: new modulators of genome dynamics and function. *Nat. Rev. Genet*. **16**, 583–597.
21. Aguilera A., García-Muse T. (2012) R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability. *Mol. Cell*. **46**, 115–124.
22. Sollier J., Cimprich K.A. (2015) Breaking bad: R-loops and genome integrity. *Trends Cell. Biol*. **25**, 514–522.
23. Chastain M., Zhou Q., Shiva O., Fadri-Moskwik M., Whitmore L., Jia P., Dai X., Huang C., Ye P., Chai W. (2016) Human CST facilitates genome-wide RAD51 recruitment to GC-rich repetitive sequences in response to replication stress. *Cell Rep*. **16**, 1300–1314.
24. Dehé P.-M., Gaillard P.-H.L. (2017) Control of structure-specific endonucleases to maintain genome stability. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. **18**, 315–330.
25. Rhodes D., Lipps H.J. (2015) G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucl. Acids Res*. **43**, 8627–8637.
26. Stults D.M., Killen M.W., Williamson E.P., Hourigan J.S., Vargas H.D., Arnold S.M., Moscow J.A., Pierce A.J. (2009) Human rRNA gene clusters are recombinational hotspots in cancer. *Cancer Res*. **69**, 9096–9104.
27. Hallgren J., Pietrzak M., Rempala G., Nelson P.T., Hetman M. (2014) Neurodegeneration-associated instability of ribosomal DNA. *Biochim. Biophys. Acta*. **1842**, 860–868.
28. Diesch J., Hannan R.D., Sanij E. (2014) Perturbations at the ribosomal genes loci are at the centre of cellular dysfunction and human disease. *Cell. Biosci*. **4**, 43.
29. Korsholm L.M., Gál Z., Lin L., Quevedo O., Ahmad D.A., Dulina E., Luo Y., Bartek J., Larsen D.H. (2019) Double-strand breaks in ribosomal RNA genes activate a distinct signaling and chromatin response to facilitate nucleolar restructuring and repair. *Nucl. Acids Res*. **47**, 8019–8035.
30. Mooser C., Symeonidou I.E., Leimbacher P.A., Ribeiro A., Shorrocks A.K., Jungmichel S., Larsen S.C., Knechtle K., Jasrotia A., Zurbriggen D., Jeanrenaud A., Leikauf C., Fink D., Nielsen M.L., Blackford A.N., Stucki M. (2020) Treacle controls the nucleolar response to rDNA breaks via TOPBP1 recruitment and ATR activation. *Nat. Commun*. **11**, 123.
31. Velichko A.K., Petrova N.V., Luzhin A.V., Strelkova O.S., Ovsyannikova N., Kireev I.I., Petrova N.V., Razin S.V., Kantidze O.L. (2019) Hypoosmotic stress induces R loop formation in nucleoli and ATR/ATM-dependent silencing of nucleolar transcription. *Nucl. Acids Res*. **47**, 6811–6825.
32. Larsen D.H., Hari F., Clapperton J.A., Gwerder M., Gutsche K., Altmeyer M., Jungmichel S., Toledo L.I., Fink D., Rask M.B., Grøfte M., Lukas C., Nielsen M.L., Smerdon S.J., Lukas J., Stucki M. (2014) The NBS1-Treacle complex controls ribosomal RNA transcription in response to DNA damage. *Nat. Cell. Biol*. **16**, 792–803.
33. Sakai K., Ohta T., Minoshima S., Kudoh J., Wang Y., de Jong P.J., Shimizu N. (1995) Human ribosomal RNA gene cluster: identification of the proximal end containing a novel tandem repeat sequence. *Genomics*. **26**, 521–526.
34. Gonzalez I.L., Sylvester J.E. (1995) Complete sequence of the 43-kb human ribosomal DNA repeat: analysis of the intergenic spacer. *Genomics*. **27**, 320–328.
35. Stults D.M., Killen M.W., Pierce H.H., Pierce A.J. (2008) Genomic architecture and inheritance of human ribosomal RNA gene clusters. *Genome Res*. **18**, 13–18.
36. Gibbons J.G., Branco A.T., Godinho S.A., Yu S., Lemos B. (2015) Concerted copy number variation balances ribosomal DNA dosage in human and mouse genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **112**, 2485–2490.
37. McStay B., Grummt I. (2008) The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol*. **24**, 131–157.
38. Grummt I., Pikaard C.S. (2003) Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. **4**, 641–649.
39. Russell J., Zomerdijk J.C. (2005) RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem. Sci*. **30**, 87–96.
40. Miller O.L., Jr., Beatty B.R. (1969) Visualization of nucleolar genes. *Science*. **164**, 955–957.
41. Olson M.O., Dundr M. (2005) The moving parts of the nucleolus. *Histochem. Cell. Biol*. **123**, 203–216.
42. Maiser A., Dillinger S., Längst G., Schermelleh L., Leonhardt H., Németh A. (2020) Super-resolution in situ analysis of active ribosomal DNA chromatin organization in the nucleolus. *Sci. Rep*. **10**, 7462.
43. Yao R.W., Xu G., Wang Y., Shan L., Luan P.F., Wang Y., Wu M., Yang L.Z., Xing Y.H., Yang L., Chen L.L. (2019) Nascent pre-rRNA sorting via phase separation drives the assembly of dense fibrillar components in the human nucleolus. *Mol. Cell*. **76**, 767–783 e711.

44. Raska I., Shaw P.J., Cmarko D. (2006) Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr. Opin. Cell. Biol*. **18**, 325–334.

45. Banani S.F., Lee H.O., Hyman A.A., Rosen M.K. (2017) Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. **18**, 285–298.

46. Разин С.В., Гаврилов А.А. (2020) Роль разделения жидких фаз в компартментализации клеточного ядра и пространственной организации генома. *Биохимия*. **85**, 755–762.

47. Mangan H., Gailín M., McStay B. (2017) Integrating the genomic architecture of human nucleolar organizer regions with the biophysical properties of nucleoli. *FEBS J*. **284**, 3977–3985.

48. Brangwynne C.P., Mitchison T.J., Hyman A.A. (2011) Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, 4334–4339.

49. Feric M., Vaidya N., Harmon T.S., Mitrea D.M., Zhu L., Richardson T.M., Kriwacki R.W., Pappu R.V., Brangwynne C.P. (2016) Coexisting liquid phases underlie nucleolar subcompartments. *Cell*. **165**, 1686–1697.

50. Reynolds R.C., Montgomery P.O., Hughes B. (1964) Nucleolar "caps" produced by actynomycin D. *Cancer Res*. **24**, 1269–1277.

51. Zhang Y., Lu H. (2009) Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer Cell*. **16**, 369–377.

52. Velichko A.K., Petrova N.V., Razin S.V., Kantidze O.L. (2015) Mechanism of heat stress-induced cellular senescence elucidates the exclusive vulnerability of early S-phase cells to mild genotoxic stress. *Nucl. Acids Res*. **43**, 6309–6320.

53. Zhao Z., Dammert M.A., Hoppe S., Bierhoff H., Grummt I. (2016) Heat shock represses rRNA synthesis by inactivation of TIF-IA and lncRNA-dependent changes in nucleosome positioning. *Nucl. Acids Res*. **44**, 8144–8152.

54. Kruhlak M., Crouch E.E., Orlov M., Montaño C., Gorski S.A., Nussenzweig A., Misteli T., Phair R.D., Casellas R. (2007) The ATM repair pathway inhibits RNA polymerase I transcription in response to chromosome breaks. *Nature*. **447**, 730–734.

55. Iarovaia O.V., Minina E.P., Sheval E.V., Onichtchouk D., Dokudovskaya S., Razin S.V., Vassetzky Y.S. (2019) Nucleolus: a central hub for nuclear functions. *Trends Cell. Biol*. **29**, 647–659.

56. Boulon S., Westman B.J., Hutten S., Boisvert F.M., Lamond A.I. (2010) The nucleolus under stress. *Mol. Cell*. **40**, 216–227.

57. Moore H.M., Bai B., Boisvert F.M., Latonen L., Rantanen V., Simpson J.C., Pepperkok R., Lamond A.I., Laiho M. (2011) Quantitative proteomics and dynamic imaging of the nucleolus reveal distinct responses to UV and ionizing radiation. *Mol. Cell. Proteomics*. **10**, M111 009241.

58. Siebenwirth C., Greubel C., Drexler G.A., Reindl J., Walsh D.W.M., Schwarz B., Sammer M., Baur I., Pospiech H., Schmid T.E., Dollinger G., Friedl A.A. (2019) Local inhibition of rRNA transcription without nucleolar segregation after targeted ion irradiation of the nucleolus. *J. Cell Sci*. **132**, jcs232181.

59. Harding S.M., Boiarsky J.A., Greenberg R.A. (2015) ATM dependent silencing links nucleolar chromatin reorganization to DNA damage recognition. *Cell. Rep*. **13**, 251–259.

60. van Sluis M., McStay B. (2015) A localized nucleolar DNA damage response facilitates recruitment of the homology-directed repair machinery independent of cell cycle stage. *Genes Dev*. **29**, 1151–1163.

61. Warmerdam D.O., van den Berg J., Medema R.H. (2016) Breaks in the 45S rDNA lead to recombination-mediated loss of repeats. *Cell Rep*. **14**, 2519–2527.

62. Ellison E.L., Vogt V.M. (1993) Interaction of the intron-encoded mobility endonuclease I-PpoI with its target site. *Mol. Cell. Biol*. **13**, 7531–7539.

63. Monnat R.J., Jr., Hackmann A.F., Cantrell M.A. (1999) Generation of highly site-specific DNA double-strand breaks in human cells by the homing endonucleases I-PpoI and I-CreI. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **255**, 88–93.

64. Berkovich E., Monnat R.J., Jr., Kastan M.B. (2007) Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair. *Nat. Cell. Biol*. **9**, 683–690.

65. Marnef A., Finoux A.L., Arnould C., Guillou E., Daburon V., Rocher V., Mangeat T., Mangeot P.E., Ricci E.P., Legube G. (2019) A cohesin/HUSH- and LINC-dependent pathway controls ribosomal DNA double-strand break repair. *Genes Dev*. **33**, 1175–1190.

66. Clouaire T., Rocher V., Lashgari A., Arnould C., Aguirrebengoa M., Biernacka A., Skrzypczak M., Aymard F., Fongang B., Dojer N., Iacovoni J.S., Rowicka M., Ginalski K., Côté J., Legube G. (2018) Comprehensive mapping of histone modifications at DNA double-strand breaks deciphers repair pathway chromatin signatures. *Mol. Cell*. **72**, 250–262 e256.

67. Kantidze O.L., Velichko A.K., Luzhin A.V., Petrova N.V., Razin S.V. (2018) Synthetically lethal interactions of ATM, ATR, and DNA-PKcs. *Trends Cancer*. **4**, 755–768.

68. Shiloh Y., Ziv Y. (2013) The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. **14**, 197–210.

69. Kuhn A., Gottlieb T.M., Jackson S.P., Grummt I. (1995) DNA-dependent protein kinase: a potent inhibitor of transcription by RNA polymerase I. *Genes Dev*. **9**, 193–203.

70. Calkins A.S., Iglehart J.D., Lazaro J.-B. (2013) DNA damage-induced inhibition of rRNA synthesis by DNA-PK and PARP-1. *Nucl. Acids Res*. **41**, 7378–7386.

71. Matsuoka S., Ballif B.A., Smogorzewska A., McDonald E.R., 3rd, Hurov K.E., Luo J., Bakalarski C.E., Zhao Z., Solimini N., Lerenthal Y., Shiloh Y., Gygi S.P., Elledge S.J. (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. **316**, 1160–1166.

72. Larsen D.H., Stucki M. (2016) Nucleolar responses to DNA double-strand breaks. *Nucl. Acids Res*. **44**, 538–544.

73. Trainor P.A., Dixon J., Dixon M.J. (2009) Treacher Collins syndrome: etiology, pathogenesis and prevention. *Eur. J. Hum. Genet*. **17**, 275–283.

74. Ciccia A., Huang J.-W., Izhar L., Sowa M.E., Harper J.W., Elledge S.J. (2014) Treacher Collins syndrome TCOF1 protein cooperates with NBS1 in the DNA damage response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**, 18631–18636.

75. Sokka M., Rilla K., Miinalainen I., Pospiech H., Syväoja J.E. (2015) High levels of TopBP1 induce ATR-dependent shut-down of rRNA transcription and nucleolar segregation. *Nucl. Acids Res*. **43**, 4975–4989.

76. Pefani D.E., Tognoli M.L., Pirincci Ercan D., Gorgoulis V., O'Neill E. (2018) MST2 kinase suppresses rDNA transcription in response to DNA damage by phosphorylating nucleolar histone H2B. *EMBO J*. **37**, e98760.

77. Iannelli F., Galbiati A., Capozzo I., Nguyen Q., Magnuson B., Michelini F., D'Alessandro G., Cabrini M., Roncador M., Francia S., Crosetto N., Ljungman M., Carninci P., d'Adda di Fagagna F. (2017) A damaged genome's transcriptional landscape through multilayered expression profiling around *in situ*-mapped DNA double-strand breaks. *Nat. Commun*. **8**, 15656.

78. Pankotai T., Bonhomme C., Chen D., Soutoglou E. (2012) DNA-PKcs-dependent arrest of RNA polymerase II transcription in the presence of DNA breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol*. **19**, 276–282.

79. Ayrapetov M.K., Gursoy-Yuzugullu O., Xu C., Xu Y., Price B.D. (2014) DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**, 9169–9174.

80. Gong F., Clouaire T., Aguirrebengoa M., Legube G., Miller K.M. (2017) Histone demethylase KDM5A regulates the ZMYND8-NuRD chromatin remodeler to promote DNA repair. *J. Cell. Biol*. **216**, 1959–1974.

81. Kruhlak M.J., Celeste A., Dellaire G., Fernandez-Capetillo O., Müller W.G., McNally J.G., Bazett-Jones D.P., Nussenzweig A. (2006) Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J. Cell. Biol*. **172**, 823–834.

82. Verkuijl S.A., Rots M.G. (2019) The influence of eukaryotic chromatin state on CRISPR-Cas9 editing efficiencies. *Curr. Opin. Biotechnol*. **55**, 68–73.

83. Falahati H., Pelham-Webb B., Blythe S., Wieschaus E. (2016) Nucleation by rRNA dictates the precision of nucleolus assembly. *Curr. Biol*. **26**, 277–285.

84. Aymard F., Bugler B., Schmidt C.K., Guillou E., Caron P., Briois S., Iacovoni J.S., Daburon V., Miller K.M., Jackson S.P., Legube G. (2014) Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol*. **21**, 366–374.

85. Caridi C.P., D'Agostino C., Ryu T., Zapotoczny G., Delabaere L., Li X., Khodaverdian V.Y., Amaral N., Lin E., Rau A.R., Chiolo I. (2018) Nuclear F-actin and myosins drive relocalization of heterochromatic breaks. *Nature*. **559**, 54–60.

86. Lottersberger F., Karssemeijer R.A., Dimitrova N., de Lange T. (2015) 53BP1 and the LIN–C complex promote microtubule-dependent DSB mobility and DNA repair. *Cell*. **163**, 880–893.

87. van Sluis M., McStay B. (2019) Nucleolar DNA double-strand break responses underpinning rDNA genomic stability. *Trends Genet*. **35**, 743–753.

88. Blackford A.N., Jackson S.P. (2017) ATM, ATR, and DNA-PK: The trinity at the heart of the DNA damage response. *Mol. Cell*. **66**, 801–817.

89. Britton S., Coates J., Jackson S.P. (2013) A new method for high-resolution imaging of Ku foci to decipher mechanisms of DNA double-strand break repair. *J. Cell. Biol*. **202**, 579–595.

90. Brinkman E.K., Chen T., de Haas M., Holland H.A., Akhtar W., van Steensel B. (2018) Kinetics and fidelity of the repair of Cas9-induced double-strand DNA breaks. *Mol. Cell*. **70**, 801–813 e806.

DNA DAMAGE RESPONSE IN NUCLEOLUS

A. K. Velichko[1, 2, 3], S. V. Razin[1], and O. L. Kantidze[1, *]

[1]*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

[2]*Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119146 Russia*

[3]*Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

**e-mail: kantidze@gmail.com*

Nucleoli, the largest subnuclear compartments, are formed around arrays of ribosomal gene repeats transcribed by RNA polymerase I. The primary function of nucleoli is ribosome biogenesis. Specific DNA damage response mechanisms exist to maintain the genomic stability of ribosomal repeats. Here, we provide a snapshot of our current understanding of processes involved in nucleolar DNA damage response. We discuss structure and function of ribosomal repeats, techniques developed for studying DNA damage response in nucleoli, as well as molecular mechanisms of DNA damage-induced repression of nucleolar transcription and nucleoli reorganization.

Keywords: DNA repair, transcription, nucleolus, ribosomal DNA

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 2, с. 223–242

ОБЗОРЫ

УДК 575.224.4:577.123.5:577.151.4

GO-СИСТЕМА: ПУТЬ РЕПАРАЦИИ ДНК ДЛЯ БОРЬБЫ С ОКИСЛИТЕЛЬНЫМИ ПОВРЕЖДЕНИЯМИ

© 2021 г. А. В. Ендуткин[a, *], Д. О. Жарков[a, b, **]

[a] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия*

[b] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия*

**e-mail: aend@niboch.nsc.ru*

***e-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru*

Поступила в редакцию 02.10.2020 г.
После доработки 14.10.2020 г.
Принята к публикации 20.10.2020 г.

GO-система, входящая в систему эксцизионной репарации оснований ДНК, необходима для корректной репарации 8-оксогуанина (oxoG) – одного из самых распространенных окислительных повреждений ДНК. Способность oxoG образовывать неканоническую пару oxoG:A делает это основание высокомутагенным, а в его репарации участвуют два фермента – 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза (Fpg, или MutM у бактерий, OGG1 у эукариот), удаляющая oxoG из пар oxoG:C, и аденин-ДНК-гликозилаза (MutY у бактерий, MUTYH у эукариот), удаляющая A из пар oxoG:A для предотвращения возникновения мутаций. Третий фермент системы (MutT у бактерий, MTH1, или NUDT1 у эукариот) гидролизует 8-оксо-2'-дезоксигуанозинтрифосфат, предотвращая его включение в ДНК. Данные последних лет указывают на белки GO-системы как на многообещающие мишени для терапии онкологических и аутоиммунных заболеваний, а также бактериальных инфекций. В обзоре освещена структура и специфичность GO-системы бактерий и эукариот, ее уникальная роль в предотвращении мутаций.

Ключевые слова: повреждение ДНК, репарация ДНК, мутагенез, окислительный стресс, 8-оксогуанин, ДНК-гликозилазы, нуклеозидтрифосфатгидролазы

DOI: 10.31857/S0026898421020063

ВВЕДЕНИЕ

Существенную часть вредных последствий окислительного стресса составляет окисление нуклеиновых кислот и мононуклеотидов. Живые организмы имеют несколько линий защиты от окислительного стресса, которые в целом можно разделить на две категории: детоксикация оксидантов и репарация окислительных повреждений [1]. Наиболее важная часть последней группы – репарация ДНК, поскольку из всех биологических молекул только ДНК нельзя полностью разрушить и заменить другой копией при повреждении. Окислительные повреждения ДНК репарируются главным образом по пути эксцизионной репарации оснований. В каноническом варианте этого пути один из ферментов, относящихся к классу ДНК-N-гликозилаз, удаляет поврежденное основание, далее апурин-апиримидиновые (AP) эндонуклеазы гидролизуют ДНК по образовавшемуся AP-сайту, ДНК-полимераза включает один или несколько нормальных dNMP, и, в конечном итоге, разрыв лигируется (рис. 1) [2].

Среди десятков идентифицированных окислительных повреждений ДНК одно из наиболее частых – 7,8-дигидро-8-оксо-2'-дезоксигуанозин (oxoG) [3]. Это повреждение обладает высоким мутагенным потенциалом, обусловленным его амбивалентными кодирующими свойствами: oxoG легко образует стабильную хугстиновскую пару oxoG(*син*):A(*анти*), приводящую к характерным трансверсиям G:C → T:A [4, 5] (рис. 2).

Вскоре после открытия oxoG и обнаружения его мутагенности в клетках *Escherichia coli* нашли три фермента – Fpg (MutM), MutY и MutT, которые вместе препятствуют накоплению oxoG в ДНК [6, 7]. В совокупности эти ферменты были названы “GO-системой”. Впоследствии показали, что аналоги GO-системы существуют практически у всех живых организмов, в том числе у человека. Интерес к этому пути защиты от окислительных повреждений значительно возрос в последние годы после валидации белков GO-системы как терапевтических мишеней при онкологических и аутоиммунных заболеваниях [8–10] и обнаружения oxoG-зависимой сенсибилизации

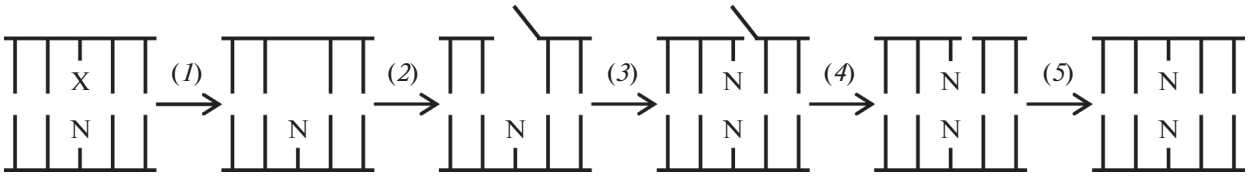


Рис. 1. Схема эксцизионной репарации оснований ДНК. ДНК-гликозилаза узнает и удаляет поврежденное основание (*1*). АР-эндонуклеаза расщепляет ДНК с 5'-стороны от АР-сайта (*2*). ДНК-полимераза включает неповрежденный дезоксирибонуклеотид (*3*). Дезоксирибофосфатлиаза удаляет оставшийся углеводный фрагмент (*4*). ДНК-лигаза восстанавливает целостность остова ДНК (*5*).

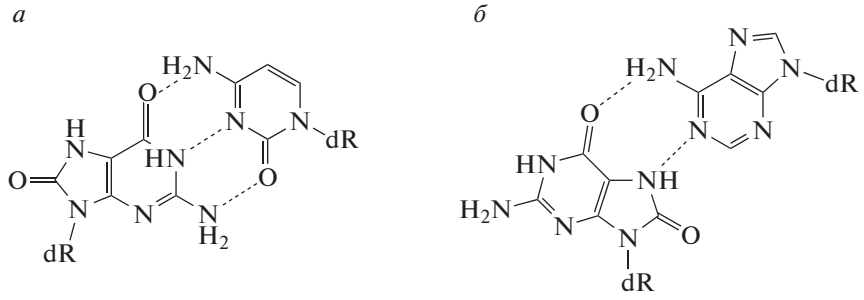


Рис. 2. Структура 8-оксогуанина и схема образуемых им пар oxoG:C по уотсон-криковскому типу (*а*) и oxoG:A по хугстиновскому типу (*б*).

бактерий к действию многих антибиотиков при окислительном стрессе [11–13]. После описания GO-системы в начале 1990-х гг. обнаружили гомологи некоторых белков, входящих в ее состав, выявили ее вариации у ряда организмов и открыли новые виды повреждений ДНК, потенциально репарируемых с помощью этой системы. В нашем обзоре описаны представления о GO-системе бактерий и эукариот, существующие на текущий момент.

КАНОНИЧЕСКАЯ GO-СИСТЕМА У *E. coli* И ЧЕЛОВЕКА: РЕПАРАЦИЯ 8-ОКСОГУАНИНА

Понятие о GO-системе было сформулировано на основе ряда биохимических и генетических экспериментов, направленных на изучение генов *mutM*, *mutT* и *mutY E. coli*, инактивация которых вызывает характерные спектры мутаций [6, 7]. Оказалось, что два из этих генов кодируют белки с ДНК-гликозилазной активностью. Фермент Fpg (MutM) удаляет oxoG из пар oxoG:C, которые образуются путем окисления G в ДНК либо при включении ДНК-полимеразами oxodGMP напротив C [14–16]. Если oxoG не будет удален до стадии репликации, то это может привести к неправильному включению dAMP напротив него, а удаление oxoG из полученной пары oxoG:A немедленно закрепит мутацию G:C → T:A (рис. 3*а*). По этой причине Fpg практически не проявляет активности в отношении субстратов oxoG:A. Вместо этого такие пары узнаются ДНК-гликозилазой MutY, которая удаляет из них нормальное основание A [6, 7, 17]. Далее в ходе репаративного синтеза ДНК напротив oxoG может включаться либо dCMP, либо dAMP; в первом случае Fpg имеет возможность корректно осуществить репарацию, во втором возможно повторение цикла репарации с участием MutY и ДНК-полимеразы (рис. 3*а*). Третий фермент системы, MutT, гидролизует oxodGTP до монофосфата, чтобы предотвратить включение oxoG в ДНК из пула окисленных нуклеотидов [18]. Такие события порождают характерные мутации A:T → C:G, возникающие при включении oxodGMP напротив A с последующей репарацией при помощи MutY (рис. 3*б*).

Функциональная кооперация ферментов Fpg, MutY и MutT подтверждена при изучении частоты и спектра мутаций в штаммах *E. coli* с дефицитом белков GO-системы [20, 21]. При этом при одновременной инактивации генов *fpg* и *mutY* скорость мутагенеза значительно превышает сумму эффектов инактивации каждого из этих генов по отдельности, в то время как делеция гена *mutT* действует аддитивным образом по отношению к *fpg* и *mutY*. При одновременной инактивации генов *fpg* и *mutY* резко возрастает количество трансверсий G → T, а при инактивации гена *mutT* – трансверсий A → C. Это полностью согласуется со специфичностью реакций, катализируемых соответствующими ферментами. Примечательно, что в долговременном эксперименте по эволюции культуры *E. coli* спонтанный гипермутаторный фенотип, обусловленный сдвигом рамки

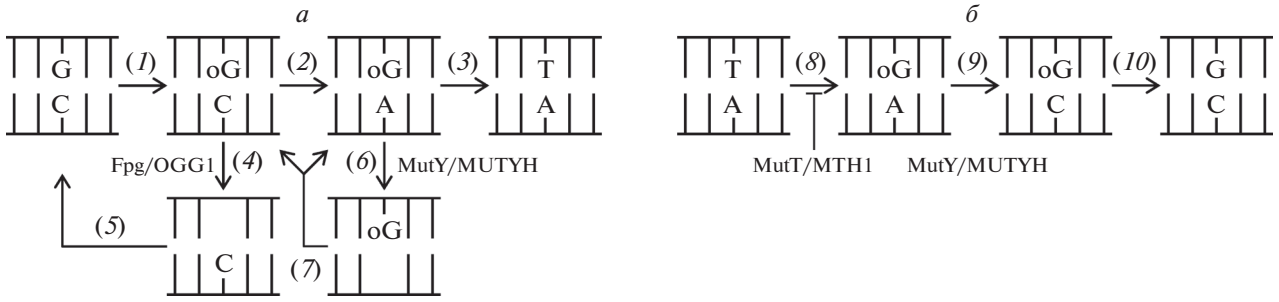


Рис. 3. Схема действия GO-системы (по [19]). В Fpg/MutY-зависимой части (*а*) при возникновении oxoG в ДНК (*1*) напротив него может включиться dAMP (*2*), что вызовет мутацию G → T (*3*). Fpg или OGG1 удаляют oxoG из пары oxoG:C (*5*), инициируя ее репарацию с восстановлением пары G:C (*5*). MutY или MUTYH удаляют A из пары oxoG:A (*6*), позволяя включение dCMP при репаративном синтезе (*7*) и повторение цикла репарации с участием Fpg/OGG1. В MutT-зависимой части (*б*) при окислении нуклеотидного пула MutT или MTH1 препятствуют включению oxodGMP в ДНК напротив A (*8*), что при репарации MutY/MUTYH (*9*) вело бы к мутации A → C (*10*).

считывания в гене *mutT*, компенсировался независимо возникающими мутациями, инактивирующими ген *mutY* [22]. Также показано, что инактивация генов *fpg* и *mutT* (по отдельности или совместно) приводит к повышению уровня oxoG в хромосомной ДНК *E. coli*, а введение плазмиды, экспрессирующей ген *fpg*, нормализует уровень oxoG в этих мутантных штаммах [20, 23].

GO-система у высших эукариот устроена так же, как и у бактерий, с одним важным отличием: роль 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы выполняет белок OGG1, не гомологичный белку Fpg и не имеющий с ним сходства на уровне третичной структуры. Белок OGG1 впервые обнаружен в дрожжах по способности кодирующего его гена комплементировать гипермутаторный фенотип штаммов *E. coli fpg mutY* [24], и независимо – как главный белок, способный связывать апуринизированную ДНК [25]. Вскоре по гомологии был клонирован ген *OGG1* человека [26–28]. Свойства эукариотических OGG1 очень похожи. OGG1 удаляет из ДНК только oxoG и 2,6-диамино-4-оксо-5-формамидопиримидин (FapyG, см. ниже) и обладает специфичностью к основанию напротив повреждения, даже большей, чем у Fpg, а эктопическая экспрессия гена *OGG1* комплементирует фенотип *E. coli fpg mutY* [26, 27, 29–31]. Трансгенные мыши с дефицитом гена *OGG1* жизнеспособны, но в их геномной ДНК повышено содержание oxoG и FapyG, с возрастом повышается также частота мутаций и заболеваемость раком [32–35].

Белки MUTYH и MTH1 (NUDT1) человека и высших эукариот гомологичны белкам MutY и MutT *E. coli*, соответственно, и выполняют те же функции [36, 37]. Субстратная специфичность MUTYH и MTH1 практически совпадает со специфичностью их бактериальных гомологов [38–40]. Как и следует ожидать в случае генов из одной эпистатической группы, у трансгенных мышей с комбинированным нокаутом двух генов GO-системы значительно увеличено число опухолей и наблюдается характерный спектр соматических мутаций, в том числе в протоонкогенах, с доминированием трансверсий G → T [41, 42]. Высокий уровень мутагенеза при нокауте всех трех генов GO-системы приводит к накоплению мутаций в клетках зародышевой линии и передаче их по наследству [43, 44].

Видно, что oxoG может узнаваться белками, принадлежащими к трем разным структурным суперсемействам: “спираль–два поворота–спираль” (Fpg), “спираль–шпилька–спираль” (OGG1) и NUDIX (MutT, MTH1 и oxoG-специфичный домен MutY). Интересно, что во всех этих случаях связывание oxoG в активном центре фермента происходит по-разному (рис. 4) и даже в структурах суперсемейства NUDIX с общей укладкой полипептидной цепи узнается разными элементами молекулы белка. Структурные аспекты узнавания oxoG подробно освещены в обзорах [19, 45].

Предполагается, что ферменты MutY/MUTYH, кроме своей непосредственной ДНК-гликозилазной функции, могут служить сенсорами окислительного стресса за счет железо-серных кластеров типа $[Fe_4S_4]^{2+}$ в их структуре. Чувствительность MutY/MUTYH зависит от присутствия электрон-дефицитных повреждений в ДНК. Согласно предложенному механизму, белок с восстановленным кластером связывается с ДНК и может отдавать электрон, который делокализуется в окружающей электрон-дефицитной π-системе. Сродство гликозилазы к ДНК при этом возрастает на несколько порядков, и комплекс MutY–ДНК служит сигналом присутствия окислительных повреждений [51–55].

ДНК-полимеразы формально не входят в GO-систему, однако их активность по отношению к субстратам, содержащим oxoG, во мно-

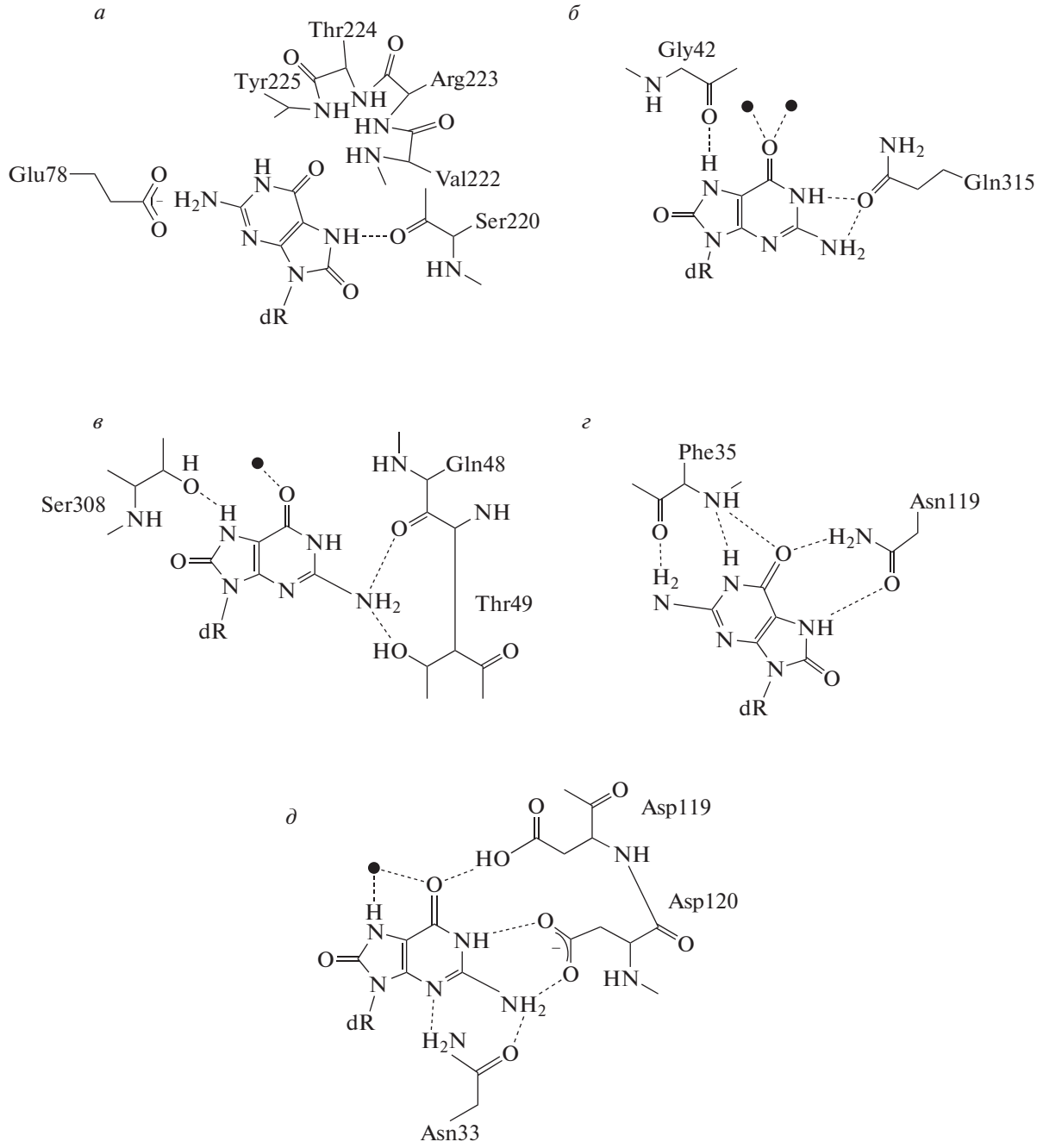


Рис. 4. Схема узнавания oxoG ферментами GO-системы. Приведены схемы взаимодействия oxoG с узнающими его центрами ферментов. *а* – Fpg *Geobacillus stearothermophilus* (код структуры в базе данных Protein Data Bank 1R2Y [46]), *б* – OGG1 человека (1EBM [47]), *в* – MutY *G. stearothermophilus* (1RRQ [48]), *г* – MutT *E. coli* (3A6T [49]), *д* – MTH1 человека (5GHI [50]). Черными точками отмечены молекулы воды, тесно связанные в белковой глобуле. Штриховыми линиями обозначены водородные связи; в случае Fpg атом O^6 образует две водородных связи с любыми двумя из четырех амидных групп пептидного остова петли Val222–Tyr225.

гом определяет мутагенность этого основания и эффективность работы GO-системы. Репликативные ДНК-полимеразы высших эукариот (α, δ и ε) предпочитают включать dAMP напротив oxoG [4, 56–59]. С другой стороны, репаративные полимеразы – ДНК-полимераза I *E. coli* и ДНК-полимеразы β и λ высших эукариот – гораздо лучше включают dCMP, чем dAMP при наличии в матрице oxoG [4, 56, 60, 61]. В цикле репарации, инициированном MUTYH, включение корректного dCMP напротив oxoG осуществляется преимущественно ДНК-полимеразой λ [62].

РЕПАРАЦИЯ GO-СИСТЕМОЙ ДРУГИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК

Из всех азотистых оснований ДНК гуанин обладает самым низким окислительно-восстановительным потенциалом и поэтому представляет собой основное место окисления ДНК. Однако oxoG далеко не единственный продукт окисления G. В процессах с участием радикала $HO^{\cdot}$ после его присоединения по C^8 пуриновая система может восстанавливаться с раскрытием имидазольного кольца и образованием формамидопиримидинового производного G (FapyG) [63]. Такая же реакция характерна и для аденина. Более того, oxoG может окисляться далее до 5-гуанидингидантоина (Gh), спироиминодигидантоина (Sp) и т.д. [64]. Относительные количества всех этих окислительных повреждений в ДНК живых клеток варьируют: окисленных производных oxoG в них в 10–100 раз меньше, чем oxoG [65, 66], а уровень FapyG сравним с уровнем oxoG или даже превосходит его [67, 68].

Насколько GO-система важна для предотвращения последствий возникновения таких окисленных оснований? Ответ на этот вопрос зависит прежде всего от кодирующих свойств этих оснований. В исследованиях *in vitro* фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I проявляет сходную специфичность при наличии FapyG и oxoG в матрице, включая dAMP со значительной частотой и эффективно удлиняя праймер с концевой парой A:FapyG [69]. Репликация плазмид, содержащих FapyG и oxoG, в клетках зеленой мартышки (COS-7) и человека (HEK293T) проходит со сходной частотой мутагенеза и спектром мутаций, характеризующимся преобладанием трансверсий G → T [70, 71]. Интересно, что в отличие от oxoG мутагенез FapyG в клетках человека обусловлен включением dAMP ДНК-полимеразой λ [71]. В клетках *E. coli* частота мутаций в плазмидной системе с FapyG ниже, чем с oxoG, однако спектр мутаций остается неизменным [72, 73]. Fapy-dGMP включается фрагментом Кленова напротив A, хотя примерно в 25 раз хуже, чем напротив C [74]. Таким образом, FapyG обладает теми же амбивалентными кодирующими свойствами, что и oxoG.

Удаление оснований FapyG ферментами Fpg и OGG1 было обнаружено практически сразу после открытия этих белков [16, 30, 75]. Способность Fpg, MutY и OGG1 к процессингу олигонуклеотидных субстратов, содержащих пары FapyG:C и FapyG:A, практически не отличается от их способности расщеплять такие же субстраты с oxoG, хотя в случае Fpg дискриминация основания напротив повреждения выражена менее явно, чем для oxoG [31, 76]. В экстрактах клеток мыши способность удалять FapyG зависит прежде всего от присутствия OGG1. Очевидно, FapyG, как и oxoG, служит субстратом для GO-системы.

Более сложная картина наблюдается в случае продуктов окисления oxoG. *In vitro* фрагмент Кленова включает напротив Gh и Sp как dAMP, так и dGMP, но не включает dCMP [77–79], а некоторые ДНК-полимеразы (α, β, ДНК-полимераза фага RB69) блокируются этими повреждениями [77, 80]. В клетках *E. coli* в плазмидной системе Gh вызывает в основном трансверсии G → C, а Sp – в равной мере G → T и G → C [81, 82], прохождение повреждения при этом обеспечивается ДНК-полимеразой V [83]. Поврежденный дезоксинуклеозидтрифосфат dSpTP используется фрагментом Кленова на 5 порядков менее эффективно по сравнению с dGTP, причем включение наблюдается только напротив C в матрице [84]. Что касается репарации, то Sp и Gh эффективно удаляются ферментом Fpg вне зависимости от основания напротив повреждения [85–87]. MutY связывается с ДНК, содержащей пары A/G:Sp/Gh, но не расщепляет их [85, 86], а в клетках *E. coli* отсутствие MutY не изменяет частоту и спектр мутаций в плазмидах, несущих остатки Sp или Gh [88]. OGG1 человека не удаляет из ДНК Sp и Gh, хотя они служат субстратами для OGG1 дрожжей [89]. В целом, специфичность ДНК-полимераз и ДНК-гликозилаз к окисленным производным oxoG говорит о том, что эти повреждения не входят в число биологических субстратов GO-системы.

БЕЛКИ, ГОМОЛОГИЧНЫЕ Fpg

Существует ряд белков, гомологичных Fpg, которые, по современным представлениям, не входят в GO-систему, хотя ранее предполагалось, что они могут играть роль “запасных” ферментов при отсутствии Fpg или OGG1. Так, эндонуклеаза VIII (Nei) *E. coli* [90, 91], котораая в основном расщепляет субстраты, содержащие окисленные пиримидиновые основания и формамидопиримидиновое производное A (FapyA) [90–93], способна с некоторой эффективностью удалять oxoG из олигонуклеотидных субстратов [93–95]. Однако такая активность не наблюдается на поврежденной высокомолекулярной ДНК [92]. В отличие от Fpg Nei не показывает предпочтения к основанию напротив повреждения [93, 95], а инактивация гена *nei* на фоне дефицита *fpg* и *mutY* незначительно увеличивает частоту трансверсий G → T [94], поэтому участие белка Nei в GO-системе маловероятно.

В клетках позвоночных и некоторых беспозвоночных описаны три белка, гомологичных Nei (NEI-Like) – NEIL1, NEIL2 и NEIL3, хотя в ходе эволюции эти белки были утрачены у многих животных [96–101]. По своей специфичности эти гомологи гораздо больше походят на Nei, чем на Fpg, они удаляют окисленные пиримидиновые основания гораздо лучше, чем oxoG [96, 98–104]. Нокаут гена *NEIL1* в клетках человека не приво-

дит к изменению частоты мутаций и их спектра [105]. Однако как эксперименты *in vitro*, так и анализ уровней разных окисленных оснований в геномной ДНК трансгенных мышей показывают, что белки NEIL участвуют в репарации FapyG [35, 96, 102–104, 106]. Также все белки NEIL весьма активны в отношении Sp и Gh [107–115]. Таким образом, белки NEIL, возможно, вносят вклад в репарацию FapyG в рамках GO-системы, но более вероятно, что основная их роль заключается в репарации продуктов окисления oxoG.

Геномы большинства растений и многих грибов содержат ген *OGG1* и один ген, кодирующий гомологичный Fpg белок MMH (MutM Homolog). Рекомбинантные белки OGG1 и MMH из *Arabidopsis thaliana* специфично связывают и расщепляют ДНК, содержащую пары oxoG:C, и проявляют гораздо меньшую активность в отношении пар oxoG:A [116–120]. Оба белка снижают количество окислительных повреждений в ядерной и митохондриальной ДНК *A. thaliana* [120] и частоту трансверсий G:C → T:A при эктопической продукции в репортерных штаммах *E. coli* [121]. Однако сравнение активности и субстратной специфичности обоих ферментов показывает, что OGG1 узнает преимущественно oxoG, в то время как MMH более специфичен в отношении FapyG, FapyA и окисленных производных oxoG [122–124]. Поскольку *A. thaliana* содержит функциональный белок MTH1 [125], а его геном – гомолог гена *MUTYH*, то можно ожидать, что GO-система *A. thaliana* и, скорее всего, других растений устроена аналогично этой системе у человека, а функции MMH сходны с функциями белков NEIL.

КАНОНИЧЕСКАЯ GO-СИСТЕМА И ЕЕ ВАРИАНТЫ У БАКТЕРИЙ

GO-система *E. coli* изучена достаточно подробно, тогда как о функциях и свойствах компонентов этой системы у других видов бактерий известно мало. Клонированы и в разной степени биохимически охарактеризованы гомологи Fpg из *Lactococcus lactis* [126–129], *Salmonella typhimurium* [130], *Thermus thermophilus* [131, 132], *Deinococcus radiodurans* [133], *Geobacillus stearothermophilus* [134–137], *Neisseria meningitidis* [138] и *Corynebacterium pseudotuberculosis* [139], свойства которых оказались типичными для Fpg. Частично охарактеризованы также свойства MutY из *G. stearothermophilus* [48], *N. meningitidis* [140], *Helicobacter pylori* [141], *Porphyromonas gingivalis* [142] и *C. pseudotuberculosis* [143, 144]. Наконец, изучены гомологи белка MutT *Mycobacterium tuberculosis*, *M. smegmatis* [145–147], *Bacillus subtilis* [148–150] и *Vibrio cholerae* [151]. У всех этих бактерий свойства MutY и MutT сходны со свойствами их гомологов у *E. coli*, что говорит о принципиальном сходстве GO-системы во всех этих организмах. Следует, однако, упомянуть, что в большинстве этих исследований для анализа функций белков *in vivo* использовали определение чувствительности к окислительному стрессу и частоты мутаций разных классов в клетках *E. coli*, экспрессирующих соответствующие гены в составе плазмид, что позволяет избежать работы с потенциально патогенными микроорганизмами, но не всегда отражает особенности реакции на окислительный стресс в клетках, из которых происходит чужеродный ген.

Присутствие полностью функциональной GO-системы с ее характерным антимутаторным паттерном экспериментально подтверждено *in vivo* в клетках *B. subtilis* [148, 150, 152], *Pseudomonas aeruginosa* [153, 154], *N. meningitidis* [138, 155, 156], *Staphylococcus aureus* [157] и *Caulobacter crescentus* [158, 159]. Функциональность Fpg показана также *in vivo* у *S. typhimurium* [130], а MutY – у *H. pylori* [141].

Для микобактерий характерна генетическая избыточность GO-системы: в их геномах обнаружены гомолог MutY, четыре гомолога MutT, а также два гомолога Fpg и еще два гомолога, относящихся к уникальным семействам в составе суперсемейства “спираль–два поворота–спираль”, которое объединяет белки Fpg, Nei, NEIL1–3 и MMH [160–166]. Это может отражать адаптацию микобактерий к выживанию в агрессивной среде (внутри макрофагов). Интересно, что инактивация генов GO-системы имеет разные последствия для чувствительности быстро делящихся клеток *M. smegmatis* и медленно делящихся *M. tuberculosis* к окислительному стрессу. В первом случае большее влияние оказывает инактивация *fpg*, а во втором – *mutY* [163, 167, 168]. Субстратная специфичность белков суперсемейства “спираль–два поворота–спираль” из *M. tuberculosis* и *M. smegmatis* сходна со специфичностью Fpg либо Nei *E. coli*, а один из них лишь связывает поврежденную ДНК, но не расщепляет ее [161, 162, 169, 170]. Фермент MutY из обоих видов по своим свойствам практически идентичен MutY *E. coli* [161, 163].

Немногочисленные данные о значимости GO-системы для патогенности бактерий свидетельствуют о ее двойственной роли. С одной стороны, эта защитная система, по-видимому, действительно способствует успешному первичному инфицированию. Показано, что отсутствие MutY значительно снижает эффективность колонизации желудка мышей *H. pylori* [141, 171]. Для успешного инфицированияи макрофагов *Brucella abortus* требуются интактные гены *fpg* и *mutY* [172], а гипервирулентные изоляты *Neisseria* поддерживают эти гены в функционально активном состоянии, несмотря на свой мутаторный фенотип [155]. Более того, устойчивость *V. cholerae* к непрямому действию аминогликозидных антибиотиков, обусловленному окислительным стрессом, связана с присут-

ствием функционального гена *mutY* [173], а дефицит MutT сенсибилизирует *E. coli* и *M. tuberculosis* к действию аминогликозидных и β-лактамных антибиотиков, а также фторхинолонов [13, 174]. С другой стороны, повышенная частота мутаций, вызванная инактивацией GO-системы, иногда служит источником генетического разнообразия для селекции высоковирулентных или лекарственно-устойчивых штаммов, что показано для *P. aeruginosa*, *Elizabethkingia anophelis* и патогенных штаммов *E. coli* [175–180]. У *E. coli* такая инактивация вызвана отбором на утрату функциональных генов *mutT* и *mutY*, характерным для адаптации к условиям ограниченной доступности питательных веществ [181–183]. Эволюционные эксперименты и основанные на них модели показывают, что потомки бактерий, несущих гипермутаторные аллели, в частности инактивированные гены *mutT* и *mutY*, закрепляются в популяции, если изначально присутствуют в количестве, превышающем определенный критический уровень [184]. Относительный эффект инактивации генов *mutT* и *mutY* зависит от нуклеотидного состава геномов: у видов с AT-богатым геномом несинонимичные замены с большей вероятностью возникают в гипермутаторах с инактивацией *mutY*, а в видах с GC-богатым геномом — в гипермутаторах с инактивацией *mutT* [185].

РЕПАРАЦИЯ 8-ОКСОГУАНИНА В ОТСУТСТВИЕ MutY

Несмотря на очевидную важность GO-системы в борьбе с генотоксичными последствиями окислительного стресса, один из ее основных элементов – белок MutY, утрачен у некоторых групп организмов. Например, гомологи MutY/MUTYH отсутствуют у представителей подотдела Saccharomycotina (настоящие дрожжи), в том числе у широко используемого модельного организма – пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. К тому же, у *S. cerevisiae* отсутствуют и гомологи MutT/MTH1. В то же время гомологи MutY/MUTYH обнаружены во всех других группах царства грибов, и один из них, Myh1 делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, очень хорошо изучен биохимически [186–188]. Гомологи MUTYH утрачены практически у всех насекомых, включая *Drosophila melanogaster*, и у круглых червей, в том числе *Caenorhabditis elegans*. С другой стороны, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы, будь то гомологи Fpg или OGG1, обнаружены у всех живых организмов.

Из видов, у которых отсутствуют гомологи MutY/MUTYH, репарация oxoG лучше всего изучена у дрожжей. Как упоминалось выше, у *S. cerevisiae* функцию 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы выполняет фермент OGG1 [24, 25], который высокоспецифично удаляет oxoG и FapyG из пар с C, но не из пар с A [189, 190]. Инактивация гена *OGG1* вызывает повышение частоты трансверсий G:C → T:A, характерных для oxoG, но не ведет к снижению жизнеспособности под действием генотоксичных факторов, что очень похоже на последствия инактивации гена *fpg* в *E. coli* [191]. Трансфекция штаммов *ogg1* плазмидами, несущими ген *fpg E. coli*, восстанавливает нормальный уровень мутагенеза [192]. Интересно, что у дрожжей наблюдается эпистатическое взаимодействие между генами *OGG1* и *RAD14* [193]. Ген *RAD14* дрожжей кодирует гомолог белка XPA человека – центрального фактора системы эксцизионной репарации нуклеотидов. Сама инактивация *RAD14* не влияет на частоту трансверсий G:C → T:A, однако на фоне мутантного генотипа *ogg1* повышает ее примерно на порядок, что говорит о значительном вкладе эксцизионной репарации нуклеотидов как запасного пути репарации oxoG у дрожжей [193].

Роль MUTYH-зависимого звена GO-системы в клетках дрожжей выполняет система мисматч-репарации [194, 195]. Гетеродимер MutSα (MSH2/MSH6) с высоким сродством связывает oxoG-содержащие ДНК-дуплексы, а инактивация генов *MSH2* или *MSH6* приводит к повышению частоты трансверсий G:C → T:A более чем на два порядка, причем этот эффект наблюдается только при росте в аэробных условиях [194, 196]. При этом более эффективно репарации подвергаются пары oxoG:A, образующиеся при репликации в запаздывающей цепи, что согласуется с механизмом дискриминации цепей при мисматч-репарации у эукариот, основанной на наличии разрывов в дочерней цепи ДНК [197]. Образовавшаяся брешь застраивается с участием транслезионной ДНК-полимеразы η, которая с высокой точностью включает dCMP напротив oxoG [195, 198–201]. В митохондриях дрожжей стабильность ДНК в условиях окислительного стресса зависит от наличия OGG1 и белка MSH1 – митохондриального гомолога MutS [202].

Помимо OGG1 *S. cerevisiae* содержит ферментативную активность, описанную под названием OGG2 (не следует путать ее с рассмотренными ниже гликозилазами OGG2 из архей), которая удаляет oxoG из ДНК без какой-либо специфичности к основанию, расположенному напротив повреждения [25]. Природа этой активности не до конца установлена: сообщалось о том, что она принадлежит белку NTG1 – одному из двух дрожжевых гомологов эндонуклеазы III *E. coli* [203, 204], однако в других работах NTG1 не проявлял активности по отношению к oxoG [205–207]. Поскольку удаление oxoG из пары с A мутагенно, если oxoG появился в результате окисления G в ДНК, то предполагается, что специфичность Ogg2 отражает необходимость удаления oxoG, включенного из пула oxodGTP, и высокую часто-

ту таких событий в отсутствие MutT/MTH1 [203]. Также включенный 3'-концевой oxodGMP может удаляться 3' → 5'-экзонуклеазной активностью дрожжевой AP-эндонуклеазы APN1 [208].

Остается неизвестным, насколько система репарации мисматчей (MMR) может замещать активность MUTYH в клетках человека. С одной стороны, гетеродимер MutSα, как и в случае дрожжевых белков, способен узнавать неканонические пары с участием oxoG [209–211]. У клеток с MMR-дефицитом снижена способность к реактивации плазмид, поврежденных окислением [212]. С другой стороны, инактивирующие мутации в гене *MUTYH* вызывают развитие рака даже при полностью функциональной системе MMR (см. ниже), а мутационная сигнатура в клетках *MUTYH*$^{-/-}$ отличается от сигнатуры, характеризующей инактивацию генов MMR [213]. Поскольку эктопическая экспрессия гена *MTH1* частично комплементирует гипермутаторный фенотип MMR-дефицитных клеток, высказывалось предположение, что MMR может частично отвечать за удаление oxoG, включенного из пула oxodGTP [214], однако MMR пары A:oxoG в клеточных экстрактах проходит неэффективно [210], а экзонуклеаза 1 – фермент, отвечающий за деградацию цепи ДНК в этом пути репарации, – не способна гидролизовать субстраты, содержащие концевой остаток oxoG [215]. В целом, в настоящее время нет надежных свидетельств того, что у человека MMR может участвовать в GO-системе вместо MUTYH. Более обоснованным представляется влияние MUTYH на систему MMR: MUTYH физически взаимодействует с MutSα [216], а MMR может использовать разрывы, внесенные MUTYH, для дискриминации родительской и дочерней цепей ДНК [217].

Система репарации 8-оксогуанина у представителей домена архей охарактеризована слабо. Эта система функционирует, по-видимому, в отсутствие гомологов MutY и MutT, которые не обнаружены в геномах организмов этой группы. Архейные гликозилазы, специфичные к oxoG, гомологичны OGG1, а не Fpg, однако они достаточно сильно отличаются от OGG1 и подразделяются на два основных семейства: OGG2 и AGOG (Archaean Glycosylases for OxoGuanine). Биохимически охарактеризованы ферменты OGG2 из *Methanocaldococcus jannaschii* [218–220], *Archaeoglobus fulgidus* [221], *Saccharolobus (Sulfolobus) solfataricus* [219] и *Thermoplasma volcanium* [222] и AGOG из *Pyrobaculum aerophilum* [223–225], *Thermococcus gammatolerans* [226] и *Th. kodakarensis* [227]. Все они удаляют из ДНК остатки oxoG, но их способность к утилизации субстратов с другими повреждениями не исследована. Все архейные oxoG-ДНК-гликозилазы характеризуются невысокой специфичностью к основанию напротив повреждения [218, 221–223, 225, 226]. Поскольку MMR для архей также нехарактерна [228], удаление оснований напротив oxoG, возможно, осуществляют специфические архейные мисматч-эндонуклеазы [229]. Спектры мутаций, вызванных окислительным повреждением ДНК, у архей не изучены.

ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ДЕФЕКТАМИ GO-СИСТЕМЫ

Как и следует ожидать, для системы, противодействующей постоянно протекающему процессу мутагенеза, дефекты GO-системы связаны с повышенным риском онкологических заболеваний. В этом отношении наиболее хорошо изучены патологии, связанные с инактивирующими мутациями в гене *MUTYH*. Впервые такие мутации обнаружили в 2002 г. в родословной с несколькими случаями колоректального рака с рецессивным аутосомным наследованием [230]. У носителей наблюдалась соматическая биаллельная инактивация гена-онкосупрессора *APC* с характерным спектром мутаций G → T, а секвенирование генов GO-системы выявило наследуемые инактивирующие мутации в гене *MUTYH*. Эти мутации вели к аминокислотным заменам Y165C и G382D, затрагивающим абсолютно консервативные остатки белка, принимающие участие в связывании ДНК. Активность вариантов белка MutY *E. coli*, MUTYH мыши и человека, несущих соответствующие мутации, значительно снижена [40, 230–233]. С тех пор обнаружили несколько десятков высокопенетрантных инактивирующих мутаций в гене *MUTYH*, ведущих к развитию колоректального рака у гомозиготных и составных гетерозиготных носителей [234–237], однако Y165C и G382D остаются самыми распространенными из них. В результате *MUTYH*-ассоциированный полипоз в настоящее время выделяют в отдельную группу синдромов, способствующих развитию колоректального рака [238–240]. Среди мутационных сигнатур опухолей – матриц частот соматических однонуклеотидных замен во всех возможных тринуклеотидах [241] – выделяют особую сигнатуру, обусловленную мутациями за счет oxoG [213].

Мутации в генах *OGG1* и *MTH1* со столь же высоким риском развития заболеваний, как инактивирующие мутации *MUTYH*, на сегодняшний день не найдены. Однако многочисленные эпидемиологические исследования и результаты мета-анализов показывают ассоциацию распространенного однонуклеотидного полиморфизма *OGG1* rs1052133 с повышенным риском развития рака легкого [242, 243]. Это связано с заменой C → G в кодоне 326 *OGG1*, приводящей к изменению остатка Ser на Cys [244]. В результате синтезируется вариант белка OGG1, склонный к окислению и димеризации и не подвергающийся фосфорилированию по остатку Ser326, что нарушает его активность и распределение в клетках в ответ

на окислительный стресс [245–249]. Сообщалось о том, что полиморфизм *MTH1* rs4866, который ведет к аминокислотной замене V83M, снижающей термостабильность белка и нарушающей его внутриклеточную локализацию [250, 251], ассоциирован с умеренно повышенным риском онкологических заболеваний и сахарного диабета первого и второго типа [252–255], однако имеющиеся данные слишком малочисленны, чтобы можно было сделать общие выводы о патогенности этого полиморфизма.

Открытия последних лет показали, что ферменты OGG1 и MTH1 человека можно рассматривать как многообещающие терапевтические мишени. OGG1, помимо своей ДНК-гликозилазной активности, способен регулировать экспрессию ряда генов воспалительного ответа, связываясь с G-квадруплексами в составе их промоторов [256, 257]. Ингибирование OGG1 оказывает мощное противовоспалительное действие [10, 258]. Фермент MTH1 оказался одним из критических звеньев в системе защиты раковых клеток от характерного для них хронического окислительного стресса, и подавление его активности вызывает гибель раковых, но не нормальных клеток [8, 9]. Многообещающие результаты в доклинических исследованиях показал ингибитор MTH1 каронудиб в качестве средства терапии метастазирующей меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы и мезотелиомы [259–261], который сейчас проходит фазу I клинических исследований (более подробно ингибиторы ферментов GO-системы описаны в обзорах [262, 263]).

В целом GO-систему можно рассматривать как специальный путь в составе системы эксцизионной репарации оснований ДНК. В состав GO-системы входят далеко не все ферменты, принимающие участие в репарации окислительных повреждений ДНК. Ее роль связана прежде всего с защитой от oxoG и FapyG – двух распространенных повреждений ДНК, которые индуцируются окислительным стрессом и обладают амбивалентными кодирующими свойствами, порождая характерный спектр мутаций. Возникновение мутаций G → T можно считать главным признаком функциональной недостаточности GO-системы; в частности, в опухолях человека выделяется отдельная мутационная сигнатура, связываемая с появлением oxoG в геноме. У бактерий, а также в раковых клетках GO-система служит ключевым фактором долговременной устойчивости к индуцированному окислительному стрессу, и ее элементы рассматриваются в качестве перспективных мишеней для лекарственных средств.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 19-74-00068, обзор GO-системы у бактерий) и Российским фондом фундаментальных исследований (грант №17-00-00261/17-00-00265, обзор GO-системы у эукариот).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Staerck C., Gastebois A., Vandeputte P., Calenda A., Larcher G., Gillmann L., Papon N., Bouchara J.-P., Fleury M.J.J. (2017) Microbial antioxidant defense enzymes. *Microb. Pathog.* **110**, 56–65.
2. Zharkov D.O. (2008) Base excision DNA repair. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 1544–1565.
3. van Loon B., Markkanen E., Hübscher U. (2010) Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair.* **9**, 604–616.
4. Shibutani S., Takeshita M., Grollman A.P. (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature.* **349**, 431–434.
5. Moriya M. (1993) Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G · C → T · A transversions in simian kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 1122–1126.
6. Michaels M.L., Cruz C., Grollman A.P., Miller J.H. (1992) Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 7022–7025.
7. Michaels M.L., Tchou J., Grollman A.P., Miller J.H. (1992) A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. *Biochemistry.* **31**, 10964–10968.
8. Gad H., Koolmeister T., Jemth A.-S., Eshtad S., Jacques S.A., Ström C.E., Svensson L.M., Schultz N., Lundbäck T., Einarsdottir B.O., Saleh A., Göktürk C., Baranczewski P., Svensson R., Berntsson R.P.-A., Gustafsson R., Strömberg K., Sanjiv K., Jacques-Cordonnier M.-C., Desroses M., Gustavsson A.-L., Olofsson R., Johansson F., Homan E.J., Loseva O., Bräutigam L., Johansson L., Höglund A., Hagenkort A., Pham T., Altun M., Gaugaz F.Z., Vikingsson S., Evers B., Henriksson M., Vallin K.S.A., Wallner O.A., Hammarström L.G.J., Wiita E., Almlöf I., Kalderén C., Axelsson H., Djureinovic T., Puigvert J.C., Häggblad M., Jeppsson F., Martens U., Lundin C., Lundgren B., Granelli I., Jensen A.J., Artursson P., Nilsson J.A., Stenmark P., Scobie M., Warpman Berglund U., Helleday T. (2014) MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool. *Nature.* **508**, 215–221.
9. Huber K.V.M., Salah E., Radic B., Gridling M., Elkins J.M., Stukalov A., Jemth A.-S., Göktürk C., Sanjiv K., Strömberg K., Pham T., Warpman Berglund U., Colinge J., Bennett K.L., Loizou J.I., Helleday T., Knapp S., Superti-Furga G. (2014) Stereospecific targeting of MTH1 by (*S*)-crizotinib as an anticancer strategy. *Nature.* **508**, 222–227.

10. Visnes T., Cázares-Körner A., Hao W., Wallner O., Masuyer G., Loseva O., Mortusewicz O., Wiita E., Sarno A., Manoilov A., Astorga-Wells J., Jemth A.-S., Pan L., Sanjiv K., Karsten S., Gokturk C., Grube M., Homan E.J., Hanna B.M.F., Paulin C.B.J., Pham T., Rasti A., Warpman Berglund U., von Nicolai C., Benitez-Buelga C., Koolmeister T., Ivanic D., Iliev P., Scobie M., Krokan H.E., Baranczewski P., Artursson P., Altun M., Jensen A.J., Kalderén C., Ba X., Zubarev R.A., Stenmark P., Boldogh I., Helleday T. (2018) Small-molecule inhibitor of OGG1 suppresses proinflammatory gene expression and inflammation. *Science.* **362**, 834–839.

11. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell.* **130**, 797–810.

12. Nguyen D., Joshi-Datar A., Lepine F., Bauerle E., Olakanmi O., Beer K., McKay G., Siehnel R., Schafhauser J., Wang Y., Britigan B.E., Singh P.K. (2011) Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science.* **334**, 982–986.

13. Foti J.J., Devadoss B., Winkler J.A., Collins J.J., Walker G.C. (2012) Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science.* **336**, 315–319.

14. Tchou J., Kasai H., Shibutani S., Chung M.-H., Laval J., Grollman A.P., Nishimura S. (1991) 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 4690–4694.

15. Tchou J., Bodepudi V., Shibutani S., Antoshechkin I., Miller J., Grollman A.P., Johnson F. (1994) Substrate specificity of Fpg protein: Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA. *J. Biol. Chem.* **269**, 15318–15324.

16. Karakaya A., Jaruga P., Bohr V.A., Grollman A.P., Dizdaroglu M. (1997) Kinetics of excision of purine lesions from DNA by *Escherichia coli* Fpg protein. *Nucl. Acids Res.* **25**, 474–479.

17. Bulychev N.V., Varaprasad C.V., Dormán G., Miller J.H., Eisenberg M., Grollman A.P., Johnson F. (1996) Substrate specificity of *Escherichia coli* MutY protein. *Biochemistry.* **35**, 13147–13156.

18. Maki H., Sekiguchi M. (1992) MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature.* **355**, 273–275.

19. Yudkina A.V., Shilkin E.S., Endutkin A.V., Makarova A.V., Zharkov D.O. (2019) Reading and misreading 8-oxoguanine, a paradigmatic ambiguous nucleobase. *Crystals.* **9**, 269.

20. Tajiri T., Maki H., Sekiguchi M. (1995) Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* **336**, 257–267.

21. Foster P.L., Lee H., Popodi E., Townes J.P., Tang H. (2015) Determinants of spontaneous mutation in the bacterium *Escherichia coli* as revealed by whole-genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **112**, E5990–E5999.

22. Wielgoss S., Barrick J.E., Tenaillon O., Wiser M.J., Dittmar W.J., Cruveiller S., Chane-Woon-Ming B., Médigue C., Lenski R.E., Schneider D. (2013) Mutation rate dynamics in a bacterial population reflect tension between adaptation and genetic load. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 222–227.

23. Schalow B.J., Courcelle C.T., Courcelle J. (2011) *Escherichia coli* Fpg glycosylase is nonrendundant and required for the rapid global repair of oxidized purine and pyrimidine damage *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **410**, 183–193.

24. Auffret van der Kemp P., Thomas D., Barbey R., de Oliveira R., Boiteux S. (1996) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *OGG1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-*N*-methylformamidopyrimidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 5197–5202.

25. Nash H.M., Bruner S.D., Schärer O.D., Kawate T., Addona T.A., Spooner E., Lane W.S., Verdine G.L. (1996) Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr. Biol.* **6**, 968–980.

26. Rosenquist T.A., Zharkov D.O., Grollman A.P. (1997) Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 7429–7434.

27. Radicella J.P., Dherin C., Desmaze C., Fox M.S., Boiteux S. (1997) Cloning and characterization of *hOGG1*, a human homolog of the *OGG1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 8010–8015.

28. Roldán-Arjona T., Wei Y.-F., Carter K.C., Klungland A., Anselmino C., Wang R.-P., Augustus M., Lindahl T. (1997) Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 8016–8020.

29. Bjørås M., Luna L., Johnsen B., Hoff E., Haug T., Rognes T., Seeberg E. (1997) Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites. *EMBO J.* **16**, 6314–6322.

30. Dherin C., Radicella J.P., Dizdaroglu M., Boiteux S. (1999) Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human α-hOgg1 protein and the polymorphic α-hOgg1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations. *Nucl. Acids Res.* **27**, 4001–4007.

31. Krishnamurthy N., Haraguchi K., Greenberg M.M., David S.S. (2008) Efficient removal of formamidopyrimidines by 8-oxoguanine glycosylases. *Biochemistry.* **47**, 1043–1050.

32. Klungland A., Rosewell I., Hollenbach S., Larsen E., Daly G., Epe B., Seeberg E., Lindahl T., Barnes D.E. (1999) Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 13300–13305.

33. Minowa O., Arai T., Hirano M., Monden Y., Nakai S., Fukuda M., Itoh M., Takano H., Hippou Y., Aburatani H., Masumura K.-i., Nohmi T., Nishimura S., Noda T. (2000) *Mmh/Ogg1* gene inactivation results in

accumulation of 8-hydroxyguanine in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 4156–4161.

34. Sakumi K., Tominaga Y., Furuichi M., Xu P., Tsuzuki T., Sekiguchi M., Nakabeppu Y. (2003) *Ogg1* knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by *Mth1* gene disruption. *Cancer Res.* **63**, 902–905.
35. Jaruga P., Xiao Y., Vartanian V., Lloyd R.S., Dizdaroglu M. (2010) Evidence for the involvement of DNA repair enzyme NEIL1 in nucleotide excision repair of (5'*R*)- and (5'*S*)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines. *Biochemistry.* **49**, 1053–1055.
36. Sakumi K., Furuichi M., Tsuzuki T., Kakuma T., Kawabata S.-i., Maki H., Sekiguchi M. (1993) Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* **268**, 23524–23530.
37. Slupska M.M., Baikalov C., Luther W.M., Chiang J.-H., Wei Y.-F., Miller J.H. (1996) Cloning and sequencing a human homolog (*hMYH*) of the *Escherichia coli mutY* gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.* **178**, 3885–3892.
38. Hayakawa H., Taketomi A., Sakumi K., Kuwano M., Sekiguchi M. (1995) Generation and elimination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate, a mutagenic substrate for DNA synthesis, in human cells. *Biochemistry.* **34**, 89–95.
39. Pope M.A., David S.S. (2005) DNA damage recognition and repair by the murine MutY homologue. *DNA Repair.* **4**, 91–102.
40. Kundu S., Brinkmeyer M.K., Livingston A.L., David S.S. (2009) Adenine removal activity and bacterial complementation with the human MutY homologue (MUTYH) and Y165C, G382D, P391L and Q324R variants associated with colorectal cancer. *DNA Repair.* **8**, 1400–1410.
41. Russo M.T., De Luca G., Degan P., Parlanti E., Dogliotti E., Barnes D.E., Lindahl T., Yang H., Miller J.H., Bignami M. (2004) Accumulation of the oxidative base lesion 8-hydroxyguanine in DNA of tumor-prone mice defective in both the *Myh* and *Ogg1* DNA glycosylases. *Cancer Res.* **64**, 4411–4414.
42. Xie Y., Yang H., Cunanan C., Okamoto K., Shibata D., Pan J., Barnes D.E., Lindahl T., McIlhatton M., Fishel R., Miller J.H. (2004) Deficiencies in mouse *Myh* and *Ogg1* result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the *K-ras* oncogene in lung tumors. *Cancer Res.* **64**, 3096–3102.
43. Ohno M., Sakumi K., Fukumura R., Furuichi M., Iwasaki Y., Hokama M., Ikemura T., Tsuzuki T., Gondo Y., Nakabeppu Y. (2014) 8-oxoguanine causes spontaneous *de novo* germline mutations in mice. *Sci. Rep.* **4**, 4689.
44. Pilati C., Shinde J., Alexandrov L.B., Assié G., André T., Hélias-Rodzewicz Z., Ducoudray R., Le Corre D., Zucman-Rossi J., Emile J.-F., Bertherat J., Letouzé E., Laurent-Puig P. (2017) Mutational signature analysis identifies *MUTYH* deficiency in colorectal cancers and adrenocortical carcinomas. *J. Pathol.* **242**, 10–15.
45. Boiteux S., Coste F., Castaing B. (2017) Repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA *N*-glycosylases. *Free Radic. Biol. Med.* **107**, 179–201.
46. Fromme J.C., Verdine G.L. (2003) DNA lesion recognition by the bacterial repair enzyme MutM. *J. Biol. Chem.* **278**, 51543–51548.
47. Bruner S.D., Norman D.P.G., Verdine G.L. (2000) Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature.* **403**, 859–866.
48. Fromme J.C., Banerjee A., Huang S.J., Verdine G.L. (2004) Structural basis for removal of adenine mispaired with 8-oxoguanine by MutY adenine DNA glycosylase. *Nature.* **427**, 652–656.
49. Nakamura T., Meshitsuka S., Kitagawa S., Abe N., Yamada J., Ishino T., Nakano H., Tsuzuki T., Doi T., Kobayashi Y., Fujii S., Sekiguchi M., Yamagata Y. (2010) Structural and dynamic features of the MutT protein in the recognition of nucleotides with the mutagenic 8-oxoguanine base. *J. Biol. Chem.* **285**, 444–452.
50. Waz S., Nakamura T., Hirata K., Koga-Ogawa Y., Chirifu M., Arimori T., Tamada T., Ikemizu S., Nakabeppu Y., Yamagata Y. (2017) Structural and kinetic studies of the human Nudix hydrolase MTH1 reveal the mechanism for its broad substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **292**, 2785–2794.
51. Boon E.M., Pope M.A., Williams S.D., David S.S., Barton J.K. (2002) DNA-mediated charge transport as a probe of MutY/DNA interaction. *Biochemistry.* **41**, 8464–8470.
52. Boon E.M., Livingston A.L., Chmiel N.H., David S.S., Barton J.K. (2003) DNA-mediated charge transport for DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 12543–12547.
53. Boal A.K., Yavin E., Lukianova O.A., O'Shea V.L., David S.S., Barton J.K. (2005) DNA-bound redox activity of DNA repair glycosylases containing [4Fe-4S] clusters. *Biochemistry.* **44**, 8397–8407.
54. Yavin E., Boal A.K., Stemp E.D.A., Boon E.M., Livingston A.L., O'Shea V.L., David S.S., Barton J.K. (2005) Protein–DNA charge transport: redox activation of a DNA repair protein by guanine radical. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 3546–3551.
55. Yavin E., Stemp E.D.A., O'Shea V.L., David S.S., Barton J.K. (2006) Electron trap for DNA-bound repair enzymes: a strategy for DNA-mediated signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 3610–3614.
56. Maga G., Villani G., Crespan E., Wimmer U., Ferrari E., Bertocci B., Hübscher U. (2007) 8-oxo-guanine bypass by human DNA polymerases in the presence of auxiliary proteins. *Nature.* **447**, 606–608.
57. Fazlieva R., Spittle C.S., Morrissey D., Hayashi H., Yan H., Matsumoto Y. (2009) Proofreading exonuclease activity of human DNA polymerase δ and its effects on lesion-bypass DNA synthesis. *Nucl. Acids Res.* **37**, 2854–2866.
58. Locatelli G.A., Pospiech H., Tanguy Le Gac N., van Loon B., Hubscher U., Parkkinen S., Syväoja J.E., Villani G. (2010) Effect of 8-oxoguanine and abasic site DNA lesions on *in vitro* elongation by human DNA polymerase ε in the presence of replication pro-

tein A and proliferating-cell nuclear antigen. *Biochem. J.* **429**, 573–582.

59. Markkanen E., Castrec B., Villani G., Hübscher U. (2012) A switch between DNA polymerases δ and λ promotes error-free bypass of 8-oxo-G lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, 20401–20406.
60. Picher A.J., Blanco L. (2007) Human DNA polymerase lambda is a proficient extender of primer ends paired to 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *DNA Repair.* **6**, 1749–1756.
61. Burak M.J., Guja K.E., Hambardjieva E., Derkunt B., Garcia-Diaz M. (2016) A fidelity mechanism in DNA polymerase lambda promotes error-free bypass of 8-oxo-dG. *EMBO J.* **35**, 2045–2059.
62. van Loon B., Hübscher U. (2009) An 8-oxo-guanine repair pathway coordinated by MUTYH glycosylase and DNA polymerase λ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 18201–18206.
63. Cadet J., Davies K.J.A., Medeiros M.H.G., Di Mascio P., Wagner J.R. (2017) Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. *Free Radic. Biol. Med.* **107**, 13–34.
64. Fleming A.M., Burrows C.J. (2017) Formation and processing of DNA damage substrates for the hNEIL enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* **107**, 35–52.
65. Hailer M.K., Slade P.G., Martin B.D., Sugden K.D. (2005) Nei deficient *Escherichia coli* are sensitive to chromate and accumulate the oxidized guanine lesion spiroiminodihydantoin. *Chem. Res. Toxicol.* **18**, 1378–1383.
66. Mangerich A., Knutson C.G., Parry N.M., Muthupalani S., Ye W., Prestwich E., Cui L., McFaline J.L., Mobley M., Ge Z., Taghizadeh K., Wishnok J.S., Wogan G.N., Fox J.G., Tannenbaum S.R., Dedon P.C. (2012) Infection-induced colitis in mice causes dynamic and tissue-specific changes in stress response and DNA damage leading to colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, E1820–E1829.
67. Hu J., de Souza-Pinto N.C., Haraguchi K., Hogue B.A., Jaruga P., Greenberg M.M., Dizdaroglu M., Bohr V.A. (2005) Repair of formamidopyrimidines in DNA involves different glycosylases: role of the OGG1, NTH1, and NEIL1 enzymes. *J. Biol. Chem.* **280**, 40544–40551.
68. Dizdaroglu M. (2012) Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett.* **327**, 26–47.
69. Wiederholt C.J., Greenberg M.M. (2002) Fapy • dG instructs Klenow exo$^-$ to misincorporate deoxyadenosine. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 7278–7279.
70. Kalam M.A., Haraguchi K., Chandani S., Loechler E.L., Moriya M., Greenberg M.M., Basu A.K. (2006) Genetic effects of oxidative DNA damages: comparative mutagenesis of the imidazole ring-opened formamidopyrimidines (Fapy lesions) and 8-oxo-purines in simian kidney cells. *Nucl. Acids Res.* **34**, 2305–2315.
71. Pande P., Haraguchi K., Jiang Y.-L., Greenberg M.M., Basu A.K. (2015) Unlike catalyzing error-free bypass of 8-oxodGuo, DNA polymerase λ is responsible for a significant part of Fapy · dG-induced G → T mutations in human cells. *Biochemistry.* **54**, 1859–1862.
72. Patro J.N., Wiederholt C.J., Jiang Y.L., Delaney J.C., Essigmann J.M., Greenberg M.M. (2007) Studies on the replication of the ring opened formamidopyrimidine, Fapy · dG in *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **46**, 10202–10212.
73. Weledji Y.N., Wiederholt C.J., Delaney M.O., Greenberg M.M. (2008) DNA polymerase bypass in vitro and in *E. coli* of a C-nucleotide analogue of Fapy · dG. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 4029–4034.
74. Imoto S., Patro J.N., Jiang Y.L., Oka N., Greenberg M.M. (2006) Synthesis, DNA polymerase incorporation, and enzymatic phosphate hydrolysis of formamidopyrimidine nucleoside triphosphates. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 14606–14611.
75. Boiteux S., Gajewski E., Laval J., Dizdaroglu M. (1992) Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry.* **31**, 106–110.
76. Wiederholt C.J., Delaney M.O., Pope M.A., David S.S., Greenberg M.M. (2003) Repair of DNA containing Fapy · dG and its β-C-nucleoside analogue by formamidopyrimidine DNA glycosylase and MutY. *Biochemistry.* **42**, 9755–9760.
77. Duarte V., Muller J.G., Burrows C.J. (1999) Insertion of dGMP and dAMP during *in vitro* DNA synthesis opposite an oxidized form of 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *Nucl. Acids Res.* **27**, 496–502.
78. Kornyushyna O., Berges A.M., Muller J.G., Burrows C.J. (2002) In vitro nucleotide misinsertion opposite the oxidized guanosine lesions spiroiminodihydantoin and guanidinohydantoin and DNA synthesis past the lesions using *Escherichia coli* DNA polymerase I (Klenow fragment). *Biochemistry.* **41**, 15304–15314.
79. Zhu J., Fleming A.M., Orendt A.M., Burrows C.J. (2016) pH-dependent equilibrium between 5-guanidinohydantoin and iminoallantoin affects nucleotide insertion opposite the DNA lesion. *J. Org. Chem.* **81**, 351–359.
80. Beckman J., Wang M., Blaha G., Wang J., Konigsberg W.H. (2010) Substitution of Ala for Tyr567 in RB69 DNA polymerase allows dAMP and dGMP to be inserted opposite guanidinohydantoin. *Biochemistry.* **49**, 8554–8563.
81. Henderson P.T., Delaney J.C., Muller J.G., Neeley W.L., Tannenbaum S.R., Burrows C.J., Essigmann J.M. (2003) The hydantoin lesions formed from oxidation of 7,8-dihydro-8-oxoguanine are potent sources of replication errors *in vivo*. *Biochemistry.* **42**, 9257–9262.
82. Delaney S., Delaney J.C., Essigmann J.M. (2007) Chemical-biological fingerprinting: probing the properties of DNA lesions formed by peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 1718–1729.
83. Neeley W.L., Delaney S., Alekseyev Y.O., Jarosz D.F., Delaney J.C., Walker G.C., Essigmann J.M. (2007) DNA polymerase V allows bypass of toxic guanine oxidation products *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **282**, 12741–12748.
84. Huang J., Yennie C.J., Delaney S. (2015) Klenow fragment discriminates against the incorporation of

the hyperoxidized dGTP lesion spiroiminodihydantoin into DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **28**, 2325–2333.

85. Leipold M.D., Muller J.G., Burrows C.J., David S.S. (2000) Removal of hydantoin products of 8-oxoguanine oxidation by the *Escherichia coli* DNA repair enzyme, FPG. *Biochemistry.* **39**, 14984–14992.
86. Hazra T.K., Muller J.G., Manuel R.C., Burrows C.J., Lloyd R.S., Mitra S. (2001) Repair of hydantoins, one electron oxidation product of 8-oxoguanine, by DNA glycosylases of *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.* **29**, 1967–1974.
87. Krishnamurthy N., Muller J.G., Burrows C.J., David S.S. (2007) Unusual structural features of hydantoin lesions translate into efficient recognition by *Escherichia coli* Fpg. *Biochemistry.* **46**, 9355–9365.
88. Delaney S., Neeley W.L., Delaney J.C., Essigmann J.M. (2007) The substrate specificity of MutY for hyperoxidized guanine lesions *in vivo*. *Biochemistry.* **46**, 1448–1455.
89. Leipold M.D., Workman H., Muller J.G., Burrows C.J., David S.S. (2003) Recognition and removal of oxidized guanines in duplex DNA by the base excision repair enzymes hOGG1, yOGG1, and yOGG2. *Biochemistry.* **42**, 11373–11381.
90. Melamede R.J., Hatahet Z., Kow Y.W., Ide H., Wallace S.S. (1994) Isolation and characterization of endonuclease VIII from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **33**, 1255–1264.
91. Jiang D., Hatahet Z., Melamede R.J., Kow Y.W., Wallace S.S. (1997) Characterization of *Escherichia coli* endonuclease VIII. *J. Biol. Chem.* **272**, 32230–32239.
92. Dizdaroglu M., Burgess S.M., Jaruga P., Hazra T.K., Rodriguez H., Lloyd R.S. (2001) Substrate specificity and excision kinetics of *Escherichia coli* endonuclease VIII (Nei) for modified bases in DNA damaged by free radicals. *Biochemistry.* **40**, 12150–12156.
93. Kropachev K.Y., Zharkov D.O., Grollman A.P. (2006) Catalytic mechanism of *Escherichia coli* endonuclease VIII: roles of the intercalation loop and the zinc finger. *Biochemistry.* **45**, 12039–12049.
94. Blaisdell J.O., Hatahet Z., Wallace S.S. (1999) A novel role for *Escherichia coli* endonuclease VIII in prevention of spontaneous G → T transversions. *J. Bacteriol.* **181**, 6396–6402.
95. Hazra T.K., Izumi T., Venkataraman R., Kow Y.W., Dizdaroglu M., Mitra S. (2000) Characterization of a novel 8-oxoguanine-DNA glycosylase activity in *Escherichia coli* and identification of the enzyme as endonuclease VIII. *J. Biol. Chem.* **275**, 27762–27767.
96. Hazra T.K., Izumi T., Boldogh I., Imhoff B., Kow Y.W., Jaruga P., Dizdaroglu M., Mitra S. (2002) Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 3523–3528.
97. Hazra T.K., Kow Y.W., Hatahet Z., Imhoff B., Boldogh I., Mokkapati S.K., Mitra S., Izumi T. (2002) Identification and characterization of a novel human DNA glycosylase for repair of cytosine-derived lesions. *J. Biol. Chem.* **277**, 30417–30420.
98. Bandaru V., Sunkara S., Wallace S.S., Bond J.P. (2002) A novel human DNA glycosylase that removes oxidative DNA damage and is homologous to *Escherichia coli* endonuclease VIII. *DNA Repair.* **1**, 517–529.
99. Morland I., Rolseth V., Luna L., Rognes T., Bjørås M., Seeberg E. (2002) Human DNA glycosylases of the bacterial Fpg/MutM superfamily: an alternative pathway for the repair of 8-oxoguanine and other oxidation products in DNA. *Nucl. Acids Res.* **30**, 4926–4936.
100. Takao M., Kanno S.-i., Kobayashi K., Zhang Q.-M., Yonei S., van der Horst G.T.J., Yasui A. (2002) A back-up glycosylase in *Nth1* knock-out mice is a functional Nei (endonuclease VIII) homologue. *J. Biol. Chem.* **277**, 42205–42213.
101. Rosenquist T.A., Zaika E., Fernandes A.S., Zharkov D.O., Miller H., Grollman A.P. (2003) The novel DNA glycosylase, NEIL1, protects mammalian cells from radiation-mediated cell death. *DNA Repair.* **2**, 581–591.
102. Jaruga P., Birincioglu M., Rosenquist T.A., Dizdaroglu M. (2004) Mouse NEIL1 protein is specific for excision of 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine and 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine from oxidatively damaged DNA. *Biochemistry.* **43**, 15909–15914.
103. Roy L.M., Jaruga P., Wood T.G., McCullough A.K., Dizdaroglu M., Lloyd R.S. (2007) Human polymorphic variants of the NEIL1 DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.* **282**, 15790–15798.
104. Muftuoglu M., de Souza-Pinto N.C., Dogan A., Aamann M., Stevnsner T., Rybanska I., Kirkali G., Dizdaroglu M., Bohr V.A. (2009) Cockayne syndrome group B protein stimulates repair of formamidopyrimidines by NEIL1 DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.* **284**, 9270–9279.
105. Zou X., Owusu M., Harris R., Jackson S.P., Loizou J.I., Nik-Zainal S. (2018) Validating the concept of mutational signatures with isogenic cell models. *Nat. Commun.* **9**, 1744.
106. Chan M.K., Ocampo-Hafalla M.T., Vartanian V., Jaruga P., Kirkali G., Koenig K.L., Browng S., Lloyd R.S., Dizdaroglu M., Teebor G.W. (2009) Targeted deletion of the genes encoding NTH1 and NEIL1 DNA *N*-glycosylases reveals the existence of novel carcinogenic oxidative damage to DNA. *DNA Repair.* **8**, 786–794.
107. Hailer M.K., Slade P.G., Martin B.D., Rosenquist T.A., Sugden K.D. (2005) Recognition of the oxidized lesions spiroiminodihydantoin and guanidinohydantoin in DNA by the mammalian base excision repair glycosylases NEIL1 and NEIL2. *DNA Repair.* **4**, 41–50.
108. Krishnamurthy N., Zhao X., Burrows C.J., David S.S. (2008) Superior removal of hydantoin lesions relative to other oxidized bases by the human DNA glycosylase hNEIL1. *Biochemistry.* **47**, 7137–7146.
109. Liu M., Bandaru V., Bond J.P., Jaruga P., Zhao X., Christov P.P., Burrows C.J., Rizzo C.J., Dizdaroglu M., Wallace S.S. (2010) The mouse ortholog of NEIL3 is a functional DNA glycosylase *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **107**, 4925–4930.
110. Yeo J., Goodman R.A., Schirle N.T., David S.S., Beal P.A. (2010) RNA editing changes the lesion specificity for the DNA repair enzyme NEIL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 20715–20719.

111. Zhao X., Krishnamurthy N., Burrows C.J., David S.S. (2010) Mutation versus repair: NEIL1 removal of hydantoin lesions in single-stranded, bulge, bubble, and duplex DNA contexts. *Biochemistry.* **49**, 1658–1666.

112. Redrejo-Rodríguez M., Saint-Pierre C., Couve S., Mazouzi A., Ishchenko A.A., Gasparutto D., Saparbaev M. (2011) New insights in the removal of the hydantoins, oxidation product of pyrimidines, via the base excision and nucleotide incision repair pathways. *PLoS One*. **6**, e21039.

113. Liu M., Bandaru V., Holmes A., Averill A.M., Cannan W., Wallace S.S. (2012) Expression and purification of active mouse and human NEIL3 proteins. *Protein Expr. Purif.* **84**, 130–139.

114. Krokeide S.Z., Laerdahl J.K., Salah M., Luna L., Cederkvist F.H., Fleming A.M., Burrows C.J., Dalhus B., Bjørås M. (2013) Human NEIL3 is mainly a monofunctional DNA glycosylase removing spiroimindiohydantoin and guanidinohydantoin. *DNA Repair.* **12**, 1159–1164.

115. McKibbin P.L., Fleming A.M., Towheed M.A., Van Houten B., Burrows C.J., David S.S. (2013) Repair of hydantoin lesions and their amine adducts in DNA by base and nucleotide excision repair. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 13851–13861.

116. Ohtsubo T., Matsuda O., Iba K., Terashima I., Sekiguchi M., Nakabeppu Y. (1998) Molecular cloning of *AtMMH*, an *Arabidopsis thaliana* ortholog of the *Escherichia coli mutM* gene, and analysis of functional domains of its product. *Mol. Gen. Genet.* **259**, 577–590.

117. Dany A.L., Tissier A. (2001) A functional *OGG1* homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Genet. Genomics.* **265**, 293–301.

118. García-Ortiz M.-V., Ariza R.R., Roldán-Arjona T. (2001) An *OGG1* orthologue encoding a functional 8-oxoguanine DNA glycosylase/lyase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **47**, 795–804.

119. Morales-Ruiz T., Birincioglu M., Jaruga P., Rodriguez H., Roldan-Arjona T., Dizdaroglu M. (2003) *Arabidopsis thaliana* Ogg1 protein excises 8-hydroxyguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine from oxidatively damaged DNA containing multiple lesions. *Biochemistry.* **42**, 3089–3095.

120. Córdoba-Cañero D., Roldán-Arjona T., Ariza R.R. (2014) Arabidopsis ZDP DNA 3'-phosphatase and ARP endonuclease function in 8-oxoG repair initiated by FPG and OGG1 DNA glycosylases. *Plant J.* **79**, 824–834.

121. Murphy T.M., Guo Y.-Y. (2010) Antimutagenic specificities of two plant glycosylases, oxoguanine glycosylase and formamidopyrimidine glycosylase, assayed *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **392**, 335–339.

122. Murphy T.M., George A. (2005) A comparison of two DNA base excision repair glycosylases from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 869–872.

123. Kathe S.D., Barrantes-Reynolds R., Jaruga P., Newton M.R., Burrows C.J., Bandaru V., Dizdaroglu M., Bond J.P., Wallace S.S. (2009) Plant and fungal Fpg homologs are formamidopyrimidine DNA glycosylases but not 8-oxoguanine DNA glycosylases. *DNA Repair.* **8**, 643–653.

124. Duclos S., Aller P., Jaruga P., Dizdaroglu M., Wallace S.S., Doublié S. (2012) Structural and biochemical studies of a plant formamidopyrimidine-DNA glycosylase reveal why eukaryotic Fpg glycosylases do not excise 8-oxoguanine. *DNA Repair.* **11**, 714–725.

125. Yoshimura K., Ogawa T., Ueda Y., Shigeoka S. (2007) *AtNUDX1*, an 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate pyrophosphohydrolase, is responsible for eliminating oxidized nucleotides in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **48**, 1438–1449.

126. Duwat P., de Oliveira R., Ehrlich S.D., Boiteux S. (1995) Repair of oxidative DNA damage in Gram-positive bacteria: the *Lactococcus lactis* Fpg protein. *Microbiology.* **141**, 411–417.

127. Castaing B., Fourrey J.-L., Hervouet N., Thomas M., Boiteux S., Zelwer C. (1999) AP site structural determinants for Fpg specific recognition. *Nucl. Acids Res.* **27**, 608–615.

128. Serre L., Pereira de Jésus K., Boiteux S., Zelwer C., Castaing B. (2002) Crystal structure of the *Lactococcus lactis* formamidopyrimidine-DNA glycosylase bound to an abasic site analogue-containing DNA. *EMBO J.* **21**, 2854–2865.

129. Pereira de Jésus K., Serre L., Zelwer C., Castaing B. (2005) Structural insights into abasic site for Fpg specific binding and catalysis: comparative high-resolution crystallographic studies of Fpg bound to various models of abasic site analogues-containing DNA. *Nucl. Acids Res.* **33**, 5936–5944.

130. Suzuki M., Matsui K., Yamada M., Kasai H., Sofuni T., Nohmi T. (1997) Construction of mutants of *Salmonella typhimurium* deficient in 8-hydroxyguanine DNA glycosylase and their sensitivities to oxidative mutagens and nitro compounds. *Mutat. Res.* **393**, 233–246.

131. Mikawa T., Kato R., Sugahara M., Kuramitsu S. (1998) Thermostable repair enzyme for oxidative DNA damage from extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB8. *Nucl. Acids Res.* **26**, 903–910.

132. Sugahara M., Mikawa T., Kumasaka T., Yamamoto M., Kato R., Fukuyama K., Inoue Y., Kuramitsu S. (2000) Crystal structure of a repair enzyme of oxidatively damaged DNA, MutM (Fpg), from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. *EMBO J.* **19**, 3857–3869.

133. Sentürker S., Bauche C., Laval J., Dizdaroglu M. (1999) Substrate specificity of *Deinococcus radiodurans* Fpg protein. *Biochemistry.* **38**, 9435–9439.

134. Fromme J.C., Verdine G.L. (2002) Structural insights into lesion recognition and repair by the bacterial 8-oxoguanine DNA glycosylase MutM. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 544–552.

135. Qi Y., Spong M.C., Nam K., Banerjee A., Jiralerspong S., Karplus M., Verdine G.L. (2009) Encounter and extrusion of an intrahelical lesion by a DNA repair enzyme. *Nature.* **462**, 762–766.

136. Sung R.-J., Zhang M., Qi Y., Verdine G.L. (2012) Sequence-dependent structural variation in DNA undergoing intrahelical inspection by the DNA glycosylase MutM. *J. Biol. Chem.* **287**, 18044–18054.

137. Sung R.-J., Zhang M., Qi Y., Verdine G.L. (2013) Structural and biochemical analysis of DNA helix invasion by the bacterial 8-oxoguanine DNA glycosylase MutM. *J. Biol. Chem.* **288**, 10012–10023.

138. Nagorska K., Silhan J., Li Y., Pelicic V., Freemont P.S., Baldwin G.S., Tang C.M. (2012) A network of enzymes involved in repair of oxidative DNA damage in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **83**, 1064–1079.

139. Souza Arantes L., Gonçalves Vila Nova L., Resende B.C., Bitar M., Vale Coelho I.E., Miyoshi A., Azevedo V.A., dos Santos L.L., Machado C.R., de Oliveira Lopes D. (2016) The *Corynebacterium pseudotuberculosis* genome contains two formamidopyrimidine-DNA glycosylase enzymes, only one of which recognizes and excises 8-oxoguanine lesion. *Gene.* **575**, 233–243.

140. Davidsen T., Bjørås M., Seeberg E.C., Tønjum T. (2005) Antimutator role of DNA glycosylase MutY in pathogenic *Neisseria* species. *J. Bacteriol.* **187**, 2801–2809.

141. Eutsey R., Wang G., Maier R.J. (2007) Role of a MutY DNA glycosylase in combating oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*. *DNA Repair.* **6**, 19–26.

142. Robles A.G., Reid K., Roy F., Fletcher H.M. (2011) *Porphyromonas gingivalis mutY* is involved in the repair of oxidative stress-induced DNA mispairing. *Mol. Oral Microbiol.* **26**, 175–186.

143. Eberle R.J., Coronado M.A., Caruso I.P., Lopes D.O., Miyoshi A., Azevedo V., Arni R.K. (2015) Chemical and thermal influence of the $[4Fe–4S]^{2+}$ cluster of A/G-specific adenine glycosylase from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1850**, 393–400.

144. Cançado de Faria R., Gonçalves Vila-Nova L., Bitar M., Carvalho Resende B., Sousa Arantes L., Basso Rebelato A., Carvalho Azevedo V.A., Franco G.R., Machado C.R., dos Santos L.L., de Oliveira Lopes D. (2016) Adenine glycosylase MutY of *Corynebacterium pseudotuberculosis* presents the antimutator phenotype and evidences of glycosylase/AP lyase activity *in vitro*. *Infect. Genet. Evol.* **44**, 318–329.

145. Dos Vultos T., Blázquez J., Rauzier J., Matic I., Gicquel B. (2006) Identification of Nudix hydrolase family members with an antimutator role in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **188**, 3159–3161.

146. Patil A.G.G., Sang P.B., Govindan A., Varshney U. (2013) *Mycobacterium tuberculosis* MutT1 (Rv2985) and ADPRase (Rv1700) proteins constitute a two-stage mechanism of 8-oxo-dGTP and 8-oxo-GTP detoxification and adenosine to cytidine mutation avoidance. *J. Biol. Chem.* **288**, 11252–11262.

147. Arif S.M., Patil A.G., Varshney U., Vijayan M. (2017) Biochemical and structural studies of *Mycobacterium smegmatis* MutT1, a sanitization enzyme with unusual modes of association. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* **73**, 349–364.

148. Sasaki M., Yonemura Y., Kurusu Y. (2000) Genetic analysis of *Bacillus subtilis* mutator genes. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **46**, 183–187.

149. Castellanos-Juárez F.X., Álvarez-Álvarez C., Yasbin R.E., Setlow B., Setlow P., Pedraza-Reyes M. (2006) YtkD and MutT protect vegetative cells but not spores of *Bacillus subtilis* from oxidative stress. *J. Bacteriol.* **188**, 2285–2289.

150. Vidales L.E., Cárdenas L.C., Robleto E., Yasbin R.E., Pedraza-Reyes M. (2009) Defects in the error prevention oxidized guanine system potentiate stationary-phase mutagenesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **191**, 506–513.

151. Lian K., Leiros H.-K.S., Moe E. (2015) MutT from the fish pathogen *Aliivibrio salmonicida* is a cold-active nucleotide-pool sanitization enzyme with unexpectedly high thermostability. *FEBS Open Bio.* **5**, 107–116.

152. Santos-Escobar F., Gutiérrez-Corona J.F., Pedraza-Reyes M. (2014) Role of *Bacillus subtilis* error prevention oxidized guanine system in counteracting hexavalent chromium-promoted oxidative DNA damage. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 5493–5502.

153. Oliver A., Sánchez J.M., Blázquez J. (2002) Characterization of the GO system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **217**, 31–35.

154. Sanders L.H., Sudhakaran J., Sutton M.D. (2009) The GO system prevents ROS-induced mutagenesis and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **294**, 89–96.

155. Davidsen T., Amundsen E.K., Rødland E.A., Tønjum T. (2007) DNA repair profiles of disease-associated isolates of *Neisseria meningitidis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **49**, 243–251.

156. Davidsen T., Tuven H.K., Bjørås M., Rødland E.A., Tønjum T. (2007) Genetic interactions of DNA repair pathways in the pathogen *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* **189**, 5728–5737.

157. Canfield G.S., Schwingel J.M., Foley M.H., Vore K.L., Boonanantanasarn K., Gill A.L., Sutton M.D., Gill S.R. (2013) Evolution in fast forward: a potential role for mutators in accelerating *Staphylococcus aureus* pathoadaptation. *J. Bacteriol.* **195**, 615–628.

158. Martins-Pinheiro M., Oliveira A.R., Valencia A.O., Fernandez-Silva F.S., Silva L.G., Lopes-Kulishev C.O., Italiani V.C.S., Marques M.V., Menck C.F., Galhardo R.S. (2017) Molecular characterization of *Caulobacter crescentus* mutator strains. *Gene.* **626**, 251–257.

159. Fernández-Silva F.S., Schulz M.L., Alves I.R., Freitas R.R., Paes da Rocha R., Lopes-Kulishev C.O., Medeiros M.H.G., Galhardo R.S. (2020) Contribution of GO system glycosylases to mutation prevention in *Caulobacter crescentus*. *Environ. Mol. Mutagen.* **61**, 246–255.

160. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E., III, Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.-A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S., Barrell B.G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* **393**, 537–544.

161. Jain R., Kumar P., Varshney U. (2007) A distinct role of formamidopyrimidine DNA glycosylase (MutM) in down-regulation of accumulation of G, C mutations and protection against oxidative stress in mycobacteria. *DNA Repair.* **6**, 1774–1785.

162. Сидоренко В.С., Рот М.А., Филипенко М.Л., Невинский Г.А., Жарков Д.О. (2008) Новые ДНК-гликозилазы из *Mycobacterium tuberculosis*. *Биохимия*. **73**, 542–552.

163. Kurthkoti K., Srinath T., Kumar P., Malshetty V.S., Sang P.B., Jain R., Manjunath R., Varshney U. (2010) A distinct physiological role of MutY in mutation prevention in mycobacteria. *Microbiology.* **156**, 88–93.

164. Kurthkoti K., Varshney U. (2011) Base excision and nucleotide excision repair pathways in mycobacteria. *Tuberculosis.* **91**, 533–543.

165. Kurthkoti K., Varshney U. (2012) Distinct mechanisms of DNA repair in mycobacteria and their implications in attenuation of the pathogen growth. *Mech. Ageing Dev.* **133**, 138–146.

166. Hassim F., Papadopoulos A.O., Kana B.D., Gordhan B.G. (2015) A combinatorial role for MutY and Fpg DNA glycosylases in mutation avoidance in *Mycobacterium smegmatis*. *Mutat. Res.* **779**, 24–32.

167. Kurthkoti K., Kumar P., Jain R., Varshney U. (2008) Important role of the nucleotide excision repair pathway in *Mycobacterium smegmatis* in conferring protection against commonly encountered DNA-damaging agents. *Microbiology.* **154**, 2776–2785.

168. Mestre O., Hurtado-Ortiz R., Dos Vultos T., Namouchi A., Cimino M., Pimentel M., Neyrolles O., Gicquel B. (2013) High throughput phenotypic selection of *Mycobacterium tuberculosis* mutants with impaired resistance to reactive oxygen species identifies genes important for intracellular growth. *PLoS One*. **8**, e53486.

169. Olsen I., Balasingham S.V., Davidsen T., Debebe E., Rødland E.A., van Soolingen D., Kremer K., Alseth I., Tønjum T. (2009) Characterization of the major formamidopyrimidine-DNA glycosylase homolog in *Mycobacterium tuberculosis* and its linkage to variable tandem repeats. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **56**, 151–161.

170. Guo Y., Bandaru V., Jaruga P., Zhao X., Burrows C.J., Iwai S., Dizdaroglu M., Bond J.P., Wallace S.S. (2010) The oxidative DNA glycosylases of *Mycobacterium tuberculosis* exhibit different substrate preferences from their *Escherichia coli* counterparts. *DNA Repair.* **9**, 177–190.

171. Kinoshita-Daitoku R., Kiga K., Sanada T., Ogura Y., Bo Z., Iida T., Yokomori R., Kuroda E., Tanaka M., Sood A., Suzuki T., Nakai K., Hayashi T., Mimuro H. (2020) Mutational diversity in *mutY* deficient *Helicobacter pylori* and its effect on adaptation to the gastric environment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **525**, 806–811.

172. Eskra L., Canavessi A., Carey M., Splitter G. (2001) *Brucella abortus* genes identified following constitutive growth and macrophage infection. *Infect. Immun.* **69**, 7736–7742.

173. Baharoglu Z., Krin E., Mazel D. (2013) RpoS plays a central role in the SOS induction by sub-lethal aminoglycoside concentrations in *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.* **9**, e1003421.

174. Dupuy P., Howlader M., Glickman M.S. (2020) A multilayered repair system protects the mycobacterial chromosome from endogenous and antibiotic-induced oxidative damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**, 19517–19527.

175. Oliver A., Cantón R., Campo P., Baquero F., Blázquez J. (2000) High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science.* **288**, 1251–1253.

176. Mandsberg L.F., Ciofu O., Kirkby N., Christiansen L.E., Poulsen H.E., Høiby N. (2009) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 2483–2491.

177. Morero N.R., Argaraña C.E. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* deficient in 8-oxodeoxyguanine repair system shows a high frequency of resistance to ciprofloxacin. *FEMS Microbiol. Lett.* **290**, 217–226.

178. Mandsberg L.F., Maciá M.D., Bergmann K.R., Christiansen L.E., Alhede M., Kirkby N., Høiby N., Oliver A., Ciofu O. (2011) Development of antibiotic resistance and up-regulation of the antimutator gene *pfpI* in mutator *Pseudomonas aeruginosa* due to inactivation of two DNA oxidative repair genes (*mutY, mutM*). *FEMS Microbiol. Lett.* **324**, 28–37.

179. Couce A., Alonso-Rodriguez N., Costas C., Oliver A., Blázquez J. (2016) Intrapopulation variability in mutator prevalence among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**, 566.

180. Perrin A., Larsonneur E., Nicholson A.C., Edwards D.J., Gundlach K.M., Whitney A.M., Gulvik C.A., Bell M.E., Rendueles O., Cury J., Hugon P., Clermont D., Enouf V., Loparev V., Juieng P., Monson T., Warshauer D., Elbadawi L.I., Walters M.S., Crist M.B., Noble-Wang J., Borlaug G., Rocha E.P.C., Criscuolo A., Touchon M., Davis J.P., Holt K.E., McQuiston J.R., Brisse S. (2017) Evolutionary dynamics and genomic features of the *Elizabethkingia anophelis* 2015 to 2016 Wisconsin outbreak strain. *Nat. Commun.* **8**, 15483.

181. Bridges B.A. (1995) *mutY* "directs" mutation? *Nature.* **375**, 741.

182. Bridges B.A., Timms A.R. (1997) Mutation in *Escherichia coli* under starvation conditions: a new pathway leading to small deletions in strains defective in mismatch correction. *EMBO J.* **16**, 3349–3356.

183. Notley-McRobb L., Pinto R., Seeto S., Ferenci T. (2002) Regulation of *mutY* and nature of mutator mutations in *Escherichia coli* populations under nutrient limitation. *J. Bacteriol.* **184**, 739–745.

184. Raynes Y., Sniegowski P.D. (2014) Experimental evolution and the dynamics of genomic mutation rate modifiers. *Heredity.* **113**, 375–380.

185. Couce A., Tenaillon O. (2019) Mutation bias and GC content shape antimutator invasions. *Nat. Commun.* **10**, 3114.

186. Lu A.-L., Fawcett W.P. (1998) Characterization of the recombinant MutY homolog, an adenine DNA glycosylase, from yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **273**, 25098–25105.

187. Chang D.-Y., Lu A.-L. (2002) Functional interaction of MutY homolog with proliferating cell nuclear antigen in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem*. **277**, 11853–11858.

188. Chang D.-Y., Lu A.-L. (2005) Interaction of checkpoint proteins Hus1/Rad1/Rad9 with DNA base excision repair enzyme MutY homolog in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem*. **280**, 408–417.

189. Girard P.-M., Guibourt N., Boiteux S. (1997) The Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: A 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase/AP lyase whose lysine 241 is a critical residue for catalytic activity. *Nucl. Acids Res*. **25**, 3204–3211.

190. Karahalil B., Girard P.-M., Boiteux S., Dizdaroglu M. (1998) Substrate specificity of the Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: excision of guanine lesions produced in DNA by ionizing radiation- or hydrogen peroxide/metal ion-generated free radicals. *Nucl. Acids Res*. **26**, 1228–1232.

191. Thomas D., Scot A.D., Barbey R., Padula M., Boiteux S. (1997) Inactivation of *OGG1* increases the incidence of G · C → T · A transversions in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for endogenous oxidative damage in DNA in eukaryotic cells. *Mol. Gen. Genet*. **254**, 171–178.

192. Guibourt N., Boiteux S. (2000) Expression of the Fpg protein of *Escherichia coli* in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on spontaneous mutagenesis and sensitivity to oxidative DNA damage. *Biochimie*. **82**, 59–64.

193. Scott A.D., Neishabury M., Jones D.H., Reed S.H., Boiteux S., Waters R. (1999) Spontaneous mutation, oxidative DNA damage, and the roles of base and nucleotide excision repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **15**, 205–218.

194. Ni T.T., Marsischky G.T., Kolodner R.D. (1999) MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxo-guanine in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell*. **4**, 439–444.

195. Shockley A.H., Doo D.W., Rodriguez G.P., Crouse G.F. (2013) Oxidative damage and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic studies of pathways affecting replication fidelity of 8-oxoguanine. *Genetics*. **195**, 359–367.

196. Earley M.C., Crouse G.F. (1998) The role of mismatch repair in the prevention of base pair mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 15487–15491.

197. Pavlov Y.I., Mian I.M., Kunkel T.A. (2003) Evidence for preferential mismatch repair of lagging strand DNA replication errors in yeast. *Curr. Biol*. **13**, 744–748.

198. Haracska L., Yu S.-L., Johnson R.E., Prakash L., Prakash S. (2000) Efficient and accurate replication in the presence of 7,8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase η. *Nat. Genet*. **25**, 458–461.

199. de Padula M., Slezak G., Auffret van Der Kemp P., Boiteux S. (2004) The post-replication repair *RAD18* and *RAD6* genes are involved in the prevention of spontaneous mutations caused by 7,8-dihydro-8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res*. **32**, 5003–5010.

200. Yung C.-W., Okugawa Y., Otsuka C., Okamoto K., Arimoto S., Loakes D., Negishi K., Negishi T. (2008) Influence of neighbouring base sequences on the mutagenesis induced by 7,8-dihydro-8-oxoguanine in yeast. *Mutagenesis*. **23**, 509–513.

201. Auffret van der Kemp P., de Padula M., Burguiere-Slezak G., Ulrich H.D., Boiteux S. (2009) PCNA monoubiquitylation and DNA polymerase η ubiquitin-binding domain are required to prevent 8-oxoguanine-induced mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res*. **37**, 2549–2559.

202. Kaniak A., Dzierzbicki P., Rogowska A.T., Malc E., Fikus M., Ciesla Z. (2009) Msh1p counteracts oxidative lesion-induced instability of mtDNA and stimulates mitochondrial recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*. **8**, 318–329.

203. Bruner S.D., Nash H.M., Lane W.S., Verdine G.L. (1998) Repair of oxidatively damaged guanine in *Saccharomyces cerevisiae* by an alternative pathway. *Curr. Biol*. **8**, 393–403.

204. Sentürker S., Dizdaroglu M., Auffret van der Kemp P., You H.J., Doetsch P.W., Boiteux S. (1998) Substrate specificities of the Ntg1 and Ntg2 proteins of *Saccharomyces cerevisiae* for oxidized DNA bases are not identical. *Nucl. Acids Res*. **26**, 5270–5276.

205. Eide L., Bjørås M., Pirovano M., Alseth I., Berdal K.G., Seeberg E. (1996) Base excision of oxidative purine and pyrimidine DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae* by a DNA glycosylase with sequence similarity to endonuclease III from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 10735–10740.

206. You H.J., Swanson R.L., Doetsch P.W. (1998) *Saccharomyces cerevisiae* possesses two functional homologues of *Escherichia coli* endonuclease III. *Biochemistry*. **37**, 6033–6040.

207. You H.J., Swanson R.L., Harrington C., Corbett A.H., Jinks-Robertson S., Sentürker S., Wallace S.S., Boiteux S., Dizdaroglu M., Doetsch P.W. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* Ntg1p and Ntg2p: broad specificity N-glycosylases for the repair of oxidative DNA damage in the nucleus and mitochondria. *Biochemistry*. **38**, 11298–11306.

208. Ishchenko A.A., Yang X., Ramotar D., Saparbaev M. (2005) The 3' → 5' exonuclease of Apn1 provides an alternative pathway to repair 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol*. **25**, 6380–6390.

209. Mazurek A., Berardini M., Fishel R. (2002) Activation of human MutS homologs by 8-oxo-guanine DNA damage. *J. Biol. Chem*. **277**, 8260–8266.

210. Larson E.D., Iams K., Drummond J.T. (2003) Strand-specific processing of 8-oxoguanine by the human mismatch repair pathway: inefficient removal of 8-oxoguanine paired with adenine or cytosine. *DNA Repair*. **2**, 1199–1210.

211. Macpherson P., Barone F., Maga G., Mazzei F., Karran P., Bignami M. (2005) 8-Oxoguanine incorporation into DNA repeats *in vitro* and mismatch recognition by MutSα. *Nucl. Acids Res*. **33**, 5094–5105.

212. Pitsikas P., Lee D., Rainbow A.J. (2007) Reduced host cell reactivation of oxidative DNA damage in hu-

man cells deficient in the mismatch repair gene *hMSH2. Mutagenesis.* **22**, 235–243.

213. Viel A., Bruselles A., Meccia E., Fornasarig M., Quaia M., Canzonieri V., Policicchio E., Urso E.D., Agostini M., Genuardi M., Lucci-Cordisco E., Venesio T., Martayan A., Diodoro M.G., Sanchez-Mete L., Stigliano V., Mazzei F., Grasso F., Giuliani A., Baiocchi M., Maestro R., Giannini G., Tartaglia M., Alexandrov L.B., Bignami M. (2017) A specific mutational signature associated with DNA 8-oxoguanine persistence in MUTYH-defective colorectal cancer. *EBioMedicine.* **20**, 39–49.
214. Colussi C., Parlanti E., Degan P., Aquilina G., Barnes D., Macpherson P., Karran P., Crescenzi M., Dogliotti E., Bignami M. (2002) The mammalian mismatch repair pathway removes DNA 8-oxodGMP incorporated from the oxidized dNTP pool. *Curr. Biol.* **12**, 912–918.
215. McDowell H.D., Carney J.P., Wilson T.M. (2008) Inhibition of the 5' to 3' exonuclease activity of hEXO1 by 8-oxoguanine. *Environ. Mol. Mutagen.* **49**, 388–398.
216. Gu Y., Parker A., Wilson T.M., Bai H., Chang D.-Y., Lu A.-L. (2002) Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with mismatch repair proteins human MutS homolog 2/human MutS homolog 6. *J. Biol. Chem.* **277**, 11135–11142.
217. Repmann S., Olivera-Harris M., Jiricny J. (2015) Influence of oxidized purine processing on strand directionality of mismatch repair. *J. Biol. Chem.* **290**, 9986–9999.
218. Gogos A., Clarke N.D. (1999) Characterization of an 8-oxoguanine DNA glycosylase from *Methanococcus jannaschii*. *J. Biol. Chem.* **274**, 30447–30450.
219. Faucher F., Duclos S., Bandaru V., Wallace S.S., Doublié S. (2009) Crystal structures of two archaeal 8-oxoguanine DNA glycosylases provide structural insight into guanine/8-oxoguanine distinction. *Structure.* **17**, 703–712.
220. Faucher F., Wallace S.S., Doublié S. (2010) The C-terminal lysine of Ogg2 DNA glycosylases is a major molecular determinant for guanine/8-oxoguanine distinction. *J. Mol. Biol.* **397**, 46–56.
221. Chung J.H., Suh M.-J., Park Y.I., Tainer J.A., Han Y.S. (2001) Repair activities of 8-oxoguanine DNA glycosylase from *Archaeoglobus fulgidus*, a hyperthermophilic archaeon. *Mutat. Res.* **486**, 99–111.
222. Fujii M., Hata C., Ukita M., Fukushima C., Matsuura C., Kawashima-Ohya Y., Tomobe K., Kawashima T. (2016) Characterization of a thermostable 8-oxoguanine DNA glycosylase specific for GO/N mismatches from the thermoacidophilic archaeon *Thermoplasma volcanium*. *Archaea*. **2016**, 8734894.
223. Sartori A.A., Lingaraju G.M., Hunziker P., Winkler F.K., Jiricny J. (2004) *Pa*-AGOG, the founding member of a new family of archaeal 8-oxoguanine DNA-glycosylases. *Nucl. Acids Res.* **32**, 6531–6539.
224. Lingaraju G.M., Sartori A.A., Kostrewa D., Prota A.E., Jiricny J., Winkler F.K. (2005) A DNA glycosylase from *Pyrobaculum aerophilum* with an 8-oxoguanine binding mode and a noncanonical helix-hairpin-helix structure. *Structure.* **13**, 87–98.
225. Lingaraju G.M., Prota A.E., Winkler F.K. (2009) Mutational studies of *Pa*-AGOG DNA glycosylase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *DNA Repair.* **8**, 857–864.
226. Zhang L., Li Y., Shi H., Zhang D., Yang Z., Oger P., Zheng J. (2019) Biochemical characterization and mutational studies of the 8-oxoguanine DNA glycosylase from the hyperthermophilic and radioresistant archaeon *Thermococcus gammatolerans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 8021–8033.
227. Gehring A.M., Zatopek K.M., Burkhart B.W., Potapov V., Santangelo T.J., Gardner A.F. (2020) Biochemical reconstitution and genetic characterization of the major oxidative damage base excision DNA repair pathway in *Thermococcus kodakarensis*. *DNA Repair.* **86**, 102767.
228. White M.F., Allers T. (2018) DNA repair in the archaea – an emerging picture. *FEMS Microbiol. Rev.* **42**, 514–526.
229. Ishino S., Nishi Y., Oda S., Uemori T., Sagara T., Takatsu N., Yamagami T., Shirai T., Ishino Y. (2016) Identification of a mismatch-specific endonuclease in hyperthermophilic Archaea. *Nucl. Acids Res.* **44**, 2977–2986.
230. Al-Tassan N., Chmiel N.H., Maynard J., Fleming N., Livingston A.L., Williams G.T., Hodges A.K., Davies D.R., David S.S., Sampson J.R., Cheadle J.P. (2002) Inherited variants of *MYH* associated with somatic G:C → T:A mutations in colorectal tumors. *Nat. Genet.* **30**, 227–232.
231. Chmiel N.H., Livingston A.L., David S.S. (2003) Insight into the functional consequences of inherited variants of the hMYH adenine glycosylase associated with colorectal cancer: complementation assays with hMYH variants and pre-steady-state kinetics of the corresponding mutated *E. coli* enzymes. *J. Mol. Biol.* **327**, 431–443.
232. Livingston A.L., Kundu S., Pozzi M.H., Anderson D.W., David S.S. (2005) Insight into the roles of tyrosine 82 and glycine 253 in the *Escherichia coli* adenine glycosylase MutY. *Biochemistry.* **44**, 14179–14190.
233. Pope M.A., Chmiel N.H., David S.S. (2005) Insight into the functional consequences of hMYH variants associated with colorectal cancer: distinct differences in the adenine glycosylase activity and the response to AP endonucleases of Y150C and G365D murine MYH. *DNA Repair.* **4**, 315–325.
234. Jones S., Emmerson P., Maynard J., Best J.M., Jordan S., Williams G.T., Sampson J.R., Cheadle J.P. (2002) Biallelic germline mutations in *MYH* predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C → T:A mutations. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2961–2967.
235. Sieber O.M., Lipton L., Crabtree M., Heinimann K., Fidalgo P., Phillips R.K.S., Bisgaard M.-L., Orntoft T.F., Aaltonen L.A., Hodgson S.V., Thomas H.J.W., Tomlinson I.P.M. (2003) Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N. Engl. J. Med.* **348**, 791–799.
236. Sampson J.R., Dolwani S., Jones S., Eccles D., Ellis A., Evans D.G., Frayling I., Jordan S., Maher E.R., Mak T., Maynard J., Pigatto F., Shaw J., Cheadle J.P. (2003) Autosomal recessive colorectal adenomatous polypo-

sis due to inherited mutations of MYH. *Lancet.* **362**, 39–41.

237. Farrington S.M., Tenesa A., Barnetson R., Wiltshire A., Prendergast J., Porteous M., Campbell H., Dunlop M.G. (2005) Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects. *Am. J. Hum. Genet.* **77**, 112–119.
238. Nielsen M., Infante E., Brand R. (2019) in *GeneReviews™ [Internet].* Eds Adam M.P., Ardinger H.H., Pagon R.A., Wallace S.E., Bean L.J.H., Stephens K., Amemiya A. Seattle, WA: Univ. Washington Seattle.
239. Short E., Sampson J. (2019) The role of inherited genetic variants in colorectal polyposis syndromes. *Adv. Genet.* **103**, 183–217.
240. Curia M.C., Catalano T., Aceto G.M. (2020) MUTYH: not just polyposis. *World J. Clin. Oncol.* **11**, 428–449.
241. Alexandrov L.B., Nik-Zainal S., Wedge D.C., Aparicio S.A.J.R., Behjati S., Biankin A.V., Bignell G.R., Bolli N., Borg A., Børresen-Dale A.-L., Boyault S., Burkhardt B., Butler A.P., Caldas C., Davies H.R., Desmedt C., Eils R., Eyfjörd J.E., Foekens J.A., Greaves M., Hosoda F., Hutter B., Ilicic T., Imbeaud S., Imielinski M., Jäger N., Jones D.T.W., Jones D., Knappskog S., Kool M., Lakhani S.R., López-Otín C., Martin S., Munshi N.C., Nakamura H., Northcott P.A., Pajic M., Papaemmanuil E., Paradiso A., Pearson J.V., Puente X.S., Raine K., Ramakrishna M., Richardson A.L., Richter J., Rosenstiel P., Schlesner M., Schumacher T.N., Span P.N., Teague J.W., Totoki Y., Tutt A.N.J., Valdés-Mas R., van Buuren M.M., van 't Veer L., Vincent-Salomon A., Waddell N., Yates L.R., Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, ICGC Breast Cancer Consortium, ICGC MMML-Seq Consortium, ICGC PedBrain, Zucman-Rossi J., Futreal P.A., McDermott U., Lichter P., Meyerson M., Grimmond S.M., Siebert R., Campo E., Shibata T., Pfister S.M., Campbell P.J., Stratton M.R. (2013) Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature.* **500**, 415–421.
242. Simonelli V., Camerini S., Mazzei F., Van Loon B., Allione A., D'Errico M., Barone F., Minoprio A., Ricceri F., Guarrera S., Russo A., Dalhus B., Crescenzi M., Hübscher U., Bjørås M., Matullo G., Dogliotti E. (2013) Genotype–phenotype analysis of S326C OGG1 polymorphism: a risk factor for oxidative pathologies. *Free Radic. Biol. Med.* **63**, 401–409.
243. Kang S.W., Kim S.K., Park H.J., Chung J.-H., Ban J.Y. (2017) Human 8-oxoguanine DNA glycosylase gene polymorphism (Ser326Cys) and cancer risk: updated meta-analysis. *Oncotarget.* **8**, 44761–44775.
244. Kohno T., Shinmura K., Tosaka M., Tani M., Kim S.-R., Sugimura H., Nohmi T., Kasai H., Yokota J. (1998) Genetic polymorphisms and alternative splicing of the *hOGG1* gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene.* **16**, 3219–3225.
245. Luna L., Rolseth V., Hildrestrand G.A., Otterlei M., Dantzer F., Bjørås M., Seeberg E. (2005) Dynamic relocalization of hOGG1 during the cell cycle is disrupted in cells harbouring the hOGG1-Cys^{326} polymorphic variant. *Nucl. Acids Res.* **33**, 1813–1824.
246. Hill J.W., Evans M.K. (2006) Dimerization and opposite base-dependent catalytic impairment of polymorphic S326C OGG1 glycosylase. *Nucl. Acids Res.* **34**, 1620–1632.
247. Bravard A., Vacher M., Moritz E., Vaslin L., Hall J., Epe B., Radicella J.P. (2009) Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity. *Cancer Res.* **69**, 3642–3649.
248. Kershaw R.M., Hodges N.J. (2012) Repair of oxidative DNA damage is delayed in the Ser326Cys polymorphic variant of the base excision repair protein OGG1. *Mutagenesis.* **27**, 501–510.
249. Moritz E., Pauly K., Bravard A., Hall J., Radicella J.P., Epe B. (2014) hOGG1-Cys326 variant cells are hypersensitive to DNA repair inhibition by nitric oxide. *Carcinogenesis.* **35**, 1426–1433.
250. Yakushiji H., Maraboeuf F., Takahashi M., Deng Z.-S., Kawabata S.-I., Nakabeppu Y., Sekiguchi M. (1997) Biochemical and physicochemical characterization of normal and variant forms of human MTH1 protein with antimutagenic activity. *Mutat. Res.* **384**, 181–194.
251. Sakai Y., Oda H., Yoshimura D., Furuichi M., Kang D., Iwai S., Hara T., Nakabeppu Y. (2006) The GT to GC single nucleotide polymorphism at the beginning of an alternative exon 2C of human *MTH1* gene confers an amino terminal extension that functions as a mitochondrial targeting signal. *J. Mol. Med.* **84**, 660–670.
252. Kimura Y., Oda S., Egashira A., Kakeji Y., Baba H., Nakabeppu Y., Maehara Y. (2004) A variant form of *hMTH1*, a human homologue of the *E coli mutT* gene, correlates with somatic mutation in the *p53* tumour suppressor gene in gastric cancer patients. *J. Med. Genet.* **41**, e57.
253. Miyako K., Kohno H., Ihara K., Kuromaru R., Matsuura N., Hara T. (2004) Association study of human *MTH1* gene polymorphisms with type 1 diabetes mellitus. *Endocr. J.* **51**, 493–498.
254. Kohno T., Sakiyama T., Kunitoh H., Goto K., Nishiwaki Y., Saito D., Hirose H., Eguchi T., Yanagitani N., Saito R., Sasaki-Matsumura R., Mimaki S., Toyama K., Yamamoto S., Kuchiba A., Sobue T., Ohta T., Ohki M., Yokota J. (2006) Association of polymorphisms in the *MTH1* gene with small cell lung carcinoma risk. *Carcinogenesis.* **27**, 2448–2454.
255. Cao L., Zhou W., Zhu Y., Guo W., Cai Z., He X., Xie Y., Li X., Zhu D., Wang Y. (2013) Combined analysis of polymorphism variants in *hMTH1, hOGG1* and *MUTYH* genes on the risk of type 2 diabetes in the Chinese population. *Gene.* **519**, 50–54.
256. Fleming A.M., Burrows C.J. (2017) 8-Oxo-7,8-dihydroguanine, friend and foe: epigenetic-like regulator versus initiator of mutagenesis. *DNA Repair.* **56**, 75–83.
257. Fleming A.M., Ding Y., Burrows C.J. (2017) Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, 2604–2609.
258. Tahara Y.-k., Kietrys A.M., Hebenbrock M., Lee Y., Wilson D.L., Kool E.T. (2019) Dual inhibitors of 8-oxoguanine surveillance by OGG1 and NUDT1. *ACS Chem. Biol.* **14**, 2606–2615.
259. Warpman Berglund U., Sanjiv K., Gad H., Kalderén C., Koolmeister T., Pham T., Gokturk C., Jafari R., Maddalo G., Seashore-Ludlow B., Chernobrovkin A.,

Manoilov A., Pateras I.S., Rasti A., Jemth A.-S., Almlöf I., Loseva O., Visnes T., Einarsdottir B.O., Gaugaz F.Z., Saleh A., Platzack B., Wallner O.A., Vallin K.S.A., Henriksson M., Wakchaure P., Borhade S., Herr P., Kallberg Y., Baranczewski P., Homan E., Wiita E., Nagpal V., Meijer T., Schipper N., Rudd S., Bräutigam L., Lindqvist A., Filppula A., Lee T.-C., Artursson P., Nilsson J.A., Gorgoulis V.G., Lehtiö J., Zubarev R.A., Scobie M., Helleday T. (2016) Validation and development of MTH1 inhibitors for treatment of cancer. *Ann. Oncol.* **27**, 2275–2283.

260. Hua X., Sanjiv K., Gad H., Pham T., Gokturk C., Rasti A., Zhao Z., He K., Feng M., Zang Y., Zhang J., Xia Q., Helleday T., Warpman Berglund U. (2019) Karonudib is a promising anticancer therapy in hepatocellular carcinoma. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **11**, 1758835919866960.

261. Magkouta S.F., Pappas A.G., Vaitsi P.C., Agioutantis P.C., Pateras I.S., Moschos C.A., Iliopoulou M.P., Kosti C.N., Loutrari H.V., Gorgoulis V.G., Kalomenidis I.T. (2020) MTH1 favors mesothelioma progression and mediates paracrine rescue of bystander endothelium from oxidative damage. *JCI Insight*. **5**, e134885.

262. Samaranayake G.J., Huynh M., Rai P. (2017) MTH1 as a chemotherapeutic target: the elephant in the room. *Cancers*. **9**, 47.

263. Mechetin G.V., Endutkin A.V., Diatlova E.A., Zharkov D.O. (2020) Inhibitors of DNA glycosylases as prospective drugs. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3118.

GO SYSTEM, A DNA REPAIR PATHWAY TO COPE WITH OXIDATIVE DAMAGE

A. V. Endutkin[1, *] and D. O. Zharkov[1, 2, **]

[1]*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

[2]*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: aend@niboch.nsc.ru*

***e-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru*

The GO system is part of the DNA base excision repair pathway and is required for the error-free repair of 8-oxoguanine (oxoG), one of the most common oxidative DNA lesions. Due to the ability of oxoG to form oxoG:A mispairs, this base is highly mutagenic, and its repair requires the action of two enzymes: 8-oxoguanine DNA glycosylase (Fpg or MutM in bacteria, OGG1 in eukaryotes), which removes oxoG from oxoG:C pairs, and adenine DNA glycosylase (MutY in bacteria, MUTYH in eukaryotes), which removes A from oxoG:A mispairs to prevent mutations. The third enzyme of the system (MutT in bacteria, MTH1 or NUDT1 in eukaryotes) hydrolyzes 8-oxo-2'-deoxyguanosine triphosphate, preventing its incorporation into DNA. Recent data point to the GO system proteins as promising targets for the therapy of cancer and autoimmune diseases and bacterial infections. The review highlights the structure and specificity of the GO system in bacteria and eukaryotes and its unique role in mutation avoidance.

Keywords: DNA damage, DNA repair, mutagenesis, oxidative stress, 8-oxoguanine, DNA glycosylases, nucleoside triphosphate hydrolases

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 2, с. 243–257

ЭНЗИМОЛОГИЯ СИСТЕМ РЕПАРАЦИИ ДНК

УДК 577.151.45

МУТАЦИОННЫЙ И КИНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭНДОРИБОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ APE1

© 2021 г. А. А. Кузнецова[a], А. А. Гаврилова[a, b], Д. С. Новопашина[a], О. С. Федорова[a, *], Н. А. Кузнецов[a, **]

[a] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия*

[b] *Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия*

**e-mail: fedorova@niboch.nsc.ru*

***e-mail: nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru*

Поступила в редакцию 14.09.2020 г.
После доработки 09.11.2020 г.
Принята к публикации 09.11.2020 г.

Апуриновая/апиримдиновая эндонуклеаза 1 человека (APE1) крайне важна для нормального функционирования организма, так как участвует в системе репарации ДНК. Основной биологической функцией APE1 считается Mg^{2+}-зависимый гидролиз AP-сайтов в ДНК. На основе структурных данных, кинетических исследований и мутационного анализа в настоящее время установлены ключевые этапы взаимодействия APE1 с поврежденной ДНК. Недавно показано, что APE1 выступает в качестве эндорибонуклеазы, которая может катализировать гидролиз мРНК по некоторым пиримидин-пуриновым сайтам и тем самым контролировать уровень определенных транскриптов. Известно, что для реализации эндорибонуклеазной активности APE1 не требуется присутствия ионов Mg^{2+}, как в случае AP-эндонуклеазной активности, что свидетельствует о различиях в механизмах катализа в случаях РНК- и ДНК-субстратов, однако причины этих различий пока до конца не выяснены. Нами исследован эндорибонуклеазный гидролиз модельных РНК-субстратов ферментом APE1 дикого типа и мутантными формами, содержащими замены аминокислотных остатков активного центра: Y171F, R177F, R181A, D210N, N212A, T268D, M270A и D308A. Показано, что замена остатков Asn212, Asp210 и Tyr171 приводит к потере только AP-эндонуклеазной активности с сохранением эндорибонуклеазной, T268D и M270A – к потере специфичности фермента к пиримидин-пуриновым последовательностям, Arg177 и Arg181 незначительно влияет на активность APE1, в то время как D308A приводит к снижению эндорибонуклеазной активности фермента.

Ключевые слова: AP-эндонуклеаза 1 человека, APE1, эндорибонуклеазная активность, активный центр, сайт-направленный мутагенез, РНК-субстраты

DOI: 10.31857/S0026898421020099

ВВЕДЕНИЕ

Апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза человека APE1 – один из ферментов, принимающих участие в процессе эксцизионной репарации оснований ДНК. Основной биологической функцией APE1 считается гидролиз фосфодиэфирной связи с 5'-стороны от апурин/апиримидиновых сайтов (AP-сайтов), в результате чего на концах разрыва цепи образуются 5'-дезоксирибозофосфат и 3'-OH группа, необходимая полимеразе для встраивания неповрежденного нуклеотида. Это AP-эндонуклеазная активность APE1. Однако, еще в 2004 году Gros и соавт. [1] обнаружили, что фермент может узнавать в качестве субстратов не только AP-сайты, но и поврежденные нуклеозиды (nucleotide incision repair, NIR), например 5,6-дигидроуридин, α-аномер аденозина и другие. Также APE1 обладает 3'-фосфодиэстеразной, 3'-фосфатазной [2] и 3'-5'-экзонуклеазной [3, 4] активностями. Наряду с репарационной активностью APE1 выполняет роль окислительно-восстановительного фактора [5].

Показано, что APE1 вызывает деградацию цепи РНК в дуплексах ДНК–РНК (РНКаза H-подобная активность) [6], гидролизует РНК, содержащую AP-сайт [7], а также структурированные

Сокращения: aPu – 2-аминопурин; BHQ1 (Black Hole Quencher-1) – тушитель флуоресценции; F – 2-гидроксиметил-3-гидроксителрагидрофуран; FAM – 6-карбоксифлуоресцеин; C^{Py} – пироллоцитозин; NIR (nucleotide incision repair) – инцизионная репарация нуклеотидов.

неповрежденные мРНК, например мРНК c-Myc, преимущественно по сайтам UA, UG и CA [8, 9]. Способность гидролизовать РНК выявлена также на микроРНК, мРНК CD44, РНК-компонентах коронавируса SARS [10]. Barnes и соавт. [8] предположили, что одной из функций цитоплазматического фермента APE1 в клетке может быть эндорибонуклеазный гидролиз мРНК, и установили, что в отличие от AP-эндонуклеазной активности, для эндорибонуклеазной активности APE1 не требуется ион металла. Из этого был сделан вывод о различных механизмах катализа APE1 на ДНК- и РНК-субстратах. Несмотря на интенсивное изучение функциональных особенностей фермента APE1, до сих пор неизвестно, каким образом фермент узнает значительно отличающиеся по своей природе и структуре поврежденные 2'-дезоксирибонуклеотиды и неповрежденные рибонуклеотиды.

Из рентгеноструктурных данных [11] следует, что активный центр фермента образован аминокислотными остатками Asp308, His309, Glu96, Asp210, Asp70, Tyr171, Asn212 и Asn174. В комплексе APE1 с ДНК остатки Arg73, Ala74, Lys78 взаимодействуют с тремя последовательными фосфатами на противоположной от AP-сайта цепи ДНК. Аминокислотные остатки Tyr128, Gly127 выступают в роли клина и расширяют малую бороздку дуплекса. Остатки Met270 и Arg177 стабилизируют внеспиральное положение AP-сайта; при этом Met270 вытесняет основание, находящееся напротив AP-сайта, внедряясь в малую бороздку ДНК, а Arg177 встраивается со стороны большой бороздки ДНК и образует водородную связь с фосфатной группой, расположенной с 3'-стороны от AP-сайта. Координация фосфатной группы, расположенной с 5'-стороны от AP-сайта, остатками Asn174, Asn212, His309 приводит фермент-субстратный комплекс в каталитически компетентное состояние. В связывании иона металла в активном сайте APE1 участвуют Asp70, Glu96 и Asp308. С помощью сайт-направленного мутагенеза показано [12], что замена Asp219Ala снижает и ДНК-связывающую, и AP-эндонуклеазную активности фермента; при этом замена остатков Asp90, Glu96 и Asp308 на Ala приводит к снижению эндонуклеазной активности с сохранением ДНК-связывающей активности. Остатки Arg73, Ala74 и Lys78 контактируют с фосфатными группами комплементарной цепи с 5'-стороны от AP-сайта. Остатки Tyr128 и Gly127 располагаются в малой бороздке ДНК, что приводит к ее расширению приблизительно на 2 Å. Каталитическая реакция начинается с нуклеофильной атаки атома кислорода молекулы воды, координированной прямо или опосредованно через ион Mg^{2+} остатком Asp210 [11, 13, 14]. Предложены также альтернативные механизмы катализа [15], согласно которым остаток Tyr171 в фенолятной форме взаимодействует с гидролизуемой фосфатной группой или остаток His309 выступает в качестве нуклеофильного основания.

Мирошникова и др. показали [14], что при взаимодействии APE1 с ДНК-субстратом, содержащим F-сайт, природа двухвалентного иона металла влияет как на связывание ДНК, так и на каталитический гидролиз 5'-фосфодиэфирной связи. Так, ионы Cu^{2+} полностью ингибируют связывание ДНК, вероятно, вследствие сильного взаимодействия Cu^{2+} с дезоксирибозофосфатным остовом ДНК. Ионы Ca^{2+} также ингибируют AP-эндонуклеазную активность фермента, вероятно, вследствие неправильного расположения иона металла в активном сайте фермента из-за большего по сравнению с Mg^{2+} ионного радиуса. Другие ионы снижают ферментативную активность APE1 в следующем порядке: $Mg^{2+} < Mn^{2+} < Ni^{2+} < Zn^{2+}$. Кроме того, установлено, что ионы металлов оказывают влияние как на способность фермента связывать ДНК, так и на его структуру [14].

Сравнивая AP-эндонуклеазную и эндорибонуклеазную активности APE1, можно заметить ряд отличий. Для проявления AP-эндонуклеазной активности APE1 с ДНК-субстратами необходимы ионы Mg^{2+}, тогда как присутствие в реакционной смеси ионов Ca^{2+} блокирует действие фермента. В случае РНК-субстратов APE1 работает как в отсутствие ионов двухвалентных металлов, так и в присутствии ионов кальция. Кроме того, Kim и соавт. показали [16], что при гидролизе фосфодиэфирной связи в РНК-субстратах в качестве конечного продукта реакции образуется 3'-PO_4^{2-}, а не 3'-OH, как в случае ДНК-субстратов. Следовательно, механизм реакции гидролиза, реализуемый APE1 на разных типах субстратов, различен.

В этой же работе [16] исследована активность различных мутантных форм APE1: H309N, E96A [9], N68A, D70A, Y171F, D210N, F266A, D283N, D308A и H309S. В результате сравнительного анализа активности этих мутантных форм APE1 по отношению к модельным РНК- и ДНК-субстратам показано, что большинство перечисленных остатков, критичных для гидролиза AP-сайта в ДНК, важны также и для гидролиза РНК, за исключением остатка Asp283, замена которого приводила только к потере AP-эндонуклеазной, но не рибоэндонуклеазной активности.

Однако на сегодняшний день так и не установлено, как APE1 узнает неповрежденные рибонуклеотиды, насколько важно пространственное строение субстрата, какие конкретно аминокислотные остатки активного центра APE1 участвуют в узнавании РНК-субстрата и каталитическом гидролизе фосфодиэфирной связи.

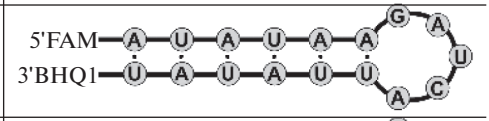
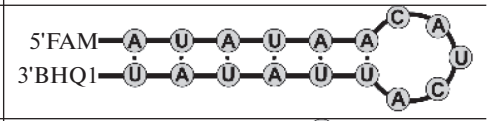
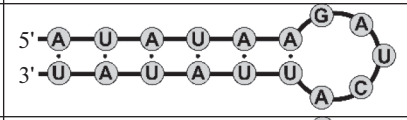
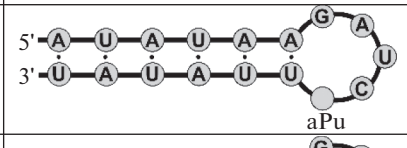
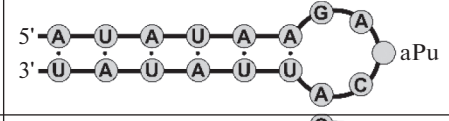
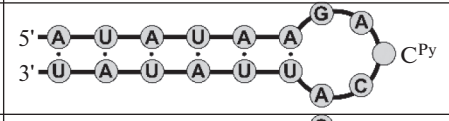
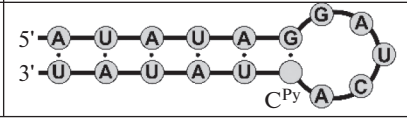
Нами проведен сравнительный анализ эндорибонуклеазного гидролиза модельных РНК-субстратов ферментом APE1 дикого типа и его мутантными формами, содержащими замены аминокислотных остатков активного центра: Y171F, R177F, R181A, D210N, N212A, T268D, M270A и D308A. Впервые получены данные о связывании исследованных мутантных форм APE1 с модельным РНК-субстратом, а также о конформационных превращениях фермента и РНК при образовании фермент-субстратного комплекса. Полученные данные позволили детализировать роль проанализированных аминокислотных остатков в реализации АР-эндонуклеазной, 3'-5'-экзонуклеазной и эндорибонуклеазной активности APE1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использовали реактивы производства “Sigma-Aldrich” (США): акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, 2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол (Tris), тетраметилэтилендиамин (TEMED), мочевина, борная кислота, дитиотреитол (DTT), этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) и ее натриевая соль, Coomassie Brilliant Blue G-250, пероксодисульфат аммония, 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), додецилсульфат натрия (SDS), хлорид кальция, хлорид магния, хлорид калия, глицерин. Все растворы готовили на дважды дистиллированной воде.

ДНК- и РНК-субстраты. Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 (“Биоссет”, Россия) с использованием коммерческих амидофосфитов 2'-дезоксирибонуклеозидов и CPG-носителей (“Glen Research”, США) (табл. 1). Синтезированные олигонуклеотиды очищали с помощью ВЭЖХ на ионообменной колонке PRP-X500 (12–30 мкм) размером 3.9 × 300 мм (“Hamilton”, Великобритания) и последующей

Таблица 1. Модельные ДНК- и РНК-субстраты, использованные в работе

Субстрат	Последовательность[a], 5'→3'	Структура
F/G	FAM-d(GCTCAFGTACAGAGCTG)/ BHQ1-d(CAGCTCTGTACGTGAGC)	
HP1	FAM-r(AUAUAAGAUCAUUAUAU)-BHQ1'	
HP2	FAM-r(AUAUAACAUCAUUAUAU)-BHQ1	
$HP1^{Trp}$	r(AUAUAAGAUCAUUAUAU)	
$HP1^{C\text{-}aPu}$	r(AUAUAAGAUC)-d(aPu)-r(UUAUAU)	
$HP1^{aPu\text{-}CA}$	r(AUAUAAGA)-d(aPu)-r(CAUUAUAU)	
$HP1^{CPy\text{-}CA}$	r(AUAUAAGA)-d(C^{Py})-r(CAUUAUAU)	
$HP1^{CA\text{-}CPy}$	r(AUAUAGGAUCA)-d(C^{Py})-r(UAUAU)	

[a]Обозначения: F – 2-гидроксиметил-3-гидроксителрагидрофуран, FAM – 6-карбоксифлуоресцеин, BHQ1 – тушитель флуоресценции, aPu – 2-аминопурин, C^{Py} – пироллоцитозин.

обращенофазовой хроматографии на колонке Bondapak C18 (15–20 мкм) размером 3.9 × 300 мм ("Waters", Ирландия).

Олигорибонуклеотиды получали твердофазным фосфитамидным методом с использованием соответствующих фосфитамидов 2'-O-трет-бутилдиметилсилильных (2'-O-TBDMS) рибонуклеотидов ("ChemGenes", США). Для введения флуоресцеина на 5'-конец использовали фосфитамид флуоресцеина ("Glen Research"). Для получения олигонуклеотидов, содержащих на 3'-конце тушитель флуоресценции BHQ1 (Black Hole Quencher-1), использовали соответствующий модифицированный полимерный носитель 3'-BHQ-1 CPG ("Glen Research"). Деблокирование олигорибонуклеотидов проводили в стандартных условиях. Деблокированные олигорибонуклеотиды выделяли с помощью препаративного электрофореза в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях (акриламид: N,N'-метиленбисакриламид (30 : 1), 8 М мочевина, 50 мМ Трис-H_3BO_3, pH 8.3, 0.1 мМ EDTA) при напряжении 50 В/см и толщине геля 0.4 мм. Полосы геля, содержащие продукт, вырезали и проводили элюцию нуклеотидного материала из ПААГ. Для этого измельченный гель помещали в 2-миллилитровую пробирку, заливали 1–1.5 мл 0.3 М $LiClO_4$ и выдерживали 16 ч при 25°C и перемешивании на термомиксере (Thermomixer Compact; "Eppendorf", Германия). Обессоливание олигонуклеотидов проводили на колонке с C18 ("Waters", США). Чистоту олигонуклеотидов проверяли с помощью денатурирующего электрофореза в 15%-ном ПААГ с последующим окрашиванием красителем Stains-all ("Sigma-Aldrich").

Оптическое поглощение растворов олигонуклеотидов измеряли на спектрофотометре NanoDrop 1000 ("Thermo Fisher Scientific", США) относительно деионизованной воды. Для расчета концентрации олигонуклеотидов в исходном растворе использовали коэффициент молярного поглощения олигорибонуклеотидов или их конъюгатов при 260 нм. Молярные коэффициенты поглощения флуоресцентно меченных производных олигорибонуклеотидов считали равными сумме значений молярных коэффициентов поглощения олигонуклеотидов и молярного коэффициента поглощения флуоресцеина и тушителя, присоединенного к олигомеру (20900 $М^{-1} \cdot см^{-1}$ для FAM и 8000 $М^{-1} \cdot см^{-1}$ для BHQ1).

Последовательности модельных ДНК- и РНК-субстратов представлены в табл. 1.

Фермент APE1 дикого типа и его мутантные формы. Фермент APE1 дикого типа выделен из линии клеток *Escherichia coli* Rosetta 2, трансформированных плазмидой pET11a, несущей ген АР-эндонуклеазы человека, по следующей методике. Культуру клеток *E. coli* Rosetta 2 выращивали в среде LB (1 л), содержащей 50 мкг/мл ампициллина, при температуре 37°C до оптического поглощения среды 0.6–0.7 при длине волны (λ) 600 нм; после чего температуру понижали до 20°C, добавляли изопропил-β-*D*-тиогалактопиранозид до концентрации 0.2 мМ и инкубировали в течение 16 ч при перемешивании. Клетки осаждали центрифугированием (10 мин при 4000 × *g*) и ресуспендировали в 30 мл буферного раствора (RB1), содержащего 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.8, и 40 мМ NaCl. Для разрушения клеток использовали френч-пресс. Все последующие процедуры проводили при 4°C. Полученный клеточный экстракт центрифугировали (40 мин при 40000 × *g*), супернатант наносили на колонку I (30 мл, Q-Sepharose Fast Flow; "Amersham Biosciences", Швеция) и промывали RB1. Фракции, содержащие белок APE1, собирали и наносили на колонку II (HiTrap-Heparin™; "Amersham Biosciences"). Хроматографию проводили в буферном растворе RB1 и линейном градиенте 40→600 мМ NaCl, оптическое поглощение раствора регистрировали на длине волны 280 нм. Степень чистоты белка APE1 определяли электрофорезом в SDS-ПААГ. Фракции, содержащие белок APE1, диализовали в буфере, содержащем 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.5, 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 250 мМ NaCl, 50% глицерин, и хранили при –20°C. Концентрацию фермента рассчитывали из значения оптического поглощения белка при 280 нм и коэффициента молярной экстинкции (ε), равного 56818 $М^{-1} \cdot см^{-1}$.

Мутантные формы APE1, содержащие замены Y171F, R177F, R181A, D210N, N212A, T268D, M270A и D308A, выделяли таким же способом за исключением того, что клетки *E. coli* были трансформированы экспрессионными векторами, несущими соответствующие нуклеотидные замены, как описано ранее [17]. Мутантные формы APE1, содержащие замены Y171F, R177F и R181A, были получены впервые, для этого методом сайт-направленного мутагенеза в ген фермента были введены соответствующие мутации (QuikChange XL; "Stratagene", США).

Анализ гидролиза модельных ДНК- и РНК-субстратов. Анализ расщепления модельных ДНК- и РНК-субстратов проводили по следующей методике. К 10 мкл раствора субстрата добавляли 10 мкл фермента в буферном растворе RB2 следующего состава: 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 50 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 9% глицерин – при 25°C. В случае ДНК- и РНК-субстратов использовали следующие концентрации: 2 мкМ субстрат и 0.05 мкМ фермент, 2 мкМ субстрат и 4 мкМ фермент соответственно. Для определения влияния ионов металлов на эффективность гидролиза ДНК- и РНК-субстратов в реакционную смесь дополнительно добавляли 5 мМ $MgCl_2$ или $CaCl_2$. Через 30 с для ДНК-субстрата и через 1 ч для РНК-субстратов реакцию останавливали путем

добавления 20 мкл раствора, содержащего 9 М мочевину и 25 мМ EDTA. Электрофорез проводили в 20%-ном ПААГ в денатурирующих условиях (7 М мочевина) в вертикальной термостатируемой камере Protean II xi (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”) при напряжении 200–300 В и температуре 55°С. Для визуализации использовали гель-документирующую систему E-Box CX.5 TS (“Vilber Lourman”, Франция).

Частичный гидролиз РНК-субстратов HP1 и HP2 РНКазой А выполняли по следующей методике. Реакционную смесь (20 мкл), содержащую 3.0 мкМ субстрат и 3.0 нМ РНКазу А (“Sigma-Aldrich”) в буферном растворе RB3 (50 мМ Трис-HCl (pH 8.5), 50 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 9% глицерин), инкубировали 5 мин при 25°С, добавляли 20 мкл раствора, содержащего 9 М мочевины и 25 мМ EDTA, и выдерживали 5 мин при 96°С.

Оценка относительной активности мутантных форм APE1. Степень гидролиза субстрата определяли с использованием программного пакета Gel-Pro Analyzer 4.0 (“Media Cybernetics”, США). Величину степени гидролиза рассчитывали как отношение площади пика продукта гидролиза к сумме площадей пиков продукта и исходного олигорибонуклеотида. Предполагаемая ошибка определения степени модификации, как правило, не превышала 20%. Активность мутантных форм определяли относительно активности фермента дикого типа, которую принимали равной 1.

Микроскопический термофорез (МСТ). Определение констант связывания исследуемых субстратов с ферментом APE1 выполнено на приборе Monolith NT.115 (“NanoTemper Technologies”, Германия) с использованием стандартных капилляров (MonolithTM NT.115 Standard Treated Capillaries). Каждая точка на кривых титрования получена путем измерения интенсивности флуоресценции отдельных растворов (10 мкл), содержащих олигонуклеотидный лиганд (1 мкМ) и фермент (0.05–18 мкМ) в буферном растворе RB2 при 25°С. Для расчета значений констант диссоциации экспериментальные данные обрабатывали в пакете программ DynaFit (“BioKin”, США) [18] с использованием модели одностадийного связывания.

Кинетические исследования методом “остановленного потока”. Кинетические кривые были зарегистрированы по изменению интенсивности флуоресценции на спектрометре “остановленного потока” SX.20 (“Applied Photophysics”, Великобритания). Кинетику взаимодействия APE1 дикого типа с флуоресцентными РНК-субстратами исследовали в буферном растворе RB2 при 25°С. В случае регистрации изменений интенсивности остатков aPu и C^{py} концентрация фермента составляла 2.0 мкМ, концентрация субстрата – 1.0 мкМ. Длина волны возбуждения составляла 310 нм и 344 нм для aPu и C^{py} соответственно; испускание флуоресценции детектировали при $\lambda > 370$ нм, используя светофильтр LG-370.

При анализе изменений интенсивности флуоресценции остатков Trp концентрация фермента составляла 2.0 мкМ, а концентрация РНК-субстрата изменялась в диапазоне 0.5–4.0 мкМ. Возбуждение интенсивности флуоресцеинции остатков Trp проводили при 290 нм, а сигнал регистрировали при $\lambda > 320$ нм, используя светофильтр WG-320.

Эффективность резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) между парой FAM/BHQ1 регистрировали при возбуждении FAM на длине волны 494 нм и сигнала испускания FRET при $\lambda > 530$ нм с использованием светофильтра OG-515 (“Schott”, Германия).

Мертвое время прибора составляло 1 мс. Каждую кинетическую кривую усредняли, как минимум, по четырем повторам.

Наблюдаемую константу скорости рассчитывали путем обработки кинетических кривых по уравнению (1):

$$f(t) = f_0 + f_1(1 - e^{-k_{obs} \cdot t}), \quad (1)$$

где $f(t)$ – наблюдаемая интенсивность флуоресценции в момент времени t, f_0 – фоновый уровень сигнала, f_1 – максимальная амплитуда изменения интенсивности флуоресценции при $t \to \infty$, k_{obs} – наблюдаемая константа скорости. В условиях квазиравновесия и избытка концентрации субстрата по отношению к ферменту k_{obs} описывается уравнением (2):

$$k_{obs} = k_1[S] + k_{-1}, \quad (2)$$

где [S] – концентрация субстрата, k_1 и k_{-1} – константы скорости образования и распада фермент-субстратного комплекса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор аминокислотных остатков активного центра APE1 для исследования эндорибонуклеазной активности

С целью идентифицировать ключевые для эндорибонуклеазной активности APE1 аминокислотные остатки активного центра фермента было исследовано расщепление модельных РНК-субстратов в присутствии APE1 дикого типа и его мутантных форм: Y171F, R177F, R181A, D210N, N212A, T268D, M270A, D308A. Выбранные для исследования аминокислотные остатки (рис. 1) можно разделить на три группы: участвующие в каталитической реакции (Tyr171, Asp210, Asn212 и Asp308), встраивающиеся в двойную спираль после выворачивания целевого нуклеотида в активный центр (Arg177 и Met270) и расположенные в субстрат-связывающем сайте (Thr268 и Arg181).

Необходимо отметить, что участие этих остатков в связывании ДНК-субстратов, содержащих

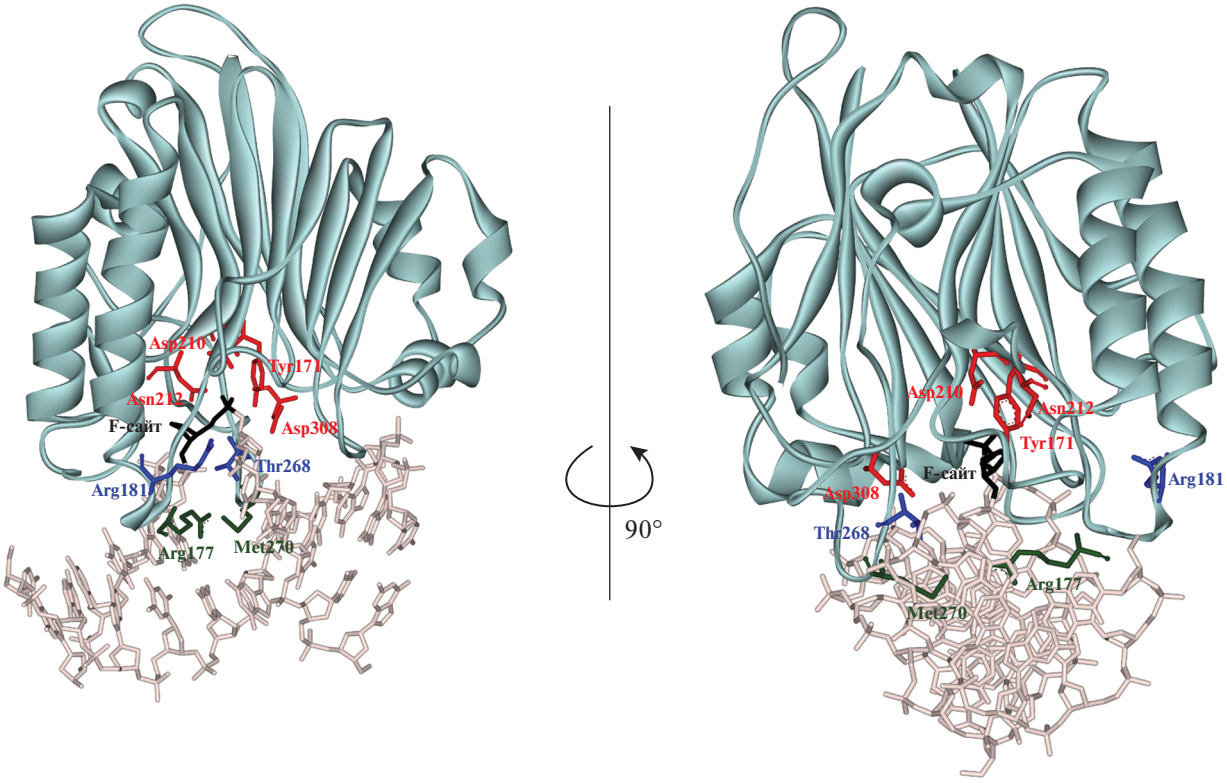


Рис. 1. Структура комплекса АР-эндонуклеазы APE1 с F/G-субстратом (PDBID 1DE8). Каталитические остатки (Tyr171, Asp210, Asn212 и Asp308) показаны красным цветом; остатки, встраивающиеся в двойную спираль после выворачивания целевого нуклеотида в активный центр (Arg177 и Met270), – зеленым; остатки, расположенные в субстратсвязывающем сайте (Thr268 и Arg181), – синим; внеспиральное положение поврежденного нуклеотида выделено черным цветом.

поврежденный нуклеотид, в узнавании F-сайта и каталитической реакции установлено ранее в ряде работ на основе рентгеноструктурных данных и данных сайт-направленного мутагенеза. Подытоживая, можно заключить, что Asp308 участвует в координации иона Mg^{2+} в активном центре и его замена на Ala приводит к снижению АР-эндонуклеазной активности [19]. Asn212 образует водородную связь с гидролизуемой фосфатной группой, а также участвует в координации молекулы воды и стабилизации переходного состояния. Его замена на Ala приводит к полной потере эндонуклеазной активности в отношении АР-сайта [19]. Asp210 координирует молекулу воды, участвующую в гидролизе фосфодиэфирной связи. Его замена на Asn также приводит к полной потере каталитической активности [20]. Остаток Tyr171 либо участвует в нуклеофильной атаке фосфатной группы в фенолятной форме, либо стабилизирует переходное состояние за счет образования водородной связи с фосфатной группой [21, 22].

Met270, предположительно, стабилизирует внеспиральное положение F-сайта; при этом его замена на Ala не приводит к изменению активности фермента [11]. Arg177 участвует в специфическом связывании ДНК, содержащей АР-сайт [11].

Thr268 расположен в ДНК-связывающем центре. Его замена на Asp приводит к значительному снижению активности по отношению к NIR-субстратам [23]. Arg181 расположен в ДНК-связывающем центре и участвует в связывании ДНК.

Дизайн РНК-субстратов

Согласно литературным данным [8, 10], основные сайты расщепления РНК под действием APE1 – динуклеотидные последовательности CA, UA и UG в одноцепочечных или слабо спаренных областях. Кроме того, наблюдали расщепление РНК и в сайтах UC, CU, AC и AU [10].

Можно предположить, что для образования каталитического комплекса важна как последовательность пиримидин-пурин, так и структура субстрата, которая может оказывать значительное влияние на узнавание целевого сайта. Действительно, в работах группы Lee [8, 10] расщепление РНК детектировали в одноцепочечных областях вблизи стеблей шпилечных структур, что может указывать на значительный вклад

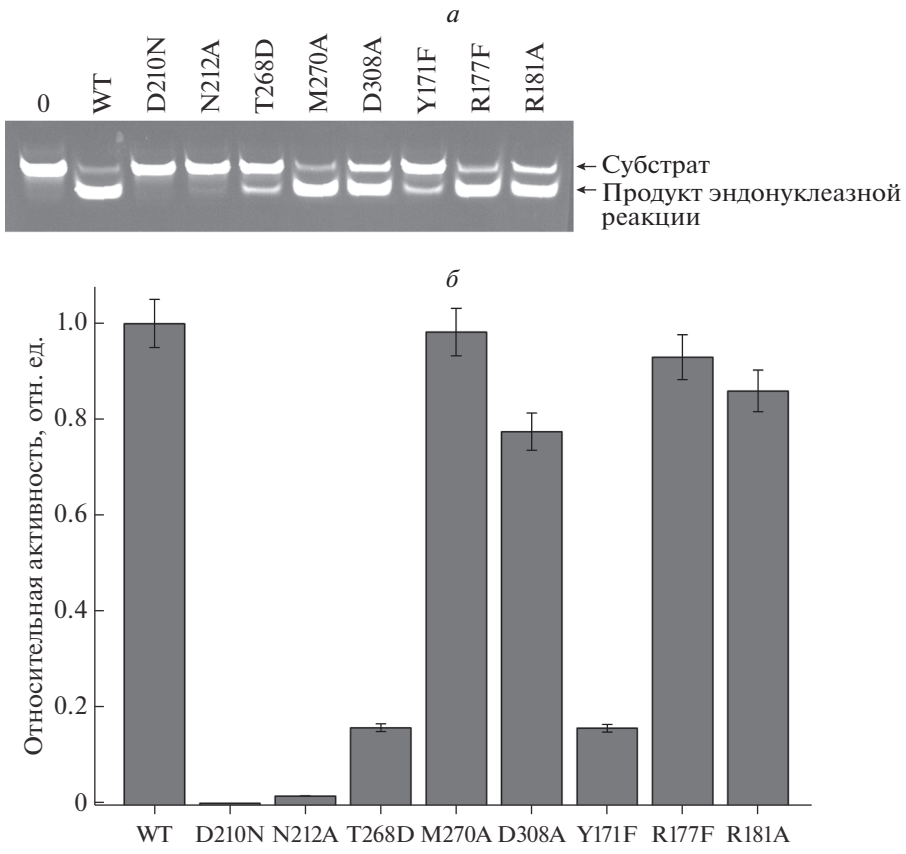


Рис. 2. Гидролиз F/G-субстрата под действием APE1 дикого типа (WT) и мутантных форм. *а* – Анализ продуктов реакции методом электрофореза в ПААГ. *б* – Относительная степень гидролиза F/G-субстрата ферментом дикого типа и его мутантными формами ([фермент] = 0.05 мкМ, [F/G] = 2.0 мкМ, $T = 25°C$, $t = 30$ с).

именно вторичной структуры РНК в узнавание ее как субстрата APE1.

Ранее нами проанализировано взаимодействие АР-эндонуклеазы человека APE1 с модельными РНК-субстратами различной структуры [24]. Показано, что образование каталитически компетентного фермент-субстратного комплекса зависит как от конформационной напряженности петли РНК-субстрата, имеющего форму шпильки, так и от контекста и местоположения гидролизуемой фосфодиэфирной связи. Опираясь на эти данные, мы использовали два модельных РНК-субстрата длиной 17 нуклеотидов, представляющих собой короткие шпилечные структуры, в которых длина стебля была равна 6 п.о., а размер петли составлял 5 нуклеотидов. Субстрат HP1, FAM-r(AUAUAAGAAUCAUUAUAU)-BHQ1, содержал одну динуклеотидную последовательность CA в петле, а субстрат HP2, FAM-r(AUAUAACAUCAUUAUAU)-BHQ1, – две динуклеотидные последовательности CA (табл. 1).

Для анализа кинетики фермент-субстратного взаимодействия использовали как субстрат $HP1^{Trp}$, не содержащий флуоресцентных меток, так и субстраты, содержащие флуоресцентные метки: HP1, $HP1^{C\text{-}aPu}$, $HP1^{aPu\text{-}CA}$, $HP1^{CPy\text{-}CA}$, $HP1^{CA\text{-}CPy}$. Олигонуклеотид $HP1^{aPu\text{-}CA}$ содержал остаток 2-аминопурина с 3'-стороны от пары CA, тогда как $HP1^{C\text{-}aPu}$ – непосредственно после цитозина. Субстраты $HP1^{CPy\text{-}CA}$ и $HP1^{CA\text{-}CPy}$ содержали остаток пироллоцитозина с 3'-стороны и с 5'-стороны от пары CA соответственно.

Влияние замен аминокислотных остатков на взаимодействие APE1 с ДНК, содержащей F-сайт

Для контроля активности мутантных форм APE1 использовали F/G-субстрат, содержащий в качестве поврежденного нуклеотида остаток 3-гидрокси-2-гидроксиметилтетрагидрофурана (F-сайт). Как видно на рис. 2, замена каталитически значимых аминокислотных остатков: Tyr171, Asp210 и Asn212, – а также Thr268, расположенного в ДНК-связывающем центре, приводит к значительной потере АР-эндонуклеазной активности фермента. В то же время замена Arg177 и Met270, встраивающихся в ДНК при образовании

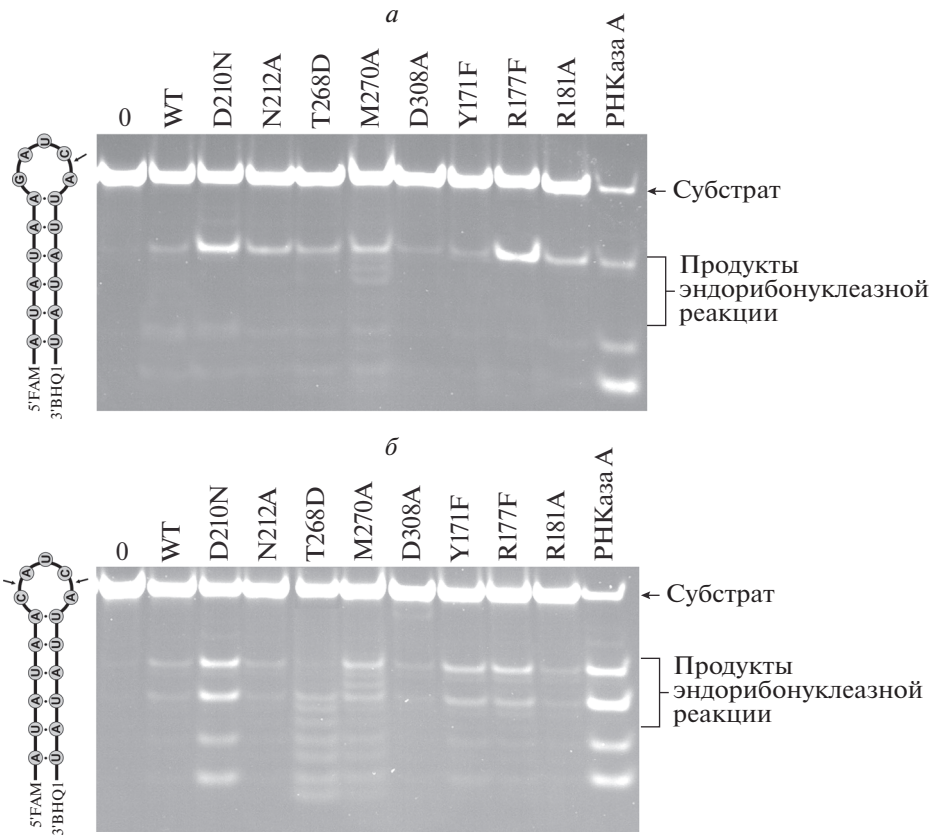


Рис. 3. Гидролиз HP1 (*а*) и HP2 (*б*) под действием APE1 дикого типа (WT) и мутантных форм в присутствии 1 мМ EDTA. [APE1] = 2.0 мкМ, [РНК] = 1.0 мкМ, $T = 25°C$, $t = 1$ ч.

каталитически компетентного комплекса, а также Arg181, образующего контакт с дезоксирибозофосфатным остовом в ДНК-связывающем центре, незначительно влияют на эффективность гидролиза F-сайта. Однако замена Asp308, участвующего в координации иона Mg^{2+} в активном центре, приводит к снижению активности примерно на 20% по сравнению с ферментом дикого типа.

Гидролиз РНК-субстратов

Влияние ионов Mg^{2+} на процессы связывания субстрата, гидролиза фосфодиэфирной связи в составе ДНК активно обсуждаются в литературе [25–32]. Более того, уже предложено два каталитических механизма действия APE1, в которых участвуют один или два катиона Mg^{2+} [11, 19]. В то же время, согласно литературным данным [10, 24], APE1 расщепляет РНК в отсутствие ионов двухвалентных металлов. На основании этого мы анализировали взаимодействие APE1 дикого типа и мутантных форм с модельными РНК-субстратами как в отсутствие ионов двухвалентных металлов (рис. 3), так и в присутствии ионов Ca^{2+} (рис. 4) и Mg^{2+} (рис. 5).

Как показано на рис. 3, в отсутствие ионов двухвалентных металлов в случае обоих РНК-субстратов, HP1 и HP2, происходило накопление продуктов реакции; при этом расщепление происходило преимущественно по последовательности CA, расположенной в петле. Наличие продуктов эндорибонуклеазной реакции в случае мутантных форм фермента, у которых отсутствует AP-эндонуклеазная активность, свидетельствует о протекании гидролиза фосфодиэфирной связи в РНК по каталитическому механизму, отличному от такового на AP-сайтах ДНК.

Следует отметить, что в присутствии ионов Ca^{2+} также наблюдали накопление продуктов эндорибонуклеазной реакции (рис. 4). Здесь следует заметить, что, как показано ранее [14], при взаимодействии APE1 с ДНК-субстратом, содержащим F-сайт, присутствие ионов Ca^{2+} приводило к блокированию AP-эндонуклеазной реакции [33].

При взаимодействии APE1 с РНК-субстратами в буферном растворе, содержащем 5 мМ $MgCl_2$, который необходим ферменту для осуществления AP-эндонуклеазной реакции, наблюдали как накопление продуктов эндорибонуклеазной активности, так и продуктов 3'-5'-экзонуклеазной реакции (отщепление тушителя BHQ1 с

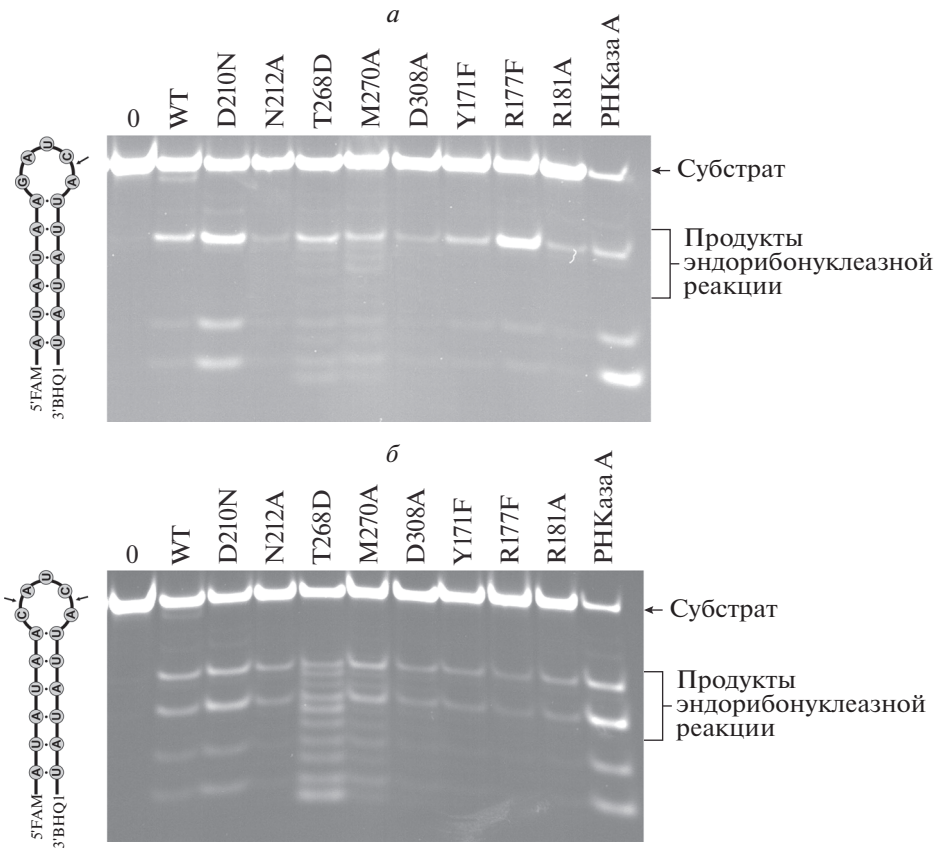


Рис. 4. Гидролиз РНК-субстратов HP1 (*а*) и HP2 (*б*) под действием APE1 дикого типа и мутантных форм в присутствии 5 мМ $CaCl_2$. [APE1] = 2.0 мкМ, [РНК] = 1.0 мкМ, T = 25°C, t = 1 ч.

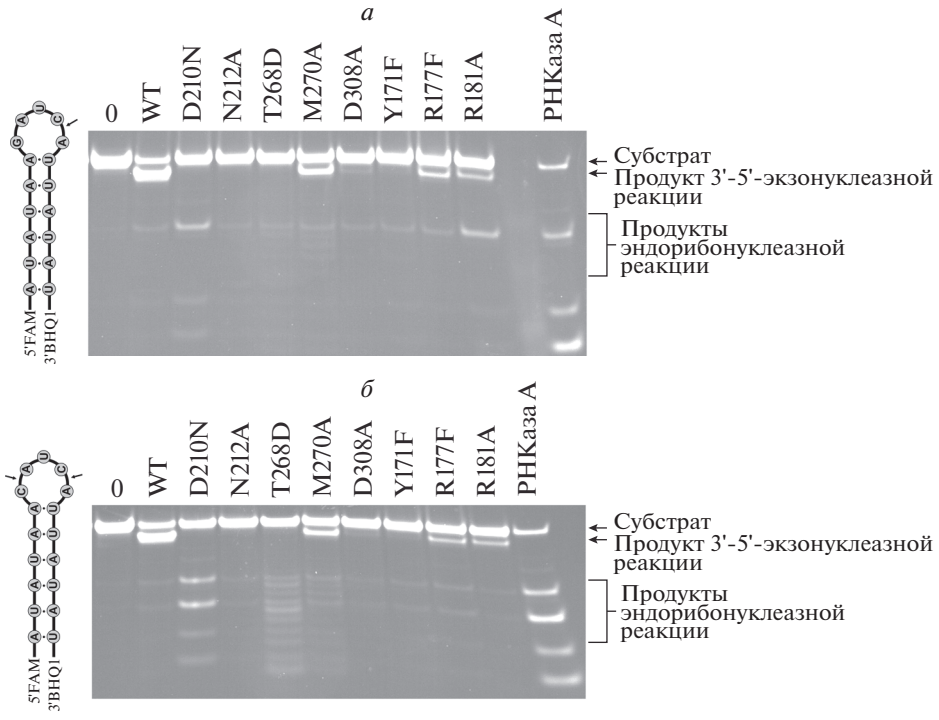


Рис. 5. Гидролиз РНК-субстратов HP1 (*а*) и HP2 (*б*) под действием APE1 дикого типа и мутантных форм в присутствии 5 мМ $MgCl_2$. [APE1] = 2.0 мкМ, [РНК] = 1.0 мкМ, T = 25°C, t = 1 ч.

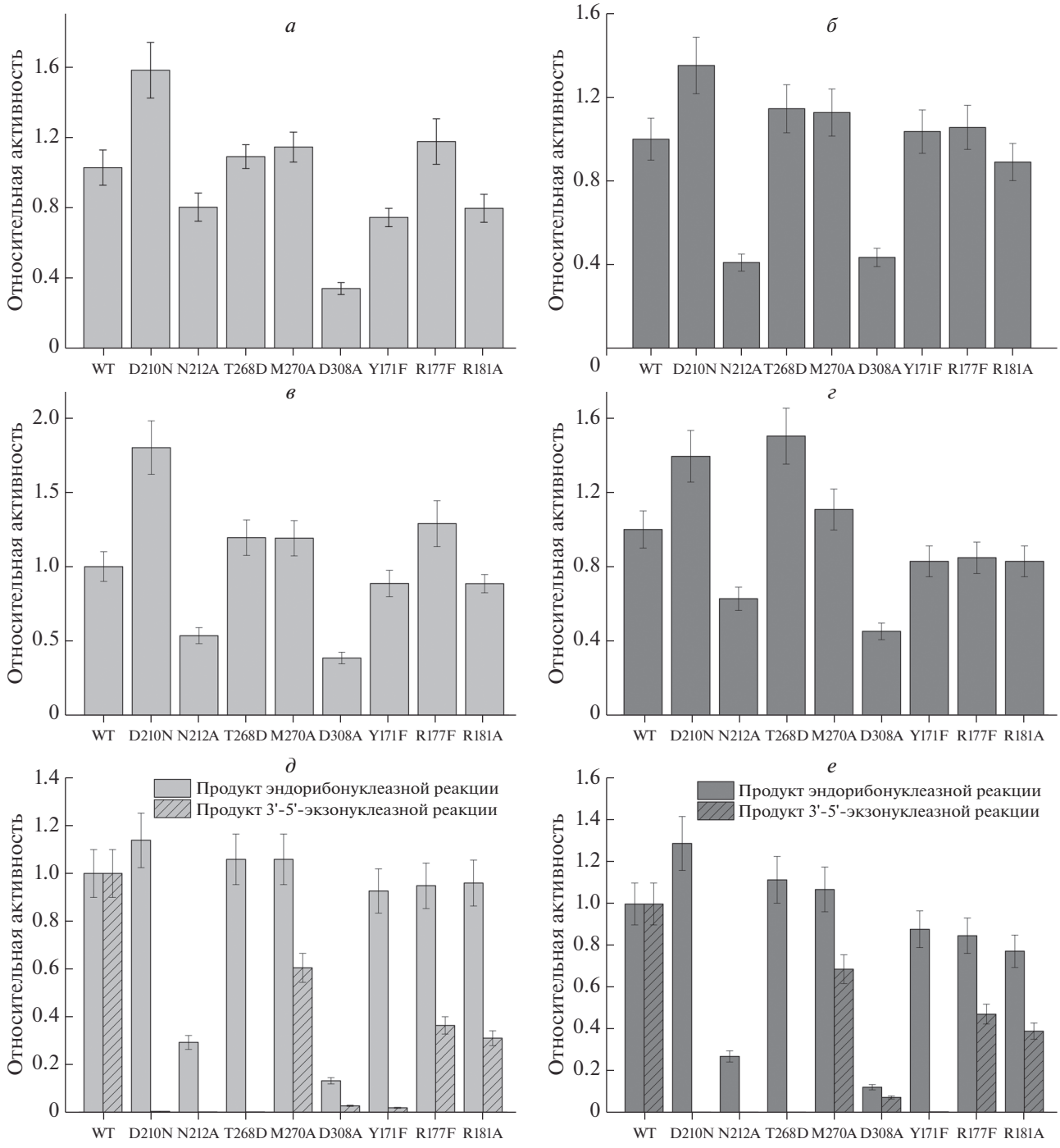


Рис. 6. Относительная активность APE1 дикого типа и мутантных форм при гидролизе субстрата HP1 (*а*, *в*, *д*) и HP2 (*б*, *г*, *е*) в присутствии 1.0 мМ EDTA (*а, б*), 5.0 мМ $CaCl_2$ (*в*, *г*) и 5.0 мМ $MgCl_2$ (*д*, *е*).

3'-конца) (рис. 5). Можно предположить, что гидролиз межнуклеотидной фосфатной группы в РНК-субстрате может проходить без участия иона Mg^{2+}, тогда как гидролиз 3'-концевого остатка BHQ1 проходит по механизму, характерному для гидролиза ДНК-субстратов. В пользу этого заключения также свидетельствует отсутствие продуктов 3'-5'-экзонуклеазной деградации РНК-субстратов под действием мутантных форм фермента, которые лишены АР-эндонуклеазной активности (D210N, N212A, T268D, Y171F).

На основании полученных данных мы рассчитали относительную активность всех мутантных форм фермента APE1 по отношению к РНК-субстратам HP1 и HP2 в присутствии EDTA и ионов двухвалентных металлов: Mg^{2+} и Ca^{2+} (рис. 6).

Интересно отметить, что замены D210N и N212A, которые приводят к исчезновению АР-эндонуклеазной активности в отношении ДНК-субстрата, содержащего F-сайт, не блокируют эндорибонуклеазную активность APE1. Оба остатка, Asn212 и Asp210, координируют молекулу воды в активном центре, которая действует как нуклеофил при каталитическом гидролизе ДНК. Таким образом, на основании полученных данных можно считать, что расщепление РНК зависит от присутствия Asn212 или Asp210 в гораздо меньшей степени, чем в случае ДНК-субстрата, а значит в гидролизе РНК-субстратов задействован альтернативный каталитический механизм APE1. Кроме того, замена еще одного ключевого каталитического остатка, необходимого для эффективного осуществления АР-эндонуклеазной активности – Tyr171 – также не приводит к уменьшению эффективности гидролиза РНК-субстратов.

Замена T268D оказывает существенное влияние (примерно 5-кратное снижение активности по сравнению с WT, рис. 2*б*) на АР-эндонуклеазную активность. Действительно, замена T268D может нарушать взаимодействия APE1 с ДНК посредством электростатического отталкивания в ДНК-связывающем центре, так как остаток Thr268 расположен в петле, которая встраивается в спираль ДНК со стороны малой бороздки рядом с АР-сайтом. В этом случае боковая группа Thr268 находится между боковой цепью Met270, встраивающегося в ДНК на место F-сайта, и фосфатной группой ДНК-субстрата. Следовательно, аспартат в положении 268 может влиять на связывание субстрата путем стерических взаимодействий с боковой цепью Met270. Интересно отметить, что замены T268D и M270A в APE1 приводят к потере специфичности фермента к пиримидин-пуриновой последовательности в обоих РНК-субстратах по сравнению с ферментом дикого типа (рис. 3–5). Такая потеря специфичности к контексту РНК-субстратов действительно указывает на то, что эффект замены T268D не может быть обусловлен только электростатическим отталкиванием. Можно предположить, что влияние этой замены, с одной стороны, связано с взаимодействием Thr268 с боковой цепью Met270, которая встраивается в полость, образованную после выворачивания нуклеотида-мишени в активный центр фермента. С другой стороны, замена M270A теоретически должна уменьшать любые стерические затруднения при связывании APE1 как с ДНК, так и с РНК-субстратами и, следовательно, активность мутантной формы M270A практически не отличается от активности фермента дикого типа.

Действительно, замена Met270 не снижала способность APE1 расщеплять АР-сайты, из чего можно сделать вывод, что этот остаток не участвует в процессе выворачивания нуклеотидов в активный центр фермента. Таким образом, функция Met270, скорее всего, заключается в стабилизации состояния, в котором гидролизуемый нуклеотид вывернут и расположен в активном центре фермента. Потеря специфичности к CA-сайту расщепления РНК также указывает на то, что Met270 выполняет важную функцию в распознавании нуклеотида-мишени. Что касается замены остатка Arg177, который встраивается в субстрат со стороны большой бороздки, а также остатка Arg181, расположенного в ДНК-связывающем центре, то они практически не влияли ни на АР-эндонуклеазную, ни на эндорибонуклеазную активность APE1.

АР-эндонуклеазная активность мутанта D308A APE1 была близка таковой для фермента дикого типа, но снижена при гидролизе РНК-субстратов. Координация иона Mg^{2+} остатком Asp308 может быть важна для стабилизации сетевых контактов в каталитическом центре при расщеплении ДНК. Кроме того, остаток Asp308 стабилизирует положение остатка His309, который образует контакт с фосфатной группой гидролизуемого нуклеотида, тем самым способствуя достижению каталитически компетентного состояния фермента.

Связывание РНК-субстратов

С помощью микроскопического термофореза (МСТ) было исследовано связывание APE1 дикого типа и его мутантных форм с субстратом HP2 (рис. 7*а*). По кривым титрования рассчитаны константы диссоциации (K_d) фермент-субстратных комплексов (рис. 7*б*). Анализ стабильности фермент-субстратных комплексов проведен методом МСТ. В результате показано, что образование комплекса APE1, как дикого типа, так и мутантных форм, с HP2 характеризуется близкими значениями констант диссоциации в диапазоне концентраций субстрата 0.5–2.0 мкМ. Таким образом, ни одна из проанализированных мутаций не приводила к серьезным нарушениям фермент-субстратных взаимодействий. Более того, наименьшее значение K_d (0.6 ± 0.1 мкМ) зарегистрировано для D210N APE1, что хорошо согласуется с литературными данными о более прочном связывании этого мутанта с модельными ДНК-субстратами по сравнению с ферментом дикого типа [17, 20, 30, 34]. В то же время вариант D210N APE1 обладал повышенной активностью по отношению к обоим исследованным РНК-субстратам как в отсутствие, так и в присутствии ионов двухвалентных металлов. Кроме того, две наименее активные мутантные формы APE1, D308A и N212A, также связывались с РНК-субстратом более эффективно, чем фермент дикого типа. Таким образом, различия в активности мутантных форм APE1, скорее всего, связаны с влиянием исследованных аминокислотных остатков на формирование каталитически компетентного состояния, а

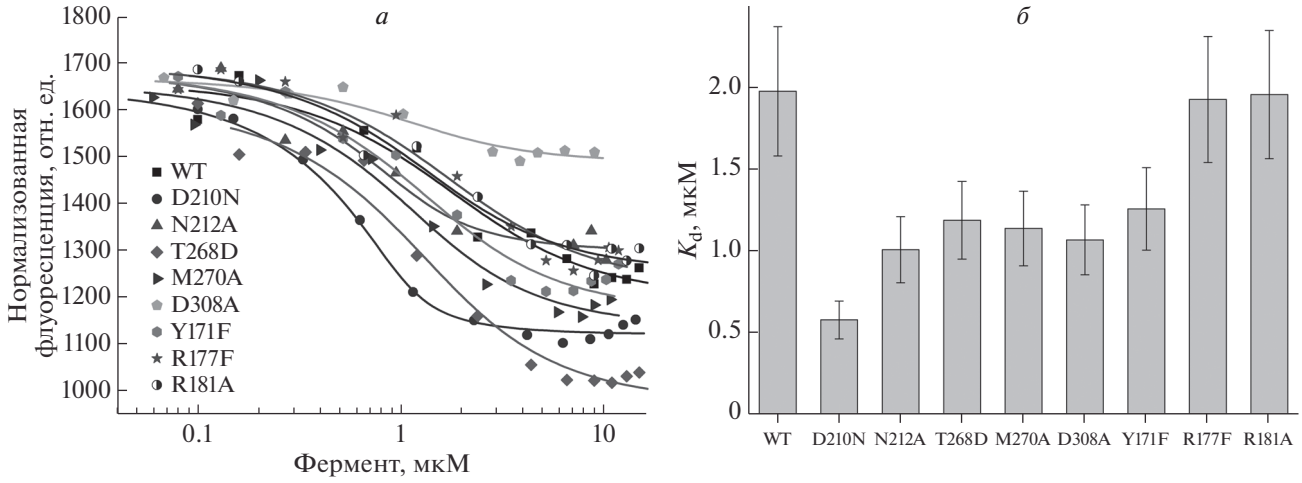


Рис. 7. Определение констант диссоциации (K_d) фермент-субстратных комплексов методом микроскопического термофореза с использованием в качестве субстрата НР2. *а* – Кривые титрования субстрата НР2 под действием APE1 дикого типа и мутантных форм. *б* – Сравнительный анализ констант диссоциации комплексов APE1-НР2.

не на стадию образования фермент-субстратного комплекса.

Анализ кинетики взаимодействия APE1 дикого типа с РНК-субстратом НР1

Ранее [33, 35] при исследовании связывания APE1 с АР-сайтами и гидролиза 5'-фосфодиэфирной связи в предстационарных условиях методом "остановленного потока" детектировали изменения интенсивности флуоресценции APE1, вызванные присутствием в белке остатков Trp. При исследовании эндорибонуклеазной реакции нами также зарегистрированы изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp на временах менее 0.5 с, которые, скорее всего, соответствуют образованию фермент-субстратного комплекса (рис. 8*а*). Следует сказать, что медленная реакция гидролиза РНК-субстрата не может быть зарегистрирована этим методом вследствие деструкции остатков Trp при длительном облучении на длине волны возбуждения флуоресценции (фотобличинга).

Для расчета наблюдаемых констант скорости, k_{obs}, кинетические кривые аппроксимировали по уравнению (1). Учитывая, что на начальной стадии взаимодействия APE1 с субстратами образуется фермент-субстратный комплекс, причем эта реакция обратима, для расчета k_{obs} мы использовали уравнение (2), которое справедливо при условии избытка одного из компонентов реакции. Несмотря на то, что в проведенных нами экспериментах это не всегда было выполнимо, зависимость k_{obs} от концентрации субстрата носила линейный характер (рис. 8*б*), что соответствовало одностадийному механизму связывания и позволило рассчитать константы скорости образования и распада фермент-субстратного комплекса (APE1 · НР1) с помощью уравнения (2), где $k_1 = 5.4 \pm 0.7$ мкМ$^{-1} \cdot$ с$^{-1}$, $k_{-1} = 23.6 \pm 1.9$ с$^{-1}$. В этом случае значение K_d равно 4.7 ± 1.1 мкМ. Это значение немного превышает величину, измеренную методом термофореза (см. рис. 7*б*), однако, учитывая принципиальное различие методов и условий реакции, использованных для получения значений K_d, такое расхождение можно считать удовлетворительным.

В проведенной нами работе использованы модельные РНК-субстраты, содержащие флуоресцирующие основания 2-аминопурин (aPu) и пирролоцитозин (C^{Py}) в различных положениях шпильки (табл. 1, рис. 8*в*). Известно, что интенсивность флуоресценции aPu и C^{Py} зависит от гидрофильности окружающей среды [36–39], поэтому, наблюдая за изменением этого параметра для аналогов азотистых оснований, можно судить о конформационных превращениях РНК-субстрата.

На основании полученных результатов можно говорить о том, что остаток aPu не чувствителен к процессам, происходящим при образовании комплекса фермента с РНК-субстратом, в то время как для C^{Py} зарегистрирован рост интенсивности флуоресценции на начальном участке кинетических кривых (до 10 с), что может отражать процесс образования фермент-субстратного комплекса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами проведен сравнительный анализ АР-эндонуклеазной и эндорибонуклеазной активности апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы человека APE1 дикого типа и восьми мутантных форм, содержащих замены

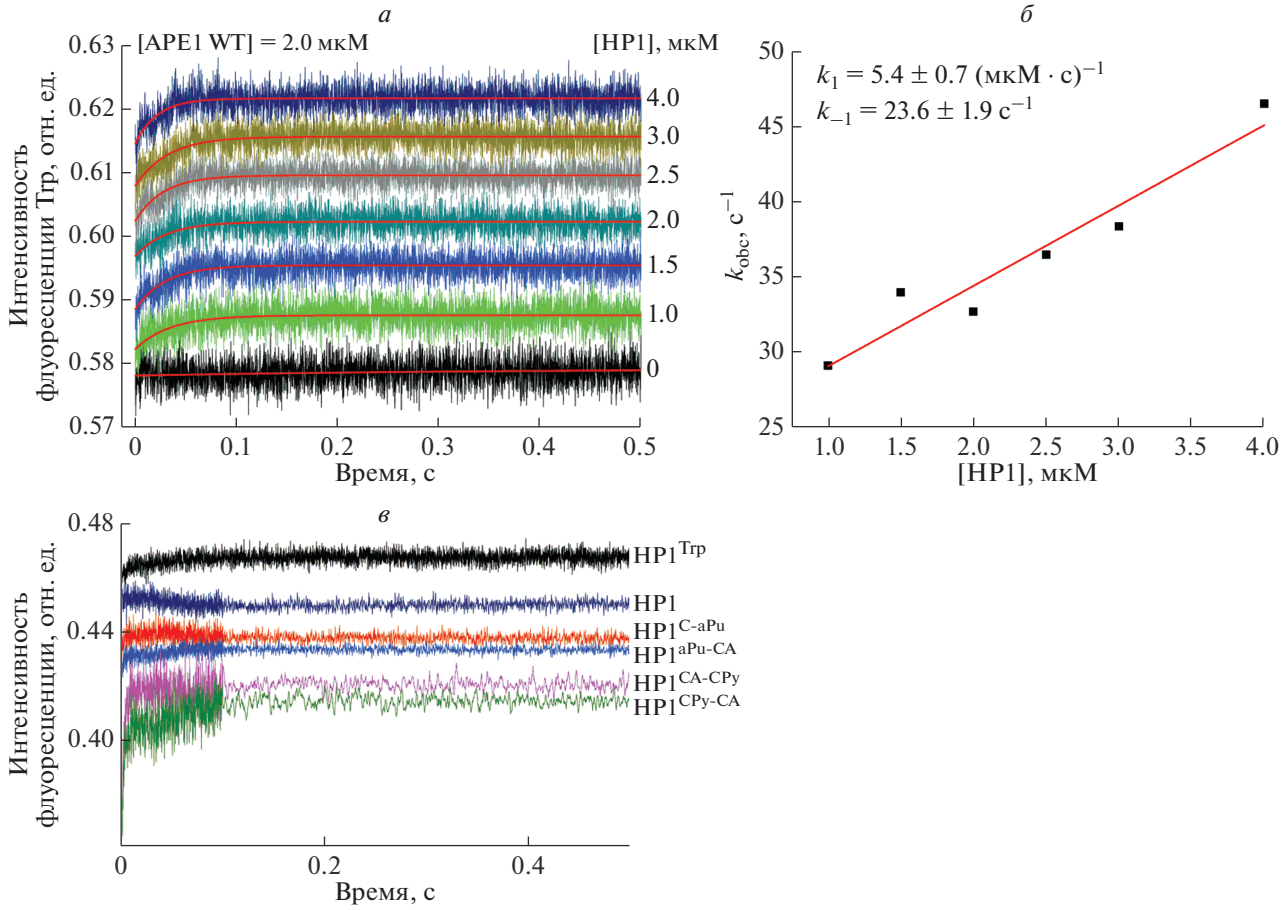


Рис. 8. Кинетика взаимодействия APE1 дикого типа с РНК-субстратами. *а* – Изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp, характеризующие образование фермент-субстратного комплекса. *б* – Зависимость наблюдаемой константы скорости (k_{obs}) от концентрации РНК-субстрата HP1. *в* – Изменения интенсивности флуоресценции остатков aPu, C^{Py} и FRET-сигнала, характеризующие конформационные превращения РНК-субстрата.

аминокислотных остатков, входящих в состав активного и субстратсвязывающего центра. Показано, что при взаимодействии APE1 с РНК-субстратами в присутствии ионов Ca^{2+}, а также в отсутствие ионов металлов происходит накопление продуктов только эндорибонуклеазной реакции, что свидетельствует о металлнезависимом каталитическом механизме гидролиза фосфодиэфирной связи в РНК-субстратах. В присутствии ионов Mg^{2+} протекают и эндорибонуклеазная, и 3'-5'-экзонуклеазная реакции. Эти два типа ферментативной активности связаны с разными каталитическими механизмами действия фермента. Так, замена аминокислотных остатков Asn212, Asp210 и Tyr171 приводит к потере АР-эндонуклеазной и 3'-5'-экзонуклеазной активностей с сохранением эндорибонуклеазной активности, из чего можно сделать вывод о том, что при гидролизе фосфодиэфирной связи в составе РНК APE1 задействует механизм катализа, альтернативный таковому на ДНК-субстратах. Установлено, что замены T268D и M270A приводят к потере специфичности фермента к пиримидин-пуриновой последовательности, а мутации Arg177 и Arg181 незначительно влияют на активность фермента. Показано, что замена D308A приводит к снижению эндорибонуклеазной активности фермента, по-видимому, за счет потери контактов с каталитически значимым остатком His309.

Экспериментальная часть работы выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-74-10034 и частичной поддержке бюджетного финансирования для обеспечения регламентных работ на использованном оборудовании № АААА-А17-117020210022-4.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gros L., Ishchenko A.A., Ide H., Elder R.H., Saparbaev M.K. (2004) The major human AP endonuclease (Ape1) is involved in the nucleotide incision repair pathway. *Nucleic Acids Res.* **32**, 73–81.
2. Chen D.S., Herman T., Demple B. (1991) Two distinct human DNA diesterases that hydrolyze 3'-blocking deoxyribose fragments from oxidized DNA. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5907–5914.
3. Chou K.-M., Cheng Y.-C. (2003) The exonuclease activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1). Biochemical properties and inhibition by the natural dinucleotide Gp_4G. *J. Biol. Chem.* **278**, 18289–18296.
4. Kuznetsova A.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. (2018) Kinetic features of 3'-5' exonuclease activity of human AP-endonuclease APE1. *Molecules.* **23**(9), 2101.
5. Li M., Wilson 3rd D.M. (2014) Human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 678–707.
6. Barzilay G., Hickson I.D. (1995) Structure and function of apurinic/apyrimidinic endonucleases. *Bioessays.* **17**, 713–719.
7. Berquist B.R., McNeill D.R., Wilson 3rd D.M. (2008) Characterization of abasic endonuclease activity of human Ape1 on alternative substrates, as well as effects of ATP and sequence context on AP site incision. *J. Mol. Biol.* **379**, 17–27.
8. Barnes T., Kim W.C., Mantha A.K., Kim S.E., Izumi T., Mitra S., Lee C.H. (2009) Identification of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) as the endoribonuclease that cleaves *c-myc* mRNA. *Nucleic Acids Res.* **37**, 3946–3958.
9. Kim S.E., Gorrell A., Rader S.D., Lee C.H. (2010) Endoribonuclease activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 revealed by a real-time fluorometric assay. *Anal. Biochem.* **398**, 69–75.
10. Kim W.C., King D., Lee C.H. (2010) RNA-cleaving properties of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1). *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* **1**, 12–25.
11. Mol C.D., Izumi T., Mitra S., Tainer J.A. (2000) DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 DNA repair and coordination. *Nature.* **403**, 451–456.
12. Barzilay G., Walker L.J., Robson C.N., Hickson I.D. (1995) Site-directed mutagenesis of the human DNA repair enzyme HAP1: identification of residues important for AP endonuclease and RNase H activity. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1544–1550.
13. Tsutakawa S.E., Shin D.S., Mol C.D., Izumi T., Arvai A.S., Mantha A.K., Szczesny B., Ivanov I.N., Hosfield D.J., Maiti B., Pique M.E., Frankel K.A., Hitomi K., Cunningham R.P., Mitra S., Tainer J.A. (2013) Conserved structural chemistry for incision activity in structurally non-homologous apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 and endonuclease IV DNA repair enzymes. *J. Biol. Chem.* **288**, 8445–8455.
14. Miroshnikova A.D., Kuznetsova A.A., Vorobjev Y.N., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. (2016) Effects of mono- and divalent metal ions on DNA binding and catalysis of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1. *Mol. Biosyst.* **12**, 1527.
15. Jen-Jacobson L., Engler L.E., Jacobson L.A. (2000) Structural and thermodynamic strategies for site-specific DNA binding proteins. *Structure.* **8**, 1015–1023.
16. Kim W.C., Berquist B.R., Chohan M., Uy C., Wilson D.M., Lee C.H. (2011) Characterization of the endoribonuclease active site of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1. *J. Mol. Biol.* **411**, 960–971.
17. Alekseeva I.V., Kuznetsova A.A., Bakman A.S., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. (2020) The role of active-site amino acid residues in the cleavage of DNA and RNA substrates by human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1864**, 129718.
18. Kuzmic P. (1996) Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.* **237**, 260–273.
19. Masuda Y., Bennett R.A., Demple B. (1998) Rapid dissociation of human apurinic endonuclease (Ape1) from incised DNA induced by magnesium. *J. Biol. Chem.* **273**, 30360–30365.
20. Rothwell D.G., Hang B., Gorman M.A., Freemont P.S., Singer B., Hickson I.D. (2000) Substitution of Asp-210 in HAP1 (APE/Ref-1) eliminates endonuclease activity but stabilises substrate binding. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2207–2213.
21. Mundle S.T., Fattal M.H., Melo L.F., Coriolan J.D., O'Regan N.E., Strauss P.R. (2004) Novel role of tyrosine in catalysis by human AP endonuclease 1. *DNA Repair (Amst.).* **3**, 1447–1455.
22. Freudenthal B.D., Beard W.A., Cuneo M.J., Dyrkheeva N.S., Wilson S.H. (2015) Capturing snapshots of APE1 processing DNA damage. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 924–931.
23. Redrejo-Rodriguez M., Vigouroux A., Mursalimov A., Grin I., Alili D., Koshenov Z., Akishev Z., Maksimenko A., Bissenbaev A.K., Matkarimov B.T., Saparbaev M., Ishchenko A.A., Moréra S. (2016) Structural comparison of AP endonucleases from the exonuclease III family reveals new amino acid residues in human AP endonuclease 1 that are involved in incision of damaged DNA. *Biochimie.* **128**, 20–33.
24. Кузнецова А.А., Новопашина Д.С., Федорова О.С., Кузнецов Н.А. (2020) Влияние структуры субстрата и ионов металлов на эффективность гидролиза неповрежденной РНК апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазой человека APE1. *Acta Naturae.* **12**, 74–85.
25. Gorman M.A., Morera S., Rothwell D.G., de La Fortelle E., Mol C.D., Tainer J.A., Hickson I.D., Freemont P.S. (1997) The crystal structure of the human DNA repair endonuclease HAP1 suggests the recognition of extra-helical deoxyribose at DNA abasic sites. *EMBO J.* **16**, 6548–6558.
26. Beernink P.T., Segelke B.W., Hadi M.Z., Erzberger J.P., Wilson D.M., Rupp B. (2001) Two divalent metal ions in the active site of a new crystal form of human apurinic/apyrimidinic endonuclease, Ape1: implications for the catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* **307**, 1023–1034.
27. Manvilla B.A., Pozharski E., Toth E.A., Drohat A.C. (2013) Structure of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 with the essential Mg^{2+} cofactor. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69**, 2555–2562.

28. Lipton A.S., Heck R.W., Primak S., McNeill D.R., Wilson D.M., Ellis P.D. (2008) Characterization of Mg^{2+} binding to the DNA repair protein apurinic/apyrimidic endonuclease 1 via solid-state 25Mg NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 9332–9341.
29. Oezguen N., Schein C.H., Peddi S.R., Power T.D., Izumi T., Braun W. (2007) A "moving metal mechanism" for substrate cleavage by the DNA repair endonuclease APE-1. *Proteins*. **68**, 313–323.
30. Erzberger J.P., Wilson D.M. (1999) The role of Mg^{2+} and specific amino acid residues in the catalytic reaction of the major human abasic endonuclease: new insights from EDTA-resistant incision of acyclic abasic site analogs and site-directed mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **290**, 447–457.
31. He H., Chen Q., Georgiadis M.M. (2014) High-resolution crystal structures reveal plasticity in the metal binding site of apurinic/apyrimidinic endonuclease I. *Biochemistry*. **53**, 6520–6529.
32. Bulygin A.A., Kuznetsova A.A., Vorobjev Y.N., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. (2020) The role of active-site plasticity in damaged-nucleotide recognition by human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1. *Molecules*. **25**, 3940.
33. Мирошникова А.Д., Кузнецова А.А., Кузнецов Н.А., Федорова О.С. (2016) Термодинамика конформационных переходов АР-эндонуклеазы человека APE1 при взаимодействии с ДНК. *Acta Naturae*. **8**, 103–110.
34. Maher R.L., Bloom L.B. (2007) Pre-steady-state kinetic characterization of the AP endonuclease activity of human AP endonuclease 1. *J. Biol. Chem*. **282**, 30577–30585.
35. Timofeyeva N.A., Fedorova O.S. (2016) A kinetic mechanism of repair of DNA containing alpha-anomeric deoxyadenosine by human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1. *Mol. Biosyst*. **12**, 3435–3446.
36. Jean J.M., Hall K.B. (2001) 2-Aminopurine fluorescence quenching and lifetimes: role of base stacking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 37–41.
37. Rachofsky E.L., Osman R., Ross J.B. (2001) Probing structure and dynamics of DNA with 2-aminopurine: effects of local environment on fluorescence. *Biochemistry*. **40**, 946–956.
38. Rist M.J., Marino J.P. (2002) Fluorescent nucleotide base analogs as probes of nucleic acid structure, dynamics and interactions. *Curr. Org. Chem*. **6**, 775–793.
39. Berry D.A., Jung K.Y., Wise D.S., Sercel A.D., Pearson W.H., Mackie H., Randolph J.B., Somers R.L. (2004) Pyrrolo-dC and pyrrolo-C: fluorescent analogs of cytidine and 2'-deoxycytidine for the study of oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* **45**, 2457–2461.

MUTATIONAL AND KINETIC ANALYSIS OF APE1 ENDORIBONUCLEASE ACTIVITY

A. A. Kuznetsova[1], A. A. Gavrilova[1, 2], D. S. Novopashina[1], O. S. Fedorova[1, *], and N. A. Kuznetsov[1, **]

[1]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

[2]Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, 630090 Russia

**e-mail: fedorova@niboch.nsc.ru*

***e-mail: nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru*

Human apurine/apirimidine endonuclease 1 (APE1) participates in the DNA repair system. It is believed that the main biological function of APE1 is Mg^{2+} dependent hydrolysis of AP-sites in DNA. On the base of structural data, kinetic studies and mutation analysis, the key stages of APE1 interaction with damaged DNA were established. It has been shown recently that APE1 can act as an endoribonuclease that catalyses mRNA hydrolysis at certain pyrimidine-purine sites and thus controls the level of certain transcripts. In addition, the presence of Mg^{2+} ions was shown to be not required for endoribonuclease activity of APE1, as in the case of AP-endonuclease activity. It indicates differences in mechanisms of APE1 catalysis on RNA and DNA substrates, but the reasons for these differences remain unclear. Here, the analysis of endoribonuclease hydrolysis of model RNA substrates with wild type APE1 enzyme and its mutant forms, Y171F, R177F, R181A, D210N, N212A, T268D, M270A and D308A, was performed. It has been shown that mutation of Asn212, Asp210 and Tyr171 residues leads to the decrease of AP-endonuclease activity whereas endoribonuclease activity retains. It has been found that T268D and M270A APE1 mutants have lost the specificity to pyrimidine-purine sequences. R177F and R181A have not shown significant decreases in enzyme activity, whereas D308A have shown the decrease of endoribonuclease activity.

Keywords: human apurine/apirimidine endonuclease, APE1, endoribonuclease activity, active site, site-directed mutagenesis, RNA substrates

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 2, с. 258–268

ЭНЗИМОЛОГИЯ СИСТЕМ РЕПАРАЦИИ ДНК

УДК 577.213.6;577.151.4;577.151.35

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ IV *Mycobacterium tuberculosis*

© 2021 г. М. А. Дымова[a, #], А. В. Ендуткин[a, #], В. В. Полуновский[b], А. И. Закабунин[a], Е. А. Храпов[a], Н. А. Торгашева[a], А. В. Юдкина[a], Г. В. Мечетин[a], М. Л. Филипенко[a], Д. О. Жарков[a, b, *]

[a] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия*

[b] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия*

**e-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru*

Поступила в редакцию 04.09.2020 г.
После доработки 19.10.2020 г.
Принята к публикации 20.10.2020 г.

В клетках *Mycobacterium tuberculosis* присутствуют две апурин-апиримидиновых (АР-) эндонуклеазы: эндонуклеаза IV (MtbEnd) и экзонуклеаза III (MtbXthA), – причем MtbEnd играет основную роль в защите микобактериальной ДНК в условиях окислительного стресса. Эндонуклеаза IV микобактерий значительно отличается от гомологов из *Escherichia coli* и других протеобактерий по ряду консервативных позиций, образующих структурные элементы связывания ДНК и узнавания АР-сайта. В работе клонирован ген *end M. tuberculosis*, а также выделен и исследован рекомбинантный белок MtbEnd. Белок эффективно гидролизовал ДНК по натуральному АР-сайту и его 1'-дезоксианалогу в присутствии двухвалентных катионов, особенно Ca^{2+}, Mn^{2+} и Co^{2+}. Экзонуклеазная активность в препаратах фермента отсутствовала; оптимум pH приходился на 7.0–8.0, а оптимум ионной силы – на ~50 мМ NaCl. Ферментативная активность MtbEnd была низкой по отношению к АР-сайтам, модифицированным химиотерапевтическим агентом метоксиамином. Результаты исследования позволяют рассматривать MtbEnd в качестве возможной мишени при разработке новых противотуберкулезных средств.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, АР-эндонуклеаза, репарация ДНК, метоксиамин

DOI: 10.31857/S002689842102004X

Патогенный микроорганизм *Mycobacterium tuberculosis* проводит значительную часть своего жизненного цикла внутри макрофагов организма-хозяина и постоянно подвергается действию производимых ими активных форм кислорода и азота [1]. Для выживания клетки в таких условиях особенно важно функционирование систем репарации ДНК [2]. Значимую роль в защите генома бактерий в этой ситуации играет система эксцизионной репарации оснований (ЭРО), так как большинство повреждений в условиях окислительного стресса представлено окисленными основаниями и апурин-апиримидиновыми (АР-) сайтами, исправляемыми именно по пути ЭРО [3]. Определение нуклеотидной последовательности генома *M. tuberculosis* и сравнение его с другими бактериальными геномами позволило выявить основные ферменты, участвующие в этой системе [4, 5].

В число главных элементов системы ЭРО входят АР-эндонуклеазы – ферменты, гидролизующие фосфодиэфирную связь с 5'-стороны от АР-сайта с образованием 5'-фосфата и 3'-гидроксильной группы [6–8]. Отсутствие этой активности приводит к резкому накоплению мутаций или к гибели клетки. В клетках *Escherichia coli* присутствуют две АР-эндонуклеазы: конститутивная экзонуклеаза III, кодируемая геном *xthA*, и индуцируемая окислительным стрессом эндонуклеаза IV (EcoNfo), кодируемая геном *nfo*. У *M. tuberculosis* есть гомологи обоих этих белков: экзонуклеазе III соответствует белок MtbXthA, кодируемый геном *xthA*, а эндонуклеазе IV – белок MtbEnd, кодиру-

[#] Авторы внесли равный вклад.

Сокращения: ЭДТА – этилендиаминтетраацетат натрия; ЭРО – эксцизионная репарация оснований; AP (apurinic/apyrimidinic) – апурин-апиримидиновые (сайты, эндонуклеазы); EcoNfo – эндонуклеаза IV *Escherichia coli*; M^{2+} – ионы двухвалентных металлов; MtbEnd – эндонуклеаза IV *Mycobacterium tuberculosis*; MtbXthA – экзонуклеаза III *Mycobacterium tuberculosis*; THF ((3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl phosphate) – (3-гидроксителрагидрофуран-2-ил)метилфосфат.

емый геном *end*. Заметим, что в отличие от *E. coli*, где фермент Nfo выполняет вспомогательную функцию, основную роль в защите микобактериальной ДНК в условиях окислительного стресса играет именно эндонуклеаза IV [9]. В мышиной модели ген *end* входит в число необходимых для успешной инфекции *M. tuberculosis* [10], хотя в исследованиях с использованием морских свинок не обнаружено разницы между эффективностью инфекции штаммом дикого типа и штаммом с инактивированным геном *end* [11]. Однако активность MtbEnd может быть более важна в условиях лекарственной терапии. Ген *end* индуцируется при стрессе, вызванном обработкой *M. tuberculosis* ингибиторами синтеза микобактериальной клеточной стенки – изониазидом и тиокарлидом [12]. При исследовании чувствительности библиотеки транспозонных мутантов *M. tuberculosis* к антибиотикам ген *end* оказался в числе 5% генов, инактивация которых приводит к повышенной чувствительности к β-лактамному антибиотику меропенему (одно из средств "последней линии" при туберкулезе с множественной лекарственной устойчивостью) при росте *in vitro* [13]. В стационарной же фазе и в инфицированных макрофагах токсичность многих антибиотиков с разным механизмом действия (рифампицина, ципрофлоксацина, стрептомицина) для *M. tuberculosis* усиливается за счет окисления пула dNTP, если система репарации ДНК не успевает удалять включаемые поврежденные дезоксинуклеотиды [14]. Совокупность полученных на сегодняшний день данных позволяет рассматривать MtbEnd в качестве возможной мишени для новых противотуберкулезных препаратов, сенсибилизирующих бактерии к действию антибиотиков.

Ферментативные свойства MtbEnd частично охарактеризованы [9, 15], однако различия в свойствах, описанных в этих публикациях, и значительные отличия от EcoNfo в отношении специфичности к двухвалентным катионам и оптимальных значений pH и ионной силы не позволяют считать характеристику MtbEnd полной и однозначной. Разница в описанных свойствах MtbEnd может быть обусловлена разными последовательностями пептидов для аффинной хроматографии, введенных в рекомбинантный белок (пептид Strep-tag в работе [9] или два олигогистидиновых пептида на обоих концах белка в работе [15]), и разными процедурами выделения. Сведения об ингибировании MtbEnd потенциальными фармакологически активными молекулами в литературе отсутствуют.

Цель работы заключалась в изучении свойств рекомбинантной эндонуклеазы MtbEnd при сведении к минимуму модификации последовательности белка и продолжительности процедуры выделения. Для этого ген *end* штамма *M. tuberculosis* H37Rv клонировали в вектор для суперпродукции белка с олигогистидиновым пептидом на С-конце. Оптимизированы условия индукции синтеза рекомбинантного белка MtbEnd в трансформированных клетках *E. coli*, процедуры очистки рекомбинантного белка и проведения ферментативной реакции. Наконец, исследована чувствительность MtbEnd к проходящему клинические испытания ингибитору АР-эндонуклеаз – метоксиамину.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. В работе использовали штаммы *E. coli* XL10 Gold Δ*(mcrA)183* Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)*173 endA1 glnV44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* Hte F'[*proAB lacI*^{q}*ZΔM15* Tn*10*(Tet^r Amy Cm^r)] ("Agilent Technologies", США) и SoluBL21(DE3) F$^-$ *ompT* *hsdS*$_B$ ($r_B^-m_B^-$) *gal dcm* (DE3) ("Genlantis", США), геномную ДНК штамма *M. tuberculosis* H37Rv (ФГБУ "Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза", Россия), плазмиду pET-23b ("Merck Millipore", США). Работу проводили с рестриктазами FauNDI, Sfr274I, ДНК-лигазой бактериофага T4 ("Сибэнзим", Россия), полинуклеотидкиназой бактериофага T4, ДНК-полимеразой Taq и Pfu ("Биосан", Россия) и урацил-ДНК-гликозилазой *E. coli* ("New England Biolabs", США). Рекомбинантный белок EcoNfo был любезно предоставлен А.А. Ищенко из Университета Париж-Саклэ (Université Paris-Saclay, Франция). Олигодезоксирибонуклеотиды, в том числе модифицированные, синтезированы в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН. Структура олигонуклеотидов представлена в табл. 1. Мечение олигонуклеотидов ^{32}P по 5'-концу проводили полинуклеотидкиназой бактериофага T4 в условиях, рекомендованных производителем фермента. Двухцепочечные субстраты получали отжигом меченого олигонуклеотида 23X с 1.3-кратным избытком комплементарного олигонуклеотида 23comp. Для получения субстратов, содержащих натуральный (альдегидный) АР-сайт, дуплекс U:C обрабатывали урацил-ДНК-гликозилазой (1 U) в течение 30 мин согласно инструкции производителя.

Клонирование гена *end M. tuberculosis*. Амплификацию фрагмента размером 772 п.о. проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 65 мМ Трис-HCl (pH 8.9), 16 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 1.8 мМ $MgCl_2$, 0.05% Tween 20, 0.2 мМ dNTP, 1 мкМ праймеры end1 и end2 (табл. 1), 1 U ДНК-полимеразы Taq, 1 U ДНК-полимеразы Pfu и 1–10 нг геномной ДНК *M. tuberculosis*. Процесс амплификации состоял из начальной денатурации при 95°C (3 мин), 33 циклов, каждый из которых включал денатурацию при 96°C (10 с), отжиг при 60°C (10 с) и элонгацию при 72°C (40 с), и завершался элонгацией при 72°C (3 мин). Амплифицированный ген *end* клонировали в вектор pET-23b

по сайтам NdeI и XhoI. Полученная плазмида pET-23b-MtbEnd кодировала белок MtbEnd, несущий на С-конце пептид His_6, под промотором РНК-полимеразы бактериофага Т7. Нуклеотидную последовательность вставки подтверждали секвенированием по Сэнгеру.

Выделение белка MtbEnd. Клетки *E. coli* SoluBL21(DE3), трансформированные плазмидой pET-23b-MtbEnd, выращивали при 37°C на среде LB до оптической плотности (OD_{600}) 0.3. Затем 40 мл полученной культуры вносили в 4 л питательной среды LB и растили при 37°C до OD_{600} 0.6. Экспрессию индуцировали добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида до концентрации 1 мМ. После культивирования в течение 3 ч при 25°C клетки осаждали центрифугированием при 14000 × *g*. Все дальнейшие процедуры по выделению фермента проводили на льду или при 4°C. Биомассу суспендировали в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5) и 0.5 М NaCl (буфер А). Клетки разрушали ультразвуком, суспензию центрифугировали при 14000 × *g*. Осветленный лизат прогревали при 60°C в течение 15 мин, денатурированные белки отделяли центрифугированием при 14000 × *g* в течение 15 мин. Супернатант наносили на металл-хелатный сорбент Profinity IMAC Resin ("Bio-Rad Laboratories" США), насыщенный ионами Ni^{2+}, промывали сорбент буфером А и вели элюцию буфером А, содержащим 50 и 500 мМ имидазол. Фракции, содержащие белок нужной молекулярной массы, обессоливали гель-фильтрацией на сорбенте Bio-Gel P6 ("Bio-Rad Laboratories"), предварительно уравновешенном в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5) и 2 мМ дитиотреитол. К раствору белка добавляли равный объем холодного глицерина и хранили при −20°C. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда.

Определение активности АР-эндонуклеаз. Анализ проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ Трис-HCl (pH 7.8), 50 мМ NaCl и 0.5 мМ $MnCl_2$ или хлориды других двухвалентных металлов, в присутствии 50 нМ двухцепочечного олигонуклеотидного субстрата. Для исследования pH-зависимости реакции Трис-HCl заменяли на 20 мМ Na-фосфатный буфер с нужным значением pH. Реакцию проводили при температуре 37°C. После остановки реакции добавлением равного объема раствора, содержащего 80%-ный формамид, 20 мМ ЭДТА (pH 8.0), 0.1%-ный ксиленцианол и 0.1%-ный бромфеноловый синий, с последующим прогреванием в течение 2 мин при 95°C продукты реакции разделяли при помощи гель-электрофореза в 20%-ном полиакриламидном геле в присутствии 8 М мочевины при 45°C. Гели визуализировали радиолюминесцентным сканированием на установке Typhoon FLA 9500 ("GE Healthcare", США). Относительное содержание продукта в смеси определяли с использованием программы Gel-Pro Analyzer v4.0 ("Media Cybernetics", США). Результаты представлены как среднее и стандартное отклонение по трем независимым экспериментам.

Анализ консервативности в семействе Nfo. Биоинформатический анализ проводили на таксономически сбалансированной выборке из 93 полипептидных последовательностей, из которых 48 происходили из типа Actinobacteria, а 45 – из типа Proteobacteria. Для составления выборки вели поиск при помощи алгоритма blastp [16] в базе данных RefSeq Национального центра биотехнологической информации США [17], используя в качестве запроса последовательность MtbEnd для актинобактерий и EcoNfo для протеобактерий. В выборке оставляли не более 1 последовательности на таксономическое семейство. Последовательности выравнивали при помощи программы Clustal Omega [18]. Консервативность физико-химических свойств в позициях анализировали при помощи программы AMAS [19] с использованием стандартного набора Тейлора для физико-химических свойств аминокислот [20], допуская наличие не более 10% атипичных остатков. Для визуализации дерева последовательностей использовали программу iTOL [21]. Расчет значений pK_a остатков, образующих сайты связывания ионов двухвалентных металлов (M^{2+}), проводили в программе DelPhiPKa, реализующей решение уравнения Пуассона–Больцмана [22, 23], при концентрации соли 0.15 М в силовом поле AMBER для структур 1QTW для EcoNfo [24] и 5ZHZ для MtbEnd [25].

Таблица 1. Последовательности олигодезоксирибонуклеотидов, использованных в работе

Название	Последовательность (5' → 3')[a]
end1	TGAACATATGCTCATTGGTTCGCATGTC
end2	GAACTCGAGGCTGCCGGTTCTTTCCC
23X (X = THF, U, G, oxoG)[b]	CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT
23comp	AGAGGAAAGGAGCGAAGGGAGAG

[a] Подчеркнуты части праймеров для ПЦР, комплементарные последовательности геномной ДНК *M. tuberculosis* H37Rv.
[b] Двухцепочечные олигонуклеотиды в дальнейшем обозначены как X:C, где X – модифицированный нуклеотид.

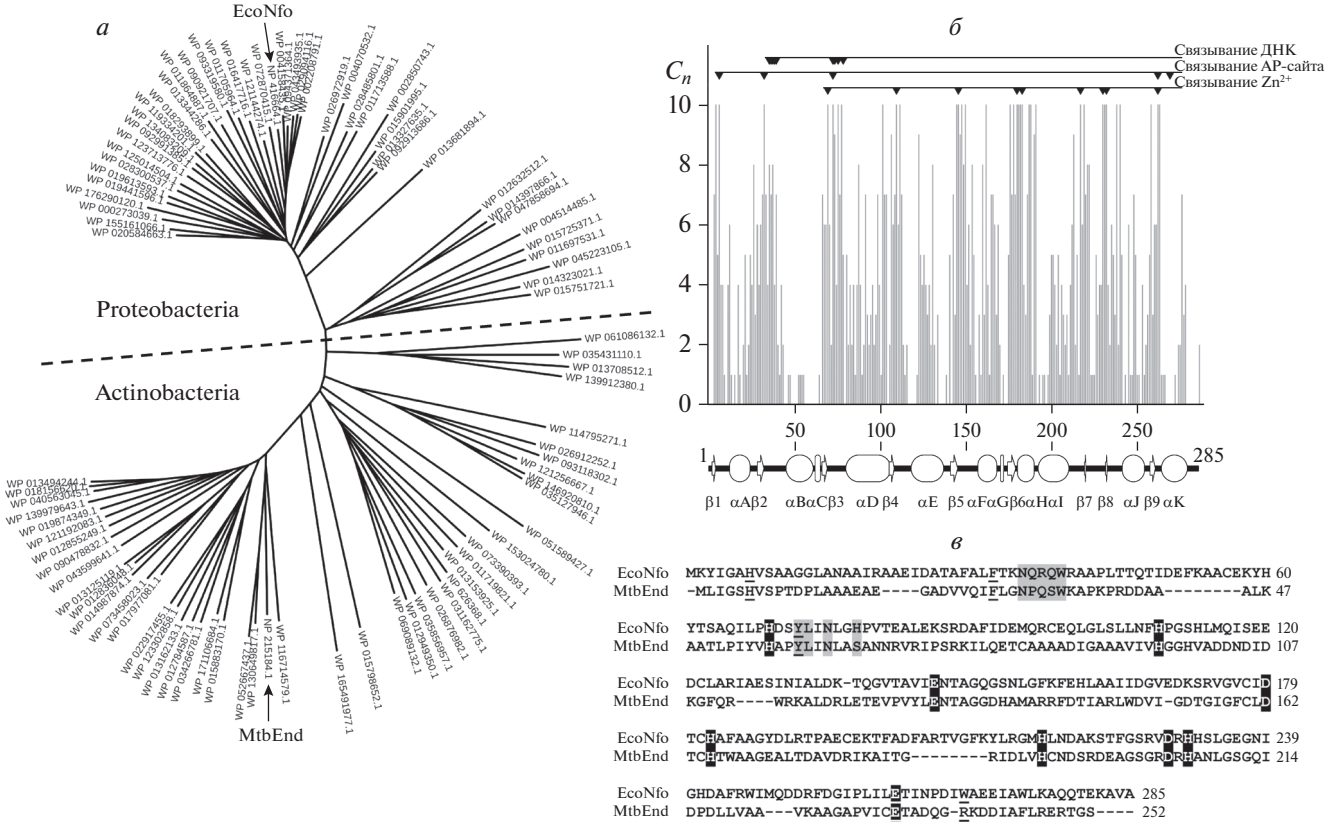


Рис. 1. Консервативность последовательности белков Nfo. *а* – Неукорененная дендрограмма последовательностей гомологов эндонуклеазы IV из протеобактерий и актинобактерий. *б* – График зависимости параметра консервативности C_n от положения в последовательности ($0 \le C_n \le 10$, где $C_n = 0$ при полном отсутствии консервативности физико-химических свойств аминокислотных остатков и $C_n = 10$ при полной консервативности во всем выравнивании). График построен для последовательности EcoNfo, элементы вторичной структуры приведены согласно пространственной структуре комплекса EcoNfo с ДНК (1QUM [24]). *в* – Выравнивание последовательностей EcoNfo и MtbEnd. Черным цветом отмечены остатки, принимающие участие в координации ионов металлов, серым — связывающие ДНК, подчеркнуты остатки, принимающие участие в узнавании AP-сайта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ консервативности в семействе эндонуклеазы IV

Последовательности, гомологичные эндонуклеазе IV, широко распространены среди бактерий. Анализ 93 последовательностей из типов Actinobacteria и Proteobacteria (рис. 1*а*, *б*) показал достаточно высокую консервативность физико-химических свойств аминокислот, в особенности в областях, лежащих в петлях между элементами вторичной структуры и несущих функционально важные остатки, принимающие участие в связывании ДНК, узнавании AP-сайта и координации ионов металлов. Однако некоторые остатки, идентифицированные как важные по результатам рентгеноструктурного анализа EcoNfo [24, 26], оказались менее консервативными. В частности, это относится к одной из петель, связывающей ДНК в малой бороздке с 3'-стороны от AP-сайта (^{35}NQRQW^{39} в EcoNfo), а также к остатку Trp268 (в EcoNfo), который образует стенку кармана, узнающего AP-сайт (рис. 1*б*, *в*). В обоих случаях упомянутые позиции абсолютно или высококонсервативны в последовательностях из протеобактерий, но либо не консервативны среди актинобактерий, либо консервативны со значительным изменением физико-химических свойств. Аналогичная картина выявлена для ряда остатков, сближенных в пространственной структуре с петлей ^{35}NQRQW^{39} и остатком Trp268. Таким образом, структурные элементы, отвечающие за узнавание поврежденной ДНК, частично реорганизованы в белке MtbEnd по сравнению с EcoNfo, и можно ожидать, что ферментативные свойства этих белков тоже не совсем идентичны.

Клонирование гена end и выделение рекомбинантной эндонуклеазы IV M. tuberculosis

Нуклеотидная последовательность амплифицированного фрагмента, содержащего ген *end*, совпала с последовательностью из штамма *M. tuberculosis* H37Rv в базе данных GenBank (геном-

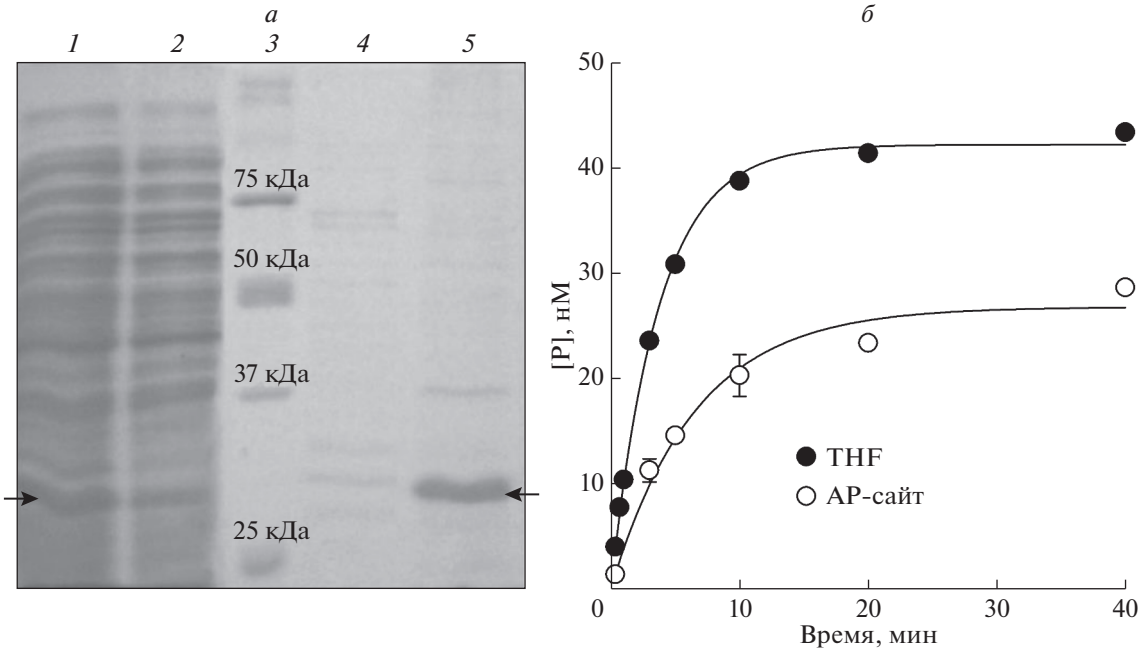


Рис. 2. Выделение и ферментативная активность белка MtbEnd. *а* – Электрофоретический анализ фракций в ходе выделения рекомбинантного белка MtbEnd: экстракт после прогревания (дорожка *1*); белок, не связавшийся с металл-хелатным сорбентом (дорожка *2*); маркеры подвижности (дорожка *3*); фракция, элюированная 50 мМ имидазолом (дорожка *4*); фракция, элюированная 500 мМ имидазолом (дорожка *5*). Стрелками отмечена полоса, соответствующая по подвижности белку MtbEnd. *б* – Кинетика накопления продукта реакции гидролиза ферментом MtbEnd субстратов, содержащих натуральный AP-сайт и его аналог THF. Реакцию проводили в присутствии 2.4 мкМ MtbEnd, 50 нМ двухцепочечного субстрата и 0.5 мМ $MnCl_2$.

ный идентификатор NC_000962.3), за исключением запланированной замены G→A в первом положении инициирующего кодона. Индуцированный синтез MtbEnd в клетках *E. coli* сопровождался образованием телец включения. Содержание фермента в растворимой фракции увеличивалось при понижении температуры культивирования с 37°C до 25°C, поэтому при получении биомассы культивирование проводили при пониженной температуре. Одной из задач исследования была разработка протокола быстрого выделения MtbEnd с минимальным числом стадий, так как хроматографические процедуры и продолжительный диализ могут приводить к утере двухвалентных катионов из активного центра белка. В связи с тем, что гомологичный белок Nfo из *E. coli* отличается повышенной термостабильностью [27], в качестве первого шага выделения использовали тепловую денатурацию осветленного лизата, что позволило избавиться от большей части примесных белков и, в частности, от экзонуклеазной активности в препарате, которую наблюдали ранее при работе с высокими концентрациями белка [9, 15]. После металл-хелатной хроматографии и обессоливания целевой белок с молекулярной массой ~28 кДа (расчетная молекулярная масса 27 910 Да) имел гомогенность >90% (рис. 2*а*) и не содержал неспецифичной нуклеазной активности. Фермент активно расщеплял 23-звенные олигонуклеотидные дуплексы, содержащие натуральный AP-сайт или его синтетический 1'-дезокси-аналог (3-гидроксителрагидрофуран-2-ил)метилфосфат (THF; рис. 2*б*), и не проявлял активности при наличии в этих позициях нормального 2'-дезоксигуанозина или его окисленного производного 8-оксо-2'-дезоксигуанозина. Гидролиз THF-субстрата был более эффективен, чем гидролиз натурального AP-сайта. Расчетные значения наблюдаемой константы скорости реакции в условиях избытка фермента (рис. 2*б*) составили 0.27 ± 0.01 мин$^{-1}$ для субстрата THF:C и 0.14 ± 0.02 мин$^{-1}$ для субстрата AP:C. По литературным данным, MtbEnd, в отличие от EcoNfo, проявляет повышенную специфичность к C и сниженную специфичность к T напротив продукта апуринизации (которой более всего подвержены нуклеозиды dG) [9], что ожидаемо для микобактерий и других организмов с высоким содержанием GC-пар в ДНК.

Влияние ионов металлов на ферментативную активность MtbEnd

Белок EcoNfo представляет собой металлофермент, нуждающийся в ионах двухвалентных металлов (M^{2+}) для поляризации связей P–O гидролизуемого фосфата и активации реагирующей

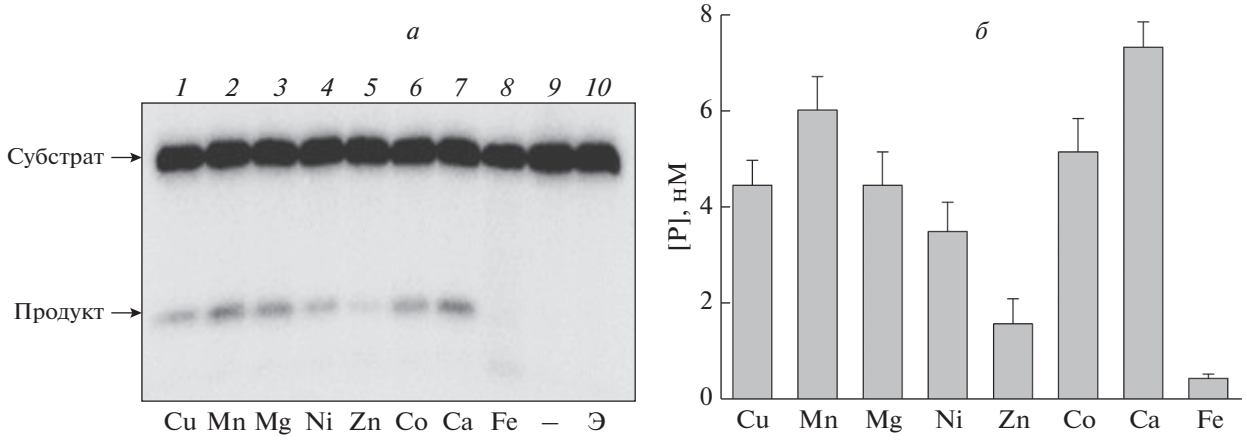


Рис. 3. Ферментативная активность MtbEnd в присутствии ионов двухвалентных металлов. *а* – Электрофоретический анализ продуктов реакции гидролиза дуплекса THF:C в присутствии ионов двухвалентных металлов (дорожки *1*–*8*). Дорожка *9* – субстрат в отсутствие фермента, дорожка *10* – реакция в присутствии ЭДТА (Э). *б* – Выход продукта реакции в присутствии ионов двухвалентных металлов. Реакцию проводили в присутствии 0.5 мМ хлорида соответствующего двухвалентного металла, 100 нМ MtbEnd и 50 нМ субстрата THF:C в течение 10 мин.

молекулы воды [26, 28–30]. Однако требования EcoNfo к природе M^{2+} до конца не выяснены. Нативный белок, выделяемый из клеток *E. coli* без гетерологичной экспрессии, содержит 2.4–2.5 ионов Zn^{2+}, 0.6–0.8 Mn^{2+}, 0.1–0.4 Fe^{2+} и ~0.2 Cu^{2+} на молекулу, прочие ионы M^{2+} присутствуют в количестве <0.1 на молекулу белка [29]. Показано, что ферментативная активность Nfo сохраняется в отсутствие ионов M^{2+} в реакционной смеси, но подавляется в присутствии хелатирующих агентов [28, 29]. При реактивации ионами M^{2+} после хелатирования активность EcoNfo выше в присутствии Mn^{2+} и Co^{2+}, чем в присутствии Zn^{2+} [29]. В кристаллах Nfo из разных видов бактерий три металлсвязывающих центра белка могут быть заняты в разных комбинациях ионами Zn^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+} и Cd^{2+}, включенными из кристаллизационного раствора [24–26, 31–33]. По данным структурных исследований в одном из металлсвязывающих центров обмен иона M^{2+} с раствором облегчен [26, 33]. В целом, EcoNfo присущи свойства металлзависимого фермента с умеренным сродством к каталитическим ионам M^{2+} и оптимальной композицией ионов $2Zn^{2+}/1Mn^{2+}$.

Аминокислотные остатки, координирующие ионы металлов, идентичны в белках EcoNfo и MtbEnd. Учитывая использование металлхелатной хроматографии для выделения MtbEnd, мы не можем исключить, что часть каталитических ионов была утеряна в ходе выделения и может быть замещена ионами из реакционной смеси. В связи с этим нами проанализирована активность MtbEnd в присутствии разных ионов M^{2+}. На рис. 3 представлены данные о влиянии ионов Zn^{2+}, Ca^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, Co^{2+} и Fe^{2+} на гидролиз дуплекса THF:C. Показано, что в присутствии 5 мМ ЭДТА ферментативная активность MtbEnd полностью исчезает (рис. 3*а*, дорожка *10*). Наибольшую активность фермент проявлял в присутствии Ca^{2+}, несколько меньшую – при наличии в растворе ионов Mn^{2+} и Co^{2+}, что для этих двух ионов согласуется с литературными данными по EcoNfo [26, 29] (рис. 3*б*). Как и в случае EcoNfo, в присутствии одних только ионов Zn^{2+} AP-эндонуклеазная активность MtbEnd была низкой. Фермент был умеренно активен при наличии в реакционной смеси ионов Cu^{2+} и Ni^{2+}, а в присутствии Fe^{2+} регистрировали низкую степень специфического расщепления, сопровождавшегося дополнительной деградацией продукта (рис. 3*а*). В присутствии других ионов M^{2+} такой деградации не наблюдалось, в отличие от ранних сообщений о наличии 3' → 5'-экзонуклеазной активности в препаратах MtbEnd [9]. Возможно, стадия тепловой денатурации в процессе выделения белка позволила избавиться от примесной экзонуклеазной активности.

Интересно, что по литературным данным ионы Mg^{2+} и Ca^{2+}, в присутствии которых MtbEnd проявляла высокую гидролитическую активность, не поддерживают активность EcoNfo [29]. Для MtbEnd ранее приводили следующие ряды "предпочтений": $Mg^{2+} > Ca^{2+} \sim Mn^{2+} > Co^{2+} \gg Zn^{2+}$, Fe^{2+}, Ni^{2+} [15] и $Mg^{2+} \sim Ca^{2+} > Mn^{2+} > Zn^{2+}$, Co^{2+} [9]. Некоторые различия в результатах связаны, по всей видимости, с разным расположением пептидов для аффинной хроматографии и с разными протоколами выделения и хранения рекомбинантного белка, что приводит к разной остаточной насыщенности сайтов связывания металлов эндогенными ионами M^{2+}. Для объяснения воз-

можных причин разной металлспецифичности EcoNfo и MtbEnd был проведен расчет значений pK_a остатков, образующих сайты связывания ионов M^{2+} в структурах этих белков (табл. 2). Основные различия обнаружены в области связывания иона 1 – одного из двух ионов, поляризующих связи P=O в фосфатной группе АР-сайта и активирующих молекулу воды для нуклеофильной атаки по атому фосфора [26, 30]. Значения pK_a остатков His56 и His96 в MtbEnd были соответственно на 0.37 и 0.24 единицы меньше, чем для гомологичных им остатков His69 и His109 в EcoNfo. Более выраженное депротонирование остатков His при нейтральном pH может приводить к более эффективному связыванию ионов M^{2+} в сайте 1 белка MtbEnd по сравнению с EcoNfo.

Как видно из данных, приведенных на рис. 3, присутствие в реакционной смеси ионов Mn^{2+} ассоциировано с достаточно высокой гидролитической активностью как MtbEnd, так и гомологичного белка EcoNfo, поэтому в дальнейших экспериментах использовали буфер, содержащий 0.5 мМ $MnCl_2$.

Влияние pH и ионной силы на ферментативную активность MtbEnd

Изменение концентрации ионов водорода оказывает выраженное влияние на скорость многих ферментативных реакций за счет изменения состояния ионизации боковых радикалов аминокислот в активном центре фермента. Таким образом, значение pH среды влияет на способность боковых радикалов служить донорами или акцепторами протонов и координировать ионы металлов. В частности, значения pK_a металлкоординирующих остатков His EcoNfo лежат в диапазоне 5.4–8.2 для белка в свободном состоянии и могут изменяться на 1–2 единицы pH при связывании ДНК [15]. Для EcoNfo pH-оптимум ферментативной активности гидролиза АР-сайта лежит в области 8.0–8.5 [34]. Для установления зависимости ферментативной активности MtbEnd от pH в отношении субстрата THF:C, проводили реакции в растворах, содержащих 25 мМ Na-фосфатный буфер в диапазоне pH 4.0–9.0 (рис. 4*а*). MtbEnd гидролизовала субстрат при всех значениях pH, при этом максимальные различия составляли около 3 раз. Зависимость активности от pH имела максимум в области pH 7–8, что согласуется с наличием как минимум двух критических для катализа ионизируемых аминокислотных остатков в активном центре фермента. Очевидными кандидатами на роль в возрастании активности с переходом в области pH 6 служат остатки His в позициях 56, 96, 165, 191 и 206, так как они координируют ионы M^{2+}; а также остаток His6, принимающий участие в узнавании АР-сайта (рис. 1*в*). Падение активности фермента при дальнейшем повышении pH может быть связано либо с общей дестабилизацией укладки полипептидной цепи, либо с ионизацией остатка Tyr59, который в норме заполняет полость в ДНК после выворачивания АР-сайта [24].

Влияние ионной силы раствора на гидролиз дуплекса (при pH 8.0) представлено на рис. 4*б*. Ферментативная активность MtbEnd имела выраженный оптимум при концентрации NaCl ~ 50 мМ, что сравнимо с оптимумом 50–100 мМ для EcoNfo [28]. Следует отметить, что области белка, контактирующие с ДНК, у MtbEnd содержат меньше положительно заряженных аминокислотных остатков, чем у EcoNfo (рис. 1*в*), и этим может быть обусловлен некоторый сдвиг оптимума в область более низких значений ионной силы.

Таблица 2. Расчетные значения pK_a остатков, образующих сайты связывания ионов M^{2+} в структурах EcoNfo и MtbEnd

Номер M^{2+}-связывающего сайта	EcoNfo		MtbEnd	
	а.о.[a]	pK_a	а.о.	pK_a
1	His69	7.14	His56	6.77
1	His109	6.74	His96	6.50
1, 3	Glu145	1.60	Glu129	1.56
3	Asp179	2.32	Asp162	1.82
2	His182	7.63	His165	7.60
3	His216	7.34	His191	7.43
2	Asp229	1.94	Asp204	1.89
2	His231	7.26	His206	7.28
3	Glu261	2.11	Glu233	2.30

[a] а.о – Аминокислотный остаток.

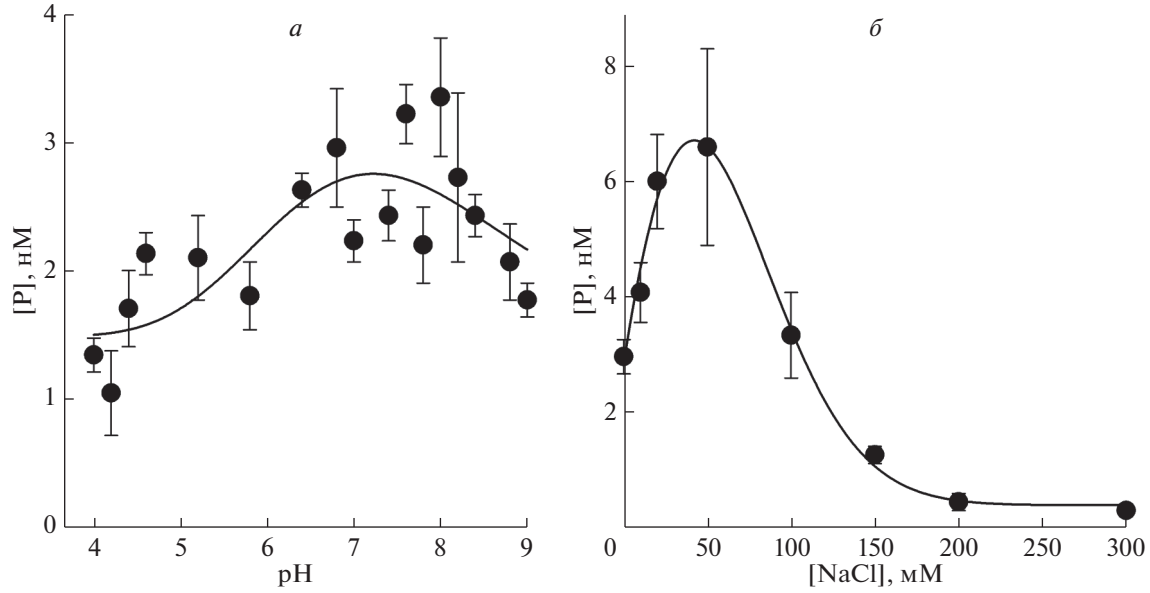


Рис. 4. Зависимость ферментативной активности MtbEnd от pH (*а*) и концентрации NaCl (*б*). Реакцию проводили в присутствии 0.5 нМ MtbEnd и 50 нМ субстрата THF:C в течение 30 мин.

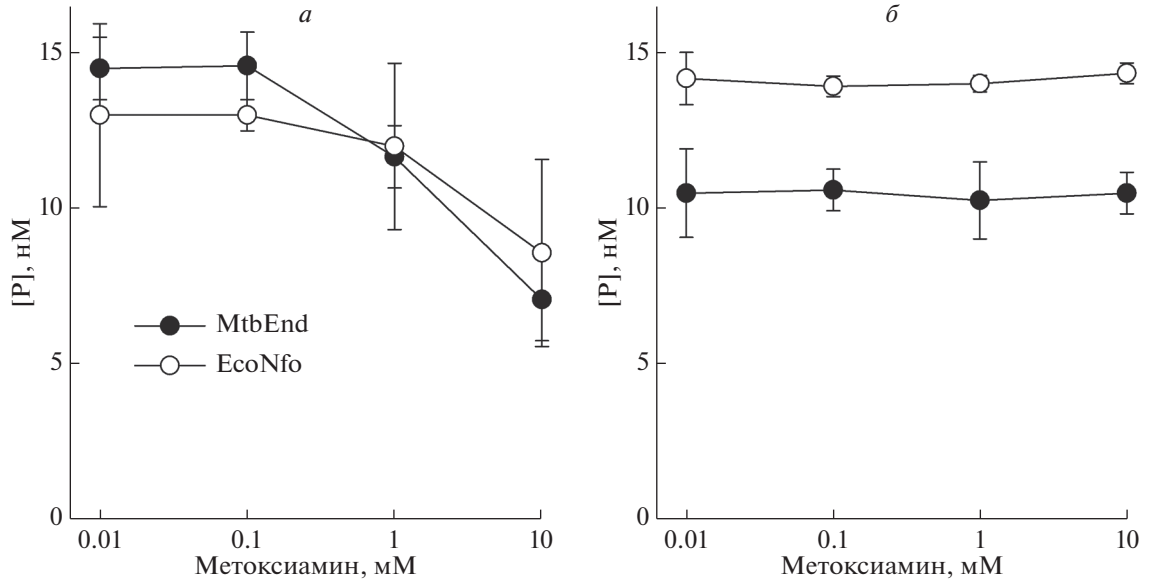


Рис. 5. Зависимость ферментативной активности MtbEnd и EcoNfo от концентрации метоксиамина при использовании в качестве субстратов AP:C (*а*) и THF:C (*б*).

Гидролитическая активность MtbEnd по AP-сайтам, модифицированным метоксиамином

Метоксиамин представляет собой небольшую молекулу, которая реагирует с альдегидной группой в составе AP-сайтов, что предотвращает их расщепление AP-эндонуклеазой человека APEX1 [35, 36]. Вследствие этого метоксиамин усиливает цитотоксичность широкого спектра терапевтических агентов, повреждающих ДНК, и в настоящее время проходит клинические испытания как сенситизатор опухолевых клеток [37–40]. Для белка EcoNfo сообщалось как об умеренном подавлении активности при реакции AP-сайтов с метоксиамином [41], так и об отсутствии эффекта [42, 43]; для MtbEnd такие данные отсутствуют. Для сравнительной оценки влияния такой модификации на активность ферментов MtbEnd и EcoNfo нами проанализировано расщепление субстратов AP:C и THF:C в присутствии 0.01–10 мМ метоксиамина. Учитывая, что метоксиамин не ингибирует ферменты непосредственно, а модифицирует на-

тивный АР-сайт, мы ожидали, что активность АР-эндонуклеаз снизится в отношении субстрата AP:C, но не THF:C. Результаты эксперимента полностью подтвердили предполагаемый механизм: наблюдалось зависимое от концентрации метоксиамина снижение количества продукта гидролиза AP:C, в то время как при любой концентрации метоксиамина оба фермента эффективно гидролизовали THF:C (рис. 5*а*, *б*). Заметим, что в сравнении с EcoNfo для MtbEnd выявлена тенденция к повышенной чувствительности к метоксиамину (рис. 5*а*).

Таким образом, нами показано, что рекомбинантный белок MtbEnd проявляет высокую ферментативную активность в присутствии ионов Ca^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+} и в несколько меньшей степени – Mg^{2+} или Cu^{2+}, что сильно отличает его от эндонуклеазы IV из *E. coli*. Максимальная ферментативная активность MtbEnd наблюдалась при концентрации NaCl ~50 мМ и pH 7.0–8.0, что свидетельствует о смещении оптимума в сторону пониженной ионной силы и основности раствора по сравнению с ферментом из *E. coli*. Модификация АР-сайтов метоксиамином – потенциальным противоопухолевым терапевтическим агентом – подавляла ферментативную активность MtbEnd на натуральном субстрате. Зная, что MtbEnd представляет собой главную АР-эндонуклеазу *M. tuberculosis*, можно рассматривать метоксиамин и другие соединения алкоксиаминового ряда как потенциальные лекарственные препараты для терапии микобактериальных инфекций.

Работа частично поддержана проектами базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН № АААА-А17-117020210027-9 (в части клонирования и выделения MtbEnd), АААА-А17-117020210023-1 (в части характеристики MtbEnd) и FSUS-2020-0035 (в части биоинформатического анализа и молекулярного моделирования белков Nfo). Секвенирование выполнено в ЦКП “Геномика” СО РАН.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saviola B., Bishai W. (2006) The genus *Mycobacterium* – medical. In: *The Prokaryotes*. Ed. Dworkin M. New York: Springer, p. 919–933.
2. Fang F.C. (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 820–832.
3. David S.S., O’Shea V.L., Kundu S. (2007) Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature.* **447**, 941–950.
4. Mizrahi V., Andersen S.J. (1998) DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence? *Mol. Microbiol.* **29**, 1331–1339.
5. Kurthkoti K., Varshney U. (2011) Base excision and nucleotide excision repair pathways in mycobacteria. *Tuberculosis.* **91**, 533–543.
6. Demple B., Harrison L. (1994) Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu. Rev. Biochem*. **63**, 915–948.
7. Mol C.D., Hosfield D.J., Tainer J.A. (2000) Abasic site recognition by two apurinic/apyrimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means. *Mutat. Res.* **460**, 211–229.
8. Королев В.Г. (2005) Эксцизионная репарация поврежденных оснований ДНК: АП-эндонуклеазы и ДНК-полимеразы. *Генетика*. **41**(10), 1301–1309.
9. Puri R.V., Singh N., Gupta R.K., Tyagi A.K. (2013) Endonuclease IV is the major apurinic/apyrimidinic endonuclease in *Mycobacterium tuberculosis* and is important for protection against oxidative damage. *PLoS One*. **8**, e71535.
10. Sassetti C.M., Rubin E.J. (2003) Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 12989–12994.
11. Puri R.V., Reddy P.V., Tyagi A.K. (2014) Apurinic/apyrimidinic endonucleases of *Mycobacterium tuberculosis* protect against DNA damage but are dispensable for the growth of the pathogen in guinea pigs. *PLoS One*. **9**, e92035.
12. Waddell S.J., Stabler R.A., Laing K., Kremer L., Reynolds R.C., Besra G.S. (2004) The use of microarray analysis to determine the gene expression profiles of *Mycobacterium tuberculosis* in response to anti-bacterial compounds. *Tuberculosis.* **84**, 263–274.
13. Xu W., DeJesus M.A., Rücker N., Engelhart C.A., Wright M.G., Healy C., Lin K., Wang R., Park S.W., Ioerger T.R., Schnappinger D., Ehrt S. (2017) Chemical genetic interaction profiling reveals determinants of intrinsic antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, e01334-17.
14. Fan X.-Y., Tang B.-K., Xu Y.-Y., Han A.-X., Shi K.-X., Wu Y.-K., Ye Y., Wei M.-l., Niu C., Wong K.-W., Zhao G.-P., Lyu L.-D. (2018) Oxidation of dCTP contributes to antibiotic lethality in stationary-phase mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **115**, 2210–2215.
15. Abeldenov S., Talhaoui I., Zharkov D.O., Ishchenko A.A., Ramanculov E., Saparbaev M., Khassenov B. (2015) Characterization of DNA substrate specificities of apurinic/apyrimidinic endonucleases from *Mycobacterium tuberculosis. DNA Repair.* **33**, 1–16.
16. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.
17. O'Leary N.A., Wright M.W., Brister J.R., Ciufo S., Haddad D., McVeigh R., Rajput B., Robbertse B., Smith-White B., Ako-Adjei D., Astashyn A., Badretdin A., Bao Y., Blinkova O., Brover V., Chetvernin V., Choi J., Cox E., Ermolaeva O., Farrell C.M., Goldfarb T., Gupta T., Haft D., Hatcher E., Hlavina W., Joardar V.S., Kodali V.K., Li W., Maglott D., Masterson P., McGar-

vey K.M., Murphy M.R., O'Neill K., Pujar S., Rangwala S.H., Rausch D., Riddick L.D., Schoch C., Shkeda A., Storz S.S., Sun H., Thibaud-Nissen F., Tolstoy I., Tully R.E., Vatsan A.R., Wallin C., Webb D., Wu W., Landrum M.J., Kimchi A., Tatusova T., DiCuccio M., Kitts P., Murphy T.D., Pruitt K.D. (2016) Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* **44**, D733–D745.

18. Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 539.
19. Livingstone C.D., Barton G.J. (1993) Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation. *Comput. Appl. Biosci.* **9**, 745–756.
20. Taylor W.R. (1986) The classification of amino acid conservation. *J. Theor. Biol.* **119**, 205–218.
21. Letunic I., Bork P. (2016) Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* **44**, W242–W245.
22. Wang L., Li L., Alexov E. (2015) p*K*a predictions for proteins, RNAs, and DNAs with the Gaussian dielectric function using DelPhi p*K*a. *Proteins.* **83**, 2186–2197.
23. Pahari S., Sun L., Basu S., Alexov E. (2018) DelPhiPKa: including salt in the calculations and enabling polar residues to titrate. *Proteins.* **86**, 1277–1283.
24. Hosfield D.J., Guan Y., Haas B.J., Cunningham R.P., Tainer J.A. (1999) Structure of the DNA repair enzyme endonuclease IV and its DNA complex: double-nucleotide flipping at abasic sites and three-metal-ion catalysis. *Cell.* **98**, 397–408.
25. Zhang W., Xu Y., Yan M., Li S., Wang H., Yang H., Zhou W., Rao Z. (2018) Crystal structure of the apurinic/apyrimidinic endonuclease IV from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **498**, 111–118.
26. Garcin E.D., Hosfield D.J., Desai S.A., Haas B.J., Björas M., Cunningham R.P., Tainer J.A. (2008) DNA apurinic-apyrimidinic site binding and excision by endonuclease IV. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 515–522.
27. Ljungquist S. (1980) Endonuclease IV from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **65**, 212–216.
28. Levin J.D., Johnson A.W., Demple B. (1988) Homogeneous *Escherichia coli* endonuclease IV: characterization of an enzyme that recognizes oxidative damage in DNA. *J. Biol. Chem.* **263**, 8066–8071.
29. Levin J.D., Shapiro R., Demple B. (1991) Metalloenzymes in DNA repair: *Escherichia coli* endonuclease IV and *Saccharomyces cerevisiae* Apn1. *J. Biol. Chem.* **266**, 22893–22898.
30. Ivanov I., Tainer J.A., McCammon J.A. (2007) Unraveling the three-metal-ion catalytic mechanism of the DNA repair enzyme endonuclease IV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 1465–1470.
31. Tomanicek S.J., Hughes R.C., Ng J.D., Coates L. (2010) Structure of the endonuclease IV homologue from *Thermotoga maritima* in the presence of active-site divalent metal ions. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **66**, 1003–1012.
32. Asano R., Ishikawa H., Nakane S., Nakagawa N., Kuramitsu S., Masui R. (2011) An additional C-terminal loop in endonuclease IV, an apurinic/apyrimidinic endonuclease, controls binding affinity to DNA. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **67**, 149–155.
33. Tsutakawa S.E., Shin D.S., Mol C.D., Izumi T., Arvai A.S., Mantha A.K., Szczesny B., Ivanov I.N., Hosfield D.J., Maiti B., Pique M.E., Frankel K.A., Hitomi K., Cunningham R.P., Mitra S., Tainer J.A. (2013) Conserved structural chemistry for incision activity in structurally non-homologous apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 and endonuclease IV DNA repair enzymes. *J. Biol. Chem.* **288**, 8445–8455.
34. Ljungquist S. (1977) A new endonuclease from *Escherichia coli* acting at apurinic sites in DNA. *J. Biol. Chem.* **252**, 2808–2814.
35. Liuzzi M., Talpaert-Borlé M. (1985) A new approach to the study of the base-excision repair pathway using methoxyamine. *J. Biol. Chem.* **260**, 5252–5258.
36. Wei S., Shalhout S., Ahn Y.-H., Bhagwat A.S. (2015) A versatile new tool to quantify abasic sites in DNA and inhibit base excision repair. *DNA Repair.* **27**, 9–18.
37. Liu L., Gerson S.R. (2004) Therapeutic impact of methoxyamine: blocking repair of abasic sites in the base excision repair pathway. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **5**, 623–627.
38. van Midwoud P.M., Sturla S.J. (2013) Improved efficacy of acylfulvene in colon cancer cells when combined with a nuclear excision repair inhibitor. *Chem. Res. Toxicol.* **26**, 1674–1682.
39. 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. (2016) Radiosensitization of non-small-cell lung cancer cells and xenografts by the interactive effects of pemetrexed and methoxyamine. *Radiother. Oncol.* **121**, 335–341.
40. 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. (2017) Phase I clinical trial of the base excision repair inhibitor methoxyamine in combination with fludarabine for patients with advanced hematologic malignancies. *Oncotarget.* **8**, 79864–79875.
41. Bailly V., Verly W.G. (1989) The multiple activities of *Escherichia coli* endonuclease IV and the extreme lability of 5'-terminal base-free deoxyribose 5-phosphates. *Biochem. J.* **259**, 761–768.
42. Cunningham R.P., Saporito S.M., Spitzer S.G., Weiss B. (1986) Endonuclease IV (*nfo*) mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **168**, 1120–1127.
43. Rosa S., Fortini P., Karran P., Bignami M., Dogliotti E. (1991) Processing *in vitro* of an abasic site reacted with methoxyamine: a new assay for the detection of abasic sites formed *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5569–5574.

CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT ENDONUCLEASE IV FROM *Mycobacterium tuberculosis*

M. A. Dymova[1], A. V. Endutkin[1], V. V. Polunovsky[2], A. I. Zakabunin[1], E. A. Khrapov[1], N. A. Torgasheva[1], A. V. Yudkina[1], G. V. Mechetin[1], M. L. Filipenko[1], and D. O. Zharkov[1, 2, *]

[1]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

[2]Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

**e-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru*

Mycobacterium tuberculosis bacteria contain two apurinic/apyrimidinic (AP) endonucleases: endonuclease IV (MtbEnd) and exonuclease III (MtbXthA), with endonuclease IV playing a dominant role in the protection of mycobacterial DNA from oxidative stress. Endonuclease IV from Mycobacteria differs significantly from its homologues in *Escherichia coli* and other Proteobacteria in a number of conserved positions important for DNA binding and AP site recognition. Here, we report cloning of the *M. tuberculosis end* gene, purification and characterization of recombinant MtbEnd. The protein hydrolyzed DNA at the natural AP site and its 1'-deoxy analog in the presence of divalent cations, of which Ca^{2+}, Mn^{2+}, and Co^{2+} supported the highest activity. The pH optimum at 7.0–8.0 and the ionic strength optimum at ~50 mM NaCl were determined. The enzymatic activity of MtbEnd was suppressed in the presence of methoxyamine, a chemotherapeutic agent that modifies AP sites. Based on the results, MtbEnd may be considered a possible target for new anti-tuberculosis drugs.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, AP endonuclease, DNA repair, methoxyamine

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 2, с. 269–276

ЭНЗИМОЛОГИЯ СИСТЕМ РЕПАРАЦИИ ДНК

УДК 577.29

5'-ДЕЗОКСИРИБОЗОФОСФАТЛИАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ АПУРИНОВОЙ/АПИРИМИДИНОВОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ 1

© 2021 г. Е. С. Ильина[a, b], О. И. Лаврик[a, b], С. Н. Ходырева[a, *]

[a] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия*

[b] *Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия*

**e-mail: svetakh@niboch.nsc.ru*

Поступила в редакцию 27.08.2020 г.
После доработки 16.10.2020 г.
Принята к публикации 22.10.2020 г.

Одно из наиболее часто встречающихся повреждений ДНК – появление апуриновых/апиримидиновых (АР-) сайтов. Основной путь репарации АР-сайтов инициирует апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 (APE1). При гидролизе этим ферментом фосфодиэфирной связи с 5'-стороны от АР-сайта образуется однонуклеотидная брешь, фланкированная 3'-гидроксильной и 5'-дезоксирибозофосфатной (5'-dRP) группой. Известно, что после гидролиза АР-сайта APE1 некоторое время остается связанной с продуктом. Этот этап работы APE1 стал предметом проведенного нами исследования, в результате которого обнаружена способность APE1 формировать продукт ковалентного присоединения к цепи ДНК, содержащей брешь с 5'-dRP-группой, которая обращена в сторону бреши. Кроме того, установлено, что, оставаясь в комплексе с продуктом гидролиза АР-сайта, APE1 проявляет 5'-dRP-лиазную активность, катализируя отщепление остатка 5'-dRP. Ранее в литературе не было сообщений на эту тему. Наличие у APE1 лиазной активности может быть важным моментом при репарации АР-сайтов в случае дефицита или мутаций ДНК-полимеразы β – основного фермента, удаляющего 5'-dRP в процессе репарации поврежденных оснований.

Ключевые слова: апуриновые/апиримидиновые сайты, апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1, дезоксирибозофосфатлиазная активность, репарация оснований ДНК, аффинная модификация

DOI: 10.31857/S0026898421020075

Апуриновые/апиримидиновые (АР-) сайты – один из наиболее часто встречающихся типов повреждений ДНК. Основной путь их метаболизма в клетке – это гидролиз апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазой 1 (APE1) [1]. APE1 расщепляет сахарофосфатный остов с 5'-стороны от АР-сайта в ходе реакции гидролиза с образованием остатка дезоксирибозы на 5'-конце олигонуклеотида, фланкирующего брешь. Ранее нами была обнаружена способность APE1 образовывать основание Шиффа с АР-сайтами [2]. Также известно, что APE1 после гидролиза АР-сайта образует достаточно стабильный комплекс с продуктом реакции [1, 2], предположительно в основном за счет взаимодействия с остатком дезоксирибозы на 5'-конце бреши.

Учитывая это обстоятельство, мы предположили возможность формирования APE1 основания Шиффа с дезоксирибозофосфатным остатком на 5'-конце олигонуклеотида, фланкирующего брешь. Для детекции таких продуктов необходимо вводить радиоактивную метку, например, на 3'-конец олигонуклеотида, содержащего 5'-дезоксирибозофосфат (5'-dRP). Варьируя положение радиоактивной метки на 3'- или 5'-конце олигонуклеотидов, формирующих дуплекс ДНК, нам удалось с помощью электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях зарегистрировать меченые APE1-продукты, которые могли быть образованы в результате ковалентного присоединения APE1 к ДНК, содержащей брешь, фланкированную 5'-dRP-группой. Время жизни продуктов ковалентного присоединения APE1 к таким ДНК не превышало 15 мин. Кроме того, установлено, что, оставаясь в комплексе с продуктом гидролиза АР-сайта, APE1 проявляет 5′-dRP-лиазную активность, отщепляя 5'-dRP-остаток и оставаясь связанной с ним, по крайней мере, в течение 30 мин.

Сокращения: АР-сайт – апуриновый/апиримидиновый сайт; APE1 – апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1; BER – эксцизионная репарация оснований; D – диэтиленгликолевый остаток; 5'-dRP – 5'-дезоксирибозофосфат; Polβ – ДНК-полимераза β; UDG – урацил-ДНК-гликозилаза *Escherichia coli*.

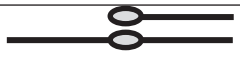
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Синтетические олигонуклеотиды синтезированы в Лаборатории биомедицинской химии (ИХБФМ СО РАН). В работе использованы [γ-^{32}P]ATP и [α-^{32}P]dATP (>3000 Ки/ммоль) – продукция Лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН; Т4-полинуклеотидкиназа, урацил-ДНК-гликозилаза *Escherichia coli* (UDG) ("Биосан", Россия), маркеры молекулярных масс белков ("Thermo Fisher Scientific", США). Плазмиды, содержащие кДНК APE1 человека и ДНК-полимеразы β (Polβ) крысы, любезно предоставлены Dr. S. Wilson (National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, США. Рекомбинантные белки APE1 и Polβ были выделены по ранее описанным методикам ([3] и [4] соответственно).

Получение AP- и 5'-dRP-ДНК. Последовательности использованных ДНК-дуплексов приведены в табл. 1, где D – остаток диэтиленгликоля, синтетический аналог AP-сайта [5].

Формирование ДНК-дуплексов, введение [^{32}P]-метки на 5'-конец олигонуклеотидов, обработку UDG для получения AP- и 5'-dRP-ДНК проводили по ранее опубликованной методике [6]. Так, введе-

Таблица 1. Использованные в работе ДНК-дуплексы

Обозначение	Последовательность	Схематическое изображение
ДНК1	5'-pUCCCGGCTTAGTCGCC-3'	
ДНК2	5'-pUCCCGGCTTAGTCGCC-3' 3'-GGGCCGAATCAGCGG-5'	
ДНК3	5'-pUCCCGGCTTAGTCGCC-3' 3'-GGGGCCGAATCAGCGG-5'	
ДНК4	5'-pUCCCGGCTTAGTCGCC-3' 3'-CCCTCCGGGACCGCAA**G**GGGCCGAATCAGCGG-5'	
ДНК5	5'-pUCCCGGCTTAGTCGCC-3' 3'-CCCTCCGGGACCGCAA**U**GGGCCGAATCAGCGG-5'	
ДНК6	5'-pUCCCGGCTTAGTCGCC-3' 3'-CCCTCCGGGACCGCAA**D**GGGCCGAATCAGCGG-5'	
ДНК7	5'-pU\ 5'-GGGAGGCCCTGGCGTT·CCCGGCTTAGTCGCC-3' 3'-CCCTCCGGGACCGCAA**G**GGGCCGAATCAGCGG-5'	
ДНК8	5'-pU\ 5'-GGGAGGCCCTGGCGTT·CCCGGCTTAGTCGCC-3' 3'-CCCTCCGGGACCGCAA**U**GGGCCGAATCAGCGG-5'	
ДНК9	5'-pU\ 5'-GGGAGGCCCTGGCGTT·CCCGGCTTAGTCGCC-3' 3'-CCCTCCGGGACCGCAA**D**GGGCCGAATCAGCGG-5'	
ДНК10	5'-GGGAGGCCCTGGCGTT**U**CCCGGCTTAGTCGCC-3' 3'-CCCTCCGGGACCGCAA**G**GGGCCGAATCAGCGG-5'	

ние 5'-[^{32}P]-метки осуществляли с использованием Т4-полинуклеотидкиназы. Для получения ДНК-дуплексов соответствующие олигодезоксирибонуклеотиды смешивали в эквимолярном соотношении в буфере, содержащем 10 мМ Трис-HCl (pH 8.0) и 1 мМ EDTA, реакционную смесь нагревали в течение 5 мин при 90°C, а затем медленно снижали температуру до комнатной. UDG-обработку ДНК, содержащей dUMP, проводили непосредственно перед экспериментом: 1 пмоль ДНК инкубировали с 0.1 U UDG 30 мин при 37°C.

Введение радиоактивной метки на 3'-конец олигонуклеотида проводили с использованием [α-^{32}P]dATP и Polβ, как описано ранее [7]. Реакционную смесь (200 мкл), содержащую 50 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 50 мМ NaCl, 10 мМ $MgCl_2$, 0.5 мкМ ДНК, 5 МБк [α-^{32}P]dATP, 1 мкМ dATP и 0.2 мкМ Polβ, инкубировали 90 мин при 37°C. Polβ инактивировали нагреванием при 90°C в течение 5 мин. Радиоактивно меченный олигонуклеотид выделяли, как описано ранее [6].

Ковалентное присоединение белков APE1 и Polβ к AP-/dRP-ДНК. Реакционную смесь (10 мкл), содержащую 50 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 50 мМ NaCl, 10 мМ EDTA, 0.1 мкМ [^{32}P]-dRP-ДНК и APE1 (0.3, 0.6, 1.2 мкМ) и/или Polβ (0.3 мкМ или 35 нМ), смешивали во льду и инкубировали при 37°C. Затем для стабилизации основания Шиффа в аддуктах [^{32}P]-dRP-ДНК и белков в реакционную смесь добавляли $NaBH_4$ до концентрации 20 мМ и инкубировали 30 мин во льду. После этого продукты анализировали электрофорезом в 12.5%-ном SDS-ПААГ [8]. Гели высушивали и анализировали с использованием Biomolecular Imager Typhoon FLA 9 500 (“GE Healthcare Life Sciences”, США) и программного обеспечения Quantity One (“Bio-Rad”, США).

Анализ 5'-dRP-лиазной активности APE1. Реакционная смесь (10 мкл) содержала 0.1 мкМ ДНК-дуплекс с радиоактивной меткой на 3′-конце 5'-dRP-олигонуклеотида, 0.3 мкМ APE1 (где указано) и следующие стандартные компоненты: 50 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 50 мМ NaCl, 10 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреитол, 0.05 мг/мл BSA. Пробы инкубировали при 37°C и отбирали аликвоты через 2, 5, 10, 15 и 20 мин. Реакцию останавливали добавлением метоксиамина до его конечной концентрации 30 мМ с последующей инкубацией при 0°C в течение 30 мин, после чего анализировали продукты электрофорезом в 20%-ном ПААГ в присутствии 7 М мочевины [9]. Далее гели обрабатывали, как описано в предыдущем разделе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие APE1 и Polβ с ДНК, содержащими 5′-дезоксирибозофосфатную группу

Для изучения взаимодействия белков с 5'-dRP-группой использовали различные ДНК-структуры, содержащие упомянутую группу. Все они представлены в табл. 1. Во всех случаях ДНК с 5'-dRP-группами и AP-сайтами получали обработкой UDG соответствующих dUMP-содержащих ДНК непосредственно перед экспериментом. Для выяснения механизма образования продуктов ковалентного присоединения APE1 к ДНК использовали ДНК-дуплекс, имитирующий продукт гидролиза AP-сайта APE1 – ДНК7, в котором однонуклеотидная брешь в цепи фланкирована с 5'-стороны дезоксирибозофосфатным остатком, содержащим введенную [^{32}P]-радиоактивную метку. Эта структура ДНК имитирует продукт гидролиза AP-сайта в реакции, катализируемой APE1. В этом случае радиоактивная метка содержится в 5'-dRP-остатке, непосредственно участвующем в образовании основания Шиффа с аминогруппой белка, которая вовлечена в удаление 5'-dRP-остатка. Такая локализация радиоактивной метки позволяет регистрировать ранний интермедиат – белок с присоединенным к нему олигонуклеотидом, – а также продукт β-элиминирования, из которого уже удален остаток олигонуклеотида, но дезоксирибозофосфат еще остается связанным с белком. Субстрат, имеющий такую локализацию радиоактивной метки, ранее был нами использован для поиска в клеточных экстрактах дезоксирибозофосфатлиаз, то есть белков, которые способны образовывать основания Шиффа с подобной структурой ДНК и осуществлять удаление остатка 5'-дезоксирибозы [10]. APE1 инкубировали с ДНК-дуплексом, имитирующим продукт реакции гидролиза AP-сайта под действием APE1, в течение различных промежутков времени. В этой ДНК 5'-dRP-группа, обращенная в сторону бреши, содержала [^{32}P]. Для стабилизации ковалентных аддуктов APE1-ДНК аликвоты обрабатывали боргидридом натрия и анализировали электорофоретическую подвижность продуктов в ПААГ (рис. 1). Образующиеся радиоактивно меченные продукты на основании их электрофоретической подвижности могут быть отнесены к APE1, ковалентно присоединенной к ДНК, содержащей 5'-dRP-остаток. Таким образом, результаты анализа согласуются с предположением о формировании APE1 ковалентных аддуктов с продуктом катализируемой реакции гидролиза AP-сайта.

По-видимому, за счет β-элиминирования происходит отщепление олигонуклеотида, а дезоксирибозофосфатный остаток остается связанным с белком, по крайней мере, в течение 30 мин. На такой сценарий указывает набор образованных ме-

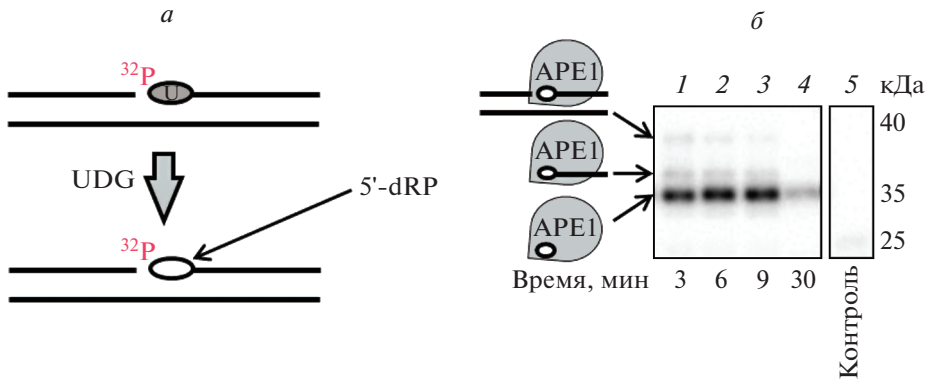


Рис. 1. Схема формирования и анализа продуктов сшивки 5'-dRP-ДНК с APE1. *а* – ДНК, содержащие на 5'-конце олигонуклеотида остаток [^{32}P]-dUMP, обрабатывали UDG. *б* – 100 нМ 5'-dRP-ДНК (ДНК7) инкубировали с 300 нМ APE1, через указанные промежутки времени аликвоты реакционной смеси обрабатывали боргидридом натрия и анализировали электрофорезом в 12.5%-ном SDS-ПААГ. Дорожки *1–4* соответствуют продуктам реакции за указанное время, дорожка *5* – контрольный образец, не содержащий APE1.

ченых продуктов и последующая кинетика их распада.

Для анализа справедливости предположения о способности APE1 проявлять AP/5'-dRP-лиазную активность и исследования специфичности этого процесса в отношении различных структур ДНК на основе 5'-[^{32}P]-меченого dUMP-содержащего олигонуклеотида (ДНК1) были созданы ДНК, имитирующие субстраты разных путей репарации, включая эксцизионную репарацию оснований (BER) (ДНК7–ДНК10) и негомологичное соединение концов (ДНК2–ДНК6) (схематическое изображение ДНК см. в табл. 1). Основание Шиффа представляет собой интермедиат реакции β- и β,δ-элиминирования, катализируемого AP/5'-dRP-лиазами. Однако в литературе описаны примеры формирования основания Шиффа, не приводящего к последующему расщеплению остова ДНК [6, 11, 12]. Для слежения за удалением 5'-dRP остатка из ДНК, моделирующих субстраты репарационных процессов, использовали набор ДНК, в которых один из олигонуклеотидов содержал на 5'-конце радиоактивно меченную dRP-группу (см. табл. 1). В этих ДНК радиоактивная метка содержится в 5'-dRP-остатке, непосредственно участвующем в образовании основания Шиффа при катализе лиазной реакции. Целевые белки инкубировали с 5'-dRP-ДНК в течение определенных промежутков времени, затем восстанавливали основание Шиффа с помощью боргидрида натрия и продукты этих превращений подвергали электрофоретическому разделению в денатурирующих условиях. Проведен сравнительный анализ меченых продуктов сшивки ДНК–белок для APE1, а также полимеразы Polβ – классической 5'-dRP-лиазы процесса BER [13]. Из данных, представленных на рис. 2, видно, что для обоих белков, с учетом их молекулярной массы (39 кДа Polβ и 35.5 кДа APE1), в пределах одного типа ДНК наборы меченых продуктов схожи. В каждом случае наблюдаются минорные продукты со сниженной электрофоретической подвижностью и мажорные – с электрофоретической подвижностью, практически совпадающей с таковой у исходных белков. Первый тип продуктов, вероятно, соответствует белку, содержащему ковалентно присоединенный олигонуклеотид (до расщепления связи), причем сам этот олигонуклеотид может находиться в составе ДНК-дуплекса или диссоциировать из него при плавлении дуплекса во время подготовки проб. Косвенно об этом можно судить по электрофоретической подвижности продуктов в зависимости от молекулярной массы ДНК-дуплекса, хотя присоединяемый к белку олигонуклеотид везде одинаков. Анализ продуктов сшивки белков с одноцепочечным 5'-dRP-содержащим олигонуклеотидом подтверждает это предположение. При подготовке образца для анализа по методу Леммли [8] в пробу не вносятся соединения, обеспечивающие разрушение водородных связей между основаниями ДНК, поэтому не всегда происходит количественное плавление дуплекса.

Для обоих белков с течением времени сначала исчезали продукты с более низкой электрофоретической подвижностью, которые относятся к белку с ковалентно присоединенной ДНК. В процессе реакции β-элиминирования олигонуклеотид высвобождается из ковалентного комплекса с белком, а дезоксирибозофосфат, несущий радиоактивную метку, продолжает оставаться связанным с белком. Этому продукту на радиоавтографе соответствуют полосы с максимальной электрофоретической подвижностью, так как присоединенный 5'-dRP-остаток практически не изменяет электрофоретическую подвижность белка (см. схему на рис. 1*б*). Правильность отнесения этого продукта была подтверждена сопоставлением по-

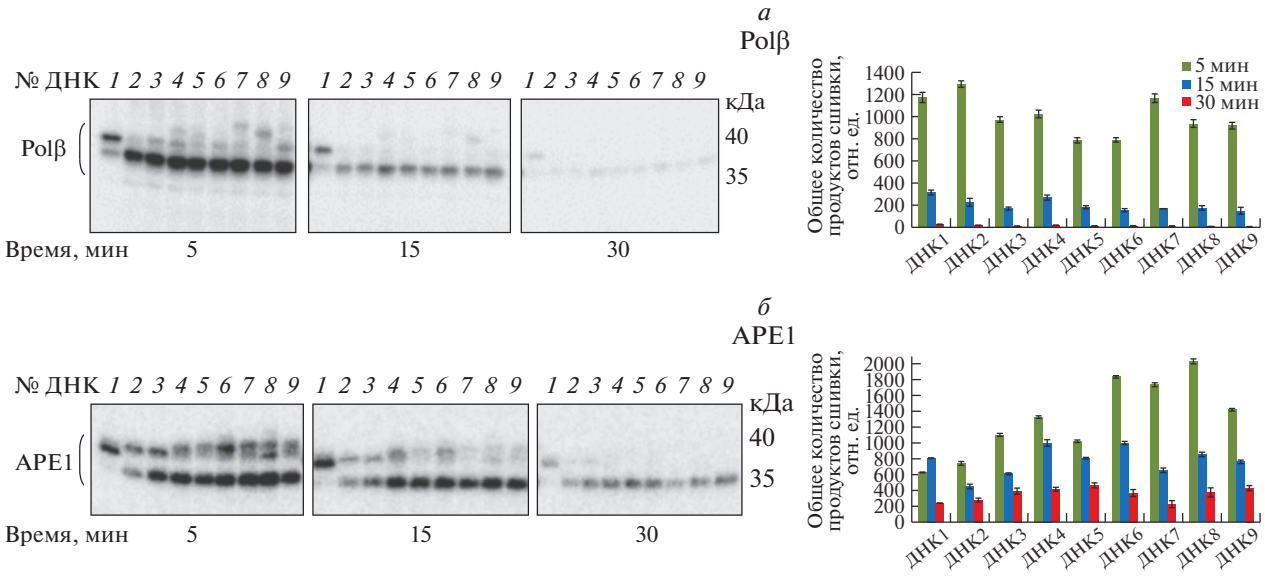


Рис. 2. Кинетика образования и распада продуктов сшивки dRP-ДНК с Polβ (*а*) и APE1 (*б*). Образец ДНК (100 нМ), содержащей 5'-[^{32}P]-dRP-остаток (ДНК1–ДНК9, указано над рисунком), инкубировали с 300 нМ Polβ или 300 нМ APE1 и через указанные промежутки времени отбирали аликвоты, обрабатывали боргидридом натрия и анализировали электрофорезом в 12.5%-ном SDS-ПААГ.

ложения в геле полосы белка (по данным окрашивания Кумасси) (рис. 3, левая панель) и соответствующей полосы на радиоавтографе (рис. 3, правая панель). Сравнительный анализ спектров продуктов пришивки различных 5'-dRP-ДНК к APE1 и Polβ и кинетика их распада свидетельствуют, что и в случае APE1 также происходит β-элиминирование, хотя и с меньшей эффективностью, чем для Polβ (рис. 2). Следует отметить, что оба белка проявляют лиазную активность на ДНК различной структуры, а не только той, которая имитирует интермедиаты процесса BER, что, несомненно, тоже представляет интерес.

Для выяснения взаимовлияния APE1 и Polβ при их взаимодействии с ДНК-интермедиатами BER проведены эксперименты по пришивке этих белков к ДНК7 (структура с расщепленным AP-сайтом) и ДНК10 (структура с интактным AP-сайтом) при одновременном присутствии обоих белков в нескольких концентрациях. В качестве примера на рис. 4 приведен анализ продуктов, образовавшихся за 1 мин в присутствии 35 нМ Polβ и различных концентраций APE1 (0.3, 0.6 и 1.2 мкМ). В целом, в выбранных условиях эффективность пришивки Polβ и APE1 к ДНК с интактными AP-сайтами сопоставима. При взаимодействии Polβ со своим субстратом, ДНК-дуплексом с 5'-dRP-группой на краю бреши (рис. 4), сшивки образуются очень эффективно, при этом даже 40-кратный избыток APE1 не влияет на выход продуктов, относящихся к Polβ. В то же время, несмотря на эффективное взаимодействие Polβ с ДНК, для APE1 сохраняется возможность связываться с ДНК и осуществлять β-элиминирование, о чем свидетельствует образование продуктов APE1-dRP (рис. 4, продукт с самой высокой электрофоретической подвижностью на дорожках *2*–*4*). Следует отметить, что в клетках количество APE1 может варьировать в широком диапазоне, но концентрация APE1 всегда выше, чем Polβ [14, 15]; именно поэтому использованные нами в экспериментах соотношения этих белков

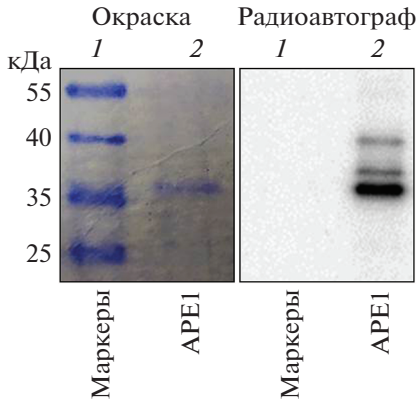


Рис. 3. Анализ продуктов модификации APE1 на основании их электрофоретической подвижности. 100 нМ 5'-dRP-ДНК (ДНК7) инкубировали с 300 нМ APE1 в течение 3 мин, обрабатывали боргидридом натрия и анализировали электрофорезом в 12.5%-ном SDS-ПААГ. Левая панель – окрашивание геля Кумасси, правая панель – радиоавтограф этого же геля.

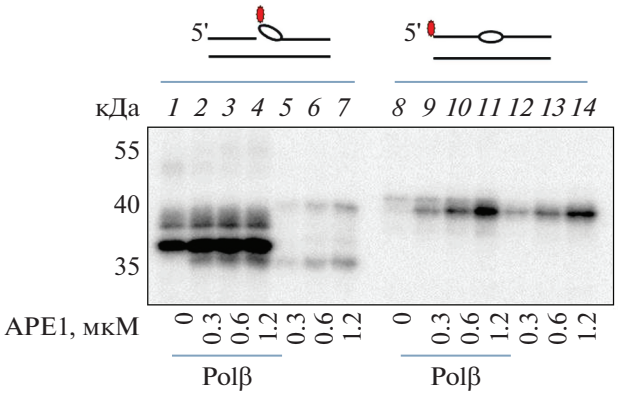


Рис. 4. Разделение продуктов ковалентного присоединения Polβ и APE1 к ДНК, содержащей интактный (ДНК10) или расщепленный (ДНК7) AP-сайты. Положение радиоактивной метки обозначено красным овалом, AP-сайта (интактного или расщепленного) – незаполненным овалом. Образец ДНК (100 нМ), содержащей остаток dUMP, обрабатывали UDG, инкубировали с APE1 (концентрация указана внизу рисунка) и/или 35 нМ Polβ (дорожки *1–4*, *8–11*) в течение 1 мин, обрабатывали боргидридом натрия и анализировали электрофорезом в 12.5%-ном SDS-ПААГ.

вполне могут отражать таковые в клетке. Кроме того, по имеющимся в литературе данным, известно об эффективном взаимодействии APE1 с продуктом реакции гидролиза AP-сайта [1, 16, 17], из чего можно сделать вывод о присущей этому ферменту лиазной активности и возможности ее реализации *in situ*.

5'-dRP-лиазная активность APE1

Для прямого доказательства способности APE1 удалять 5'-dRP-остаток ДНК-интермедиат BER (ДНК7) с радиоактивной меткой на 3′-конце dRP-содержащего олигонуклеотида инкубировали в присутствии белка APE1 (300 нМ) или без него в течение указанных промежутков времени, затем реакционные смеси обрабатывали метоксиамином и анализировали электрофоретическую подвижность продуктов в ПААГ в присутствии 7 М мочевины (рис. 5). Метоксиамин способен формировать аддукты с альдегидными группами ДНК, что повышает устойчивость последних в процессе пробоподготовки и последующего электрофореза. В то же время метоксиамин не восстанавливает основание Шиффа, поэтому ДНК не фиксируется на белке и, следовательно, учитывается при анализе. В результате показано, что, действительно, при инкубации 5'-dRP-ДНК в присутствии или в отсутствие APE1 накопление продукта с увеличенной электрофоретической подвижностью происходит быстрее в образцах с APE1. В то же время сопоставимые уровни превращения 5'-dRP-субстрата в продукт под действием фермента Polβ достигаются при его концентрациях в 10–20 раз меньше таковых для APE1 [18]. Учитывая временные и концентрационные характеристики удаления 5'-dRP-группы ферментами Polβ и APE1, можно сделать вывод, что в нормальных условиях в клетке вклад APE1 в удаление 5'-dRP невелик, но значимость этой активности APE1 может существенно возрастать при дефиците 5'-dRP-лиазной активности, например обусловленной низ-

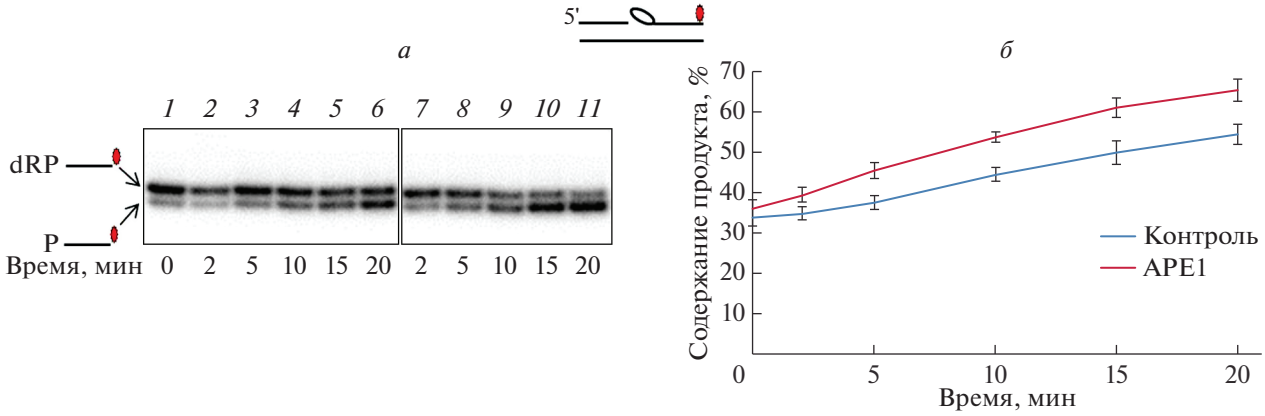


Рис. 5. Удаление остатка 5'-dRP под действием лиазной активности APE1. Структура использованной ДНК (ДНК7) представлена вверху рисунка. Положение радиоактивной метки обозначено красным овалом, 5'-dRP-остатка – незаполненным овалом. Образец ДНК (100 нМ), содержащей остаток 5'-dUMP, обрабатывали UDG, инкубировали в отсутствие APE1 (контроль, дорожки *1–6*) или в присутствии 300 нМ APE1 (APE1, дорожки *7–11*) в течение 0, 2, 5, 10, 15 и 20 мин. Через указанные промежутки времени реакцию останавливали добавлением метоксиамина. *а* – Анализ продуктов реакции электрофорезом в 20%-ном ПААГ в присутствии 7 М мочевины. *б* – Кинетические кривые, построенные на основании результатов, представленных на панели (*а*). По оси ординат указано процентное содержание продукта 5'-dRP-лиазной реакции в общем пуле меченых компонентов реакционной смеси.

кой экспрессией Polβ либо ее мутациями. Кроме того, как отмечено выше, реализацию этой активности APE1 нельзя исключить и для других механизмов репарации, включающих процессинг 5'-dRP-ДНК.

Интересно отметить, что 5'-dRP-лиазная активность уже ранее обнаружена нами у некоторых белков, участвующих в BER: PARP1, PARP2 и HMGB1 [9, 18, 19]. Следовательно, в случае недостаточной активности Polβ эти белки могут быть вовлечены в регуляцию эффективности BER, участвуя в стадии, лимитирующей скорость процесса репарации оснований в целом [20, 21]. В то же время APE1 может катализировать выщепление 5'-dRP-группы без диссоциации комплекса с продуктом своей основной реакции. Такой механизм представляется тем более вероятным, что эксперименты, проведенные в клетках, показали, что диссоциация APE1 из комплекса с ДНК модулируется Polβ, и при отсутствии полимеразы скорость может снижаться [22]. Таким образом, лиазная активность APE1 может быть необходимой для репарации AP-сайтов в случае дефицита или мутаций Polβ – основного фермента, участвующего в удалении 5'-dRP-группы в ходе репарации поврежденных оснований [23].

Работа по изучению взаимодействия белков с ДНК выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-00-00097), а этапы наработки и характеристики белков для проведения исследований – при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00204).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дырхеева Н.С., Лебедева Н.А., Лаврик О.И. (2016) AP-эндонуклеаза 1 – ключевой фермент репарации апуриновых/апиримидиновых сайтов. *Биохимия*. **81**, 1198–1216.
2. Ilina E.S., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. (2018) Unusual interaction of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) with abasic sites via the Schiff-base-dependent mechanism. *Biochimie*. **150**, 88–99.
3. Lebedeva N.A., Khodyreva S.N., Favre A., Lavrik O.I. (2003) AP endonuclease 1 has no biologically significant 3'→5'-exonuclease activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **300**, 182–187.
4. Драчкова И.А., Петрусева И.О., Сафронов И.В., Захаренко А.Л., Шишкин Г.В., Лаврик О.И., Ходырева С.Н. (2001) Реагенты для модификации белково-нуклеиновых комплексов. II. Сайт-специфическая фотомодификация комплексов ДНК-полимеразы β праймерами, элонгированными экзо-*N*-замещенными арилазидными производными dCTP. *Биоорган. химия*. **27**, 197–204.
5. Кутузов М.М., Ильина Е.С., Суханова М.В., Пышная И.А., Пышный Д.В., Лаврик О.И., Ходырева С.Н. (2011) Взаимодействие поли(ADP-рибозо)полимеразы-1 с апуриновыми/апиримидиновыми сайтами в составе кластерных повреждений ДНК. *Биохимия*. **76**, 176–187.
6. Ilina E.S., Lavrik O.I., Khodyreva S.N. (2008) Ku antigen interacts with abasic sites. *Biochim. Biophys. Acta*. **1784**, 1777–1785.
7. Белоусова Е.А., Кутузов М.М., Иванкина П.А., Ищенко А.А., Лаврик О.И. (2018) Новый путь репарации разрывов ДНК с участием PARP3 и белков эксцизионной репарации оснований. *Доклады Академии наук*. **482**, 96–100.
8. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **277**, 680–685.
9. Мазин А.В., Кузнеделов, Краев А.С. и др. (1990) *Методы Молекулярной Генетики и Генной Инженерии*, под. ред. Салганика Р.И. Новосибирск: “Наука”. Сибирское отделение, 238–239.
10. Prasad R., Liu Y., Deterding L.J., Poltoratsky V.P., Kedar P.S., Horton J.K., Kanno S.-I., Asagoshi K., Hou E.W., Khodyreva S.N., Lavrik O.I., Tomer K.B., Yasui A., Wilson S.H. (2007) HMGB1 is a cofactor in mammalian base excision repair. *Mol. Cell*. **27**, 829–841.
11. Zharkov D.O., Grollman A.P. (1998) MutY DNA glycosylase: base release and intermediate complex formation. *Biochemistry*. **37**, 12384–12394.
12. Kosova A.A., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. (2015) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) interacts with apurinic/apyrimidinic sites in DNA. *Mutat. Res*. **779**, 46–57.
13. Idriss H.T., Al-Assar O., Wilson S.H. (2002) DNA polymerase beta. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*. **34**, 321–324.
14. Mol C.D., Hosfield D.J., Tainer J.A. (2000) Abasic site recognition by two apurinic/apyrimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means. *Mutat. Res*. **460**, 211–229.
15. Horton J.K., Srivastava D.K., Zmudzka B.Z., Wilson S.H. (1995) Strategic down-regulation of DNA polymerase beta by antisense RNA sensitizes mammalian cells to specific DNA damaging agents. *Nucleic Acids Res*. **23**, 3810–3815.
16. Freudenthal B.D., Beard W.A., Cuneo M.J., Dyrkheeva N.S., Wilson S.H. (2015) Capturing snapshots of APE1 processing DNA damage. *Nat. Struct. Mol. Biol*. **22**, 924–931.
17. Cistulli C., Lavrik O.I., Prasad R., Hou E., Wilson S.H. (2004) AP endonuclease and poly(ADP-ribose) polymerase-1 interact with the same base excision repair intermediate. *DNA Repair (Amst.)*. **3**, 581–591.
18. Khodyreva S.N., Prasad R., Ilina E.S., Sukhanova M.V., Kutuzov M.M., Liu Y., Hou E.W., Wilson S.H., Lavrik O.I. (2010) Apurinic/apyrimidinic (AP) site recognition by the 5'-dRP/AP lyase in poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 22090–22095.

19. Kutuzov M.M., Khodyreva S.N., Ilina E.S., Sukhanova M.V., Amé J.C., Lavrik O.I. (2015) Interaction of PARP-2 with AP site containing DNA. *Biochimie*. **112**, 10–19.
20. Horton J.K., Prasad R., Hou E., Wilson S.H. (2000) Protection against methylation-induced cytotoxicity by DNA polymerase beta-dependent long patch base excision repair. *J. Biol. Chem*. **275**, 2211–2218.
21. Srivastava D.K., Berg B.J., Prasad R., Molina J.T., Beard W.A., Tomkinson A.E., Wilson S.H. (1998) Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps. *J. Biol. Chem*. **273**, 21203–21209.
22. Janoshazi A.K., Horton J.K., Zhao M.-L., Prasad R., Scappini E.L., Tucker C.J., Wilson S.H. (2020) Shining light on the response to repair intermediates in DNA of living cells. *DNA Repair (Amst.)*. **85**, 102749.
23. Sobol R.W., Prasad R., Evenski A., Baker A., Yang X.P., Horton J.K., Wilson S.H. (2000) The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity. *Nature*. **405**, 807–810.

5'-DEOXYRIBOSE PHOSPHATE LYASE ACTIVITY OF APURINIC/APYRIMIDINIC ENDONUCLEASE 1

E. S. Ilina[1, 2], O. I. Lavrik[1, 2], and S. N. Khodyreva[1, *]

[1]*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

[2]*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: svetakh@niboch.nsc.ru*

One of the most common DNA lesions is the apurinic/apyrimidinic (AP-) sites. The main repair pathway for AP sites is initiated by apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1). Upon hydrolysis of the phosphodiester bond by this enzyme, a one nucleotide gap flanked by 3'-hydroxyl and 5'-deoxyribose phosphate groups on the 5'-side of the AP site is formed. It is known that after hydrolysis of the AP site, APE1 remains associated with the product for some time. In the present work, the ability of APE1 to form the product of covalent attachment of APE1 to DNA containing a gap with a 5'-deoxyribose phosphate residue was demonstrated. In addition, it was found that remaining in a complex with the product of hydrolysis of the AP site, APE1 exhibits 5'-deoxyribosephosphate lyase activity, cleaving off the 5'-deoxyribose phosphate residue. The presence of lyase activity in APE1 may be important for the repair of AP sites in the case of a deficiency or mutations in DNA polymerase β, the main enzyme that removes the 5'-deoxyribose phosphate group.

Keywords: apurinic/apyrimidinic sites, apurinic/apyrimidinic endonuclease 1, deoxyribose phosphate lyase activity, DNA repair, affinity modification

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 2, с. 277–288

ЭНЗИМОЛОГИЯ СИСТЕМ РЕПАРАЦИИ ДНК

УДК 577.151.45

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ УРАЦИЛ-ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗ ЧЕЛОВЕКА SMUG1 И MBD4

© 2021 г. И. В. Алексеева[a], А. С. Бакман[a, b], Д. А. Яковлев[a], Н. А. Кузнецов[a, *], О. С. Федорова[a, **]

[a] Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

[b] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

**e-mail: nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru*

***e-mail: fedorova@niboch.nsc.ru*

Поступила в редакцию 12.10.2020 г.
После доработки 12.10.2020 г.
Принята к публикации 26.10.2020 г.

N-гликозилазы человека SMUG1 и MBD4 катализируют удаление из ДНК остатков урацила, образующихся в результате дезаминирования цитозина или ошибок репликации. Для однонуклеотидных полиморфных вариантов (SNP) SMUG1 (G90C, P240H, N244S, N248Y) и каталитического домена $MBD4^{cat}$ (S470L, G507S, R512W, H557D) методом молекулярной динамики получены структуры фермент-субстратных комплексов. Экспериментально установлено, что SNP-варианты SMUG1 N244S и N248Y обладают повышенной каталитической активностью по сравнению с ферментом дикого типа, по-видимому, за счет ускорения диссоциации комплекса фермента с продуктом и увеличения числа оборотов фермента. У остальных вариантов SMUG1 (G90C, P240H) и всех вариантов $MBD4^{cat}$, в которых замены аминокислот нарушали область связывания с субстратом и/или активный центр, каталитическая активность была значительно ниже, чем у ферментов дикого типа.

Ключевые слова: репарация ДНК, урацил-ДНК-гликозилаза человека, MBD4, SMUG1, однонуклеотидный полиморфный вариант, активный центр, катализ

DOI: 10.31857/S0026898421020026

ВВЕДЕНИЕ

Появление урацила в ДНК – одно из наиболее распространенных повреждений этой молекулы. Урацил образуется либо при дезаминировании цитозина (как спонтанном [1–3], так и ферментативном [4, 5]), либо при ошибочной вставке остатка уридина во время репликации [6]. Несмотря на то, что частота гидролитического дезаминирования цитозина на два порядка меньше, чем, например, частота апуринизации (70–200 против 10^4 случаев в одной клетке в сутки [3]), такие повреждения относятся к сильно мутагенным из-за того, что репликативные ДНК-полимеразы не способны отличать урацил и тимин в ДНК. Таким образом, в ходе дальнейшей репликации U/G-пара считывается как A/T, что в результате приводит к замене исходной пары C/G на T/A. Однако во всех живых организмах существует эффективный механизм поиска и удаления урацила из ДНК [7].

Урацил в ДНК человека узнается и удаляется несколькими ДНК-гликозилазами: урацил-ДНК-гликозилазой (UNG2), тимин-ДНК-гликозилазой (TDG), специфичной к одноцепочечной ДНК моно-функциональной урацил-ДНК-гликозилазой (SMUG1) и метил-CpG-связывающим ферментом 4 (MBD4) [8, 9]. Первые три фермента относятся к первому, второму и третьему подсемействам структурного суперсемейства урацил-ДНК-гликозилаз (семейство UDG), а белок MBD4 – к семейству "спираль-шпилька-спираль" (семейство HhH) [8, 10]. Необходимо отметить, что четыре ДНК-гликозилазы человека, обладающие способностью удалять урацил, имеют специализированную субстратную специфичность, связанную с биологической функцией этих ферментов: UNG2 и SMUG1 в основном удаляют урацил из одно- и двухцепочечной ДНК, а TDG и MBD4 – производные урацила, возникающие в процессах эпигенетической модификации ДНК [8].

В исследованиях субстратной специфичности SMUG1 [11, 12] обнаружено, что фермент в 700 раз эффективнее работает на двухцепочечных, чем одноцепочечных урацилсодержащих ДНК-субстратах, причем преимущественно удаляет урацил из U/G-пар. Кроме того, предполагается, что SMUG1 – основной фермент, удаляющий

5-гидроксиметилурацил (5hmU) из ДНК [11–13]. Считается, что 5hmU образуется в качестве интермедиата в многостадийном процессе активного деметилирования, где 5-метилцитозин (5mC) гидроксилируется диоксигеназами TET с образованием 5-гидроксиметилцитозина (5hmC), а последующее дезаминирование 5hmC под действием фермента AID/APOBEC приводит к образованию 5hmU.

В настоящее время трехмерная структура SMUG1 человека (hSMUG1) неизвестна, поэтому, используя в качестве матрицы структуры GmeSMUG1 из *Geobacter metallireducens* (PDB Acc. No 5H98 и 5H9I) [14] и xSMUG1 из *Xenopus laevis* (PDB Acc. No 1OE4 и 1OE5) [11], Кузнецова и др. [15] методом гомологичного моделирования получили структуру hSMUG1. При сравнении полученной модельной структуры с данными мутационного анализа [16–18] были идентифицированы аминокислотные остатки, участвующие в связывании ДНК, узнавании поврежденного нуклеотида и катализе [15]. Установлено, что аминокислотные остатки Asn85 и His239 катализируют гидролиз *N*-гликозидной связи. Расположенное в активном центре фермента азотистое основание образует π-π-стэкинг с Phe98, а также специфическую водородную связь с Asn163. Несколько аминокислотных остатков, Gly87–Met91, отвечают за узнавание заместителя в C5-положении пиримидинового основания. В hSMUG1 последовательность His239–Lys249, называемая интеркалирующей петлей, служит "клином", проникающим в двойную спираль ДНК в области поврежденного нуклеотида [16]; при этом остаток Arg243 встраивается в дуплекс на место поврежденного нуклеотида.

Основной субстрат MBD4 – ДНК, содержащая неканонические пары T/G и U/G [19, 20]. Также показано, что MBD4 эффективно удаляет 5hmU в двухцепочечных CpG-динуклеотидах *in vitro* [21, 22]. Кроме того, ферменты AID/APOBEC могут напрямую дезаминировать 5mC, превращая его в тимин и тем самым формируя мисматч T/G – субстрат MBD4 [23].

ДНК-гликозилаза человека MBD4 содержит два домена: 5mC-связывающий и ДНК-гликозилазный ($MBD4^{cat}$). В настоящее время известна кристаллическая структура обоих доменов [21, 24, 25]. Установлено, что каталитический домен, $MBD4^{cat}$, состоит из 138 а.о., образующих 9 α-спиралей. Структура $MBD4^{cat}$ довольно консервативна и относится к семейству "спираль-шпилька-спираль" (HhH). Опубликованы [21, 25] структуры каталитического домена с 12-звенными ДНК-дуплексами, содержащими пары 5hmU/G, T/G и AP/G. Все комплексы и свободный белок имеют сходную кристаллическую упаковку, из чего можно сделать вывод, что при связывании ДНК домен $MBD4^{cat}$ не претерпевает серьезных конформационных изменений. Показано, что все дуплексы ДНК в комплексе с ферментом изогнуты в области поврежденного нуклеотида на ~38°. При анализе структурных данных показано, что $MBD4^{cat}$ связывается с ДНК тремя участками: петлями Leu466–Gly471 и Lue503–Leu511 и Gly-богатой шпилькой из HhH-мотива (Leu534–Gly541), взаимодействуя преимущественно с цепью ДНК, содержащей удаляемое основание. Петля Leu466–Gly471 проникает в ДНК через малую бороздку и остаток Arg468 заполняет пространство в дуплексе, освобожденное после выворачивания поврежденного нуклеотида. Гуанидиновая группа этого аминокислотного остатка взаимодействует с 5'-фосфатной группой нуклеотида, расположенного с 5'-стороны от вырезаемого основания, и с 3'-фосфатной группой поврежденного нуклеотида. Вывернутое основание удерживается в кармане, образованном остатками Leu466, Leu447 и Lys562 [26]. Данные о функциональной роли аминокислотных остатков активных центров SMUG1 и $MBD4^{cat}$ были использованы при анализе базы данных NCBI dbSNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/) однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в соответствующих белках. Действительно, SNP-ассоциированные аминокислотные замены в ферментах репарации широко распространены в человеческой популяции [27, 28], более того роль SNP в белок-кодирующей области генов ферментов системы эксцизионной репарации оснований ДНК в восприимчивости к болезням активно обсуждается в настоящее время в ряде публикаций [29–43]. Однако в настоящее время остается неизвестным, как аминокислотные замены, вызванные SNP, могут влиять на эффективность удаления повреждений из ДНК ферментами SMUG1 и $MBD4^{cat}$.

В связи с этим целью работы было определение влияния некоторых SNP-ассоциированных аминокислотных замен в первичных структурах $MBD4^{cat}$ и SMUG1 на ферментативную активность этих белков. Для каждой ДНК-гликозилазы были выбраны четыре варианта мутантных форм, содержащих замены в области ДНК-связывающего и каталитического центров. Исследуя накопление продуктов реакции с помощью электрофореза в ПААГ, оценивали эффективность удаления урацила из модельных ДНК-субстратов ферментами дикого типа и их мутантными формами. Учитывая, что стадии связывания ДНК-субстрата, узнавания урацила и образования каталитического комплекса происходят в миллисекундном и секундном диапазонах времени, для регистрации этих процессов использовали метод "остановленного потока". Конформационные изменения ферментов в комплексах с ДНК-субстратами регистрировали по изменению интенсивности флуоресценции остатков Trp. Анализ кинетических данных позволил выявить стадии ферментатив-

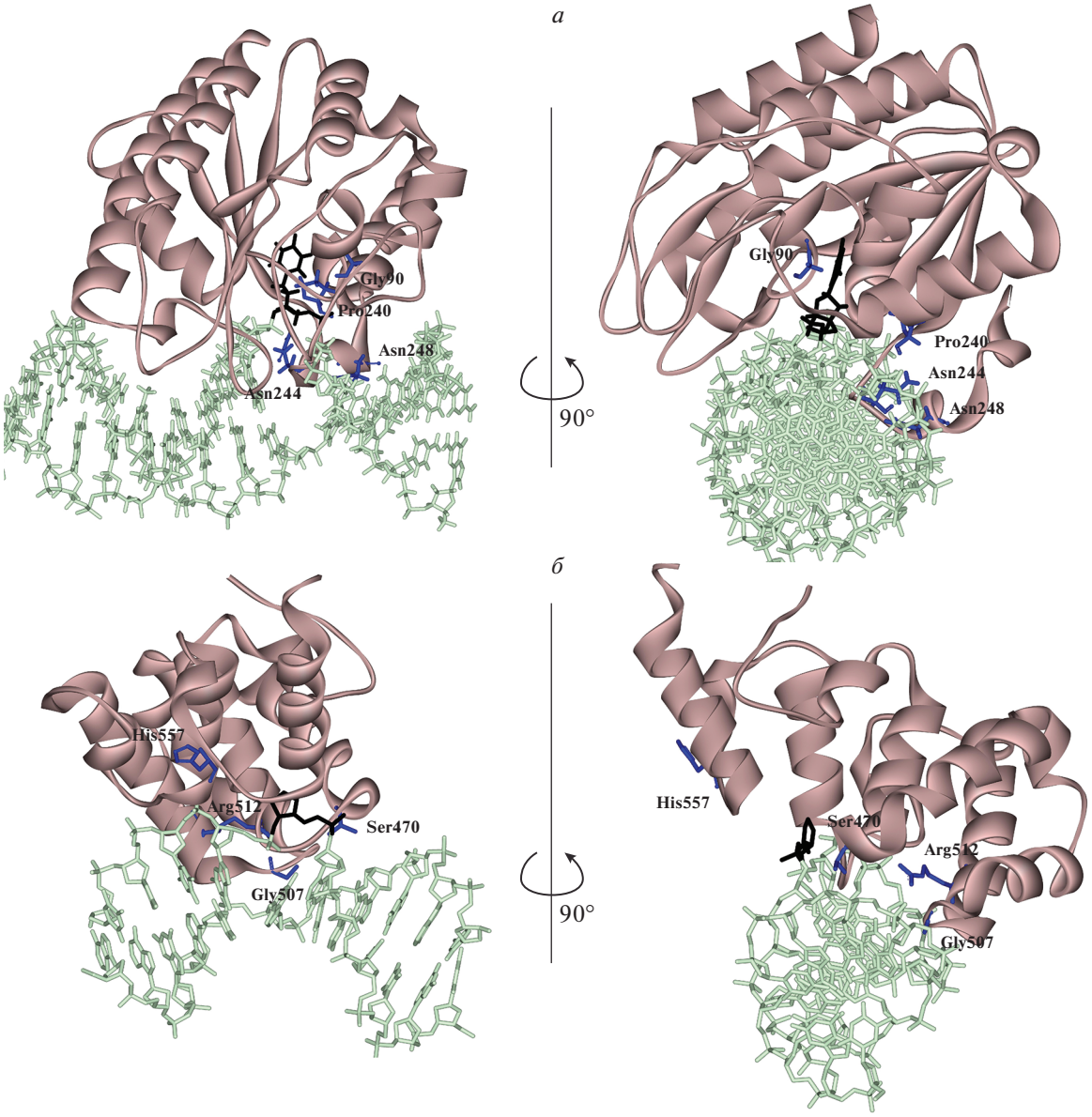


Рис. 1. Пространственное расположение аминокислотных остатков в структуре SMUG1 (*а*) и MBD4^{cat} (*б*), подвергающихся заменам в случае отобранных SNP (см. табл. 1).

ного процесса MBD4^{cat} и SMUG1, которые наиболее подвержены влиянию SNP-ассоциированных аминокислотных замен.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выбор потенциально важных SNP. Используя базу данных dbSNP NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/), мы отобрали полиморфные варианты в экзонах генов, кодирующих MBD4^{cat} и SMUG1 человека. Последующий анализ потенциальной важности SNP был основан на принципе изменения химической природы боковой группы аминокислоты, кодируемой соответствующим триплетом нуклеотидов, и пространственным расположением аминокислотного остатка вблизи ДНК-связывающего сайта и/или активного центра фермента (рис. 1). Для каждого фермента выбрали по четыре SNP (табл. 1) для изучения их влияния на активность ДНК-гликозилаз. Потенциальная важность выбранных вариантов была проверена по базе данных BioMuta, содержащей данные по ассоциированным с онкологическими заболеваниями однонуклеотидным вариациям в геноме (https://hive.biochemistry.gwu.edu/biomuta/proteinview/Q53HV7 для hSMUG1 и https://hive.biochemistry.gwu.edu/biomuta/proteinview/O95243 для MBD4).

Таблица 1. Замены аминокислотных остатков, вызванные SNP, их положение и функциональная роль в структуре фермента и встречаемость при онкологических заболеваниях

Фермент	Замена	Положение в структуре фермента и функциональная роль	Онкологическое заболевание (по базе BioMuta)
SMUG1	G90C	Входит в состав участка Gly87–Met91, отвечающего за узнавание заместителя в С5-положении пиримидинового основания	Рак легкого
	P240H	Входят в состав интеркалирующей петли His239–Lys249, выступающей в роли "клина" и встраивающейся в двойную спираль ДНК в области поврежденного нуклеотида	Меланома
	N244S		Рак легкого
	N248Y		Рак печени
$MBD4^{cat}$	S470L	Входит в состав петли Leu466–Gly471, участвующей в связывании ДНК	Рак молочной железы
	G507S	Входит в состав петли Leu503–Leu511, участвующей в связывании ДНК	Колоректальный рак
	R512W	Примыкает к петле Leu503–Leu511, участвующей в связывании ДНК	Колоректальный рак
	H557D	Расположен на поверхности и приводит к смене заряда этого участка белка	Рак молочной железы

Моделирование структуры фермент-субстратного комплекса, содержащего полиморфные варианты белков. Для определения влияния аминокислотных замен, вызванных SNP, на структуру фермента в составе фермент-субстратного комплекса была использована программа UCSF Chimera (http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera/). В структуре фермента дикого типа заменяли соответствующие аминокислотные остатки следующим образом: боковую цепь изучаемого остатка удаляли из исходного файла PDB и реконструировали новую боковую цепь, используя библиотеку ротамеров [44]. Затем модели фермент-субстратных комплексов с замененными аминокислотными остатками оптимизировали методом молекулярной динамики с использованием модифицированного силового поля AMBER ff99 [45–47] и программы BioPASED [47]. Для этого белки уравновешивали при 50 K с использованием неявной гауссовой модели воды [48] и затем в течение 100 пс температуру увеличивали до 300 K. После этого в течение 6.5 нс проводили оптимизацию структуры фермент-субстратного комплекса при постоянной температуре 300 K. Общая потенциальная энергия и общее среднеквадратичное отклонение (RMSD) были стабильными во время моделирования.

ДНК-субстраты. Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 ("Биоссет", Россия) с использованием коммерческих амидофосфитов 2'-дезоксирибонуклеозидов и CPG-носителей ("GlenResearch", США) (табл. 2). Синтезированные олигонуклеотиды очищали ВЭЖХ на ионообменной колонке PRP-X500 (12–30 мкм) размером 3.9 × 300 мм ("Hamilton", США) и затем обращеннофазовой хроматографией на колонке Bondapak C18 (15–20 мкм) размером 3.9 × 300 мм ("Waters", Ирландия).

Для расчета концентрации олигонуклеотидов в исходном растворе использовали коэффициент молярного поглощения олигонуклеотидов или их конъюгатов при длине волны 260 нм.

Ферменты дикого типа и их мутантные формы. Мутации в кодирующей последовательности генов $MBD4^{cat}$ и SMUG1 были созданы с использованием набора для сайт-направленного мутагенеза QuikChange XL ("Stratagene", США). Каталитический домен ДНК-гликозилазы человека $MBD4^{cat}$ (аминокислотные остатки 426–580), полноразмерная гликозилаза человека SMUG1 и их полиморфные варианты были выделены из клеток *Escherichia coli* Rosetta 2, трансформированных плазмидой pET29b-$MBD4^{cat}$ или pET28c-hSMUG1 соответ-

Таблица 2. Модельные ДНК-субстраты, использованные в работе

Субстрат	Последовательность[a]
U	5'-GCTCAUGTACAGAGCTG-3' 3'-CGAGTGCATGTCTCGAC-5'
FRET-U	5'-**FAM**-GCTCAUGTACAGAGCTG-3' 3'-CGAGTGCATGTCTCGAC-**BHQ1**-5'

[a] Сокращения: FAM – 6-карбоксифлуоресцеин, BHQ1 – тушитель флуоресценции.

ственно, по методикам, описанным ранее [15, 17, 21, 49, 50].

Электрофорез в ПААГ. Все эксперименты по исследованию ферментативной реакции проводили в буферном растворе (RB), содержащем 50 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 50 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит и 7% глицерина, при 25°C. Продукты анализировали электрофорезом в 20%-ном ПААГ, содержащем 7 М мочевину, с использованием FRET-U-субстрата. Зависимость степени превращения субстрата от времени определяли следующим образом. К 20 мкл RB, содержащего 10 мкМ FRET-U-субстрат, добавляли 20 мкл 2.0 мкМ фермента в том же буфере. Реакционную смесь быстро перемешивали и через определенные промежутки времени отбирали аликвоты объемом 2 мкл, которые переносили в предварительно подготовленные пробирки, содержащие 2 мкл раствора 7 М мочевины, 25 мМ EDTA и 0.1% ксиленцианола. Затем добавляли 1 мл 2%-ного раствора $LiClO_4$ в ацетоне, выдерживали 30 мин при −20°C и центрифугировали 10 мин (14000 × *g*). Осадок промывали ацетоном, высушивали, растворяли в 10 мкл буферного раствора, содержащего 1.0 мкМ AP-эндонуклеазу Nfo и инкубировали при 25°C в течение 1 мин для гидролиза фосфодиэфирных связей в AP-сайтах. Реакцию останавливали добавлением раствора 7 М мочевины, 25 мкМ EDTA и 0.1% ксиленцианола. Полученные образцы наносили на ПААГ и проводили электрофорез при 50 В/см. Количество образующегося продукта определяли путем сканирования геля на приборе E-Box (“VILBER”, Франция) и обработки данных в программном пакете Gel-Pro Analyzer 4.0 (“Media Cybernetics”, США).

Ферментативную активность полиморфных вариантов определяли относительно активности фермента дикого типа, которую принимали равной 1.

Анализ предстационарной кинетики. Анализ кинетики взаимодействия ферментов с модельными ДНК-субстратами (табл. 2) проводили в RB при 25°C. Флуоресцентный сигнал регистрировали на спектрометре “остановленного потока” SX20 (“Applied Photophysics”, Великобритания). В работе использовали несколько типов флуоресцентной регистрации процесса фермент-субстратного взаимодействия. Конформационные изменения фермента в процессе взаимодействия с U-субстратом регистрировали по изменению собственной флуоресценции белка, обусловленной остатками Trp. Ферменты $MBD4^{cat}$ и SMUG1 содержат соответственно 8 и 4 остатка Trp. Возбуждение интенсивности флуоресценции остатков Trp проводили при длине волны 290 нм, регистрацию флуоресценции – при более 320 нм (фильтр WG-320; “Schott”, Германия). Мертвое время прибора составляло 1.0 мс. Каждую кинетическую кривую усредняли, как минимум, по четырем повторам.

Наблюдаемую константу скорости рассчитывали путем обработки кинетических кривых по уравнению (1):

$$f(t) = f_0 + f_1 \cdot e^{-k_1 t} + f_2 e^{-k_2 t}, \quad (1)$$

где $f(t)$ – наблюдаемая интенсивность флуоресценции в момент времени t, f_0 – фоновый уровень сигнала, f_1 и f_2 – коэффициенты, k_1 и k_2 – кажущиеся константы скорости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние замен аминокислотных остатков на структуру фермент-субстратных комплексов

Модели мутантных форм построены на основе структур комплексов SMUG1 [15] и $MBD4^{cat}$ [25] дикого типа с ДНК. Время симуляции составляло 6.5 нс. Как видно на рис. 2, анализируемые мутации не вносили значительных изменений в общую структуру фермент-субстратного комплекса, тем не менее некоторые замены могут приводить к локальным изменениям. Так, в случае полиморфных вариантов фермента SMUG1 можно отметить, что замена G90C (рис. 2*а*) приводит к увеличению объема бокового радикала, что сопровождается локальным “раздвиганием” окружения, но не вызывает значительных перестроек в укладке этой области белка. При замене P240H (рис. 2*б*) имидазольное кольцо гистидина может образовать стэкинг с индольным кольцом Trp251 и водородную связь с Arg140, что приводит к стабилизации этой области, не вызывая в ней значительных конформационных изменений. При заменах N244S и N248Y (рис. 2*в* и *г*) остатки аспарагина, расположенные в ДНК-связывающем канале фермента, теряют сеть контактов, образованных между карбоксамидной группой Asn с ДНК, что может сопровождаться дестабилизацией фермент-субстратного комплекса.

Замена S470L в $MBD4^{cat}$ (рис. 2*д*) приводит к тому, что в области контакта с сахарофосфатным остовом ДНК появляется гидрофобный аминокислотный остаток лейцина. Можно предположить, что нахождение гидрофобного остатка в заряженном окружении энергетически невыгодно и может ослаблять связывание фермента с субстратом. Замена G507S $MBD4^{cat}$ (рис. 2*е*) не вносит серьезных изменений в общую конформацию фермента, но имеет сильное локальное влияние. Так, из-за появления в ДНК-связывающей области гидроксиметильной группы серина могут возникнуть дополнительные водородные связи с ДНК, что усилит связывание фермента с ДНК и, следовательно, снизит скорость оборота фермента из-за уменьшения константы диссоциации с продуктом реакции. Замена R512W в $MBD4^{cat}$

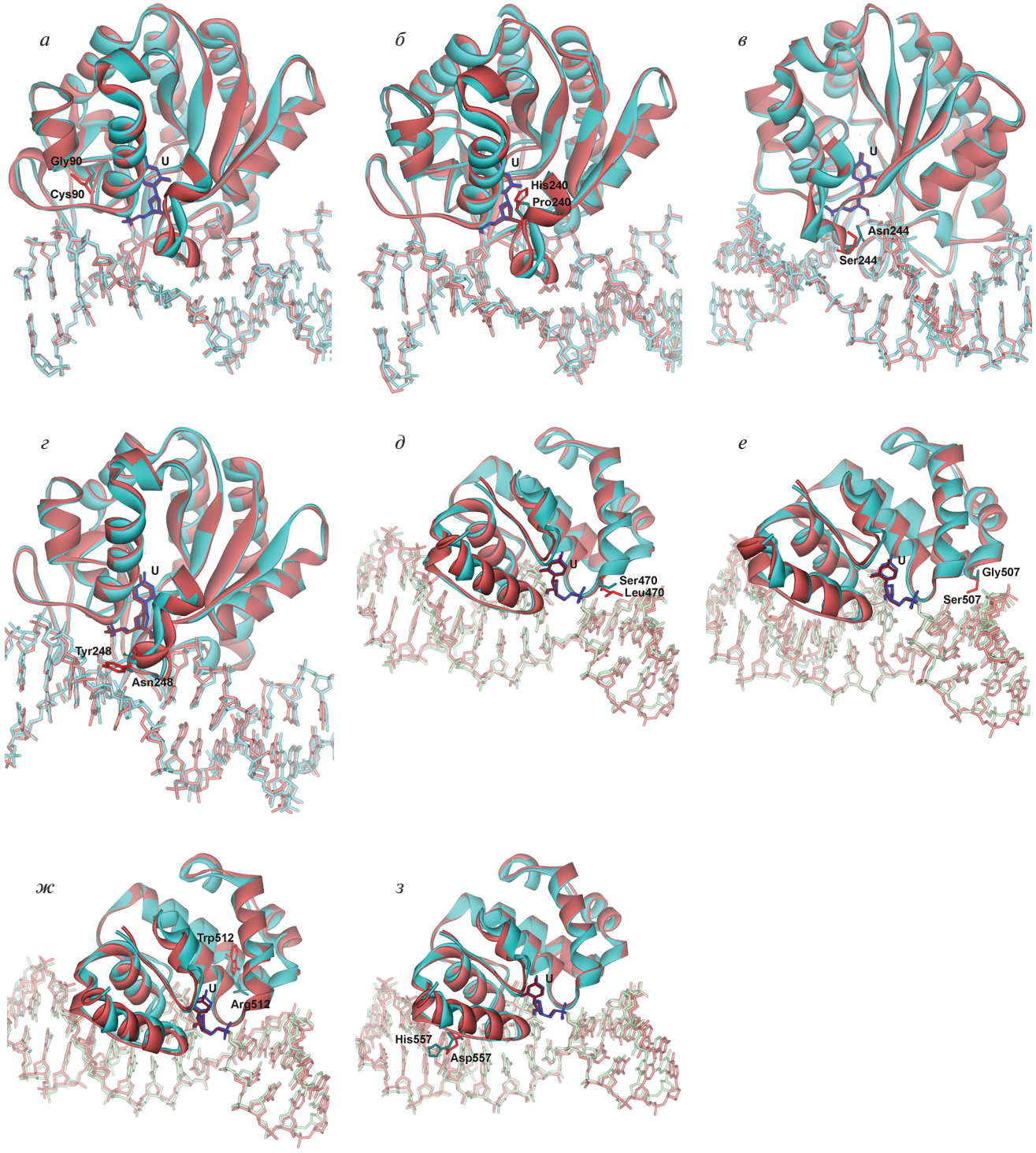


Рис. 2. Сравнение структур фермент-субстратных комплексов для ферментов дикого типа (голубой) и их полиморфных вариантов (красный). В структурах показано внеспиральное положение уридина и аминокислотные остатки, подвергающиеся заменам для отобранных SNP, а именно: SMUG1 G90C (*а*), P240H (*б*), N244S (*в*) и N248Y (*г*); $MBD4^{cat}$ S470L (*д*), G507S (*е*), R512W (*ж*) и H557D (*з*).

(рис. 2*ж*) приводит, с одной стороны, к потере водородных связей с ДНК, образованных боковой цепью аргинина, а с другой стороны, к встраиванию индольного остатка триптофана в гидрофобную область белка. В этом случае происходит смещение петли, сформированной остатками Ala488–Ser520, наружу белковой глобулы. Также можно предположить, что эта замена ослабляет

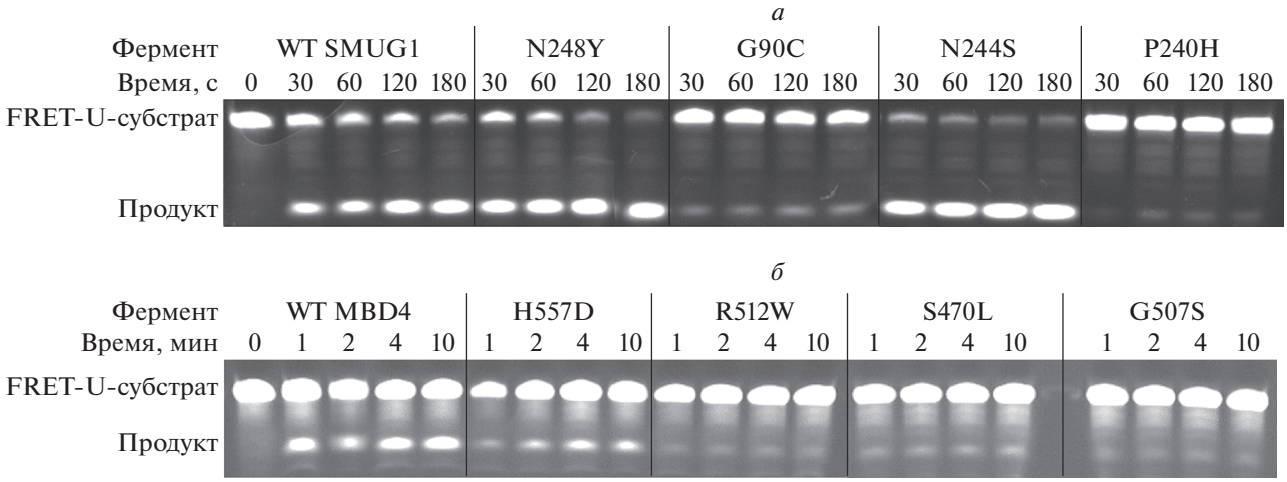


Рис. 3. Ферментативная активность SMUG1 (*а*) и MBD4^{cat} (*б*) дикого типа (WT) и их полиморфных вариантов в отношении FRET-U-субстрата. [FRET-U-субстрат] = 5.0 мкМ, [фермент] = 1.0 мкМ.

связь фермента и ДНК за счет уменьшения поверхностного положительного заряда в ДНК-связывающем канале. Замена положительно заряженного His557 (рис. 2*з*), взаимодействующего с сахарофосфатным остовом ДНК, на отрицательно заряженный аспартат приведет к "отталкиванию" петли Val550–Asp560 от ДНК, ее деформации и, скорее всего, дестабилизации фермент-субстратного комплекса.

Эффективность удаления урацила полиморфными вариантами SMUG1 и MBD4^{cat}

Методом электрофореза в ПААГ показано, что эффективность удаления урацила ферментами дикого типа и их полиморфными вариантами значительно отличается (рис. 3).

Действительно, на основании анализа кинетических кривых накопления продуктов реакции при взаимодействии SMUG1 и его вариантов с FRET-U-субстратом (рис. 4*а*) и сравнения относительной активности (рис. 4*в*) показано, что замены N244S и N248Y приводят к повышению скорости оборота фермента. Ранее сообщалось [15], что для фермента дикого типа скорость лимитирующая стадия ферментативного процесса – диссоциация комплекса фермента с продуктом, поэтому нарушение прямых взаимодействий между аминокислотными остатками в позициях 244 и 248 и ДНК приводит к дестабилизации фермент-субстратного комплекса и сопровождается повышением скорости оборота фермента. Однако замена P240H – остатка, играющего роль "клина" в составе интеркалирующей петли His239–Lys249, встраивающейся в двойную спираль ДНК в области поврежденного нуклеотида, – приводит к значительному снижению каталитической активности фермента. Согласно модели фермент-субстратного комплекса, His240 образует сеть контактов с Arg140 и Trp251, что может приводить к ограничению конформационной подвижности всей петли His239–Lys249 и тем самым препятствовать формированию каталитически компетентного состояния фермента в комплексе с субстратом. Замена G90C, расположенная на участке Gly87–Met91, отвечающем за узнавание заместителя в C5-положении пиримидинового основания, также значительно снижает эффективность удаления урацила.

Необходимо отметить, что активность MBD4^{cat} с заменами S470L, G507S и R512W составляла не более 30% от таковой для фермента дикого типа, а мутация H557D приводила к снижению активности до 50% (рис. 4*б* и *в*). Таким образом, в случае всех тестируемых вариантов MBD4^{cat} наблюдается значительное снижение активности за счет нарушения локальных взаимодействий в области ДНК-связывающего канала.

Анализ кинетики образования фермент-субстратных комплексов методом "остановленного потока"

Кинетические кривые, характеризующие изменение интенсивности флуоресценции Trp при взаимодействии SMUG1 дикого типа с U-субстратом (рис. 5*а*), содержат фазу падения интенсивности флуоресценции до ~0.3 с и фазу роста с выходом на плато к 5 с с начала реакции. Ранее показано [15, 18], что падение сигнала на начальном участке кинетической кривой соответствует образованию первичных неспецифических контактов с ДНК, а фаза роста интенсивности флуоресценции Trp в интервале 0.5–10 с – стадиям гидролиза *N*-гликозидной связи и диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции. Уста-

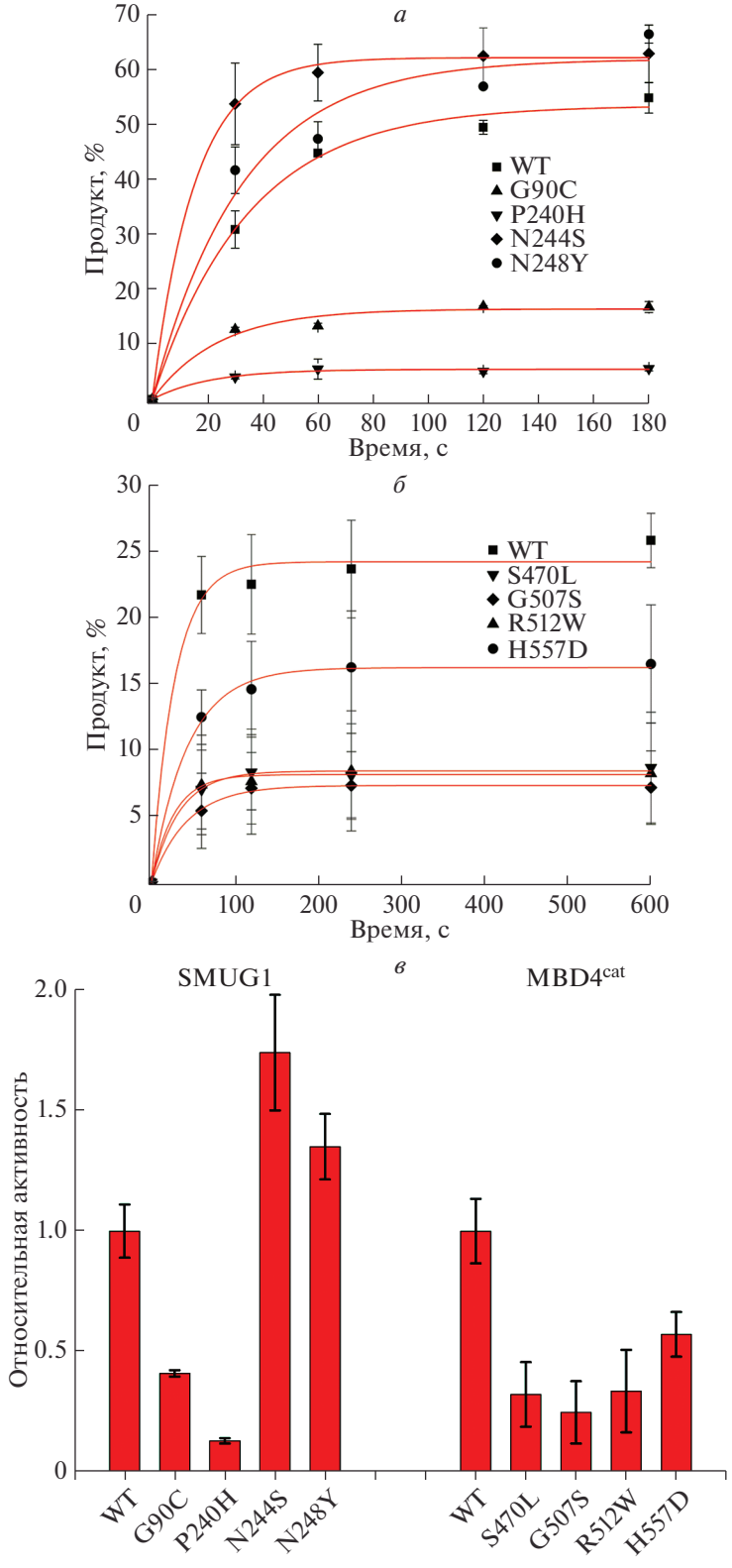


Рис. 4. Эффективность удаления урацила из FRET-U-субстрата под действием SMUG1 (*а*) и MBD4^{cat} (*б*) дикого типа (WT) и их полиморфных вариантов. *в* – Сравнительный анализ полученных результатов представлен относительно активности соответствующего фермента дикого типа, принятой за 1.

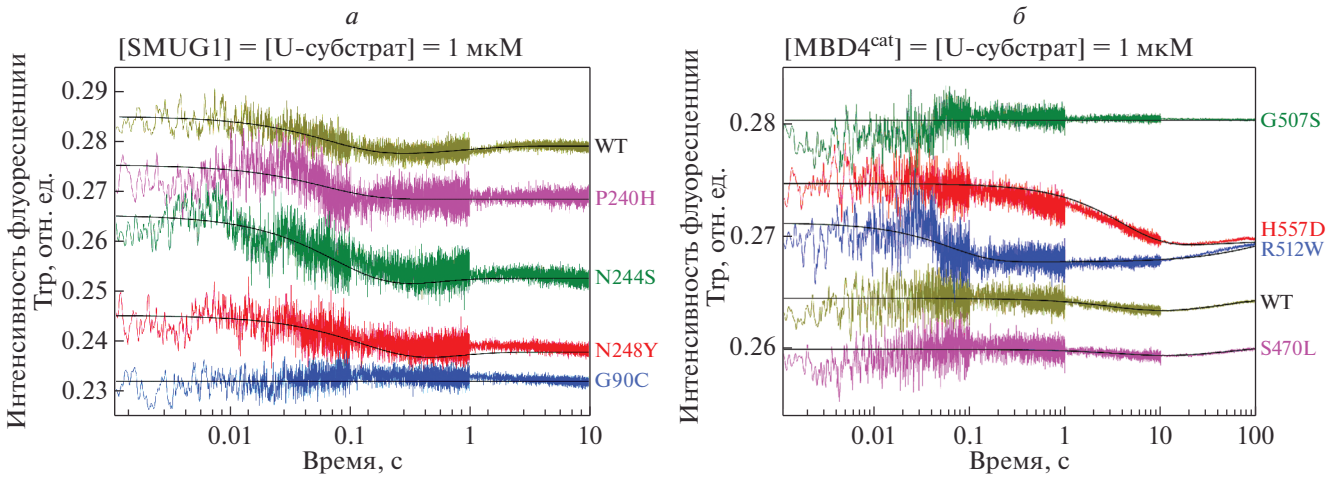


Рис. 5. Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp при взаимодействии SMUG1 (*а*) и MBD4^{cat} (*б*) дикого типа (WT) и полиморфных вариантов с U-субстратом (базовые линии искусственно смещены относительно друг друга для улучшения восприятия данных; это не сказывается на расчете значений кажущихся констант).

новлено, что диссоциация комплекса фермент-продукт – скорость лимитирующая стадия ферментативного процесса. Полученные кинетические кривые аппроксимировали по уравнению (1), что позволило рассчитать значения кажущихся констант скорости обоих процессов (табл. 3).

Сравнение кинетических кривых и наблюдаемых констант скорости для SMUG1 дикого типа с таковыми для полиморфных вариантов показывает, что в случае U-субстрата изменения интенсивности флуоресценции Trp на начальном участке имеют похожий вид для всех вариантов, кроме G90C. Таким образом, в случае мутантной формы G90C нарушается прохождение начальной стадии ферментативной реакции: связывания субстрата и узнавания урацила. В то же время замена P240H, которая также приводит к снижению каталитической активности фермента, не влияет на стадию связывания ДНК, так как на кинетических кривых присутствует стадия падения интенсивности флуоресценции остатков Trp. По-видимому, блокирование ферментативной активности в случае P240H происходит на стадии перехода фермента в составе комплекса с субстратом в каталитически компетентную конформацию. Интересно отметить, что для более активных вариантов SMUG1, N248Y и N244S, кажущаяся константа фазы роста интенсивности k_1 была соответственно в 1.7 и 2.1 раза выше, чем для фермента дикого типа.

На рис. 5*б* представлены кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp при взаимодействия MBD4^{cat} дикого типа и его полиморфных вариантов с U-субстратом. Согласно данным Petronzelli и соавт. [51], падение интенсивности флуоресценции Trp во временном интервале 2 мс–10 с характеризует образование первичного комплекса и поиск модифицированного основания, а рост в интервале 10–100 с соответствует образованию каталитически компетентной конформации фермента и началу процесса накопления продукта. Как и в случае SMUG1, скорость лимитирующая стадия ферментативного процесса – диссоциации комплекса фермент-продукт [51]. Интересно отметить, что замены S470L и H557D не оказывали влияния на значения наблюдаемых констант скорости в условиях эквимолярного соотношения фермент-субстрат. В то же время в случае избытка субстрата (рис. 4*в*) ферментативная активность этих мутантов MBD4^{cat} снижает-

Таблица 3. Кажущиеся константы скорости реакции SMUG1 и MBD4^{cat} дикого типа и полиморфных вариантов с модельными ДНК-субстратами

Фермент	k_1, с$^{-1}$	k_2, с$^{-1}$
SMUG1		
WT	14.4 ± 0.3	1.2 ± 0.1
G90C	–	–
P240H	16.0 ± 0.4	–
N244S	12.5 ± 0.4	2.5 ± 0.5
N248Y	7.0 ± 1.0	2.0 ± 0.8
MBD4^{cat}		
WT	0.28 ± 0.02	0.020 ± 0.002
S470L	0.22 ± 0.01	0.018 ± 0.001
G507S	–	–
R512W	15.5 ± 0.4	0.010 ± 0.001
H557D	0.25 ± 0.02	0.024 ± 0.003

ся, что свидетельствует о замедлении скорость лимитирующей стадии – диссоциации фермент-субстратного комплекса. В случае варианта G507S, наименее активного среди всех проанализированных (рис. 4*в*), изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp не зарегистрированы (рис. 5*б*), что может быть связано со значительной дестабилизацией фермент-субстратного комплекса, так как остаток Gly507 входит в состав петли Leu503–Leu511, участвующей в связывании ДНК. В случае варианта R512W, содержащего дополнительный остаток Trp в области петли Leu503–Leu511, которая участвует в связывании ДНК, зарегистрирован этап взаимодействия этой петли с ДНК. Действительно, в случае R512W, в отличие от всех других вариантов, на начальном участке кинетической кривой происходило значительное уменьшение интенсивности флуоресценции Trp, что, по-видимому, характеризует конформационную перестройку петли Leu503–Leu511 при образовании фермент-субстратного комплекса; в случае всех других мутантных форм $MBD4^{cat}$ этот переход не удавалось зарегистрировать.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании полученных данных по активности полиморфных вариантов двух урацил-ДНК-гликозилаз человека: SMUG1 и MBD4 – можно сделать вывод, что природные варианты этих ферментов могут различаться по эффективности удаления остатков урацила из ДНК. Показано, что повышенная ферментативная активность полиморфных вариантов N248Y и N244S SMUG1 обусловлена ускорением лимитирующей стадии процесса – диссоциации комплекса фермент-продукт. Для всех других проанализированных нами SNP-вариантов выявлена сниженная активность по сравнению с ферментами дикого типа, что может негативно отражаться на репарации геномной ДНК у носителей этих полиморфизмов.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 16-14-10038 и частичной поддержке бюджетного финансирования (№ АААА-А17-117020210022-4) для обеспечения регламентных работ на использованном оборудовании.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lari S.-U., Chen C.-Y., Vertéssy B.G., Morré J., Bennett S.E. (2006) Quantitative determination of uracil residues in *Escherichia coli* DNA: contribution of ung, dug, and dut genes to uracil avoidance. *DNA Repair (Amst.)*. **5**, 1407–1420.
2. Lewis C.A., Crayle J., Zhou S., Swanstrom R., Wolfenden R.,Wolfenden R. (2016) Cytosine deamination and the precipitous decline of spontaneous mutation during Earth's history. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **113**, 8194–8199.
3. Lindahl T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. **362**, 709–715.
4. Jaszczur M., Bertram J.G., Pham P., Scharff M.D., Goodman M.F. (2013) AID and Apobec3G haphazard deamination and mutational diversity. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 3089–3108.
5. Rebhandl S., Hümer M., Greil R., Geisberger R. (2015) AID/APOBEC deaminases and cancer. *Oncoscience*. **2**, 320–333.
6. Ladner R.D. (2001) The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy. *Curr. Protein Pept. Sci*. **2**, 361–370.
7. Krokan H.E., Drabløs F., Slupphaug G. (2002) Uracil in DNA – occurrence, consequences and repair. *Oncogene*. **21**, 8935–8948.
8. Jacobs A.L., Schar P. (2012) DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma*. **121**, 1–20.
9. Visnes T., Doseth B., Pettersen H.S., Hagen L., Sousa M.M., Akbari M., Otterlei M., Kavli B., Slupphaug G., Krokan H.E. (2009) Uracil in DNA and its processing by different DNA glycosylases. *Philos. Trans. R. Soc., B.* **364**, 563–568.
10. Dawson N.L., Lewis T.E., Das S., Lees J.G., Lee D., Ashford P., Orengo C.A., Sillitoe I. (2017) CATH: an expanded resource to predict protein function through structure and sequence. *Nucleic Acids Res.* **45**, D289–D295.
11. Wibley J.E.A., Waters T.R., Haushalter K., Verdine G.L., Pearl L.H. (2003) Structure and specificity of the vertebrate anti-mutator uracil-DNA glycosylase SMUG1. *Mol. Cell.* **11**, 1647–1659.
12. Kavli B., Sundheim O., Akbari M., Otterlei M., Nilsen H., Skorpen F., Aas P.A., Hagen L., Krokan H.E., Slupphaug G. (2002) hUNG2 is the major repair enzyme for removal of uracil from U:A matches, U:G mismatches, and U in single-stranded DNA, with hSMUG1 as a broad specificity backup. *J. Biol. Chem.* **277**, 39926–39936.
13. Kavli B., Otterlei M., Slupphaug G., Krokan H.E. (2007) Uracil in DNA – general mutagen, but normal intermediate in acquired immunity. *DNA Repair (Amst.)*. **6**, 505–516.
14. Zhang Z., Shen J., Yang Y., Li J., Cao W., Xie W. (2016) Structural basis of substrate specificity in *Geobacter metallireducens* SMUG1. *ACS Chem. Biol.* **11**, 1729–1736.
15. Kuznetsova A.A., Iakovlev D.A., Misovets I.V., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. (2017) Pre-steady-state kinetic analysis of damage recognition by human single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase SMUG1. *Mol. Biosyst.* **13**, 2638–2649.
16. Matsubara M., Tanaka T., Terato H., Ohmae E., Izumi S., Katayanagi K., Ide H. (2004) Mutational analysis of the damage-recognition and catalytic mechanism of

human SMUG1 DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res.* **32**, 5291–5302.

17. Iakovlev D.A., Alekseeva I.V., Vorobjev Y.N., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. (2019) The role of active-site residues Phe98, HiS239, and Arg243 in DNA binding and in the catalysis of human uracil-DNA glycosylase SMUG1. *Molecules.* **24**(17), 3133.
18. Iakovlev D.A., Alekseeva I.V., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. (2020) Role of Arg243 and His239 residues in the recognition of damaged nucleotides by human uracil-DNA glycosylase SMUG1. *Biochemistry (Mosc.).* **85**(5), 594–603.
19. Sjolund A.B., Senejani A.G., Sweasy J.B. (2013) MBD4 and TDG: multifaceted DNA glycosylases with ever expanding biological roles. *Mutat. Res.* **743–744**, 12–25.
20. Turner D.P., Cortellino S., Schupp J.E., Caretti E., Loh T., Kinsella T.J., Bellacosa A. (2006) The DNA N-glycosylase MED1 exhibits preference for halogenated pyrimidines and is involved in the cytotoxicity of 5-iododeoxyuridine. *Cancer Res.* **66**(15), 7686–7693.
21. Morera S., Grin I., Vigouroux A., Couve S., Henriot V., Saparbaev M., Ishchenko A.A. (2012) Biochemical and structural characterization of the glycosylase domain of MBD4 bound to thymine and 5-hydroxymethyuracil-containing DNA. *Nucleic Acids Res.* **40**, 9917–9926.
22. Hill P.W., Amouroux R., Hajkova P. (2014) DNA demethylation, Tet proteins and 5-hydroxymethylcytosine in epigenetic reprogramming: an emerging complex story. *Genomics.* **104**, 324–333.
23. Rai K., Huggins I.J., James S.R., Karpf A.R., Jones D.A., Cairns B.R. (2008) DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and Gadd45. *Cell.* **135**, 1201–1212.
24. Walavalkar N.M., Cramer J.M., Buchwald W.A., Scarsdale J.N., Williams D.C. (2014) Solution structure and intramolecular exchange of methyl-cytosine binding domain protein 4 (MBD4) on DNA suggests a mechanism to scan for mCpG/TpG mismatches. *Nucleic Acids Res.* **42**, 11218–11232.
25. Manvilla B.A., Maiti A., Begley M.C., Toth E.A., Drohat A.C. (2012) Crystal structure of human methyl-binding domain IV glycosylase bound to abasic DNA. *J. Mol. Biol.* **420**, 164–175.
26. Hashimoto H., Zhang X., Cheng X. (2012) Excision of thymine and 5-hydroxymethyluracil by the MBD4 DNA glycosylase domain: structural basis and implications for active DNA demethylation. *Nucleic Acids Res.* **40**, 8276–8284.
27. Shen M.R., Jones I.M., Mohrenweiser H. (1998) Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res.* **58**, 604–608.
28. Mohrenweiser H.W., Jones I.M. (1998) Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation? *Mutat. Res.* **400**, 5–24.
29. Hung R.J., Hall J., Brennan P., Boffetta P. (2005) Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a huge review. *Am. J. Epidemiol.* **162**, 925–942.
30. Nohmi T., Kim S.R., Yamada M. (2005) Modulation of oxidative mutagenesis and carcinogenesis by polymorphic forms of human DNA repair enzymes. *Mutat. Res.* **591**, 60–73.
31. Illuzzi J.L., Harris N.A., Manvilla B.A., Kim D., Li M., Drohat A.C., Wilson D.M. (2013) Functional assessment of population and tumor-associated APE1 protein variants. *PLoS One.* **8**, e65922.
32. Kim W.C., Ma C., Li W.M., Chohan M., Wilson D.M., Lee C.H. (2014) Altered endoribonuclease activity of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 variants identified in the human population. *PLoS One.* **9**, 1–9.
33. Kwiatkowski D., Czarny P., Galecki P., Bachurska A., Talarowska M., Orzechowska A., Bobinska K., Bielecka-Kowalska A., Pietras T., Szemraj J., Maes M., Sliwinski T. (2015) Variants of base excision repair genes *MUTYH, PARP1* and *XRCC1* in Alzheimer's disease risk. *Neuropsychobiology.* **71**, 176–186.
34. Czarny P., Kwiatkowski D., Toma M., Kubiak J., Sliwinska A., Talarowska M., Szemraj J., Maes M., Galecki P., Sliwinski T. (2017) Impact of single nucleotide polymorphisms of base excision repair genes on DNA damage and efficiency of DNA repair in recurrent depression disorder. *Mol. Neurobiol.* **54**, 4150–4159.
35. Marsden C.G., Dragon J.A., Wallace S.S., Sweasy J.B. (2017) Base excision repair variants in cancer. *Methods Enzymol.* **591**, 119–157.
36. Chan K.K.L., Zhang Q.M., Dianov G.L. (2006) Base excision repair fidelity in normal and cancer cells. *Mutagenesis.* **21**, 173–178.
37. Sweasy J.B., Lang T.M., DiMaio D. (2006) Is base excision repair a tumor suppressor mechanism? *Cell Cycle.* **5**, 250–259.
38. Tudek B. (2007) Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers. *Mol. Aspects Med.* **28**, 258–275.
39. D'Errico M., Parlanti E., Dogliotti E. (2008) Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology. *Mutat. Res.* **659**, 4–14.
40. Nemec A.A., Wallace S.S., Sweasy J.B. (2010) Variant base excision repair proteins: contributors to genomic instability. *Semin. Cancer Biol.* **20**, 320–328.
41. Wilson D.M., Kim D., Berquist B.R., Sigurdson A.J. (2011) Variation in base excision repair capacity. *Mutat. Res.* **711**, 100–112.
42. Wallace S.S., Murphy D.L., Sweasy J.B. (2012) Base excision repair and cancer. *Cancer Lett.* **327**, 73–89.
43. Karahalil B., Bohr V.A., Wilson D.M. (2012) Impact of DNA polymorphisms in key DNA base excision repair proteins on cancer risk. *Hum. Exp. Toxicol.* **31,** 981–1005.
44. Shapovalov M.V., Dunbrack R.L. (2011) A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions. *Structure.* **19**, 844–858.
45. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A. (1995) A second generation all atom force field for the simulation of proteins, nucleic acids and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5179–5197.

46. Wang J., Cieplak P., Kollman P.A. (2000) How well does a Restrained Electrostatic Potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.* **21**, 1049–1074.
47. Попов А.В., Воробьев Ю.Н. (2010) Программа GUI-BioPASED для моделирования молекулярной динамики биополимеров с графическим пользовательским интерфейсом. *Молекуляр. биология*. **44**, 735–742.
48. Lazaridis T., Karplus M. (1999) Effective energy function for proteins in solution. *Proteins.* **35**, 133–152.
49. Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S. (2014) Pre-steady-state fluorescence analysis of damaged DNA transfer from human DNA glycosylases to AP endonuclease APE1. *Biochim. Biophys. Acta.* **1840**, 3042–3051.
50. Яковлев Д.А., Кузнецова А.А., Федорова О.С., Кузнецов Н.А. (2017) Поиск поврежденных участков ДНК метил-CpG-связывающим ферментом MBD4. *Acta Naturae.* **9**, 95–105.
51. Petronzelli F., Riccio A., Markham G.D., Seeholzer S.H., Genuardi M., Karbowski M., Yeung A.T., Matsumoto Y., Bellacosa A. (2000) Investigation of the substrate spectrum of the human mismatch-specific DNA *N*-glycosylase MED1 (MBD4): fundamental role of the catalytic domain. *J. Cell Physiol.* **185**, 473–480.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE ACTIVITY OF THE POLYMORPHIC VARIANTS OF HUMAN URACIL-DNA-GLYCOSYLASE SMUG1 AND MBD4

I. V. Alekseeva[1], A. S. Bakman[1, 2], D. A. Iakovlev[1], N. A. Kuznetsov[1, *], and O. S. Fedorova[1, **]

[1]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

[2]Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

**e-mail: nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru*

***e-mail: fedorova@niboch.nsc.ru*

Human *N*-glycosylases SMUG1 and MBD4 catalyze the removal of uracil residues from DNA resulting from cytosine deamination or replication errors. For polymorphic variants of SMUG1 (G90C, P240H, N244S, N248Y) and the catalytic domain MBD4^{cat} (S470L, G507S, R512W, H557D), the structures of enzyme-substrate complexes were obtained by molecular dynamics. It was experimentally found that SNP variants of SMUG1, N244S and N248Y, had increased catalytic activity compared to the wild-type enzyme, probably due to the acceleration of the dissociation of the enzyme-product complex and an increase in the enzyme turnover rate. All other SNP variants of SMUG1 (G90C, P240H) and MBD4^{cat}, wherein amino acid substitutions disrupted the substrate binding region and/or active site, had significantly lower catalytic activity than the wild-type enzymes.

Keywords: DNA repair, human uracil-DNA glycosylase, MBD4, SMUG1, polymorphic variant, active site, catalysis

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 2, с. 289–304

ЭНЗИМОЛОГИЯ СИСТЕМ РЕПАРАЦИИ ДНК

УДК 577.151.45:577.113.4

БЕЛОК MutL ИЗ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ МИСМАТЧЕЙ БАКТЕРИИ *Neisseria gonorrhoeae*: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С АТР И ДНК

© 2021 г. М. В. Монахова[a, *], М. А. Милакина[b], В. Ю. Савицкая[b], Е. А. Романова[a], Desirazu N. Rao[c], Е. А. Кубарева[a]

[a] *Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия*

[b] *Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия*

[c] *Department of Biochemistry, Indian Institute of Science, Bangalore, 560012 India*

**e-mail: monakhovamv@gmail.com*

Поступила в редакцию 04.08.2020 г.
После доработки 04.08.2020 г.
Принята к публикации 17.08.2020 г.

Система репарации неканонических пар нуклеотидов, или мисматчей (MMR), обеспечивает неизменность генетической информации в процессе репликации ДНК почти во всех организмах. Репарация мисматчей инициируется после узнавания неканонической пары белком MutS и формирования комплекса MutS с белком MutL. Эукариотические и большинство бактериальных гомологов MutL могут действовать как эндонуклеазы и вносить одноцепочечный разрыв в дочернюю цепь ДНК, тем самым активируя процесс репарации. Однако многие аспекты механизма действия этого белка не изучены. Нами изучены АТРазная и ДНК-связывающая функции белка MutL из патогенной бактерии *Neisseria gonorrhoeae* (NgoMutL), обладающего эндонуклеазной активностью. Впервые определены кинетические параметры реакции гидролиза АТР полноразмерным белком NgoMutL. Изучено его взаимодействие с одно- и двухцепочечными фрагментами ДНК различной длины. Показано, что NgoMutL способен эффективно образовывать комплексы с фрагментами ДНК длиной более 40 нуклеотидных звеньев. С помощью модифицированных ДНК-дуплексов, содержащих 2-пиридилдисульфидную группу на линкерах различной длины, впервые получены конъюгаты NgoMutL с ДНК. Этот результат свидетельствует о локализации остатков Cys белка дикого типа на расстоянии приблизительно 18–50 Å от дуплекса. Показано, что эффективность аффинной модификации остатков Cys NgoMutL реакционноспособными ДНК снижается в присутствии АТР или его негидролизуемого аналога, а также $ZnCl_2$ в реакционной смеси. Впервые высказано предположение, что консервативные остатки Cys С-концевого домена NgoMutL, отвечающие за координацию ионов металла в активном центре белка, участвуют во взаимодействии с ДНК. Полученная информация может быть полезна при реконструкции основных этапов функционирования системы MMR в прокариотах, отличных от γ-протеобактерий, и поиске новых мишеней для лекарственных препаратов против *N. gonorrhoeae*.

Ключевые слова: система репарации мисматчей, MutL, ДНК-белковое взаимодействие, 2-пиридилдитиогруппа, ковалентное связывание белка с ДНК, *Neisseria gonorrhoeae*

DOI: 10.31857/S0026898421020117

ВВЕДЕНИЕ

Двойная спираль ДНК постоянно подвергается воздействию различных мутагенных факторов, что приводит к изменению закодированной в ДНК генетической информации и нарушению нормальной жизнедеятельности организма [1]. Мутагенные факторы могут быть как экзогенными (УФ- или радиоактивное излучение), так и эндогенными (свободные радикалы, активные формы кислорода, вырабатываемые в клетках организма). Кроме того, вследствие сбоев в функционировании

Сокращения: а.о. – аминокислотный остаток (при числе); ПААГ – полиакриламидный гель; AaeMutL – MutL из *Aquifex aeolicus*; AMPPNP – аденозин-5'-(β,γ-имидо)трифосфат; ATPγS – аденозин-5'-(γ-тио)трифосфат; BsuMutL – MutL из *Bacillus subtilis*; CTD – С-концевой домен белка; EcoMutL – MutL из *Escherichia coli*; K_d^{app} – кажущаяся константа диссоциации; k_{cat} – каталитическая константа скорости реакции; K_M – константа Михаэлиса; MMR – система репарации некомплементарных пар нуклеотидов; NgoMutL – MutL из *Neisseria gonorrhoeae;* NTD – N-концевой домен белка; PaeMutL – MutL из *Pseudomonas aeruginosa*; PDB – база данных Protein Data Bank; RspMutL – MutL из *Rhodobacter sphaeroides*; SPDP – сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат; TAMRA – 5-карбокситетраметилродамин; TaqMutL – MutL из *Thermus aquaticus*; TthMutL – MutL из *Thermus thermophilus.*

ДНК-полимеразы в процессе репликации ДНК возможно появление некомплементарных пар нуклеотидов, или мисматчей [2]. По существующим оценкам в случае бактериальных полимераз одна такая ошибка приходится на 0.1–10 млрд. н. Эукариотические ДНК-полимеразы не обладают 3'-5'-экзонуклеазной активностью, что обуславливает более частое возникновение мисматчей.

Для сохранения целостности и правильности генома, точной передачи генетической информации в клетках всех живых организмов существуют различные системы репарации повреждений ДНК. В случае серьезных повреждений ДНК, которые не могут быть восстановлены, инициируется запрограммированная клеточная смерть (апоптоз) [3].

За исправление повреждений ДНК, возникающих в результате ошибок ДНК-полимеразы в процессе репликации, отвечает система репарации некомплементарных пар нуклеотидов, или MMR (от англ. mismatch repair). Работа этой системы понижает вероятность возникновения мутаций в 10^2–10^3 раз [4]. Система MMR узнает не только некомплементарные пары, но также небольшие делеционные и инсерционные петли (“индели”) длиной до 4 н. [5]. Функционирование этой системы обусловлено скоординированным действием более 10 белков, в результате которого происходит удаление протяженного одноцепочечного фрагмента вновь синтезированной цепи ДНК, содержащей мисматч, с дальнейшим застраиванием образовавшейся “бреши” [6]. Ключевыми белками системы MMR являются MutS и MutL. Репарация мисматчей инициируется после узнавания неканонической пары белком MutS и формирования комплекса MutS-MutL, который предположительно направляет последовательность следующих этапов репарации. MutS – сенсорный белок, сканирующий и идентифицирующий мисматчи и повреждения в ДНК, хорошо охарактеризован [7]. Существенно меньше известно о роли MutL в процессе репарации, прежде всего из-за динамического характера структуры этого белка, принимающего множество различных конформаций, а также отсутствия у него определенного участка узнавания в ДНК [8–12].

Сигналом к репарации, при которой фрагмент цепи ДНК, содержащий мисматч, удаляется, служит гидролиз фосфодиэфирной связи в одной из цепей ДНК. В клетках γ-протеобактерий, в том числе *Escherichia coli*, этот разрыв вносит белок MutH, узнающий монометилированную последовательность 5'-Gm^{6}ATC-3'/3'-CTAG^-5' (^ указывает место гидролиза). Каталитическая функция MutH стимулируется тройным комплексом, состоящим из белков MutS и MutL и ДНК с мисматчем. У эукариот и большинства бактерий метилирование не является маркером вновь синтезированной цепи. Введение разрыва в ДНК таких организмов приписывают гомологам MutL, у которых обнаружен эндонуклеазный мотив [6, 13].

Бактериальные системы репарации мисматчей, в которых белок MutL обладает эндонуклеазной функцией, изучены существенно хуже, чем системы репарации *E. coli* и даже человека [6]. Вместе с тем, MMR бактерий представляет значительный интерес в связи с большим функциональным и видовым разнообразием прокариот.

Neisseria gonorrhoeae – это грамотрицательный диплококк, факультативный внутриклеточный патоген человека. *N. gonorrhoeae* вызывает гонорею – венерическое заболевание, которое поражает в первую очередь органы репродуктивной системы человека. Чтобы адаптироваться к новой среде и избежать иммунного ответа организма-хозяина *N. gonorrhoeae* использует широкомасштабную вариацию фаз [14, 15]. Стандартные способы лечения гонореи быстро становятся неэффективными из-за постоянного появления новых штаммов. У *N. gonorrhoeae* отсутствует наиболее важная репарационная система – SOS-ответ [16]. Устойчивость *N. gonorrhoeae* к действию вакцин и лекарственных препаратов может быть связана не только с феноменом вариации фаз, но с эффективной работой основных систем репарации этой бактерии, в том числе системы MMR.

Функционирование системы MMR у *N. gonorrhoeae* и *E. coli* должно отличаться, поскольку у *N. gonorrhoeae* отсутствует никующая эндонуклеаза MutH [17]. Ранее было показано, что гомодимерный белок MutL *N. gonorrhoeae* (NgoMutL) обладает эндонуклеазной функцией, как и его эукариотические аналоги и белки MutL бактерий *Aquifex aeolicus* (AaeMutL), *Bacillus subtilis* (BsuMutL), *Pseudomonas aeruginosa* (PaeMutL), *Rhodobacter sphaeroides* (RspMutL), *Thermus aquaticus* (TaqMutL) и *T. thermophilus* (TthMutL) [17–22]. NgoMutL гидролизует плазмидную ДНК не только в присутствии ионов Mn^{2+}, что характерно для белков MutLα человека и дрожжей, но также в присутствии ионов Mg^{2+}, как PaeMutL и RspMutL, и ионов Ca^{2+}, что пока не обнаружено у MutL из других организмов [6]. В отличие от MutLα дрожжей и аналогично бактериальным белкам BsuMutL, PaeMutL, RspMutL и TthMutL ATP ингибирует гидролитическую активность NgoMutL [17–19, 21]. Таким образом, NgoMutL, по-видимому, имеет свой уникальный механизм функционирования. Недавно выявили участие этого механизма в работе системы репарации VSP (very short patch) [23].

Выделен и охарактеризован С-концевой домен NgoMutL (NgoMutL-CTD), показана его способность гидролизовать ДНК в присутствии ионов марганца [22]. Решена кристаллическая структура NgoMutL-CTD, показано, что активный центр этого фермента, ответственный за катализ гидролиза

ДНК, сформирован четырьмя из шести консервативных мотивов С-концевого домена, включая центры связывания ионов двухвалентных металлов [24]. В металлсвязывающих центрах MutL содержатся остатки цистеина [25], роль которых во взаимодействии с ионами марганца и цинка пока не вполне понятна. Не выяснено, принимают ли они участие во взаимодействии с ДНК. Не удается также получить кристаллы ни полноразмерных белков MutL, ни их отдельных доменов с ДНК. Развиваемый нами метод аффинной модификации белков ДНК-дуплексами с реакционноспособными, селективными по отношению к цистеину, группировками на линкерах различной длины позволяет зондировать сближенность остатков Cys белка с ДНК в процессе их взаимодействия [26–32].

В результате проведенного исследования впервые получены кинетические параметры гидролиза ATP белком NgoMutL, установлено влияние ионов цинка на функционирование этого фермента. Кроме того, определена минимальная длина одно- и двухцепочечных фрагментов ДНК, с которыми может эффективно связываться изучаемый белок. Методом аффинной модификации с использованием дуплексов, содержащих 2-пиридилдисульфидную группу на линкерах длиной 18.6, 31.7 или 50.4 Å в пятом положении тимидина, установлено, что остатки цистеина эндонуклеазного домена NgoMutL могут взаимодействовать с ДНК. Показано, что выход ДНК-белкового конъюгата зависит от длины линкера, на котором локализована пиридилдисульфидная группа, концентрации ATP и присутствия ионов цинка в реакционной смеси.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигонуклеотиды, реагенты и буферные растворы. Немодифицированные и флуоресцентно меченные олигодезоксирибонуклеотиды синтезированы компанией “Евроген” (Россия). Олигодезоксирибонуклеотид с модифицированным остатком тимидина синтезирован компанией “Синтол” (Россия). Использованные в работе ДНК приведены на рис. 1.

Использовали ATP, аденозин-5'-(γ-тио)трифосфат (ATPγS), ADP, бромид этидия фирмы “Sigma-Aldrich” (США); *N*,*N*,*N*',*N*'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), акриламид, *N*,*N*'-метиленбисакриламид, глицерин – все “Serva” (Германия); *N*-2-гидроксиэтилпиперазин-*N*'-2-этансульфоновую кислоту (HEPES), додецилсульфат натрия (SDS), трис-(гидроксиметил)аминометан (Трис), этилендиаминтетраацетат натрия (EDTA), гидрофосфат натрия, β-меркаптоэтанол, изопропил-β-*D*-1-тиогалактопиранозид (IPTG), имидазол, трео-2,3-дигидрокси-1,4-димеркаптобутан (дитиотреит, DTT) – “Хеликон” (Россия); Ni-NTA (никель-нитрилотриуксусная кислота)-агарозу – “Novagen” (Германия); набор для окрашивания гелей солями серебра PageSilver™ – “Thermo Fisher Scientific” (США).

При проведении экспериментальных работ использовали следующие буферные растворы: А (10 мМ HEPES-KOH, pH 8.0, 300 мМ KCl, 1 мМ β-меркаптоэтанол, 10% (v/v) глицерина), Б (10 мМ HEPES-KOH, pH 8.0), В (10 мМ HEPES-KOH, pH 7.5, 5 мМ $MgCl_2$), ТБЕ (89 мМ Трис, 89 мМ борная кислота, pH 8.3, 2 мМ EDTA), ТГ (25 мМ Трис-HCl, 250 мМ глицин, pH 8.3, 0.1% (m/v) SDS), LAP (50 мМ Трис-HCl, pH 6.8, 2.5% (m/v) SDS, 10% (v/v) глицерина, 0.5% (v/v) β-меркаптоэтанола, 0.01% (m/v) БФС), LB (10 г/л триптон, 10 г/л NaCl, 5 г/л дрожжевой экстракт), STE (10 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 100 мМ NaCl, 100 мкМ EDTA).

Выделение белка NgoMutL. Белок MutL синтезировали в клетках *E. coli* (штамм BL21(DE3)pLys). Клеточную культуру растили в 2 л среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и инкубировали при интенсивной аэрации и 37°C до A_{600} = 0.8 о.е. Затем добавляли водный раствор IPTG до концентрации 1 мМ и инкубировали клетки в течение 3 ч при 28°C. После этого отделяли клетки от среды центрифугированием в стаканах объемом 500 мл (30 мин, 4200 об./мин, 4°C), ресуспендировали клеточный осадок в 35 мл буфера STE, центрифугировали (в пробирке объемом 50 мл) в течение 15 мин при 4200 об./мин и 4°C, удаляли жидкость над осадком и замораживали биомассу при –18°C.

Белок NgoMutL выделяли методом аффинной хроматографии на носителе Ni-NTA-агароза согласно методике, описанной ранее [22]. Для дополнительной очистки от продуктов деградации использовали эксклюзионную хроматографию на колонке Enrich SEC 650 “Bio-Rad” (США). Колонку уравновешивали буфером А, который затем служил элюентом. Объем наносимого на колонку препарата – 500 мкл. Расход элюента – 1 мл/мин. За ходом разделения следили по поглощению при 280 нм. Концентрацию белка во фракциях определяли на приборе NanoDrop ND-1000 (“Thermo Fisher Scientific”). Наличие целевого белка во фракциях детектировали методом электрофореза в 8%-ном ПААГ, содержащем 0.1% SDS, как описано в [17].

Оценка ATPазной активности белка MutL. За основу были взяты методики [9, 22]. Смеси объемом 60 мкл в буфере Б, содержащие 50 нМ 76-звенного ДНК-дуплекса **V** (рис. 1), 5 мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl, ATP в разных концентрациях (100, 150, 250, 300, 400, 500, 750, 1000 мкМ), инкубировали с белком MutL (0.7 мкМ) при 25°C в течение 150 мин. Каждые 15 мин из реакционной смеси отбирали пробы по 30 мкл и останавливали реакцию добавлением 50 мМ EDTA. Затем 20 мкл реакционной смеси добавляли к 80 мкл реагента для идентифи-

I 5' –TCGAGTCTTCTCAAGG–**TAMRA**–3' (*1*) 16-мер
3' –AGCTCAGAAGAGTTCC–5'

II 5' –TGCCAAGAGTCCTCTAGCTT–**TAMRA**–3' (*2*) 20-мер
3' –ACGGTTCTCAGGAGATCGAA–5'

III 5' –GATGCTGCCAAGAGTCCTCTAGCTTCATAC–**TAMRA**–3' (*3*) 30-мер
3' –CTACGACGGTTCTCAGGAGATCGAAGTATG–5'

IV 5' –ATAGGACGCTGACACTGGTGCTTGGCAGCTTCTAATTCGAT–**TAMRA**–3' (*4*) 41-мер
3' –TATCCTGCGACTGTGACCACGAACCGTCGAAGATTAAGCTA–5'

V 5' –ATAGGACGCTGACACTGGTGCTTGGCAGCTGAGCCATATGCTCGAGTAACGCTCATAGGATCCAAGCGCGAAAGGA–**TAMRA**–3' (*5*) 76-мер
3' –TCCTTTCGCGCTTGGATCCTATGAGCGTTACTCGAGCATATGGCTCAGCTGCCAAGCACCAGTGTCAGCGTCCTAT–5'

VI 5' –ACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGTCTCA–AGCTGCCAAGCACCAGTGTCAGCGTCCTAT–3'
3' –TGTTACGCGAGTAGCAGTAGGAGCAGAGT**T***CGACGGTTCGTGGTCACAGTCGCAGGATA–5'

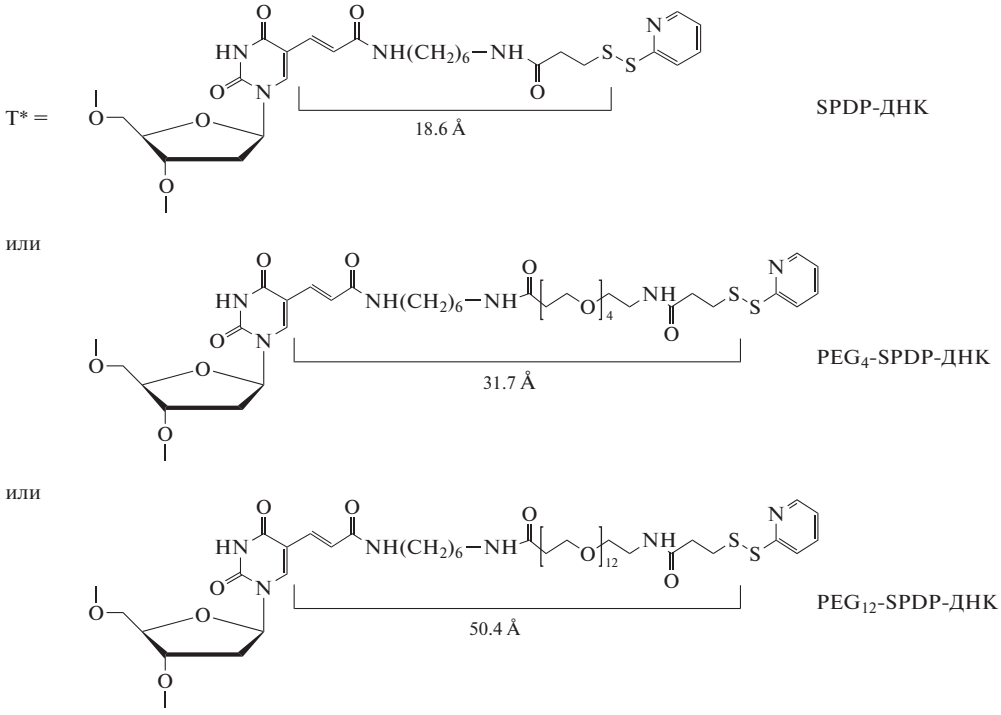


Рис. 1. Используемые в работе ДНК-дуплексы и олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие флуоресцентную метку TAMRA, а также реакционноспособные дуплексы для аффинной модификации белка NgoMutL. T* – модифицированный остаток тимидина, содержащий 2-пиридилдитиогруппу на линкерах различной длины. Префикс “d” (дезокси) при обозначении олигодезоксирибонуклеотидов и ДНК-дуплексов опущен.

кации фосфат-иона (0.0815% малахитового зеленого, 2.32% поливинилового спирта, 5.75% молибдата аммония в 6 Н HCl в соотношении с водой 2 : 1 : 1 : 2), предварительно помещенного в ячейки 96-луночного планшета, и тщательно перемешивали. Затем добавляли 20 мкл 34%-ного раствора цитрата натрия, перемешивали до стабилизации окраски и выдерживали в течение примерно 15 мин. Поглощение полученных сине-зеленых растворов измеряли на планшетном ридере Victor X5 при длине волны 590 нм “Perkin Elmer” (США). Измеряли оптическую плотность растворов с известным количеством фосфат-иона и строили калибровочный график. С его помощью определяли количество фосфат-иона в исследуемых растворах. Кинетические параметры рассчитывали методом нелинейной регрессии с применением схемы Михаэлиса–Ментен.

Комплексообразование NgoMutL с ДНК различной длины. Для проверки ДНК-связывающей активности белка NgoMutL использовали ДНК-дуплексы **I**–**V** (рис. 1) различной длины (16, 20, 30, 41, 76 п.н.) и 16-, 20-, 30-, 41- и 76-звенные олигонуклеотиды ***1***–***5*** с флуоресцентной меткой TAMRA (5-карбокситетраметилродамином), входящие в состав ДНК-дуплексов. Связывание проводили по методике, описанной в [22]. Смеси объемом 20 мкл в буфере Б, содержащие 20 нМ ДНК-дуплекса, 1 мМ DTT, 100 мМ KCl, 0.5 мг/мл БСА, инкубировали с белками MutL различной концентрации (0.25–4 мкМ) в течение 10 мин в бане со льдом. Анализ проводили методом гель-

электрофореза в 6%-ном ПААГ в ТБЕ-буфере при 4°C (метод "торможения в геле"). Фотографии гелей, полученные на приборе Typhoon FLA 9500 ("GE Healthcare", США), обрабатывали с помощью программы TotalLab TL120 ("GE Healthcare"). Измеряли интенсивность зон, соответствующих свободной ДНК и комплексу белка MutL с ДНК. Степень комплексообразования рассчитывали как отношение интенсивности зоны, соответствующей ДНК-белковому комплексу, к суммарной интенсивности зон, умноженное на 100%. Значение кажущейся константы диссоциации (K_d^{app}) комплексов MutL с ДНК определяли как концентрацию белка, при которой 50% ДНК-лиганда находится в комплексе с ферментом. Расчет проводили как минимум из трех независимых экспериментов.

Аффинная модификация белка NgoMutL модифицированными ДНК. Реакцию ковалентного связывания NgoMutL с реакционноспособными ДНК проводили в соответствии с методикой, опубликованной ранее [26]. Смеси объемом 10 мкл в буфере В, содержащие 1 мкМ ДНК-дуплекса и 4 мкМ белка MutL, инкубировали в течение 15 мин в бане со льдом. Концентрация ATP, ADP, ATPγS или $ZnCl_2$ в реакционной смеси при проведении ковалентного связывания составляла 1 мМ. Реакцию останавливали, добавляя в смесь буфер LAP без β-меркаптоэтанола. Анализ реакционных смесей проводили в 8%-ном ПААГ, содержащем 0.1% SDS. После электрофореза гель сначала окрашивали водным раствором бромида этидия (0.5 мкг/мл) в течение 15 мин для визуализации ДНК и фотографировали в ультрафиолетовом свете. При этом наблюдалось и окрашивание зон, соответствующих белкам, что описано в [33]. Затем для визуализации белковых зон тот же гель окрашивали раствором солей серебра с помощью набора PageSilver™ ("Thermo Fisher Scientific") в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

Гидролиз плазмидной ДНК белком NgoMutL. За основу взята методика [17]. Плазмиду pUC-MMR (концентрация 10 нМ) инкубировали с NgoMutL (500 нМ) в буфере Б, содержащем 100 мМ KCl, 5 мМ $MgCl_2$ или $MnCl_2$ (в зависимости от эксперимента), при 37°C в течение 1 ч. При проведении гидролиза в присутствии $ZnCl_2$ его концентрация варьировали от 10 до 100 мкМ. Реакцию останавливали добавлением к инкубационной смеси 50 мМ EDTA. Для деградации белков в реакционную смесь добавляли протеиназу K (10 ед. акт.), инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Реакционные смеси анализировали методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле, содержащем бромид этидия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика и выделение белка NgoMutL

Белок NgoMutL был впервые выделен и охарактеризован в 2009 г. В растворе этот белок находится в виде гомодимера [22]. Мономер NgoMutL состоит из 658 аминокислотных остатков (а.о.), имеет молекулярную массу 71.1 кДа, pI – 6.04. Конструкция на основе плазмиды pET15b, содержащая ген *NgoMutL*, получена с применением ПЦР с геномной ДНК штамма FA 1090 *N. gonorrhoeae* в качестве матрицы [22]. После секвенирования [22] в вариабельном линкерном участке обнаружены четыре делеции, что не должно сказываться на основных функциях белка. Так, удаление 40% остатков линкерного участка MutL из *E. coli* (EcoMutL) не повлияло существенно на свойства этого белка [34]. Ранее мы провели детальный сравнительный анализ первичных структур 1483 бактериальных белков MutL, обладающих эндонуклеазной функцией, и выявили 16 консервативных мотивов в их структуре [17, 25]. В составе NgoMutL найдено семь мотивов, ответственных за связывание и гидролиз ATP (мотивы *I–III*, *V*, *VII*, *IX*, *X*), а также пять мотивов (*XI*, *XII*, *XIV–XVI*), формирующих каталитический центр белка, обеспечивающий гидролиз ДНК (см. табл. 1 и рис. 1 в [17]). Как и все белки MutL, NgoMutL состоит из N- и C-концевых доменов и вариабельного линкера между ними. Структурные мотивы, отвечающие за связывание и гидролиз ATP, локализованы в N-концевом домене белков (NTD); мотивы, которые обеспечивают гидролиз ДНК – в C-концевом домене (CTD) [22]. Исходя из сравнения аминокислотных последовательностей гомологов MutL, взятых из базы данных UniProt, N- и C-концевые домены NgoMutL определены с точностью до 5 а.о. (1–324 и 468–658 а.о. соответственно); длина линкера – 144 а.о. Анализ шести выделенных и относительно изученных бактериальных MutL, обладающих эндонуклеазной функцией, показал, что по первичной структуре и биохимическим свойствам NgoMutL наиболее сходен с белками MutL из *R. sphaeroides* и *P. aeruginosa* [17].

Белок NgoMutL выделяли методом металл-хелатной хроматографии на сорбенте Ni-NTA-агароза за счет эффективного комплексообразования ионов Ni^{2+} с последовательностью из шести остатков His на N-конце белковой молекулы [22].

Дополнительную очистку NgoMutL проводили методом эксклюзионной хроматографии (см. пункт "Выделение белка NgoMutL" раздела "Экспериментальная часть"). Препарат NgoMutL получен в количестве 1 мг (концентрация 14.4 мкМ).

Анализ АТРазной активности белка NgoMutL

И бактериальные гомодимерные, и эукариотические гетеродимерные белки MutL принадле-

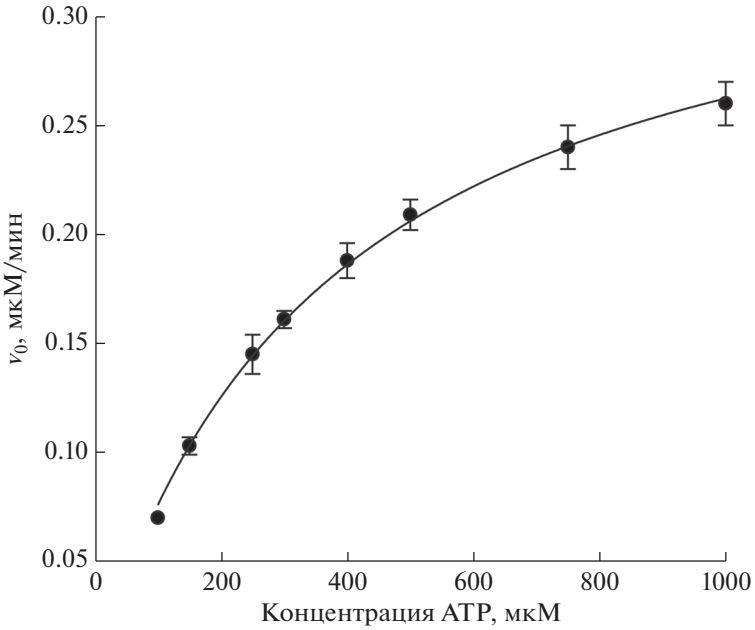


Рис. 2. Зависимость начальной скорости гидролиза АТР белком NgoMutL (0.7 мкМ) от концентрации субстрата. Реакцию проводили при 25°С в течение 150 мин в присутствии 50 нМ 76-звенного ДНК-дуплекса **V**. Представлены средние значения, вычисленные из данных трех экспериментов.

жат суперсемейству GHKL АТРаз (Gyrase, Hsp90, Histidine Kinase и MutL). Наличие в последовательности NgoMutL консервативных мотивов, ответственных за взаимодействие с АТР, позволяет также отнести его к этому семейству [25]. АТРазная активность MutL необходима для функционирования системы репарации ДНК. При взаимодействии с АТР белок MutL меняет свою конформацию и таким образом становится способным взаимодействовать с другими участниками системы репарации, что влияет на его эндонуклеазную активность [9, 10, 12, 35]. Количественно охарактеризована АТРазная активность N-концевых доменов гомологов белка MutL из четырех организмов: EcoMutL, AaeMutL, BsuMutL и PMS2 человека [6]. Данные для полноразмерного белка BsuMutL представлены только в работе [19] (табл. 1).

АТРазную активность белков удобно измерять колориметрическим методом по скорости образования фосфат-иона с использованием красителя малахитового зеленого, меняющего свой цвет при взаимодействии с фосфомолибдатным комплексом при низком значении pH [36]. Для количественной характеристики АТРазной активности NgoMutL использованы методики, предложенные ранее [9, 22]. Показано, что АТРазная активность NgoMutL увеличивается в присутствии дцДНК [22]. Исходя из этого, использованная нами реакционная смесь содержала 50 нМ 76-звенного дуплекса **V** (рис. 1). Количество образовавшегося фосфат-иона определяли, измеряя поглощение полученного раствора при длине волны 590 нм [37]. Зависимость начальной скорости (v_0) гидролиза АТР белком NgoMutL от концентрации АТР представлена на рис. 2. Кинетические параметры реакции рассчитывали по уравнению Михаэлиса–Ментен (табл. 1).

Полученные данные согласуются с данными для гомологов белка MutL из других организмов, значения K_M у которых варьируют от 50 до 400 мкМ, а

Таблица 1. Параметры гидролиза АТР белками MutL из различных бактерий

Белок	K_M, мкМ	k_{cat}, $с^{-1}$	Ссылка
NgoMutL	377 ± 16	$(6.9 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	
BsuMutL	400	5.0×10^{-3}	[19]
PMS2-NTD человека	~100	3.3×10^{-3}	[38]
EcoMutL-NTD	~90	6.6×10^{-3}	[9]
AaeMutL-NTD	~49	2.9×10^{-4}	[39]

значения k_{cat} – от 3×10^{-4} до 6×10^{-3} $с^{-1}$. Из табл. 1 видно, что NgoMutL имеет практически такое же сродство к ATP, как и BsuMutL. У всех белков MutL, исследованных ранее, а также у NgoMutL значения k_{cat} сравнимы. Только AaeMutL-NTD имеет константу скорости гидролиза ATP на порядок ниже. Таким образом, NgoMutL обладает относительно низкой ATPазной активностью, как и многие члены семейства GHKL, по сравнению с другими ATPазами (например, k_{cat} ДНК-топоизомераз типа II составляет ~1 $с^{-1}$ [40]).

Анализ ДНК-связывающей активности белка NgoMutL

Показано, что гомологи белка MutL способны связывать как оц-, так и дцДНК произвольной последовательности вне зависимости от присутствия мисматча [41–43]. Согласно современным представлениям ДНК-связывающий центр MutL находится в N-концевом домене белка [34]. ДНК-связывающая активность белков MutL может зависеть от множества факторов, таких как длина ДНК, наличие кофакторов (ADP, ATP, негидролизуемые аналоги ATP) и ионная сила раствора [6].

В ранних исследованиях указывалось, что EcoMutL не связывает 72-звенный ДНК-фрагмент, малоэффективно взаимодействует со 118-звенным ДНК-дуплексом и полностью связывает ДНК длиной 187 п.н. [42]. Однако затем методом измерения поляризации флуоресценции показали комплексообразование EcoMutL с 41-звенными ДНК [44]. Позднее было изучено связывание MutL из *A. aeolicus*, обладающего эндонуклеазной функцией, с короткими ДНК длиной от 15 до 60 п.н. [45]. Этот белок образовывал комплекс уже с 15-звенным ДНК-дуплексом. По мере увеличения длины ДНК эффективность связывания повышалась и достигала максимального значения при длине дуплекса, равной 30 п.н. Дальнейшее увеличение длины дуплекса не влияло на связывание ДНК белком AaeMutL. Таким образом, "место посадки" белка AaeMutL на ДНК составляет около 30 п.н. [45]. Однако MutL из *A. aeolicus* имеет очень короткий для белков MutL линкер между N- и C-доменами (5 а.о.). MutL из *T. thermophilus*, длина линкера у которого составляет 29 а.о., эффективно взаимодействует с 80-звенным ДНК-дуплексом (K_d = 420 нМ) [21]. Отметим, что оба эти белка MutL относятся к подсемействам III и II соответственно. Эффективность гидролиза ими ДНК не зависит от присутствия β-субъединицы ДНК-полимеразы III (β-зажима). Белок NgoMutL, напротив, относится к подсемейству I белков MutL, т.е. содержит характерный мотив QHLLIP, взаимодействующий с β-зажимом, и имеет достаточно длинный линкерный участок (144 а.о.) [46]. Возможно, его способность связывать короткие ДНК отличается от способности белков AaeMutL и TthMutL.

Ранее методом "торможения в геле" показали, что в присутствии 300 мМ KCl NgoMutL эффективно связывает дцДНК длиной 440 п.н. и 45-звенную оцДНК [22]. Однако известно, что уменьшение ионной силы буферного раствора повышает степень связывания белков MutL с ДНК [47]. Таким образом, для изучения методом "торможения в геле" ДНК-связывающей способности NgoMutL решено снизить концентрацию KCl в буферном растворе до 100 мМ. Эту же ионную силу раствора использовали при изучении связывания белков TthMutL и AaeMutL с ДНК [21, 45]. При выборе длины фрагментов ДНК для проведения исследования мы опирались также на данные, полученные методом поверхностного плазмонного резонанса, согласно которым NgoMutL достаточно эффективно взаимодействовал с 35-звенной оцДНК, иммобилизованной на носителе [22].

Таким образом, для проверки способности NgoMutL связывать ДНК использовали дцДНК (дуплексы **I–V**) длиной 16, 20, 30, 41, 76 п.н., содержащие флуоресцентную метку TAMRA (рис. 1). В условиях комплексообразования (см. Экспериментальную часть, раздел "Комплексообразование NgoMutL с ДНК различной длины") белок NgoMutL взаимодействует с ДНК-дуплексами длиной не менее 30 п.н. (рис. 3), т.е. в отличие от AaeMutL, дуплексы длиной 16 и 20 п.н. с NgoMutL не связываются.

По мере увеличения длины ДНК эффективность ее связывания с NgoMutL возрастает, что согласуется с данными для AaeMutL [45]. В случае 30-звенного ДНК-дуплекса **III** не удалось рассчитать константу диссоциации комплекса NgoMutL–ДНК, так как в выбранных нами условиях степень связывания не достигла 50% (рис. 4). Комплексообразование NgoMutL с 41- и 76-звенными дцДНК охарактеризовано кажущимися константами диссоциации (табл. 2): при увеличении длины дуплекса от 41 до 76 п.н. величина K_d^{app} уменьшилась почти вдвое. Следовательно, "место посадки" полноразмерного белка NgoMutL на ДНК превышает 41 п.н. Таким образом, это первый пример бактериального MutL с эндонуклеазной функцией из подсемейства I, который, несмотря на достаточно протяженный линкер между N- и C-доменами, способен эффективно связывать относительно короткие ДНК.

Кроме того, в качестве лигандов NgoMutL использовали оцДНК ***1–5*** такой же длины. оцДНК связываются с белком менее эффективно по сравнению с ДНК-дуплексами (табл. 2). K_d^{app} их комплексов с NgoMutL примерно в 1.3–1.5 раза выше, чем K_d^{app} дцДНК аналогичной длины. NgoMutL взаимодействует с оцДНК длиной более 40 нук-

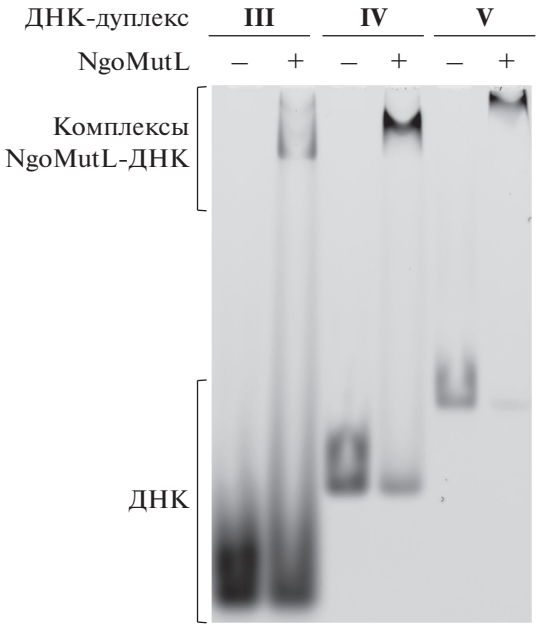


Рис. 3. Анализ комплексообразования белка NgoMutL (2 мкМ) с ДНК-дуплексами различной длины (20 нМ), содержащими флуоресцентную метку TAMRA. Комплексы формировали при 0°C в течение 10 мин. Электрофорез в 6%-ном ПААГ в буфере ТБЕ в неденатурирующих условиях.

леотидных остатков, и чем протяженнее ДНК, тем выше эффективность связывания. Отметим, что EcoMutL, напротив, связывает оцДНК более эффективно, чем ДНК-дуплекс той же длины [10]. С другой стороны, TthMutL и эукариотический гомолог MutL – белок PMS2, эффективнее взаимодействуют с дцДНК [38].

Аффинная модификация белка NgoMutL ДНК, содержащими 2-пиридилдитиогруппу

Кристаллическая структура белка MutL в комплексе с ДНК на данный момент не определена. Невыясненным остается также вопрос о локализации ДНК в комплексе с MutL на разных стадиях процесса MMR. Удобным инструментом зондирования контактов белков с ДНК является метод ковалентного связывания этих биомолекул [48–51]. Как упоминалось, сравнение аминокислотных последовательностей белков MutL, способных гидролизовать ДНК, выявило в них пять консервативных мотивов, образующих каталитический центр [17, 25]. В состав двух из этих мотивов (*XIV* и *XV* [17, 25]) входят остатки цистеина. NgoMutL содержит остатки Cys в положениях 171, 251, 528, 604, 635. Три последних остатка Cys расположены в С-концевом домене NgoMutL и два из них (Cys604 и Cys635) входят в состав консервативных мотивов, составляющих каталитический центр белка (мотивы [A/S]**C**K и **C**[P/N]HGRP). Как показано ранее, эти остатки Cys необходимы для функционирования системы MMR. Так, замена даже одного из двух консервативных Cys на Ser или Ala в MutLα, NgoMutL-CTD или TthMutL приводит к “выключению” MMR *in vivo* [21, 52]. Мы поставили задачу методом ковалентного связывания определить, сближены ли остатки Cys эндонуклеазного домена белка NgoMutL с ДНК.

Таблица 2. Кажущиеся константы диссоциации комплексов NgoMutL с ДНК различной длины

Длина ДНК, п.н.	K_d^{app}, мкМ	
	оцДНК	дцДНК
16	–	–
20	–	–
30	–	+
41	1.99 ± 0.02	1.39 ± 0.05
76	1.11 ± 0.01	0.86 ± 0.03

Примечание: – нет связывания, + комплексообразование детектируется, но определение K_d^{app} невозможно.

Для модификации белка NgoMutL с целью его ковалентного связывания с ДНК в качестве реакционноспособной группы выбрана 2-пиридилдитиогруппа, которую вводили путем ацилирования бифункциональными реагентами модифицированного олигонуклеотида, содержащего алифатическую аминогруппу в 5-м положении остатка тимидина [27]. Пиридилдитиогруппа удобна по нескольким причинам: с высокой скоростью вступает в реакцию тиолдисульфидного обмена при физиологических значениях pH; селективно модифицирует сближенные остатки Cys с высоким выходом. Аффинную модификацию остатков Cys различных ДНК-связывающих белков фрагментами ДНК, содержащими пиридилдитиогруппу, мы успешно применяли для изучения механизмов ДНК-белкового взаимодействия [26–32]. В данной работе использованы производные 59-звенного дуплекса **VI**: SPDP-ДНК, PEG_4-SPDP-ДНК, PEG_{12}-SPDP-ДНК (рис. 1), содержащие 2-пиридилдитиогруппу на трех линкерах различной длины (расстояние от гетероциклического основания до атома серы, соединенного с атомом С линкера, составляет 18.6, 31.7 или 50.4 Å), что позволяет примерно оценить расстояние от Cys в белке до ДНК [26]. Ранее мы успешно использовали эти же ДНК для модификации белков MutS и MutL из системы MMR *E. coli* [26, 27]. Установлено, что введение в 5-е положение тимидина дуплекса **VI** 2-пиридилдитиогруппы на указанных на рис. 1 линкерах не влияет на комплексообразование EcoMutL с 59-звенной ДНК [26].

Ковалентное связывание NgoMutL с модифицированными ДНК, содержащими 2-пиридилди-

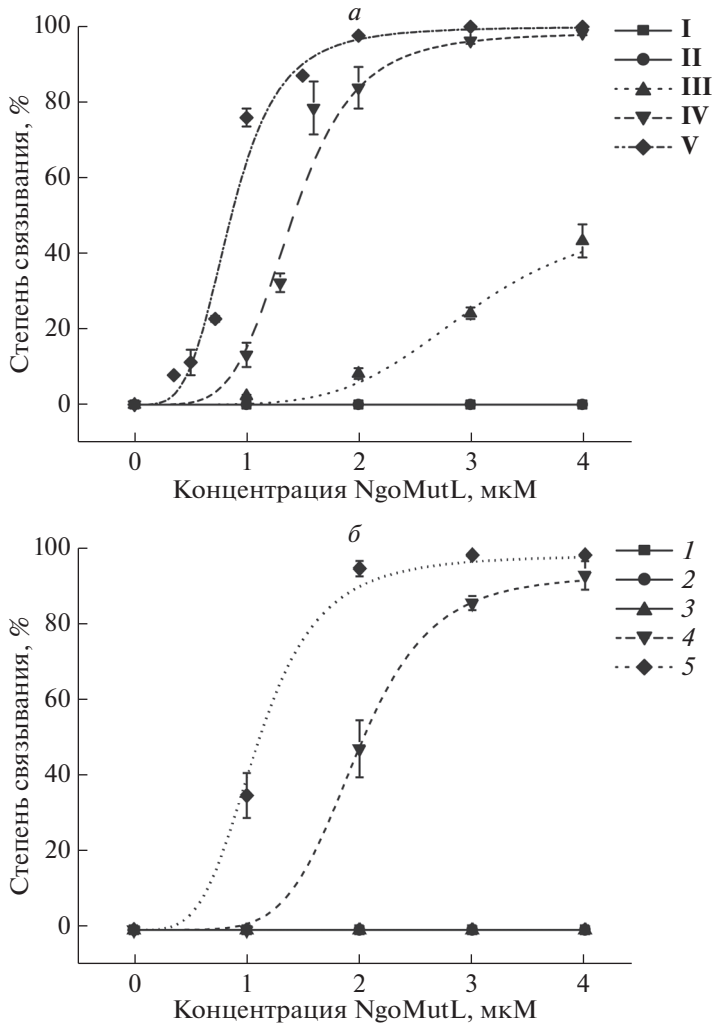


Рис. 4. Зависимость степени комплексообразования NgoMutL с ДНК разной длины (20 нМ) от концентрации белка. Последовательности дцДНК (*а*) и оцДНК (*б*) приведены на рис. 1.

тиогруппу, проводили в буфере B, содержащем кофактор реакции гидролиза ДНК – ионы магния, в течение 15 мин при 0°C согласно методике, предложенной в работе [26]. Гидролиз 59-звенных ДНК-дуплексов в этих условиях не наблюдали (данные не приведены). Продукты реакции анализировали в 8%-ном ПААГ, содержащем SDS (рис. 5). Гели окрашивали раствором бромида этидия, а затем (для визуализации белков) раствором солей серебра. Бромид этидия интеркалирует преимущественно в ДНК, хотя в небольшой степени он связывается и с белками [33]. Для проведения реакции важно отсутствие восстановителей в инкубационной смеси: такие реагенты, как 2-меркаптоэтанол, DTT и др., разрушают связь, образующуюся между белком и ДНК, в конъюгате. Поэтому, кроме мономера NgoMutL, в геле наблюдаются также зоны, соответствующие димеру белка (рис. 5). Реакция между 2-пиридилдисульфидсодержащей ДНК и белком протекает по схеме, представленной на рис. 6. Важно отметить, что ДНК содержит только одну реакционноспособную группу в каждой молекуле, поэтому в димере NgoMutL с ДНК может реагировать только один остаток Cys.

В качестве положительного контроля использовали мутантную форму белка MutL из *E. coli* (EcoMutL(A251C)), содержащую единственный остаток Cys вблизи предполагаемого ДНК-связывающего центра. Остаток Cys251 в EcoMutL(A251C) доступен для модификации ДНК с пиридилдитиогруппой [26]. Полученные результаты представлены на рис. 5. В случае EcoMutL(A251C) в присутствии PEG_{12}-ДНК в геле появлялась дополнительная зона с более высокой молекулярной массой, интенсивно окрашиваемая растворами бромида этидия и солей серебра, что позволяло считать ее продуктом ковалентного связывания EcoMutL(A251C) с ДНК. Образование конъюга-

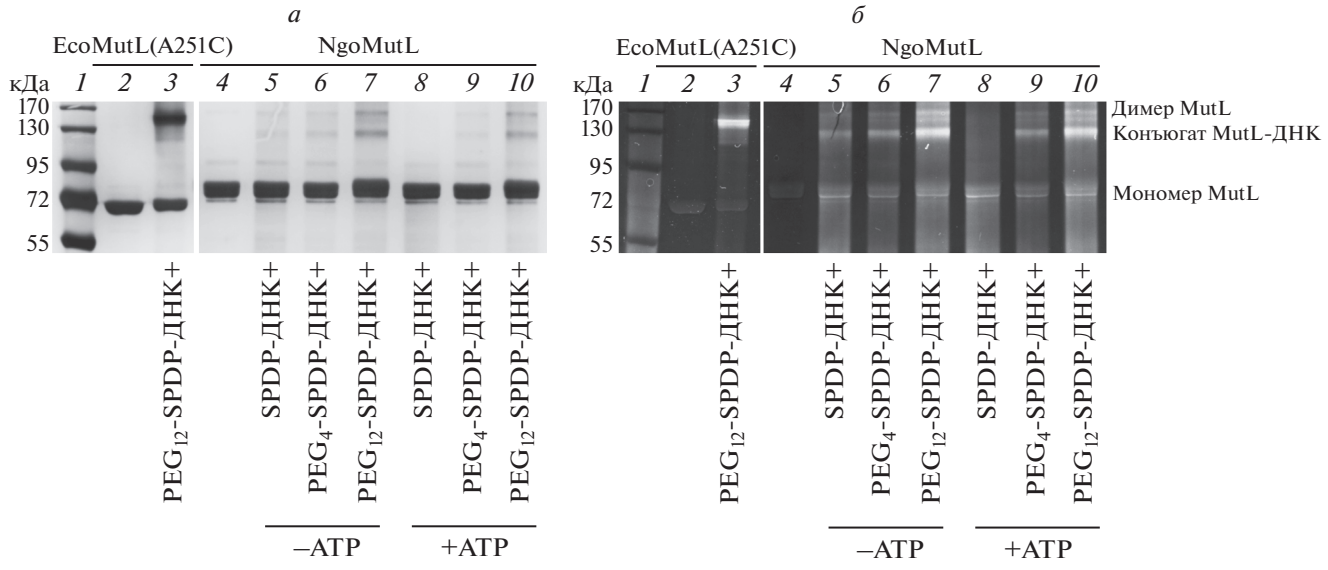


Рис. 5. Анализ продуктов ковалентного связывания EcoMutL(A251C) (4 мкМ) с PEG_{12}-ДНК (1 мкМ, дорожка *3*) и NgoMutL (4 мкМ) с SPDP-ДНК, PEG_4-ДНК, PEG_{12}-ДНК (1 мкМ, дорожки *5*–*10*, дуплексы указаны под дорожками геля). Дорожки *5*–*7* – реакцию NgoMutL с SPDP-ДНК, PEG_4-ДНК или PEG_{12}-ДНК, соответственно, проводили в отсутствие нуклеотидных кофакторов, дорожки *8*–*10* – в присутствии 1 мМ АТР. Условия реакции: 15 мин, 0°С. Приведены фотографии электрофоретического разделения реакционных смесей в 8%-ном SDS-ПААГ. Один и тот же гель окрашивали бромидом этидия (панель *б*) и затем раствором солей серебра (панель *а*). Дорожки *2* и *4* – исходные белки EcoMutL(A251C) и NgoMutL соответственно. Дорожка *1* – маркер молекулярной массы белков, кДа.

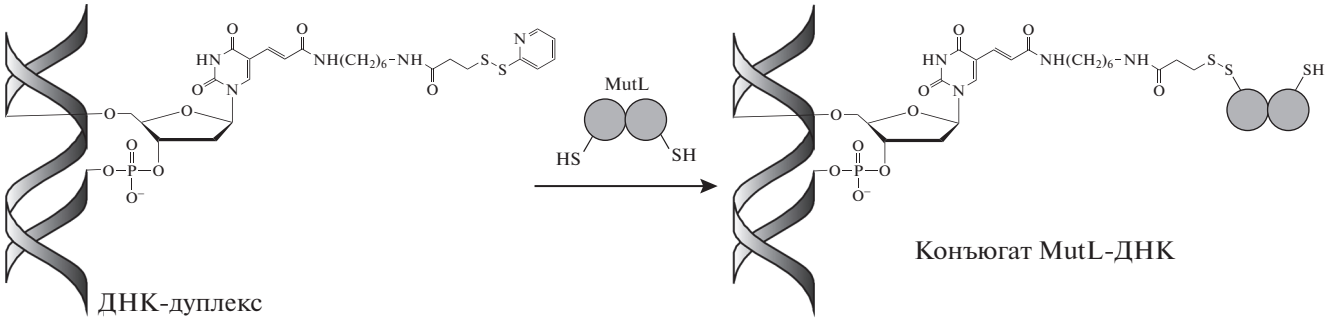


Рис. 6. Схема взаимодействия 2-пиридилдитиогруппы в ДНК с SH-группой остатка Cys гомодимера NgoMutL.

та EcoMutL(A251C)-ДНК свидетельствовало о реакционной способности полученных нами препаратов. Зафиксировано также появление конъюгатов белка NgoMutL с SPDP-ДНК, PEG_4-SPDP-ДНК, PEG_{12}-SPDP-ДНК с молекулярной массой около 130 кДа. Обнаружено, что выход ДНК-белкового конъюгата повышается с увеличением длины линкера между реакционной группой и ДНК. Наибольший выход продукта реакции достигнут при использовании ДНК с линкером PEG_{12}. Таким образом, показано, что остатки Cys белка NgoMutL могут находиться на расстоянии примерно 18–50 Å от ДНК.

Влияние АТР на ковалентное связывание NgoMutL с ДНК

На следующем этапе работы оценили влияние АТР на образование конъюгатов NgoMutL-ДНК. Известно, что связывание АТР с белком MutL приводит к конформационным перестройкам белка и, соответственно, к изменениям его свойств [8, 10]. Так, присутствие АТР в реакционной смеси ингибирует эндонуклеазную активность NgoMutL [22]. В отсутствие АТР MutL находится в “открытой” конформации. В присутствии 1 мМ АТР N-концевые домены белка образуют димер. Такая конформация называется “закрытой” [10]. Мы сравнили

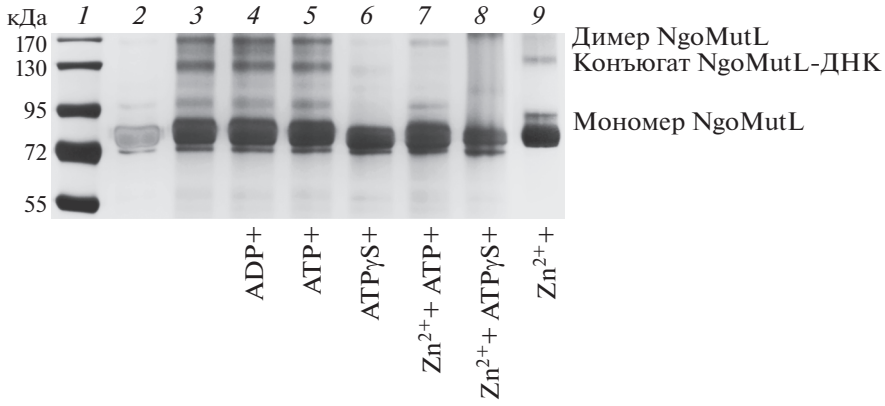


Рис. 7. Анализ продуктов ковалентного связывания NgoMutL (4 мкМ) с PEG_{12}-ДНК (1 мкМ) методом электрофореза в 8%-ном SDS-ПААГ (дорожка *3*). Гель окрашен солями серебра. Дорожка *1* – маркер молекулярной массы белков, кДа; дорожка *2* – исходный белок. Дорожки *4–6* соответствуют реакционным смесям, содержащим, кроме NgoMutL и PEG_{12}-ДНК, один из нуклеотидных кофакторов (1 мМ): ADP, ATP, ATPγS соответственно. Дорожка *9* – анализ продуктов ковалентного связывания NgoMutL с PEG_{12}-ДНК в присутствии 1 мМ $ZnCl_2$; дорожка *7* – в присутствии 1 мМ $ZnCl_2$ и 1 мМ ATP; дорожка *8* – в присутствии 1 мМ $ZnCl_2$ и 1 мМ ATPγS. Условия реакции: 15 мин, 0°C.

результаты ковалентного связывания NgoMutL с 2-пиридилдисульфидсодержащими ДНК в отсутствие и в присутствии 1 мМ ATP. С этой целью белок инкубировали при 0°C с ATP или без него в течение 10 мин, а затем добавляли модифицированные ДНК: SPDP-ДНК, PEG_4-SPDP-ДНК, PEG_{12}-SPDP-ДНК. Как видно из рис. 5, ATP влияет на взаимодействие белка с ДНК: выход конъюгатов NgoMutL с PEG_4-SPDP-ДНК и с PEG_{12}-SPDP-ДНК незначительно снижается, а в случае SPDP-ДНК конъюгат не образуется. В контрольном эксперименте присутствие в реакционной смеси ADP, не вызывающего конформационных перестроек MutL [10], не влияло значимо на образование белково-нуклеинового конъюгата (рис. 7). Ранее мы показали, что эффективность ковалентного связывания остатков Cys, введенных в локализованный в N-концевом домене ДНК-связывающий центр MutL *E. coli*, лишенного эндонуклеазной активности, не зависела от концентрации ATP в реакционной смеси [26]. Исходя из этого, можно предположить, что понижение выходов продуктов реакции между NgoMutL и пиридилдисульфидсодержащими ДНК в присутствии ATP связано с изменением локализации относительно ДНК остатков Cys именно эндонуклеазного домена (увеличение расстояния между ними) в процессе конформационной перестройки белка. Действительно, присутствие ATP (в отличие от ADP) в реакционной смеси снижало эффективность модификации остатков Cys С-концевого эндонуклеазного домена TthMutL гуанидингидрохлоридом. Согласно [21], это свидетельствует о существенных конформационных изменениях белка, вызванных взаимодействием с ATP. Интересно, что в присутствии негидролизуемого аналога ATP – ATPγS, образование конъюгата NgoMutL-PEG_{12}-SPDP-ДНК не наблюдалось. Вероятно, гидролиз ATP необходим для взаимодействия остатков Cys эндонуклеазного домена с ДНК. С другой стороны, ATP и особенно его негидролизуемый аналог аденозин-5'-(β,γ-имидо)трифосфат (AMPPNP) снижают эффективность связывания TthMutL с дцДНК, что также может быть причиной уменьшения выхода ДНК-белковых конъюгатов [21].

Влияние ионов цинка на эндонуклеазную функцию NgoMutL и ковалентное связывание с ДНК

Кристаллические структуры С-концевых доменов, содержащих эндонуклеазный мотив, решены для MutL из нескольких видов бактерий: *A. aeolicus* (PDB-код 5B42), *B. subtilis* (PDB-код 3KDK), *N. gonorrhoeae* (PDB-код 3NCV) [19, 24, 46]. В расшифрованных структурах AaeMutL-CTD и BsuMutL-CTD обнаружены ионы цинка, которые предположительно играют важную роль в организации структуры каталитических центров этих белков [19, 46]. Показано, что BsuMutL-CTD координирует ионы Zn^{2+} в специальном Zn^{2+}-связывающем участке, что приводит к сближению аминокислотных остатков мотивов *XII*, *XIV* и *XV*, которые формируют активный центр белка (рис. 8) [19]. Полагают, что в каталитический центр NgoMutL входят мотивы *XI*, *XII*, *XIV* и *XV*, которые катализируют гидролиз ДНК путем связывания их аминокислотных остатков с ДНК-субстратом и ионами металлов [24]. Из рис. 8 видно, что локализация ключевых аминокислотных остатков этих мотивов, в том числе Cys, в BsuMutL-CTD и NgoMutL-CTD очень похожи. Несмотря на то, что кристалл NgoMutL-CTD не содержит ионов Zn^{2+}, можно полагать, что аминокислот-

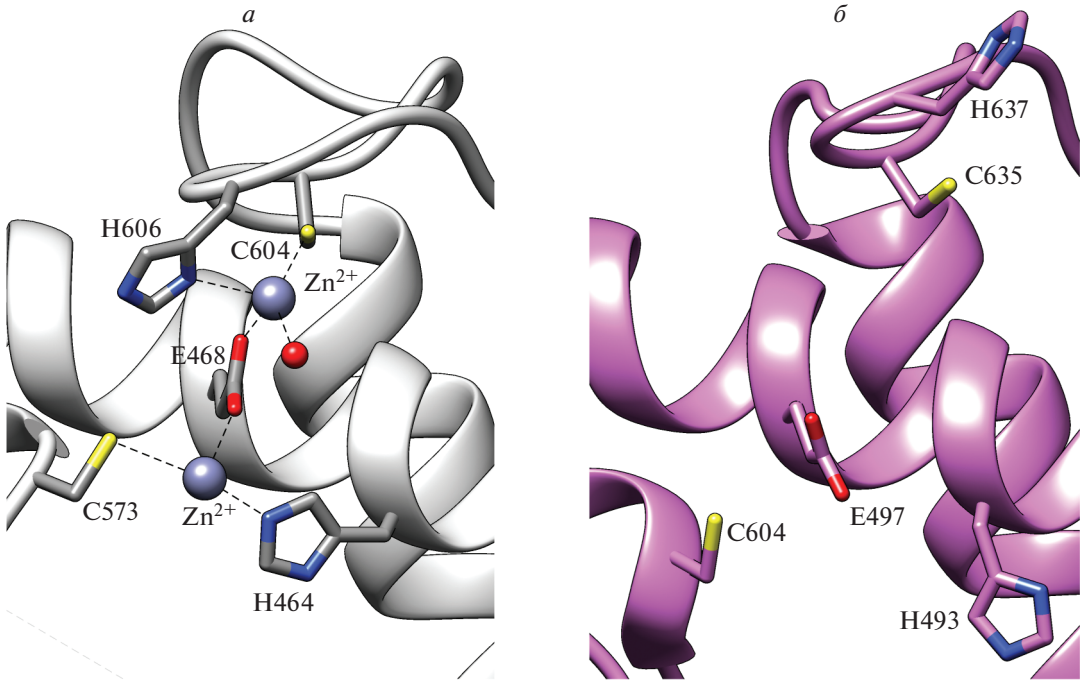


Рис. 8. Структурная организация эндонуклеазного центра белков BsuMutL-CTD (PDB-код 3KDK; панель *а*) и NgoMutL-CTD (PDB-код 3NCV; панель *б*). Приведены номера аминокислотных остатков, участвующих во взаимодействии BsuMutL-CTD (или, предположительно, NgoMutL-CTD) с ионами двухвалентных металлов. Предложено согласно [19, 24].

ные остатки NgoMutL координируют эти ионы сходным с BsuMutL образом.

Сами ионы Zn^{2+} не обеспечивают эндонуклеазную активность NgoMutL-CTD и BsuMutL [19, 24]. Однако в случае BsuMutL присутствие обоих ионов Mn^{2+} и Zn^{2+} приводит к увеличению линейной формы плазмидной ДНК, т.е. к внесению белком двухцепочечного разрыва [19] (табл. 3). По-видимому, это обусловлено влиянием Zn^{2+} на структуру эндонуклеазного домена, что приводит к сближению двух каталитических центров гомодимерной молекулы белка с ДНК. С другой стороны, при добавлении Zn^{2+} в реакционную смесь, содержащую ионы Mn^{2+}, наблюдалось ингибирование эндонуклеазной функции RspMutL [17]. Подобные данные получены и для MutL из *P. aeruginosa* [18]. Интересно, что присутствие ионов Zn^{2+} в реакционной смеси стимулировало эндонуклеазную активность белка MutL *A. aeolicus* [20] (табл. 3). Влияние ионов Zn^{2+} на гидролиз ДНК полноразмерным белком NgoMutL, в том числе в присутствии ионов Mn^{2+}, ранее не изучали.

NgoMutL, как и большинство изученных ранее бактериальных белков MutL, не гидролизо-

Таблица 3. Влияние ионов Zn^{2+} на эндонуклеазную активность белков MutL

Организм	Zn^{2+}, 5 мМ	Zn^{2+} и Mn^{2+}, 5 мМ	Ссылка
*N. gonorrhoeae**	Гидролиз отсутствует	Ингибирование (10–100 мкМ Zn^{2+})	*
R. sphaeroides	То же	Ингибирование (10–100 мкМ Zn^{2+})	[17]
P. aeruginosa	»	Не определяли	[18]
B. subtilis	»	Увеличение линейного продукта гидролиза плазмиды (1 мМ Zn^{2+})	[19]
T. thermophilus	»	Не определяли	[21]
A. aeolicus	»	Увеличение “никованной” формы плазмиды (0.5 мМ Zn^{2+})	[20, 53]

* Результаты получены в данной работе.

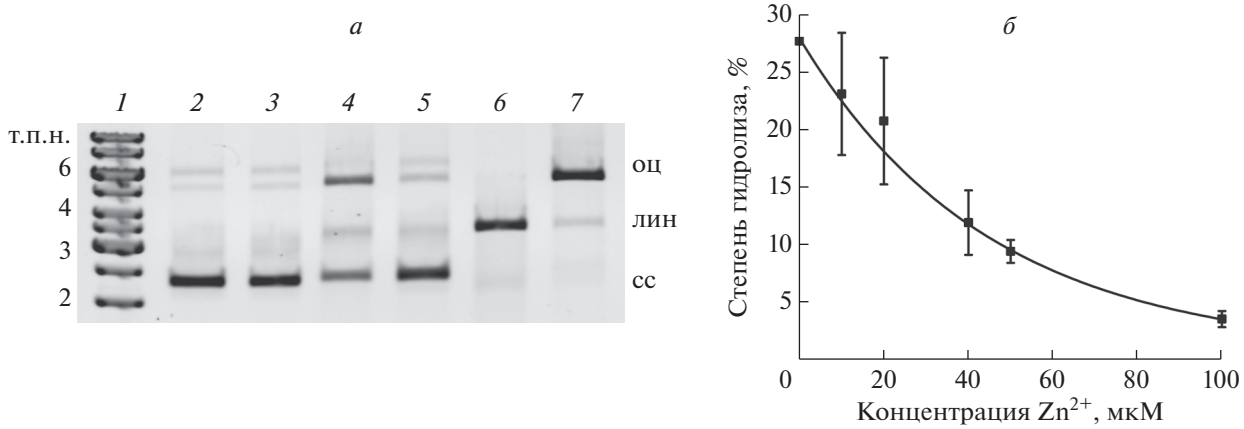


Рис. 9. Гидролиз плазмиды pUC-MMR (10 нМ) белком NgoMutL (500 нМ) при 37°C в течение 60 мин. *а* – Фотография (в инвертированном варианте) 1%-ного агарозного геля, окрашенного бромидом этидия, после электрофореза. Дорожки: *1* – маркер длины ДНК (т.п.н.); *2* – исходная плазмида pUC-MMR; *3* – pUC-MMR и NgoMutL в отсутствие ионов двухвалентных металлов; *4* – гидролиз pUC-MMR белком NgoMutL в присутствии $MnCl_2$ (5 мМ); *5* – гидролиз pUC-MMR белком NgoMutL в присутствии $MnCl_2$ (5 мМ) и $ZnCl_2$ (1 мМ); *6* – гидролиз pUC-MMR эндонуклеазой рестрикции BamHI; *7* – гидролиз pUC-MMR никующей эндонуклеазой Bpu10I. Справа указаны формы кольцевой ДНК: суперскрученная (сс), с разрывом в одной цепи (оц), линейная ДНК (лин). *б* – Зависимость количества образующейся оц-формы при гидролизе плазмиды pUC-MMR (10 нМ) белком NgoMutL в присутствии 5 мМ $MnCl_2$ от концентрации $ZnCl_2$.

вал плазмиду pUC-MMR в присутствии ионов Zn^{2+} (5 мМ). Мы проверили влияние Zn^{2+} на эндонуклеазную функцию NgoMutL в присутствии 5 мМ $MnCl_2$. С увеличением концентрации Zn^{2+} (10–100 мкМ) эффективность образования ДНК с разрывом только в одной из цепей белком NgoMutL значительно уменьшается (рис. 9). В присутствии 100 мкМ $ZnCl_2$ в реакционной смеси наблюдается практически полное ингибирование эндонуклеазной активности NgoMutL. Аналогичное действие ионы Zn^{2+} оказывают на гидролиз белком NgoMutL двух цепей плазмиды pUC-MMR: в присутствии Mn^{2+} наблюдается небольшое (до 10%) увеличение линейной формы ДНК. Однако при повышении концентрации Zn^{2+} линейный продукт полностью исчезает (данные не приведены). Очевидно, что сродство ионов цинка к NgoMutL гораздо выше, чем ионов марганца, и ионы Zn^{2+} эффективно вытесняют ионы Mn^{2+} из металлсвязывающих участков белка.

Полагают, что замена консервативного Cys635 из мотива *XV* на Ser в NgoMutL и связанная с этим инактивация системы MMR в клетках бактерии *N. gonorrhoeae* обусловлена потерей способности NgoMutL координировать ионы Zn^{2+}, что подтверждается также в случае эукариотических аналогов MutL [52]. Очевидно, что если остатки Cys С-концевого домена NgoMutL взаимодействуют с ионами Zn^{2+}, то они должны быть недоступны или менее доступны для модификации ДНК-реагентами в присутствии хлорида цинка. Поэтому интересно было провести реакцию с ДНК в присутствии 1 мМ Zn^{2+}. Перед проведением реакции белок инкубировали с $ZnCl_2$ (5 мин, 4°C), чтобы добиться максимального связывания ионов металла с белком. Показано, что в присутствии 1 мМ $ZnCl_2$ конъюгат NgoMutL с PEG_{12}-SPDP-ДНК образуется с меньшей эффективностью по сравнению с выходом продукта реакции в отсутствие ионов Zn^{2+}. При одновременном добавлении в реакционную смесь ATP и $ZnCl_2$ в концентрации 1 мМ ковалентное связывание между реакционноспособной ДНК и белком практически отсутствует (рис. 7). Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что в модификации NgoMutL 2-пиридилдисульфидсодержащими ДНК участвуют остатки Cys, находящиеся в металлсвязывающих мотивах белка.

Таким образом, нами впервые получены кинетические параметры (K_M, k_{cat}) гидролиза ATP полноразмерным белком MutL *N. gonorrhoeae*, величина которых сопоставима со значениями, определенными в реакции гидролиза ATP белком BsuMutL. Установлено, что для эффективного связывания с NgoMutL длина как дц-, так и оцДНК должна превышать 41 нуклеотидное звено. Использование 59-звенных дуплексов с 2-пиридилдитиогруппой позволило зафиксировать взаимодействие ДНК с остатками Cys, предположительно локализованными в каталитическом центре белка. Ионы цинка, связываясь в этом участке белка, не только ингибируют эндонуклеазную функцию NgoMutL, но и уменьшают выход продукта реакции. Максимальный выход ДНК-белкового конъюгата получен при локализации реакционноспособной группировки на

линкере длиной 50.4 Å, т.е. остатки Cys эндонуклеазного домена в составе ДНК-белкового комплекса находятся на значительном расстоянии от ДНК. В присутствии ATP и особенно его негидролизуемого аналога ATPγS эффективность ковалентного связывания NgoMutL с ДНК снижается. Для понимания механизма действия NgoMutL как компонента системы MMR необходимы дальнейшие исследования.

Авторы благодарят P. Friedhoff (Институт биохимии, университет им. Юстуса Либиха, Германия) за любезно предоставленные плазмидные конструкции с генами мутантных форм белка MutL из *E. coli*. D.N. Rao благодарит Научно-технический совет Департамента науки и технологии правительства Индии (грант J.C. BOSE).

Работа выполнена при финансовой поддержке совместной программы Российского фонда фундаментальных исследований и Департамента науки и технологии правительства Индии (гранты № 17-54-45126 и P-259). Белки выделяли с использованием хроматографической системы ÄKTA Purifier (Программа развития МГУ PNR 5.13).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Errol C.F., Graham C.W., Wolfram S., Richard D.W., Roger A.S., Tom E. (2006) *DNA Repair and Mutagenesis. Second Ed.*, Washington (DC): Am. Soc. Microbiol.
2. Hsieh P., Yamane K. (2008) DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech. Ageing Dev.* **129**, 391–407.
3. Hoeijmakers J.H.J. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. **411**, 366–374.
4. Modrich P. (1991) Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 229–253.
5. Iyer R.R., Pluciennik A., Burdett V., Modrich P.L. (2006) DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem. Rev*. **106**, 302–323.
6. Монахова М.В., Милакина М.А., Трикин Р.М., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. (2020) Особенности функционирования белка MutL из системы репарации “мисматчей” различных организмов. *Биоорг. химия*. **6**, 563–579.
7. Hingorani M.M. (2016) Mismatch binding, ADP–ATP exchange and intramolecular signaling during mismatch repair. *DNA Repair (Amst.)*. **38**, 24–31.
8. Yang W. (2000) Structure and function of mismatch repair proteins. *Mutat. Res. Repair*. **460**, 245–256.
9. Ban C., Yang W. (1998) Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis. *Cell*. **95**, 541–552.
10. Ban C., Junop M., Yang W. (1999) Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis. *Cell*. **97**, 85–97.
11. Sacho E.J., Kadyrov F.A., Modrich P., Kunkel T.A., Erie D.A. (2008) Direct visualization of asymmetric adenine nucleotide-induced conformational changes in MutLα. *Mol. Cell*. **29**, 112–121.
12. Liu J., Hanne J., Britton B.M., Bennett J., Kim D., Lee J.-B., Fishel R. (2016) Cascading MutS and MutL sliding clamps control DNA diffusion to activate mismatch repair. *Nature*. **539**, 583–587.
13. Nishant K.T., Plys A.J., Alani E. (2008) A mutation in the putative MLH3 endonuclease domain confers a defect in both mismatch repair and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae. Genetics*. **179**, 747–755.
14. Snyder L.A.S., Butcher S.A., Saunders N.J. (2001) Comparative whole-genome analyses reveal over 100 putative phase-variable genes in the pathogenic *Neisseria* spp. *Microbiology*. **147**, 2321–2332.
15. Jordan P.W., Snyder L.A.S., Saunders N.J. (2005) Strain-specific differences in *Neisseria gonorrhoeae* associated with the phase variable gene repertoire. *BMC Microbiol.* **5**, 21.
16. Black C.G., Fyfe J.A.M., Davies J.K. (1998) Absence of an SOS-like system in *Neisseria gonorrhoeae. Gene*. **208**, 61–66.
17. Монахова М.В., Пенкина А.И., Павлова А.В., Лящук А.М., Кучеренко В.В., Алексеевский А.В., Лунин В.Г., Фридхофф П., Клуг Г., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. (2018) Характеристика эндонуклеазной функции белка MutL из системы репарации “мисматчей” *Rhodobacter sphaeroides. Биохимия*. **83**, 281–293.
18. Correa E.M.E., Martina M.A., De Tullio L., Argañaraña C.E., Barra J.L. (2011) Some amino acids of the *Pseudomonas aeruginosa* MutL D(Q/M)HA(X)2E(X)4E conserved motif are essential for the *in vivo* function of the protein but not for the *in vitro* endonuclease activity. *DNA Repair (Amst.)*. **10**, 1106–1113.
19. Pillon M.C., Lorenowicz J.J., Uckelmann M., Klocko A.D., Mitchell R.R., Chung Y.S., Modrich P., Walker G.C., Simmons L.A., Friedhoff P., Guarné A. (2010) Structure of the endonuclease domain of MutL: unlicensed to cut. *Mol. Cell*. **39**, 145–151.
20. Iino H., Kim K., Shimada A., Masui R., Kuramitsu S., Fukui K. (2011) Characterization of C- and N-terminal domains of *Aquifex aeolicus* MutL endonuclease: N-terminal domain stimulates the endonuclease activity of C-terminal domain in a zinc-dependent manner. *Biosci. Rep.* **31**, 309–322.
21. Fukui K., Nishida M., Nakagawa N., Masui R., Kuramitsu S. (2008) Bound nucleotide controls the endonuclease activity of mismatch repair enzyme MutL. *J. Biol. Chem.* **283**, 12136–12145.
22. Duppatla V., Bodda C., Urbanke C., Friedhoff P., Rao D.N. (2009) The C-terminal domain is sufficient for endonuclease activity of *Neisseria gonorrhoeae* MutL. *Biochem. J.* **423**, 265–277.
23. Adamczyk-Popławska M., Bandyra K., Kwiatek A. (2018) Activity of Vsr endonucleases encoded by *Neisseria gonorrhoeae* FA 1090 is influenced by MutL and MutS proteins. *BMC Microbiol.* **18**, 95.

24. Namadurai S., Jain D., Kulkarni D.S., Tabib C.R., Friedhoff P., Rao D.N., Nair D.T. (2010) The C-terminal domain of the MutL homolog from *Neisseria gonorrhoeae* forms an inverted homodimer. *PLoS One*. **5**, e13726.

25. Banasik M., Sachadyn P. (2014) Conserved motifs of MutL proteins. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen*. **769**, 69–79.

26. Monakhova M., Ryazanova A., Kunetsky V., Li P., Shilkin E., Kisil O., Rao D.N., Oretskaya T., Friedhoff P., Kubareva E. (2020) Probing the DNA-binding center of the MutL protein from the *Escherichia coli* mismatch repair system via crosslinking and Förster resonance energy transfer. *Biochimie*. **171–172**, 43–54.

27. Monakhova M., Ryazanova A., Hentschel A., Viryasov M., Oretskaya T., Friedhoff P., Kubareva E. (2015) Chromatographic isolation of the functionally active MutS protein covalently linked to deoxyribonucleic acid. *J. Chromatogr. A*. **1389**, 19–27.

28. Heinze R.J., Sekerina S., Winkler I., Biertümpfel C., Oretskaya T.S., Kubareva E., Friedhoff P. (2012) Covalently trapping MutS on DNA to study DNA mismatch recognition and signaling. *Mol. Biosyst.* **8**, 1861.

29. Воробьева О.В., Романенков А.С., Метелев В.Г., Карягина А.С., Лаврова Н.В., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. (2003) Ковалентное связывание Cys142 метилтрансферазы SsoII с ДНК-дуплексами, содержащими фосфорилдисульфидную межнуклеотидную группу. *Молекуляр. биология*. **37**, 906–915.

30. Романенков А.С., Кисиль О.В., Зацепин Т.С., Ямскова О.В., Карягина А.С., Метелев В.Г., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. (2006) ДНК-метилтрансфераза SsoII как бифункциональный белок: особенности взаимодействия с промоторной областью генов системы рестрикции-модификации SsoII. *Биохимия*. **71**, 1648–1658.

31. Metelev V., Romanenkov A., Kubareva E., Zubin E., Polouchine N., Zatsepin T., Molochkov N., Oretskaya T. (2006) Structure-based cross-linking of NF-κB p50 homodimer and decoy bearing a novel 2'-disulfide trapping site. *IUBMB Life*. **58**, 654–658.

32. Абросимова Л.А., Самсонова А.А., Перевязова Т.А., Юнусова А.К., Артюх Р.И., Романова Е.А., Железная Л.А., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. (2020) Роль остатков цистеина во взаимодействии никующей эндонуклеазы BspD6I с ДНК. *Молекуляр. биология*. **54**, 667–679.

33. Vincent A., Scherrer K. (1979) A rapid and sensitive method for detection of proteins in polyacrylamide SDS gels: staining with ethidium bromide. *Mol. Biol. Rep.* **5**, 209–214.

34. Guarné A., Ramon-Maiques S., Wolff E.M., Ghirlando R., Hu X., Miller J.H., Yang W. (2004) Structure of the MutL C-terminal domain: a model of intact MutL and its roles in mismatch repair. *EMBO J.* **23**, 4134–4145.

35. Räschle M., Dufner P., Marra G., Jiricny J. (2002) Mutations within the hMLH1 and hPMS2 subunits of the human MutLα mismatch repair factor affect its ATPase activity, but not its ability to interact with hMutSα. *J. Biol. Chem.* **277**, 21810–21820.

36. Cogan E.B., Birrell G.B., Griffith O.H. (1999) A robotics-based automated assay for inorganic and organic phosphates. *Anal. Biochem.* **271**, 29–35.

37. Rowlands M.G., Newbatt Y.M., Prodromou C., Pearl L.H., Workman P., Aherne W. (2004) High-throughput screening assay for inhibitors of heat-shock protein 90 ATPase activity. *Anal. Biochem.* **327**, 176–183.

38. Guarne A. (2001) Structure and function of the N-terminal 40 kDa fragment of human PMS2: a monomeric GHL ATPase. *EMBO J.* **20**, 5521–5531.

39. Iino H., Hikima T., Nishida Y., Yamamoto M., Kuramitsu S., Fukui K. (2015) Small-angle X-ray scattering analysis reveals the ATP-bound monomeric state of the ATPase domain from the homodimeric MutL endonuclease, a GHKL phosphotransferase superfamily protein. *Extremophiles.* **19**, 643–656.

40. Berger J.M., Wang J.C. (1996) Recent developments in DNA topoisomerase II structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 84–90.

41. Drotschmann K., Hall M.C., Shcherbakova P. V., Wang H., Erie D.A., Brownewell F.R., Kool E.T., Kunkel T.A. (2002) DNA binding properties of the yeast Msh2-Msh6 and Mlh1-Pms1 heterodimers. *Biol. Chem.* **383**, 969–975.

42. Bende S.M., Grafström R.H. (1991) The DNA binding properties of the MutL protein isolated from *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.* **19**, 1549–1555.

43. McCulloch S.D., Gu L., Li G.-M. (2003) Bi-directional processing of DNA loops by mismatch repair-dependent and -independent pathways in human cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 3891–3896.

44. Groothuizen F.S., Winkler I., Cristóvão M., Fish A., Winterwerp H.H., Reumer A., Marx A.D., Hermans N., Nicholls R.A., Murshudov G.N., Lebbink J.H., Friedhoff P., Sixma T.K. (2015) MutS/MutL crystal structure reveals that the MutS sliding clamp loads MutL onto DNA. *Elife.* **4**, e06744.

45. Fukui K., Iino H., Baba S., Kumasaka T., Kuramitsu S., Yano T. (2017) Crystal structure and DNA-binding property of the ATPase domain of bacterial mismatch repair endonuclease MutL from *Aquifex aeolicus*. *Biochim. Biophys. Acta – Proteins Proteomics*. **1865**, 1178–1187.

46. Fukui K., Baba S., Kumasaka T., Yano T. (2016) Structural features and functional dependency on β-clamp define distinct subfamilies of bacterial mismatch repair endonuclease MutL. *J. Biol. Chem.* **291**, 16990–17000.

47. Niedziela-Majka A., Maluf N.K., Antony E., Lohman T.M. (2011) Self-assembly of *Escherichia coli* MutL and its complexes with DNA. *Biochemistry.* **50**, 7868–7880.

48. Qiu H., Wang Y. (2009) Exploring DNA-binding proteins with *in vivo* chemical cross-linking and mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **8**, 1983–1991.

49. Hoffman E.A., Frey B.L., Smith L.M., Auble D.T. (2015) Formaldehyde crosslinking: a tool for the study of chromatin complexes. *J. Biol. Chem.* **290**, 26404–26411.

50. Verdine G.L., Norman D.P.G. (2003) Covalent trapping of protein-DNA complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 337–366.

51. Dolinnaya N., Zubin E., Kubareva E., Zatsepin T., Oretskaya T. (2009) Design and synthesis of 2-functionalised oligonucleotides. Their application for covalent trapping the protein–DNA complexes. *Curr. Org. Chem.* **13**, 1029–1049.
52. Kosinski J., Plotz G., Guarné A., Bujnicki J.M., Friedhoff P. (2008) The PMS2 subunit of human MutLα contains a metal ion binding domain of the iron-dependent repressor protein family. *J. Mol. Biol.* **382**, 610–627.
53. Fukui K., Baba S., Kumasaka T., Yano T. (2018) Multiple zinc ions maintain the open conformation of the catalytic site in the DNA mismatch repair endonuclease MutL from *Aquifex aeolicus*. *FEBS Lett.* **592**, 1611–1619.

PROTEIN MutL FROM *Neisseria gonorrhoeae* MISMATCH REPAIR SYSTEM: INTERACTION WITH ATP AND DNA

M. V. Monakhova[1], *, M. A. Milakina[2], V. Yu. Savitskaia[2], E. A. Romanova[1], Desirazu N. Rao[3], and E. A. Kubareva[1]

[1]Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
[2]Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
[3]Department of Biochemistry, Indian Institute of Science, Bangalore, 560012 India
**e-mail: monakhovamv@gmail.com*

The mismatch repair system (MMR) ensures the stability of the genetic information during DNA replication in almost all organisms. Mismatch repair is initiated after recognition of a non-canonical nucleotide pair by the MutS protein and formation of a complex between MutS and the MutL. In eukaryotes and most bacteria, MutL works as the endonuclease, which introduces a single-strand break in the daughter strand of the DNA, thus activating the repair process. However, many aspects of MutL functioning remain unknown. We have studied the ATPase and DNA-binding functions of MutL from pathogenic bacterium *Neisseria gonorrhoeae* (NgoMutL) which has endonuclease activity. For the first time, the kinetic parameters of ATP hydrolysis have been determined for the full-length NgoMutL protein. Its interactions with single- and double-stranded DNA fragments of various lengths have been studied. We have shown that NgoMutL is able to efficiently form complexes with DNA fragments longer than 40 nucleotides or base pairs. Using modified DNA duplexes harbouring a 2-pyridyldisulfide group on linkers of various lengths, we have obtained NgoMutL conjugates with DNA for the first time. According to the study of this conjugate, the Cys residues of the wild-type protein are located at a distance of approximately 18–50 Å from the duplex. We have shown that the yield of the affinity modification of Cys residues in NgoMutL with DNA decreases in the presence of ATP or its non-hydrolysable analogue, as well as $ZnCl_2$, in the reaction mixture. For the first time, we have suggested that the conserved Cys residues of the C-terminal domain of NgoMutL that are responsible for the coordination of metal ions in the active centre of the protein, are involved in its interaction with DNA. This study could be useful for understanding the main stages of the MMR in prokaryotes, other than γ-proteobacteria, and for the new drug targets search against *N. gonorrhoeae*.

Keywords: mismatch repair system, MutL, DNA-protein interaction, 2-pyridyldithio group, DNA-protein crosslinking, *Neisseria gonorrhoeae*

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 2, с. 305–311

ЭНЗИМОЛОГИЯ СИСТЕМ РЕПАРАЦИИ ДНК

УДК 577.213.6

МАТРИЧНЫЕ СВОЙСТВА 5-МЕТИЛ-2'-ДЕЗОКСИЦИТИДИНА И 5-ГИДРОКСИМЕТИЛ-2'-ДЕЗОКСИЦИТИДИНА В РЕАКЦИЯХ С ТРАНСЛЕЗИОННЫМИ И РЕПАРАТИВНЫМИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗАМИ ЧЕЛОВЕКА

© 2021 г. Е. С. Шилкин[a], Д. В. Петрова[b], В. А. Полтораченко[a], Е. О. Болдинова[a], Д. О. Жарков[b, c, *], А. В. Макарова[a, **]

[a] *Научно-исследовательский центр "Курчатовский институт" – Институт молекулярной генетики, Москва, 123182 Россия*

[b] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия*

[c] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия*

**e-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru*

***e-mail: amakarova-img@yandex.ru*

Поступила в редакцию 30.08.2020 г.
После доработки 18.09.2020 г.
Принята к публикации 24.09.2020 г.

5-Метил-2'-дезоксицитидин (mC) и продукт его регулируемого окисления 5-гидроксиметил-2'-дезоксицитидин (hmC) играют ключевую роль в эпигенетической регуляции экспрессии генов, в клеточной дифференцировке и канцерогенезе. Геномные CpG-сайты, содержащие mC и hmC, представляют собой горячие точки мутагенеза. Основной механизм мутагенеза в CpG-сайтах – спонтанное дезаминирование модифицированных остатков цитозина. Однако дополнительным источником мутаций в районах CpG-сайтов, содержащих повреждения, потенциально могут быть высокоошибочные транслезионные и репаративные ДНК-полимеразы. В настоящей работе проанализирована точность включения нуклеотидов напротив mC и hmC ДНК-полимеразами человека Polβ, Polλ, Polη, Polι, Polκ и праймазой-полимеразой PrimPol *in vitro*. Результаты исследования указывают на высокую точность копирования mC и hmC репаративными ДНК-полимеразами Polβ и Polλ. Polη, Polι, Polκ и PrimPol копировали mC и hmC с меньшей точностью и включали напротив них dAMP и dTMP. Такой же спектр ошибочного включения dNMP наблюдали и в сайтах с немодифицированными остатками цитозина.

Ключевые слова: CpG-сайты, 5-метилцитозин, 5-гидроксиметилцитозин, транслезионный синтез, мутагенез

DOI: 10.31857/S0026898421020130

ВВЕДЕНИЕ

Эпигенетическое метилирование ДНК по положению C5 2'-дезоксицитидина с образованием 5-метил-2'-дезоксицитидина (mC) – один из ключевых механизмов, регулирующих компактизацию хроматина и экспрессию генов высших эукариот [1–3]. Метилированию подвергаются преимущественно динуклеотиды CpG, и 70–80% сайтов CpG в геноме человека содержат mC [4, 5]. В эпигенетической регуляции участвует и продукт регулируемого окисления mC – 5-гидроксиметил-2'-дезоксицитидин (hmC) [6, 7]. mC превращается в hmC под действием диоксигеназ семейства TET [8, 9].

Динуклеотиды CpG представляют собой горячие точки мутагенеза. Основной тип мутаций в CpG-сайтах – транзиции CG → TA, образуются в результате спонтанного дезаминирования mC до T и последующего включения dAMP при репликации [10, 11]. Известно, что эффективность репарации пар TG ниже, чем dUG [10, 11]. Мутации может вызывать также 5-гидроксиметил-2'-дезоксиуридин (hmU), образующийся в результате последовательного окисления mC до hmC и дезаминирования hmC [12].

Сокращения: mC – 5-метил-2'-дезоксицитидин; hmC – 5-гидроксиметил-2'-дезоксицитидин; oxoG – 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозин.

Первичными мутагенными повреждениями в динуклеотидах CpG могут быть не только основания Thy и hmUra, образующиеся в ходе дезаминирования. Присутствие mC может повышать способность комплементарного или соседнего с ним G к окислению [13] и образованию аддуктов с канцерогенами [14, 15], а сам mC под действием ультрафиолетового излучения дает ряд промутагенных продуктов [16–18]. В последние годы накапливаются данные о том, что часть мутаций, образующихся в горячих точках мутагенеза в области CpG-сайтов, возникает в результате работы ДНК-полимераз в ходе нормальной репликации ДНК и не связана с дезаминированием mC [19, 20].

Помимо высокоточных репликативных ДНК-полимераз α, δ и ε (Polα, Polδ, Polε) в клетках человека присутствуют специализированные ДНК-полимеразы. Репаративные полимеразы β, θ, λ и μ (Polβ, Polθ, Polλ, Polμ), принадлежащие к семействам X и A, отвечают за синтез ДНК при эксцизионной репарации нуклеотидов и негомологичном соединении концов ДНК [21]. Транслезионные ДНК-полимеразы η, ι и κ (Polη, Polι, Polκ) семейства Y и ДНК-полимераза ζ (Polζ) семейства B включают нуклеотиды напротив повреждений, предотвращая коллапс движущейся репликативной вилки на поврежденной матрице [22–24]. Праймаза-ДНК-полимераза PrimPol выполняет функцию реинициации синтеза ДНК после поврежденных участков [25]. Точность специализированных ДНК-полимераз при синтезе на неповрежденной ДНК-матрице значительно ниже, чем у репликативных ДНК-полимераз [23, 26].

По частоте возникновения спонтанных повреждений, затрагивающих динуклеотиды CpG, можно выделить дезаминирование C и mC и окисление G с образованием 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозина (oxoG) [27]. Репарация продуктов повреждения в составе пар dUG, dU-oxoG и T-oxoG протекает по пути эксцизионной репарации оснований с вовлечением Polβ или Polλ. Если oxoG не был удален до начала репликации, то для его "прохождения" привлекаются транслезионные ДНК-полимеразы [28]. Таким образом, как mC, так и hmC могут выступать в качестве матричных нуклеотидов для включения dNMP репаративными и транслезионными ДНК-полимеразами. Однако вопрос о точности включения нуклеотидов напротив mC и hmC ДНК-полимеразой человека не исследован. В настоящей работе изучена точность и эффективность включения dNMP напротив mC и hmC панелью репаративных и транслезионных ДНК-полимераз человека – Polβ, Polλ, Polη, Polι, Polκ и PrimPol *in vitro*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

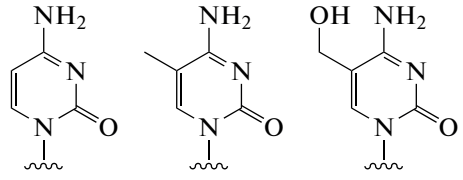
Белки. Polι выделяли из клеток *Saccharomyces cerevisiae* согласно [29]. Polη экспрессировали с использованием плазмиды, полученной в [29], и выделяли из клеток *S. cerevisiae*, аналогично Polζ [30] и Rev1 [31]. PrimPol экспрессировали в клетках *Escherichia coli* и выделяли согласно [32]. Polβ и Polλ, содержащие на N-конце дополнительную последовательность с шестью остатками His, выделяли из клеток *E. coli* методом аффинной хроматографии на Ni-NTA ("Qiagen", Германия) с последующей очисткой на гепарин-сефарозе ("GE Healthcare", США). Препарат Polκ, выделенный из клеток *E. coli*, любезно предоставлен Л.В. Генингом (НИЦ Курчатовский институт – ИМГ).

ДНК-субстраты. Праймер и ДНК-матрицы, содержащие C, mC и hmC, синтезированы в ИХБФМ СО РАН из коммерчески доступных амидофосфитов ("Glen Research", США). Олигонуклеотиды, содержащие модифицированные основания, при гидролизе метилзависимой эндонуклеазой рестрикции GlaI ("Сибэнзим", Россия) давали продукт с ожидаемой электрофоретической подвижностью [33]. Для получения ДНК-субстратов [5'-^{32}P]-меченый праймер гибридизовали с немеченными олигонуклеотидными матрицами в соотношении 1 : 1.1, нагревая раствор до 73°C и медленно охлаждая до 24°C. Последовательности олигонуклеотидов представлены на рис. 1.

Анализ активности ДНК-полимераз. Активность ДНК-полимераз оценивали в реакции удлинения праймера в смеси объемом 20 мкл, содержащей 30 мМ HEPES–KOH (pH 7.0), 8% глицерина, 0.1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 20 нМ ДНК-субстрат, $MgCl_2$, dNTP и ДНК-полимеразы в концентрациях, указанных в табл. 1. Реакции инициировали добавлением dNTP и инкубировали при 37°C в течение времени, указанного в табл. 1. Реакции останавливали, добавляя 20 мкл буфера для нанесения (95% формамида, 10 мМ EDTA и 0.1% бромфенолового синего). Продукты реакции разделяли в денатурирующем 21%-ном полиакриламидном геле с добавлением 7 М мочевины и детектировали с помощью радиолюминесцентного сканера Typhoon 9400 ("GE Healthcare"). Об эффективности включения dNTP судили по проценту удлиненного праймера (PrEx) – соотношению между удлиненными молекулами ДНК (продуктами реакции) и всеми молекулами ДНК в дорожке. Эксперименты повторяли 3–4 раза, рассчитывали стандартные ошибки средних значений. Данные сравнивали с помощью *t*-критерия Стьюдента, различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Анализ включения индивидуальных нуклеотидов в условиях стационарной кинетики. Для измерения эффективности включения индивидуальных dNTP концентрации dNTP в реакционной смеси варьировали от 1 до 1000 мкМ. Реакции проводи-

а



C mC hmC

б 5'-GCTTGTACTTTAGC^{+1}
3'-CGAACATGAAATCGXGTAACTAAGAGTGGTGC
X = C, mC, hmC

Рис. 1. Структура использованного ДНК-субстрата. *а* – Структуры C, mC и hmC. *б* – Нуклеотидная последовательность цепей ДНК-субстрата.

ли при 37°C в течение 4–30 мин (включение dGTP напротив C, mC и hmC – 4 мин, включение dCTP напротив C – 10 мин, включение dCTP напротив mC и hmC – 30 мин). Полученные данные использовали для расчета параметров k_{cat} и K_M в уравнении Михаэлиса–Ментен $k_{obs} = k_{cat} \times [dNTP]/(K_M + [dNTP])$ с помощью нелинейной регрессии в программе GraFit 5 (Erithacus Software, Великобритания), где k_{obs} и k_{cat} – наблюдаемая и максимальная скорости реакции, соответственно, K_M – кажущаяся константа Михаэлиса. Значения параметров K_M и k_{cat} использовали для определения эффективности включения нуклеотида (k_{cat}/K_M) и коэффициента эффективности включения нуклеотида напротив модифицированного C (F_{inc} – отношение k_{cat}/K_M включения dNMP напротив модифицированного C и k_{cat}/K_M включения dNMP напротив C). Эксперименты повторяли 3 раза и рассчитывали ошибку среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали двухцепочечный ДНК-субстрат с выступающим одноцепочечным 5'-участком, в котором C, mC или hmC (рис. 1*а*) находились в положении +1 матричной цепи в нуклеотидном окружении –G(X)G– (рис. 1*б*). Точность включения нуклеотидов напротив mC и hmC оценивали с использованием индивидуальных dNMP в реакциях удлинения праймера. Транслезионные ДНК-полимеразы семейства Y (Polη, Polι и Polκ) показали наименьшую точность копирования неповрежденного матричного C. Хотя все ДНК-полимеразы семейства Y включали напротив C преимущественно комплементарный dGMP (рис. 2*а*, дорожка *3*; рис. 2*б*, дорожка *3*; рис. 2*в*, дорожка *3*), наблюдалось также включение некомплементарных dAMP (рис. 2*а*, дорожка *2*; рис. 2*б* дорожка *2*; рис. 2*в*, дорожка *2*) и dTMP (рис. 2*а*, дорожка *4*; рис. 2*б*, дорожка *4*; рис. 2*в*, дорожка *4*). Polι включала нуклеотидные субстраты напротив C с наименьшей точностью (рис. 2*б*). Полученные результаты согласуются с данными о невысокой точности копирования неповрежденной матрицы ДНК-полимеразами семейства Y [34–36].

Все ДНК-полимеразы семейства Y эффективно включали dNMP напротив C, mC и hmC (рис. 2*а–в*). Спектр включения dNMP напротив mC и hmC не отличался существенно от спектра включения нуклеотидных субстратов напротив C полимеразами Polη и Polκ (рис. 2*а*, *в*). Однако Polι включала dCMP напротив mC и hmC с меньшей эффективностью по сравнению с немодифицированным C (рис. 2*б*). Включение комплементар-

Таблица 1. Условия определения ДНК-полимеразной активности

ДНК-полимераза	$MgCl_2$, мМ	dNTP, мкМ	ДНК-полимераза, нМ	Время реакции, мин
Polη	10	50	5	4
Polκ	10	50	5	2
Polι	1	50	10	8
Polβ	10	50	5	5
Polλ	1	50	100	10
PrimPol	10	200	200	15

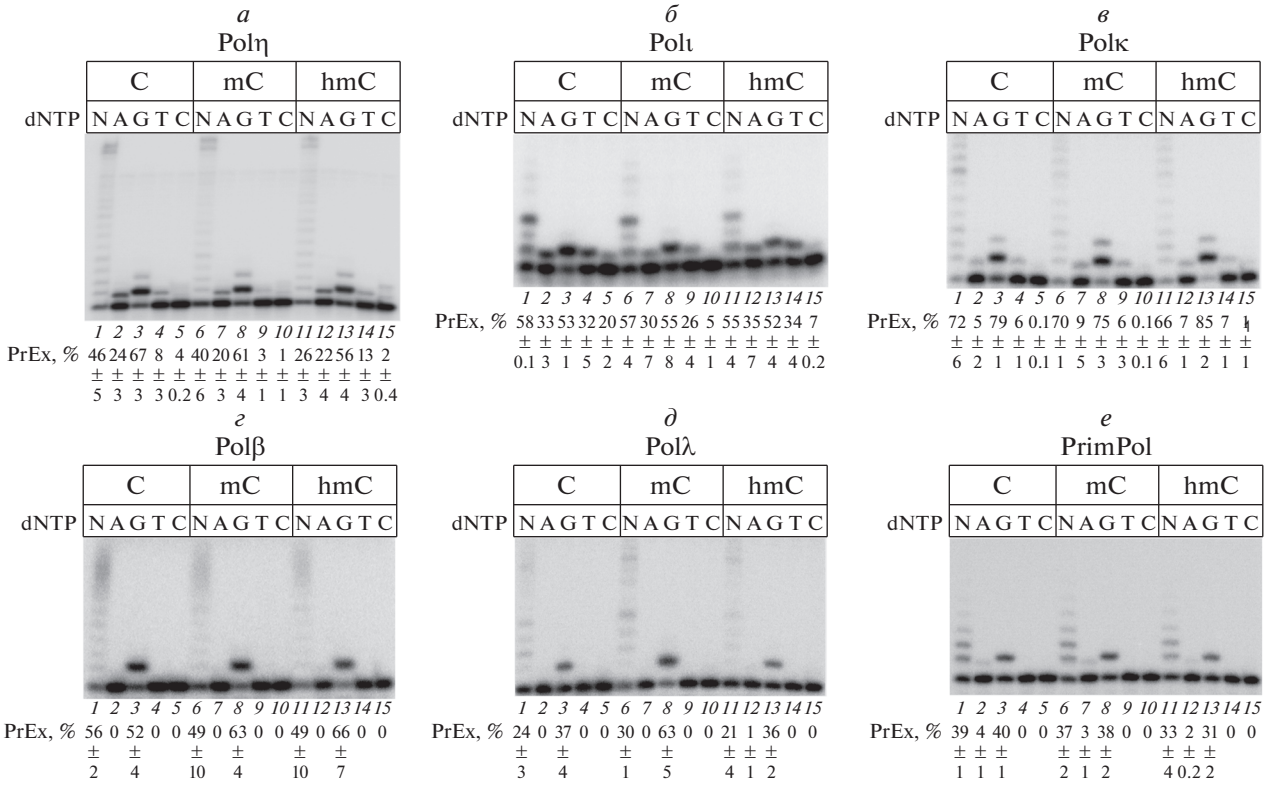


Рис. 2. Включение dNTP ДНК-полимеразами человека: Polη (*а*), Polι (*б*), Polκ (*в*), Polβ (*г*), Polλ (*д*) и праймазой-полимеразой PrimPol (*е*) напротив C, mC и hmC. Показаны значения удлинения праймера (PrEx, %) и стандартные ошибки средних значений.

ного dGMP и некомплементарного dCMP Polι изучено более детально с помощью стационарной кинетики (табл. 2). Оказалось, что Polι включает dCMP напротив mC и hmC в 4–7.1 раза менее эффективно по сравнению с C. Кроме того, Polι в 3.1–5 раз менее эффективно включала напротив mC и hmC комплементарный dGMP (табл. 2). Таким образом, наличие 5-метильной и 5-гидроксиметильной групп в несколько раз снижает активность Polι как при нормальном, так и при мутагенном включении dNMP напротив C.

Репаративные ДНК-полимеразы Polβ и Polλ семейства X включали напротив матричного C только комплементарный dGMP (рис. 2*г*, дорожка *3* и рис. 2*д*, дорожка *3*). Метильная или гидроксиметильная группы в положении 5 пиримидинового кольца не влияли на точность включения нуклеотидных субстратов напротив C (рис. 2*г*, дорожки *6–15* и рис. 2*д*, дорожки *6–15*). Интересно отметить, что Polλ включала dGMP напротив mC (рис. 2*д*, дорожка *8*) примерно в 2 раза эффективнее, чем напротив немодифицированного C ($p = 0.01$) и hmC ($p = 0.0004$) (рис. 2*д*, дорожки *3*

Таблица 2. Включение dGMP и dCMP напротив C, mC и hmC Polι человека

Субстратный dNTP	Матричный нуклеотид	k_{cat}, мин$^{-1}$	K_M, мкМ	k_{cat}/K_M, мкМ$^{-1}$ · мин$^{-1}$	F_{inc}
dGTP	C	0.199 ± 0.035	20.4 ± 2	9.7×10^{-3}	1
	mC	0.188 ± 0.026	95 ± 12.8	2×10^{-3}	0.2
	hmC	0.163 ± 0.027	54.6 ± 6.6	3.1×10^{-3}	0.32
dCTP	C	0.135 ± 0.027	164.6 ± 0.4	8.2×10^{-4}	1
	mC	0.035 ± 0.001	315 ± 58.3	1.1×10^{-4}	0.14
	hmC	0.043 ± 0.011	214.6 ± 74.5	2.1×10^{-4}	0.25

и *13*). Таким образом, репаративные Polβ и Polλ копировали mC и hmC с высокой точностью и эффективностью.

PrimPol включала напротив C преимущественно комплементарный dGMP (рис. 2*e*, дорожка *3*) и небольшое количество некомплементарного dAMP (рис. 2*e*, дорожка *2*). Спектр включения dNMP напротив mC и hmC существенно не отличался от немодифицированного C (рис. 2*e*, дорожки *6*–*15*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ДНК-полимеразы семейств Y и X и праймаза-полимераза PrimPol, участвующие в репарации и репликации поврежденной ДНК, не обладают корректирующей 3' → 5'-экзонуклеазной активностью и копируют неповрежденную ДНК с невысокой точностью [23, 26, 37]. В ходе репарации повреждений в динуклеотидах CpG или репликации таких матриц репаративные и транслезионные ДНК-полимеразы могут встретить в матрице mC и hmC. Ошибки при копировании mC и hmC могут быть одним из источников мутагенеза, ассоциированного с CpG. Действительно, некоторые недавние исследования указывают на участие ДНК-полимераз (в частности, репликативной Polε и транслезионной Polη) в мутагенезе по динуклеотидам CpG независимо от дезаминирования mC [19, 38–41].

Нами впервые оценена точность и эффективность включения dNTP напротив mC и hmC шестью специализированными ДНК-полимеразами человека. Показано, что репаративные ДНК-полимеразы семейства X копируют mC и hmC с высокой точностью. Polλ включала комплементарный dGMP напротив mC даже более эффективно, чем напротив немодифицированного C.

Транслезионные ДНК-полимеразы семейства Y и PrimPol включали нуклеотидные субстраты с меньшей точностью. В мутационном спектре динуклеотидов CpG доминируют транзиции CG → → TA [42, 43]. Все ДНК-полимеразы семейства Y и PrimPol включали напротив mC и hmC некомплементарный dATP, что может быть причиной таких мутаций. Эффективность включения dATP напротив mC и hmC убывала в ряду Polι > Polη > > Polκ ~ PrimPol. Однако общий спектр включения dNTP напротив mC и hmC существенно не отличался от немодифицированного C.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что, по крайней мере в отсутствие дезаминирования матричного C или его производных mC и hmC, репаративные ДНК-полимеразы не вносят заметного вклада в мутагенез по CpG-сайтам. Транслезионные ДНК-полимеразы Polη, Polι и Polκ и праймаза-полимераза PrimPol могут быть источником мутаций в CpG-сайтах. В клетке такая ситуация может возникать при прохождении репликативной вилкой остатка oxoG в контексте CpG с привлечением транслезионных ДНК-полимераз [28]. Оценки встречаемости динуклеотида CpG [4, 5] и частоты oxoG в геноме человека [44, 45] позволяют утверждать, что каждая клетка содержит около 100 Cp(oxoG)-сайтов. Поскольку включение некомплементарных dNMP полимеразами семейства Y оказалось сопоставимым для C, mC и hmC, их промутагенное действие должно быть независимым от статуса метилирования ДНК.

Следует отметить, что нами изучены ДНК-матрицы, содержащие C, mC или hmC только в одном нуклеотидном контексте – GCG. Возможно, в других контекстах или в случае повреждений точность и эффективность включения dNMP ДНК-полимеразами может отличаться. Например, спектры соматических мутаций в некоторых опухолях указывают на возможную роль Polη в мутагенезе по остаткам C в контексте YCG (где Y – пиримидин, но чаще T), которая не зависит от дезаминирования цитозина [39]. Таким образом, для установления механизмов мутагенеза в динуклеотидах CpG перспективным представляется изучение точности транслезионных полимераз при копировании эпигенетически модифицированных оснований ДНК в расширенном наборе нуклеотидных контекстов.

Авторы выражают благодарность Л.В. Генингу (ИМГ) за предоставление Polκ, О.И. Лаврик (ИХБФМ СО РАН) за экспрессионный вектор Polλ и К.А. Бондаренко за помощь в выделении Polη.

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№ 17-00-00264-комфи (АВМ) и № 17-00-00261-комфи (ДОЖ)). Тестирование активности PrimPol поддержано Российским научным фондом (№ 18-14-00354 (АВМ)).

Работа не содержит исследований с использованием животных или биологических материалов, полученных от людей, в качестве объектов.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weber M., Schübeler D. (2007) Genomic patterns of DNA methylation: Targets and function of an epigenetic mark. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 273–280.
2. Law J.A., Jacobsen S.E. (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 204–220.
3. Szulwach K.E., Jin P. (2014) Integrating DNA methylation dynamics into a framework for understanding epigenetic codes. *Bioessays.* **36**, 107–117.
4. Jabbari K., Bernardi G. (2004) Cytosine methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA frequencies. *Gene.* **333**, 143–149.

5. Stevens M., Cheng J.B., Li D., Xie M., Hong C., Maire C.L., Ligon K.L., Hirst M., Marra M.A., Costello J.F., Wang T. (2013) Estimating absolute methylation levels at single-CpG resolution from methylation enrichment and restriction enzyme sequencing methods. *Genome Res.* **23**, 1541–1553.
6. Branco M.R., Ficz G., Reik W. (2011) Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 7–13.
7. Shen L., Zhang Y. (2013) 5-Hydroxymethylcytosine: generation, fate, and genomic distribution. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 289–296.
8. Lu X., Zhao B.S., He C. (2015) TET family proteins: oxidation activity, interacting molecules, and functions in diseases. *Chem. Rev.* **115**, 2225–2239.
9. Wu X., Zhang Y. (2017) TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 517–534.
10. Waters T.R., Swann P.F. (2000) Thymine-DNA glycosylase and G to A transition mutations at CpG sites. *Mutat. Res.* **462**, 137–147.
11. Pfeifer G.P. (2006) Mutagenesis at methylated CpG sequences. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **301**, 259–281.
12. Olinski R., Starczak M., Gackowski D. (2016) Enigmatic 5-hydroxymethyluracil: oxidatively modified base, epigenetic mark or both? *Mutat. Res.* **767**, 59–66.
13. Kawai K., Wata Y., Hara M., Tojo S., Majima T. (2002) Regulation of one-electron oxidation rate of guanine by base pairing with cytosine derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 3586–3590.
14. Denissenko M.F., Pao A., Tang M.-S., Pfeifer G.P. (1996) Preferential formation of benzo[*a*]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in *P53*. *Science.* **274**, 430–432.
15. Hu W., Feng Z., Tang M.-S. (2003) Preferential carcinogen-DNA adduct formation at codons 12 and 14 in the human *K-ras* gene and their possible mechanisms. *Biochemistry.* **42**, 10012–10023.
16. Vairapandi M., Duker H.J. (1994) Excision of ultraviolet-induced photoproducts of 5-methylcytosine from DNA. *Mutat. Res.* **315**, 85–94.
17. You Y.-H., Li C., Pfeifer G.P. (1999) Involvement of 5-methylcytosine in sunlight-induced mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **293**, 493–503.
18. Lee D.-H., Pfeifer G.P. (2003) Deamination of 5-methylcytosines within cyclobutane pyrimidine dimers is an important component of UVB mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 10314–10321.
19. Tomkova M., McClellan M., Kriaucionis S., Schuster-Böckler B. (2018) DNA replication and associated repair pathways are involved in the mutagenesis of methylated cytosine. *DNA Repair.* **62**, 1–7.
20. Tomkova M., Schuster-Böckler B. (2018) DNA modifications: naturally more error prone? *Trends Genet.* **34**, 627–638.
21. Yamtich J., Sweasy J.B. (2010) DNA polymerase family X: function, structure, and cellular roles. *Biochim. Biophys. Acta.* **1804**, 1136–1150.
22. Pata J.D. (2010) Structural diversity of the Y-family DNA polymerases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1804**, 1124–1135.
23. Yang W. (2014) An overview of Y-family DNA polymerases and a case study of human DNA polymerase η. *Biochemistry.* **53**, 2793–2803.
24. Makarova A.V., Burgers P.M. (2015) Eukaryotic DNA polymerase ζ. *DNA Repair.* **29**, 47–55.
25. García-Gómez S., Reyes A., Martínez-Jiménez M.I., Chocrón E.S., Mourón S., Terrados G., Powell C., Salido E., Méndez J., Holt I.J., Blanco L. (2013) PrimPol, an archaic primase/polymerase operating in human cells. *Mol. Cell.* **52**, 541–553.
26. Белоусова Е.А., Лаврик О.И. (2010) ДНК-полимеразы β и λ и их роль в репликации и репарации ДНК. *Молекуляр. биология.* **44**, 947–965.
27. Lindahl T., Barnes D.E. (2000) Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **65**, 127–133.
28. Maga G., Villani G., Crespan E., Wimmer U., Ferrari E., Bertocci B., Hübscher U. (2007) 8-oxo-guanine bypass by human DNA polymerases in the presence of auxiliary proteins. *Nature.* **447**, 606–608.
29. Makarova A.V., Grabow C., Gening L.V., Tarantul V.Z., Tahirov T.H., Bessho T., Pavlov Y.I. (2011) Inaccurate DNA synthesis in cell extracts of yeast producing active human DNA polymerase iota. *PLoS One.* **6**, e16612.
30. Makarova A.V., Stodola J.L., Burgers P.M. (2012) A four-subunit DNA polymerase ζ complex containing Polδ accessory subunits is essential for PCNA-mediated mutagenesis. *Nucl. Acids Res.* **40**, 11618–11626.
31. Makarova A.V., Nick McElhinny S.A., Watts B.E., Kunkel T.A., Burgers P.M. (2014) Ribonucleotide incorporation by yeast DNA polymerase ζ. *DNA Repair.* **18**, 63–67.
32. Boldinova E.O., Stojkovič G., Khairullin R., Wanrooij S., Makarova A.V. (2017) Optimization of the expression, purification and polymerase activity reaction conditions of recombinant human PrimPol. *PLoS One.* **12**, e0184489.
33. Petrova D.V., Naumenko M.B., Khantakova D.V., Grin I.R., Zharkov D.O. (2019) Relative efficiency of recognition of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine by methyl-dependent DNA endonuclease GlaI. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **45**, 625–629.
34. Johnson R.E., Washington M.T., Prakash S., Prakash L. (2000) Fidelity of human DNA polymerase η. *J. Biol. Chem.* **275**, 7447–7450.
35. Zhang Y., Yuan F., Wu X., Wang Z. (2000) Preferential incorporation of G opposite template T by the low-fidelity human DNA polymerase ι. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7099–7108.
36. Zhang Y., Yuan F., Xin H., Wu X., Rajpal D.K., Yang D., Wang Z. (2000) Human DNA polymerase κ synthesizes DNA with extraordinarily low fidelity. *Nucl. Acids Res.* **28**, 4147–4156.
37. Boldinova E.O., Wanrooij P.H., Shilkin E.S., Wanrooij S., Makarova A.V. (2017) DNA damage tolerance by eukaryotic DNA polymerase and primase PrimPol. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1584.
38. Poulos R.C., Olivier J., Wong J.W.H. (2017) The interaction between cytosine methylation and processes of DNA replication and repair shape the mutational landscape of cancer genomes. *Nucl. Acids Res.* **45**, 7786–7795.

39. Rogozin I.B., Goncearenco A., Lada A.G., De S., Yurchenko V., Nudelman G., Panchenko A.R., Cooper D.N., Pavlov Y.I. (2018) DNA polymerase η mutational signatures are found in a variety of different types of cancer. *Cell Cycle.* **17**, 348–355.
40. Tomkova M., Tomek J., Kriaucionis S., Schuster-Böckler B. (2018) Mutational signature distribution varies with DNA replication timing and strand asymmetry. *Genome Biol.* **19**, 129.
41. Fang H., Barbour J.A., Poulos R.C., Katainen R., Aaltonen L.A., Wong J.W.H. (2020) Mutational processes of distinct POLE exonuclease domain mutants drive an enrichment of a specific TP53 mutation in colorectal cancer. *PLoS Genet.* **16**, e1008572.
42. Alexandrov L.B., Nik-Zainal S., Wedge D.C., Aparicio S.A.J.R., Behjati S., Biankin A.V., Bignell G.R., Bolli N., Borg A., Børresen-Dale A.-L., Boyault S., Burkhardt B., Butler A.P., Caldas C., Davies H.R., Desmedt C., Eils R., Eyfjörd J.E., Foekens J.A., Greaves M., Hosoda F., Hutter B., Ilicic T., Imbeaud S., Imielinski M., Jäger N., Jones D.T.W., Jones D., Knappskog S., Kool M., Lakhani S.R., López-Otín C., Martin S., Munshi N.C., Nakamura H., Northcott P.A., Pajic M., Papaemmanuil E., Paradiso A., Pearson J.V., Puente X.S., Raine K., Ramakrishna M., Richardson A.L., Richter J., Rosenstiel P., Schlesner M., Schumacher T.N., Span P.N., Teague J.W., Totoki Y., Tutt A.N.J., Valdés-Mas R., van Buuren M.M., van 't Veer L., Vincent-Salomon A., Waddell N., Yates L.R., Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, ICGC Breast Cancer Consortium, ICGC MMML-Seq Consortium, ICGC PedBrain, Zucman-Rossi J., Futreal P.A., McDermott U., Lichter P., Meyerson M., Grimmond S.M., Siebert R., Campo E., Shibata T., Pfister S.M., Campbell P.J., Stratton M.R. (2013) Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature.* **500**, 415–421.
43. Alsøe L., Sarno A., Carracedo S., Domanska D., Dingler F., Lirussi L., SenGupta T., Tekin N.B., Jobert L., Alexandrov L.B., Galashevskaya A., Rada C., Sandve G.K., Rognes T., Krokan H.E., Nilsen H. (2017) Uracil accumulation and mutagenesis dominated by cytosine deamination in CpG dinucleotides in mice lacking UNG and SMUG1. *Sci. Rep.* **7**, 7199.
44. ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage) (2002) Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus. *Carcinogenesis.* **23**, 2129–2133.
45. ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage), Gedik C.M., Collins A. (2005) Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *FASEB J.* **19**, 82–84.

TEMPLATE PROPERTIES OF 5-METHYL-2'-DEOXYCYTIDINE AND 5-HYDROXYMETHYL-2'-DEOXYCYTIDINE IN REACTIONS WITH HUMAN REPARATIVE AND TRANSLESION DNA POLYMERASES

E. S. Shilkin[1], D. V. Petrova[2], V. A. Poltorachenko[1], E. O. Boldinova[1], D. O. Zharkov[2, 3, *], and A. V. Makarova[1, **]

[1]National Research Center "Kurchatov Institute" – Institute of Molecular Genetics, Moscow, 123182 Russia
[2]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia
[3]Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia
**e-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru*
***e-mail: amakarova-img@yandex.ru*

5-Methyl-2'-deoxycytidine (mC) and the product of its controlled oxidation, 5-hydroxymethyl-2'-cytidine (hmC), play a key role in the epigenetic regulation of gene expression, the cell differentiation, and the carcinogenesis. Due to spontaneious deamination, genomic CpG sites containing mC and hmC serve as mutagenesis hotspots. In addition, error-prone translesion and reparative DNA polymerases may serve as additional source of mutations in the lesion-containing regions with CpG sites. In the present work, we performed *in vitro* analysis of the accuracy of nucleotide incorporation opposite to mC and hmC by human DNA polymerases Polβ, Polλ, Polη, Polι, Polκ and primase polymerase PrimPol. The results of the study show a high accuracy of copying mC and hmC by the reparative DNA polymerases Polβ and Polλ, while Polη, Polι, Polκ, and PrimPol copied mC and hmC with less accuracy evident by incorporation of dAMP and dTMP. The same spectrum of error-prone dNMP incorporation was also noted at sites with unmodified cytosines.

Keywords: CpG sites, 5-methylcytosine, 5-hydroxymethylcytosine, translesion DNA synthesis, mutagenesis

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 2, с. 312–317

СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ И ТРАНСКРИПЦИИ В РАЗВИТИИ МЕТОДОВ ОНКОТЕРАПИИ И ЛЕЧЕНИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

УДК 577.29

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ КОМБИНАЦИИ ТОПОТЕКАНА И ИНГИБИТОРА ТИРОЗИЛ-ДНК-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 1 НА МОДЕЛИ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ КРЕБС-2 МЫШИ

© 2021 г. Н. С. Дырхеева[a], А. Л. Захаренко[a], Е. С. Новоселова[a], А. А. Чепанова[a, b], Н. А. Попова[b, c], В. П. Николин[c], О. А. Лузина[d], Н. Ф. Салахутдинов[d], Е. И. Рябчикова[a, b], О. И. Лаврик[a, b, *]

[a] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия*

[b] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия*

[c] *Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия*

[d] *Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия*

**e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru*

Поступила в редакцию 31.08.2020 г.
После доработки 08.09.2020 г.
Принята к публикации 08.09.2020 г.

Топотекан – цитостатический препарат из группы камптотецинов, действующий как ингибитор активности топоизомеразы 1 (TOP1). Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1) – фермент репарации, удаляющий заместители с 3'-конца ДНК. TDP1 препятствует действию ингибиторов TOP1, снижая их терапевтическую эффективность, поэтому подавление активности TDP1 может усилить эффект топотекана. Нами изучено действие как самого противоопухолевого препарата топотекан, так и его комбинации с ингибитором TDP1 (гидразинотиазольным производным усниновой кислоты) на асцитную опухоль мышей Кребс-2. Ранее мы установили, что это производное усниновой кислоты является эффективным ингибитором TDP1. В настоящей работе показано, что внутрибрюшинное введение как топотекана, так и ингибитора TDP1 по отдельности оказывает противоопухолевое действие, которое оценивали по весу асцитной опухоли и по количеству клеток в асцитической жидкости. Совместное введение топотекана и исследуемого ингибитора TDP1 аддитивно снижало оба показателя. Также показано, что комбинированное введение этих двух препаратов приводит к развитию деструктивных процессов в опухоли, выражающихся в появлении клеток, в которых липидные капли занимали почти всю цитоплазму, повышенном накоплении клеточного детрита, отсутствовавшего в образцах, полученных от мышей, которым препараты вводили по отдельности.

Ключевые слова: тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1, ингибитор TDP1, карцинома Кребс-2, топотекан, топоизомераза 1

DOI: 10.31857/S0026898421020051

ВВЕДЕНИЕ

Противоопухолевое действие многих химиотерапевтических агентов и радиотерапии напрямую связано с их способностью вызывать повреждения ДНК. Однако влияние этих агентов нивелируется способностью раковых клеток репарировать индуцированные повреждения ДНК, что приводит к снижению эффективности терапии и развитию лекарственной резистентности. Поэтому поиск новых соединений, подавляющих активность ферментов репарации ДНК, можно рассматривать в качестве стратегии для потенцирования цитотоксичности уже применяемых лекарственных препаратов, которые действуют как повреждающие ДНК агенты. Топотекан – полусинтетический водорастворимый аналог камптотецина, ингибирующий топоизомеразу 1 (TOP1). TOP1 регулирует степень локального скручивания спирали ДНК, в ходе реакции образуется ковалентный комплекс ДНК–TOP1 [1]. На сегодняшний день ингибиторы TOP1 – аналоги камптотецина, топотекан и иринотекан [1, 2], применяют при широком спектре опухолей: при раке легкого, толстой кишки, шейки матки, яичников и др. Действие камптотецинов приводит к стабилизации ковалентного комплекса TOP1–ДНК на ДНК, что предотвраща-

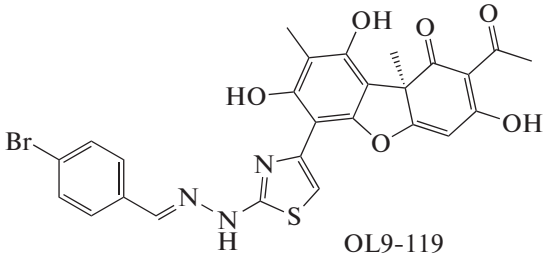


Рис. 1. Химическая структура ингибитора TDP1 (лабораторный код OL9-119 [14]).

ет восстановление цепи ДНК. Таким образом в ДНК сохраняются повреждения в виде ковалентных аддуктов и одноцепочечных разрывов, что в конечном итоге приводит к остановке клеточного цикла и гибели клетки [1]. Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1) катализирует удаление с 3'-конца ДНК ковалентно присоединенного пептида – остатка ковалентного аддукта TOP1, возникающего в процессе протеасомной деградации [3–5], нивелируя таким образом эффект ингибиторов TOP1. Подавление активности TDP1 может усиливать действие ингибиторов TOP1, например топотекана. Таким образом, совместное использование ингибиторов TDP1 и TOP1 может заметно повысить эффективность химиотерапии [3, 6, 7].

Известные ингибиторы TDP1 действуют в диапазоне 0.01–100 мкМ [6–12]. Проведенные нами комплексные исследования в системах *in vitro* и *in vivo* позволили найти целый ряд эффективных ингибиторов TDP1, которые способны усилить противоопухолевый эффект химиотерапевтических препаратов [6]. Среди широкого спектра известных ингибиторов TDP1 – синтетических аналогов природных веществ, одними из наиболее перспективных считаются производные усниновой кислоты [6, 9, 10, 13]. Усниновая кислота – широко распространенное и доступное природное соединение, вторичный метаболит лишайников. Ее синтетические аналоги могут быть получены путем направленных химических модификаций в фенольном или трикетоновом фрагментах [12, 13]. Нами показан синергический эффект различных производных усниновой кислоты с камптотецином или топотеканом на клеточных линиях *in vitro*, а также с топотеканом *in vivo* [9, 10, 14–17]. Гидразинотиазольное производное усниновой кислоты 20d [14] (лабораторный код OL9-119, рис. 1) является эффективным ингибитором TDP1 с IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) 26 нМ. Это соединение усиливало действие топотекана как *in vitro*, так и *in vivo*, а также противоопухолевый и антиметастатический эффект топотекана на модели карциномы легкого Льюис [14]. В настоящей работе изучено действие одного топотекана и топотекана в комбинации с ингибитором TDP1 OL9-119 на развитие асцитной опухоли Кребс-2 у мышей. Согласно полученным данным, и топотекан, и ингибитор TDP1 OL9-119 обладали противоопухолевым действием, а их комбинация аддитивно повышала противоопухолевую активность и приводила к развитию деструктивных процессов в опухоли. Таким образом, гидразинотиазольное производное усниновой кислоты – ингибитор TDP1, можно считать перспективным для разработки комбинированной противоопухолевой терапии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. В работе использованы следующие соединения: топотекан (“USP”, США), ингибитор TDP1 (лабораторный код OL9-119), синтезированный в Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН (Новосибирск, Россия) согласно [14], а также органические растворители и другие реактивы отечественного производства квалификации х.ч. и ч.д.а.

Лабораторные животные и модельная опухоль. В исследовании использовали мышей линии C57BL/6 3–4-месячного возраста из вивария конвенциональных животных Института цитологии и генетики СО РАН. Животных (35 особей) содержали на подстилке из опилок в пластиковых клетках (по семь мышей в каждой) со свободным доступом к корму (“Лабораторкорм”, Москва, Россия) и воде. Все эксперименты проведены в соответствии с протоколами, одобренными межинститутской комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН и директивой 2010/63/EU.

Экспериментальной моделью служила опухоль Кребс-2, которую мышам прививали внутрибрюшинно (по 0.2 млн. клеток). Экспериментальные группы мышей (пять групп) формировали случайным образом. Группа 1 – контрольная – мышам этой группы однократно внутрибрюшинно вводили опухолевые клетки, но химиотерапию не проводили. Группа 2 (контроль действия растворителя) – мышам двукратно (через 2 и 4 дня после прививки опухоли) внутрибрюшинно вводили 15% ДМСО (“Sigma”, США) и 10% Твин-80 (“Panreac AppliChem”, Германия). Группа 3 – топотекан в разовой дозе 2 мг/кг. Группа 4 – мыши этой группы получали ингибитор TDP1 в разовой дозе 100 мг/кг в виде суспензии в ДМСО/Твин-80 в воде (0.2 мл суспензии на мышь). Группа 5 – мышам вводили одновременно топотекан и ингибитор TDP1.

Действие препаратов на опухоль оценивали в конце эксперимента на 10-й день по весу асцитной опухоли (разница в весе мыши до и после удаления опухоли), а также по числу опухолевых клеток в асците, определенному с помощью счетчика клеток (“Logos Biosystems”, Южная Корея). Для приготовления препаратов для микроскопи-

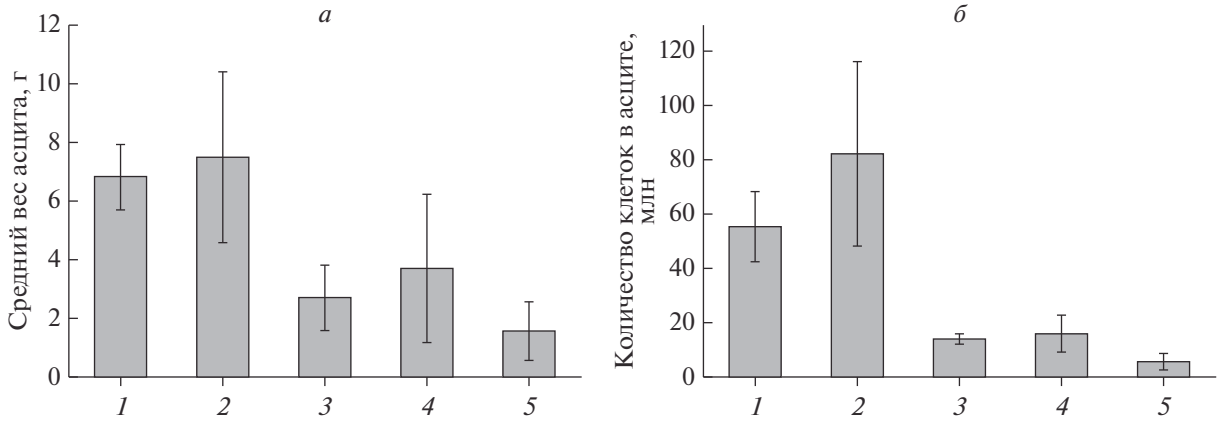


Рис. 2. Средний вес асцитной опухоли (разница в весе мыши с опухолью в брюшной полости и после удаления опухоли) (*а*), и количество опухолевых клеток в асците (*б*). *1* – Контрольная группа. *2–5* – Группы мышей, которым вводили ДМСО, топотекан ингибитор TDP1, совместно топотекан и ингибитор TDP1 соответственно.

ческого исследования 1 мл опухоли от каждой мыши смешивали с 10 мл 10%-ного раствора забуференного формалина (“Биовитрум”, Россия). Статистическую обработку данных проводили в программе Microsoft Office Excel 2013, результаты приведены как значение ± стандартное отклонение.

Микроскопическое исследование. Для светооптического исследования образцы асцитической жидкости опухоли Кребс-2, а также опухоли после обработки растворителем (ДМСО/Твин-80), топотеканом, препаратом-ингибитором TDP1, комбинацией топотекан + ингибитор TDP1 фиксировали в растворе 10%-ного формалина через 10 сут после первого введения препаратов. Далее клетки обрабатывали 1%-ным раствором осмиевой кислоты (“EMS”, США), обезвоживали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации и ацетоне, заливали в смесь эпон-аралдита (“EMS”). Полутонкие срезы готовили на ультрамикротоме EM UC7 (“Leica”, Германия) и окрашивали 1%-ным раствором азура-2 (“EMS”) на 1%-ном растворе буры (“EMS”).

Полутонкие срезы клеток асцитной формы опухоли Кребс-2 изучали с помощью светового микроскопа DM2500 (“Leica”), фотосъемку проводили с помощью цифровой камеры MC 170 HD (“Leica”).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Перед первым введением препаратов мышей разделили на пять групп, по семь мышей в каждой. Действие топотекана и ингибитора TDP1 OL9-119 (рис. 1) по отдельности и совместно на асцитную форму опухоли оценивали на 10-й день по весу опухоли, а также по числу опухолевых клеток в асците. Индивидуальное введение как топотекана, так и ингибитора TDP1 приводило к снижению веса опухоли и числа опухолевых клеток в асците (рис. 2) по сравнению с контрольной группой 1 и с группой 2, которой вводили ДМСО. Следует отметить, что ДМСО не влияет на эти два показателя, т.е. снижение веса опухоли при введении ингибитора TDP1, растворенного в ДМСО, обусловлено действием самого ингибитора. Комбинированное введение топотекана и ингибитора TDP1 аддитивно снизило оба показателя (рис. 2).

Ранее мы сообщали о сенсибилизации карциномы Льюис мышей к действию топотекана препаратом этого же ингибитора TDP1 при внутрижелудочном введении [14]. Введение только данного препарата (OL9-119) не оказывало ни противоопухолевого, ни антиметастатического эффекта, но при комбинированном применении значительно усиливало действие топотекана. В настоящем исследовании препарат OL9-119 вводили внутрибрюшинно, чтобы обеспечить его прямой доступ к опухолевым клеткам, и наблюдали его “собственный” противоопухолевый эффект. Мы предполагаем, что различия в воздействии соединения OL9-119 – ингибитора TDP1, на карциному Льюис и карциному Кребс-2 могут быть обусловлены как разной чувствительностью модельных опухолей, так и разными способами введения препарата.

Мы провели светооптическое исследование клеток асцитной опухоли Кребс-2, полученных от мышей всех пяти групп. Опухолевые клетки мышей контрольной группы (рис. 3*а, б*) на полутонких срезах имели округлую форму и диаметр около 15 мкм, цитоплазма клеток была окрашена в ярко-синий цвет и вакуолизирована. Около половины опухолевых клеток содержали в цитоплазме по две–три липидные капли (рис. 3*б*). Присутствие липидных капель в цитоплазме клеток опухоли Кребс-2 описано ранее [18]. На поверхности всех клеток наблюдались небольшие выросты цитоплазмы. Ядра содержали преиму-

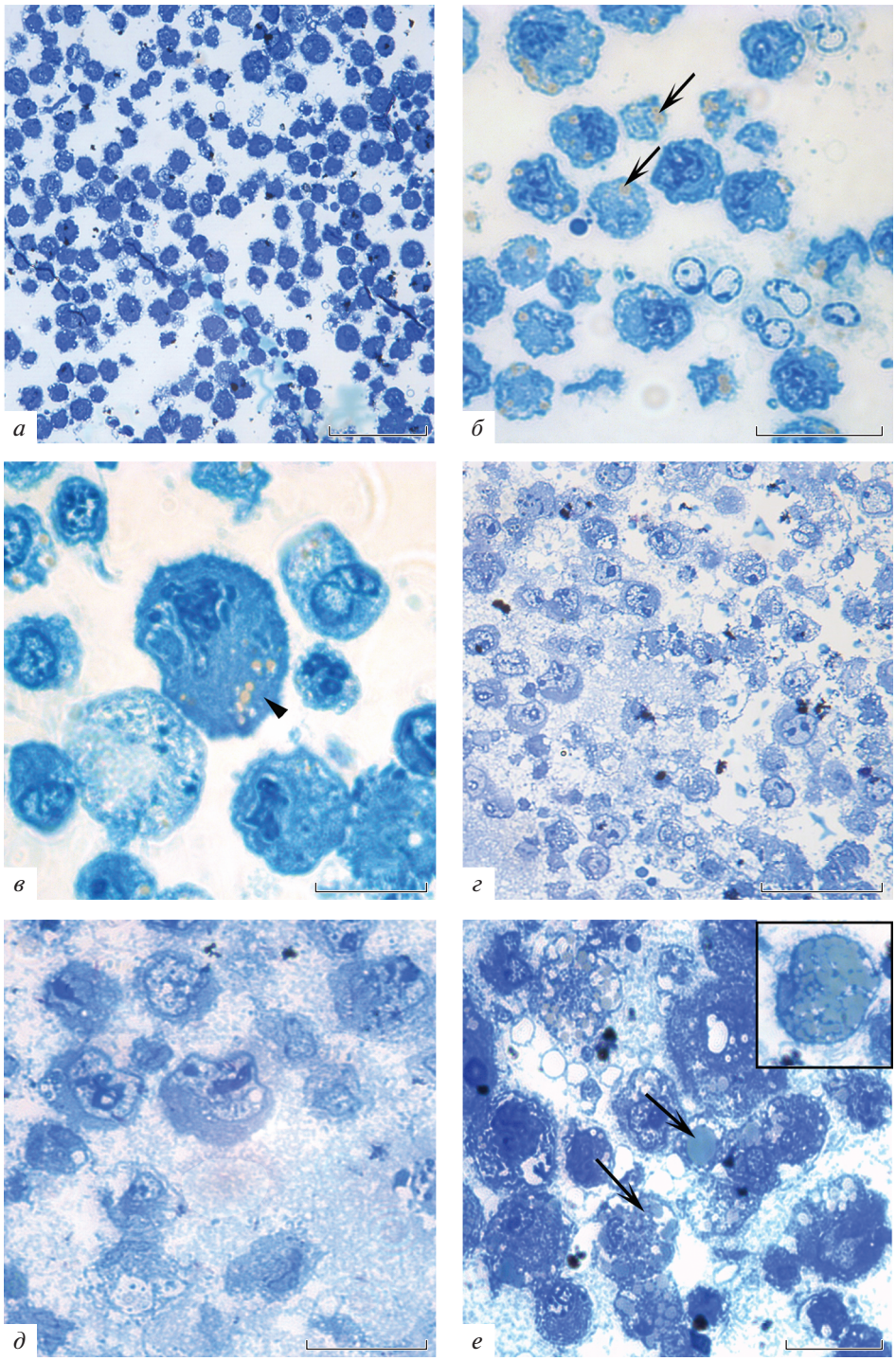


Рис. 3. Клетки асцитной формы опухоли Кребс-2. *а*, *б* – Контрольная группа. Стрелками показаны липидные капли в цитоплазме клеток, на поверхности клеток видны выросты цитоплазмы. *в* – Клетки Кребс-2 после обработки топотеканом, стрелкой показана гигантская клетка. *г*–*е* – Клетки после введения топотекана в сочетании с ингибитором TDP1, пространство между клетками заполнено клеточным детритом. Стрелками показаны липидные капли в цитоплазме; на врезке клетка, заполненная липидными каплями. Окраска азуром-2. Длина масштабной линейки в *а*, *г* соответствует 50 мкм и 20 мкм в *б*, *в*, *д*, *е*.

щественно эухроматин, на срезах некоторых клеток выявлялись ядрышки. В образцах отмечены единичные макрофаги со светло-голубой цитоплазмой, вдвое превышающие по размеру опухолевые клетки. Значимых морфологических отличий между опухолевыми клетками мышей контрольной группы и мышей, которым вводили ДМСО, не наблюдалось (снимки не приведены).

Действие топотекана на опухоль приводило к появлению гигантских клеток (рис. 3*в*), доля которых составила почти 25% всех клеток в образцах. Диаметр таких клеток достигал 30 мкм, вдвое превышая размер опухолевых клеток контрольной группы. Цитоплазма гигантских клеток окрашена в ярко-синий цвет, вакуолизирована, содержит липидные капли. Ядра крупные, неправильной формы, занимают около трети объема клетки.

Введение мышам ингибитора TDP1 OL9-119, а также топотекана в сочетании с этим ингибитором приводило к разрушению большого количества опухолевых клеток, препараты содержали клеточный детрит, встречались гигантские клетки. При введении комбинации этих двух препаратов (рис. 3*г*–*е*) в образцах выявлены клетки, в которых липидные капли занимали практически всю цитоплазму, при 400-кратном увеличении наблюдались две–три таких клетки в поле зрения. Вместе с тем, общее количество клеток с липидными каплями заметно не менялось. Интересно, что введение только OL9-119 не приводило к накоплению липидов в клетках опухоли.

Таким образом, комбинированное введение топотекана и исследуемого ингибитора TDP1 приводило к развитию деструктивных процессов в опухоли, которые выражались в повышенном накоплении клеточного детрита, отсутствовавшего в образцах после введения каждого из препаратов по отдельности.

В научной литературе не опубликовано результатов морфологического изучения асцитной опухоли Кребс-2 при воздействии противоопухолевых препаратов, поэтому мы не можем сопоставить полученные нами данные с результатами других исследователей. Таким образом, нами впервые показаны морфологические изменения клеток Кребс-2, вызванные воздействием только топотекана и топотекана в комбинации с ингибитором TDP1.

Представленные результаты изучения влияния внутрибрюшинного введения *in vivo* топотекана и ингибитора TDP1 OL9-119 на асцитную форму карциномы Кребс-2 мыши подтверждают ранее полученные нами данные *in vitro*, которые показывают усиление цитотоксического действия топотекана в комбинации с данным ингибитором TDP1 [14]. Следует подчеркнуть, что наиболее выраженный терапевтический эффект мы наблюдали при совместном применении топотекана с OL9-119. Полученные результаты подтверждают, что соединение OL9-119 – ингибитор TDP1, гидразинотиазольное производное усниновой кислоты – можно считать перспективным для разработки комбинированных противоопухолевых препаратов.

Работа проведена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-00-00097 КОМФИ) и Базового проекта ПФНИ ГАН на 2017–2020 гг. (№ АААА-А17-117020210022-4) “Механизмы функционирования систем репарации, транскрипции и трансляции. Патологические процессы, связанные с этими системами” (рук. проекта О.И. Лаврик).

Все эксперименты проведены в соответствии с протоколами, одобренными межинститутской комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН и директивой 2010/63/EU.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pommier Y., Leo E., Zhang H.L., Marchand C. (2010) DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem. Biol.* **17**, 421–433.
2. Pommier Y. (2006) Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat. Rev. Cancer.* **6**, 789–802.
3. Yang S.W., Burgin Jr. A.B., Huizenga B.N., Robertson C.A., Yao K.C., Nash H.A. (1996) A eukaryotic enzyme that can disjoin dead end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 11534–11539.
4. Interthal H., Pouliot J.J., Champoux J.J. (2001) The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 12009–12014.
5. Beretta G.L., Cossa G., Gatti L., Zunino F., Perego P. (2010) Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 targeting for modulation of camptothecin-based treatment. *Curr. Med. Chem.* **17**, 1500–1508.
6. Zakharenko A., Dyrkheeva N., Lavrik O. (2019) Dual DNA topoisomerase 1 and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibition for improved anticancer activity. *Med. Res. Rev.* **39**, 1427–1441.
7. Brettrager E.J., van Waardenburg R.C. (2019) Targeting tyrosyl-DNA phosphodiesterase I to enhance toxicity of phosphodiester linked DNA-adducts. *Cancer Drug Resist.* **2**, 1153–1163.
8. Comeaux E.Q., van Waardenburg R.C. (2014) Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I resolves both naturally and chemically induced DNA adducts and its potential as a therapeutic target. *Drug Metab. Rev.* **46**, 494–507.
9. Filimonov A.S., Chepanova A.A., Luzina O.A., Zakharenko A.L., Zakharova O.D., Ilina E.S., Dyrkheeva N.S., Kuprushkin M.S., Kolotaev A.V., Khachatryan D.S., Patel J., Leung I.K.H., Chand R., Ayine-Tora D.M., Reynisson J., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. (2019) New hydrazinothiazole derivatives of usnic acid as potent Tdp1 inhibitors. *Molecules.* **24**, 3711.
10. Luzina O., Filimonov A., Zakharenko A., Chepanova A., Zakharova O., Ilina E., Dyrkheeva N., Likhatskaya G., Salakhutdinov N., Lavrik O. (2020) Usnic acid conjugates with monoterpenoids as potent tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors. *J. Nat. Prod.* **83**, 2320–2329.
11. Salomatina O.V., Popadyuk I.I., Zakharenko A.L., Zakharova O.D., Fadeev D.S., Komarova N.I., Reynisson J., Arabshahi H.J., Chand R., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. (2018) Novel semisyn-

thetic derivatives of bile acids as effective tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors. *Molecules*. **23**, 679.

12. Li-Zhulanov N.S., Zakharenko A.L., Chepanova A.A., Patel J., Zafar A., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Reynisson J., Leung I.K.H., Lavrik O.I. (2018) A novel class of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors that contains the octahydro-2H-chromen-4-ol scaffold. *Molecules*. **23**, 2468.
13. Luzina O.A, Salakhutdinov N.F. (2018) Usnic acid and its derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2000–2017). *Expert. Opin. Ther. Pat*. **28**, 477–491.
14. Zakharenko A.L., Luzina O.A., Sokolov D.N., Kaledin V.I., Nikolin V.P., Popova N.A., Patel J., Zakharova O.D., Chepanova A.A., Zafar A., Reynisson J., Leung E., Leung I.K.H., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. (2019) Novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors enhance the therapeutic impact of topotecan on *in vivo* tumor models. *Eur. J. Med. Chem*. **161**, 581–593.
15. Zakharenko A., Luzina O., Koval O., Nilov D., Gushchina I., Dyrkheeva N., Švedas V., Salakhutdinov N., Lavrik O. (2016) Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors: usnic acid enamines enhance the cytotoxic effect of camptothecin. *J. Nat. Prod*. **79**, 2961–2967
16. Zakharova O., Luzina O., Zakharenko A., Sokolov D., Filimonov A., Dyrkheeva N., Chepanova A., Ilina E., Ilyina A., Klabenkova K., Chelobanov B., Stetsenko D., Zafar A., Eurtivong C., Reynisson J., Volcho K., Salakhutdinov N., Lavrik O. (2018) Synthesis and evaluation of aryliden- and hetarylidenfuranone derivatives of usnic acid as highly potent Tdp1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem*. **26**, 4470–4480.
17. Колдышева Е.В., Меньщикова А.П., Лушникова Е.Л., Попова Н.А., Каледин В.И., Николин В.П., Захаренко А.Л., Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф., Лаврик О.И. (2018) Антиметастатическая активность комбинации топотекана и ингибитора тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 на модели карциномы легкого Льюис. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед*. **166**, 609–615.
18. Kirikovich S.S., Taranov O.S., Omigov V.V., Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Efremov Y.R., Bogachev S.S. (2019) Ultrastructural analysis of the Krebs-2 ascites cancer cells treated with extracellular double-stranded DNA preparation. *Ultrastruct. Pathol*. **43**, 56–65.

ANTITUMOR ACTIVITY OF THE COMBINATION OF TOPOTECAN AND TYROSYL-DNA-PHOSPHODIESTERASE 1 INHIBITOR ON MODEL KREBS-2 MOUSE ASCITE CARCINOMA

N. S. Dyrkheeva[1], A. L. Zakharenko[1], E. S. Novoselova[1], A. A. Chepanova[1, 2], N. A. Popova[2, 3], V. P. Nikolin[3], O. A. Luzina[4], N. F. Salakhutdinov[4], E. I. Ryabchikova[1, 2], and O. I. Lavrik[1, 2, *]

[1]*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

[2]*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

[3]*Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

[4]*Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru*

Topotecan is a cytostatic drug from the camptothecin group, it acts by inhibiting topoisomerase 1 (TOP1). Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) is capable of interfering with the action of TOP1 inhibitors, reducing their therapeutic efficacy. Suppression of TDP1 activity may enhance the effects of topotecan. In this work, we investigated the effect of the antitumor drug topotecan alone and in combination with the TDP1 inhibitor, a hydrazinothiazole derivative of usnic acid, on the Krebs-2 mouse ascites tumor. We have previously shown that this derivative efficiently inhibits TDP1. In the present work, we show that both topotecan and TDP1 inhibitor have an antitumor effect when evaluated separately. The combination of topotecan and the TDP1 inhibitor additively reduces both the weight of the ascites tumor and the number of cells in ascites. In mice, the TDP1 inhibitor alone or in combination with topotecan eliminated the tumor cells. After the combined intraperitoneal administration of these two compounds, we observed cells in which lipid droplets occupied almost the entire cytoplasm and the accumulation of cell detritus, which was absent in the samples collected from mice treated with each compound separately.

Keywords: tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 1, Tdp1 inhibitor, Krebs-2 carcinoma, topotecan, topoisomerase 1

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 2, с. 318–337

ОБЗОРЫ

УДК 575.164;571.27;575.176

ВОВЛЕЧЕННОСТЬ ГЕНОВ БЕЛКОВ BRCA1-АССОЦИИРОВАННОГО КОМПЛЕКСА НАБЛЮДЕНИЯ ЗА ГЕНОМОМ (BASC) В РАЗВИТИЕ МНОГОФАКТОРНОЙ ПАТОЛОГИИ

© 2021 г. Н. П. Бабушкина[a], *, А. Е. Постригань[a], А. Н. Кучер[a]

[a]Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050 Россия

**e-mail: nad.babushkina@medgenetics.ru*

Поступила в редакцию 12.08.2020 г.
После доработки 05.09.2020 г.
Принята к публикации 07.09.2020 г.

Генетическая компонента многофакторных заболеваний интенсивно изучается на протяжении многих лет, но до сих пор в этой области остается очень много вопросов. В последние годы появились исследования в области "менделевского кода" – гипотезы, постулирующей существование связи между менделевскими (моногенными) и многофакторными патологиями: полиморфные варианты в генах менделевских заболеваний могут оказаться значимыми для многофакторных патологий, в которых задействованы те же биохимические пути. В настоящем обзоре через призму гипотезы "менделевского кода" представлен взгляд на группу генов, которые могут оказаться перспективными генами-кандидатами широкого спектра патологических состояний, а именно, генов белков систем репарации ДНК. В качестве примера рассмотрены белки BRCA1-ассоциированного комплекса наблюдения за геномом (BASC). Обсуждаются основные функции белков этого комплекса в процессах репарации двухцепочечных разрывов ДНК (ATM, MRE11, NBN, RAD50, BRCA1, BLM) и мисматч-репарации (MSH2, MSH6, MLH1, PMS2, RF-C, PCNA); вовлеченность этих белков в функционирование митохондрий; участие белков BASC в развитии адаптивного иммунного ответа. В 13 (из 16) генах белков комплекса BASC уже известны мутации, приводящие к моногенным заболеваниям, а 11 ассоциированы с многофакторными заболеваниями или отдельными биологическими процессами. Общность патогенетически значимых признаков у больных с мутациями во многих генах белков комплекса BASC и у больных с тяжелыми комбинированными иммунодефицитами позволяет предполагать участие полиморфных вариантов в генах белков систем репарации ДНК в развитии многофакторных заболеваний, вероятно, из-за вовлечения в процессы иммунного ответа. Плейотропные эффекты данных генов указывают на возможность их участия в развитии различных состояний организма – как в норме, так и при патологии.

Ключевые слова: менделевский код, гены белков репарации ДНК, BASC, SNP, многофакторная патология

DOI: 10.31857/S0026898421020038

"МЕНДЕЛЕВСКИЙ КОД" МНОГОФАКТОРНОЙ ПАТОЛОГИИ

Многофакторные заболевания составляют основную проблему здравоохранения во всем мире, поэтому формирование новых стратегий профилактики и лечения широко распространенных патологий по-прежнему находится в фокусе внимания исследователей. Наследственная компонента таких болезней сложна, поэтому генетические исследования в этой области актуальны и в настоящее время, хотя подходы к ее изучению с течением времени существенно меняются.

В последние годы значительный интерес вызывает гипотеза менделевского кода, согласно которой существует связь между менделевскими и многофакторными патологиями: многие из частых вариантов, вносящих свой вклад в формирование сложно наследуемых заболеваний, локализованы в генах, причинных для моногенных патологий [1]. Фенотипические эффекты мутаций, приводящих к синдромальной либо моногенной патологии, чрезвычайно сильны, в то время как полиморфные варианты привносят слабые эффекты, модифицируемые как факторами внешней среды, так и генетическим фоном. Поэтому

Сокращения: GWAS – полногеномные ассоциативные исследования (**G**enome-**W**ide **A**ssociation **S**tudies); BASC – BRCA1-ассоциированный комплекс наблюдения за геномом (**B**RCA1-**a**ssociated **g**enome surveillance **c**omplex).

полиморфные варианты в генах менделевских заболеваний могут оказаться значимыми для многофакторных патологий, в которых задействованы те же биохимические пути. Эта идея получила подтверждение и развитие в ряде исследований. Так, например, показано, что более 23% генов, мутации в которых приводят к высокопенетрантным менделевским заболеваниям, ассоциированы и с многофакторной патологией, причем значения OR для рисковых вариантов таких генов выше, чем для рисковых вариантов генов, не приводящих к моногенным заболеваниям, но ассоциированных с многофакторными [2]. Известно, что проведение полногеномных ассоциативных исследований (**G**enome-**W**ide **A**ssociation **S**tudies, GWAS) позволяет выявить замены в непосредственной близости от генов менделевских заболеваний, причем фенотипические проявления изучаемых сложно наследуемых патологий частично перекрываются с проявлениями моногенных заболеваний [3].

Взгляд через призму гипотезы менделевского кода может дать второе дыхание "кандидатному" подходу в изучении генетической компоненты многофакторной патологии. Наше внимание привлекла группа генов белков систем репарации ДНК. Нарушение процессов репарации ДНК приводит к возникновению целого ряда моногенных и онкологических заболеваний [4, 5]. Вовлеченность полиморфизма генов систем репарации ДНК в развитие патологических состояний разной этиологии в настоящее время активно исследуется, но может ли оно считаться достаточно изученным? Основное внимание сосредоточено на выявлении роли генов систем репарации ДНК в развитии онкопатологии. Известно, что мутации в некоторых генах белков различных систем репарации ДНК обусловливают развитие ряда наследственных онкозаболеваний. Полиморфные варианты в генах этой системы ассоциированы с онкопатологией, чувствительностью к воздействию химических веществ и радиации. Изучение именно этих феноменов чаще всего включает и вовлеченность генетического полиморфизма данных систем генов [5]. Вместе с тем, в единичных исследованиях (в том числе и в GWAS) показано участие полиморфизма генов систем репарации в формировании предрасположенности к широкому спектру сложно наследуемых патологий, таких как заболевания сердечно-сосудистой системы [6–9], психические [10, 11], метаболические [12], иммунологические [13–15] и другие нарушения.

В репарации ДНК участвуют сотни белков. Согласно "GenOntology" в процессы репарации ДНК у человека вовлечены продукты 511 генов (GO: 0006281, фильтры "Homo sapiens", "experimental evidence", "UniProt") [16]. Белки систем репарации образуют, как правило, мультибелковые комплексы, позволяющие исправлять те или иные повреждения ДНК, а также комплексы вне "своих" систем репарации [17, 18]. В настоящем обзоре рассмотрено участие полиморфных вариантов генов белков BRCA1-ассоциированного комплекса наблюдения за геномом (BASC) в формировании предрасположенности к многофакторной патологии. Мультибелковый комплекс BASC содержит опухолевые супрессоры и белки репарации повреждений ДНК – BRCA1, MSH2, MSH6, MLH1, PMS2, RF-C, PCNA, ATM, BLM, MRE11, NBN, RAD50. Комплекс BASC представляет собой динамичную систему, меняющую свой состав как на протяжении клеточного цикла, так и в пределах субклеточных доменов. Белки этого комплекса (рис. 1) участвуют в качестве компонентов в различных системах репарации, а также способны формировать небольшие стабильные субкомплексы, независимые от BRCA1 [19].

БЕЛКИ КОМПЛЕКСА BASC И РЕПАРАЦИЯ ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫХ РАЗРЫВОВ ДНК

Сразу после возникновения двухцепочечного повреждения ДНК близлежащий гистон H2AX очень быстро фосфорилируется (киназой ATM или другими киназами этого семейства), образуя форму gH2AX [20]. Фосфорилирование гистона необходимо для координации сборки репарационного комплекса, а также для дополнительного привлечения необходимых ферментов [21–27]. Нибрин (NBN) в составе комплекса MRN (включающего белки MRE11, RAD50 и NBN) связывается с gH2AX и с ATM, что способствует накоплению факторов репарации ДНК в хроматине, окружающем повреждение, активируя тем самым процесс репарации двухцепочечных разрывов ДНК [28–30]. Комплекс MRN является единственным сенсором активации ATM при дисфункции теломер [31]. Он играет центральную роль в активации ATM-киназы в сайтах двухцепочечных разрывов ДНК [32].

Протеинкиназа ATM, входящая в семейство киназ P13/P14, играет важную роль в путях передачи сигнала о двухцепочечных разрывах в ДНК высших эукариот. ATM опосредованно контролирует наличие двухцепочечных разрывов ДНК через индуцированные ими изменения в структуре хроматина [33]. Белок ATM может находиться как в ядре, так и в цитоплазме, в том числе в пероксисомах, везикулах и митохондриях. Киназа ATM имеет сотни мишеней в целом ряде сигнальных путей, участвующих в поддержании клеточного и окислительно-восстановительного гомеостаза, регуляции митохондриальных функций [34–36]. Предполагается, что в ответ на появление двухцепочечных разрывов ДНК ATM активируется с помощью двух независимых путей, вовлекающих TP53BP1, с одной стороны, и NBN, с другой [37]. Кроме того, ATM может активиро-

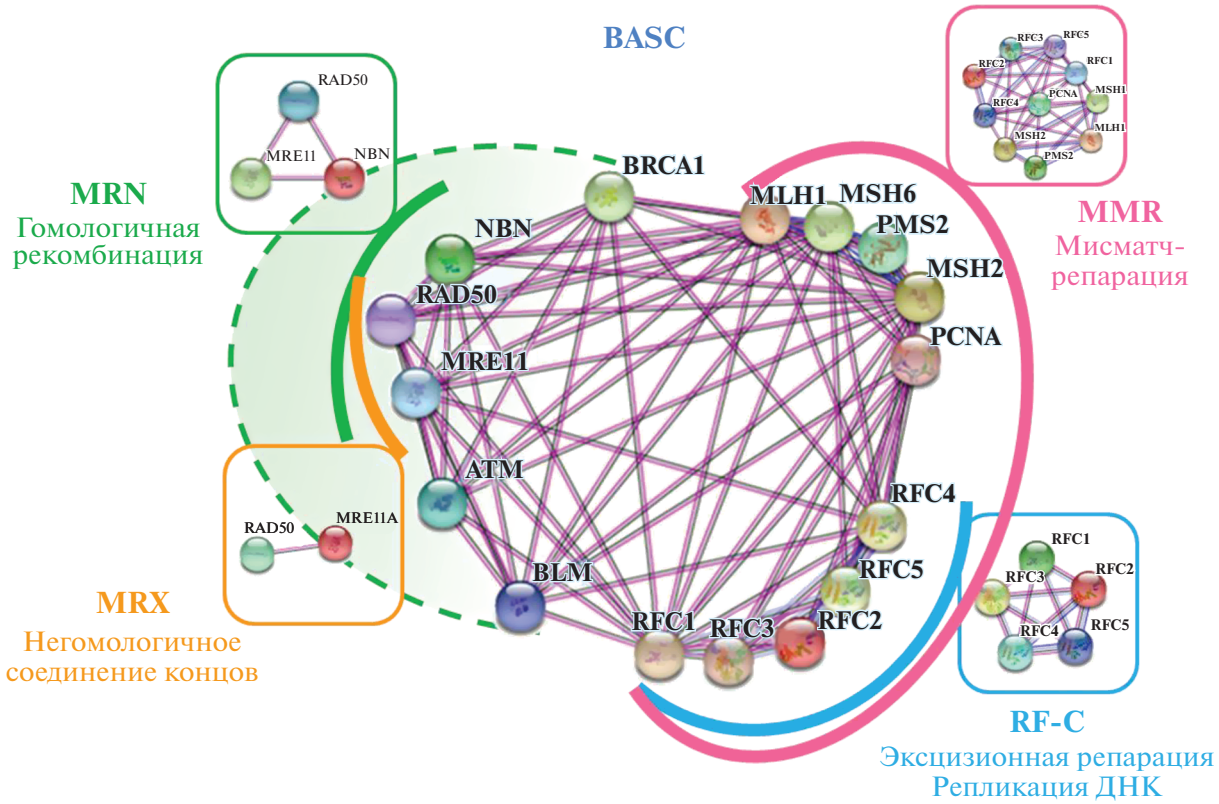


Рис. 1. Комплекс BASC. Сеть построена с помощью on-line ресурса STRING v:11.0; линии, соединяющие белки в сети, отображают экспериментально доказанные взаимодействия, колокализацию и коэкспрессию. Помимо комплекса BASC указанные белки включены в такие белковые комплексы (все белковые комплексы выделены подчеркиванием), как MRN (MRE11, RAD50, NBN), MRX (MRE11, RAD50), RF-C (RFC1, RFC2, RFC3, RFC4, RFC5), MMR (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, PCNA и RF-C). Наряду с BRCA1, ATM и BLM, белковые комплексы MRN и MRX участвуют в процессах гомологичной рекомбинации; MRX и ATM – в процессах негомологичного соединения концов. Гетеропентамер RF-C, а также PCNA вовлечены в репликацию ДНК и эксцизионную репарацию. Комплекс MMR осуществляет мисматч-репарацию.

ваться в митохондриях в ответ на окислительный стресс независимо от клеточного ответа на повреждения ДНК, на одноцепочечные разрывы ДНК, на изменения структуры хроматина [38–41]. Мутации в гене *ATM* приводят к возникновению атаксии-телеангиэктазии (табл. 1), для которой, помимо основных нейродегенеративных нарушений, характерны сосудистые изменения, а также частые респираторные инфекции. Описаны ассоциации вариантов гена *ATM* с долгожительством [42, 43], шизофренией [10], коронарным атеросклерозом, сахарным диабетом [6, 44], инсулинорезистентностью [45] и ответом на терапию метформином больных сахарным диабетом типа 2 [46–48].

Комплекс MRN, состоящий из белков MRE11, NBN и RAD50, участвует не только в репарации двухцепочечных разрывов ДНК, но связан и с формированием теломер и проверкой повреждений ДНК [49]. Этот комплекс вовлечен в сигнальные пути, опосредующие развитие врожденного иммунитета [50]. Мутации в гене *NBN* (*NBS1*) приводят к синдрому хромосомных поломок Ниймегена, в гене *RAD50* – к заболеванию, подобному синдрому Ниймегена (Nijmegen breakage syndrome-like disorder) (табл. 1). При этом полиморфные варианты гена *NBN* ассоциированы с аутоиммунными заболеваниями [13], нарушениями метаболизма [12] и процессами старения [51]. Варианты гена *RAD50* ассоциированы с бронхиальной астмой [14, 52, 53] и сердечно-сосудистой патологией [54]. Мутации гена *MRE11* описаны при ATLD1 (Ataxia-telangiectasia-like disorder 1, заболевание (тип 1), сходное с атаксией-телеангиэктазией) (табл. 1) [56, 57], а ассоциации вариантов этого гена – с инфарктом миокарда [7], иммунным старением Т-клеток [58].

Для эффективной передачи сигнала через MRN и ATM требуется еще целый ряд факторов, в том числе TP53BP1 и BRCA1, присутствие которых в комплексе определяет путь, по которому пойдет репарация двухцепочечных разрывов ДНК – гомологичной рекомбинации (HR), опосредуемой BRCA1, или негомологичного воссоединения кон-

Таблица 1. Моногенные заболевания, вызываемые мутациями в генах белков комплекса BASC

Тип репарации ДНК	Ген	Менделевское заболевание/синдром	OMIM*
Репарация двухцепочечных разрывов ДНК (гомологичная рекомбинация, негомологичное соединение концов)	*ATM*	Атаксия телеангиоэктазия	208900
	NBN (*NBS1*)	Синдром хромосомных поломок Ниймегена	251260
	RAD50	Заболевание, подобное синдрому Ниймегена	613078
	MRE11	ATLD1 (Ataxia-telangiectasia-like disorder 1, заболевание (тип 1), подобное атаксии-телеангиоэктазии)	604391
Гомологичная рекомбинация	*BRCA1*	Наследственный рак молочной железы и яичников (familial breast-ovarian cancer-1, BROVCA1)	604370
		Рак поджелудочной железы (Pancreatic cancer, susceptibility to 4)	614320
		Анемия Фанкони (Fanconi anemia, complementation group S), группа комплементации S	617883
	BLM	Синдром Блума	210900
Мисматч-репарация	*MLH1*	Синдром Линча (наследственный неполипозный колоректальный рак типа 2)	609310
		Синдром Туркота (синдромальный рак мисматч-репарации, сочетание колоректального полипоза и первичных опухолей ЦНС)	276300
		Синдром Муира–Торре (Muir–Torre syndrome, MRTES)	158320
	PMS2	Синдром Линча (наследственный неполипозный колоректальный рак типа 4)	614337
		Синдром Туркота (синдромальный рак мисматч-репарации, сочетание колоректального полипоза и первичных опухолей ЦНС)	276300
	MSH2	Синдром Линча (наследственный неполипозный колоректальный рак типа 1)	120435
		Синдром Туркота (синдромальный рак мисматч-репарации, сочетание колоректального полипоза и первичных опухолей ЦНС)	276300
		Синдром Муира–Торре (Muir–Torre syndrome, MRTES)	158320
	MSH6	Синдром Линча (наследственный неполипозный колоректальный рак типа 5)	614350
		Синдром Туркота (синдромальный рак мисматч-репарации, сочетание колоректального полипоза и первичных опухолей ЦНС)	276300
		Наследственный рак эндометрия	608089
Мисматч-репарация, эксцизионная репарация	*RFC1*	Церебеллярная атаксия, невропатия и синдром вестибулярной арефлексии	614575
	RFC2	Локализован в регионе делеции при синдроме Вильямса (*RFC2* – один из 28 генов в этом регионе)	194050
	PCNA	ATLD2 (Ataxia-telangiectasia-like disorder 2), подобное атаксии-телеангиэктазии заболевание типа 2	615919

Примечание. Описаны также мутации в генах *MLH1*, *MSH2*, *NBN*, *RAD50* (см. [55]), приводящие к синдромам дефицита антител IgAD и CVID, но не включенные в OMIM.

цов (NHEJ), опосредуемого TP53BP1 [59, 60]. BRCA1 – ядерный фосфопротеин, играющий важную роль в поддержании геномной стабильности в целом и в качестве опухолевого супрессора. Функции BRCA1 чрезвычайно разнообразны: он взаимодействует с компонентами гистондеацетилазного комплекса, обусловливая участие этого фермента в процессах транскрипции, репарации ДНК и рекомбинации [61]; участвует в сборке митотического веретена деления [62]. Связываясь с RAD50, BRCA1 блокирует экзонуклеазную активность MRN-комплекса [63, 64]. Из всех генов белков комплекса BASC, *BRCA1* изучается наиболее активно – мутации в этом гене ответственны примерно за 40% случаев наследственного рака молочной железы и более чем за 80% случаев наследственного рака молочной железы и яичников (табл. 1) [4, 5]. Полиморфизм гена *BRCA1* ассоциирован с характером воспалительного ответа [5, 65].

Один из компонентов системы гомологичной рекомбинации – продукт гена *BLM,* взаимодействует с топоизомеразой 3α и двумя геликазами того же подсемейства, что и BLM (DExH-бокссодержащие ДНК- и РНК-геликазы). BLM обладает ДНК-зависимой АТРазной и ДНК-геликазной активностью, вовлечен в процессы рекомбинации, репарации, репликации, сегрегации сестринских хроматид в митозе, участвует в разрешении структуры Холлидея и расплетании G-квадруплексов, в опосредованном рекомбинацией удлинении теломер, регуляции экспрессии генов [66–69]. Мутации в этом гене вызывают развитие синдрома Блума (табл. 1), который характеризуется слишком высокой частотой рекомбинации гомологичных хромосом и сестринских хроматид [70, 71]. Влияя на жизнеспособность клеток и апоптоз, BLM участвует в прогрессии катаракты [72]. На мышиной модели показано, что BLM обеспечивает правильное развитие и функционирование В-лимфоцитов различных подтипов [73]. Показано участие BLM в патогенезе колоректального рака и рака предстательной железы [74, 75].

Следует отметить существование ассоциации полиморфных вариантов в генах *NBN, MRE11*, *RAD50*, *ATM*, *BRCA1* и *BLM* с различными онкологическими заболеваниями [5, 67, 76–85].

БЕЛКИ КОМПЛЕКСА BASC И МИСМАТЧ-РЕПАРАЦИЯ

Еще один комплекс, ассоциированный с BASC, представлен белками весьма сложной системы пострепликативной мисматч-репарации ДНК (MMR). Основная роль этого комплекса (включающего как минимум 20 белков) заключается в устранении ошибок, связанных с репликацией ДНК (кроме таких мисматчей, как G/T, G/G и A/C, мишенями этой системы служат также и O6-метилгуанин, спаренный с C или T, межцепочечные сшивки CpG, вызванные действием цисплатина, индуцированные УФ-светом фотопродукты, пуриновые аддукты бензпирена, производные аминофлуорена, 8-оксигуанин, инсерции и делеции) [86]. Кроме того, MMR ингибирует рекомбинацию между неидентичными последовательностями и влияет на многие процессы, связанные с метаболизмом ДНК, включая передачу сигналов о повреждении ДНК, экспансию тринуклеотидных повторов, переключения синтеза классов иммуноглобулинов, соматическую гипермутабельность [87]. MMR, по-видимому, играет двойную роль в ответе на повреждения ДНК (непосредственно мисматч-репарация и передача сигнала о повреждении ДНК), а также вовлечена в активацию индукции апоптоза [88]. В экспериментах *in vivo* показано, что MMR опосредует клеточную реакцию на дисфункцию теломер через ослабление индукции белка p21 [89].

Мисматчи опознаются и связываются субъединицами MutS, представляющими собой гетеродуплексы трех типов: комплекс MutSα, образуемый белками MSH2 и MSH6, распознает преимущественно одиночные мисматчи и небольшие инсерции/делеции; комплекс MutSβ (MSH2/MSH3), связывающий протяженные инсерции/делеции; и комплекс MutSγ (MSH4/MSH5), участвующий в процессе мейотической рекомбинации [90–93]. С MutS связывается субъединица MutL, также представленная несколькими гетеродимерными формами: MutLα, MutLβ, MutLγ. Белки MLH1 и PMS2 формируют субъединицу MutLα. Показаны физические взаимодействия MutLα с ДНКполимеразой III, которая присоединяется к участку репарации. MLH1 может также образовывать гетеродимеры с MLH3, формируя субъединицу MutLγ, участвующую в процессе мейоза. PMS2 и MLH3 обладают слабой эндонуклеазной активностью, критичной для функционирования субъединицы MutL. PMS2 не может разрезать метилированную ДНК, поэтому, вероятно, таким путем могут исправляться только *de novo* нарушения, однако в клетках человека это пока не доказано [17, 18, 93, 94]. MLH1 в комплексе с PMS1 (MutLβ) или PMS2 подавляют гомологичную рекомбинацию, особенно когда это касается коротких гомологичных отрезков ДНК. MutL-комплекс человека к тому же защищает от формирования геномных перестроек, участвуя в процессах, не имеющих отношения непосредственно к мисматч-репарации [95]. Так PMS2 принимает участие в сперматогенезе [96]. Мутации в генах *MLH1*, *MLH3*, *PMS2*, *PMS1*, *MSH2*, *MSH6* могут быть причиной некоторых наследственных онкологических заболеваний (табл. 1), таких как синдром Линча (наследственный неполипозный колоректальный рак) и синдром Туркота (синдромальный рак мисматч-репарации, синдром полипозной опухоли

мозга) [4, 97–101]. Мутации в *MLH1* и *MSH2* могут быть причиной синдрома Muir–Torre (MRTES), в *MLH1, MLH3*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6* – рака эндометрия [97, 102–105]. Показаны ассоциации полиморфных вариантов этих генов и при других онкозаболеваниях [5, 106–111]. Кроме того, выявлены ассоциации полиморфных вариантов генов *MLH1* и *PMS2* с продолжительностью жизни [112, 113]. Описаны мутации в гене *MSH5*, приводящие к преждевременному угасанию функции яичников [114, 115], ассоциации полиморфных вариантов с IGAD1 (дефицит IgA) [116]. Ген *MSH4* ассоциирован с мужским бесплодием [117]. На мышиной модели показано, что дефицит MSH2 приводит к общегеномному увеличению степени метилирования гистона H3 [118].

Немаловажную роль в мисматч-репарации играет еще один белковый комплекс – репликативный фактор С (RF-C), обладающий АТРазной активностью в присутствии ДНК и ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA). RF-C представляет собой гетеропентамер, субъединицы которого кодируются генами *RFC1*, *RFC2*, *RFC3*, *RFC4 RFC5* [119]. RF-C взаимодействует с 5'-концом последовательности ДНК, затем связывает PCNA, опосредуя его посадку на ДНК. PCNA необходим для сборки комплекса репликации, он стабилизирует комплекс матричной ДНК и ДНК-полимеразы (дельта или эпсилон), что обеспечивает процессивный синтез ДНК [120]. PCNA может связывать также ряд белков (лигазу 1, метилтрансферазу, флэп-эндонуклеазу 1 и т.д.), привлекая их, при необходимости, к репликативному комплексу, он вовлечен в поддержание жизнеспособности пролиферирующих клеток [121–123]. Эндонуклеазная активность MutLα активируется PCNA [124]. RF-C принимает участие в процессах репликации, эксцизионной репарации нуклеотидов, мисматч-репарации, поддержании стабильности теломер [125–127]. Полиморфизм генов *PCNA*, *RFC1, RFC2, RFC3, RFC4, RFC5* активно изучается при онкопатологиях [5, 119, 128–130]. Экспансия пентануклеотидного повтора в гене *RFC1* приводит к аутосомно-рецессивной поздневозрастной мозжечковой атаксии (табл. 1) [131]. Выявлена ассоциация полиморфного варианта в гене *RFC1* с иммунологическими реакциями [132]. Ген *RFC2* локализован в участке делеции при синдроме Вильямса (табл. 1) [133, 134]. Мутации в гене *PCNA* приводят к развитию ATLD2 (табл. 1) – заболеванию, сходному с атаксией-телеангиэктазией [135]. Уровень PCNA активно используется в качестве белкового маркера пролиферирующих клеток, поэтому изменение его уровня при различных патологиях и в модельных системах отмечено во многих работах (см. [5] и ссылки там). Показана вовлеченность PCNA в патогенез болезни Паркинсона [136, 137].

ГЕНЫ БЕЛКОВ КОМПЛЕКСА BASC И МНОГОФАКТОРНАЯ ПАТОЛОГИЯ

В настоящее время нет достаточно убедительных доказательств участия большинства генов белков этого функционального класса в развитии многофакторной патологии, хотя в этой области накоплено уже немало данных. A. Ciccia и S.J. Elledge, рассматривая 40 синдромов, вызываемых мутациями более чем в 80 генах, пришли к выводу, что дефекты в репарации ДНК в первую очередь влияют на гомеостаз нервной, иммунной и репродуктивной систем, они также могут привести к преждевременному старению или предрасположенности к раку [34]. Действительно, из приведенных этими авторами данных видно, что патология нервной системы наблюдается в 62% случаев синдромов, вызываемых мутациями в генах белков репарации ДНК, повышенная предрасположенность к онкопатологии в – 37%, нарушения в функционировании иммунной системы в – 35%, те или иные признаки преждевременного старения находят у 25% больных [34]. В доступных источниках наибольший объем информации касается вовлеченности генов белков репарации ДНК в развитие онкопатологий (см., например, DisGenet, а также [4, 5, 67, 76–85, 97–101, 106–111, 119, 128–130]). Именно поэтому нам представляется наиболее интересным рассмотреть и другие аспекты.

Дисфункция митохондрий

Хромосомные перестройки и нестабильность генома фактически являются маркерами нарушения процессов репарации ДНК. Однако ряд признаков, общих для некоторых синдромов, связанных с нарушением репарации ДНК (атаксия-телеангиэктазия, синдром Блума, синдром Ниймегена), таких как преждевременное старение, задержка роста, инсулинорезистентность, эндокринные нарушения и иммунодефицит, – могут вызываться дефектами антиоксидантной защиты и, как следствие, накоплением окислительных повреждений ДНК [138]. Эти процессы связаны не только с непосредственным накоплением мутаций в ядрах соматических клеток (процесс корректной репарации ДНК особенно актуален для нейронов), но и с накоплением повреждений в мтДНК. Поскольку мтДНК кодирует важные субъединицы дыхательной цепи митохондрий, то дефекты в ней зачастую приводят к нарушению процессов окислительного фосфорилирования [34, 139]. Дисфункция митохондрий может быть причиной целого ряда патологических состояний, затрагивающих в первую очередь ткани с активным метаболизмом – ЦНС, скелетные мышцы, сердце, а также целый ряд других тканей, вызывая нейродегенерацию, сердечно-сосудистые и метаболические заболевания, старение, рак и т.д. [139, 140]. Нарушения ультраструктуры и

функций митохондрий, повышенная продукция митохондриальных АФК характерны для атаксии-телеангиэктазии и сходного с ней ATLD, синдромов Блума, Ниймегена, Кокейна и пигментной ксеродермы [36, 138].

Большинство АФК генерируются во время нормального клеточного метаболизма в основном в митохондриях, пероксисомах и эндоплазматической сети [141]. Непосредственная физическая близость к источникам АФК и отсутствие гистонов приводят к увеличению скорости мутагенеза в митохондриях, которая там в 10–20 раз выше, чем в ядерном геноме [140, 142]. Наиболее стабильное окислительное повреждение ДНК – 8-оксигуанин – во время последующей репликации может образовывать мисматчи с аденином, причем чаще, чем "правильные" пары с цитозином [143]. Таким образом формируется "мутаторный" фенотип, т.е. повреждение ДНК, вызывающее дальнейшее появление мутаций [144, 145]. Окислительные повреждения ДНК исправляются в первую очередь посредством BER (эксцизионная репарация оснований), в митохондриях ошибки также исправляются преимущественно посредством BER. Однако это далеко не единственный механизм. В настоящее время доказано, что в митохондриях активно функционируют также системы NER (эксцизионная репарация нуклеотидов), MMR, а также системы репарации двухцепочечных разрывов ДНК – как основанные на гомологичной рекомбинации, так и на негомологичном воссоединении концов, вероятно, путем сшивания концов, основанном на микрогомологии – MMEJ. Несмотря на то, что детали функционирования этих систем в митохондриях и в ядре могут отличаться [140, 145–147], вполне ожидаемо участие белков комплекса BASC в репарационных процессах в митохондриях.

Некоторые белки комплекса BASC встречаются в митохондриях и необходимы для их нормального функционирования. В частности, на клеточных и животных моделях показано, что потеря активности киназы ATM приводит к быстрому изменению гомеостаза митохондрий. Фактически это свидетельствует о важной роли ATM в функционировании митохондрий, не зависящей от повреждений как в ядерной, так и в мтДНК. Предполагается, что увеличение уровня окислительного стресса у мышей с нокаутом гена *ATM* обусловлено повышением уровня АФК в митохондриях, возможно, из-за сниженной активности комплекса I [148]. При дефиците комплекса MMR (MLH1 или MSH2) в клетке также снижается активность комплекса I [124, 145], а потеря MLH1 приводит, кроме того, к существенному снижению количества копий мтДНК. При сборке комплекса MMR на мисматчах ДНК происходит взаимодействие MLH1 и ATM, что необходимо для развития дальнейшего клеточного ответа на повреждение ДНК [149]. Дисфункция митохондрий, вызванная дефицитом белков системы мисматч-репарации, может либо опосредоваться именно нарушением взаимодействия MLH1/ATM [145], либо быть независимым событием с неизвестным пока механизмом реализации. Показано участие комплекса MRN и продукта гена *BLM* в функционировании MMEJ, однако доказательства присутствия и функциональной значимости в митохондриях к настоящему времени получены только для MRE11 и RAD50 [140, 150, 151]. Роль BRCA1 в поддержании стабильности как ядерного, так и митохондриального геномов считается универсальной [152]. Локализация других белков комплекса BASC в митохондриях еще не установлена.

Таким образом, имеются убедительные данные о роли ряда генов систем репарации ДНК в развитии дисфункции митохондрий и ответа на воздействие окислительного стресса. Наиболее полно изучено участие в этих процессах продукта гена *ATM* [153–155]. Но вовлеченность в развитие окислительного стресса может объяснять связь гена *ATM* с патогенезом ограниченного спектра заболеваний, в частности сердечно-сосудистых или нейродегенеративных. На наш взгляд, более универсальным механизмом, посредством которого белки генов систем репарации ДНК могут вносить вклад в развитие многофакторной патологии различной этиологии, является модификация иммунного ответа и воспаления.

Иммунный ответ

Наличие сопутствующих иммунологических нарушений у пациентов с моногенными заболеваниями, вызываемыми мутациями в генах систем репарации ДНК (наряду с повышенной радиочувствительностью и склонностью к развитию онкопатологии), хорошо известно. Так, у больных атаксией-телеангиэктазией (мутации в гене *ATM*) с младенчества наблюдается повышенная частота бактериальных инфекций дыхательных путей, обусловленная нарушением сборки генов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов (TCR). Аналогичные нарушения обнаружены и у пациентов с синдромами Ниймегена (мутации в гене *NBN*) и Блума (мутации в гене *BLM*) [156–158].

Формирование антигенраспознающих участков иммуноглобулинов и TCR при созревании Т- и В-лимфоцитов происходит в результате V(D)J-рекомбинации (реаранжировки) – соматической негомологичной рекомбинации. Мутации в генах некоторых белков, осуществляющих реаранжировку, приводят к развитию тяжелых комбинированных иммунодефицитов (SCID), обусловленных нарушениями в созревании и/или функционировании лимфоцитов, таких как, например,

синдром Оменна. Нарушение реаранжировки – не единственный патогенетический механизм развития SCID, кроме него описаны и такие пути, как накопление токсичных метаболитов, нарушение цитокиновой сигнализации, аномалии тимуса, снижение выживаемости лимфопоэтических клеток-предшественников. Однако стоит подчеркнуть, что повышенная радиочувствительность отмечена только у пациентов со SCID, у которых заболевание вызвано мутациями в генах белков, вовлеченных в V(D)J-рекомбинацию [159–161]. Из белков комплекса BASC в таких перестройках участвуют ATM [162, 163], MRE11 [164], NBN [164–166], RAD50 [164].

На более поздних этапах созревания лимфоцитов формирование дальнейшего разнообразия антител связано с двумя процессами: соматической гипермутацией (somatic hypermutation, SHM) и переключением синтеза классов иммуноглобулинов (class switch recombination, CSR) [167]. Нарушение этих процессов приводит к развитию редких первичных иммунодефицитов, характеризующихся отсутствием продукции переключенного изотипа (IgG, IgA или IgE) [168, 169]. Участие ферментов системы мисматч-репарации в переключении классов иммуноглобулинов описано на мышиной модели еще в 1999 г. [170]. Немного позже показали участие в этом процессе белков MRN-комплекса уже и у человека [171]. Известно, что CSR осуществляется с привлечением, в том числе, белков MRN-комплекса – MRE11, RAD50 и NBN [171, 172], а также MSH2 и MLH1 [170], PMS2 [169, 170], ATM [173], BRCA1 [174]. Все белки системы MMR также вовлечены в процессы соматической гипермутации [175, 176]. Известны мутации в генах системы MMR (*MLH1*, *MSH2*) и комплекса MRN (*NBN*, *RAD50*), приводящие к развитию синдромов дефицита антител IgAD и CVID, а также полиморфные варианты в генах различных систем репарации ДНК, ассоциированные с нарушениями процесса переключения классов иммуноглобулинов [55].

В результате анализа более миллиона историй болезней Blaire и соавт. составили список, в который вошли более 3000 высоко скоррелированных пар “менделевское заболевание/сложно наследуемое заболевание” [1]. Запрос по ключевому слову “Immunodeficiency” (иммунодефицит) позволил получить список из двух моногенных (иммунодефицит с повышенным уровнем IgM (Immunodeficiency with Increased IgM) и SCID) и 50 многофакторных заболеваний. При этом примерно в трети этих заболеваний ведущим или сопутствующим патогенетическим механизмом является воспаление (например, вирусная инфекция, ревматоидный артрит, болезнь Крона, псориаз, бронхит, угревая сыпь, острый инфаркт миокарда, катаракта, остеоартрит и т.д.).

“Менделевский код”

Опубликован список из 3276 генов, в котором выделяют три группы – гены “комплексных и менделевских заболеваний (CM)”, “комплексных, но не менделевских (CNM)” и “менделевских, но не комплексных (MNC)” [2]. Из 16 генов комплекса BASC в этом списке представлены восемь, и только один из них – ген *ATM* – относится к типу “CM”, как приводящий к атаксии-телеангиэктазии и ассоциированный с ревматоидным артритом. Два гена отнесены к категории “CNM” и ассоциированы с астмой/атопическим дерматитом (*RAD50*) и болезнью Альцгеймера (*RFC3*). Еще пять генов отнесены к категории “MNC” – *MLH1*, *PMS2*, *BRCA1*, *BLM*, *MSH2* [2]. Действительно, в каждом из этих пяти генов описаны мутации, приводящие к менделевской патологии (табл. 1). Но можно ли утверждать, что эти гены не связаны со сложно наследуемыми заболеваниями, или же такие исследования просто не проводились?

С 13 из 16 белков комплекса BASC связано развитие моногенных заболеваний (табл. 1). Мутации в генах семи из них приводят либо к развитию онкопатологии (*BRCA1*, *MLH1*, *PMS2*, *MSH2*, *MSH6*), либо к повышенной предрасположенности к раку (*ATM*, *NBN*). Мутации в восьми генах связаны с неврологическими нарушениями (*ATM*, *NBN*, *RAD50*, *MRE11*, *BRCA1* (при анемии Фанкони), *BLM*, *RFC1*, *PCNA*), а девяти – с иммунологическими нарушениями в составе синдрома (иммунодефицитные состояния – *ATM*, *NBN*, *MRE11*, *BLM*; Т-лимфомы при синдроме Туркота – *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) или в результате других мутаций в тех же генах (*NBN*, *RAD50*, *MLH1*, *MSH2*) [4]. Соответственно, можно предположить участие этих генов в развитии многофакторной патологии, в основе которой могут быть нарушения иммунных процессов, окислительный стресс и/или дисфункция митохондрий.

Ориентируясь на гипотезу о вовлеченности полиморфных вариантов в генах белков систем репарации ДНК в развитие многофакторных заболеваний, мы провели пилотное исследование ишемической болезни сердца (ИБС) и бронхиальной астмы (БА) и изучили изменчивость нескольких генов белков комплекса BASC (*ATM*, *MLH1*, *PMS2*, *NBN*, *MRE11*) при этих двух патологиях. Выявлен ряд ассоциаций с патогенетически значимыми для развития ИБС признаками: индексом массы тела и наличием периферического атеросклероза (*NBN*, *MLH1*), с уровнями липопротеидов низкой плотности (*PMS2*), с дислипидемией и индексом массы миокарда у больных ИБС (*MRE11*); с эхокардиографическими показателями (*MLH1*) [177–179]. Кроме того, выявлены ассоциации генов *ATM* и *MLH1* с БА, показано, что воздействие средовых факторов

(курение, паразитозы) значительно модифицирует проявление ассоциаций [178, 180].

Кроме того, используя приведенные в PheWeb данные, мы проанализировали ассоциированность 16 генов белков комплекса BASC с широким спектром фенотипов [181, 182]. PheWeb представляет собой общедоступный репозиторий результатов ассоциативного анализа примерно 28 млн. SNP с 1403 бинарными фенотипическими признаками (phenome-wide association studies, PheWAS). Этот анализ выполнен Биобанком Великобритании на 408961 образце ДНК европеоидов с использованием специально адаптированного статистического подхода [181, 182]. В табл. 2 представлены ассоциации с наибольшими для каждого гена уровнями значимости (в общей сложности 71 патологический фенотип различной этиологии; группировка фенотипов и их названия в тексте приведены согласно PheWeb). Исследования в формате PheWAS стали проводить лишь в последние годы в связи со значительным снижением стоимости генотипирования, но пока еще не получили широкого распространения. При этом данные интернет-ресурса PheWeb являются, пожалуй, самыми крупными.

Наибольшее количество фенотипов, ассоциированных с генами белков комплекса BASC (табл. 2), относится к нарушениям сердечно-сосудистой системы, таким как инфаркт миокарда, стенокардия, различные варианты ИБС (показаны ассоциации этих фенотипов с геном *BLM*), коронарный и церебральный атеросклероз (*BLM*, *MRE11*), заболевания периферических сосудов (*RFC4*), кровоизлияния (*MSH6*), различные варианты гипертензии (*BLM*, *PCNA*, *RAD50*) (табл. 2). В различных источниках описаны также ассоциации как с сердечно-сосудистой патологией в общем, так и ее отдельными эндофенотипами генов *ATM*, *MRE11* и *RAD50* [6–9, 54, 177–179]. Большая группа фенотипов, отнесенная к категории дерматологических нарушений (табл. 2), включает алопецию (ассоциация с геном *NBN*), заболевания волос и волосяных фолликулов (*MLH1*), ногтей (*MSH6*), сальных желез (*MLH1*), нарушения кожи и подкожной клетчатки (*BRCA1*), диффузные заболевания соединительной ткани (*RFC3*, *MSH2*). Большая часть этих признаков встречается при прогерии и/или процессах физиологического старения. Примечательно, что при мутациях в генах *ATM*, *BML*, *NBN* в комплекс синдромальных признаков входит преждевременное старение [138]. Известны ассоциации гена *NBN* с процессами старения [51], *ATM*, *MLH1* и *PMS2* – с продолжительностью жизни [42, 43, 112, 113]. К другим дерматологическим нарушениям (согласно PheWeb, табл. 2) отнесены все варианты дерматитов – как неуточненной этиологии, так и атопического/контактного (*RFC1*), в то время как астма (*RAD50*) отнесена к заболеваниям дыхательной системы наряду с кровохарканием (*PMS2*), назальными полипами (*RAD50*) и другими симптомами, затрагивающими органы дыхания (*PMS2*) (табл. 2). С БА ассоциированы гены *RAD50* [14, 52, 53], *ATM* и *MLH1* [178, 180]. И атопический дерматит, и атопическая БА относятся к аллергическим заболеваниям (мы упоминали их в контексте иммунологических патологий). Известен ряд ассоциаций рассматриваемых генов с другими иммунологическими нарушениями – аутоиммунными заболеваниями [13, 15], дефицитом IgA [116], иммунным старением Т-клеток [58] и т.д. С некоторыми психическими расстройствами (параноидальные расстройства, алкоголизм, фобии и прочие “симптомы, касающиеся головы”), согласно данным PheWeb, ассоциированы гены *BRCA1*, *MSH6*, *RFC1*, *NBN* (табл. 2); с шизофренией – ген *ATM* [10]. Вовлечение ATM-киназы в регуляцию инсулинового ответа [35, 36] логично объясняет ассоциацию этого гена с инсулиновой резистентностью [6, 44–48], сахарным диабетом и ответом больных на лечение метформином. По данным PheWeb (табл. 2) имеются ассоциации и других генов белков репарации ДНК с метаболическими нарушениями (гипотиреоз, *MLH1*), нарушение липидного обмена и избыточный вес (*BLM*, *RFC2*).

Таким образом, анализ результатов ассоциативных исследований генов белков репарации ДНК (включая информацию PheWeb (табл. 2)) позволяет сделать следующие обобщения. Роли генов белков репарации ДНК в патогенезе неоплазий и канцерогенезе посвящено огромное количество публикаций. Кроме того, выявлены ассоциации рассмотренных в настоящем обзоре генов с нарушениями сердечно-сосудистой, пищеварительной, мочеполовой, скелетно-мышечной, гемопоэтической систем, органов чувств, с эндокринными и метаболическими, психическими и неврологическими нарушениями; а также с инфекционными, респираторными, дерматологическими заболеваниями, травматическими повреждениями и реакциями организма на травмы и отравления. Соответственно, рассмотренные гены обладают более широкой сферой компетенции, чем предполагают классические представления. Все это свидетельствует о целесообразности привлечения генов данного функционального класса к исследованию генетической компоненты многофакторных заболеваний. Достаточно четко выраженные плейотропные эффекты рассмотренных генов дают основания предположить возможность их участия в развитии различных состояний организма как в норме, так и при патологии, а следовательно, объяснить ассоциацию маркеров в этих генах с широко распространенными заболеваниями.

Таблица 2. Клинические фенотипы, ассоциированные с регионами генов белков комплекса BASC*

Ген	Фенотип	Уровень значимости
BRCA1	Нарушение кожи и подкожной клетчатки (без других указаний)	$2.10E^{-07}$
	Перелом лучевой и локтевой костей	$1.30E^{-06}$
	Неуточненные заболевания глаз	$1.60E^{-06}$
	Симптомы, касающиеся головы и шеи	$1.70E^{-06}$
MSH2	Другие уточненные диффузные заболевания соединительной ткани	$2.50E^{-08}$
	Кровоизлияние или гематома	$3.00E^{-08}$
	Мышечные дистрофии и другие миопатии	$3.50E^{-07}$
	Послеоперационный шок	$4.20E^{-07}$
	Дефекты поля зрения	$7.00E^{-07}$
MSH6	Кровоизлияние или гематома, осложняющие процедуру	$3.00E^{-08}$
	Заболевания ногтей (без других указаний)	$6.60E^{-08}$
	Спайки брюшины или кишечника	$2.90E^{-07}$
	Параноидальные расстройства	$3.70E^{-07}$
	Врастающий ноготь	$5.10E^{-07}$
	Кровоизлияние (без других указаний)	$9.00E^{-07}$
MLH1	Заболевания волос и волосяных фолликулов	$2.90E^{-37}$
	Киста сальной железы	$1.80E^{-35}$
	Заболевания сальных желез	$2.30E^{-35}$
	Гипотиреоз (без других указаний)	$5.20E^{-07}$
PMS2	Симптомы со стороны дыхательной системы и другие симптомы со стороны грудной клетки	$1.70E^{-06}$
	Вторичное злокачественное новообразование органов дыхания	$1.80E^{-06}$
	Травматическая артропатия	$2.00E^{-06}$
	Кровохарканье	$2.20E^{-06}$
RFC1	Расстройства, связанные с алкоголем	$1.30E^{-07}$
	Острая почечная недостаточность	$3.10E^{-06}$
	Кровоизлияние или гематома, осложняющие процедуру	$3.10E^{-06}$
	Атопический/контактный или другой, или неуточненный дерматит	$3.70E^{-06}$
RFC2	Паховая грыжа	$6.70E^{-10}$
	Брюшная грыжа	$5.40E^{-08}$
	Тучность	$1.00E^{-06}$
	Избыточный вес, ожирение и другое переедание	$1.40E^{-06}$
RFC3	Судороги	$4.00E^{-08}$
	Диффузное заболевание соединительной ткани, неуточненное	$4.50E^{-07}$
	Эпилепсия	$1.10E^{-06}$
	Церебральная дегенерация, неуточненная	$1.30E^{-06}$

Таблица 2. Продолжение

Ген	Фенотип	Уровень значимости
RFC4	Отклонения от нормы при исследовании мочи	$2.00E^{-07}$
	Поверхностная травма без упоминания инфекции	$8.30E^{-07}$
	Заболевания периферических сосудов	$1.30E^{-06}$
	Рак дыхательной системы	$1.50E^{-06}$
RFC5	Рак мочевыводящих органов (в том числе почек и мочевого пузыря)	$9.50E^{-08}$
	Заболевания селезенки	$1.30E^{-06}$
	Расстройство мочеиспускания	$2.30E^{-06}$
	Осложнения со стороны мочевыводящих путей	$3.20E^{-06}$
PCNA	Другие заболевания сетчатки	$4.90E^{-08}$
	Эссенциальная гипертензия	$1.80E^{-07}$
	Повышенное кровяное давление	$2.00E^{-07}$
	Периапикальный абсцесс	$2.10E^{-07}$
	Сосудистые изменения и аномалии сетчатки	$4.90E^{-07}$
	Рак щитовидной железы	$5.40E^{-07}$
ATM	Лейомиома матки	$8.50E^{-11}$
	Доброкачественное новообразование матки	$3.00E^{-10}$
	Доброкачественное новообразование кожи	$3.00E^{-07}$
	Отравление агентами, в первую очередь влияющими на сердечно-сосудистую систему	$7.10E^{-07}$
	Старческая катаракта	$7.60E^{-07}$
BLM	Эссенциальная гипертензия	$3.90E^{-23}$
	Повышенное кровяное давление	$6.50E^{-23}$
	Коронарный атеросклероз	$4.90E^{-20}$
	Ишемическая болезнь сердца	$1.10E^{-17}$
	Стенокардия	$5.20E^{-11}$
	Инфаркт миокарда	$1.40E^{-10}$
	Другая форма хронической ишемической болезни сердца	$1.40E^{-10}$
	Нарушения липидного обмена	$8.80E^{-09}$
	Гиперлипидемия	$8.80E^{-09}$
MRE11	Побочные эффекты седативных средств или других депрессантов центральной нервной системы и анестетиков	$3.40E^{-07}$
	Слепота и слабое зрение	$5.30E^{-07}$
	Церебральный атеросклероз	$1.30E^{-06}$
	Нерегулярные менструальные кровотечения	$2.10E^{-06}$
NBN	Алопеция	$5.30E^{-07}$
	Простой герпес	$6.30E^{-07}$
	Фобия	$9.30E^{-07}$
	Другие и неуточненные дефекты коагуляции	$1.00E^{-06}$

Таблица 2. Окончание

Ген	Фенотип	Уровень значимости
RAD50	Астма	$2.70E^{-16}$
	Повышенное кровяное давление	$3.90E^{-09}$
	Эссенциальная гипертензия	$4.00E^{-09}$
	Назальные полипы	$4.60E^{-09}$
	Воспалительные заболевания кишечника, другие гастроэнтериты и колиты.	$8.00E^{-08}$
	Контрактура ладонной фасции (болезнь Дюпюитрена)	$1.50E^{-07}$

* Составлено по данным PheWeb version 1.1.17. Примечание. В репозитории PheWeb v. 1.1.17 приведены результаты PheWAS Британского биобанка, полученные для европеоидного населения. Методом “случай/контроль” проведен анализ 1403 фенотипов; количество индивидов с разными фенотипами в группе “случай” составляет от 51 до 77977, в группе “контроль” – от 330366 до 408908. [182]. Названия фенотипов приведены согласно PheWeb.

Работа выполнена при частичном финансировании Госзадания Министерства науки и высшего образования (№ 075-00603-19-00).

Этические нормы соблюдены. Обзор написан с использованием открытых публикаций.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blair D.R., Lyttle C.S., Mortensen J.M., Bearden C.F., Jensen A.B., Khiabanian H., Melamed R., Rabadan R., Bernstam E.V., Brunak S., Jensen L.J., Nicolae D., Shah N.H., Grossman R.L., Cox N.J., White K.P., Rzhetsky A. (2013) A nondegenerate code of deleterious variants in Mendelian loci contributes to complex disease risk. *Cell.* **155**, 70–80. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.030
2. Spataro N., Rodrıguez J.A., Navarro A., Bosch E. (2017) Properties of human disease genes and the role of genes linked to Mendelian disorders in complex disease aetiology. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 489–500. https://doi.org/10.1093/hmg/ddw405
3. Freund M.K., Burch K.S., Shi H., Mancuso N., Kichaev G., Garske K.M., Pan D.Z., Miao Z., Mohlke K.L., Laakso M., Pajukanta P., Pasaniuc B., Arboleda V.A. (2018) Phenotype-specific enrichment of Mendelian disorder genes near GWAS regions across 62 complex traits. *Am. J. Hum. Genet.* **103**, 535–552. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.08.017
4. OMIM. https://omim.org/
5. DisGeNet. www.disgenet.org
6. Li S., Zhang L., Chen T., Tian B., Deng X., Zhao Z., Yuan P., Dong B., Zhang Y., Mo X. (2011) Functional polymorphism rs189037 in the promoter region of *ATM* gene is associated with angiographically characterized coronary stenosis. *Atherosclerosis.* **219**, 694–697. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.08.040
7. Verschuren J.J., Trompet S., Deelen J., Stott D.J., Sattar N., Buckley B.M., Ford I., Heijmans B.T., Guchelaar H.J., Houwing-Duistermaat J.J., Slagboom P.E., Jukema J.W. (2013) Non-homologous end-joining pathway associated with occurrence of myocardial infarction: gene set analysis of genome-wide association study data. *PLoS One.* **8**, e56262. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056262
8. Wang L., Chu A., Buring J.E., Ridker P.M., Chasman D.I., Sesso H.D. (2014) Common genetic variations in the vitamin D pathway in relation to blood pressure. *Am. J. Hypertens.* **27**, 1387–1395. https://doi.org/10.1093/ajh/hpu049
9. Guo Z., Kozlov S., Lavin M.F., Person M.D., Paull T.T. (2010) ATM activation by oxidative stress. *Science.* **330**, 517–521. https://doi.org/10.1126/science.1192912
10. Zhang F., Xu Y., Liu P., Fan H., Huang X., Sun G., Song Y., Sham P.C. (2008) Association analyses of the interaction between the *ADSS* and *ATM* genes with schizophrenia in a Chinese population. *BMC Med. Genet.* **9**, 119. https://doi.org/10.1186/1471-2350-9-119
11. Qian Y., Chen W., Wu J., Tao T., Bi L., Xu W., Qi H., Wang Y., Guo L. (2010) Association of polymorphism of DNA repair gene *XRCC1* with sporadic late-onset Alzheimer’s disease and age of onset in elderly Han Chinese. *J. Neurol. Sci.* **295**, 62–65. https://doi.org/10.1016/j.jns.2010.05.002
12. He C., Kraft P., Chasman D.I., Buring J.E., Chen C., Hankinson S.E., Pare G., Chanock S., Ridker P.M., Hunter D.J. (2010) A large-scale candidate-gene association study of age at menarche and age at natural menopause. *Hum. Genet.* **128**, 515–527. https://doi.org/10.1007/s00439-010-0878-4
13. Lin Y.J., Lan Y.C., Wan L., Huang C.M., Lin C.W., Hsueh K.C., Chen D.Y., Lin T.H., Tsai F.J. (2010) The *NBS1* genetic polymorphisms and the risk of the systemic lupus erythematosus in Taiwanese patients. *J. Clin. Immunol.* **30**, 643–648. https://doi.org/10.1007/s10875-010-9427-0
14. Li X., Howard T.D., Zheng S.L., Haselkorn T., Peters S.P., Meyers D.A., Bleecker E.R. (2010 Genome-wide association study of asthma identifies RAD50-IL13 and HLA-DR/DQ regions. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, 328–335. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.11.018
15. Souliotis V.L., Vougas K., Gorgoulis V.G., Sfikakis P.P. (2016) Defective DNA repair and chromatin organiza-

tion in patients with quiescent systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 182. https://doi.org/10.1186/s13075-016-1081-3
16. GenOntology. http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0006281
17. Kadyrov F.A., Dzantiev L., Constantin N., Modrich P. (2006) Endonucleolytic function of MutL alpha in human mismatch repair. *Cell.* **126**, 297–308. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.039
18. Sacho E.J., Kadyrov F.A., Modrich P., Kunkel T.A., Erie D.A. (2008) Direct visualization of asymmetric adenine-nucleotide-induced conformational changes in MutL alpha. *Mol. Cell.* **29**, 112–121. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.030
19. Wang Y., Cortez D., Yazdi P., Neff N., Elledge S.J., Qin J. (2000) BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.* **14**, 927–939.
20. Daniel R., Ramcharan J., Rogakou E., Taganov K.D., Greger J.G., Bonner W., Nussenzweig A., Katz R.A., Skalka A.M. (2004) Histone H2AX is phosphorylated at sites of retroviral DNA integration but is dispensable for postintegration repair. *J. Biol. Chem.* **279**, 45810–45814. https://doi.org/10.1074/jbc.M407886200
21. Paull T.T., Rogakou E.P., Yamazaki V., Kirchgessner C.U., Gellert M., Bonner W.M. (2000) A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* **10**, 886–895. https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00610-2
22. Redon C., Pilch D.R., Rogakou E.P., Orr A.H., Lowndes N.F., Bonner W.M. (2003) Yeast histone 2A serine 129 is essential for the efficient repair of checkpoint-blind DNA damage. *EMBO J.* **4**, 678–684. https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor871
23. Furuta T., Takemura H., Liao Z.Y., Aune G.J., Redon C., Sedelnikova O.A., Pilch D.R., Rogakou E.P., Celeste A., Chen H.T., Nussenzweig A., Aladjem M.I., Bonner W.M., Pommier Y. (2003) Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J. Biol. Chem.* **278**, 20303–20312. https://doi.org/10.1074/jbc.M300198200
24. Lowndes N.F., Toh G.W.(2005) DNA repair: the importance of phosphorylating histone H2AX. *Curr. Biol.* **15**, R99–R102. https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.029
25. Morrison A.J., Shen X. (2005) DNA repair in the context of chromatin. *Cell Cycle.* **4**, 568–571.
26. Ibuki Y., Toyooka T. (2015) Evaluation of chemical phototoxicity, focusing on phosphorylated histone H2AX. *J. Radiat. Res.* **56**, 220–228. https://doi.org/10.1093/jrr/rru105
27. Georgoulis A., Vorgias C.E., Chrousos G.P., Rogakou E.P. (2017) Genome instability and γH2AX. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, E1979. https://doi.org/10.3390/ijms18091979
28. Kobayashi J., Tauchi H., Sakamoto S., Nakamura A., Morishima K., Matsuura S., Kobayashi T., Tamai K., Tanimoto K., Komatsu K. (2002) NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr. Biol.* **12**, 1846–1851. https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01259-9
29. Roossink F., Wieringa H.W., Noordhuis M.G., ten Hoor K.A., Kok M., Slagter-Menkema L., Hollema H., de Bock G.H., Pras E., de Vries E.G., de Jong S., van der Zee A.G., Schuuring E., Wisman G.B., van Vugt M.A. (2012) The role of ATM and 53BP1 as predictive markers in cervical cancer. *Int. J. Cancer.* **131**, 2056–2066. https://doi.org/10.1002/ijc.27488
30. Chen C., Zhang L., Huang N.J., Huang B., Kornbluth S. (2013) Suppression of DNA-damage checkpoint signaling by Rsk-mediated phosphorylation of Mre11. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 20605–20610. https://doi.org/10.1073/pnas.1306328110
31. Dimitrova N., de Lange T. (2009) Cell cycle-dependent role of MRN at dysfunctional telomeres: ATM signaling-dependent induction of nonhomologous end joining (NHEJ) in G1 and resection-mediated inhibition of NHEJ in G2. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 5552–5563. https://doi.org/10.1128/MCB.00476-09
32. Lavin M.F., Kozlov S., Gatei M., Kijas A.W. (2015) ATM-dependent phosphorylation of all three members of the MRN complex: from sensor to adaptor. *Biomolecules.* **5**, 2877–2902. https://doi.org/10.3390/biom5042877
33. Zgheib O., Huyen Y., DiTullio R.A. Jr., Snyder A., Venere M., Stavridi E.S., Halazonetis T.D. (2005) ATM signaling and 53BP1. *Radiother. Oncol.* **76**, 119–122. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2005.06.026
34. Ciccia A., Elledge S.J. (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell.* **40**, 179–204. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019
35. Shiloh Y., Ziv Y. (2013) The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **14**, 197–210. https://doi.org/10.1038/nrm3546
36. Choy K.R., Watters D.J. (2018) Neurodegeneration in ataxia-telangiectasia: multiple roles of ATM kinase in cellular homeostasis. *Dev. Dyn.* **247**, 33–46. https://doi.org/10.1002/dvdy.24522
37. Mochan T.A., Venere M., DiTullio R.A.Jr., Halazonetis T.D. (2003) 53BP1 and NFBD1/MDC1-Nbs1 function in parallel interacting pathways activating ataxia-telangiectasia mutated (ATM) in response to DNA damage. *Cancer Res.* **63**, 8586–8591.
38. Morita A., Tanimoto K., Murakami T., Morinaga T., Hosoi Y. (2014) Mitochondria are required for ATM activation by extranuclear oxidative stress in cultured human hepatoblastoma cell line Hep G2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**, 1286–1290. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.139
39. Navrkalova V., Kafkova L.R., Divoky V., Pospisilova S. (2015) Oxidative stress as a therapeutic perspective for ATM-deficient chronic lymphocytic leukemia patients. *Haematologica.* **100**, 994–996. https://doi.org/10.3324/haematol.2015.130260
40. Хороненкова С.В. (2016) Механизмы неканонической активации ATM-киназы. *Успехи биол. химии.* **56**, 197–210. https://fbras.ru/wp-content/uploads/ 2017/10/Khoronenkova-2016.pdf
41. Berger N.D., Stanley F.K.T., Moore S., Goodarzi A.A. (2017) ATM-dependent pathways of chromatin remodelling and oxidative DNA damage responses. *Phi-*

los. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci. **372**, 20160283. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0283

42. Chen T., Dong B., Lu Z., Tian B., Zhang J., Zhou J., Wu H., Zhang Y., Wu J., Lin P., Zhang J., Xu H., Mo X. (2010) A functional single nucleotide polymorphism in promoter of *ATM* is associated with longevity. *Mech. Ageing Dev.* **131**, 636–640. https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.08.009
43. Piaceri I., Bagnoli S., Tedde A., Sorbi S., Nacmias B. (2013) Ataxia-telangiectasia mutated (*ATM*) genetic variant in Italian centenarians. *Neurol. Sci.* **34**, 573–575. https://doi.org/10.1007/s10072-012-1188-5
44. Schiekofer S., Bobak I., Kleber M.E., Maerz W., Rudofsky G., Dugi K.A., Schneider J.G. (2014) Association between a gene variant near ataxia telangiectasia mutated and coronary artery disease in men. *Diab. Vasc. Dis. Res.* **11**, 60–63. https://doi.org/10.1177/1479164113514232
45. Joven J., Menendez J.A., Fernandez-Sender L., Espinel E., Rull A., Beltran-Debon R., Rodriguez-Gallego E., Riera-Borrull M., Pedro-Botet J., Alonso-Villaverde C., Camps J., Aragones G. (2013) Metformin: a cheap and well-tolerated drug that provides benefits for viral infections. *HIV Med.* **14**, 233–240. https://doi.org/10.1111/hiv.12000
46. Florez J.C. (2011) Does metformin work for everyone? A genome-wide association study for metformin response. *Curr. Diab. Rep.* **11**, P. 467–469. https://doi.org/10.1007/s11892-011-0220-0
47. GoDARTS and UKPDS Diabetes Pharmacogenetics Study Group; Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Zhou K., Bellenguez C., Spencer C.C., Bennett A.J., Coleman R.L., Tavendale R., Hawley S.A., Donnelly L.A., Schofield C., Groves C.J., Burch L., Carr F., Strange A., Freeman C., Blackwell J.M., Bramon E., Brown M.A., Casas J.P., Corvin A., Craddock N., Deloukas P., Dronov S., Duncanson A., Edkins S., Gray E., Hunt S., Jankowski J., Langford C., Markus H.S., Mathew C.G., Plomin R., Rautanen A., Sawcer S.J., Samani N.J., Trembath R., Viswanathan A.C., Wood N.W.; MAGIC investigators, Harries L.W., Hattersley A.T., Doney A.S., Colhoun H., Morris A.D., Sutherland C., Hardie D.G., Peltonen L., McCarthy M.I., Holman R.R., Palmer C.N., Donnelly P., Pearson E.R. (2011) Common variants near *ATM* are associated with glycemic response to metformin in type 2 diabetes. *Nat. Genet.* **43**, P. 117–120. https://doi.org/10.1038/ng.735
48. van Leeuwen N., Nijpels G., Becker M.L., Deshmukh H., Zhou K., Stricker B.H., Uitterlinden A.G., Hofman A., van't Riet E., Palmer C.N., Guigas B., Slagboom P.E., Durrington P., Calle R.A., Neil A., Hitman G., Livingstone S.J., Colhoun H., Holman R.R., McCarthy M.I., Dekker J.M., 't Hart L.M., Pearson E.R. (2012) A gene variant near *ATM* is significantly associated with metformin treatment response in type 2 diabetes: a replication and meta-analysis of five cohorts. *Diabetologia*. **55**, 1971–1977. https://doi.org/10.1007/s00125-012-2537-x
49. Haber J.E. (1998) The many interfaces of Mre11. *Cell.* **95**, 583–586.
50. Bhattacharya S., Srinivasan K., Abdisalaam S., Su F., Raj P., Dozmorov I., Mishra R., Wakeland E.K., Ghose S., Mukherjee S., Asaithamby A. (2017) RAD51 interconnects between DNA replication, DNA repair and immunity. *Nucl. Acids Res.* **45**, 4590–4605. https://doi.org/10.1093/nar/gkx126
51. Pereira-Lopes S., Tur J., Calatayud-Subias J.A., Lloberas J., Stracker T.H., Celada A. (2015) *NBS1* is required for macrophage homeostasis and functional activity in mice. *Blood*. **126**, 2502–2510. https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-637371
52. Murk W., Walsh K., Hsu L.I., Zhao L., Bracken M.B., Dewan A.T. (2011) Attempted replication of 50 reported asthma risk genes identifies a SNP in RAD50 as associated with childhood atopic asthma. *Hum. Hered.* **71**, 97–105. https://doi.org/10.1159/000319536
53. Chen J., Zhang J., Hu H., Jin Y., Xue M. (2015) Polymorphisms of *RAD50, IL33* and *IL1RL1* are associated with atopic asthma in Chinese population. *Tissue Antigens*. **86**, 443–447. https://doi.org/10.1111/tan.12688
54. Mathur P., Kaga S., Zhan L., Das D.K., Maulik N. (2005) Antibody-array technique reveals overexpression of important DNA-repair proteins during cardiac ischemic preconditioning. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **38**, 99–102. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.11.032
55. Offer S.M., Pan-Hammarstrom Q., Hammarstrom L., Harris R.S. (2010) Unique DNA repair gene variations and potential associations with the primary antibody deficiency syndromes IgAD and CVID. *PLoS One*. **5**, e12260. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012260
56. Stewart G.S., Maser R.S., Stankovic T., Bressan D.A., Kaplan M.I., Jaspers N.G., Raams A., Byrd P.J., Petrini J.H., Taylor A.M. (1999) The DNA double-strand break repair gene *hMRE11* is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell*. **99**, 577–587.
57. Aquino J., Ribeiro V., Alonso I., Ramos F., Vasconcelos M. (2017) Ataxia-telangiectasia like: una adolescente portadora de una nueva variante del gen *MRE11A* (ataxia telangiectasia-like disorder -a child with a novel variant in *MRE11A* gene). *Rev. Neurol.* **65**, 143–144.
58. Li Y., Shen Y., Hohensinner P., Ju J., Wen Z., Goodman S.B., Zhang H., Goronzy J.J., Weyand C.M. (2016) Deficient activity of the nuclease MRE11A induces T cell aging and promotes arthritogenic effector functions in patients with rheumatoid arthritis. *Immunity*. **45**, 903–916. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.013
59. Yun M.H., Hiom K. (2009) Understanding the functions of BRCA1 in the DNA-damage response. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 597–604. https://doi.org/10.1042/BST0370597
60. Lee J.H., Goodarzi A.A., Jeggo P.A., Paull T.T. (2010) 53BP1 promotes ATM activity through direct interactions with the MRN complex. *EMBO J.* **29**, 574–585. https://doi.org/10.1038/emboj.2009.372
61. Yarden R.I., Brody L.C. (1999) BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 4983–4988.
62. Joukov V., Groen A.C., Prokhorova T., Gerson R., White E., Rodriguez A., Walter J.C., Livingston D.M. (2006) The BRCA1/BARD1 heterodimer modulates ran-dependent mitotic spindle assembly. *Cell*. **127**, 539–552.

63. Zhong Q., Chen C.F., Li S., Chen Y., Wang C.C., Xiao J., Chen P.L., Sharp Z.D., Lee W.H. (1999) Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science*. **285**, 747–750. https://doi.org/10.1126/science.285.5428.747

64. Paull T.T., Cortez D., Bowers B., Elledge S.J., Gellert M. (2001) Direct DNA binding by Brca1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 6086–6091. https://doi.org/10.1073/pnas.111125998

65. Teoh H., Quan A., Creighton A.K., Bang A.K.W., Singh K.K., Shukla P.C., Gupta N., Pan Y., Lovren F., Leong-Poi H., Al-Omran M., Verma S. (2013) *BRCA1* gene therapy reduces systemic inflammatory response and multiple organ failure and improves survival in experimental sepsis. *Gene Ther*. **20**, 51–61. https://doi.org/10.1038/gt.2011.214

66. Johnson J.E., Cao K., Ryvkin P., Wang L.S., Johnson F.B. (2010) Altered gene expression in the Werner and Bloom syndromes is associated with sequences having G-quadruplex forming potential. *Nucl. Acids Res*. **38**, 1114–1122. https://doi.org/10.1093/nar/gkp1103

67. Brosh R.M. Jr. (2013) DNA helicases involved in DNA repair and their roles in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. **13**, 542–558. https://doi.org/10.1038/nrc3560

68. Kitano K. (2014) Structural mechanisms of human RecQ helicases WRN and BLM. *Front. Genet*. **5**, 366. https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00366

69. Nguyen G.H., Tang W., Robles A.I., Beyer R.P., Gray L.T., Welsh J.A., Schetter A.J., Kumamoto K., Wang X.W., Hickson I.D., Maizels N., Monnat R.J. Jr, Harris C.C. (2014) Regulation of gene expression by the BLM helicase correlates with the presence of G-quadruplex DNA motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**, 9905–9910. https://doi.org/10.1073/pnas.1404807111

70. Karow J.K., Constantinou A., Li J.L., West S.C., Hickson I.D. (2000) The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of Holliday junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 6504–6508. https://doi.org/10.1073/pnas.100448097

71. Lillard-Wetherell K., Machwe A., Langland G.T., Combs K.A., Behbehani G.K., Schonberg S.A., German J., Turchi J.J., Orren D.K., Groden J. (2004) Association and regulation of the BLM helicase by the telomere proteins TRF1 and TRF2. *Hum. Mol. Genet*. **13**, 1919–1932. https://doi.org/10.1093/hmg/ddh193

72. Xiang J., Kang L., Gao H., Wu J., Qin B., Zhou T., Zhang G., Guan H. (2019) BLM can regulate cataract progression by influencing cell vitality and apoptosis. *Exp. Eye Res*. **178**, 99–107. https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.08.022

73. Babbe H., McMenamin J., Hobeika E., Wang J., Rodig S.J., Reth M., Leder P. (2009) Genomic instability resulting from Blm deficiency compromises development, maintenance, and function of the B cell lineage. *J. Immunol*. **182**, 347–360. https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.1.347

74. Qian X., Feng S., Xie D., Feng D., Jiang Y., Zhang X. (2017) RecQ helicase BLM regulates prostate cancer cell proliferation and apoptosis. *Oncol. Lett*. **14**, 4206–4212. https://doi.org/10.3892/ol.2017.6704

75. Votino C., Laudanna C., Parcesepe P., Giordano G., Remo A., Manfrin E., Pancione M. (2017) Aberrant BLM cytoplasmic expression associates with DNA damage stress and hypersensitivity to DNA-damaging agents in colorectal cancer. *J. Gastroenterol*. **52**, 327–340. https://doi.org/10.1007/s00535-016-1222-0

76. Rapakko K., Heikkinen K., Karppinen S.M., Erkko H., Winqvist R. (2007) Germline alterations in the *53BP1* gene in breast and ovarian cancer families. *Cancer Lett*. **245**, 337–340. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.01.021

77. Loizidou M.A., Michael T., Neuhausen S.L., Newbold R.F., Marcou Y., Kakouri E., Daniel M., Papadopoulos P., Malas S., Hadjisavvas A., Kyriacou K. (2009) DNA-repair genetic polymorphisms and risk of breast cancer in Cyprus. *Breast Cancer Res. Treat*. **115**, 623–627. https://doi.org/10.1007/s10549-008-0084-4

78. Schuetz J.M., MaCarthur A.C., Leach S., Lai A.S., Gallagher R.P., Connors J.M., Gascoyne R.D., Spinelli J.J., Brooks-Wilson A.R. (2009) Genetic variation in the *NBS1, MRE11, RAD50* and *BLM* genes and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *BMC Med. Genet*. **10**, 117. https://doi.org/10.1186/1471-2350-10-117

79. Pennington K.P., Walsh T., Harrell M.I., Lee M.K., Pennil C.C., Rendi M.H., Thornton A., Norquist B.M., Casadei S., Nord A.S., Agnew K.J., Pritchard C.C., Scroggins S., Garcia R.L., King M.C., Swisher E.M. (2014) Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clin. Cancer Res*. **20**, 764–775. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2287

80. Damiola F., Pertesi M., Oliver J., Le Calvez-Kelm F., Voegele C., Young E.L., Robinot N., Forey N., Durand G., Vallee M.P., Tao K., Roane T.C., Williams G.J., Hopper J.L., Southey M.C., Andrulis I.L., John E.M., Goldgar D.E., Lesueur F., Tavtigian S.V. (2014) Rare key functional domain missense substitutions in MRE11A, RAD50, and NBN contribute to breast cancer susceptibility: results from a Breast Cancer Family Registry case-control mutation-screening study. *Breast Cancer Res*. **16**, R58. https://doi.org/10.1186/bcr3669

81. Janku F., Kaseb A.O., Tsimberidou A.M., Wolff R.A., Kurzrock R. (2014) Identification of novel therapeutic targets in the PI3K/AKT/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma using targeted next generation sequencing. *Oncotarget*. **5**, 3012–3022. https://doi.org/10.18632/oncotarget.1687

82. Ramus S.J., Song H., Dicks E., Tyrer J.P., Rosenthal A.N., Intermaggio M.P., Fraser L., Gentry-Maharaj A., Hayward J., Philpott S., Anderson C., Edlund C.K., Conti D., Harrington P., Barrowdale D., Bowtell D.D., Alsop K., Mitchell G.; AOCS Study Group, Cicek M.S., Cunningham J.M., Fridley B.L., Alsop J., Jimenez-Linan M., Poblete S., Lele S., Sucheston-Campbell L., Moysich K.B., Sieh W., McGuire V., Lester J., Bogdanova N., Durst M., Hillemanns P.; Ovarian Cancer Association Consortium, Odunsi K., Whittemore A.S., Karlan B.Y., Dork T., Goode E.L., Menon U., Jacobs I.J., Antoniou A.C., Pharoah P.D., Gayther S.A. (2015) Germline muta-

tions in the *BRIP1, BARD1, PALB2*, and *NBN* genes in women with ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **107**, pii: djv214.
https://doi.org/10.1093/jnci/djv214

83. Smolarz B., Michalska M.M., Samulak D., Romanowicz H., Wojcik L. (2019) Polymorphism of DNA repair genes via homologous recombination (HR) in ovarian cancer. *Pathol. Oncol. Res.* **25**, 1607–1614.
https://doi.org/10.1007/s12253-019-00604-5
84. Kang Z., Zhu Y., Zhang Q.A., Dong L., Xu F., Zhang X., Guan M. (2019) Methylation and expression analysis of mismatch repair genes in extramammary Paget's disease. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **33**, 874–879.
https://doi.org/10.1111/jdv.15404
85. Slavin T.P., Sun C.L., Chavarri-Guerra Y., Sedrak M.S., Katheria V., Castillo D., Herzog J., Dale W., Hurria A., Weitzel J.N. (2020) Older breast cancer survivors may harbor hereditary cancer predisposition pathogenic variants and are at risk for clonal hematopoiesis. *J. Geriatr. Oncol.* **11**, 316–319.
https://doi.org/10.1016/j.jgo.2019.09.004
86. Marra G., Schar P. (1999) Recognition of DNA alterations by the mismatch repair system. *Biochem. J.* **338**, 1–13.
87. Jiricny J. (2006) The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**, 335–346.
https://doi.org/10.1038/nrm1907
88. Luo Y., Lin F.T., Lin W.C. (2004) ATM-mediated stabilization of hMutL DNA mismatch repair proteins augments p53 activation during DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6430–6444.
https://doi.org/10.1128/MCB.24.14.6430-6444.2004
89. Siegl-Cachedenier I., Munoz P., Flores J.M., Klatt P., Blasco M.A. (2007) Deficient mismatch repair improves organismal fitness and survival of mice with dysfunctional telomeres. *Genes Dev.* **21**, 2234–2247.
https://doi.org/10.1101/gad.430107
90. Paquis-Flucklinger V., Santucci-Darmanin S., Paul R., Saunieres A., Turc-Carel C., Desnuelle C. (1997) Cloning and expression analysis of a meiosis-specific *MutS* homolog: the human *MSH4* gene. *Genomics.* **44**, 188–194.
91. Bocker T., Barusevicius A., Snowden T., Rasio D., Guerrette S., Robbins D., Schmidt C., Burczak J., Croce C.M., Copeland T., Kovatich A.J., Fishel R. (1999) hMSH5: a human MutS homologue that forms a novel heterodimer with hMSH4 and is expressed during spermatogenesis. *Cancer Res.* **59**, 816–822.
92. Snowden T., Shim K.S., Schmutte C., Acharya S., Fishel R. (2008) hMSH4-hMSH5 adenosine nucleotide processing and interactions with homologous recombination machinery. *J. Biol. Chem.* **283**, 145–154.
https://doi.org/10.1074/jbc.M704060200
93. Cannavo E., Gerrits B., Marra G., Schlapbach R., Jiricny J. (2007) Characterization of the interactome of the human MutL homologues MLH1, PMS1, and PMS2. *J. Biol. Chem.* **282**, 2976–2986.
https://doi.org/10.1074/jbc.M609989200
94. Raschle M., Marra G., Nystrom-Lahti M., Schar P., Jiricny J. (1999) Identification of hMutLbeta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. *J. Biol. Chem.* **274**, 32368–32375.
https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.32368
95. Siehler S.Y., Schrauder M., Gerischer U., Cantor S., Marra G., Wiesmüller L. (2009) Human MutL-complexes monitor homologous recombination independently of mismatch repair. *DNA Repair (Amst.).* **8**, 242–252.
https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.10.011
96. van Oers J.M., Roa S., Werling U., Liu Y., Genschel J., Hou H. Jr., Sellers R.S., Modrich P., Scharff M.D., Edelmann W. (2010) PMS2 endonuclease activity has distinct biological functions and is essential for genome maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 13384–13389.
https://doi.org/10.1073/pnas.1008589107
97. Hamilton S.R., Liu B., Parsons R.E., Papadopoulos N., Jen J., Powell S.M., Krush A.J., Berk T., Cohen Z., Tetu B, Burger P.C., Wood P.A., Taqi F., Booker S.V., Petersen G.M., Offerhaus G.J.A., Tersmette A.C., Giardiello F.M., Vogelstein B., Kinzler K.W. (1995) The molecular basis of Turcot's syndrome. *N. Engl. J. Med.* **332**, 839–847.
https://doi.org/10.1056/NEJM199503303321302
98. Ou J., Rasmussen M., Westers H., Andersen S.D., Jager P.O., Kooi K.A., Niessen R.C., Eggen B.J., Nielsen F.C., Kleibeuker J.H., Sijmons R.H., Rasmussen L.J., Hofstra R.M. (2009) Biochemical characterization of MLH3 missense mutations does not reveal an apparent role of MLH3 in Lynch syndrome. *Genes Chromosomes Cancer.* **48**, 340–350.
https://doi.org/10.1002/gcc.20644
99. Senter L., Clendenning M., Sotamaa K., Hampel H., Green J., Potter J.D., Lindblom A., Lagerstedt K., Thibodeau S.N., Lindor N.M., Young J., Winship I., Dowty J.G., White D.M., Hopper J.L., Baglietto L., Jenkins M.A., de la Chapelle A. (2008) The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germline PMS2 mutations. *Gastroenterology.* **135**, 419–428.
https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.04.026
100. Farrell M.P., Hughes D.J., Drost M., Wallace A.J., Cummins R.J., Fletcher T.A., Meany M.A., Kay E.W., de Wind N., Power D.G., Andrews E.J., Green A.J., Gallagher D.J. (2013) Multivariate analysis of *MLH1* c.1664T>C (p.Leu555Pro) mismatch repair gene variant demonstrates its pathogenicity. *Fam. Cancer.* **12**, 741–747.
https://doi.org/10.1007/s10689-013-9652-9
101. Rossi L., Le Frere-Belda M.A., Laurent-Puig P., Buecher B., De Pauw A., Stoppa-Lyonnet D., Canlorbe G., Caron O., Borghese B., Colas C., Delhomelle H., Chabbert-Buffet N., Grandjouan S., Lecuru F., Bats A.S. (2017) Clinicopathologic characteristics of endometrial cancer in Lynch syndrome: a French multicenter study. *Int. J. Gynecol. Cancer.* **27**, 953–960.
https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000985
102. Risinger J.I., Umar A., Boyd J., Berchuck A., Kunkel T.A., Barrett J.C. (1996) Mutation of *MSH3* in endometrial cancer and evidence for its functional role in heteroduplex repair. *Nat. Genet.* **14**, 102–105.
103. Simpkins S.B., Bocker T., Swisher E.M., Mutch D.G., Gersell D.J., Kovatich A.J., Palazzo J.P., Fishel R., Goodfellow P.J. (1999) *MLH1* promoter methylation and gene silencing is the primary cause of microsatellite instability in sporadic endometrial cancers. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 661–666.
https://doi.org/10.1093/hmg/8.4.661
104. Stefansson I., Akslen L.A., MacDonald N., Ryan A., Das S., Jacobs I.J., Salvesen H.B. (2002) Loss of

hMSH2 and hMSH6 expression is frequent in sporadic endometrial carcinomas with microsatellite instability: a population-based study. *Clin. Cancer Res.* **8**, 138–143.

105. Taylor N.P., Powell M.A., Gibb R.K., Rader J.S., Huettner P.C., Thibodeau S.N., Mutch D.G., Goodfellow P.J. (2006) MLH3 mutation in endometrial cancer. *Cancer Res.* **66**, 7502–7508. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0248
106. Chen C.C., Yang S.Y., Liu C.J., Lin C.L., Liaw Y.F., Lin S.M., Lee S.D., Chen P.J., Chen C.J., Yu M.W. (2005) Association of cytokine and DNA repair gene polymorphisms with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *Int. J. Epidemiol.* **34**, 1310–1318. https://doi.org/10.1093/ije/dyi191
107. Rubio-Del-Campo A., Salinas-Sanchez A.S., Sanchez-Sanchez F., Gimenez-Bachs J.M., Donate-Moreno M.J., Pastor-Navarro H., Carrion-Lopez P., Escribano J. (2008) Implications of mismatch repair genes *hMLH1* and *hMSH2* in patients with sporadic renal cell carcinoma. *BJU Int.* **102**, 504–509. https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2008.07581.x
108. Zhang Y., Shu Y.M., Wang S.F., Da B.H., Wang Z.H., Li H.B. (2010) Stabilization of mismatch repair gene *PMS2* by glycogen synthase kinase 3beta is implicated in the treatment of cervical carcinoma. *BMC Cancer.* **10**, 58. https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-58
109. Vilkin A., Niv Y. (2011) Association between hMLH1 hypermethylation and JC virus (JCV) infection in human colorectal cancer (CRC). *Clin. Epigenetics.* **2**, 1–5. https://doi.org/10.1007/s13148-010-0013-3
110. Shinsato Y., Furukawa T., Yunoue S., Yonezawa H., Minami K., Nishizawa Y., Ikeda R., Kawahara K., Yamamoto M., Hirano H., Tokimura H., Arita K. (2013) Reduction of MLH1 and PMS2 confers temozolomide resistance and is associated with recurrence of glioblastoma. *Oncotarget.* **4**, 2261–2270. https://doi.org/10.18632/oncotarget.1302
111. Vageli D.P., Zaravinos A., Daniil Z., Dahabreh J., Doukas S.G., Spandidos D.A., Gourgoulianis K.I., Koukoulis G.K. (2013) *hMSH2* and *hMLH1* gene expression patterns differ between lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: correlation with patient survival and response to adjuvant chemotherapy treatment. *Int. J. Biol. Markers.* **27**, e400–4. https://doi.org/10.5301/JBM.2012.9420
112. Kim D.J., Yi S.M., Lee S.Y., Kang H.S., Choi Y.H., Song Y.W., Park S.C. (2006) Association between the *MLH1* gene and longevity. *Hum. Genet.* **119**, 353–354. https://doi.org/10.1007/s00439-006-0148-7
113. Han J., Ryu S., Moskowitz D.M., Rothenberg D., Leahy D.J., Atzmon G., Barzilai N., Suh Y. (2013) Discovery of novel non-synonymous SNP variants in 988 candidate genes from 6 centenarians by target capture and nextgeneration sequencing. *Mech. Ageing Dev.* **134**, 478–485. https://doi.org/10.1016/j.mad.2013.01.005
114. Mandon-Pepin B., Touraine P., Kuttenn F., Derbois C., Rouxel A., Matsuda F., Nicolas A., Cotinot C., Fellous M. (2008) Genetic investigation of four meiotic genes in women with premature ovarian failure. *Eur. J. Endocrinol.* **158**, 107–115. https://doi.org/10.1530/EJE-07-0400
115. Guo T., Zhao S., Zhao S., Chen M., Li G., Jiao X., Wang Z., Zhao Y., Qin Y., Gao F., Chen Z.J. (2017) Mutations in MSH5 in primary ovarian insufficiency. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 1452–1457. https://doi.org/10.1093/hmg/ddx044
116. Sekine H., Ferreira R.C., Pan-Hammarstrom Q., Graham R.R., Ziemba B., de Vries S.S., Liu J., Hippen K., Koeuth T., Ortmann W., Iwahori A., Elliott M.K., Offer S., Skon C., Du L., Novitzke J., Lee A.T., Zhao N., Tompkins J.D., Altshuler D., Gregersen P.K., Cunningham-Rundles C., Harris R.S., Her C., Nelson D.L., Hammarstrom L., Gilkeson G.S., Behrens T.W. (2007) Role for Msh5 in the regulation of Ig class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 7193–7198. https://doi.org/10.1073/pnas.0700815104
117. Aston K.I., Krausz C., Laface I., Ruiz-Castane E., Carrell D.T. (2010) Evaluation of 172 candidate polymorphisms for association with oligozoospermia or azoospermia in a large cohort of men of European descent. *Hum. Reprod.* **25**, 1383–1397. https://doi.org/10.1093/humrep/deq081
118. Herberg M., Siebert S., Quaas M., Thalheim T., Rother K., Hussong M., Altmuller J., Kerner C., Galle J., Schweiger M.R., Aust G. (2019) Loss of Msh2 and a single-radiation hit induce common, genome-wide, and persistent epigenetic changes in the intestine. *Clin. Epigenetics.* **11**, 65. https://doi.org/10.1186/s13148-019-0639-8
119. Li Y., Gan S., Ren L., Yuan L., Liu J., Wang W., Wang X., Zhang Y., Jiang J., Zhang F., Qi X. (2018) Multifaceted regulation and functions of replication factor C family in human cancers. *Am. J. Cancer Res.* **8**, 1343–1355. PMID: 30210909
120. Okumura K., Nogami M., Taguchi H., Dean F.B., Chen M., Pan Z.Q., Hurwitz J., Shiratori A., Murakami Y., Ozawa K., Eki T. (1995) Assignment of the 36.5-kDa (RFC5), 37-kDa (RFC4), 38-kDa (RFC3), and 40-kDa (RFC2) subunit genes of human replication factor C to chromosome bands 12q24.2-q24.3, 3q27, 13q12.3-q13, and 7q11.23. *Genomics.* **25**, 274–278. https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80135-9
121. Moldovan G.L., Pfander B., Jentsch S. (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell.* **129**, 665–679. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.003
122. Witko-Sarsat V., Mocek J., Bouayad D., Tamassia N., Ribeil J.A., Candalh C., Davezac N., Reuter N., Mouthon L., Hermine O., Pederzoli-Ribeil M., Cassatella M.A. (2010) Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival. *J. Exp. Med.* **207**, 2631–2645. https://doi.org/10.1084/jem.20092241
123. Cazzalini O., Sommatis S., Tillhon M., Dutto I., Bachi A., Rapp A., Nardo T., Scovassi A.I., Necchi D., Cardoso M.C., Stivala L.A., Prosperi E. (2014) CBP and p300 acetylate PCNA to link its degradation with nucleotide excision repair synthesis. *Nucl. Acids Res.* **42**, 8433–8448. https://doi.org/10.1093/nar/gku533
124. Rashid S. (2017) Targeting the mitochondria for the treatment of MLH1-deficient disease / Queen Mary University of London. PhD Thesis. 1–248. http://qmro.qmul.ac.uk/xmlui/handle/123456789/30924
125. KEGG PATHWAY Database. https://www.genome.jp/kegg/pathway.html

126. Uchiumi F., Ohta T., Tanuma S. (1996) Replication factor C recognizes 5'-phosphate ends of telomeres. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **229**, 310–315. https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1798
127. Ohashi E., Tsurimoto T. (2017) Functions of multiple clamp and clamp-loader complexes in eukaryotic. In: *DNA Replication. From Old Principles to New Discoveries.* Eds Masai H., Foiani M. *Adv. Exp. Med. Biol*. 135–162. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6955-0_7
128. Liao Y.H., Ren J.T., Zhang W., Zhang Z.Z., Lin Y., Su F.X., Jia W.H., Tang L.Y., Ren Z.F. (2017) Polymorphisms in homologous recombination repair genes and the risk and survival of breast cancer. *J. Gene Med*. **19**, e2988. https://doi.org/10.1002/jgm.2988
129. Hua Q., Gu X., Chen X., Song W., Wang A., Chu J. (2019) IL-8 is involved in radiation therapy resistance of esophageal squamous cell carcinoma via regulation of PCNA. *Arch. Biochem. Biophys*. **676**, 108158. https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.108158
130. Ye X., Ling B., Xu H., Li G., Zhao X., Xu J., Liu J., Liu L. (2020) Clinical significance of high expression of proliferating cell nuclear antigen in non-small cell lung cancer. *Medicine (Baltimore)*. **99**, e19755. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000019755
131. Cortese A., Simone R., Sullivan R., Vandrovcova J., Tariq H., Yau W.Y., Humphrey J., Jaunmuktane Z., Sivakumar P., Polke J., Ilyas M., Tribollet E., Tomaselli P.J., Devigili G., Callegari I., Versino M., Salpietro V., Efthymiou S., Kaski D., Wood N.W., Andrade N.S., Buglo E., Rebelo A., Rossor A.M., Bronstein A., Fratta P., Marques W.J., Zuchner S., Reilly M.M., Houlden H. (2019) Biallelic expansion of an intronic repeat in RFC1 is a common cause of late-onset ataxia. *Nat. Genet*. **51**, 649–658. https://doi.org/10.1038/s41588-019-0372-4
132. Arora M., Lindgren B., Basu S., Nagaraj S., Gross M., Weisdorf D., Thyagarajan B. (2010) Polymorphisms in the base excision repair pathway and graft-versus-host disease. *Leukemia*. **24**, 1470–1475. https://doi.org/10.1038/leu.2010.139
133. Peoples R., Perez-Jurado L., Wang Y.K., Kaplan P., Francke U. (1996) The gene for replication factor C subunit 2 (RFC2) is within the 7q11.23 Williams syndrome deletion. *Am. J. Hum. Genet*. **58**, 1370–1373. PMID: 8651315
134. Martindale D.W., Wilson M.D., Wang D., Burke R.D., Chen X., Duronio V., Koop B.F. (2000) Comparative genomic sequence analysis of the Williams syndrome region (LIMK1-RFC2) of human chromosome 7q11.23. *Mamm. Genome*. **11**, 890–898. https://doi.org/10.1007/s003350010166
135. Baple E.L., Chambers H., Cross H.E., Fawcett H., Nakazawa Y., Chioza B.A., Harlalka G.V., Mansour S., Sreekantan-Nair A., Patton M.A., Muggenthaler M., Rich P., Wagner K., Coblentz R., Stein C.K., Last J.I., Taylor A.M., Jackson A.P., Ogi T., Lehmann A.R., Green C.M., Crosby A.H. (2014) Hypomorphic PCNA mutation underlies a human DNA repair disorder. *J. Clin. Invest*. **124**, 3137–3146. https://doi.org/10.1172/JCI74593
136. Zhang Z., Zhang Z., Wang H., Zhang G., Hu D., Xiong J., Xiong N., Wang T., Cao X., Mao L. (2014) Proliferating cell nuclear antigen binds DNA polymerase-β and mediates 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neuronal death. *PLoS One*. **9**, e106669. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106669
137. Li D.W., Li G.R., Zhang B.L., Feng J.J., Zhao H. (2016) Damage to dopaminergic neurons is mediated by proliferating cell nuclear antigen through the p53 pathway under conditions of oxidative stress in a cell model of Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Med*. **37**, 429–435. https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2430
138. Maciejczyk M., Mikoluc B., Pietrucha B., Heropolitanska-Pliszka E., Pac M., Motkowski R., Car H. (2017) Oxidative stress, mitochondrial abnormalities and antioxidant defense in ataxia-telangiectasia, Bloom syndrome and Nijmegen breakage syndrome. *Redox Biol*. **11**, 375–383. https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.030
139. Greaves L.C., Reeve A.K., Taylor R.W., Turnbull D.M. (2012) Mitochondrial DNA and disease. *J. Pathol*. **226**, 274–286. https://doi.org/10.1002/path.3028
140. Vasileiou P.V.S., Mourouzis I., Pantos C. (2017) Principal aspects regarding the maintenance of mammalian mitochondrial genome integrity. *Int. J. Mol. Sci*. **18**, 1821. https://doi.org/10.3390/ijms18081821
141. Gorrini C., Harris I., Mak T. (2013) Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov*. **12**, 931–947. https://doi.org/10.1038/nrd4002
142. Song S, Pursell Z.F., Copeland W.C., Longley M.J., Kunkel T.A., Mathews C.K. (2005) DNA precursor asymmetries in mammalian tissue mitochondria and possible contribution to mutagenesis through reduced replication fidelity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 4990–4995. https://doi.org/10.1073/pnas.0500253102
143. Kalam M.A., Haraguchi K., Chandani S., Loechler E.L., Moriya M., Greenberg M.M., Basu A.K. (2006) Genetic effects of oxidative DNA damages: comparative mutagenesis of the imidazole ring-opened formamidopyrimidines (Fapy lesions) and 8-oxo-purines in simian kidney cells. *Nucl. Acids Res*. **34**, 2305–2315. https://doi.org/10.1093/nar/gkl099
144. Martin S.A., Hewish M., Sims D., Lord C.J., Ashworth A. (2011) Parallel high-throughput RNA interference screens identify PINK1 as a potential therapeutic target for the treatment of DNA mismatch repair-deficient cancers. *Cancer Res*. **71**, 1836–1848. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2836
145. Rashid S., Freitas M.O., Cucchi D., Bridge G., Yao Z., Gay L., Williams M., Wang J., Suraweera N., Silver A., McDonald S.A.C., Chelala C., Szabadkai G., Martin S.A. (201) MLH1 deficiency leads to deregulated mitochondrial metabolism. *Cell Death Dis*. **10**, 795. https://doi.org/10.1038/s41419-019-2018-y
146. Storr S.J., Woolston C.M., Martin S.G. (2012) Base excision repair, the redox environment and therapeutic implications. *Curr. Mol. Pharmacol*. **5**, 88–101. PMID: .22122466
147. Зиновкина Л.А. (2018) Механизмы репарации митохондриальной ДНК млекопитающих. *Биохимия*. **83**, 349–367.
148. Valentin-Vega Y.A., Maclean K.H., Tait-Mulder J., Milasta S., Steeves M., Dorsey F.C., Cleveland J.L., Green D.R., Kastan M.B. (2012) Mitochondrial dys-

function in ataxia-telangiectasia. *Blood*. **119**, 1490–1500.
https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-373639

149. Brown K.D., Rathi A., Kamath R., Beardsley D.I., Zhan Q., Mannino J.L., Baskaran R. (2003) The mismatch repair system is required for S-phase checkpoint activation. *Nat. Genet.* **33**, 80–84.
https://doi.org/10.1038/ng1052
150. Tadi S.K., Sebastian R., Dahal S., Babu R.K., Choudhary B., Raghavan S.C. (2016) Microhomology-mediated end joining is the principal mediator of double-strand break repair during mitochondrial DNA lesions. *Mol. Biol. Cell*. **27**, 223–235.
https://doi.org/10.1091/mbc.E15-05-0260
151. Seol J.H., Shim E.Y., Lee S.E. (2018) Microhomology-mediated end joining: good, bad and ugly. *Mutat. Res.* **809**, 81–87.
https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.07.002
152. Coene E.D., Hollinshead M.S., Waeytens A.A., Schelfhout V.R., Eechaute W.P., Shaw M.K., Van Oostveldt P.M., Vaux D.J. (2005) Phosphorylated BRCA1 is predominantly located in the nucleus and mitochondria. *Mol. Biol. Cell*. **16**, 997–1010.
https://doi.org/10.1091/mbc.e04-10-0895
153. Rotman G., Shiloh Y. (1997) Ataxia-telangiectasia: is ATM a sensor of oxidative damage and stress? *Bioessays*. **19**, 911–917.
154. Okuno Y., Nakamura-Ishizu A., Otsu K., Suda T., Kubota Y. (2012) Pathological neoangiogenesis dependson oxidative stress regulation by ATM. *Nat. Med.* **18**, 1208–1216.
https://doi.org/10.1038/nm.2846
155. Ambrose M., Gatti R.A. (2013) Pathogenesis of ataxia-telangiectasia: the next generation of ATM functions. *Blood*. **121**, 4036–4045. .
https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-456897
156. Bonilla F.A.1, Geha R.S. (2003) Primary immunodeficiency diseases. *J. Allergy Clin. Immunol*. **111**, S571–581.
https://doi.org/10.1067/mai.2003.86
157. Geha R.S., Notarangelo L.D., Casanova J.L., Chapel H., Conley M.E., Fischer A., Hammarstrom L., Nonoyama S., Ochs H.D., Puck J.M., Roifman C., Seger R., Wedgwood J.; International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. (2007) Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J. Allergy Clin. Immunol*. **120**, 776–794.
https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.08.053
158. Bonilla F.A., Barlan I., Chapel H., Costa-Carvalho B.T., Cunningham-Rundles C., de la Morena M.T., Espinosa-Rosales F.J., Hammarstrom L., Nonoyama S., Quinti I., Routes J.M., Tang M.L., Warnatz K. (2016) International Consensus Document (ICON): common variable immunodeficiency disorders. *J. Allergy. Clin. Immunol. Pract*. **4**, 38–59.
https://doi.org/10.1016/j.jaip.2015.07.025
159. Lim M.S., Elenitoba-Johnson K.S. (2004) The molecular pathology of primary immunodeficiencies. *J. Mol. Diagn*. **6**, 59–83.
https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60493-X
160. Cirillo E., Giardino G., Gallo V., D'Assante R., Grasso F., Romano R., Di Lillo C., Galasso G., Pignata C. (2015) Severe combined immunodeficiency–an update. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. **1356**, 90–106.
https://doi.org/10.1111/nyas.12849
161. Kumrah R., Vignesh P., Patra P., Singh A., Anjani G., Saini P., Sharma M., Kaur A., Rawat A. (2019) Genetics of severe combined immunodeficiency. *Genes Dis*. **24**, 52–61.
https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.07.004
162. Bredemeyer A.L., Sharma G.G., Huang C.Y., Helmink B.A., Walker L.M., Khor K.C., Nuskey B., Sullivan K.E., Pandita T.K., Bassing C.H., Sleckman B.P. (2006) ATM stabilizes DNA double-strand-break complexes during V(D)J recombination. *Nature*. **442**, 466–470.
https://doi.org/10.1038/nature04866
163. Zha S., Guo C., Boboila C., Oksenych V., Cheng H.-L., Zhang Y., Wesemann D.R., Yuen G., Patel H., Goff P.H., Dubois R.L., Alt F.W. (2011) ATM damage response and XLF repair factor are functionally redundant in joining DNA breaks. *Nature*. **469**, 250–254.
https://doi.org/10.1038/nature09604
164. Helmink B.A., Bredemeyer A.L., Lee B.-S., Huang C.-Y., Sharma G.G., Walker L.M., Bednarski J.J., Lee W.-L., Pandita T.K., Bassing C.H., Sleckman B.P. (2009) MRN complex function in the repair of chromosomal Rag-mediated DNA double-strand breaks. *J. Exp. Med*. **206**, 669–679.
https://doi.org/10.1084/jem.20081326
165. Chen H.T., Bhandoola A., Difilippantonio M.J., Zhu J., Brown M.J., Tai X., Rogakou E.P., Brotz T.M., Bonner W.M., Ried T., Nussenzweig A. (2000) Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX. *Science*. **290**, 1962–1965.
https://doi.org/10.1126/science.290.5498.1962
166. Saidi A., Li T., Weih F., Concannon P., Wang Z.Q. (2010) Dual functions of Nbs1 in the repair of DNA breaks and proliferation ensure proper V(D)J recombination and T-cell development. *Mol. Cell. Biol*. **30**, 5572–5581.
https://doi.org/10.1128/MCB.00917-10
167. Альтшулер Е.П., Серебряная Д.В., Катруха А.Г. (2010) Получение рекомбинантных антител и способы увеличения их аффинности. *Успехи биол. химии*. **50**, 203–258.
168. Peron S., Pan-Hammarstrom Q., Imai K., Du L., Taubenheim N., Sanal O., Marodi L., Bergelin-Besançon A., Benkerrou M., de Villartay J.P., Fischer A., Revy P., Durandy A. (2007) A primary immunodeficiency characterized by defective immunoglobulin class switch recombination and impaired DNA repair. *J. Exp. Med*. **204**, 1207–1216.
https://doi.org/10.1084/jem.20070087
169. Peron S., Metin A., Gardes P., Alyanakian M.A., Sheridan E., Kratz C.P., Fischer A., Durandy A. (2008) Human PMS2 deficiency is associated with impaired immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med*. **205**, 2465–2472.
https://doi.org/10.1084/jem.20080789
170. Schrader C.E., Edelmann W., Kucherlapati R., Stavnezer J. (1999) Reduced isotype switching in splenic B cells from mice deficient in mismatch repair enzymes. *J. Exp. Med*. **190**, 323–330.
https://doi.org/10.1084/jem.190.3.323
171. Lahdesmaki A., Taylor A.M., Chrzanowska K.H., Pan-Hammarstrom Q. (2004) Delineation of the role

of the Mre11 complex in class switch recombination. *J. Biol. Chem.* **279**, 16479–16487. https://doi.org/10.1074/jbc.M312796200

172. Dinkelmann M., Spehalski E., Stoneham T., Buis J., Wu Y., Sekiguchi J.M., Ferguson D.O. (2009) Multiple functions of MRN in end-joining pathways during isotype class switching. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 808–813. https://doi.org/10.1038/nsmb.1639
173. Pan-Hammarstrom Q., Dai S., Zhao Y., van Dijk-Hard I.F., Gatti R.A., Borresen-Dale A.L., Hammarstrom L. (2003) ATM is not required in somatic hypermutation of VH, but is involved in the introduction of mutations in the switch mu region. *J. Immunol.* **170**, 3707–3716. https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.7.3707
174. Yun M.H., Hiom K. (2009) Understanding the functions of BRCA1 in the DNA-damage response. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 597–604. https://doi.org/10.1042/BST0370597
175. Chahwan R., Edelmann W., Scharff M.D., Roa S. (2011) Mismatch-mediated error prone repair at the immunoglobulin genes. *Biomed. Pharmacother.* **65**, 529–536. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2011.09.001
176. Chahwan R., van Oers J.M., Avdievich E., Zhao C., Edelmann W., Scharff M.D., Roa S. (2012) The ATPase activity of MLH1 is required to orchestrate DNA double-strand breaks and end processing during class switch recombination. *J. Exp. Med.* **209**, 671–678. https://doi.org/10.1084/jem.20111531
177. Бабушкина Н.П., Постригань А.Е., Кучер А.Н. (2018) Вовлеченность генов систем репарации ДНК в развитие сердечно-сосудистой патологии. *Сб.: "Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике"*. Под ред. Масленникова А.Б. Новосибирск: Академиздат. 48–62.
178. Babushkina N., Postrigan A., Kucher A. (2018) Association rs189037 in the *ATM* gene with bronchial asthma taking into account environmental factors. *BGRS\SB-2018: systems biology and biomedicine (SBioMed-2018) Symp.* (2018) Novosibirsk, Russia, Abstracts book, P. 16.
179. Бабушкина Н.П., Постригань А.Е., Кучер А.Н. (2018) Вовлеченность гена *MLH1* в формирование клинических особенностей ИБС. *Российский национальный конгресс кардиологов. "Новые технологии – в практику здравоохранения"*. Москва, Россия, сборник тезисов. С. 1003.
180. Бабушкина Н.П., Постригань А.Е., Хитринская Е.Ю., Кучер А.Н. (2019) Средовые эффекты на ассоциации генов белков систем репарации ДНК с бронхиальной астмой. *VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС)*. (2019) Санкт-Петербург, Россия. Сборник тезисов. С. 788
181. Zhou W., Nielsen J.B., Fritsche L.G., Dey R., Gabrielsen M.E., Wolford B.N., LeFaive J., VandeHaar P., Gagliano S.A., Gifford A., Bastarache L.A., Wei W.Q., Denny J.C., Lin M., Hveem K., Kang H.M., Abecasis G.R., Willer C.J., Lee S. (2018) Efficiently controlling for case-control imbalance and sample relatedness in large-scale genetic association studies. *Nat. Genet.* **50**, 1335–1341. https://doi.org/10.1038/s41588-018-0184-y
182. PheWeb v. 1.1.17. http://pheweb.sph.umich.edu/SAIGE-UKB

INVOLVEMENT OF THE VARIANTS IN THE GENES ENCODING BRCA1-ASSOCIATED GENOME SURVEILLANCE COMPLEX (BASC) IN THE DEVELOPMENT OF COMMON HUMAN DISEASES

N. P. Babushkina[1], *, A. E. Postrigan[1], and A. N. Kucher[1]

[1]Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia

**e-mail: nad.babushkina@medgenetics.ru*

"Mendelian code" hypothesis postulates the relationship between Mendelian (monogenic) and common pathologies. In frame of this hypothesis, polymorphic variants in the genes of Mendelian diseases may provide significant contribution to predisposition for common diseases exploiting the vulnerability in the same biochemical pathway. This review utilizes the "Mendelian code" hypothesis as a prism for a dissection of a role for a group of genes encoding various proteins participating in the DNA repair, with a particular focus on the BRCA1-associated genome surveillance complex (BASC). Here we discuss 1) their main functions in the repair of double-stranded DNA breaks (ATM, MRE11, NBN, RAD50, BRCA1, BLM) and mismatch repair (MSH2, MSH6, MLH1, PMS2, RF-C, PCNA); 2) the mitochondrial involvement of these proteins; 3) involvement of BASC proteins in the development of an adaptive immune response. For 13 out of 16 BASC proteins encoding genes the mutations leading to monogenic diseases are described already; for 11 – there are associations with common diseases or individual biological processes. Patients with *BASC* gene and patients with severe combined immunodeficiency share similar symptoms. Polymorphic variants within DNA repair genes may play a role in the development of common diseases through undermining the processes of immune response. Pleiotropic effects of these genes suggest their participation in the development of various body conditions, both in normal state of health and in pathology.

Keywords: "Mendelian code", genes of DNA repair proteins, BASC, SNP, common diseases

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 2, с. 338–345

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

УДК 616.248:616-002.5

ЭКЗОСОМЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФОРМАХ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

© 2021 г. Д. Г. Кулабухова[a, b], Л. А. Гараева[a, c], А. К. Емельянов[a, b], К. А. Сенкевич[a, b], Е. В. Грачева[d], И. В. Милюхина[a, b, d], Е. Ю. Варфоломеева[a, c], А. А. Тимофеева[b], А. Л. Шварцман[a], Т. А. Штам[a, c], С. Н. Пчелина[a, b, c, d, *]

[a]*Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Научно-исследовательского центра "Курчатовский институт", Гатчина, 188300 Россия*

[b]*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 197022 Россия*

[c]*Научно-исследовательский центр "Курчатовский институт", Москва, 123182 Россия*

[d]*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия*

*****e-mail: sopchelina@hotmail.com*

Поступила в редакцию 07.08.2020 г.
После доработки 07.08.2020 г.
Принята к публикации 10.08.2020 г.

Болезнь Паркинсона (БП) – второе по распространенности нейродегенеративное заболевание, патогенез которого связан с накоплением и агрегацией белка альфа-синуклеина в нейронах черной субстанции головного мозга. Обсуждаются прионные свойства альфа-синуклеина. Предполагается, что экзосомы (микровезикулы размером 40–100 нм) могут играть ключевую роль в транспорте патогенных форм данного белка. Описаны наследственные формы заболевания, из которых наиболее распространена БП, ассоциированная с мутациями в гене глюкоцереброзидазы (GBA-БП) и гене киназы 2, обогащенной лейциновыми повторами (LRRK2-БП). Цель настоящего исследования состояла в определении концентрации и размера экзосом плазмы крови у пациентов с GBA-БП, бессимптомных носителей мутаций в гене *GBA*, а также влияния мутаций в генах *GBA* и *LRRK2* на уровень альфа-синуклеина экзосом плазмы крови. Экзосомы плазмы крови выделяли двумя методами: последовательным ультрацентрифугированием и химической преципитацией; концентрацию и размер экзосом оценивали с помощью анализа траекторий наночастиц (NTA). Уровень альфа-синуклеина экзосом оценивали методом иммуноферментного анализа. В исследование включены пациенты со спорадической формой болезни Паркинсона (сБП), в том числе с деменцией, пациенты с наследственными формами заболевания (GBA-БП и LRRK2-БП), а также бессимптомные носители мутаций в гене *GBA*. Показано повышение концентрации внеклеточных везикул плазмы крови пациентов с GBA-БП по сравнению с сБП, бессимптомными носителями мутации *GBA* и контролем ($p = 0.004$, 0.019 и 0.0001 соответственно), а также увеличение размера везикул плазмы крови у пациентов с GBA-БП по сравнению с бессимптомными носителями мутаций *GBA* и контролем ($p = 0.009$ и 0.0001 соответственно). Различий в концентрации альфа-синуклеина в лизатах экзосом плазмы крови в разных группах не выявлено. Полученные результаты позволяют предположить, что дисфункции лизосомного фермента глюкоцереброзидазы влияют на пул экзосом плазмы крови, а также свидетельствуют об отсутствии корреляции между мутациями в генах *LRRK2* или *GBA* и уровнем альфа-синуклеина в экзосомах плазмы крови человека.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, альфа-синуклеин, экзосомы, *LRRK2*, *GBA*

DOI: 10.31857/S0026898421010092

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – нейродегенеративное заболевание, частота которого составляет 1–2% среди лиц старше 60 лет. Описаны редкие моногенные формы БП. Из аутосомно-доминантных форм наиболее распространена (до 7% среди семейных форм) БП, обусловленная мутациями в гене киназы 2, обогащенной лейциновы-

Сокращения: БП – болезнь Паркинсона; СМЖ – спинномозговая жидкость; LRRK2 – обогащенная лейциновыми повторами киназа 2; GBA – глюкоцереброзидаза; БПД – БП с деменцией; GBA-БП – БП, ассоциированная с мутациями в гене *GBA*; LRRK2-БП – БП, ассоциированная с мутациями в гене *LRRK2*; сБП – спорадическая форма БП; БН-GBA – бессимптомные носители мутаций в гене *GBA*; УЦ – последовательное ультрацентрифугирование; ХП – химическая преципитация; NTA – анализ траекторий наночастиц; ТЕМ – просвечивающая электронная микроскопия.

ми повторами (*LRRK2*) [1–3]. Мутации в гене глюкоцереброзидазы (*GBA*) считаются фактором высокого риска развития БП. В гомозиготном состоянии мутации приводят к развитию лизосомной болезни накопления — болезни Гоше. Многочисленные исследования, в том числе выполненные в российской популяции, показали, что у носителей мутаций в гене *GBA* риск развития БП повышен в 6–8 раз, эти мутации обнаруживаются у 4–5% пациентов с БП [1, 4].

В основе патогенеза БП лежит накопление и агрегация белка альфа-синуклеина в нейронах черной субстанции головного мозга. Альфа-синуклеин обнаружен также в периферических жидкостях организма человека, таких как спинномозговая жидкость (СМЖ), слюна, кровь и ее компоненты и др. Считается, что основной нейротоксический эффект при синуклеинопатиях имеют растворимые, или протофибрилярные формы альфа-синуклеина [5]. На данный момент установлен факт передачи альфа-синуклеина между клетками [6], рассматриваются различные способы переноса патогенных форм этого белка, в том числе в составе экзосом [5, 7]. Экзосомы – внеклеточные везикулы размером около 40–120 нм, секретируемые большинством типов клеток и присутствующие в различных биологических жидкостях (кровь, моча, слюна, СМЖ и др.) [8]. Предполагается, что уровень альфа-синуклеина экзосом периферических жидкостей организма (кровь, СМЖ, слюна) можно рассматривать в качестве потенциального маркера БП [9–11].

Пул экзосом, а также их белковый состав, может меняться при различных заболеваниях, в частности, при нарушении опосредованной лизосомами аутофагии, поскольку предполагается, что экзосомы осуществляют альтернативный лизосомам путь деградации молекул в клетке [12]. Известно, что киназа LRRK2 участвует в опосредуемой шаперонами аутофагии [13]. Мутации в гене *LRRK2* могут влиять на белковый состав экзосом [14]. На клеточных линиях, а также на модельных животных показано влияние дисфункций GBA на биогенез лизосом и процесс аутофагии [15].

Недавно мы охарактеризовали особенности пула внеклеточных везикул у пациентов с болезнью Гоше и выявили изменение физических характеристик экзосом при данной патологии [16]. Влияние мутаций в генах *GBA* и *LRRK2* на пул внеклеточных везикул при БП и уровень альфа-синуклеина экзосом плазмы крови не исследован.

В данной работе определены концентрация и размер экзосом плазмы крови у пациентов с GBA-БП и у бессимптомных носителей мутаций в гене *GBA* (БН-GBA), а также оценен уровень альфа-синуклеина в экзосомах плазмы крови пациентов с БП, включая наследственные формы (мутации в генах *LRRK2*, *GBA*), БП с деменцией (БПД) и БН-GBA.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследуемые группы. В исследование вошли 63 пациента с установленным диагнозом БП, включая 15 с БПД, 9 – с GBA-БП (носители мутаций в гене *GBA*), пять – с LRRK2-БП (носители мутаций в гене *LRRK2*) и 34 пациента с сБП (табл. 1). Диагноз БП поставлен в соответствии с критериями Общества по изучению расстройств движения и БП от 2015 г. [17]. Пациентов обследовали в Научно-клиническом центре нейродегенеративных заболеваний Института экспериментальной медицины и в консультативно-диагностическом центре Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова. Скрининг мутаций L444P, N370S, 84GG в гене *GBA* и G2019S, R1441T/C в гене *LRRK2* проводили с использованием методов ПЦР и рестрикционного анализа или аллельспецифичной ПЦР с зондами TaqMan, описанными ранее [18–22].

Группа БН-GBA с отсутствием неврологических заболеваний состояла из 9 индивидов и была сформирована при обследовании родственников первой степени пациентов с болезнью Гоше. Мутации в гене *GBA* в данной выборке подтверждены ранее методом прямого секвенирования.

Контрольная группа, сформированная случайным образом из жителей того же географического региона, что и включенная в анализ группа пациентов с БП, состояла из 30 индивидов. Все члены этой группы проходили обследование у невролога с целью исключения диагноза БП и других нейродегенеративных заболеваний. Проведение исследования одобрено локальными этическими комитетами указанных медицинских учреждений и проведено при подписании информированного согласия пациента.

Таблица 1. Характеристики исследуемых групп

Общие характеристики	сБП $N = 34$	GBA-БП $N = 9$	БН-GBA $N = 10$	LRRK2-БП $N = 5$	БПД $N = 15$	Контроль $N = 30$
Пол, мужчины, %	15 (44.1%)	4 (44.4%)	3 (33.3%)	1 (20%)	5 (33.3%)	16 (53.3%)
Возраст, лет	62.1 ± 8.5	61.4 ± 11.8	54.1 ± 9.8	71.2 ± 6.6	73.7 ± 8.2	63.5 ± 7.8
Возраст начала заболевания, лет	56.3 ± 7.1	55.4 ± 11.7	–	65.6 ± 7.0	63.5 ± 13.4	–

Выделение фракции внеклеточных везикул. Плазма периферической крови получена путем центрифугирования в течение 20 мин при 3000 об./мин. Внеклеточные микровезикулы выделяли двумя способами. Для оценки уровня альфа-синуклеина в экзосомах плазмы крови внеклеточные везикулы получали методом химической преципитации (ХП) из 200 мкл плазмы крови с использованием набора ExoPrep (“Lonza”, Эстония) в соответствии с инструкцией производителя. Для оценки размера и концентрации экзосом плазмы крови внеклеточные везикулы выделяли методом последовательного ультрацентрифугирования (УЦ). Образцы плазмы крови (в объеме 3 мл каждый) центрифугировали в течение 1 ч при 4°C при $16000 \times g$, далее супернатант смешивали с раствором PBS в соотношении 1 : 1, центрифугировали в течение 2 ч при 4°C при $100000 \times g$, осадок ресуспендировали в растворе PBS и повторно центрифугировали (2 ч при 4°C, $100000 \times g$). Полученные образцы внеклеточных везикул плазмы крови ресуспендировали в 100 мкл PBS, замораживали и хранили при –80°C.

Характеристика фракции внеклеточных везикул. Размеры, гомогенность и концентрацию везикул в полученных препаратах оценивали с помощью метода анализа траекторий наночастиц (nano-particle tracking analysis, NTA, “Malvern Instruments”, Великобритания). Количественный анализ экзосомального поверхностного маркера (тетраспанин CD9) на поверхности выделенных внеклеточных везикул проводили с помощью проточной цитометрии с использованием набора Exo-FACS (“Lonza”). Наличие поверхностных маркеров экзосом (CD63, CD81) подтверждено методом вестерн-блотинга. В работе использовали первичные поликлональные антитела кролика к CD63 (1 : 300; ab216130, “Abcam”, Великобритания), CD81 (1 : 300; ab109201, “Abcam”) и вторичные козьи антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 2500; ab205718, “Abcam”). Вторичные антитела, связанные с соответствующим белком на фрагментах мембраны, идентифицировали с использованием набора Amersham ECL TM PlusSystem (“Amersham”, Великобритания). Прямая визуализация везикул, полученных методом УЦ, проведена методом просвечивающей электронной микроскопии (TEM) с использованием цифровой фотокамеры Morada (“Olympus Inc”, Япония).

Оценка концентрации альфа-синуклеина в препаратах экзосом. Лизис экзосом проводили с использованием набора Total Protein Extraction Kit (“Chemicon” (“Milipore”), США). Концентрацию альфа-синуклеина в лизатах экзосом измеряли методом ИФА с использованием набора SensoLyte Anti-alpha-Synuclein Quantitative ELISA Kit (Human) (“AnaSpec”, США) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию альфа-синуклеина в образце определяли в трех повторах. Концентрацию альфа-синуклеина в лизатах экзосом плазмы крови определяли в 10 мкл лизата и нормировали по содержанию общего белка. Концентрацию общего белка оценивали с использованием набора Pierce BCA Protein Assay kit (“Thermo Scientific”, США).

Статистическая обработка результатов. Проверку полученных вариационных рядов на соответствие нормальному распределению проводили методом Шапиро–Уилка. Различия между группами оценивали с помощью теста Манна–Уитни. Значения $p < 0.05$ считали статистически значимыми. Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения SPSS 12.0. Клинические и экспериментальные данные выражали как среднее значение и стандартная ошибка среднего или медиана (min–max) соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Группа пациентов с наследственными формами БП была частично описана нами ранее [1]. В настоящем исследовании проведен скрининг мутаций L444P, N370S гена *GBA* и G2019S, R1441T/C гена *LRRK2* в группе из 300 пациентов с БП. Всего обследовано 1050 пациентов. В исследование вошли 9 пациентов с GBA-БП, из которых пять были носителями мутации L444P, четыре – мутации N370S, и пять пациентов с LRRK2-БП (четверо носителей мутации G2019S и один – мутации R1441T/C). Не выявлено носителей мутации 84GG гена *GBA*. В группе БН-GBA выявлены два носителя мутации L444P, пять – N370S, по одному носителю мутаций G241R и N227S.

В ходе работы внеклеточные везикулы были выделены из плазмы периферической крови методом ХП и УЦ. Внеклеточные везикулы плазмы крови были охарактеризованы с использованием NTA, TEM. Наличие поверхностных маркеров экзосом (CD9, CD63, CD81) подтверждено с помощью вестерн-блотинга и проточной цитометрии (рис. 1). Средние размеры и концентрация везикул составили: при выделении методом УЦ – 123.87 ± 24.5 нм и $(18.4 \pm 1.4) \times 10^{12}$ частиц/мл; при выделении методом ХП – 100.38 ± 11.4 нм и $(13.73 \pm 5.29) \times 10^{12}$ частиц/мл. На рис. 1*а*, *б* приведены примеры распределения частиц по размеру при выделении везикул методами УЦ и ХП. Поверхностный маркер экзосом – тетраспанин CD9 – выявлен методом проточной цитометрии во всех образцах. На рис. 1*в* приведен пример визуализации поверхностных маркеров экзосом CD63 и CD81 методом вестерн-блотинга во внеклеточных везикулах, выделенных методами УЦ и ХП. На рис. 1*г* представлена цитограмма экзосом, выделенных методом УЦ. Аналогичные данные

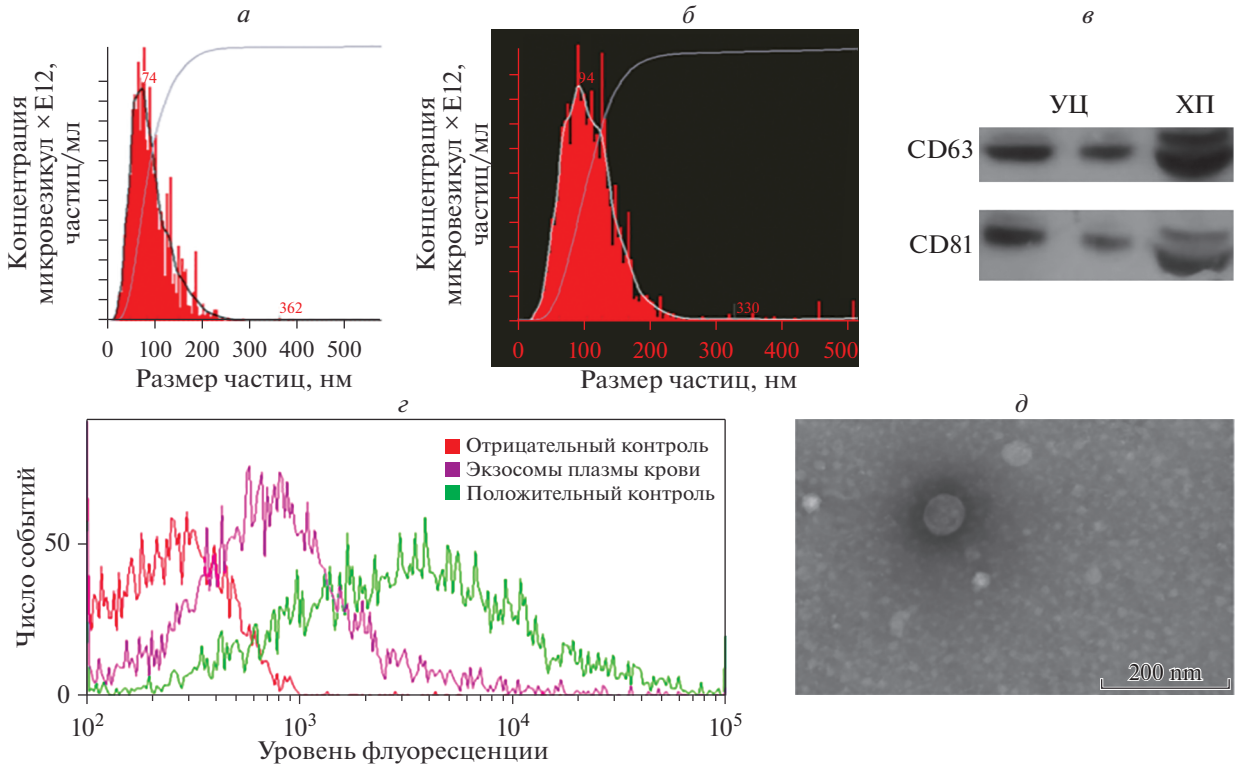


Рис. 1. Характеристика размера и концентрации внеклеточных везикул методом NTA (*а* – экзосомы, полученные методом УЦ, *б* – методом ХП), вестерн-блот тетраспанинов CD63 и CD81 в образцах везикул, полученных методами УЦ и ХП (*в*), количественная оценка поверхностного маркера экзосом, тетраспанина CD9, методом проточной цитометрии (пример экзосом, полученных методом УЦ) (*г*), визуализация экзосом, полученных методом УЦ, с помощью ТЕМ (*д*).

получены при выделении методом ХП. Визуализация везикул, полученных методом УЦ, проведена с помощью ТЕМ (рис. 1*д*). Везикулы имели округлую форму, при микроскопическом исследовании визуализировалась мембрана. Размер везикул, равный примерно 100 нм, а также представленность специфических поверхностных маркеров CD9, CD63 и CD81 позволили подтвердить присутствие экзосом.

В группах GBA-БП (N = 9), сБП (N = 10), БН-GBA (N = 10) и контроля (N = 10) проведено сопоставление количества и размера экзосом, полученных методом УЦ (рис. 2). Показано, что концентрация экзосом плазмы крови у пациентов с GBA-БП (28.03 (8.89–57.7) × 10^{12} частиц/мл), сБП (9.8 (2.66–16.47) × 10^{12} частиц/мл) и в группе БН-GBA (10.4 (1.05–50.8) × 10^{12} частиц/мл) была выше, чем в контроле (3.05 (1.49–10.37) × 10^{12} частиц/мл, p = 0.00001, 0.008, 0.02 соответственно). Размер частиц у пациентов с GBA-БП (127.8 (108.6–208.6) нм) и сБП (123.8 (109.0–204.6) нм) был больше, чем в контрольной группе (107.0 (101.0–117.3) нм, p = 0.0001, 0.0001 соответственно) и группе БН-GBA (112.6 (97.3–135.0), p = 0.009 и 0.019 соответственно) (рис. 3). Следует отметить, что концентрация и размер внеклеточных везикул в группе GBA-БП были статистически значимо выше по сравнению с группой БН-GBA (p = 0.019 и 0.009 соответственно).

Уровень альфа-синуклеина экзосом плазмы крови оценили в группах пациентов с сБП (N = = 34); GBA-БП (N = 9); LRRK2-БП (N = 5); БПД (N = 15), БН-GBA (N = 10) и у представителей контрольной группы (N = 30). Не выявлено различий в уровне альфа-синуклеина экзосом плазмы крови в этих группах (рис. 4). Также не выявлено влияния типа мутации как в гене *GBA*, так и в гене *LRRK2* на уровень альфа-синуклеина в экзосомах плазмы крови лиц с наследственными формами БП (данные не приведены).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании впервые оценена концентрация и размер экзосом, выделенных из плазмы крови пациентов с GBA-БП и БН-GBA. Также определен уровень альфа-синуклеина в лизатах экзосом плазмы крови пациентов с наследственной формой БП (мутации в генах *GBA* и *LRRK2*).

Нами впервые показано увеличение количества и размера экзосом в плазме крови пациентов

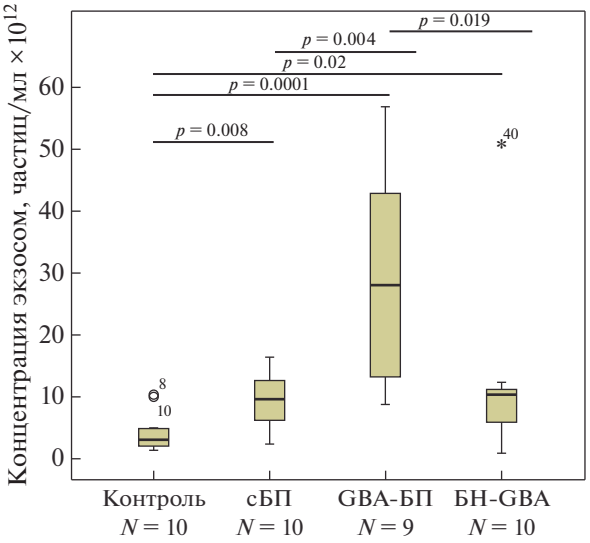


Рис. 2. Концентрация экзосом плазмы крови в контрольной группе, у пациентов с GBA-БП и сБП и в группе БН-GBA.

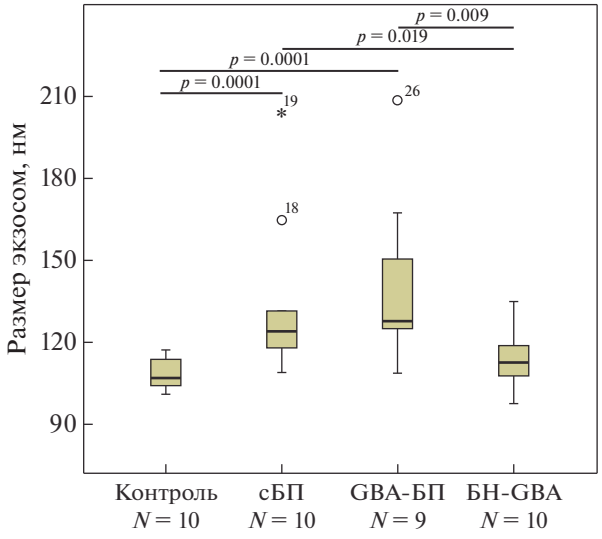


Рис. 3. Размер экзосом плазмы крови в группе контроля, у пациентов с GBA-БП и сБП и в группе БН-GBA.

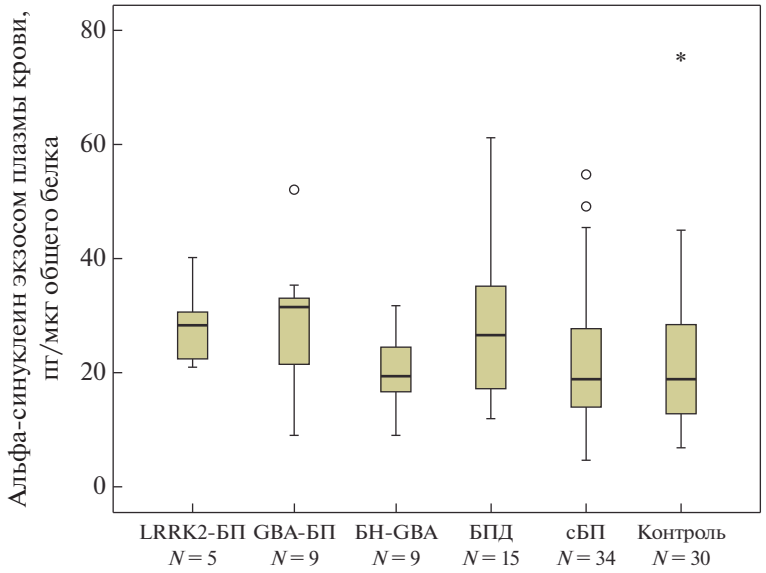


Рис. 4. Концентрация альфа-синуклеина экзосом плазмы крови в группе пациентов с LRRK2-БП, GBA-БП, в группе БН-GBA, у пациентов с БПД, сБП и в контроле.

с БП, несущих мутацию в гене *GBA*. Как показано нами и другими исследователями ранее, при GBA-БП наблюдается снижение активности GBA, а также накопление лизосфинголипидов в крови [12, 15, 19, 23–25]. Известно, что дисфункция GBA приводит к нарушению рециркуляции лизосом в процессе аутофагии [15]. Сохранность функции лизосом необходима для формирования аутолизосомы, в частности, для удаления дефектных белков из клетки. Предполагается, что нарушение эндосомно-лизосомного пути может приводить к повышенной секреции экзосом в составе мультивезикулярных телец [12]. В исследованиях *in vitro* установлено, что ингибирование функции лизосом увеличивает секрецию внеклеточных везикул клетками [26].

На модельных животных показано, что при подавлении активности GBA селективным ингибитором кондуритол-B-эпоксидом (CBE) увеличивается секреция экзосом клетками головного мозга мыши [27]. Ранее нарушение аутофагии отмечали в первичной культуре макрофагов, полученных от пациентов с болезнью Гоше [28].

Недавно с использованием методов NTA, динамического светорассеяния и криоэлектронной микроскопии мы охарактеризовали пул внеклеточных везикул плазмы крови пациентов с болезнью Гоше [16]. Показано, что в пуле внеклеточных везикул пациентов уровень экзосомальных маркеров (CD9, CD63, CD81, HSP70) выше, чем в контроле, увеличен также размер везикул и изменена их морфология. Большинство везикул имело многослойную мембрану [16]. В сумме полученные нами результаты подтверждают предположение о том, что нарушение метаболизма церамидов может влиять на пул экзосом, секретируемых клетками.

В настоящей работе нами показано, что мутации в генах *GBA* и *LRRK2* не влияют на уровень альфа-синуклеина экзосом плазмы крови при БП. За последние годы проведен ряд исследований, направленных на оценку возможности использования уровня альфа-синуклеина экзосом периферических жидкостей (кровь, СМЖ, слюна) в качестве биомаркера БП. В 2014 году Shi и соавт. показали, что уровень альфа-синуклеина экзосом плазмы крови, содержащих поверхностный маркер L1CAM, у пациентов с БП повышен по сравнению с контрольной группой [9]. Экзосомы получали методом иммунопреципитации с использованием антител к поверхностному маркеру экзосом L1CAM (присутствие этого маркера свидетельствует о нейронном происхождении экзосом [29]). Уровень альфа-синуклеина оценивали с помощью метода Luminex. В 2019 году Han и соавт. определили концентрацию альфа-синуклеина общего пула экзосом плазмы крови и показали, что уровень альфа-синуклеина у пациентов с БП выше, чем в контроле [30]. Экзосомы плазмы крови были получены с помощью последовательного УЦ с последующей очисткой образцов методом ХП. Уровень альфа-синуклеина, как и в нашей работе, оценивали методом ИФА. В 2016 году Stuendl и соавт. показали, что уровень альфа-синуклеина экзосом СМЖ на ранних стадиях БП ниже, чем в контрольной группе [10]. Экзосомы выделяли методом последовательного УЦ, уровень альфа-синуклеина оценивали методом электрохемилюминесценции. В 2019 году Cao и соавт. выявили повышение уровня альфа-синуклеина в экзосомах слюны у пациентов с БП по сравнению с контрольной группой [11]. Экзосомы слюны получены методом ХП, уровень альфа-синуклеина оценен с помощью метода электрохемилюминесценции. В 2018 году Cerry и соавт. обнаружили повышение уровня альфа-синуклеина экзосом плазмы крови у пациентов с БП в сравнении с контрольной группой, а также выявили отрицательную корреляцию уровня альфа-синуклеина в экзосомах плазмы крови с тяжестью БП по шкале Хен-Яра [31]. В каждом исследовании использовали разные методы получения фракции внеклеточных везикул, а также детекции альфа-синуклеина.

На данный момент существует несколько методов выделения экзосом, каждый из которых имеет свои плюсы и минусы. Метод последовательного УЦ позволяет получить фракцию, максимально чистую от внесенных в образец дополнительных примесей, но не позволяет полноценно удалить следы белков и прочих молекул внеклеточной среды биологических жидкостей. Этот метод обычно применяют для выделения экзосом в целях их сокультивирования с клеточными культурами. Считается, однако, что метод последовательного УЦ не следует использовать для выделения фракции внеклеточных везикул без дополнительной очистки при последующей оценке белкового состава экзосом [32]. В нашей работе мы использовали коммерческий набор, принцип работы которого основан на методе ХП экзосом из биологических жидкостей, позволяющем удалить из биологического образца большую часть растворимых белков [32]. Использование этого подхода позволило нам минимизировать содержание альфа-синуклеина плазмы крови в исследуемых образцах.

В отличие от данных, полученных ранее, мы не выявили повышения содержания альфа-синуклеина экзосом плазмы крови при различных формах БП по сравнению с контролем. Подобные различия могут объясняться разнообразием существующих сегодня методов выделения и очистки пула экзосом плазмы крови, а также методов детекции альфа-синуклеина. Интересно отметить, что все исследования по оценке белкового состава экзосом плазмы крови методом масс-спектрометрии (МС/МС) не обнаружили в их составе альфа-синуклеина [26, 33].

Таким образом, нами впервые показано, что мутации в гене *GBA* влияют на пул экзосом плазмы крови у пациентов с БП. В то же время не выявлено влияния мутаций в генах *GBA* и *LRRK2* на уровень альфа-синуклеина экзосом плазмы крови.

Выражаем благодарность Горшкову Андрею Николаевичу (Научно-исследовательский Институт гриппа им. А.А. Смородинцева) за проведение экспериментов с просвечивающей электронной микроскопией.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №18-015-00262А (скрининг мутаций в генах *GBA* и *LRRK2* и оценка концентрации альфа-синуклеина в экзосомах плазмы крови); грант №19-315-90059 Аспиранты (характеристика внеклеточных везикул методом проточной цитометрии, вестерн-блотинга), Российского научного фонда (№ 19-15-00315 (характеристика везикул методом NTA в группах бессимптомных носителей мутаций *GBA*, пациентов с GBA-БП)).

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От всех пациентов получено информированное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Emelyanov A.K., Usenko T.S., Tesson C., Senkevich K.A., Nikolaev M.A., Miliukhina I.V., Kopytova A.E., Timofeeva A.A., Yakimovsky A.F., Lesage S., Brice A., Pchelina S.N. (2018) Mutation analysis of Parkinson's disease genes in a Russian data set. *Neurobiol. Aging*. **71**, 272.
2. Пчелина С.Н., Иванова О.Н., Емельянов А.К., Якимовский А.Ф. (2011) Клиническое течение LRRK2-ассоциированной болезни Паркинсона. *Ж. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. **12**(111), 56–62.
3. Lesage S., Anheim M., Condroyer C., Pollak P., Durif F, Dupuits C., Viallet F., Lohmann E., Corvol JC., Honore A., Rivaud S., Vidailhet M., Durr A., Brice A., French Parkinson's Disease Genetics Study Group. (2011) Large-scale screening of the Gaucher's disease-related glucocerebrosidase gene in Europeans with Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* **20**(1), 202–210.
4. Balestrino R., Schapira A. (2019) Parkinson disease. *Eur. J. Neurol.* **27**, 27–42.
5. Bieri G., Gitler A.D., Brahic M. (2018) Internalization, axonal transport and release of fibrillar forms of alpha-synuclein. *Neurobiol. Dis.* **109**, 219–225.
6. Danzer K.M., Krebs S.K., Wolff M., Birk G., Hengerer B. (2009) Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology. *J. Neurochem.* **111**(1), 192–203.
7. Шварцман А.Л., Сенкевич К.А., Емельянов А.К., Пчелина С.Н. (2019) Прионные свойства альфа-синуклеина. *Молекуляр. биология*. **53**(3), 380–387.
8. Greening D., Simpson R. (2018) Understanding extracellular vesicle diversity – current status. *Expert. Rev. Proteomics.* **15**, 887–910.
9. Shi M., Liu C., Cook T.J., Bullock K.M., Zhao Y., Ginghina C., Li Y., Aro P., Dator R., He C., Hipp M.J., Zabetian C.P., Peskind C.P., Hu S-C., Quinn S.F., Galasko D.R., Banks W.A., Zhang J. (2014) Plasma exosomal α-synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* **128**, 639–650.
10. Stuendl A., Kunadt M., Kruse N., Bartels C., Moebius W., Danzer K.M., Mollenhauer B., Schneider A. (2016) Induction of α-synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain*. **139**, 481–494.
11. Cao Z., Wu Y., Liu G., Jiang Y., Wang X., Wang Z., Feng T. (2019) α-Synuclein in salivary extracellular vesicles as a potential biomarker of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett*. **696**, 114–120.
12. Eitan E., Suire C., Zhang S., Mattson M.P. (2016) Impact of lysosome status on extracellular vesicle content and release. *Ageing Res. Rev.* **32**, 65–74.
13. Orenstein S.J., Kuo S.H., Tasset I., Arias E., Koga H., Fernandez-Carasa I., Cortes E., Honig L.S., Dauer W., Consiglio A., Raya A., Sulzer D., Cuervo A.M. (2013) Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nat. Neurosci.* **16**(4), 394–406.
14. Fraser K.B., Rawlins A.B., Clark R.G., Alcalay R.N., Standaert D.G., Liu N. (2016) Ser(P)-1292 LRRK2 in urinary exosomes is elevated in idiopathic Parkinson's disease. *Mov. Disord*. **31**(10), 1543–1550.
15. Magalhaes J., Gegg M.E., Migdalska-Richards A., Doherty M.K., Whitfield P.D., Schapira A.H. (2016) Autophagic lysosome reformation dysfunction in glucocerebrosidase deficient cells: relevance to Parkinson disease. *Hum. Mol. Genet*. **25**, 3432–3445.
16. Shtam T., Naryzhny S., Kulabukhova D., Garaeva L., Senkevich K., Landa S., Varfolomeeva E., Salogub G., Verlov N., Kopylov A., Zorina E., Kamyshinsky R., Usenko T., Shwartsman A., Zakharova E., Emelyanov A., Pchelina S. (2020) Altered level of plasma exosomes in patients with Gaucher disease. *Eur. J. Med. Genet.* **63**(11), 104038.
17. Postuma R.B., Berg D., Stern M., Poewe W., Olanow C.W., Oertel W., Obeso J., Marek K., Litvan I., Lang A.E., Halliday G., Goetz C.G., Gasser T., Dubois B., Chan P., Bloem B.R., Adler C.H., Deuschl G. (2015) MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov. Disord*. **30**, 1591–1601.
18. Aharon-Peretz J., Rosenbaum H., Gershoni-Baruch R. (2004) Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi jews. *N. Engl. J. Med.* **351**(19), 1972–1977.
19. Alcalay R.N., Levy O.A., Waters C.C., Fahn S., Ford B., Kuo S-H., Mazzoni P., Pauciulo M.W., Nichols W.C., Gan-Or Z., Rouleau G.A., Chung W.K., Wolf P., Oliva P., Keutzer J., Marder K., Zhang X. (2015) Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. *Brain*. **138**(Pt9), 2648–2658.
20. Pchelina S.N., Yakimovskii A.F., Emelyanov A.K., Ivanova O.N., Schwarzman A.L., Singleton A.B. (2008) Screening for LRRK2 mutations in patients with Parkinson's disease in Russia: identification of a novel LRRK2 variant. **15**(7), 692–696.
21. Hashad D.I., Abou-Zeid A.A., Achmawy G.A., Allah H.M., Saad M.A. (2011) G2019S mutation of the leucine-rich repeat kinase 2 gene in a cohort of Egyptian patients with Parkinson's disease. *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* **15**(12), 861–866.
22. Fedick A., Su J., Jalas C., Northrop L., Devkota B., Ekstein J., Treff N.R. (2013) High-throughput carrier screening using TaqMan allelic discrimination. *PLoS One.* **8**(3), e59722.
23. Pchelina S., Emelyanov A., Baydakova G., Andoskin P., Senkevich K., Nikolaev M., Miliukhina I., Yakimovskii A., Timofeeva A., Fedotova E., Abramycheva N., Usenko T., Kulabukhova D., Lavrinova A., Kopytova A., Garaeva L., Nuzhnyi E., Illarioshkin S., Zakharova E. (2017) Oligomeric α-synuclein and glucocerebrosidase activity levels in GBA-associated Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **636**, 70–76.
24. Guedes L.C., Chan R.B., Gomes M.A., Conceiçao V.A., Machado R.B., Soares T., Xu Y., Gaspar P., Carriço J.A.,

Alcalay R.N., Ferreira J.J., Outeiro T.F., Miltenberger-Miltenyi G. (2017) Serum lipid alterations in GBA-associated Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **44**, 58–65.

25. Pchelina S., Baydakova G., Nikolaev M., Senkevich K., Emelyanov A., Kopytova A., Miliukhina I., Yakimovskii A., Timofeeva A., Berkovich O., Fedotova E., Illarioshkin S., Zakharova E. (2018). Blood lisosphingolipids accumulation in patients with Parkinson's disease with glucocerebrosidase 1 mutations. *Mov. Disord.* **33**(8), 1325–1330.
26. Miao Y., Li G., Zhang X., Xu H., Abraham S.N. (2015) A TRP channel senses lysosome neutralization by pathogens to trigger their expulsion. *Cell.* **161**(6), 1306–1319.
27. Papadopoulos V.E., Nikolopoulou G., Antoniadou I., Karachaliou A., Arianoglou G., Emmanouilidou E., Sardi S.P., Stefanis L., Vekrellis K. (2018) Modulation of β-glucocerebrosidase increases α-synuclein secretion and exosome release in mouse models of Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* **27**(10), 1696–1710.
28. Aflaki E., Stubblefield B.K., Maniwang E., Lopez G., Moaven N., Goldin E., Marugan J., Patnaik S., Dutra A., Southall N., Zheng W., Tayebi N., Sidransky E. (2016) Macrophage models of Gaucher disease for evaluating disease pathogenesis and candidate drugs. *Sci. Transl. Med.* **6**, 240–273.
29. Lachenal G., Pernet-Gallay K., Chivet M., Hemming F.G., Belly A., Bodon G., Blot B., Haase G., Goldberg Y., Sadoul R. (2011) Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol. Cell. Neurosci.* **46**(2), 409–418.
30. Han C., Xiong N., Guo X., Huang J., Ma K., Liu L., Xia Y., Shen Y., Li J., Jiang H., Wang L., Guo S., Xu X., Zhang G., Liu J., Cao X., Zhang Z., Lin Zh., Wang T. (2019) Exosomes from patients with Parkinson's disease are pathological in mice. *J. Mol. Med. (Berl.).* **97**(9), 1329–1344.
31. Cerri S., Ghezzi C., Sampieri M., Avenali M., Dornini G., Zangaglia R., Minafra B., Blandini F. (2018) The exosomal/total α-synuclein ratio in plasma is associated with glucocerebrosidase activity and correlates with measures of disease severity in PD patients. *Front. Cell Neurosci.* **12**, 125.
32. de la Torre Gomez C., Goreham R.V., Bech Serra J.J., Nann T., Kussmann M. (2018) "Exosomics" – a review of biophysics, biology and biochemistry of exosomes with a focus on human breast milk. *Front. Genet.* **9**, 92.
33. Tomlinson P.R., Zheng Y., Fischer R., Heidasch R., Gardiner C., Evetts S., Hu M., Wade-Martins R., Turner M.R., Morris J., Talbot K., Kessler B.M., Tofaris G.K. (2015) Identification of distinct circulating exosomes in Parkinson's disease. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2**(4), 353–361.

PLASMA EXOSOMES IN INHERITED FORMS OF PARKINSON'S DISEASE

D. G. Kulabukhova[1, 2], L. A. Garaeva[1, 3], A. K. Emelyanov[1, 2], K. A. Senkevich[1, 2], E. V. Gracheva[4], I. V. Milukhina[1, 2, 4], E. Y. Varfolomeeva[1, 3], A. A. Timofeeva[2], A. L. Shwartsman[1], T. A. Shtam[1, 3], and S. N. Pchelina[1, 2, 3, 4, *]

[1]*Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute of National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina, 188300 Russia*

[2]*First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, St. Petersburg, 197022 Russia*

[3]*National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia*

[4]*Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine", St. Petersburg, 197376 Russia*

**e-mail: sopchelina@hotmail.com*

Parkinson's disease (PD) is the second most frequent neurodegenerative disorder. Alpha-synuclein misfolding and aggregation resulting in neurototoxicity is a hallmark of PD. The prion properties of alpha-synuclein are discussed. Exosomes (extrcellular vesicles 40–100 nm in size) can play a key role in the transport of pathogenic forms of alpha-synuclein. The most frequent inherited forms of the disease are PD, associated with mutation in the leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2-PD) and glucocerebrosidase (GBA-PD) genes. The aim of our work is to evaluate concentration and size of exosomes derived from blood plasma of patients with GBA-PD, asymptomatic *GBA* mutation carriers and an effect of *GBA* and *LRRK2* mutations on alpha-synuclein level in exosomes derived from peripheral blood plasma. Plasma extracellular vesicles were isolated via chemical precipitation and sequential ultracentrifugation and characterized by transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis (NTA) and flow cytometry. Total alpha-synuclein level in plasma exosomes was estimated by enzyme-linked immunosorbent assay. Patients with sporadic PD, PD with dementia, patients with inherited PD (GBA-PD, LRRK2-PD) as well as asymptomatic *GBA* mutation carriers were included into the study. The concentration on plasma exosomes was higher in GBA-PD patients compared to sporadic PD, asymptomatic carriers of mutations on *GBA* gene and control ($p = 0.004$, 0.019 and 0.0001 respectively). The size of plasma exosomes was higher in GBA-PD patients compared to asymptomatic carriers of *GBA* mutations and control ($p = 0.009$ and 0.0001, respectively). No significant difference was found for exosomal alpha-synuclein levels in the studied groups. Our results allowed us to suggest that a decrease in GBA activity may affect the pool of plasma exosomes and mutations in the *LRRK2* and *GBA* gene do not influence on plasma exosomal alpha-synuclein level.

Keywords: Parkinson's disease, alpha-synuclein, exosomes, *LRRK2*, *GBA*

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 2, с. 346

АЛЕКСАНДР СЕРГЕЕВИЧ СПИРИН (4 СЕНТЯБРЯ 1931–30 ДЕКАБРЯ 2020)

DOI: 10.31857/S0026898421120016

Ушел Ученый из числа тех, что составляют славу и гордость страны. Один из основателей мировой и создатель отечественной молекулярной биологии Александр Сергеевич Спирин буквально ворвался в науку. Уже в 27 лет, через 4 года после окончания Московского университета и через 5 лет после открытия двойной спирали ДНК, вместе со своим учителем Андреем Николаевичем Белозерским он публикует статью, ошеломившую научный мир свидетельством существования одного из ключевых элементов жизни – матричных РНК, передающих генетическую информацию от ДНК к рибосомам, которые транслируют эту информацию в белки. Александр Сергеевич Спирин внес решающий вклад в изучение структуры и функции рибосом, а также открыл информосомы – частицы, в составе которых матричные РНК транспортируются из клеточного ядра к рибосомам. Его блестящие доклады завораживали слушателей красотой экспериментов, безупречной логикой и четкостью формулировок. Им восхищались такие светила науки, как Мстислав Всеволодович Келдыш и Израиль Моисеевич Гельфанд.

В 35 лет Александр Сергеевич был избран членом-корреспондентом Академии наук СССР, а в 39 лет – академиком. Его достижения отмечены такими высокими наградами, как Большая Золотая Медаль им. М.В. Ломоносова Российской академии наук, медаль и премия Федерации Европейских биохимических обществ, Ленинская премия, два ордена Ленина и два ордена “За заслуги перед Отечеством”. Признанием его выдающихся заслуг перед мировой наукой стало избрание членом Национальной академии наук США.

Ушел Учитель, создавший выдающую научную школу. Более 30 лет он возглавлял кафедру молекулярной биологии МГУ и основанный им Институт белка. На его лекциях аудитории были переполнены. Он заражал студентов и сотрудников своим энтузиазмом, учил их думать, ставить точные эксперименты, критически осмысливать результаты, радовался успехам учеников, всемерно помогал им. Множество ученых по всему миру благодарят судьбу за счастье быть рядом с ним, за право называться его учениками.

Ушел Человек, обладавший огромной жизненной энергией. Он всегда был бесспорным авторитетом и лидером, умел сплотить вокруг себя людей и был им настоящим другом.

Прощайте, Александр Сергеевич. Необходимо время, чтобы понять, кого мы потеряли.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 2, с. 347–352

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

DOI: 10.31857/S0026898421020154

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал “**Молекулярная биология**” публикует экспериментальные, теоретические и обзорные статьи, посвященные исследованию структуры, функций, синтеза и распада биологических макромолекул в клетке и в модельных системах, изучению взаимодействий макромолекул между собой и с низкомолекулярными лигандами. Публикуются статьи, посвященные исследованию молекулярной организации клетки и молекулярных механизмов регуляции жизни клеток.

Журнал помещает также проблемные статьи и мини-обзоры. Издаются тематические выпуски, посвященные наиболее актуальным проблемам молекулярной биологии.

Журнал выпускается на русском языке ИКЦ “Академкнига” и одновременно на английском языке Издательской группой Pleiades Publishing (http://pleiades.online). Англоязычный вариант журнала распространяется издательством Springer (http://www.springer.com).

Разделы журнала:

– Обзоры

– Геномика. Транскриптомика

– Молекулярная биология клетки

– Структурно-функциональный анализ биополимеров и их комплексов

– Биоинформатика

– Протеомика

– Методы

– Хроника (этот раздел публикуется только в русскоязычной версии журнала).

При представлении рукописи в печать авторы могут указать раздел журнала, в который хотели бы поместить свою статью. Статьи, в которых раздел авторами не указан, редакция размещает по рубрикам по своему усмотрению.

Направление статьи в Редакцию означает, что авторы не передали аналогичный материал (в оригинале или в переводе на другие языки или с других языков) в другой журнал(ы), что этот материал не был ранее опубликован и не будет направлен в печать в другое издание или не принят в печать в другом журнале.

Если в ходе работы над рукописью выяснится, что аналогичный материал (возможно, под другим названием и с другим порядком авторов) направлен в другой журнал, статья немедленно возвращается авторам, о происшедшем сообщается в журнал, принявший к рассмотрению этот материал, с рекомендацией отклонить статью за нарушение этических норм.

Для принятия редколлегией решения о публикации статьи в журнале авторам необходимо представить в редакцию вместе с рукописью авторский договор с издателем журнала, заполненный и подписанный всеми авторами. Авторский договор вступает в силу в случае и с момента принятия статьи к публикации. Формы договоров с издателями и дополнительная юридическая информация размещены на http://molecbio.ru/ (**русская и английская версии**) и http://pleiades.online/ru/authors/agreement/ (**английская версия**).

Объем статьи не ограничивается.

Журнал публикует заказанные редколлегией **обзоры**. Обзорные статьи могут быть предложены также авторами после предварительной заявки, которую рассматривает редколлегия**.** К **з**аявке необходимо приложить резюме предлагаемого обзора и список работ автора за последние 5 лет. Объем обзорной статьи согласовывается с Редакцией.

Статья обязательно должна быть подписана всеми авторами. На отдельной странице укажите данные всех авторов (фамилия, имя, отчество, почтовый адрес с индексом, домашний и служебный телефоны, факс, электронная почта). Укажите лицо, с которым Редакция будет вести переговоры и переписку. **Электронную версию рукописи необходимо представить через портал редакционно-издательской системы –** https://publish.sciencejournals.ru/login. Если возникнут технические проблемы, то в исключительном случае электронная версия рукописи может быть отправлена в редакцию по электронной почте – jrmolbio@gmail.com.

Если в рукописи используются материалы (рисунки, таблицы, фрагменты текста) из другой статьи в оригинальном или модифицированном виде, необходимо предоставить редакции разрешение от Издателя на такое заимствование, а также дать ссылку на соответствующую работу.

К рукописи необходимо приложить в электронном виде копию опубликованной в зарубежных изданиях статьи по данной тематике (свою или других авторов) **для адекватного перевода терминологии при подготовке англоязычной версии журнала.**

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Текст печатается через 1.5 интервала и должен занимать 30–35 строк на странице: размер шрифта 12, поле слева – 30 мм. Заголовки отделяются от основного текста сверху и снизу двумя интервалами.

Страницы рукописи должны иметь сквозную нумерацию, включая список литературы, таблицы и подписи к рисункам.

Материалы необходимо разместить в следующем порядке:

УДК в верхнем левом углу, шрифт – курсив, размер 9.

Название статьи. Шрифт – заглавный, полужирный. **Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы, а не ее тему или объект. В названии работы недопустимы слова типа "изучение, исследование, сравнение, анализ и т.д." из-за их неинформативности.**

Инициалы и фамилии авторов (А. А. Иванов, Б. В. Петров...), шрифт прямой, строчной, полужирный. Буквенными (латинский шрифт) надстрочными индексами необходимо связать фамилию автора и место его работы. Звездочкой отмечается фамилия автора, с которым ведется переписка, после адреса этого автора указывается адрес его электронной почты.

Полное название института, ведомства (например, *Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064*). Шрифт – строчной курсив. Если научных учреждений два и более, необходимо буквенными надстрочными индексами связать название учреждения и фамилии авторов, в нем работающих. Названия институтов следует давать без добавления характеристик организационно-правовой формы учреждения. Например, не надо указывать "Федеральное государственное бюджетное учреждение науки".

Аннотация (резюме). Шрифт – прямой строчной, кегль 12. Резюме – важная часть статьи, так как именно резюме и заглавие публикации попадает в различные зарубежные и отечественные базы данных, поэтому научное сообщество судит о работе именно по резюме. Структура резюме должна быть предельно четкой:

– Постановка проблемы и обоснование выбора объекта исследования.

– Обоснование выбора методического подхода и стратегии исследования.

– Полученные результаты с четким указанием, в чем их новизна, по сравнению с известными в литературе.

– Следствия, вытекающие из этих результатов: новая гипотеза, опровержение известной гипотезы, возможность практических приложений, возможность постановки новых задач и т.п.

Средний объем резюме составляет 20 строк. Размер резюме зависит не столько от размера статьи, сколько от степени новизны полученных в ней результатов. Сокращений употреблять не следует, даже если они и расшифрованы в статье.

Ключевые слова. Шрифт – прямой строчной, полужирный. В ключевых словах необходимо отразить:

– предмет исследования (названия молекул, первичная структура, трехмерная структура в растворе, процессы и т.д.),

– метод,

– объект (прокариоты, эукриоты, род/вид, клетки и т.д.),

– специфику данной работы.

Сокращения – в примечаниях к первой странице. Стандартные сокращения (п.н. при цифре, н. при цифре, мкм и т.д.) не приводятся.

Текст статьи, который включает следующие разделы (названия разделов в статьях теоретического характера определяются автором):

Раздел "ВВЕДЕНИЕ".

Раздел "ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ". Редко используемые методы следует описывать достаточно подробно, чтобы их можно было воспроизвести при необходимости. Новые методы необходимо описывать детально и точно. На простые и общераспространенные методы лучше давать ссылки. Необходимо указывать квалификацию наиболее важных реактивов, названия фирм (в кавычках, на языке страны).

Раздел "РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ". В зависимости от объема раздел может содержать 2–4 подраздела. Заголовки подразделов должны быть информативны ("микротезисы"), а не описательны. Следует давать заголовки к рисункам и таблицам. Все иллюстрации необходимо, по крайней мере, один раз процитировать в тексте. Для документации одного и того же материала нельзя использовать и рисунки, и таблицы. Для читателя хороший рисунок всегда предпочтительней таблицы, хотя в некоторых случаях рисунок не может заменить таблицу. Весьма приветствуются схемы, поясняющие либо постановку опыта, либо полученные результаты и их интерпретацию.

Для более полного описания результатов исследования к статье могут прилагаться дополнительные материалы (дополнительные большие таблицы, рисунки и пр.) при условии, что автор является правообладателем прилагаемых материалов. Дополнительные материалы размещаются на сайте журнала по адресу http://molecbio.ru и публикуются в электронной версии англоязычного издания на сайте http://link.springer.com

Раздел “ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ”. В этом разделе полученные данные объясняют и сопоставляют с опубликованными ранее результатами.

Допускается объединение разделов “РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ” и “ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ” в один раздел – “РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ”.

Раздел “СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ”.

Подраздел “***Благодарности***”. Шрифт – строчной курсив.

В этом разделе дается информация о любой помощи в проведении работы и подготовке статьи, а также сообщается об использовании центров коллективного пользования.

Подраздел “***Финансирование работы***”. Шрифт – строчной курсив.

В разделе указываются названия всех фондов и организаций, финансировавших работу, и в скобках – номера грантов. Сокращений в названиях финансирующих организаций употреблять не следует.

Подраздел “***Соблюдение этических стандартов***”. Шрифт – строчной курсив.

Если в работе исследования проведены на животных, то в этом разделе указывается, что все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Если в работе опыты на животных не проводились, то необходимо указать, что настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

Если в экспериментах использовались биологические материалы, полученные от человека, формировались когорты больных и т.п., то в данный раздел необходимо вставить два пункта:

• Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическими стандартами институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

• От каждого из включенных в исследование участника было получено информированное добровольное согласие.

Подраздел ***“Конфликт интересов”***. Указать информацию о конфликтах интересов.

Подраздел “***Открытый доступ***”. Если предполагается публикация английской версии статьи в режиме Open Access, то необходимо указать, что статья публикуется в соответствии с лицензией Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY). Шрифт – строчной курсив.

Лицензия CC BY разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что указаны автор и источник публикации, включена ссылка на лицензию Creative Commons и указывается, были ли внесены какие-либо изменения. Авторы или владельцы авторских прав безоговорочно, заблаговременно и на неограниченное время предоставляют любому третьему лицу право использовать, воспроизводить или распространять статью полностью или частично в любом формате и на любом носителе при условии, что в публикации не допущено никаких существенных ошибок, указаны авторы статьи и корректная ссылка на источник публикации, а также то, что библиографические данные не были изменены. Объем статьи на английском языке не должен превышать 15 полос (приблизительно 30 страниц, включая список литературы, рисунки и таблицы). Стоимость публикации статьи в режиме Open Access можно узнать на сайте Издателя английской версии https://www.pleiades.online/ru/authors/openaccess/how-to-publish/

Подраздел “**Дополнительные материалы**”. Шрифт – строчной курсив.

Если в работе есть дополнительные материалы, то в этом разделе даются ссылки на сайты, на которых они размещены, а именно: http://link.springer.com, http://molecbio.ru. Просим не размещать дополнительные материалы на сторонних ресурсах.

Подраздел “**Дополнительная информация**”. Шрифт – строчной курсив.

В этом разделе могут быть размещены, например, нестандартные ссылки (материалы, которые по каким-то причинам не опубликованы, но могут быть предоставлены авторами по запросу); дополнительные ссылки на профили авторов (Orchid ID); информация о связанных со статьей ранее неопубликованных докладах на конференциях и семинарах и т.п.

Издатель оставляет за собой право включить в этот раздел издательскую информацию, например, выразить несогласие с выводами работы или индифферентность по отношению к полученным данным, указать составителей, ответственных за включение статьи в номер, если они не указаны другим способом, а также указать другую информацию, имеющую отношение к данной статье или журналу.

Раздел “СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ”. Печатается на отдельной странице и содержит перечень работ **с обязательным указанием заглавия (см. ниже образец)** в порядке цитирования. При упоминании в тексте ссылка (номер) дается в квадратных скобках. Номера ссылок должны идти строго по порядку. Цитирование двух и более работ под одним номером, одной и той же работы под разными номерами не допускается. **Ссылки на неопуб-**

ликованные работы не допускаются. Не допускаются также ссылки на диссертации и их авторефераты, т.к. они печатаются на правах рукописи и для читателей практически недоступны.

Обращаем внимание авторов на то, что ссылки на российские журналы, выходящие в двух версиях – на русском и английском языках, – необходимо приводить для двух версий. Проверить номера страниц для ссылок на журнал "Молекулярная биология" в англоязычной версии **можно на сайте издательства** (http://pleiades.online), на котором размещены содержания номеров и резюме публикаций с 1967 г. по настоящее время, и на сайте журнала (http:// www.molecbio.ru).

Необходимо строго соблюдать принятый в журнале порядок расположения данных в списке литературы. Оформляйте СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ по следующему образцу, обращая внимание на расположение пробелов между знаками:

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ДЛЯ ЖУРНАЛОВ:

1. Студитский В.М. (2001) Транскрипция хроматина. *Молекуляр. биология*. **35**, 235–247. (Stuitsky V.M. (2001) Transcription through chromatin. *Mol. Biol. (Mosk.)*. **35**, 194–205.)

2. Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*. **100**, 57–70.

ДЛЯ СБОРНИКОВ:

3. Orlean P. (1997) Biogenesis of yeast cell wall and surface components. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces. Cell Cycle and Cell Biology*, vol. 3. Eds Pringle J.R., Broach J.R., Jones E.W. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, pp. 229–362.

ДЛЯ ТЕЗИСОВ ДОКЛАДОВ

4. Zhirnov O.P., Konakova T.E., Krichevets S.G., Iordansky S.N., Klenk H.D. *11-th international conference Negative Strand Viruses*. (2000) Quebec, Canada. Abstract book. P. 91. Abstract 102.

ДЛЯ КНИГ:

5. Уотсон Д. (1967) *Молекулярная биология гена*. Москва: Мир. (То же для иностранных изданий).

Заглавие статьи на английском языке. Шрифт – заглавный, полужирный.

Фамилии и инициалы авторов в английской транскрипции с пометками, указывающими на учреждение, в котором работает автор. Шрифт – прямой, строчный, полужирный. Цифровыми надстрочными индексами необходимо связать фамилию автора и место его работы. Звездочкой отмечается фамилия автора, с которым ведется переписка, после адреса этого автора указывается адрес его электронной почты.

Полное название института, ведомства на английском языке. Шрифт – светлый курсив, адрес электронной почты. Если научных учреждений два и более, необходимо цифровыми надстрочными индексами связать название учреждения и фамилии авторов, в нем работающих.

Резюме на английском языке – точный перевод аннотации на русском языке. Шрифт – прямой, кегль 12.

Ключевые слова на английском языке. Шрифт – прямой, кегль 12.

ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ РУКОПИСЕЙ

При оформлении рукописи следует во всех материалах, включая текст, рисунки и надписи на фотографиях, придерживаться следующих правил:

Знак "–" (тире) отбивается пробелами; знак "минус", "интервал" или "связь" пробелами не отбивается.

Десятичные дроби пишутся через точки – 1.4, а не 1,4.

В качестве **знака умножения** используется только "×": 5×10^3 моль/л. Знак "×" ставится только в том случае, если справа от него стоит число: $C \times 10^3$, но не 10^3C. Символ "·" применяется в скалярных произведениях, в химических формулах ($CuSO_4 \cdot 7H_2O$), в нековалетных комплексах (ДНК · РНК и т.п.).

Числовой материал следует давать в виде таблиц.

В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов;

Значки типа ~ (волна), ° (кружок), ^ (крышки над и под буквами) используются в крайних случаях.

Рисунки предоставляются в черно-белом виде в форматах JPEG, TIFF, EPS, PDF с разрешением не менее 600 dpi (каждую иллюстрацию поместить в отдельный файл, в масштабе, необходимом для воспроизведения в журнале). **Цветные рисунки публикуются за счет средств авторов в бумажной версии журнала. В электронной версии – бесплатно.**

Латинские названия родов и видов живого мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга – прямым шрифтом. Названия фагов и вирусов в латинской транскрипции пишутся прямым шрифтом.

Названия генов пишутся курсивом (генов человека и дрожжей – заглавными буквами, например *EBFR*; генов мыши – с заглавной буквы, например *Ebfr*; гены других организмов – строчным курсивом).

Названия белков пишутся прямым шрифтом (белков человека, мыши, птиц, рептилий, дрожжей – заглавными буквами, например EBFR; амфибий и рыб – с заглавной буквы, например Ebfr).

Названия нуклеотидов (A, C, G, U), **аминокислотных остатков** (Ala, Arg, Asn и т.д.) и **фосфатов** (ATP, ADP) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.

Нумерация оснований и аминокислот пишется без дефиса (U25; Ala32).

Последовательности аминокислот и нуклеотидов, как правило, не публикуются, а приводятся только их номера в банке данных, например, Acc.no. (Accession number) EMBL Data Bank. Можно приводить в тексте или давать как рисунок короткие последовательности (не более 400 аминокислот или пар нуклеотидов) в случае их активного обсуждения в статье.

Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).

Приводить биохимические и химические термины, а также названия ферментов необходимо в соответствии с международными правилами, принятыми Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

Сокращение терминов и названий ферментов, как правило, затрудняет восприятие текста читателем, поэтому число таких сокращений должно быть сведено к минимуму. **Вводите сокращения в примечания на первой странице**.

В один файл включается аннотация, текст статьи, литература, таблицы и рисунки с подписями. Графики и рисунки необходимо дополнительно предоставить и в отдельных графических файлах. “Тексты” длинных последовательностей, полученных при секвенировании нуклеиновых кислот или белков, надо включить в отдельные текстовые файлы.

Неправильно оформленная рукопись к рассмотрению Редакцией не принимается.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Поступившая в Редакцию рукопись направляется на отзыв **двум специалистам** в данной конкретной области исследований. **Авторы статьи имеют право назвать 3-5 фамилий (имя и отчество полностью) возможных рецензентов с обязательным указанием места работы, телефона, адреса электронной почты. Выбор рецензента остается за редколлегией журнала**. В спорных случаях по усмотрению редколлегии привлекаются дополнительные рецензенты. Срок рецензирования – от 4 до 8 недель. Рукопись, получившая отрицательные отзывы двух независимых рецензентов, по решению редколлегии “отклоняется”. Редакция вправе не вступать в переписку с автором относительно причин (оснований) отказа в публикации статьи. Рукописи, не соответствующие профилю журнала, “отклоняются” без рецензии. Рукописи авторам не возвращаются.

После анонимного рецензирования рукопись передается члену редколлегии, курирующему данное направление в журнале, который дает окончательное заключение о возможности публикации статьи.

Статья, условно принятая к публикации, но нуждающаяся в доработке, направляется авторам с замечаниями рецензента. **Авторам следует учесть все замечания, сделанные в процессе рецензирования статьи, в сопроводительном письме ответить на каждое из замечаний и указать место в рукописи, где сделаны изменения. В случае несогласия с рецензентом автор должен кратко и четко обосновать свою позицию.** Сделанные автором изменения в рукописи необходимо внести в электронный вариант текста и возвратить в Редакцию. **Датой принятия к публикации считается дата поступления версии, удовлетворяющая всем требованиям рецензента и редколлегии.**

Статью, отправленную Редакцией **на доработку после рецензирования и исправленную в соответствии с замечаниями рецензента и редактора, необходимо возвратить в Редакцию в течение 30 дней с момента ее получения авторами, в этом случае сохраняется первая дата поступления. Статья, возвращенная в Редакцию по прошествии более чем 30 дней, будет иметь новую дату поступления.**

В процессе редактирования и подготовки рукописи к печати небольшие стилистические и номенклатурные исправления вносятся по усмотрению научного редактора в соответствии с принятыми в Редакции правилами, более серьезные исправления согласовываются с авторами статьи, или статья отправляется редактором на доработку. В интересах автора как можно быстрее согласовать правку с научным редактором, это существенно ускорит срок публикации статьи.

Для авторов, предоставляющих статью на английском языке или в двух версиях (на английском и русском языке), доступна подготовка статей по технологии OnlineFirst (английская версия). Цель технологии OnlineFirst (далее OF) – ускорить публикацию подготовленной авторами и редакцией журнала статьи путем размещения ее на сайте Springer-link прежде, чем статья будет опубликована в конкретном номере Print-версии. Статья, размещаемая в OF, публикуется значительно раньше формирования окончательной версии номера. При этом она не содержит в себе информацию о конкретном выпуске, томе, годе издания. Указанные элементы удалены из статьи. Идентифицирующим признаком такой статьи является DOI (Digital Object Identifier). Присвоение статье

этого уникального номера позволяет авторам производить ссылку на нее до Print-публикации.

После публикации статьи в Print-версии (в конкретном выпуске) OF-статья замещается на сайте новым вариантом, который обязан совпадать с предыдущим, за исключением добавления тома, номера, года и нумерацией страниц в соответствующей печатной версии.

Очередность публикации устанавливается по дате принятия статьи к печати. **Вне очереди** публикуются работы, отнесенные редколлегией к приоритетным, а также статьи, получившие высокую оценку рецензентов и рекомендуемые редколлегией к ускоренной публикации. **Члены редколлегии журнала имеют право рекомендовать статьи к ускоренной публикации.** В этом случае член редколлегии, представивший к ускоренной публикации статью, осуществляет предварительное рецензирование рукописи и целиком отвечает за ее научное и оформительское качество. Фамилия члена редколлегии, рекомендовавшего статью в печать, публикуется под названием статьи.

Имеют право на внеочередную публикацию статьи аспиранты третьего-четвертого года обучения, представившие справку из отдела аспирантуры.

КОРРЕКТУРА, ОТТИСКИ, ГОНОРАРЫ

Корректура высылается авторам Издательством в виде pdf-файла. На чтение корректуры отводится 3–5 дней со дня отправки. Все исправления необходимо внести в файл и отправить его в Издательство. В исключительных случаях можно составить подробный список исправлений и отправить его в Редакцию по электронной почте.

Исправления против оригинала, особенно в рисунках, не допускаются. В исключительных случаях они могут быть приняты за счет средств автора.

Электронный адрес Редакции: jrmolbio@gmail.com

Веб-сайт Редакции: http://www.molecbio.ru

Веб-сайт Издательств: http://pleiades.online

Телефон: (499) 343-78-07

Издательство высылает первому автору бесплатно электронные файлы статьи в формате PDF на русском и английском языках.

Авторские гонорары за публикацию статьи в журнале не предусмотрены.