

Репарация 8-оксогуанина в ДНК. Механизмы ферментативного катализа

М.В.Рогачева, С.А.Кузнецова

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Химический факультет
119991 Москва, Ленинские горы, факс (495) 939–3181

Обобщены сведения о ферментах, играющих ключевую роль в репарации 8-оксогуанина, одного из наиболее распространенных видов окислительного повреждения ДНК, оказывающего мутагенное действие. Приведены литературные данные о субстратной специфичности, строении активных центров и структурно-функциональных особенностях про- и эукариотических 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз, аденин-ДНК-гликозилаз и 8-оксогуанозин-трифосфатаз. Особое внимание уделено химическим аспектам механизмов каталитического действия этих ферментов, в том числе стереохимии каталитических процессов.

Библиография — 206 ссылок.

Оглавление

I. Введение	817
II. 8-Оксогуанин-ДНК-гликозилазы	819
III. Аденин-ДНК-гликозилазы	832
IV. 8-Оксогуанозинтрифосфатазы	835
V. Система репарации гетеродуплексов	839
VI. Заключение	839

I. Введение

Клеточная ДНК в процессе своего функционирования постоянно подвергается воздействию различных экзогенных и эндогенных факторов, приводящих к ее повреждению. Одними из наиболее агрессивных факторов окружающей среды являются активные формы кислорода, образующиеся в качестве побочных продуктов клеточного метаболизма, в результате окислительного стресса или под действием ионизирующей радиации. Они вызывают окислительные повреждения ДНК, которые могут быть причинами преждевременного старения, возникновения онкологических и ряда других заболеваний.^{1,2} К настоящему времени известно более 100 видов окислительных повреждений ДНК.^{1,3}

М.В.Рогачева. Кандидат химических наук, стипендиат фонда им. Александра фон Гумбольдта. Телефон: (495)391–3153, e-mail: rogacheva.maria@gmail.com

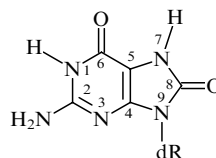
Область научных интересов: синтез и структура модифицированных ДНК-дуплексов, ДНК–белковые взаимодействия, ферменты репарации.

С.А.Кузнецова. Доктор химических наук, ведущий научный сотрудник химического факультета МГУ.

Телефон: (495)931–2562, e-mail: svetlana@belozersky.msu.ru
Область научных интересов: направленная модификация ДНК, ДНК–белковые взаимодействия, ферменты нуклеинового обмена.

Дата поступления 18 января 2008 г.

К наиболее распространенным окислительным повреждениям ДНК, оказывающим мутагенное действие, относится образование нуклеотида, содержащего в качестве основания 7,8-дигидро-8-оксогуанин (далее оксогуанин, охoG).



dR — остаток дезоксирибозы.

Образование охoG вызывает трансверсии G:C → T:A и A:T → C:G, поскольку в процессе репликации охoG может образовывать стабильную хугстиновскую пару с аденином.⁴ ДНК, содержащая в своем составе оксогуанин, является наиболее стабильным продуктом окисления ДНК. Оксогуанин часто используют как биомаркер окислительного повреждения ДНК, связанного с канцерогенезом.⁵

Живые организмы в процессе эволюции выработали целый комплекс мер, направленных на предотвращение гено-токсического эффекта различных повреждений ДНК. Среди этих мер следует отметить реактивацию, рекомбинантную репарацию, репарацию гетеродуплексов, эксцизионную репарацию и др. Эти процессы отличаются друг от друга субстратами, ферментами и механизмами устранения повреждений. Система реактивации используется клеткой для репарации гетероциклических оснований (цикло-бутановых пиримидиновых димеров, алкилированных осно-

ваний) без расщепления и последующего синтеза ДНК.^{6–8} В случае более существенных повреждений (двухцепочечные разрывы, протяженные одноцепочечные «бреши», ковалентные связи между цепями ДНК) функционирует система рекомбинационной репарации. Для ее работы необходимо наличие в клетке неповрежденной копии генетического материала, которая используется для рекомбинации.^{6–9} Неканонические пары оснований ДНК корректируются системой репарации гетеродуплексов. При этом специфически распознаются и удаляются неправильно спаренные основания в дочерней цепи ДНК.^{6–8, 10, 11}

Наиболее распространенным способом устранения повреждений ДНК является эксцизионная репарация, которую можно подразделить на два основных типа: эксцизионную репарацию нуклеотидов, для которой характерно удаление небольших олигонуклеотидных фрагментов ДНК, содержащих повреждение, с последующим восстановлением исходной последовательности нуклеотидов в молекуле;^{6, 12, 13} эксцизионную репарацию оснований, которая включает удаление поврежденного основания специфической ДНК-гликозилазой, удаление остатка дезоксирибозофосфата и восстановление образовавшейся «бреши».

Эксцизионная репарация оснований является основным механизмом устранения окислительных повреждений в ДНК.^{7, 8, 14, 15} Кроме того, в клетках существует и так называемая SOS-репарация, включающаяся в тот момент, когда нужно реплицировать ДНК, но в ней остались повреждения,

которые ни одна из указанных выше систем не смогла устранить. Это крайне рискованный механизм репарации, спасающий клетку от гибели в данный момент. Он позволяет ДНК-полимеразе строить дочернюю цепь ДНК, содержащую довольно много ошибок, которые могут стать летальными для клетки в будущем.^{6, 16, 17}

Для репарации охoG в поврежденной ДНК клетка использует так называемую GO-систему. Эта система обнаружена в клетках практически всех организмов, от бактерий до человека, что обуславливает ее значимость в сохранении клеточного генома. GO-Система прокариот включает действие ряда ферментов: 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (Fpg, известной также как MutM), аденин-ДНК-гликозилазы (MutY) и 8-оксогуанозинтрифосфатазы (MutT)¹⁸ (рис. 1). Поврежденное основание охoG, образующее уотсон-криковскую пару с цитозином, может быть удалено ферментом Fpg с последующей реконструкцией молекулы ДНК с помощью комплексного действия ряда других ферментов. Если основание охoG не было удалено до процесса репликации, то в результате образуется ДНК, содержащая как пары охoG:C, так и пары охoG:A. В этом случае фермент MutY удаляет ошибочно встроенный аденин, ДНК-полимераза I встраивает 2'-дезокситидин-5'-монофосфат напротив 7,8-дигидро-8-оксо-2'-дезоксигуанозин-5'-монофосфата (охoGMP), а затем ДНК-лигаза восстанавливает непрерывную цепь ДНК.

Действие активных форм кислорода может приводить также к возникновению окисленных нуклеозидтрифосфатов.

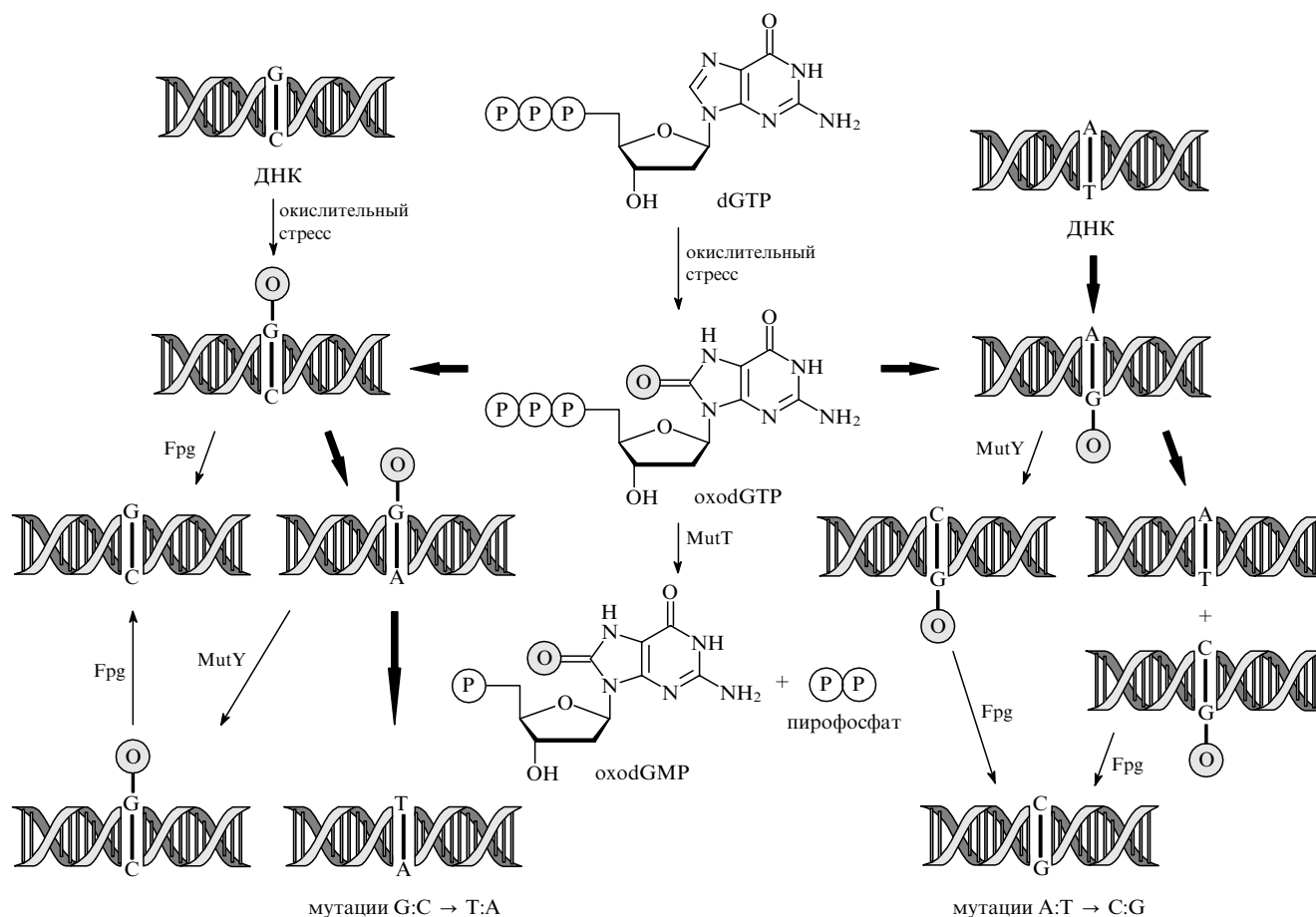


Рис. 1. GO-Система ферментов репарации, предотвращающая мутагенную активность охoG. Жирными стрелками обозначен процесс репликации, тонкими — процесс репарации.

Образование 7,8-дигидро-8-оксо-2'-дезоксигуанозин-5'-трифосфата (оходGTP), являющегося субстратом ДНК-полимеразы, приводит к встраиванию в процессе репликации остатка оходG напротив остатка цитозина в ДНК-матрице (см. рис. 1). Кроме того, возможно ошибочное встраивание остатков оходG напротив аденина ДНК-матрицы. В этом случае фермент MutY вовлекается в процесс мутагенеза, поскольку удаление аденина из неканонической пары оходG:A приводит к трансверсии A:T → C:G. Фермент MutT специфически гидролизует оходGTP до оходGMP, предотвращая внедрение остатков оходG в ДНК.

GO-Система эукариот построена аналогичным образом.^{19,20} Она включает гомологи ферментов MutT и MutY — ферменты МТН и МУН соответственно, — а также функциональный аналог фермента Fpg — 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазу (Ogg1). Биохимические исследования показали наличие короткого и длинного путей реконструкции ДНК в клетках млекопитающих после удаления остатков оходG.²¹ В клетках, содержащих ДНК-полимеразу β, N-концевой домен которой обладает дезоксирибофосфатазной активностью, реконструкция идет по короткому пути, включающему последовательные действия ДНК-полимеразы β и ДНК-лигазы III.²² В клетках, дефектных по ДНК-полимеразе β, этот процесс протекает по длинному пути, включающему синтез цепи ДНК с вытеснением исходной цепи (3–6 нуклеотидов) ДНК-полимеразами δ или ε и фактором PCNA.²³ Затем флэп-эндонуклеаза (FEN1) удаляет вытесненную цепь, а ДНК-лигаза I восстанавливает ковалентную связь между 5'-фосфатом и группой 3'-ОН.²⁴ Анализ репарации оходG в клеточных экстрактах млекопитающих показал, что это основание удаляется из поврежденной ДНК преимущественно по короткому пути.²⁵

Бактерии, несущие дефекты в генах *mutM* или *mutY*, характеризуются увеличением скорости спонтанного мутагенеза. В штаммах *mutM*[–] и *mutY*[–] наблюдается более чем 100-кратное увеличение скорости мутагенеза по сравнению со штаммами «дикого» типа.¹⁸ Инактивация гена *mutT* является сильным мутагенным фактором, приводящим к 1000–10000-кратному увеличению общего уровня A:T → C:G-трансверсий.²⁶ Исследования эукариотических клеточных линий, нокаутных по соответствующим генам, также продемонстрировали увеличение частоты спонтанных мутаций, приводящих к развитию рака.^{19,27,28}

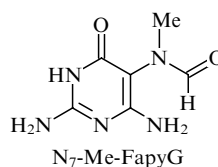
Репарация ДНК — фундаментальный биологический процесс, обеспечивающий стабильность и целостность генома. За последние годы опубликовано большое число оригинальных и обзорных статей, посвященных различным типам повреждений ДНК,^{6,29–33} различным способам их репарации;^{3,9,11–13} биологическим, фармакологическим и клиническим аспектам репарации окислительных повреждений ДНК;^{34–36} ДНК-полимеразам^{37,38} и ДНК-лигазам,^{39,40} вовлеченным в этот процесс; структурным, биофизическим, биохимическим, теоретическим, физико-химическим и молекулярно-биологическим методам исследования, используемым в данной области.^{33,41–43}

В настоящем обзоре обобщены опубликованные за последние 10 лет данные о ферментах, играющих ключевую роль в защите генетического аппарата клетки от мутагенного воздействия 8-оксогуанина. Особое внимание уделено рассмотрению химических аспектов механизмов каталитического действия и конформационной динамики этих ферментов, структурным аспектам их взаимодействия с ДНК. Суммированы сведения о последних достижениях в исследовании сложных процессов поиска и распозна-

вания остатков 8-оксогуанина специфическими ДНК-гликозилазами в геноме.

II. 8-Оксогуанин-ДНК-гликозилазы

Первым выделенным и охарактеризованным белком класса ДНК-гликозилаз является формамидопиримидин-ДНК-гликозилаза (Fpg) *E. coli*. В 1979 г. этот фермент был описан как ДНК-гликозилаза, специфичная к остаткам 2,6-диамино-4-гидрокси-5-(N-метилформамидо)пиримидина (N₇-Me-FapyG).⁴⁴



Такие остатки возникают в ДНК при метилировании атома N₇ гуанина с последующим раскрытием гетероциклического основания под действием различных окислителей. Это повреждение блокирует синтез ДНК и, таким образом, потенциально летально *in vivo*.⁴⁵ В 1991 г. было доказано, что формамидопиримидин-ДНК-гликозилазную и 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазную активности проявляет один и тот же фермент, присутствующий в клетках *E. coli*.⁴⁶ К настоящему времени 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы обнаружены практически во всех изученных организмах про- и эукариот. Эти ферменты представляют собой мономерные глобулярные белки с молекулярной массой 30–40 кДа. Они являются бифункциональными N-гликозилазами/АР-лиазами (АР — апурин/апириимидин), катализирующими удаление остатков оходG и последующее расщепление сахарофосфатного остова ДНК. Скорость-определяющей стадией процесса является гидролиз сахарофосфатного остова ДНК.

1. 8-Оксогуанин-ДНК-гликозилазы прокариот

8-Оксогуанин-ДНК-гликозилазы прокариот имеют высокую степень консервативности, сходные третичную структуру, субстратную специфичность и механизм каталитического действия. Гены *fpg*, кодирующие белки Fpg *E. coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus* и *Lactococcus lactis*, клонированы, их длина составляет ~900 пар нуклеотидов.^{47–49}

а. Структура Fpg прокариот

В 2000 г. методом рентгеноструктурного анализа была решена третичная структура фермента Fpg *T. thermophilus*.⁵⁰ К настоящему времени это единственная структура свободного фермента Fpg в отсутствие ДНК. Позднее были установлены структуры комплексов Fpg *E. coli*,⁵¹ Fpg *B. stearothermophilus*⁵² и каталитически неактивного P1G Fpg *L. lactis*^{53,54} с аналогами ДНК, содержащими апурин/апириимидиновые участки (АР-участки). Кроме того, удалось кристаллизовать комплексы каталитически неактивной E2Q-формы Fpg *B. stearothermophilus* с ДНК, содержащей остатки оходG или дигидроурацила (DHU).⁵⁵ В результате этих структурных исследований была получена ценная информация об общей архитектуре ферментов Fpg прокариот и их комплексов с ДНК (рис. 2).

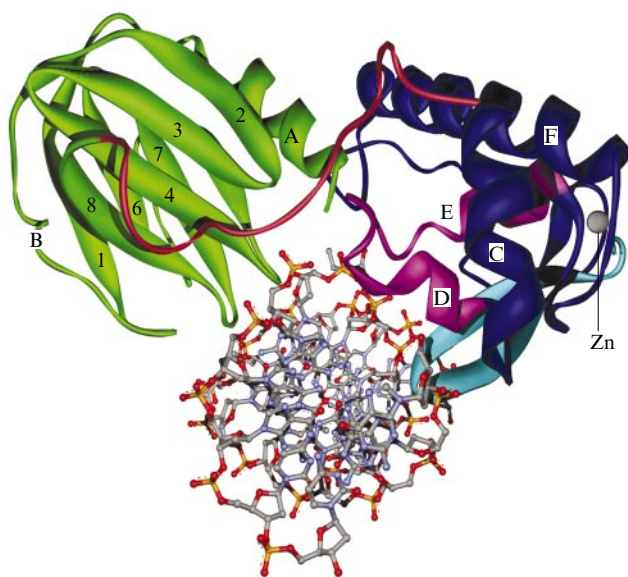


Рис. 2. Структура ковалентного комплекса фермента Fpg *E. coli* с ДНК, содержащей AP-участок (PDB код 1K82).¹⁷ N-Концевой домен фермента изображен зеленым, петля, соединяющая N- и C-концевые домены, — красным, C-концевой домен — синим, мотив H2TH — фиолетовым, мотив «цинковый палец» — голубым, атом цинка — серым.

Было установлено, что прокариотические 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы содержат два различных домена, соединенных гибким полипептидным линкером. N-Концевой домен состоит из восьми антипараллельных β -структур и двух α -спиралей и имеет структуру двухслойного β -сэндвича. C-Концевой домен состоит из четырех α -спиралей и двух антипараллельных β -структур. Две из четырех α -спиралей формируют мотив «спираль — два поворота — спираль» (H2TH), а β -структуры формируют мотив «цинковый палец». H2TH-Мотив и мотив «цинковый палец» являются ДНК-связывающими.

Прокариотические 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы являются металлопротеинами. На одну молекулу фермента приходится один атом цинка, входящий в мотив третичной структуры «цинковый палец».^{50–55} Положительно заряженная ДНК-связывающая бороздка и консервативная аминокислотная последовательность PELPEVET, содержащая каталитически активный аминокислотный остаток Pro-1, расположены между двумя основными доменами фермента.^{50–55}

В 2006 г. были установлены структуры ковалентных комплексов мутантной формы E2Q/Q166C фермента Fpg *B. stearothermophilus* с ДНК-дуплексами различной последовательности, содержащими пару ohoG:C.⁵⁶ Также были установлены структуры комплексов Q166C Fpg *B. stearothermophilus* с ДНК, содержащей пару G:C или A:T вместо ohoG:C.⁵⁶ Эти структуры позволили детально понять процессы, происходящие на ранней стадии поиска повреждения в ДНК прокариотическими 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазами.

Структурные исследования показали, что в комплексах бактериальных белков Fpg с неповрежденной ДНК в отсутствие ohoG полипептидный фрагмент фермента, в состав которого входят аминокислоты, взаимодействующие с поврежденным основанием, разупорядочен.^{53, 54, 56} В то же

время в структуре свободного фермента Fpg *T. thermophilus*⁵⁰ и комплексов каталитически неактивных форм E2Q и E2Q/Q166C Fpg *B. stearothermophilus* с ДНК-дуплексами, содержащими пару ohoG:C,^{55, 56} этот фрагмент упорядочен.

До настоящего времени нет данных о структуре комплексов каталитически активных ферментов Fpg с ohoG-содержащей ДНК. Это связано с тем, что ДНК-гликозилазы «дикого типа» расщепляют свои субстраты намного быстрее, чем протекает процесс кристаллизации и сбор данных. Прогресс в области химического синтеза и модификации ДНК, позволивший осуществить дизайн и синтез нерасщепляемых аналогов субстратов, сделал возможным изучение взаимодействия ДНК-гликозилаз с поврежденными основаниями. Так, в 2004 г. была установлена структура комплекса Fpg *L. lactis* с ДНК, содержащей карбоциклический аналог формамидопиримидина.⁵⁷ Перспективными соединениями для структурных исследований комплексов ферментов «дикого типа» с ohoG-содержащей ДНК являются новые аналоги субстратов 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз, в которых одна из природных межнуклеотидных фосфатных групп вблизи остатка ohoG заменена на пирофосфатную либо реакционноспособную замещенную пирофосфатную группу.^{58, 59} Установлено, что ДНК-дуплексы, содержащие такие модифицированные группы в 3'-положении 7,8-дигидро-8-оксо-2'-дезоксигуанозина (ohodG) либо через одно нуклеотидное звено от него, являются негидролизуемыми аналогами субстратов 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз.^{60, 61}

6. Субстратная специфичность Fpg прокариот

Существует много разновидностей субстратов прокариотических 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз. Кроме остатков ohoG и N₇-Me-FaryG, эти ферменты эффективно удаляют из ДНК остатки 2,6-диамино-4-гидрокси-5-формамидопиримидина (FaryG), 4,6-диамино-5-формамидопиримидина (FaryA),[†] а также продукты одноэлектронного окисления ohoG, такие как спироиминодигидантоин (Sp) и гуанидинодигидантоин (Gh).^{62–64} Остаток 7,8-дигидро-8-оксо-2'-дезоксинузиона (ohodI) удаляется этими ферментами приблизительно в два раза эффективнее, чем остаток ohodG,⁶⁵ в то же время остатки 7,8-дигидро-8-оксо-2'-дезоксинебуларина (ohodN) и 7,8-дигидро-8-оксо-2'-дезоксиаденозина (ohodA) удаляются прокариотическими белками Fpg на два порядка менее эффективно (рис. 3).^{65, 66} Кроме того, прокариотические ферменты Fpg удаляют из олигодезоксинуклеотидов производные 1,N⁶-этендезоксиаденозина ($\epsilon dA'$ и $\epsilon dA''$),⁶⁷ продукты окисления ohoG — оксазолон (Z)^{68, 69} и оксалуровую кислоту (oxA),^{68, 70} — а также производные 2,6-диамино-4-гидрокси-5-формамидопиримидина (Fary) с заместителями при атоме N формамидной группы, такими как 2-(гидроксиэтилтио)этил- (N₇-HETE-FaryG),⁷¹ 2-{N-(2-хлорэтил)-N-[(амино)гидрокси]фосфорил}аминоэтил- (N₇-PM-FaryG),⁵⁷ афлатоксин B1 (N₇-AFB1-FaryG),⁵⁷ и C₈-аминофлуореновые производные гуанина с открытым имидазольным кольцом — C₈-AF-iroG и C₈-AF-G.⁶⁵

Найдено, что бактериальные белки Fpg проявляют активность и по отношению к некоторым окисленным пиримидинам. Так, эти ферменты удаляют из ДНК-дуплексов нуклеозиды 5-гидроксцитозина (5-OH-dC),^{72, 73} 5-гидроксинузиона (5-OH-dU),⁷³ 5,6-дигидроурацила (DHdU),⁵⁷ 5,6-дигидро-

[†] OhoG, FaryG, N₅-Me-FaryG, FaryA являются физиологическими субстратами Fpg прокариот.

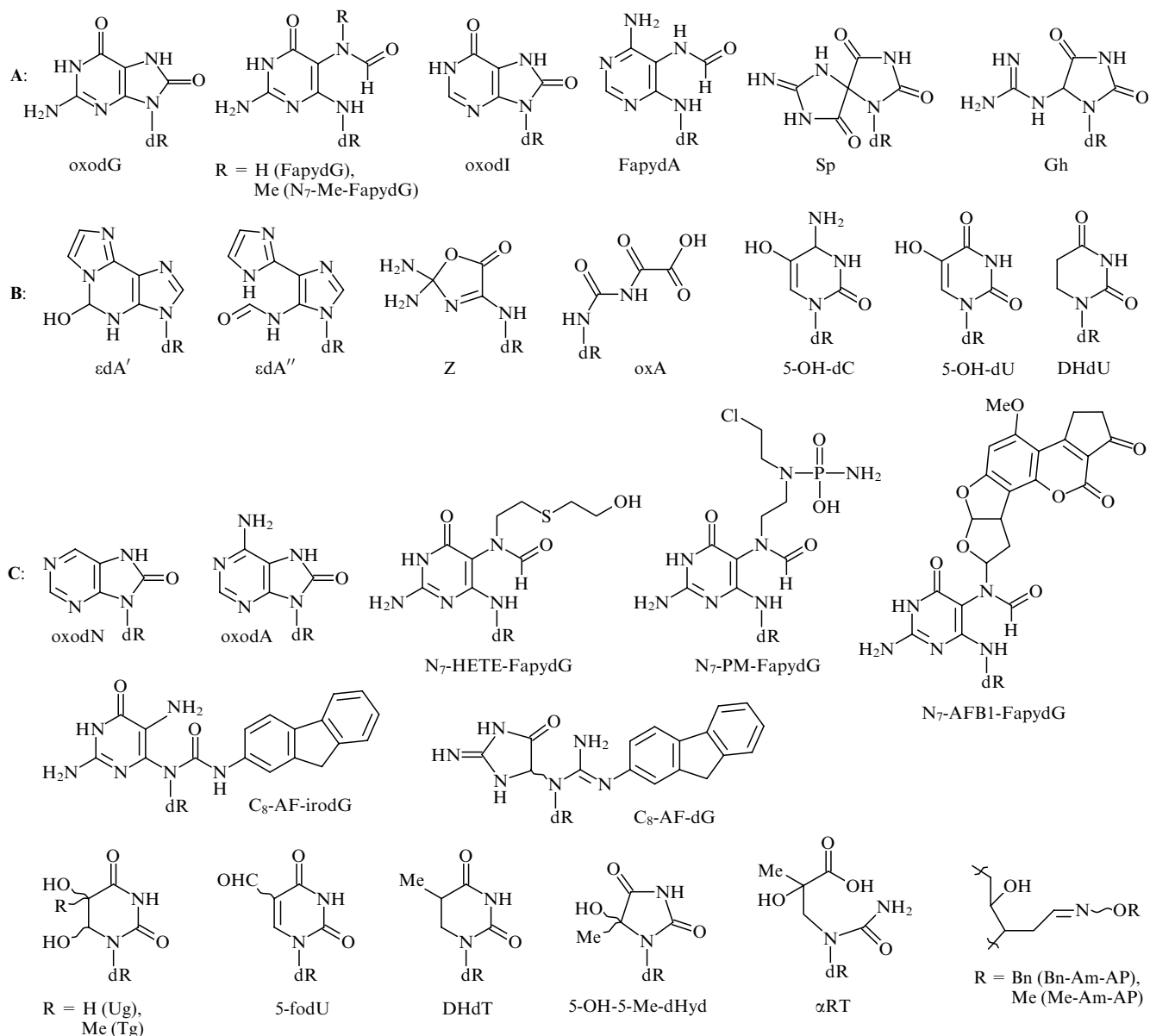
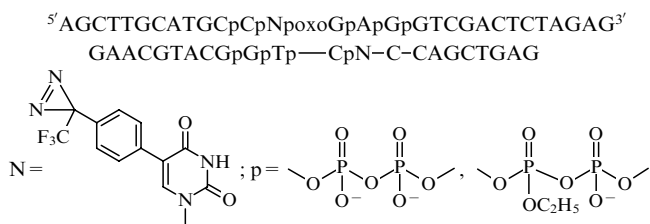


Рис. 3. Структуры поврежденных участков, удаляемых из ДНК прокариотическими ферментами Fpg. Фрагменты, представленные в секциях **A**, **B** и **C**, удаляются с высокой, средней и низкой эффективностью соответственно.

тимина (DHdT),⁷² урацилгликоля (Ug),^{57,74} тимингликоля (Tg),^{72,74} 5-гидрокси-5-метилгидантоина (5-OH-5-Me-dHyd),⁷⁵ 5-формилурацила (5-fodU),⁷⁶ 3-уреидо-(2*R*)-гидрокси-2-метилпропионовой кислоты (αRT),⁷⁷ а также *O*-метил- и *O*-бензилгидроксиламины из соответствующих модифицированных AP-участков — Me-Am-AP, Bn-Am-AP.⁷⁸ Полагают, что такой широкий спектр субстратной специфичности прокариотических ферментов Fpg может быть обусловлен их способностью изменять свои активные центры, чтобы связывать как окисленные пиримидины, так и окисленные пурины.^{79,80} Следует отметить, что ферменты Fpg удаляют из олигонуклеотидных субстратов гораздо более широкий спектр поврежденных оснований, чем из высокомолекулярной ДНК,^{62,81} в частности, из высокомолекулярной ДНК не удаляются основания DHU, 5-OH-C, 5-OH-U.⁶²

Недавно были предложены новые аналоги субстратов 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз, содержащие остаток 8-оксогуанина и модифицированные межнуклеотидные группы в различных положениях по отношению к нему.^{58,60,61} Показано, что такие субстраты узнаются ферментом Fpg *E. coli* и его эукариотическим аналогом — 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой человека (hOGG1) — и эффективно связываются с ними. Эффективность каталитического расщепления таких соединений зависит от положения модифицированной группы по отношению к остатку oxoG и может быть как выше эффективности расщепления природного субстрата аналогичного строения, так и ниже, вплоть до полного ингибирования удаления остатка oxoG.^{58,60} Описаны также аналоги субстратов Fpg *E. coli*, содержащие фотоактивируемые арил(трифторметил)дизазириновые группы в составе нуклеозидов, расположенных в непосредственной близости от остатка oxodG.⁸²



Продemonстрировано, что предложенные аналоги субстратов, содержащие реакционноспособные *O*-алкиламещенные пирофосфатные и арил(трифторметил)диазиринные группы, являются эффективными реагентами для зондирования активных центров Fpg *E. coli* и hOGG1.^{61, 82}

Еще одним субстратом прокариотических 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз является ДНК, которая содержит AP-участки, образующиеся при гидролизе N-гликозидной связи.^{54, 83} Расщепление N-гликозидной связи может осуществляться ДНК-гликозилазами, а также быть следствием спонтанной апуринизации/апириимидинизации ДНК. Установлено, что в результате спонтанных гидролитических процессов в клетках человека образуется примерно 1000 AP-участков на одну клетку в день.²⁹ Наличие AP-участков в ДНК может приводить к возникновению мутаций и быть летальным для клетки.⁸⁰

Установлено, что 5'-концевой дезоксирибозофосфат (5'-dRp), продукт действия клеточных AP-эндонуклеаз, также является субстратом 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз прокариот.⁸⁴ Скорость dRp-азной активности Fpg прокариот выше, чем ДНК-гликозилазной и сравнима со скоростью выщепления AP-участков.⁸⁴

в. Каталитический механизм расщепления субстратов прокариотическими ферментами Fpg

Общий механизм каталитического расщепления субстрата прокариотическими 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазами включает выпетливание и удаление остатка oxoG из двойной спирали ДНК путем разрыва N-гликозидной связи. На следующем этапе происходит расщепление сахарофосфатного остова ДНК по механизму β, δ -элиминирования. В результате в ДНК образуется одноцепочечная одонуклеотидная брешь, фланкированная 3'- и 5'-фосфатными группами, а остаток дезоксирибозы и поврежденное основание удаляются (схема 1).

Разрыв N-гликозидной связи происходит в результате нуклеофильной атаки каталитически активной аминокислоты фермента по атому $\text{C}_{1'}$ поврежденного нуклеотида с образованием ковалентного фермент-субстратного интермедиата — основания Шиффа (см. схему 1). Образование такого производного подтверждено его восстановлением цианоборгидридом натрия с последующим рентгеноструктурным анализом образующегося ДНК-белкового комплекса.^{51, 52} Методами масс-спектрометрии с электрораспылением⁸⁵ и PCA^{51, 52} было доказано, что в роли нуклеофила выступает α -аминогруппа N-концевого остатка пролина, принадлежащего высококонсервативной последовательности PELPEVET Fpg прокариот. В случае ДНК, содержащей AP-участок, Pro-1 необходим для проявления белком AP-лиазной активности, но не для образования основания Шиффа.⁸⁶ Установлено, что Pro-1 не является существенно важным в поддержании конформации активного центра Fpg прокариот.⁸⁶ Взаимное расположение атомов N_α и $\text{O}_{4'}$ в комплексе Fpg *E. coli*, ковалентно связанного с AP-ДНК, свидетельствует о том, что нуклеофильная атака

осуществляется вдоль связи $\text{C}_{1'} \rightarrow \text{O}_{4'}$ (см.⁵¹). Согласно данным PCA нековалентного комплекса E2Q Fpg *B. stearothermophilus* с oxoG-содержащей ДНК,⁵⁵ аминогруппа пролина расположена достаточно близко к атому $\text{C}_{1'}$, однако не очень выгодно с точки зрения нуклеофильной атаки по $\text{S}_{\text{N}}2$ -механизму.

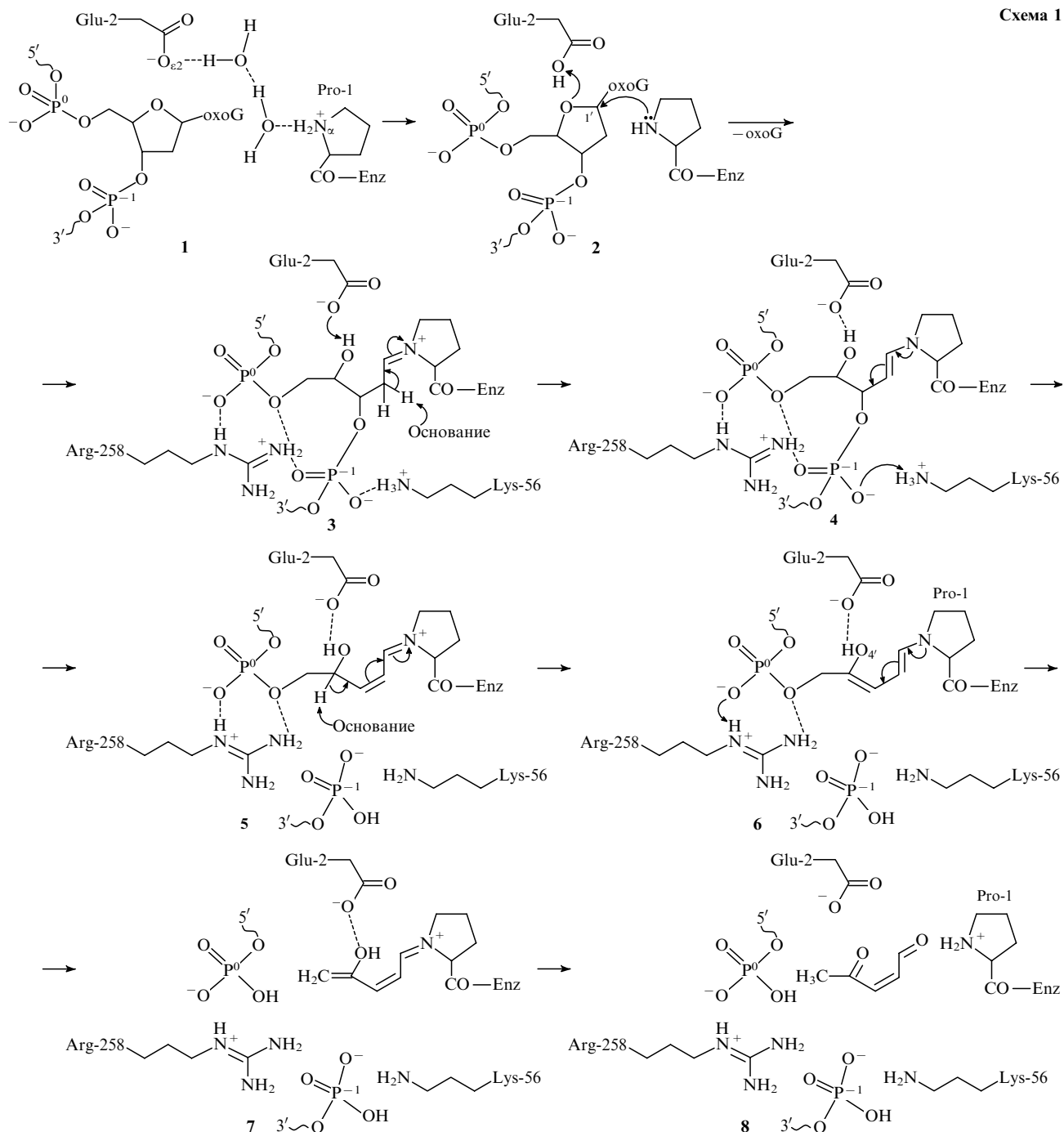
В последнее время в литературе появились данные, свидетельствующие о том, что удаление поврежденного основания из ДНК протекает по $\text{S}_{\text{N}}1$ -механизму. Согласно этому диссоциативному механизму, на первой стадии происходит удаление поврежденного основания с образованием промежуточного реакционноспособного оксокарбениевого иона, который на следующем этапе атакуется α -аминогруппой Pro-1 (см.⁵⁵). В пользу такого механизма свидетельствует образование сети водородных связей с участием атома O_6 oxoG в комплексе E2Q Fpg *B. stearothermophilus* с oxoG-ДНК, которые активируют основание oxoG как уходящую группу.⁵⁵ Согласно данным PCA свободного фермента Fpg *T. thermophilus*,⁵⁰ аминокислотные остатки Pro-1, Glu-2, Asn-161 и Ile-162 формируют плотную сеть водородных связей с несколькими молекулами воды. Такая сеть потенциально может переносить протон от атома N_α Pro-1 на атом O_{62} Glu-2 (см. схему 1, структура 1), которые расположены на расстоянии 6.2 Å друг от друга в структуре белка. Это одновременно активирует остаток Pro-1 для нуклеофильной атаки и позволяет остатку Glu-2 протонировать атом $\text{O}_{4'}$ дезоксирибозы (см. схему 1, структура 2), что обеспечивает раскрытие цикла дезоксирибозы поврежденного нуклеотида.

Формирование обратимого ковалентного интермедиата (см. схему 1, структура 3) способствует дальнейшему удалению остатка дезоксирибозы в виде 4-оксопент-2-енала по механизму β, δ -элиминирования. Для успешного протекания этого процесса необходимы акцепторы протонов, расположенные в ближайшем окружении атомов $\text{C}_{2'}$ и $\text{C}_{4'}$ поврежденного нуклеотида. Их природа к настоящему времени не установлена. Для фермента Fpg *B. stearothermophilus* предполагается, что эту функцию осуществляет молекула воды, расположенная на расстоянии 3.5 Å от атома $\text{C}_{2'}$ (см.⁵²). Однако такая молекула воды отсутствует в случае Fpg *E. coli*, делая ее участие в этом процессе менее вероятным.

К настоящему времени сведений о стереохимии процесса β, δ -элиминирования, осуществляемого прокариотическими ферментами Fpg, в литературе крайне мало. Существует четыре возможных стереохимических направления реакции элиминирования: *син*-элиминирование протона *pro-S-2'* (соответствующее значение торсионного угла $\nu_2(\text{C}_{2'}-\text{C}_{3'}) = 120^\circ$), *син*-элиминирование протона *pro-R-2'* ($\nu_2 = 0^\circ$), *анти*-элиминирование протона *pro-S-2'* ($\nu_2 = -60^\circ$), *анти*-элиминирование протона *pro-R-2'* ($\nu_2 = 180^\circ$).⁸⁷ Структурные данные для ковалентных комплексов Fpg прокариот с AP-содержащей ДНК свидетельствуют о том, что наиболее предпочтительным является *анти*-элиминирование протона *pro-S-2'*.^{51, 52} Средняя величина торсионного угла ν_2 составляет -81.6° для Fpg *E. coli*⁵¹ и -121.0° для Fpg *B. stearothermophilus*.⁵² Следует отметить, что другие AP-лиазы удаляют протон *pro-S-2'* из остатка дезоксирибозы согласно механизму *син*-элиминирования.⁸⁸

Другой особенностью реакций β, δ -элиминирования является стабилизация уходящих фосфатных групп. Согласно данным PCA, в случае Fpg *E. coli* фосфатные группы, фланкирующие поврежденный нуклеотид, жестко координируются высококонсервативными аминокислотными остатками Lys-56, Asn-168, Arg-258 и Tyr-236 (рис. 4). Эти остатки протонируют фосфаты, формируя хорошие

Схема 1



уходящие группы, и стабилизируют отрицательный заряд, образующийся на фосфатах в результате реакций элиминирования (см. схему 1, структуры 4–7). Так, Lys-56 протонирует P^{-1} -фосфат в 3'-положении окисленного нуклеотида, а Arg-258 протонирует одновременно P^{-1} -фосфат в 3'-положении и P^0 -фосфат в 5'-положении от повреждения (структура 4). После расщепления фосфодиэфирной связи в P^{-1} -фосфате его связь с Arg-258 ослабляется, позволяя этому аминокислотному остатку сместиться в сторону P^0 -фосфата для его более эффективного протонирования (структура 5). Следует отметить, что координация уходящих фосфатных групп ДНК N-гликозилазами/АР-лиазами коррелирует с их активностью в реакциях β,δ -элиминирования по отношению к соответствующим фосфатам.⁸⁷

г. Конформационные изменения в структуре комплексов Fpg прокариот с ДНК

Двухдоменная структура прокариотических 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз позволяет предположить, что оба домена могут двигаться в процессе связывания ДНК, поиска и удаления поврежденного основания. Это предположение согласуется с данными РСА, из которых следует, что остатки Pro-1 и Glu-2 фермента Fpg *T. thermophilus* вовлечены в прямые взаимодействия с аминокислотами из H2TH-мотива этого белка, в то время как в комплексе Fpg *E. coli* с ДНК эти взаимодействия заменяются специфичными контактами с ДНК. Кроме того, изменения собственной флуоресценции остатков триптофана, зафиксированные при связывании

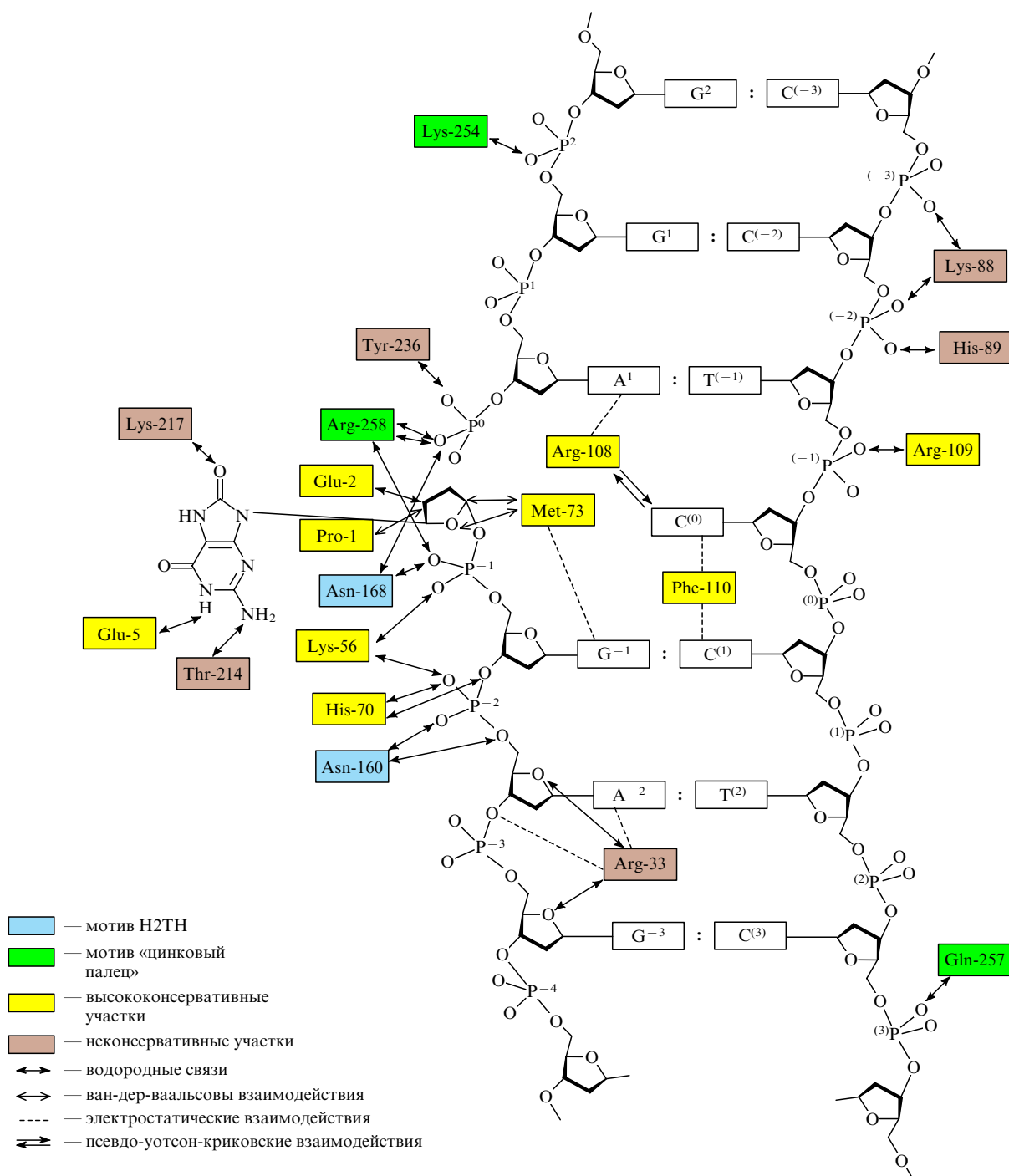


Рис. 4. Схематическое изображение взаимодействий между oxoG-содержащей ДНК и ферментом Fpg *E. coli*.^{60, 61, 94} Центральные нуклеотиды поврежденной и комплементарной цепей ДНК – oxoG⁰ и C⁽⁰⁾ соответственно.

Fpg *E. coli* с ДНК;⁸⁹ свидетельствуют о конформационных изменениях в структуре фермента. Согласно данным ЯМР, α A- и α F-спирали, составляющие часть ДНК-связывающей бороздки фермента Fpg *E. coli*, подвижны.^{90, 91} Жарков и соавт.⁸⁷ предполагают существование открытой (для ферментов, не связанных с ДНК) и закрытой (для ферментов, связанных с ДНК) конформаций фермента Fpg *E. coli*. Для открытой формы ферментов семейства Fpg характерен существенно больший угол между N- и C-концевыми доменами по сравнению с закрытой формой. Таким образом,

совокупность всех полученных данных свидетельствует о том, что при связывании ДНК два домена прокариотических 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз могут поворачиваться друг относительно друга.⁸⁷

Ковалем и соавт.⁹² была исследована кинетика конформационных переходов в молекуле Fpg в ходе каталитического процесса. Для этого использовали метод остановленной струи (stopped-flow) и регистрировали изменение интенсивности флуоресценции остатков триптофана белка при его взаимодействии со специфическими олигонуклеотидными

субстратами, содержащими остаток oHoG . Было показано, что кинетические кривые содержат пять конформационных переходов, что соответствует пяти стадиям каталитического процесса удаления остатков oHoG из ДНК. Эти стадии включают связывание фермента Fpg с ДНК, узнавание поврежденного основания и взаимные адаптации структур белка и ДНК, необходимые для осуществления катализа.

Кузнецов и соавт.,⁹³ регистрируя флуоресценцию остатков триптофана в Fpg *E. coli* и 2-аминопурина в ДНК методом остановленной струи, изучили предстационарную кинетику ферментативных реакций с участием Fpg *E. coli*. Было установлено, что образование каталитически-активного комплекса фермента Fpg со специфическим ДНК-субстратом также проходит через пять стадий. На первой стадии происходит неспецифическое связывание фермента с ДНК, которое приводит к формированию первичного «столкновительного» комплекса. На второй стадии образуется вторичный комплекс, который играет ключевую роль в процессе распознавания поврежденного участка ДНК. Показано, что на этой стадии происходит конформационные изменения в структуре фермента в области остатка Phe-110. На третьей стадии осуществляется выпетливание поврежденного основания. Эта стадия приводит к формированию полости в дуплексе ДНК. Четвертая стадия характеризуется процессом встраивания аминокислотных остатков фермента в образовавшуюся в ДНК полость и подстройкой конформации активного центра фермента для осуществления каталитических стадий процесса. Завершает ферментативный цикл равновесная стадия диссоциации комплекса фермент – продукт.

Наряду с конформационными изменениями в структуре фермента, происходящими при его взаимодействии с поврежденной ДНК, наблюдаются существенные изменения и в структуре ДНК. Это связано с тем, что удаление окисленного основания из двойной спирали ДНК является крайне затруднительным, поскольку для этого необходимо проникновение остатка Pro-1 внутрь спирали ДНК. Поэтому для эффективного протекания каталитической реакции прокариотические ферменты Fpg, аналогично всем ДНК-гликозилазам, выпетливают поврежденное основание из двойной спирали ДНК и связывают его в глубоком кармане активного центра фермента.^{51,55} Выпетливание поврежденного основания происходит через малую бороздку и осуществляется за счет вращения вокруг связей $\text{P}-\text{O}_{5'}$ и $\text{O}_{3'}-\text{P}$. Энергия, необходимая для выпетливания поврежденного основания из ДНК, составляет ~ 3 ккал·моль⁻¹. Этот барьер легко преодолевается за счет нековалентных фермент-субстратных взаимодействий. Прокариотические ферменты Fpg имеют относительно большую контактную поверхность с ДНК (для Fpg *E. coli* она составляет $2512 \text{ \AA}^2$).⁵¹ В конформационной перестройке ДНК участвуют аминокислотные остатки из обоих доменов Fpg прокариот.

Находящаяся в комплексе с ферментами Fpg ДНК имеет классическую В-форму по всей длине за исключением поврежденного участка.

Фермент-зависимые изменения структуры ДНК в месте повреждения осуществляются в основном за счет взаимодействий фосфатных групп ДНК с аминокислотами Fpg (см. рис. 4).^{51,60,61,94} Важнейшую роль в этом процессе играет остаток Phe-110 из $\beta 7-\beta 8$ -петли N-концевого домена фермента. Ароматическое кольцо остатка Phe-110 встраивается между основанием нуклеотида $\text{C}^{(0)}$, комплементарного поврежденному oHoG^0 -основанию, и соседним с 5'-конца основанием $\text{C}^{(1)}$, образуя так называемые «face-to-face» π -взаимодействия с пиримидиновым кольцом $\text{C}^{(1)}$

нуклеотида.[‡] При этом нарушаются стэкинг-взаимодействия этих двух оснований, что в совокупности со специфическими контактами фосфатных групп с аминокислотами фермента приводит к существенному изгибу ДНК (66°) в месте повреждения и выпетливанию окисленного основания из спирали ДНК (см. рис. 4).

При выпетливании поврежденного основания в спирали ДНК образуется значительная полость (расстояние между атомами C_1' дезоксирибоз поврежденного oHoG^0 и комплементарного ему $\text{dC}^{(0)}$ нуклеотидов составляет $14.7 \text{ \AA}$ вместо обычного значения $10.5 \text{ \AA}$ в В-ДНК).⁵¹ В эту полость внедряются гидрофобные аминокислотные остатки фермента. В случае Fpg *E. coli* это Met-73, Arg-108 и Phe-110 (см. рис. 4). Объемный остаток Met-73 из $\beta 4-\beta 5$ -петли встраивается в спираль ДНК через малую бороздку, занимая положение выпетленного основания oHoG^0 . Основание $\text{C}^{(0)}$, комплементарное выпетленному, остается внутри спирали ДНК за счет образования двух водородных связей с остатком Arg-108, принадлежащего $\beta 7-\beta 8$ -петле фермента. Эти взаимодействия обуславливают специфичность Fpg по отношению к основанию, комплементарному поврежденному.

Следует отметить, что взаимодействие Fpg прокариот с ДНК, не содержащей повреждений, существенным образом отличается от взаимодействий фермента с поврежденной ДНК. Когда фермент связывается с поврежденной ДНК, изогнутой в области oHoG -нуклеотида, часть положительно заряженной ДНК-связывающей бороздки фермента Fpg прокариот остается свободной. В случае неповрежденной ДНК изгиб в ее структуре отсутствует или менее выражен, поэтому в связывании такой ДНК участвует вся бороздка фермента. При этом осуществляются дополнительные или альтернативные взаимодействия, необходимые для поиска ферментом повреждений.

д. Поиск остатков oHoG в геноме прокариотическими ферментами Fpg

Модель поиска остатков oHoG в геноме прокариотическими ферментами Fpg включает следующие стадии: 1) неспецифическое связывание фермента с ДНК; 2) сканирование бороздок ДНК при диффузии по ней фермента; 3) узнавание поврежденного основания; 4) формирование переходного фермент-субстратного комплекса; 5) выпетливание поврежденного нуклеотида из спирали ДНК и 6) его связывание в «кармане» активного центра фермента.⁹⁵

К настоящему времени остается нерешенным вопрос о механизме узнавания повреждения прокариотическими ферментами Fpg. Известно, что выпетливание каждого основания из спирали ДНК связано с существенными энергетическими затратами. В то же время ДНК-гликозилазы не тратят энергии при поиске повреждений на ДНК.⁹⁶ Структурные исследования комплексов Fpg *B. stearothermophilus* с различными ДНК-дуплексами свидетельствуют о том, что взаимодействие ароматического кольца остатка Phe-114 фермента, интеркалированного в спираль неповрежденной ДНК, приводит лишь к незначительному повороту гетероциклических оснований, в то время как взаимодействие этого остатка с oHoG :С-ДНК приводит к выпетливанию поврежденного

[‡] Номера нуклеотидов поврежденной цепи приведены без скобок, а номера нуклеотидов комплементарной цепи даны в круглых скобках. Точкой отсчета для нумерации нуклеотидов служит поврежденное звено.

основания.⁵⁶ Возможно, что в активном центре прокариотических ферментов Fpg связывается именно поврежденное основание, спонтанно выпетлившее из спирали ДНК. По такому механизму действуют урацил-ДНК-гликозилазы,⁹⁷ однако механизм действия других ДНК-гликозилаз не доказан. Наиболее вероятным в настоящее время считается распознавание окисленного гетероциклического основания, находящегося внутри спирали ДНК, до момента его выпетливания.⁶⁵ Такой механизм внутриспирального узнавания повреждения является кинетически наиболее предпочтительным.

Важным моментом в процессе узнавания повреждения является установление механизма распознавания окисленного основания прокариотическими ферментами Fpg и определение структурных элементов, участвующих в этом процессе. Возможны два варианта распознавания: 1) прямое считывание, включающее узнавание повреждения посредством образования водородных или электростатических взаимодействий с гетероциклическим основанием нуклеотида, находящегося в большой или малой бороздке ДНК;⁹⁸ 2) не прямое считывание, представляющее собой механизм узнавания относительно термодинамически нестабильной структуры ДНК в месте повреждения.⁸¹ Оба этих механизма подразумевают существование «читающей головки» — структурного элемента, который используется ферментом для поиска повреждений и взаимодействует с ДНК до того, как происходит ее изгиб и выпетливание поврежденного основания из спирали.⁸⁷

Поскольку уотсон-криковская пара охoG:C является термодинамически стабильной,⁹⁹ первоначально считалось, что прокариотические ферменты Fpg используют механизм прямого считывания и различают структурные особенности основания охoG, т.е. различают группы N₇—H и C₈=O, экспонированные в большую бороздку ДНК.⁶⁵ Однако позднее методом PCA было установлено, что прокариотические ферменты Fpg связывают ДНК со стороны малой бороздки.^{51, 52} Со структурной точки зрения только один аминокислотный остаток Arg-258 Fpg *E. coli* из мотива «цинковый палец» может непосредственно взаимодействовать с группами N₇—H и C₈=O охoG. Учитывая тот факт, что ДНК существенным образом изогнута в специфическом фермент-субстратном комплексе, наиболее вероятной в настоящее время кажется модель непрямого считывания.

Полагают, что во время одномерной диффузии фермента по ДНК аминокислотные остатки фермента Fpg прокариот образуют слабые неспецифические аддитивные связи с фосфатными группами неповрежденной ДНК с участием молекул воды.^{56, 100, 101} Переход от неповрежденной ДНК к охoG-содержащей ДНК сопровождается уменьшением степени сольватации контактной поверхности комплекса Fpg-ДНК и изменением характера взаимодействия аминокислотных остатков фермента с фосфатными группами ДНК.⁵⁶ В специфическом комплексе эти контакты, возникающие за счет взаимодействия отдельных, непосредственно контактирующих групп, являются кооперативными.^{100, 101} Такой переход характеризуется изменением свободной энергии связывания Fpg *E. coli* $\Delta\Delta G = -2.8$ ккал·моль⁻¹, причем вклад от связывания Fpg с охoG составляет -0.9 ккал·моль⁻¹ (см.^{100, 101}).

Пять аминокислотных остатков Fpg *E. coli* — Lys-88, His-89, Arg-108, Arg-109 и Phe-110 — вызывают изгиб ДНК; они функционируют вместе и «пытаются» изменить структуру ДНК. Ключевую роль в этом процессе играет остаток Phe-110. При этом возможно только локальное изменение

структуры ДНК на участке, содержащем окисленное основание. Несмотря на то что пара охoG:C не вносит конформационных изменений в структуру ДНК,⁹⁹ а специфические взаимодействия между основаниями охoG и C незначительно слабее таковых в паре A:T,¹⁰² взаимодействие остатка Phe-110 с парой охoG:C отличается от его взаимодействия с парами A:T или G:C.

После того как поврежденный участок найден, остаток охoG выпетливается в специфический карман фермента Fpg.

е. Взаимодействие прокариотических ферментов Fpg с остатком охoG поврежденной ДНК

По данным моделирования взаимодействия Fpg *E. coli* с поврежденной ДНК методом молекулярной динамики,^{81, 103} остаток охoG узнается независимо от его конформации (*син* или *анти*) в ДНК. Узнавание осуществляется за счет образования стабильной водородной связи между атомом O₈ охoG и ϵ -аминогруппой Lys-217 (см. рис. 4). Длина этой связи составляет 2.8 ± 0.1 Å и 3.1 ± 0.5 Å для *анти*- и *син*-конформаций соответственно. Кроме того, ϵ -аминогруппа Lys-217 участвует в образовании водородной связи с атомом O_{4'} дезоксирибозы окисленного нуклеотида. Вероятно, образование этих водородных связей способствует разрыву N-гликозидной связи в поврежденном нуклеотидном звене ДНК и удалению поврежденного основания из ДНК. Важно отметить, что Lys-217 не образует контактов с неповрежденным остатком гуанина, находящимся вблизи от активного центра Fpg *E. coli*, независимо от того, в какой конформации находится охoG.⁸¹ В связи с этим полагают, что контакты, образованные с участием Lys-217, обуславливают субстратную специфичность Fpg *E. coli*. Это подтверждают данные, полученные методом сайт-направленного мутагенеза.⁸¹ Так, замена Lys-217 на Thr приводила к уменьшению примерно в 5 раз каталитической активности Fpg *E. coli*; при этом эффективность связывания охoG-содержащих субстратов была аналогичной эффективности их связывания ферментом «дикого» типа.

В процессе специфического узнавания охoG-содержащей ДНК ферментом Fpg *E. coli* помимо остатка Lys-217 участвуют также остатки Met-73 и Thr-214 фермента. Так, для *anti*-охoG вместо водородной связи ϵ -аминогруппы Lys-217 с атомом O₈ охoG возможно образование водородной связи между N₇H-группой охoG и карбонильной группой остатка Met-73, а гидроксильная группа остатка Thr-214 может участвовать в образовании водородной связи с экзациклической аминогруппой охoG.

Данные⁶⁵ по изучению субстратной специфичности Fpg *E. coli* свидетельствуют о том, что для эффективного удаления поврежденного основания из ДНК необходимо взаимодействие этого фермента с атомами N₁ и O₆ охoG. Несмотря на то что эти атомы присутствуют как в окисленном, так и в неповрежденном гуанине, они участвуют в образовании разных связей с ферментом. Так, атом N₁ *anti*-охoG участвует в электростатическом или ван-дер-ваальсовом взаимодействии с карбоксильной группой Glu-5 Fpg *E. coli*. Замена остатка глутаминовой кислоты на остаток глутамина приводит к снижению N-гликозилазной активности Fpg *E. coli*.¹⁰⁴

В неспецифическом комплексе неповрежденной ДНК с Fpg *E. coli* вместо взаимодействия атома N₁ с карбоксильной группой Glu-5 имеет место взаимодействие атома N₁ неповрежденного гуанина с карбонильной группой Thr-214. В этом случае неповрежденный гуанин имеет менее благо-

приятную конформацию в специфическом «кармане» Fpg *E. coli*, что, вероятно, приводит к тонкой перестройке активного центра фермента и препятствует удалению гуанина. Нуклеозид *syn*-охоG не взаимодействует с Glu-5, но контактирует с другими аминокислотами из активного центра Fpg *E. coli*.⁸¹

Из сказанного выше следует, что остатки Lys-217, Met-73 и Thr-214 Fpg *E. coli* ответственны за узнавание поврежденного основания охoG, в то время как остаток Glu-5 оказывает влияние на скорость удаления охoG из поврежденной ДНК. Важно отметить, что остатки Thr-214 и Lys-217 в отличие от Glu-5 не являются высококонсервативными в семействе белков Fpg.

Взаимодействия охoG с аминокислотными остатками активного центра E2Q Fpg *B. stearothermophilus* отличаются от его взаимодействий с аминокислотными остатками Fpg *E. coli*. Согласно данным РСА, в этом случае выпетленный поврежденный нуклеозид имеет *син*-конформацию в специфическом «кармане» фермента. Группа N₇H образует водородную связь с карбонильной группой Ser-220 (Thr-214 в Fpg *E. coli*). Гуанидиновая группа остатка Arg-223 (Lys-217 в Fpg *E. coli*) не взаимодействует с атомом O₈ охoG. Активный центр E2Q Fpg *B. stearothermophilus* узнает охoG за счет образования водородных связей между неконсервативными остатками Thr-224, Glu-78 и атомами N₁ и N₂ охoG. Кроме того, E2Q Fpg *B. stearothermophilus* участвует в образовании четырех водородных связей с атомом O₆ охoG,⁵⁵ в то время как фермент Fpg *E. coli* формирует с этим атомом только одну водородную связь. Вероятно, эти отличия связаны с изменением конформации активного центра E2Q Fpg *B. stearothermophilus*, вызванным заменой Glu-2 на Gln, а именно, заменой заряженной карбоксильной группы на нейтральную амидную группу.

ж. Взаимодействие Fpg прокариот с цепью ДНК, комплементарной поврежденной

Отличительной особенностью всех ДНК-гликозилаз является образование большого числа контактов с поврежденной цепью ДНК, в то время как неповрежденная цепь удерживается в комплексе в основном за счет специфических взаимодействий с комплементарными парами оснований поврежденной цепи. Ферменты Fpg прокариот образуют небольшое количество контактов с противоположной цепью ДНК, причем аминокислотные остатки, вступающие в контакт с Fpg, в основном неконсервативны.^{51–55}

Ферменты Fpg более эффективно удаляют остатки охoG из ДНК, содержащей неканонические пары охoG:Т и охoG:G, чем из физиологического субстрата, содержащего пару охoG:C.^{65,81} Структуры комплексов Fpg *B. stearothermophilus* с ДНК, содержащими восстановленный AP-участок напротив цитозина, гуанина или тимина,⁵² дают ключ к пониманию того, как прокариотические ферменты Fpg могут стабилизировать продуктивные михаэлисовские комплексы с такими ДНК, но не объясняют порядок субстратной предпочтительности. Полагают, что более низкая термодинамическая стабильность пар охoG:G и охoG:Т является основной причиной такой предпочтительности.^{65,102}

Структурные⁵¹ и биохимические⁸¹ данные свидетельствуют о том, что остаток Arg-108 фермента Fpg *E. coli* является основным элементом, дискриминирующим основание в неповрежденной цепи ДНК, комплементарное поврежденному. Атомы N_η и N_ε гуанидиновой группы остатка Arg-108, интеркалированного внутрь спирали ДНК, обра-

зуют псевдо-уотсон-криковские водородные связи с атомами N₃ и O₂ цитозина (C⁽⁰⁾), удерживая его внутри спирали ДНК. Образованию этих водородных связей способствуют вандер-ваальсовы взаимодействия между остатком Phe-110, интеркалированным между основаниями C⁽⁰⁾ и C⁽¹⁾ и расположенным с 5'-конца от C⁽⁰⁾, которые ограничивают подвижность этих оснований.

Согласно структурным данным комплекса Fpg *B. stearothermophilus* с ДНК, содержащей восстановленный AP-участок напротив гуанина и тимина,⁵² гуанин в таком комплексе находится в *син*-конформации и образует два контакта с Arg-108 с участием атомов O₆ и N₇, в то время как тимин образует только одну водородную связь с Arg-108 с участием атома O₂. В этом случае аминокислотный остаток Arg-108 принимает конформацию, в которой силы отталкивания между атомами N_{η1} и N₃ минимальны. Хотя к настоящему времени структура комплекса Fpg прокариот с ДНК, содержащей пару охoG:A, не известна, полагают, что такая ДНК является плохим субстратом вследствие ее слабого связывания с этим ферментом, высокой термодинамической стабильности хугстиновской пары охoG:A и возможности аденина формировать только одну водородную связь с Arg-108.⁵²

Согласно данным РСА ковалентного комплекса Fpg *E. coli* с AP-ДНК, аминокислотные остатки His-89 и Arg-109 фермента контактируют с фосфатными группами цепи ДНК, комплементарной поврежденной. Замена His-89 приводит к снижению специфичности этого фермента, в то время как замена обеих аминокислот His-89/Arg-109 приводит к полной потере активности Fpg *E. coli* по отношению к охoG-содержащей ДНК.⁸¹

2. 8-Оксогуанин-ДНК-гликозилазы эукариот

Функциональные аналоги фермента Fpg прокариот — эукариотические ферменты Ogg1 — были найдены в клетках многих эукариот.^{105–107} Интересно, что растения содержат одновременно гены *fpg* и *ogg1*.^{108–110} К настоящему времени не установлена причина сохранения растениями генов обеих ДНК-гликозилаз, обладающих сходными функциями. Возможно, они локализованы в разных органеллах или проявляют различную специфичность в клетках растений.

Первым был клонирован ген *ogg1* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, установлена его нуклеотидная последовательность.¹⁰⁶ Этот ген кодирует белок уOgg1, состоящий из 376 аминокислот, с молекулярной массой 43 кДа.^{106,111} Сравнение аминокислотных последовательностей Fpg *E. coli* и уOgg1 показало отсутствие гомологии между этими ферментами. Найдено, что ген *yogg1* гомологичен гену, кодирующему эндонуклеазу III *E. coli* (Endo III), а фермент уOgg1 является структурным аналогом фермента Endo III. Позднее были клонированы кДНК Ogg1 млекопитающих, гомологичные гену *ogg1 S. cerevisiae*.^{20,105,112,113}

В клетках человека ген *hogg1* расположен на хромосоме 3 (3p25).^{112–115} Он содержит 8 экзонов.¹¹³ В результате альтернативного сплайсинга с использованием экзонов 7 или 8 были экспрессированы две главные изоформы hOGG1, которые оказались идентичными по первым 316 аминокислотным остаткам, но отличались по С-концу.¹¹⁶ При этом белок hOGG1-α содержал сигнал ядерной локализации, а белок hOGG1-β — сигнал локализации в митохондриях или хлоропластах (в случае растений).^{116,117}

Белок hOGG1-α (молекулярная масса 39 кДа) состоит из 345 аминокислотных остатков, а hOGG1-β (47 кДа) — из 424 аминокислотных остатков.^{114–116} Фермент hOGG1-α

является бифункциональной ДНК-гликозилазой/АР-лиазой, удаляет *охоG* и *FaruG* из ДНК и расщепляет сахарофосфатный остов ДНК по механизму β -элиминирования.^{105, 111–114, 117} Субстратная специфичность и каталитический механизм действия фермента *hOGG1*- β детально не были изучены, однако было показано, что этот фермент расщепляет олигонуклеотидные субстраты, содержащие пару *охоG:C*.¹¹⁴

Кроме двух главных изоформ — *hOGG1*- α и *hOGG1*- β — в клетках человека на уровне мРНК зафиксировано еще несколько минорных изоформ *hOGG1*, различающихся по использованию альтернативных сайтов сплайсинга.^{113, 116} Однако остается неизвестным, имеет ли место трансляция этих мРНК.

Эукариотический фермент *Ogg1*- α был найден и охарактеризован в клетках *S. cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, а также в клетках млекопитающих, в то время как фермент *Ogg1*- β был обнаружен только в клетках человека.¹¹⁷ В дальнейшем под *hOGG1* мы будем понимать изоформу *hOGG1*- α , так как именно на ней проводились все описанные в литературе структурные и функциональные исследования.

Структурный анализ гена *hogg1* и его транскриптов показал, что вследствие генетического полиморфизма в клетках человека продуцируются два белка с разными аминокислотами в кодоне 326 — *hOGG1*-Ser-326 и *hOGG1*-Cys-326.¹¹⁸ Репарирующая активность в отношении остатков *охоG* оказалась выше у *hOGG1*-Ser-326.

Фермент *hOGG1* принадлежит к семейству ДНК-гликозилаз, характерной особенностью которых является наличие в активном центре мотива «спираль – шпилька – спираль», за которым следует Gly/Pro-богатая петля, оканчивающаяся абсолютно консервативным остатком аспарагиновой кислоты (HhH-GPD-мотив).¹¹⁹ Это семейство включает монофункциональные ДНК-гликозилазы — 3-метилаленин-ДНК-гликозилазу *E. coli* (AlkA), аденин-ДНК-гликозилазу *E. coli* (MutY) — и бифункциональные ДНК-гликозилазы/АР-лиазы — эндонуклеазы *Micrococcus luteus* UV, Endo III (известную также как Nth1), yNtg1, yNtg2 и ферменты *Ogg1* дрожжей и млекопитающих.^{111, 119} Установлено, что функциональный остаток лизина в HhH-мотиве консервативен у всех белков данного семейства, обладающих лиазной активностью, и отсутствует в белках, не имеющих этой активности.^{120–122}

а. Структура 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз эукариот

К настоящему времени из всех идентифицированных эукариотических 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз третичная структура решена только для минимального фрагмента фермента *hOGG1*, содержащего аминокислотные остатки 12–327.¹²³ Попытки получить кристаллы полноразмерного *hOGG1* и его комплексов с ДНК не увенчались успехом. В результате ограниченного трипсинолиза *hOGG1* с N- и C-концов фермента были удалены неструктурированные пептидные сегменты. В результате был получен минимальный фрагмент *hOGG1*, так называемый каталитический кор, обладающий такой же каталитической активностью, что и белок «дикого» типа, но связывающийся с ДНК с меньшей аффинностью.¹²³

В 2000 г. удалось закристаллизовать мутантную форму минимального фрагмента фермента K249Q-*hOGG1*, не обладающую каталитической активностью, но сохраняющую способность узнавать пару *охоG:C* в ДНК в составе ком-

плекса с *охоG*-ДНК, и исследовать структуру этого комплекса методом РСА.¹²³ Позднее была решена структура каталитического кора *hOGG1* и его ковалентного комплекса с ДНК, содержащей нерасщепляемый аналог АР-участка.^{124–126} Оказалось, что конформации *hOGG1* в этих структурах сходны, за исключением активного центра фермента.^{123, 125} Фермент *hOGG1*, как и другие ферменты данного структурного класса, содержит два α -спиральных домена и антипараллельный β -складчатый домен. Такой β -домен был обнаружен еще только у AlkA. Возможно, он принимает участие в белок-белковых взаимодействиях (см. рис. 5 на с. 833).

Абсолютно консервативный аминокислотный остаток Asp-268, расположенный на C-конце HhH-GPD-мотива *hOGG1*, является чрезвычайно важным как для поддержания третичной структуры, так и для проявления ферментом ДНК-гликозилазной и АР-лиазной активностей.¹²⁷ Было установлено, что Asp-268 участвует в ориентации дезоксирибозы поврежденного нуклеотида, необходимой для успешного протекания каталитического расщепления *охоG*-содержащей ДНК ферментом *hOGG1*. Замена Asp-268 на аспарагин не вызывает изменения структуры белка, но приводит к полной потере его каталитической активности.

Анализ данных РСА комплекса D268N-*hOGG1* (минимальный фрагмент *hOGG1*) с *охоG*-содержащей ДНК,¹²⁷ а также комплексов D268E-*hOGG1* и D268Q-*hOGG1* с ДНК, содержащей остаток тетрагидрофурана, выявил, что Asp-268 взаимодействует с N-концевыми аминокислотами из α M-спирали, расположенной непосредственно после HhH-GPD-мотива. Карбонильная группа Asp-268 участвует в образовании водородных связей с амидной группой остатка Met-271 и имидазольным кольцом His-270, обеспечивая необходимую для успешного протекания каталитического акта ориентацию α M-спирали. Эти взаимодействия играют важную роль при формировании третичной структуры *hOGG1*.¹²⁷

Следует отметить, что остаток Glu-2 фермента Fpg прокариот играет ту же роль, что и остаток Asp-268 фермента *hOGG1*. Формируя водородные связи с амидными группами из основной цепи α -E спирали ДНК-связывающего H2TH-мотива, остаток Glu-2 Fpg *B. stearothermophilus* обеспечивает ориентацию этой спирали, необходимую для успешного протекания каталитического расщепления поврежденной ДНК.⁵⁵

В 2005 г. были установлены¹²⁸ структуры комплексов каталитического кора *hOGG1* с ДНК, не содержащей повреждений, и с ДНК, содержащей *охоG*. Для этого Вердайн и соавт.¹²⁸ разработали и применили стратегию ковалентного связывания ДНК с ферментом. С этой целью были осуществлены две модификации: 1) в ДНК по экзоциклической аминогруппе цитозина, комплементарного *охоG*, была введена дисульфидная линкерная группа; 2) в ферменте *hOGG1* остаток Asn-149 был заменен на Cys. Полученный фермент N149C-*hOGG1* проявлял каталитическую активность, аналогичную активности фермента *hOGG1* «дикого» типа. В результате реакции между модифицированными таким образом ферментом и ДНК образовывалась дисульфидная связь. Позже (в 2006 г.) с использованием этого подхода была установлена структура ковалентного комплекса фермента N149C-*hOGG1* с *охоG*:G-ДНК, в котором остаток гуанина, расположенный непосредственно с 5'-конца от *охоG*, оказался выпетленным из спирали ДНК.¹²⁹ Эти данные пролили свет на один наиболее интригующий вопрос эксцизионной репарации оснований, связанный с механиз-

мом поиска ДНК-гликозилазами повреждений в геноме^{129, 130} (см. раздел II.2.д).

В 2007 г. были установлены структуры комплексов ферментов H270A-hOGG1, Q315A-hOGG1, Q315F-hOGG1 и G42A-hOGG1 с *охоГ:С-ДНК*.⁹⁶ Найдено, что входящие в состав активного центра hOGG1 аминокислотные остатки His-270, Gln-315 и Gly-42 образуют связи с выпетленным окисленным нуклеотидом. Так, His-270 образует водородную связь с фосфатной группой, расположенной с 5'-конца от *охоГ*. Это позволяет ферменту hOGG1 отличить *охоГ* от аденина, цитозина и тимина, но не от гуанина. Единственным аминокислотным остатком hOGG1, который распознает оксогуанин и гуанин, является Gly-42. Остаток Gly-42 входит в состав *охоГ*-узнающей петли (аминокислотные остатки 35–43) фермента hOGG1, конформация которой жестко закреплена многочисленными водородными связями.⁹⁶ Жесткая фиксация конформации Gly-42 является исключительно важной для распознавания ферментом hOGG1 поврежденного и неповрежденного гуанина. Эти данные позволили детально понять процесс узнавания поврежденного основания ДНК эукариотическими 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазами.

б. Субстратная специфичность фермента Ogg1 эукариот

Ферменты Ogg1 эукариот удаляют из ДНК остатки *охоГ*, находящегося напротив цитозина, тимина и гуанина, но они практически неактивны по отношению к дуплексам, содержащим пару *охоГ:А*.¹¹² В опытах *in vitro* показано, что с наибольшей эффективностью проходят N-гликозилазная и AP-лиазная реакции Ogg1 с ДНК-субстратом, содержащим пару *охоГ:С*.^{105, 107, 131} В случае образования оксогуанином неканонических пар с другими основаниями протекает только гликозилазная реакция, эффективность которой выше для ДНК, содержащей пару *охоГ:Т*.^{111, 132}

Было показано, что эукариотические 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы расщепляют ДНК, содержащую остатки FaryG, N₇-Me-FaryG, *охоА*, *охоI* и 7,8-дигидро-8-оксо-6-О-метилгуанина (6-ОМе-*охоГ*).^{107, 131–134} Следует отметить, что эукариотические ферменты Ogg1 удаляют остатки N₇-Me-FaryG намного менее эффективно, чем *охоГ*,^{105, 106} в то время как прокариотические ферменты Frg удаляют эти остатки из поврежденной ДНК с одинаковой эффективностью.^{46, 47} Фермент уOgg1, в отличие от Frg, не удаляет остатки FaryA,¹³¹ а фермент mOgg1 удаляет остатки 8-оксо-небуларина из олигонуклеотидных субстратов, содержащих пары *оходN:dC* и *оходN:dG* и остатки 8-аминогуанина, менее эффективно, чем остатки *охоГ*.^{105, 132}

Эффективности расщепления ДНК, содержащей неканонические пары оснований *охоГ:А*, *охоГ:Т* или *охоГ:Г*, ферментами Ogg1 эукариот и Frg прокариот существенно различаются. Эукариотические ферменты расщепляют ДНК, содержащую напротив поврежденного основания цитозин, примерно в два раза более эффективно, чем ДНК, содержащую любой другой нуклеозид. В противоположность этому прокариотические ферменты в 10–30 раз более эффективно расщепляют ДНК, содержащую напротив поврежденного основания гуанин или тимин, чем ДНК, содержащую цитозин.¹³²

Еще одним субстратом Ogg1 эукариот является ДНК, содержащая AP-участок, эффективность удаления которого уменьшается в ряду AP:C > AP:T >> AP:G.¹³⁵ Ферменты Ogg1 эукариот, проявляющие AP-лиазную активность, расщепляют ДНК с 3'-конца от повреждения по механизму

β-элиминирования.^{135–137} AP-Лиазная активность эукариотических ферментов Ogg1 существенно ниже их ДНК-гликозилазной активности.¹³²

Найдено, что фермент rOgg1 (аналогично ферменту Frg *E. coli*) при взаимодействии с ДНК, содержащей AP-участок, удаляет остаток дезоксирибозы по механизму β,δ-элиминирования,¹⁰⁷ а фермент уOgg1 обладает дезоксирибозофосфатазной активностью.¹³⁸

Недавно было показано, что аналогами субстратов hOGG1 являются синтетические ДНК-дуплексы, содержащие пирофосфатные и О-этилзамещенные пирофосфатные группы в различных положениях по отношению к остатку *охоГ*.^{60, 61}

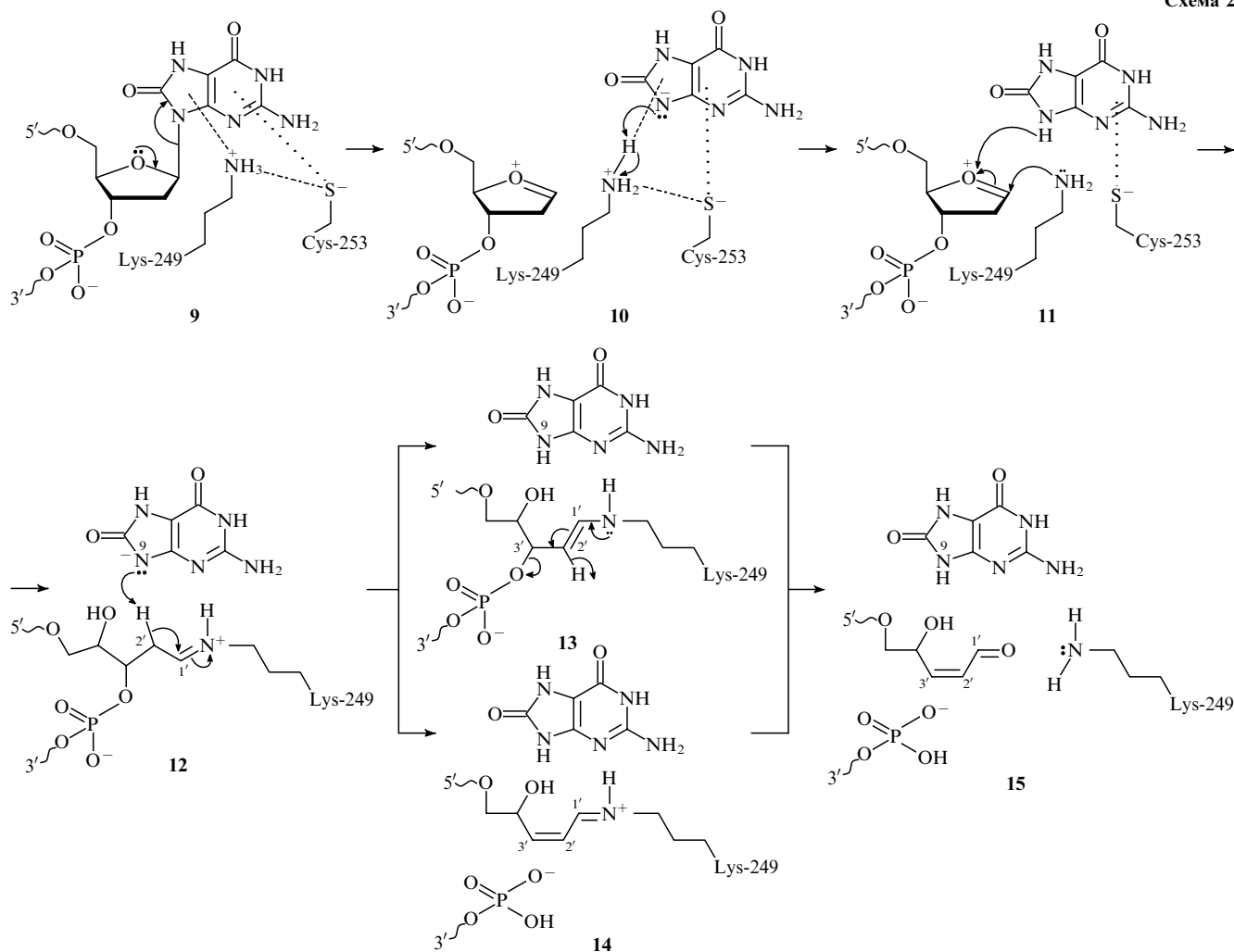
В клетках *S. cerevisiae* и HeLa в дополнение к Ogg1 был обнаружен белок Ogg2 с молекулярной массой ~36 кДа, который удаляет окисленные гетероциклические основания, образующие пары с пуриновыми основаниями.^{111, 137, 139} Эффективность удаления *охоГ* ферментом hOGG2 уменьшается в ряду *охоГ:Г* > *охоГ:А* > *охоГ:Т* ≡ *охоГ:С*.¹¹¹ Было показано, что фермент уOgg2 удаляет остатки FaryG, а также расщепляет ДНК, содержащую AP-участки, по механизму β-элиминирования.¹⁰⁴ Следует отметить, что белок уOgg2 способен проявлять активность только в присутствии ЭДТА и полностью ингибируется 0.2 М KCl. Биологическая роль Ogg2 заключается в репарации остатков *охоГ*, встраиваемых в ДНК в ходе репликации в виде *оходGMP*, и в предотвращении тем самым трансверсий T:A → G:C.^{102, 104}

в. Каталитический механизм расщепления субстратов эукариотическими ферментами Ogg1

Каталитическое удаление поврежденного основания *охоГ* эукариотическими ферментами Ogg1 протекает по механизму S_N1 и включает не менее пяти последовательных стадий, происходящих в одном активном центре фермента (схема 2).^{119, 126, 127, 140} На первом этапе ε-аминогруппа Lys-249 и сульфгидрильная группа Cys-253, принадлежащие мотиву NhH-GPD фермента hOGG1, образуют соответственно π-катионную (обозначена штриховой линией) и вандер-ваальсову связи (пунктирная линия) с поврежденным основанием (соединение 9), а также водородную связь между собой (штрих-пунктирная линия). Это приводит к отщеплению *охоГ* в форме аниона *охоГ*[−] и образованию оксокарбениевого катиона (ДНК-гликозилазная активность) (схема 2, соединение 10).^{119, 126, 127} Следует отметить, что отщепившееся основание *охоГ*[−] не высвобождается из ДНК-белкового комплекса, а остается связанным в активном центре hOGG1 и используется ферментом в качестве кофактора (кислотно-основного катализатора). Так, *охоГ*[−] отщепляет протон у атома N_ε остатка Lys-249, активируя этот остаток для нуклеофильной атаки по атому C_{1'} остатка дезоксирибозы поврежденного нуклеозида (схема 2, соединение 11), что приводит к образованию ковалентного ДНК-белкового интермедиата (соединение 12).[§] Во время нуклеофильной атаки водородная связь между остатками Lys-249 и Cys-253 разрушается. Далее *охоГ* участвует в переносе протона на атом O_{4'}, что приводит к раскрытию дезоксирибозного цикла поврежденного нуклеозида. На следующем этапе фермент Ogg1 катализирует расщепление сахарофосфатного

§ Интермедиат 12, представляющий собой основание Шиффа, был зафиксирован путем восстановления боргидридом натрия.¹²⁶

Схема 2



остова с 3'-конца от образовавшегося AP-участка (AP-лиазная активность).^{119, 126} Эта реакция протекает по механизму β -элиминирования и инициируется удалением протона у атома C2' поврежденного нуклеотида с образованием либо енамина (схема 2, соединение **13**), либо α,β -непредельного основания Шиффа (соединение **14**). Если образуется енамин, то на следующем этапе происходит самопроизвольное β -элиминирование, приводящее к образованию основания Шиффа. В результате одна из цепей ДНК разрывается^{91, 92, 119} (продукты **15**).

К настоящему времени стереохимия заместителей при связях C=N и C=C в соединениях **12–14** не определена. В отсутствие кофактора фермент hOGG1 проявляет низкую стереоспецифичность и удаляет 65% протонов *pro-S* и 35% протонов *pro-R*. В присутствии нуклеинового основания hOGG1 проявляет более высокую специфичность, удаляя 75–85% протонов *pro-R*.¹²⁶

Следует отметить, что использование ohoG в качестве кофактора для расщепления сахарофосфатного остова ДНК ферментом hOGG1 является единственным известным к настоящему времени примером ферментативного катализа, осуществляемого с помощью продукта каталитического расщепления.¹²⁶ Каталитическое расщепление AP-содержащей ДНК ферментом hOGG1 ускоряется в присутствии 8-аминогуанина более чем в 75 раз, 8-бромгуанина более чем в 35 раз и в присутствии гуанина примерно в 10 раз.¹²⁶

Как было упомянуто выше (см. раздел II.1.в), активность ДНК-гликозилаз в реакциях β,δ -элиминирования коррелирует с эффективностью координирования уходящих фосфатных групп ДНК аминокислотами фермента. Так, в формировании водородных связей с фосфатной группой, расположенной в 3'-положении от модифицированного нуклеотида, в случае фермента hOGG1 участвуют два аминокислотных остатка (Asn-149 и Asn-150), а в случае фермента Fpg *E. coli* — три остатка (Lys-56, Arg-258 и Asn-168). Этим объясняется более слабая AP-лиазная активность ферментов hOGG1 по сравнению с Fpg *E. coli*.¹²³ Скоростью определяющей стадией процесса каталитического расщепления поврежденной ДНК эукариотическими ферментами Ogg1 является реакция β -элиминирования. В противоположность этому для прокариотических ферментов Fpg скоростью определяющей стадией является разрыв N-гликозидной связи. Таким образом, наличие доноров протонов в окружении фосфатных групп играет важную роль в процессе расщепления поврежденной ДНК 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазами.

г. Конформационные изменения в структуре комплекса hOGG1 с поврежденной ДНК

Ферменты Ogg1 эукариот при взаимодействии с поврежденной ДНК существенно изменяют ее структуру, контактируя в основном с поврежденной цепью.¹²³ Так, фермент hOGG1

«сжимает» сахарофосфатный остов ДНК в месте повреждения вдвое по сравнению с В-формой ДНК, уменьшая расстояние между фосфатами, фланкирующими 8-оксогуанозин.¹²³ Сжатие происходит за счет образования водородных связей между аминокислотными остатками активного центра hOGG1 и фосфатными группами ДНК, при этом остаток ohoG полностью выпетливается[¶] из спирали ДНК и позиционируется в специфическом «кармане» каталитического центра фермента.^{123, 128}

В полость, образовавшуюся в результате выпетливания поврежденного основания, встраиваются боковые радикалы аминокислотных остатков Asn-149, Tyr-203 и Arg-204 фермента hOGG1. Интеркаляция Tyr-203 между цитозином пары ohoG:C (C⁽⁰⁾) и соседним (с 5'-конца) основанием вносит существенный вклад в деформацию сахарофосфатного остова ДНК и узнавание пары ohoG:C (аналогично узнаванию Phe-110 фермента Fpg *E. coli*).¹²³ Цитозин C⁽⁰⁾ остается внутри спирали ДНК за счет формирования пяти водородных связей с аминокислотными остатками Asn-149, Arg-154 и Arg-204 фермента hOGG1. В стэкинг-взаимодействиях с соседними гетероциклическими основаниями цитозин C⁽⁰⁾ не участвует вследствие резкого отклонения ДНК (70°) от плоскости пары ohoG:C. Атом кислорода амидной группы остатка Asn-149 взаимодействует с аминогруппой цитозина C⁽⁰⁾. Аминокислотные остатки Arg-154 и Arg-204, располагающиеся в непосредственной близости от плоскости гетероциклического кольца цитозина C⁽⁰⁾, одновременно образуют по две водородные связи с атомами N₃ и O₂ цитозина. Эти взаимодействия являются исключительно сильными и специфическими, они позволяют ферменту отличить цитидин от остальных азотистых оснований ДНК. Участок ДНК, не контактирующий с ферментом, находится в канонической В-форме.

Согласно структурным данным, в образование ohoG-связывающего «кармана» фермента hOGG1 вовлечены аминокислотные остатки His-270, Gln-315 и Phe-319.^{123, 125} Конформации боковых групп в этих трех аминокислотных остатках определяют две основные формы специфического «кармана» фермента: открытую форму для hOGG1, связанного с ohoG-содержащей ДНК, и закрытую для свободного фермента.^{123, 124} Переход между закрытой и открытой формами ohoG-связывающего «кармана» hOGG1 происходит в результате согласованного изменения конформации боковых групп этих трех аминокислот. Так, при связывании ohoG-ДНК с ферментом hOGG1 ароматическое кольцо Phe-319 поворачивается на 90°. При этом разрушается π-стэкинг-взаимодействие между аминокислотными остатками His-270 и Phe-319 и происходит образование водородной связи между His-270 и фосфатной группой, расположенной с 5'-конца от ohoG. Остаток Phe-319, в свою очередь, участвует в ван-дер-ваальсовом взаимодействии с ohoG, а остаток Gln-315 образует две водородные связи с N₁-имино- и N₂-аминогруппами ohoG, стабилизируя его в специфическом «кармане» hOGG1.¹²⁸

Биохимические данные также свидетельствуют о том, что при связывании поврежденной ДНК ферментом hOGG1 аминокислотные остатки His-270, Gln-315 и Phe-319 изменяют свою ориентацию.¹⁴¹ Так, замены H270 → A, H270 → L,

Q315 → A и F319 → A приводят к существенному снижению эффективности ДНК-связывающей и N-гликозилазной активностей фермента hOGG1, но не влияют на его AP-лиазную активность. Замена H270 → R приводит к небольшому снижению связывающей и гликозилазной активностей фермента по отношению к ДНК, содержащей пару ohoG:C.¹⁰¹ Снижение активности фермента H270A-hOGG1 при замене H270 → A вызвано нарушением специфического взаимодействия His-270 с фосфатной группой, расположенной с 5'-конца от ohoG.

Кузнецов и соавт.^{142, 143} исследовали предстационарную кинетику ферментативных реакций с участием hOGG1, регистрируя флуоресценцию остатков триптофана в белках и 2-аминопурина в ДНК методом остановленной струи. Установлено, что в ходе каталитического цикла происходят множественные конформационные изменения как фермента, так и ДНК-субстрата. Эти изменения приводят к взаимной адаптации структур взаимодействующих молекул, формированию каталитически-активных состояний ферментов и способствуют превращению субстрата в продукт. Фермент hOGG1 связывается с ohoG-субстратом в три стадии. Сначала происходит образование неспецифического комплекса, что приводит к «разрыхлению» двойной спирали субстрата и быстрому выпетливанию поврежденного основания в активный центр фермента. На второй и третьей стадиях происходит последовательное встраивание аминокислотных остатков в полость ДНК-дуплекса, образующегося после выпетливания из цепи остатка ohoG. Показано, что дискриминация субстратов по основанию, расположенному напротив поврежденного основания, происходит на второй стадии процесса, в то время как на третьей стадии формируется каталитически-активный комплекс, в котором последовательно происходят химические стадии ферментативного процесса. Завершает ферментативный цикл равновесная стадия диссоциации комплекса фермент – продукт.

д. Поиск остатков ohoG в геноме эукариотическим ферментом hOGG1

Последние данные, полученные с использованием новейшей технологии, позволяющей зафиксировать скольжение молекулы фермента вдоль протяженной цепи ДНК, показывают, что фермент hOGG1 в физиологических условиях за доли секунды связывает ДНК и скользит по ней со скоростью, превышающей $2 \cdot 10^7$ пар оснований в секунду.¹⁴⁴ Использование этой технологии позволило также подтвердить предположение о процессивности фермента Fpg *E. coli*.

Данные, полученные методами PCA и атомно-силовой микроскопии, свидетельствуют о том, что при поиске поврежденных оснований фермент hOGG1 изгибает ДНК.¹²⁸ Так, в комплексе N149C-hOGG1 с неповрежденной ДНК ДНК-дуплекс изогнут на 80° с 5'-конца от выпетленного гуанозина и повернут на 20° вокруг оси спирали.[†] В комплексе этого фермента с ohoG:G-содержащей ДНК изгиб спирали с 5'-конца от выпетленного гуанозина еще больше.¹²⁹

Основываясь на данных PCA ковалентных комплексов мутантного фермента N149C-hOGG1 с ДНК-дуплексами, содержащими оксогуанин или неповрежденный гуанин, Вер-

[¶] Эукариотические ферменты Ogg1 в противоположность прокариотическим 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазам выпетливают остаток ohoG через большую бороздку ДНК.¹²⁸

[†] В комплексе мутантного фермента N149C-hOGG1 с ДНК, содержащей выпетленный ohoG, изгиб спирали меньше и составляет 70°.

дайн и соавт.¹²⁸ предположили, что при поиске поврежденных оснований фермент hOGG1 выпетливает каждый остаток гуанина. Если выпетленным оказывается неповрежденное основание, оно фиксируется в так называемом «экзо-участке» активного центра фермента, где оно образует контакты с аминокислотами Phe-319 и His-270. Если выпетленным оказывается поврежденное основание, то за счет вращения более чем на 110° вокруг связей $C_4' - C_{5'}$ и $P - O_{5'}$ поврежденного нуклеозида и вокруг связи $C_4' - C_{5'}$ нуклеозида, расположенного с 3'-конца от поврежденного, оно попадает в специфический карман, расположенный на расстоянии 5 Å от «экзо-участка» фермента hOGG1. Остаток oxoG также взаимодействует с аминокислотными остатками Phe-319 и His-270 фермента, однако эти взаимодействия полностью отличаются от взаимодействий с участием остатка гуанозина. Так, в специфическом комплексе His-270 образует водородную связь с 5'-фосфатной группой oxoG, в то время как в неспецифическом комплексе он образует слабые π -связи с гуанином.^{128, 129}

Оксогоанин отличается от гуанина и величиной электростатического потенциала; инверсия зарядов в положениях 7 и 8 приводит к противоположному направлению локальных диполей этих оснований.¹²⁸ Квантово-механические расчеты показали, что существенный вклад в предпочтительное связывание oxoG с hOGG1 по сравнению с гуанином вносят диполь-дипольные взаимодействия этого основания с парой Lys-249(NH_3^+)/Cys-253(S^-) активного центра hOGG1. Если предположить, что гуанин занимает ту же позицию в активном центре hOGG1, что и oxoG, то дипольный момент пары Lys-249(NH_3^+)/Cys-253(S^-) будет ориентирован антипараллельно дипольному моменту oxoG, но параллельно дипольному моменту гуанина. В результате диполь Lys-249(NH_3^+)/Cys-253(S^-) будет стабилизировать взаимодействие hOGG1 с oxoG и дестабилизировать взаимодействие hOGG1 с гуанином. Важную роль в специфическом связывании oxoG в активном центре hOGG1 играет остаток Gly-42. При переходе от oxoG к G водородная связь между карбонильной группой Gly-42 и фрагментом N7H oxoG заменяется сильным отталкивающим взаимодействием между Gly-42 и неподеленной электронной парой атома N7 гуанина. Эти взаимодействия фермент hOGG1 использует, чтобы отличить oxoG от неповрежденного гуанина. Несмотря на то что нет сведений о константах скорости выпетливания oxoG и G из спирали ДНК, существует предположение о том, что фермент с большей скоростью выпетливает окисленное основание, чем неповрежденное.¹⁴⁴

На ранних этапах выпетливания основания консервативные аминокислоты Gly-245, Lys-249 и Val-250 из NhH-мотива hOGG1 образуют контакты с фосфатными группами, расположенными с 3'-конца от выпетленного нуклеозида. Такие контакты были обнаружены в комплексах мутантного фермента N149C-hOGG1 как с oxoG-, так и с oxoG:G- и с G-содержащими ДНК.^{128, 129} На поздних стадиях выпетливания, после встраивания oxoG в специфический карман hOGG1, фермент hOGG1 формирует контакты с фосфатными группами, расположенными с 5'-конца от выпетленного нуклеозида.^{128, 129}

III. Аденин-ДНК-гликозилазы

Аденин-ДНК-гликозилазы катализируют удаление остатков аденина из пар oxoG:A, оставляя в молекуле ДНК AP-участок.¹⁴⁵ К настоящему времени накоплено много сведений о

структуре, субстратной специфичности и механизме каталитического действия прокариотических аденин-ДНК-гликозилаз. Данные об эукариотических гомологах этих ферментов в литературе крайне ограничены. В связи с этим в настоящем разделе в основном будут суммированы сведения о прокариотических аденин-ДНК-гликозилазах.

1. Аденин-ДНК-гликозилазы прокариот

Аденин-ДНК-гликозилазы (MutY) прокариот принадлежат к семейству ДНК-гликозилаз, содержащих в своей структуре NhH-GPD-мотив и удаляющих различные генотоксические повреждения ДНК.¹⁴⁶ Прокариотические ферменты MutY отличаются от других членов данного структурного класса тем, что кроме N-концевого домена (каталитического кора фермента) они содержат дополнительный С-концевой домен, отвечающий за узнавание остатков oxoG.¹⁴⁷ Удаление С-концевого домена приводит к потере способности ферментов MutY различать пары А : oxoG и А : G. Анализ аминокислотных последовательностей выявил наличие общих эволюционных предков С-концевых доменов MutY *E. coli* и MutT *E. coli*.^{147, 148} При секвенировании гена *mutY* обнаружено, что N-концевой домен фермента MutY *E. coli* гомологичен N-концевому домену фермента Endo III *E. coli*.¹⁴⁷

а. Структура фермента MutY прокариот

Структуры N- и С-концевых доменов фермента MutY *E. coli* были определены методами РСА и ЯМР с высоким разрешением.^{146, 148} Кроме того, был закристаллизован полноразмерный фермент MutY (молекулярный вес 41 кДа), выделенный из термофильных бактерий *B. stearothermophilus*, и ковалентный комплекс мутантной каталитически неактивной формы фермента D144N-MutY *B. stearothermophilus* с ДНК, содержащей пару oxoG:A (рис. 6).¹⁴⁹

Согласно полученным данным, каталитический кор прокариотических аденин-ДНК-гликозилаз состоит из двух α -спиральных субдоменов: субдомена, сформированного шестью α -спиралями и содержащего NhH-GPD-мотив, а также $[4Fe-4S]^{2+}$ -кластерного субдомена, образованного пятью α -спиралями и $[4Fe-4S]^{2+}$ -кластерсвязывающей петлей. N- и С-Концевые домены связывает между собой частично разупорядоченный линкер, состоящий из десяти аминокислот. При взаимодействии прокариотических ферментов MutY с ДНК этот линкер пересекает большую бороздку дуплекса вблизи поврежденного участка (см. рис. 6). Входящие в состав линкера остатки лизина (в случае MutY *B. stearothermophilus* это Lys-228, Lys-230, Lys-231 и Lys-235) обеспечивают электростатические взаимодействия фермента с ДНК.¹⁴⁹

$[4Fe-4S]^{2+}$ -Кластер координирован четырьмя остатками цистеина аминокислотной последовательности Cys-192-X₆-Cys-199-X₂-Cys-202-X₅-Cys-208, где X — остаток любой аминокислоты.¹⁴⁶ Исследования его функциональной значимости для приобретения ферментом MutY *E. coli* третичной структуры показали, что денатурированный белок в отсутствие ионов железа и серы способен восстанавливать свою структуру. Согласно данным спектроскопии кругового дихроизма, для сворачивания глобулы фермента $[4Fe-4S]^{2+}$ -кластер не нужен. Более того, он не влияет на термическую стабильность MutY *E. coli*.⁸⁰ Однако фермент MutY *E. coli*, в котором отсутствует $[4Fe-4S]^{2+}$ -кластер, не обладает аденин-ДНК-гликозилазной активностью. Такой фермент не

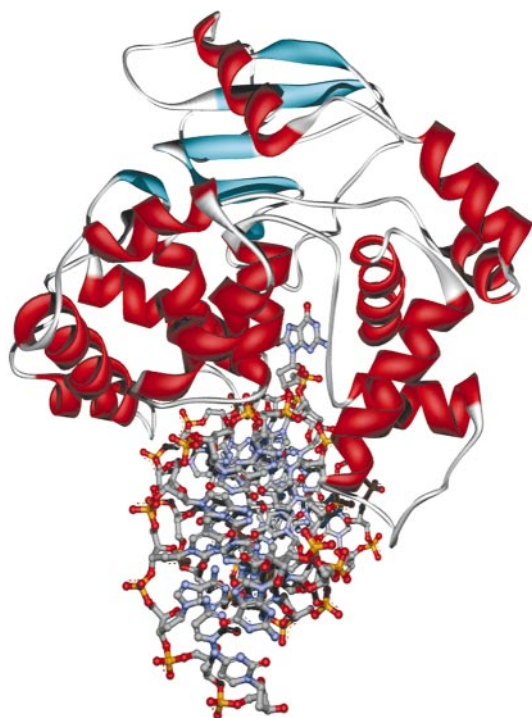


Рис. 5. Структура комплекса K249Q-hOgg1 с ДНК, содержащей пару *охоG:C* (PDB код 1EBM).¹²³ α -Спиральные домены фермента изображены красным, β -складчатый домен — голубым.

способен специфически связывать субстратную ДНК, а осуществляет только неспецифическое связывание. Таким образом, наличие у фермента MutY $[4Fe-4S]^{2+}$ -кластера является существенным не только для проявления ферментом каталитической активности, но и для специфического узнавания им субстратов.^{80, 146}

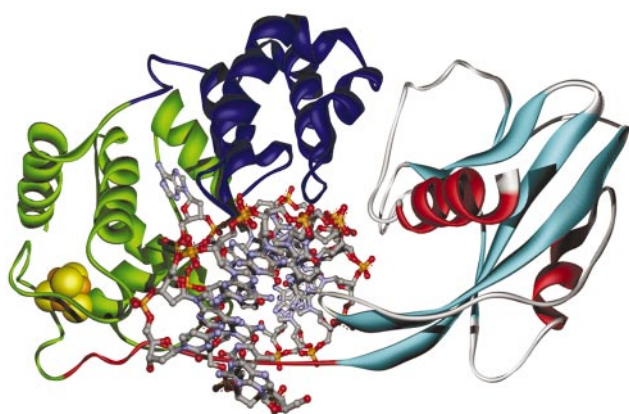
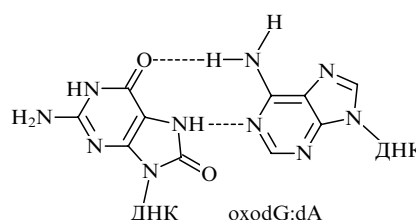


Рис. 6. Структура комплекса D144N-MutY *B. stearothermophilus* с ДНК, содержащей пару *охоG:A* (PDB код 1RRQ).¹⁴⁹ $[4Fe-4S]$ -Субдомен фермента изображен зеленым, 6-спиральный субдомен (HhH-GPD-мотив) — синим, линкер, соединяющий N- и C-концевые домены — красным. C-Концевой домен окрашен по вторичной структуре (β -структуры голубые, α -спирали красные, петли серые). Атомы серы и железа $[4Fe-4S]$ -кластера изображены желтым и оранжевым соответственно.

б. Субстратная специфичность фермента MutY прокариот

Прокариотические аденин-ДНК-гликозилазы обладают достаточно широкой субстратной специфичностью. Эффективность действия этих ферментов зависит от структуры обоих оснований неканонической *охоG:A*-пары ДНК, но в целом ферменты MutY более чувствительны к изменениям в структуре аденина. Ниже приведены основания, которые могут замещать один из компонентов *охоG:A*-пары ДНК, не вызывая изменения каталитической активности прокариотических белков MutY.⁸⁰



Остатки, замещающие *охоdG* в неканонической паре *охоdG:dA*

Остатки, замещающие *dA* в неканонической паре *охоdG:dA*

охоdA, *охоdN*, *охоdI*, *dG*, *dC*, *dI*, 2'-*O*-метилгуанозин, 8-метокси-2'-дезоксигуанозин, 2'-дезоксирибозил-2-амино-1,6-дигидропурин

охоdA, *охоdN*, *dI*, 2-гидрокси-2'-дезоксаденозин, 2'-дезоксирибозил-2-амино-1,6-дигидропурин, 2'-*O*-метил-аденозин

Ферменты MutY удаляют аденин из *охоG:A*-, *G:A*- и *C:A*-пар ДНК как *in vivo*, так и *in vitro*. Удаление аденина из пары *охоG:A* проходит в шесть раз более эффективно, чем из пары *G:A*.¹⁵⁰ Интересно отметить, что аденин-ДНК-гликозилазная активность фермента MutY по отношению к ДНК, содержащей *G:A*-пары, в 5–35 раз выше, чем к ДНК, содержащей *C:A*-пары. Изучение субстратной специфичности фермента MutY с использованием ДНК, содержащей остаток 2'-дезоксиформина (негидролизуемого аналога 2'-дезоксаденозина), комплементарный *охоG* или гуанину, показало, что фермент MutY связывает *охоG*-содержащий субстрат в 30 раз более эффективно, чем субстрат, содержащий остаток гуанина. Это служит дополнительным доказательством того, что ДНК, содержащая пару *охоG:A*, является наиболее предпочтительным субстратом для MutY прокариот.¹⁵¹

Кроме того, было показано, что белок MutY *E. coli* удаляет остатки 2-гидроксиаденозина (2-ОН-А) из пары 2-ОН-А:*охоG*, но не из пары 2-ОН-А:*G*.¹⁵²

в. Каталитический механизм действия фермента MutY прокариот

Прокариотические ферменты MutY являются монофункциональными ДНК-гликозилазами.¹⁵³ Для нуклеофильной атаки поврежденного нуклеотида они используют молекулу воды, находящуюся в активном центре фермента. Эта особенность отличает монофункциональные аденин-ДНК-гликозилазы от бифункциональных ДНК-гликозилаз, использующих для этих целей аминокислотные остатки из активного центра фермента.

Механизм функционирования прокариотических ферментов MutY заключается в следующем. На первом этапе ферменты MutY неспецифически связываются с ДНК преимущественно за счет электростатических и гидрофобных взаи-

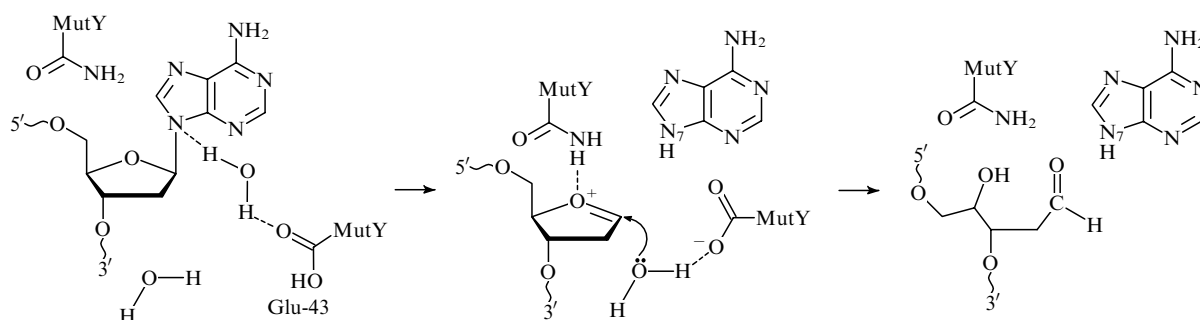


Схема 3

модействий. Диффундируя вдоль молекулы ДНК, эти ферменты осуществляют узнавание неканонической пары и специфически связываются с ней, выпетливая аденин в гидрофильный «карман» активного центра фермента. Каталитическое расщепление субстрата ферментом MutY происходит по диссоциативному механизму нуклеофильного замещения (S_N1) (схема 3).¹⁵³ В результате разрыва N-гликозидной связи образуется оксокарбениевый ион, который в случае MutY *B. stearothermophilus* стабилизируется остатком Asn-144, расположенным вблизи атома O_4' аденозина. На следующем этапе активированная ферментом молекула воды нуклеофильно атакует атом C_1' дезоксирибозы субстратного нуклеотида, что приводит к раскрытию кольца дезоксирибозы.

Согласно данным РСА ковалентного комплекса MutY *B. stearothermophilus* с ДНК, содержащей пару охoG:A, в активном центре фермента присутствуют две ориентированные молекулы воды. Одна молекула воды образует водородную связь с атомом N_7 аденина, стабилизируя основание как уходящую группу на этапе разрыва N-гликозидной связи, а другая, расположенная в непосредственной близости от кольца дезоксирибозы субстратного нуклеотида, атакует оксокарбениевый интермедиат. Обе молекулы воды образуют водородные связи с карбоксильной группой остатка Glu-43 фермента MutY *B. stearothermophilus*, проявляющего свойства кислотно-основного катализатора. Так, Glu-43 через молекулу воды переносит протон на атом N_7 аденина, понижая тем самым энергию переходного состояния в реак-

ции удаления основания. Образующийся карбоксилат-ион Glu-43 активирует для нуклеофильной атаки вторую молекулу воды. В случае MutY *E. coli* атом N_7 аденина протонируется остатком Glu-37, а остаток Asp-138 активирует молекулу воды для нуклеофильной атаки.^{146, 153}

С этой схемой взаимодействия согласуется экспериментальный факт, свидетельствующий о том, что замена атома N_7 на C_7H -группу приводит к образованию аналога субстрата, который связывается с ферментом MutY *E. coli*, но не расщепляется им.¹⁵¹ Кроме того, замена Glu-37 → Ser в MutY *E. coli* приводит к полной потере ферментативной активности.¹⁴⁶

Несмотря на то что прокариотические ферменты MutY относят к монофункциональным ДНК-гликозилазам, они проявляют AP-лиазную активность, по крайней мере *in vitro*.¹⁵⁴ Однако AP-лиазная активность фермента MutY прокариот структурно и химически не связана с их ДНК-гликозилазной активностью, что отличает эти ферменты от других бифункциональных ДНК-гликозилаз/AP-лиаз. AP-Лиазная активность MutY прокариот значительно ниже N-гликозилазной.^{153, 155} Прокариотические аденин-ДНК-гликозилазы расщепляют AP-ДНК по механизму β,δ -элиминирования (схема 4). Установлено, что Lys-142 иницирует AP-лиазную активность фермента MutY *E. coli* и участвует в образовании основания Шиффа.¹⁴⁶ Следует отметить, что к настоящему времени остается невыясненным, проявляют ли ферменты MutY прокариот AP-лиазную активность *in vivo*.

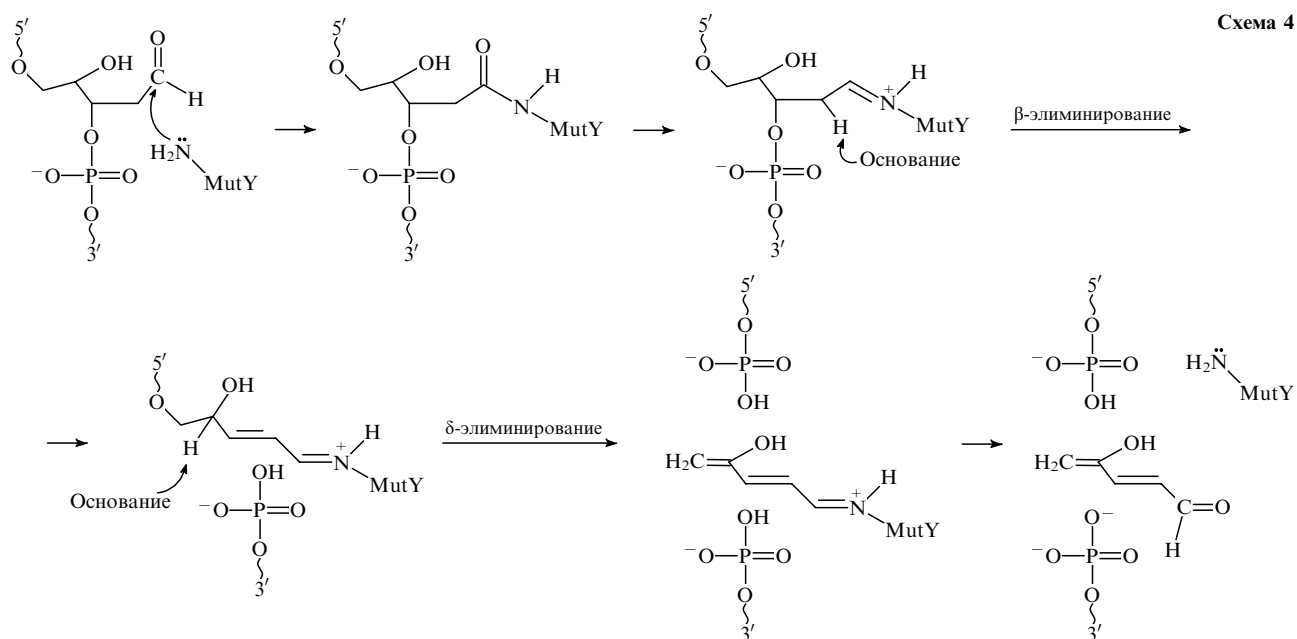


Схема 4

г. Конформационные перестройки в структуре комплексов MutY прокариот с охoG:A-содержащей ДНК

Каталитический домен прокариотических ферментов MutY взаимодействует с ДНК аналогично каталитическому домену фермента hOGG1. Аминокислоты глубоко проникают в спираль ДНК, нарушая стэкинг оснований, что приводит к выпетливанию аденина из пары охoG:A в специфический «карман», расположенный в глубокой бороздке между HhH-GPD-мотивом, сформированным шестью α -спиральными участками и $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -кластером.¹¹² Так, ароматическое кольцо остатка Tyr-88 фермента MutY *B. stearothermophilus* интеркалирует в спираль ДНК с 5'-конца от охoG, что приводит к двукратному увеличению расстояния между охoG и основанием, расположенным с 5'-конца от него. Амидная группа бокового радикала Gln-48 встраивается в полость, возникающую при выпетливании аденина, участвуя одновременно в π -стэкинг-взаимодействии с основанием и в образовании водородных связей с фосфатной группой, расположенной непосредственно в 3'-положении от выпетленного аденозина. Эти взаимодействия способствуют изгибу ДНК-дуплекса на 55° в месте повреждения.

В поврежденной ДНК, не связанной с ферментом, остаток охoG находится в *syn*-конформации. В комплексе с ферментом MutY *B. stearothermophilus* охoG приобретает *anti*-конформацию.¹⁵⁶ Это свидетельствует о том, что при связывании ДНК, содержащей пару охoG:A, с ферментом MutY *B. stearothermophilus* основание охoG поворачивается на 180° вокруг N-гликозидной связи. Возможно, этот поворот инициирует выпетливание аденина из спирали ДНК.

д. Взаимодействие фермента MutY прокариот с остатком охoG поврежденной ДНК

При взаимодействии фермента MutY прокариот с охoG:A-содержащей ДНК аминокислотные остатки из N- и C-доменов фермента формируют контакты с остатком охoG.¹⁴⁹ Площадь поверхности субдомена, сформированного шестью α -спиралями, находящаяся в контакте с поврежденной ДНК, составляет 444 Å², в то время как общая контактная поверхность MutY *B. stearothermophilus* с ДНК равна 1530 Å². Такая значительная контактная поверхность позволяет ферменту полностью окружить ДНК-дуплекс в месте повреждения.

По данным PCA комплекса D144N-MutY *B. stearothermophilus* с охoG:A-содержащей ДНК,¹⁴⁹ остаток охoG находится внутри спирали ДНК, что противоречит выводу, который был сделан на основе данных об изменении интенсивности флуоресценции ДНК, индуцированной ферментом MutY *E. coli*.¹⁵⁷ Однако, возможно, наблюдаемое изменение в интенсивности флуоресценции связано с изгибом ДНК, а не с выпетливанием остатка охoG.

Остаток охoG узнается ферментом MutY с помощью двух водородных связей, образуемых группой N₁H и экзотической аминогруппой охoG с карбонильной группой остатка Gln-48 основной цепи и гидроксильной группой Thr-49 соответственно. Эти аминокислотные остатки образуют водородную связь друг с другом. Аминогруппа охoG, обращенная в сторону малой бороздки ДНК, контактирует с карбонильной группой остатка Leu-86 основной цепи. Водородная связь образуется также между группой N₇H и гидр-

оксильной группой Ser-308, конформация которого, в свою очередь, стабилизируется образованием водородной связи с гидроксильной группой Tyr-88. Кроме того, карбонильная группа C=O охoG участвует в образовании водородной связи с амидным протоном остатка Ser-308 основной цепи.

Значительное число водородных связей, образующихся при взаимодействии MutY прокариот с охoG, объясняет лучшие субстратные свойства ДНК, содержащей пару охoG:A, по сравнению с ДНК, содержащей пару T:A. Следует отметить, что водородные связи, образуемые группой N₇H оксогуанина и неподеленной электронной парой атома N₇ гуанина с гидроксильной группой аминокислотного остатка Ser-308, имеют противоположную полярность. Такое обращение полярности приводит к нарушению сети водородных связей между функциональными группами аминокислотных остатков Ser-308, Tyr-88 и Gln-48. Эту разницу фермент MutY *B. stearothermophilus* использует, чтобы различать основания охoG и G.¹⁴⁹ Еще одним отличительным фактором может быть разница в эффективности стэкинг-взаимодействия Tyr-88 с охoG и G.¹⁴⁹ Локальные диполи групп атомов, способных к хугстиновским взаимодействиям, в пятичленных кольцах охoG и G имеют противоположную ориентацию и поэтому могут существенно отличаться по способу взаимодействия с локальными диполями аминокислот белка.

2. Аденин-ДНК-гликозилазы эукариот

Эукариотические гомологи ферментов MutY были идентифицированы в клетках человека (MUTYH) и мыши (mMUYH). Гены этих белков клонированы и секвенированы.^{158, 159} Белок MUTYH состоит из 535 аминокислотных остатков. Его аминокислотная последовательность на 41% идентична последовательности MutY *E. coli*. Третичная структура эукариотических аденин-ДНК-гликозилаз до настоящего времени не решена.

Субстратная специфичность ферментов MUTYH, mMUYH и MutY *E. coli* в целом одинакова. Однако ферменты MUTYH и mMUYH в отличие от MutY прокариот проявляют N-гликозилазную активность по отношению к 2-гидроксиаденину, который может находиться как в паре с охoG, так и в паре с гуанином.^{152, 160} Методом сайт-направленного мутагенеза было установлено, что аминокислотные остатки Arg-361 и Gly-365 фермента mMUYH играют важнейшую роль в проявлении этой активности.¹⁶¹ Фермент MUTYH формирует прочный комплекс с AP-ДНК, образующейся после удаления аденина из пары охoG:A. В то же время комплекс этого фермента с AP-ДНК, образовавшейся после удаления окисленного аденина из пары охoG:2-OH-A, легко распадается с выделением фермента. Следует отметить, что MUTYH в два раза активнее по отношению к ДНК, содержащей пару G:A, чем к ДНК, содержащей пару охoG:A, хотя связывание с ДНК, содержащей охoG:A, более эффективное.⁸⁰

IV. 8-Оксогуанозинтрифосфатазы

Характерной особенностью 8-оксогуанозинтрифосфатаз является наличие в их структуре так называемого «Nudix»-мотива — консервативной последовательности, состоящей из 23 аминокислотных остатков GX₅EX₇REUXEEXGU, где U — остаток объемной гидрофобной аминокислоты.¹⁶²

1. 8-Оксогуанозинтрифосфатазы прокариот

К настоящему времени из всех 8-оксогуанозинтрифосфатаз прокариот наиболее изучена MutT *E. coli*. В связи с этим в данном разделе структура, субстратная специфичность и механизм каталитического действия прокариотических 8-оксогуанозинтрифосфатаз в основном будут рассмотрены на примере именно этого фермента, хотя фермент GTP-циклогидролаза II *E. coli*, катализирующий превращение гуанозинтрифосфата в 2,5-диамино-6-оксо-4-(5-фосфорибозил-амино)пиримидин, также может проявлять 8-оксогуанозинтрифосфатазную активность и эффективно гидролизовать 8-охоG-содержащие дезоксирибо- и рибонуклеозидтрифосфаты до 8-oxodGMP и 8-охоGMP соответственно.¹⁶³

а. Структура фермента MutT *E. coli*

Фермент MutT *E. coli* — мономерный глобулярный белок с молекулярной массой 14,9 кДа, состоящий из 129 аминокислотных остатков. Его структура была определена в растворе,¹⁶⁴ позже были получены предварительные данные о конформации этого фермента в кристалле.¹⁶⁵ Фермент MutT *E. coli* имеет структуру типа «сэндвич», представляющую собой «β-лист», экранированный двумя α-спиралями (рис. 7). «β-Лист» состоит из пяти β-элементов (βA–βE) и расположен на N-конце фермента. Два поворота и петля L3 соединяют «β-лист» с мотивом «петля L1 – αI-спираль – петля L2». Мотив «петля L4 – αII-спираль» расположен на C-конце фермента. Фермент MutT *E. coli* относится к металлозависимым ферментам, он содержит в своей структуре ион двухвалентного магния.

Для проявления каталитической активности MutT *E. coli* необходимо, чтобы β- и γ-фосфатные группы гидролизуемого нуклеозидтрифосфата (NTP) координировали еще один ион двухвалентного металла.^{166–168} Центр связывания субстрата MutT *E. coli* сформирован в основном из гидрофоб-

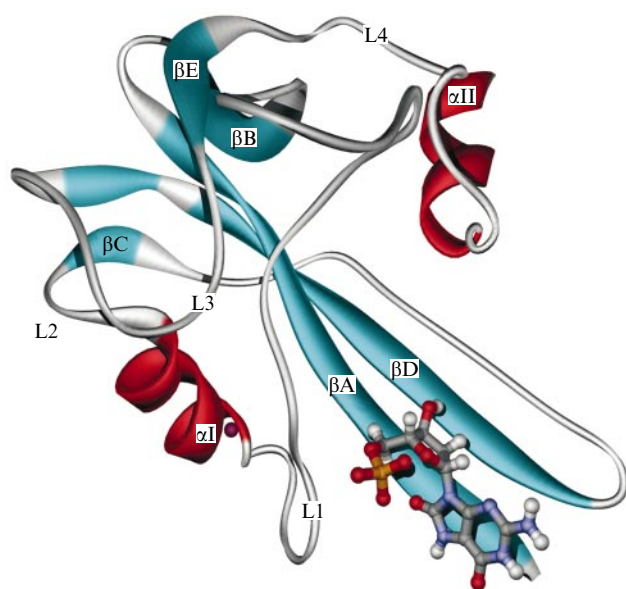


Рис. 7. Структура комплекса MutT *E. coli* с oxodGMP (PDB код 1PUN).¹⁶⁷

Фермент окрашен по вторичной структуре (β-структуры голубые, α-спирали красные, петли серые), ион магния изображен малиновым.

ных аминокислот (Leu-4, Leu-41, Tyr-73, Phe-75, Ile-80 и Leu-82), принадлежащих β-элементам βA, βC и βD, петле L1 и N-концу спирали L2, и только из трех полярных аминокислотных остатков Lys-3, Lys-39 и Arg-78.

б. Субстратная специфичность MutT *E. coli*

Во время матричного биосинтеза нуклеозидтрифосфаты dGTP, oxodGTP и GTP, oxoGTP эффективно конкурируют с dTTP, dGTP и TTP, GTP за встраивание в ДНК и РНК напротив остатков А и С соответственно.¹⁶⁹ Фермент MutT *E. coli* специфически гидролизует 8-охоG-содержащие дезоксирибо- и рибонуклеозидтрифосфаты, предотвращая тем самым встраивание 8-оксогуанина в ДНК и РНК.

Фермент MutT *E. coli* также гидролизует dGTP до dGMP и пирофосфата.¹⁶⁹ Однако константа Михаэлиса (K_m) реакции гидролиза oxodGTP в 10 000 раз меньше K_m гидролиза dGTP, что свидетельствует о том, что oxodGTP является более предпочтительным субстратом для MutT *E. coli*.¹⁶⁶

7,8-Дигидро-8-оксо-2'-дезоксигуанозин-5'-трифосфат может образовываться при прямом окислении dGTP, а также при фосфорилировании oxodGDP. Показано, что MutT *E. coli* расщепляет oxoG-содержащие дезоксирибо- и рибонуклеозидтрифосфаты с эффективностью, аналогичной эффективности расщепления oxodGTP и oxoGTP.¹⁶⁶

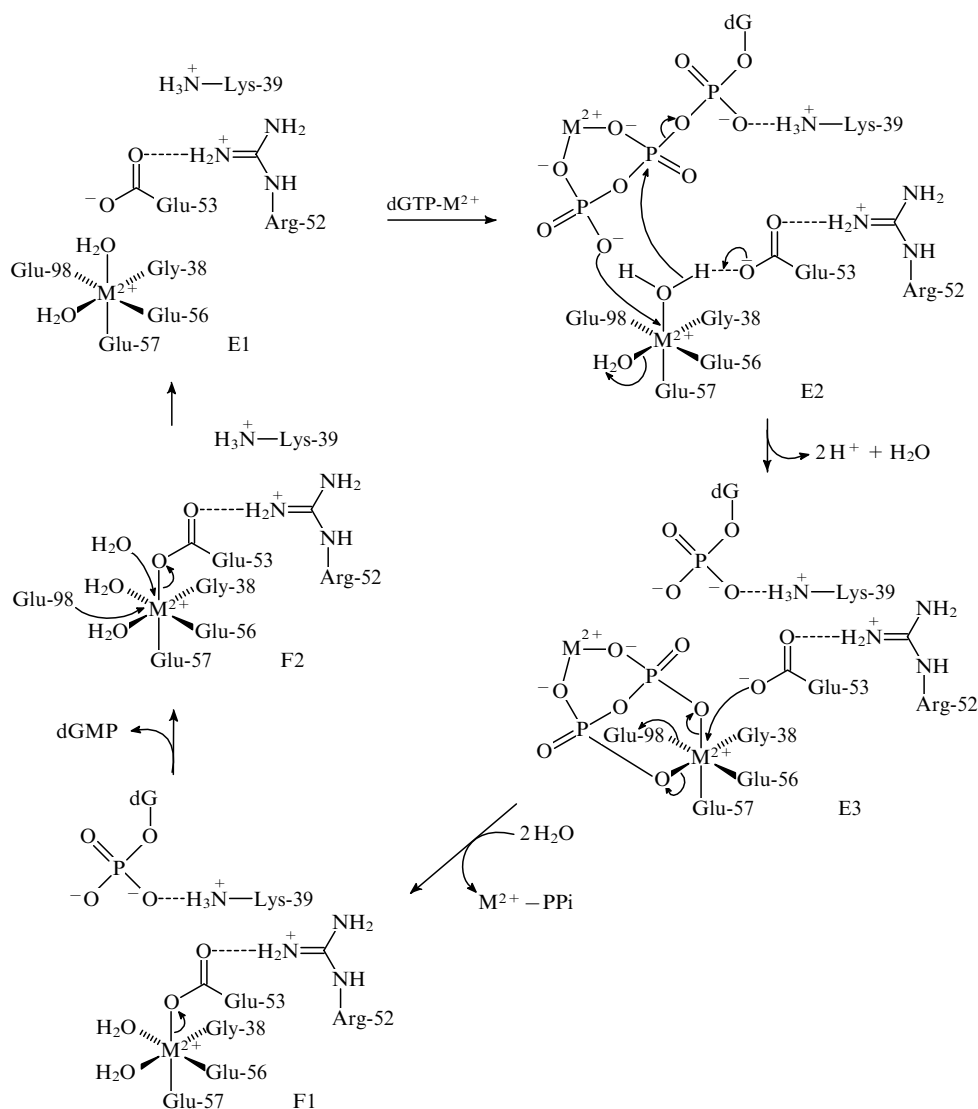
Следует отметить, что окисленный аденозинтрифосфат не является субстратом фермента MutT *E. coli*.

в. Каталитический механизм действия фермента MutT *E. coli*

В отличие от большинства гидролаз фермент MutT *E. coli* расщепляет рибо- и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты по механизму нуклеофильного замещения у β-, а не у α-атома фосфора (схема 5).^{170, 171} На первом этапе катализа активная форма MutT *E. coli*, в которой карбоксильные группы остатков Gly-38, Glu-56, Glu-57, Glu-98 и две молекулы воды координируют двухзарядный ион металла (форма E1), связывает нуклеозидтрифосфат, находящийся в комплексе с ионом металла, который координирует его γ-фосфатную группу. Далее карбоксильная группа аминокислотного остатка Glu-53 активного центра MutT *E. coli* переносит протон от молекулы воды, находящейся в координационной сфере иона металла фермента, активируя ее для нуклеофильной атаки по β-атому фосфора нуклеозидтрифосфата (форма E2). В результате этой атаки пирофосфат в комплексе с ионом металла ($M^{2+}PP_i$) координируется ионом металла фермента. Остаток Lys-39 активного центра MutT *E. coli* стабилизирует фосфатную группу уходящего нуклеозидмонофосфата, образуя водородную связь (форма E3).¹⁷¹ На следующем этапе пирофосфат уходит, ион металла фермента координируется карбоксильной группой Glu-53 активного центра фермента; при этом фермент MutT *E. coli* принимает конформацию (форма F1), в которой он неактивен.

Фермент MutT *E. coli* в конформации F1 неактивен по двум причинам: во-первых, он не может эффективно связывать субстрат; во-вторых, остаток Glu-53, связанный с ионом металла фермента, не может проявлять основные свойства, необходимые для элиминирования протона у каталитической молекулы воды. На следующем этапе происходит диссоциация нуклеозидмонофосфата, а на завершающей стадии — изменение конформации фермента, включающее уход остатка Glu-53 из координационной сферы иона металла фермента и возвращение Glu-98 и новой молекулы воды (конформация F2). Нуклеозидмонофосфат, образу-

Схема 5



шийся таким путем, более не фосфорилируется, а расщепляется до азотистого основания.¹⁷²

г. 8-Оксогуанозинтрифосфатазы эукариот

Гомологи фермента MutT *E. coli* с oxodGTP-фосфатазной активностью найдены в различных организмах: *Streptococcus pneumoniae*, *Proteus vulgaris*,¹⁷³ в клетках мышей,¹⁷⁴ крыс¹⁷⁵ и человека.^{176, 177} В клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* был найден белок YLR151c, являющийся функциональным гомологом MutT.¹⁷⁸ 8-Оксогуанозинтрифосфатазы бактерий и млекопитающих близки по размеру. В работе Сапарбаева и соавт.¹⁷⁹ охарактеризован альтернативный путь репарации остатков oxoG в клетках *S. cerevisiae* с участием AP-эндонуклеазы (Apl1). Кроме того, было показано, что в клетках дрожжей поврежденный остаток oxoG может удаляться путем эксцизионной репарации нуклеотидов.¹⁸⁰

Экспрессия 8-оксогуанозинтрифосфатаз из клеток млекопитающих в клетки *E. coli mutT*⁻ приводит к снижению спонтанных мутаций до нормального уровня.¹⁸¹ Высокая активность oxodGTP-фосфатаз обнаружена в клетках печени, тимуса, толстой кишки и особенно в эмбриональных клетках мышей. 8-Оксогуанозинтрифосфатаза (MTH1) в клетках млекопитающих в основном локализована в цитоплазме и

митохондриях.¹⁸² У мышей, нокаутных по гену *mth1*, развивается рак печени и, в меньшей степени, рак легких и желудка, что свидетельствует о том, что образование oxodGTP может инициировать злокачественные образования *in vivo*.^{6, 27}

д. Структура 8-оксогуанозинтрифосфатазы эукариот

Структура 8-оксогуанозинтрифосфатазы из клеток человека (NUDT1, известной также как hMTH1) была решена в растворе методом ЯМР (рис. 8).¹⁸³ Этот фермент имеет молекулярную массу 18 кДа и содержит 156 аминокислотных остатков. Основным структурным отличием 8-оксогуанозинтрифосфатаз эукариот от MutT прокариот является присутствие в молекуле NUDT1 β -шпильки, состоящей из βF - и βG -элементов и соединяющей их петли.^{183–185} βF -Элемент связан с βC -элементом сетью водородных связей, что приводит к образованию протяженной β -структуры, состоящей из пяти элементов: βA , βD , βC , βF и βG . Удаление βF - и βG -элементов приводит к полной потере активности 8-оксогуанозинтрифосфатаз эукариот.¹⁸⁶

Специфический «карман» фермента NUDT1, в котором происходит связывание поврежденного гетероциклического основания субстрата, формируют гидрофобные аминокислотные остатки Phe-27, Asn-33, Trp-117 и Asn-119 из

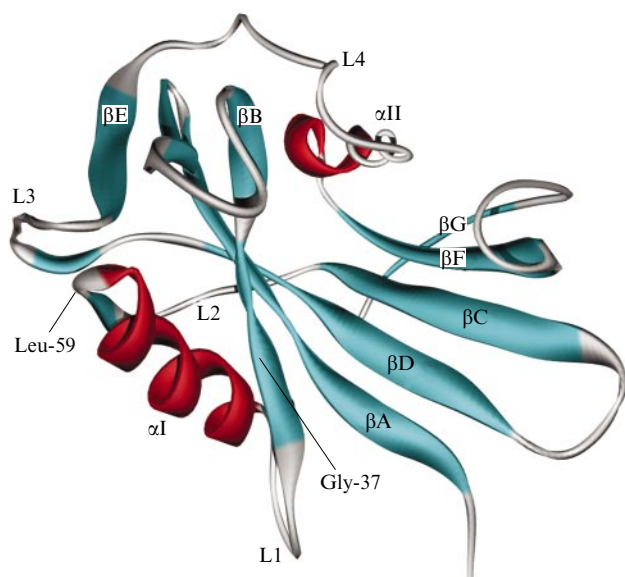


Рис. 8. Структура hMTH1 (PDB код 1IRY).¹⁸³ β-Структуры изображены голубым, α-спирали — красным, петли — серым. Стрелками указаны начальный (Gly-37) и конечный (Leu-59) аминокислотные остатки «Nudix»-мотива.

петель L1 и L4. «Карман» расположен между β-структурой, спиралью αII и петлей β-шпильки NUDT1. Аминокислотные остатки Asn-33, Trp-117 и Asn-119 фермент NUDT1 использует для узнавания окисленных пуриновых нуклеозидтрифосфатов.^{183, 187}

Каталитический центр NUDT1 локализован внутри «Nudix»-мотива. Аминокислотные остатки из этого мотива опосредованно связывают фосфатные группы субстрата, координируя связанный с ними ион металла. «Nudix»-Мотив фермента NUDT1 содержит гидрофобный кор, в состав которого входят аминокислотные остатки Thr-8,

Val-10 и Val-12 из βA-структуры, Phe-86 из βD-структуры, Phe-35 из петли L1, а также Ala-49, Leu-53 и Leu-59, расположенные на внутренней стороне «Nudix»-спирали и играющие важную роль в формировании третичной структуры фермента (см. рис. 8). Согласно данным сайт-направленного мутагенеза, 14 из 23 консервативных аминокислот «Nudix»-мотива (остатки 35, 39, 41, 43, 45, 48, 49, 51–53, 55–57 и 59) необходимы для проявления ферментом каталитической активности.¹⁸⁸ Аминокислотные остатки Glu-52, Glu-55 и Glu-56 фермента NUDT1 формируют кислотный кластер и, вероятно, координируют ион металла фермента аналогично тому, как это происходит в случае MutT *E. coli*.¹⁶⁶ Кроме того, остаток Glu-100 фермента NUDT1, расположенный в ближайшем окружении кислотного кластера, аналогично Glu-98 фермента MutT *E. coli* координирует ион металла вне «Nudix»-мотива.

Для проявления каталитической активности NUDT1 важна конформация петли, включающей аминокислотные остатки 37–43. Эта петля имеет β-поворот у остатка Glu-42, который стабилизируют водородные связи между карбоксильной группой, находящейся в боковой цепи остатка Glu-43, и амидной группой остатка Glu-40, находящейся в основной цепи, а также гидрофобные контакты Val-39 с Ile-45. Аминокислотные остатки Glu-42 и Glu-43 высоконсервативны для ферментов с «Nudix»-мотивом. Методом сайт-направленного мутагенеза было показано, что замена аминокислот Gly-37, Gly-42, Gly-43, а также Val-39 и Ile-45 приводит к потере активности фермента NUDT1 (см.¹⁸¹).

е. Субстратная специфичность 8-оксогуанозинтрифосфатаз эукариот

Эукариотические гомологи прокариотических ферментов MutT согласно их субстратной специфичности делят на две группы (рис. 9). В состав первой группы входят ферменты MTH1^{189, 190} и MTH2¹⁹¹ (известные также как NUDT1 и NUDT5 соответственно), расщепляющие oxoGTP до oxoGMP по механизму, аналогичному каталитическому

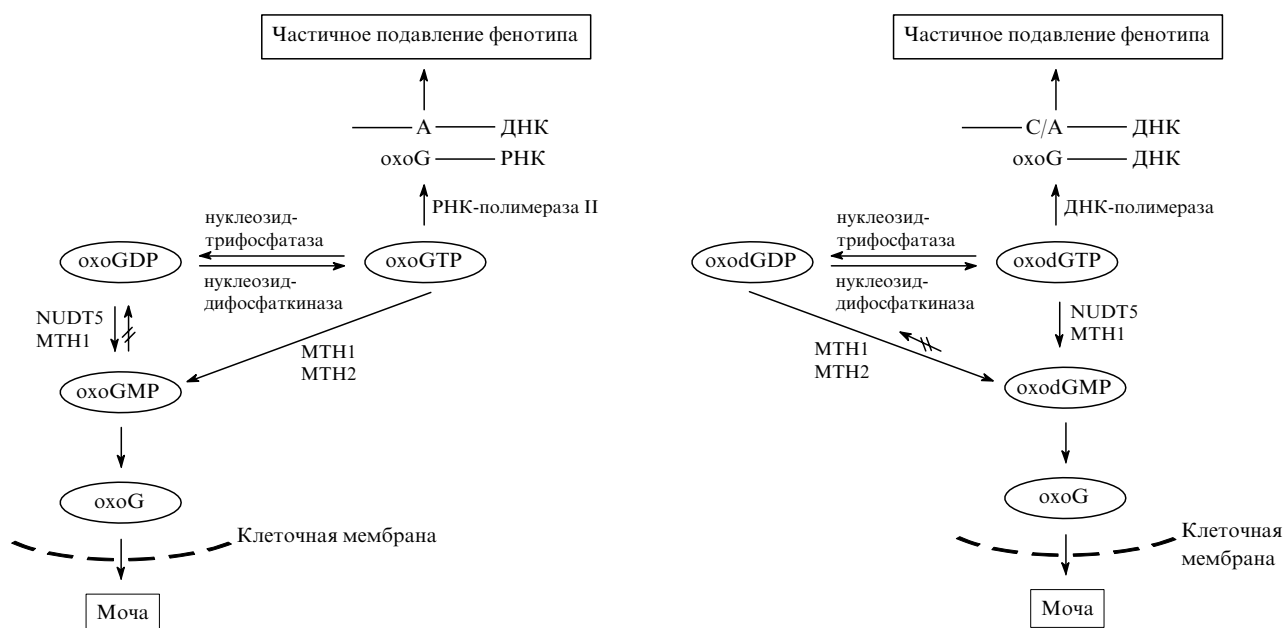


Рис. 9. Модель удаления oxoG-содержащих нуклеозидтрифосфатов из смеси dNTP и NTP в клетках млекопитающих.

механизму расщепления субстратов ферментом MutT *E. coli*. Ферменты второй группы, такие как NUDT5, обладают слабой активностью по отношению к *oxodGTP*, но эффективно гидролизуют *oxodGDP*.^{192, 193} На рис. 9 представлена схема механизма удаления *oxoG*-содержащих нуклеотидов из смеси нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфатов.

Фермент NUDT1, в отличие от MutT *E. coli*, обладает более широкой субстратной специфичностью, гидролизует окисленные нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфаты пуринового ряда, такие как *oxodGTP*, *oxoGTP*, 2-ОН-dATP, 2-ОН-ATP, 8-*oxodATP*, 8-*oxoATP*,^{186, 194, 195} и отвечает за предотвращение их внедрения в нуклеиновые кислоты.^{177, 180}

V. Система репарации гетеродуплексов

Следует отметить, что репарация *oxoG* из поврежденной ДНК, содержащей неканонические пары оснований, образованные с участием *oxoG*, может осуществляться с помощью системы репарации гетеродуплексов или, как ее еще называют, системы репарации неспаренных оснований (*mismatch repair system*).^{10, 28} Эта система используется клеткой для удаления неспаренных оснований, которые могут возникать в процессе прямого повреждения оснований ДНК или их предшественников продуктами клеточного метаболизма, в результате ошибочного встраивания некомплементарного основания ДНК-полимеразой в ходе репликации или рекомбинационной интеграции одноцепочечного участка ДНК в неабсолютно идентичную ДНК.

Система репарации гетеродуплексов включает удаление одного из нуклеиновых оснований неканонической пары в ДНК с последующим расщеплением фосфодиэфирной связи, удаление остатка дезоксирибозы, включение в освободившееся положение соответствующего комплементарного нуклеотидного остатка и воссоединение непрерывной цепи ДНК. В этом процессе задействована целая группа ферментов, среди которых эндонуклеазы рестрикции, ДНК-полимеразы, ДНК-лигазы и ряд других. Было показано, что система репарации гетеродуплексов как в клетках прокариот,¹⁹⁶ так и в клетках эукариот¹⁹⁷ может репарировать также и ДНК, содержащую остатки *oxoG*, удаляя пару оснований 8-*oxoG*:A и тем самым защищая клетки от мутагенного воздействия окислительных агентов на пострепликативном этапе.

Установлено, что *oxoG* репарруется не только в составе ДНК и ее предшественников, но и в составе РНК.^{198, 199} Так, было обнаружено, что клетки *E. coli* содержат белки, которые специфически связываются с *oxoG*-содержащей РНК.¹⁹⁸ Среди них был идентифицирован белок — полинуклеотидфосфорилаза, — связывание которого с *oxoG*-РНК приводило к ингибированию роста клеток. Следствием этого было исключение окисленной РНК из трансляционных процессов.¹⁹⁸

В клетках млекопитающих белки MTH1 и NUDT5 расщепляют *oxoGTP* и *oxoGDP* до *oxoGMP*.¹⁹⁹ Аналогом этих белков, функционирующих на уровне РНК, является полинуклеотидфосфорилаза. Полинуклеотидфосфорилаза человека специфически связывается с *oxoG*-содержащей РНК. При обработке клеток соединениями, вызывающими окислительный стресс, количество полинуклеотидфосфорилазы быстро уменьшалось, в то время как количество других белков оставалось неизменным.¹⁹⁹ Это свидетельствовало о том, что полинуклеотидфосфорилаза человека может играть роль в исключении окисленных форм РНК из процессов трансляции.

VI. Заключение

Окислительные повреждения ДНК, такие как *oxoG*, приводят к возникновению соматических мутаций, которые являются одной из причин канцерогенеза. Установлено, что количество образующихся остатков *oxoG* зависит от природы организма, типа клеток, места локализации в них ДНК, а также от природы мутагена, интенсивности и длительности его воздействия.^{200–202} Содержание остатков *oxoG* в ДНК тканей опухолей человека повышено в 2–3 раза по сравнению с их содержанием в ДНК здоровых тканей, где оно составляет 10⁵ поврежденных оснований на клетку.²⁰³ Инициация роста опухоли требует ряда мутаций, инактивирующих гены-супрессоры опухолей и активирующих протоонкогены. Оксогуанин вызывает возникновение трансверсий G:C → T:A, которые часто встречаются в мутантных аллелях генов *p53* и *ras*, присутствующих во многих человеческих опухолях.²⁰⁴ Способность *oxoG* инициировать рост опухоли наиболее ярко была продемонстрирована при трансфекции клеток плазмидой, содержащей ген *c-Ha-ras* с единственным специфически расположенным остатком *oxoG*, что привело к значительному увеличению числа фокусов трансформации.²⁰⁵

Известны многочисленные корреляции между возрастом организма и содержанием окислительных повреждений ДНК, включая *oxoG*, а также между продолжительностью жизни организмов определенного вида и их способностью к репарации ДНК. Существует гипотеза, что повреждения ДНК с возрастом накапливаются главным образом в геноме митохондрий. Прямые измерения уровня *oxoG* в мтДНК дают, как правило, величины большие, чем для ядерной ДНК, хотя экспериментальные трудности, связанные с измерением уровня повреждений, приводят к большому разбросу полученных величин.²⁰⁶

Новые исследования в области репарации ДНК в совокупности с данными, полученными к настоящему времени, позволят выяснить природу репарационных механизмов на молекулярном уровне, что в будущем даст возможность направленно влиять на эти процессы в борьбе со многими опасными заболеваниями человека.

Литература

1. S.S.Wallace. *Free Radical Biol. Med.*, **33**, 1 (2002)
2. S.Bjelland, E.Seeberg. *Mutat. Res.*, **531**, 37 (2003)
3. S.S.David, V.L.O'Shea, S.Kundu. *Nature (London)*, **447**, 941 (2007)
4. H.Kamiya. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 517 (2003)
5. C.M.Gedik, S.P.Boyle, S.G.Wood, N.J.Vaughan, A.R.Collins. *Carcinogenesis*, **23**, 1441 (2002)
6. E.C.Friedberg, G.C.Walker, W.Siede. *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington, DC, 1995
7. R.Hakem. *EMBO J.*, **27**, 589 (2008)
8. M.L.Fishel, M.R.Vasko, M.R.Kelley. *Mutat. Res.*, **614**, 24 (2007)
9. Y.Ishino, T.Nishino, K.Morikawa. *Chem. Rev.*, **106**, 324 (2006)
10. P.Modrich. *Annu. Rev. Genet.*, **25**, 229 (1991)
11. R.R.Iyer, A.Pluciennik, V.Burdett, P.L.Modrich. *Chem. Rev.*, **106**, 302 (2006)
12. J.J.Truglio, D.L.Croteau, B.Van Houten, C.Kisker. *Chem. Rev.*, **106**, 233 (2006)
13. L.C.J.Gillet, O.D.Schärer. *Chem. Rev.*, **106**, 253 (2006)
14. D.L.Croteau, R.H.Stierum, V.A.Bohr. *Mutat. Res./DNA Repair*, **434**, 137 (1999)

15. L.Gros, M.K.Saparbaev, J.Laval. *Oncogene*, **21**, 8905 (2002)
16. C.Janion. *Acta Biochim. Pol.*, **48**, 599 (2001)
17. K.Schlacher, P.Pham, M.M.Cox, M.F.Goodman. *Chem. Rev.*, **106**, 406 (2006)
18. R.G.Fowler, S.J.White, C.Koyama, S.C.Moore, R.L.Dunn, R.M.Schaaper. *DNA Repair*, **2**, 159 (2003)
19. M.Sekiguchi, T.Tsuzuki. *Oncogene*, **21**, 8895 (2002)
20. R.Lu, H.M.Nash, G.L.Verdine. *Curr. Biol.*, **7**, 397 (1997)
21. G.Frosina, P.Fortini, O.Rossi, F.Carrozzino, G.Raspaglio, L.S.Cox, D.P.Lane, A.Abbondandolo, E.Dogliotti. *J. Biol. Chem.*, **271**, 9573 (1996)
22. Y.Kubota, R.A.Nash, A.Klungland, P.Schar, D.E.Barnes, T.Lindal. *EMBO J.*, **15**, 6662 (1996)
23. M.Stucki, B.Pascucci, E.Parlanti, P.Fortini, S.H.Wilson, U.Hübscher, E.Dogliotti. *Oncogene*, **17**, 835 (1998)
24. B.Pascucci, M.Stucki, Z.O.Jónsson, E.Dogliotti, U.Hübscher. *J. Biol. Chem.*, **274**, 33696 (1999)
25. P.Fortini, E.Parlanti, O.M.Sidorkina, J.Laval, E.Dogliotti. *J. Biol. Chem.*, **274**, 15230 (1999)
26. R.G.Fowler, R.M.Schaaper. *FEMS Microbiol. Rev.*, **21**, 43 (1997)
27. T.Tsuzuki, A.Egashira, H.Igarashi, T.Iwakuma, Y.Nakatsuru, Y.Tominaga, H.Kawate, K.Nakao, K.Nakamura, F.Ide, S.Kura, Y.Nakabeppu, M.Katsuki, T.Ishikawa, M.Sekiguchi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 11456 (2001)
28. M.T.Russo, G.De Luca, P.Degan, M.Bignami. *Mutat. Res.*, **614**, 69 (2007)
29. E.Seeberg, L.Eide, M.Bjørås. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 391 (1995)
30. Y.Mishina, E.M.Duguid, C.He. *Chem. Rev.*, **106**, 215 (2006)
31. D.M.Noll, T.McGregor Mason, P.S.Miller. *Chem. Rev.*, **106**, 277 (2006)
32. Y.Nakabeppu, D.Tsuchimoto, H.Yamaguchi, K.Sakumi. *J. Neurosci. Res.*, **85**, 919 (2007)
33. M.Lukin, C.de los Santos. *Chem. Rev.*, **106**, 607 (2006)
34. T.Paz-Elizur, M.Krupsky, D.Elinger, E.Schechtman, Z.Livneh. *Cancer Biomark.*, **1**, 201 (2005)
35. A.R.Collins, I.Gaivão. *Mol. Aspects Med.*, **28**, 307 (2007)
36. B.Tudek. *Mol. Aspects Med.*, **28**, 258 (2007)
37. W.A.Beard, S.H.Wilson. *Chem. Rev.*, **106**, 361 (2006)
38. F.P.Guengerich. *Chem. Rev.*, **106**, 420 (2006)
39. A.K.Showalter, B.J.Lamarche, M.Bakhtina, M.-I.Su, K.-H.Tang, M.-D.Tsai. *Chem. Rev.*, **106**, 340 (2006)
40. A.E.Tomkinson, S.Vijayakumar, J.M.Pascal, T.Ellenberger. *Chem. Rev.*, **106**, 687 (2006)
41. U.D.Priyakumar, A.D.MacKerell Jr. *Chem. Rev.*, **106**, 489 (2006)
42. P.J.Berti, J.A.B.McCann. *Chem. Rev.*, **106**, 506 (2006)
43. W.Bujalowski. *Chem. Rev.*, **106**, 556 (2006)
44. C.J.Chetsanga, T.Lindahl. *Nucleic Acids Res.*, **6**, 3673 (1979)
45. B.Tudek. *J. Biochem. Mol. Biol.*, **36**, 12 (2003)
46. J.Tchou, H.Kasai, S.Shibutani, M.H.Chung, J.Laval, A.P.Grollman, S.Nishimura. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4690 (1991)
47. S.Boiteux, T.R.O'Connor, J.Laval. *EMBO J.*, **6**, 3177 (1987)
48. T.Mikawa, R.Kato, M.Sugahara, S.Kuramitsu. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 903 (1998)
49. P.Duwat, R.de Oliveira, S.D.Ehrlich, S.Boiteux. *Microbiology*, **141**, 411 (1995)
50. M.Sugahara, T.Mikawa, T.Kumasaka, M.Yamamoto, R.Kato, K.Fukuyama, Y.Inoue, S.Kuramitsu. *EMBO J.*, **19**, 3857 (2000)
51. R.Gilboa, D.O.Zharkov, G.Golan, A.S.Fernandes, S.E.Gerchman, E.Matz, J.H.Kyica, A.P.Grollman, G.Shoham. *J. Biol. Chem.*, **277**, 19811 (2002)
52. J.C.Fromme, G.L.Verdine. *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 544 (2002)
53. L.Serre, P.K.de Jésus, S.Boiteux, C.Zelwer, B.Castaing. *EMBO J.*, **21**, 2854 (2002)
54. K.P.de Jésus, L.Serre, C.Zelwer, B.Castaing. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 5936 (2005)
55. J.C.Fromme, G.L.Verdine. *J. Biol. Chem.*, **278**, 51543 (2003)
56. A.Banerjee, W.L.Santos, G.L.Verdine. *Science*, **311**, 1153 (2006)
57. F.Coste, M.Ober, T.Carell, S.Boiteux, C.Zelwer, B.Castaing. *J. Biol. Chem.*, **279**, 44074 (2004)
58. S.Kuznetsova, A.Rykhlevskaya, M.Taranenko, O.Sidorkina, T.Oretskaya, J.Laval. *Biochimie*, **85**, 511 (2003)
59. M.V.Rogacheva, A.V.Bochenkova, S.A.Kuznetsova, M.K.Saparbaev, A.V.Nemukhin. *J. Phys. Chem. B*, **111**, 432 (2007)
60. M.V.Rogacheva, M.K.Saparbaev, I.M.Afanasov, S.A.Kuznetsova. *Biochimie*, **87**, 1079 (2005)
61. M.Rogacheva, A.Ishchenko, M.Saparbaev, S.Kuznetsova, V.Ogryzko. *J. Biol. Chem.*, **281**, 32353 (2006)
62. A.Karakaya, P.Jaruga, V.A.Bohr, A.P.Grollman, M.Dizdaroglu. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 474 (1997)
63. C.J.Burrows, J.G.Muller, O.Kornyushyna, W.Luo, V.Duarte, M.D.Leipold, S.S.David. *Environ. Health Perspect.*, **110**, 713 (2002)
64. M.D.Leipold, J.G.Muller, C.J.Burrows, S.S.David. *Biochemistry*, **39**, 14984 (2000)
65. J.Tchou, V.Bodepudi, S.Shibutani, I.Antoshechkin, J.Miller, A.P.Grollman, F.Johnson. *J. Biol. Chem.*, **269**, 15318 (1994)
66. S.Boiteux, E.Gajewski, J.Laval, M.Dizdaroglu. *Biochemistry*, **31**, 106 (1992)
67. E.Speina, J.M.Ciesla, J.Wójcik, M.Bajek, J.T.Kusmerek, B.Tudek. *J. Biol. Chem.*, **276**, 21821 (2001)
68. N.Y.Tretyakova, J.S.Wishnok, S.R.Tannenbaum. *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 658 (2000)
69. V.Duarte, D.Gasparutto, M.Jaquinod, J.Cadet. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1555 (2000)
70. V.Duarte, D.Gasparutto, M.Jaquinod, J.-L.Ravanat, J.Cadet. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 46 (2001)
71. Q.Li, J.Laval, D.B.Ludlum. *Carcinogenesis*, **18**, 1035 (1997)
72. C.D'Ham, A.Romieu, M.Jaquinod, D.Gasparutto, J.Cadet. *Biochemistry*, **38**, 3335 (1999)
73. Z.Hatahet, Y.W.Kow, A.A.Purmal, R.P.Cunningham, S.S.Wallace. *J. Biol. Chem.*, **269**, 18814 (1994)
74. A.A.Purmal, G.W.Lampman, J.P.Bond, Z.Hatahet, S.S.Wallace. *J. Biol. Chem.*, **273**, 10026 (1998)
75. D.Gasparutto, M.Ait-Abbas, M.Jaquinod, S.Boiteux, J.Cadet. *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 575 (2000)
76. Q.M.Zhang, I.Miyabe, Y.Matsumoto, K.Kino, H.Sugiyama, S.Yonei. *J. Biol. Chem.*, **275**, 35471 (2000)
77. J.Jurado, M.Saparbaev, T.J.Matray, M.M.Greenberg, J.Laval. *Biochemistry*, **37**, 7757 (1998)
78. A.A.Purmal, L.E.Rabow, G.W.Lampman, R.P.Cunningham, Y.W.Kow. *Mutat. Res./DNA Repair*, **364**, 193 (1996)
79. J.Laval, J.Jurado, M.Saparbaev, O.Sidorkina. *Mutat. Res.*, **402**, 93 (1998)
80. S.S.David, S.D.Williams. *Chem. Rev.*, **98**, 1221 (1998)
81. E.I.Zaika, R.A.Perlow, E.Matz, S.Broyde, R.Gilboa, A.P.Grollman, D.O.Zharkov. *J. Biol. Chem.*, **279**, 4849 (2004)
82. M.Taranenko, A.Rykhlevskaya, M.Mtchedlidze, J.Laval, S.Kuznetsova. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 2945 (2003)
83. B.Castaing, J.-L.Fourrey, N.Hervouet, M.Thomas, S.Boiteux, C.Zelwer. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 608 (1999)
84. R.J.Graves, I.Felzenszwalb, J.Laval, T.R.O'Connor. *J. Biol. Chem.*, **267**, 14429 (1992)
85. D.O.Zharkov, R.A.Rieger, C.R.Iden, A.P.Grollman. *J. Biol. Chem.*, **272**, 5335 (1997)
86. S.V.Kuznetsov, O.M.Sidorkina, J.Jurado, M.Bazin, P.Tauc, J.C.Brochon, J.Laval, R.Santus. *Eur. J. Biochem.*, **253**, 413 (1998)
87. D.O.Zharkov, G.Shoham, A.P.Grollman. *DNA Repair*, **2**, 839 (2003)

88. A.Mazumder, J.A.Gerlt, M.J.Absalon, J.Stubbe, R.P.Cunningham, J.Withka, P.H.Bolton. *Biochemistry*, **30**, 1119 (1991)
89. O.S.Fedorova, G.A.Nevinsky, V.V.Koval, A.A.Ishchenko, N.L.Vasilenko, K.T.Douglas. *Biochemistry*, **41**, 1520 (2002)
90. G.W.Buchko, S.S.Wallace, M.A.Kennedy. *J. Biomol. NMR*, **22**, 301 (2002)
91. G.W.Buchko, K.McAteer, S.S.Wallace, M.A.Kennedy. *DNA Repair*, **4**, 327 (2005)
92. V.V.Koval, N.A.Kuznetsov, D.O.Zharkov, A.A.Ishchenko, K.T.Douglas, G.A.Nevinsky, O.S.Fedorova. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 926 (2004)
93. N.A.Kuznetsov, V.V.Koval, D.O.Zharkov, Yu.N.Vorobjev, G.A.Nevinsky, K.T.Douglas, O.S.Fedorova. *Biochemistry*, **46**, 424 (2007)
94. М.В.Рогачева. Дис. канд. хим. наук. МГУ, Москва, 2006
95. D.O.Zharkov, A.P.Grollman. *Mutat. Res.*, **577**, 24 (2005)
96. C.T.Radom, A.Banerjee, G.L.Verdine. *J. Biol. Chem.*, **282**, 9182 (2007)
97. C.Cao, Y.L.Jiang, J.T.Stivers, F.Song. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 1230 (2004)
98. A.P.Grollman, D.O.Zharkov. In *Advances in DNA Damage and Repair*. (Eds M.Dizdaroglu, A.E.Karakaya). Plenum Press, 1999. P. 135
99. L.A.Lipscomb, M.E.Peek, M.L.Morningstar, S.M.Verghis, E.M.Miller, A.Rich, J.M.Essigmann, L.D.Williams. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 719 (1995)
100. A.A.Ishchenko, N.L.Vasilenko, O.I.Sinitina, V.I.Yamkovoy, O.S.Fedorova, K.T.Douglas, G.A.Nevinsky. *Biochemistry*, **41**, 7540 (2002)
101. D.O.Zharkov, A.A.Ishchenko, K.T.Douglas, G.A.Nevinsky. *Mutat. Res.*, **531**, 141 (2003)
102. G.E.Plum, A.P.Grollman, F.Johnson, K.J.Breslauer. *Biochemistry*, **34**, 16148 (1995)
103. P.Amara, L.Serre, B.Castaing, A.Thomas. *Protein Sci.*, **13**, 2009 (2004)
104. O.V.Lavrukhin, R.S.Lloyd. *Biochemistry*, **39**, 15266 (2000)
105. T.A.Rosenquist, D.O.Zharkov, A.P.Grollman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7429 (1997)
106. P.A.van der Kemp, D.Thomas, R.Barbey, R.de Oliveira, S.Boiteux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5197 (1996)
107. M.J.Prieto Alamo, J.Jurado, E.Francastel, J.Laval. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 5199 (1998)
108. T.M.Murphy, A.George. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **329**, 869 (2005)
109. A.L.Dany, A.Tissier. *Mol. Genet. Genomics*, **265**, 293 (2001)
110. M.-V.Garcia-Ortiz, R.R.Ariza, T.Roldán-Arjona. *Plant Mol. Biol.*, **47**, 795 (2001)
111. H.M.Nash, S.D.Bruner, O.D.Schärer, T.Kawate, T.A.Addona, E.Spooner, W.S.Lane, G.L.Verdine. *Curr. Biol.*, **6**, 968 (1996)
112. J.P.Radicella, C.Dherin, C.Desmaze, M.S.Fox, S.Boiteux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8010 (1997)
113. H.Aburatani, Y.Hippo, T.Ishida, R.Takashima, C.Matsuba, T.Kodama, M.Takao, A.Yasui, K.Yamamoto, M.Asano, K.Fukasawa, T.Yoshinari, H.Inoue, E.Ohtsuka, S.Nishimura. *Cancer Res.*, **57**, 2151 (1997)
114. T.Roldán-Arjona, Y.-F.Wei, K.C.Carter, A.Klungland, C.Anselmino, R.-P.Wang, M.Augustus, T.Lindahl. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8016 (1997)
115. K.Arai, K.Morishita, K.Shinmura, T.Kohno, S.-R.Kim, T.Nohmi, M.Taniwaki, S.Ohwada, J.Yokota. *Oncogene*, **14**, 2857 (1997)
116. K.Nishioka, T.Ohtsubo, H.Oda, T.Fujiwara, D.Kang, K.Sugimachi, Y.Nakabeppu. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 1637 (1999)
117. S.Boiteux, J.P.Radicella. *Arch. Biochem. Biophys.*, **377**, 1 (2000)
118. T.Kohno, K.Shinmura, M.Tosaka, M.Tani, S.-P.Kim, H.Sugimura, T.Nohmi, H.Kasai, J.Yokota. *Oncogene*, **16**, 3219 (1998)
119. O.D.Schärer, J.Jiricny. *BioEssays*, **23**, 270 (2001)
120. H.M.Nash, R.Lu, W.S.Lane, G.L.Verdine. *Chem. Biol.*, **4**, 693 (1997)
121. P.M.Girard, N.Guibourt, S.Boiteux. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3204 (1997)
122. N.Guibourt, B.Castaing, P.A.van Der Kemp, S.Boiteux. *Biochemistry*, **39**, 1716 (2000)
123. S.D.Bruner, D.P.G.Norman, G.L.Verdine. *Nature (London)*, **403**, 859 (2000)
124. D.P.G.Norman, S.D.Bruner, G.L.Verdine. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 359 (2001)
125. M.Bjørås, E.Seeberg, L.Luna, L.H.Pearl, T.E.Barrett. *J. Mol. Biol.*, **317**, 171 (2002)
126. J.C.Fromme, S.D.Bruner, W.Yang, M.Karplus, G.L.Verdine. *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 204 (2003)
127. D.P.G.Norman, S.J.Chung, G.L.Verdine. *Biochemistry*, **42**, 1564 (2003)
128. A.Banerjee, W.Yang, M.Karplus, G.L.Verdine. *Nature (London)*, **434**, 612 (2005)
129. A.Banerjee, G.L.Verdine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15020 (2006)
130. G.L.Verdine, S.D.Bruner. *Chem. Biol.*, **4**, 329 (1997)
131. B.Karahalil, P.-M.Girard, S.Boiteux, M.Dizdaroglu. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1228 (1998)
132. D.O.Zharkov, T.A.Rosenquist, S.E.Gerchman, A.P.Grollman. *J. Biol. Chem.*, **275**, 28607 (2000)
133. C.Dherin, J.P.Radicella, M.Dizdaroglu, S.Boiteux. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 4001 (1999)
134. P.M.Girard, C.D'Ham, J.Cadet, S.Boiteux. *Carcinogenesis*, **19**, 1299 (1998)
135. M.Bjørås, L.Luna, B.Johnsen, E.Hoff, T.Haug, T.Rognes, E.Seeberg. *EMBO J.*, **16**, 6314 (1997)
136. K.Shinmura, H.Kasai, A.Sasaki, H.Sugimura, J.Yokota. *Mutat. Res./DNA Repair*, **385**, 75 (1997)
137. T.K.Hazra, T.Izumi, L.Maidt, R.A.Floyd, S.Mitra. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 5116 (1998)
138. M.Sandigursky, A.Yacoub, M.R.Kelley, Y.Xu, W.A.Franklin, W.A.Deutsch. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4557 (1997)
139. S.D.Bruner, H.M.Nash, W.S.Lane, G.L.Verdine. *Curr. Biol.*, **8**, 393 (1998)
140. A.D.Scott, M.Neishabury, D.H.Jones, S.H.Reed, S.Boiteux, R.Waters. *Yeast*, **15**, 205 (1999)
141. P.A.van der Kemp, J.-B.Charbonnier, M.Audebert, S.Boiteux. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 570 (2004)
142. N.A.Kuznetsov, V.V.Koval, D.O.Zharkov, G.A.Nevinsky, K.T.Douglas, O.S.Fedorova. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 3919 (2005)
143. N.A.Kuznetsov, V.V.Koval, G.A.Nevinsky, K.T.Douglas, D.O.Zharkov, O.S.Fedorova. *J. Biol. Chem.*, **282**, 1029 (2007)
144. P.C.Blainey, A.M.van Oijen, A.Banerjee, G.L.Verdine, X.S.Xie. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 5752 (2006)
145. Q.-M.Zhang, N.Ishikawa, T.Nakahara, S.Yonei. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4669 (1998)
146. Y.Guan, R.C.Manuel, A.S.Arva, S.S.Parikh, C.D.Mol, J.H.Miller, R.S.Lloyd, J.A.Tainer. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 1058 (1998)
147. D.M.Noll, A.Gogos, J.A.Granek, N.D.Clarke. *Biochemistry*, **38**, 6374 (1999)
148. D.E.Volk, P.G.House, V.Thivyanathan, B.A.Luxon, S.Zhang, R.S.Lloyd, D.G.Gorenstein. *Biochemistry*, **39**, 7331 (2000)
149. J.C.Fromme, A.Banerjee, S.J.Huang, G.L.Verdine. *Nature (London)*, **427**, 652 (2004)
150. S.L.Porello, A.E.Leyes, S.S.David. *Biochemistry*, **37**, 14756 (1998)
151. S.L.Porello, S.D.Williams, H.Kuhn, M.L.Michaels, S.S.David. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 10684 (1996)
152. H.Kamiya, H.Kasai. *J. Radiat. Res.*, **41**, 349 (2000)

153. R.C.Manuel, K.Hitomi, A.S.Arva, P.G.House, A.J.Kurtz, M.L.Dodson, A.K.McCullough, J.A.Tainer, R.S.Lloyd. *J. Biol. Chem.*, **279**, 46930 (2004)
154. J.J.Tsai-Wu, H.F.Liu, A.L.Lu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8779 (1992)
155. C.L.Chepanoske, S.L.Porello, T.Fujiwara, H.Sugiyama, S.S.David. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 3197 (1999)
156. K.E.McAuley-Hecht, G.A.Leonard, N.J.Gibson, J.B.Thomson, W.P.Watson, W.N.Hunter, T.Brown. *Biochemistry*, **33**, 10266 (1994)
157. A.S.Bernards, J.K.Miller, K.K.Bao, I.Wong. *J. Biol. Chem.*, **277**, 20960 (2002)
158. J.P.McGoldrick, Y.C.Yeh, M.Solomon, J.M.Essigmann, A.L.Lu. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 989 (1995)
159. A.Ichinoe, M.Behmanesh, Y.Tominaga, Y.Ushijima, S.Hirano, Y.Sakai, D.Tsuchimoto, K.Sakumi, N.Wake, Y.Nakabeppu. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 477 (2004)
160. T.Ohtsubo, K.Nishioka, Y.Imaiso, S.Iwai, H.Shimokawa, H.Oda, T.Fujiwara, Y.Nakabeppu. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1355 (2000)
161. Y.Ushijima, Y.Tominaga, T.Miura, D.Tsuchimoto, K.Sakumi, Y.Nakabeppu. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 672 (2005)
162. M.J.Bessman, L.C.Bullions, S.K.Bhatnagar, B.C.Braden, W.E.Love. *J. Biol. Chem.*, **266**, 9055 (1991)
163. M.Kobayashi, Y.Ohara-Nemoto, M.Kaneko, H.Hayakawa, M.Sekiguchi, K.Yamamoto. *J. Biol. Chem.*, **273**, 26394 (1998)
164. C.Abeygunawardana, D.J.Weber, A.G.Gittis, D.N.Frick, J.Lin, A.-F.Miller, M.J.Bessman, A.S.Mildvan. *Biochemistry*, **34**, 14997 (1995)
165. T.Nakamura, T.Doi, M.Sekiguchi, Y.Yamagata. *Acta Crystallogr., Sect. D*, **60**, 1641 (2004)
166. J.Lin, C.Abeygunawardana, D.N.Frick, M.J.Bessman, A.S.Mildvan. *Biochemistry*, **36**, 1199 (1997)
167. M.A.Massiah, V.Saraswat, H.F.Azurmendi, A.S.Mildvan. *Biochemistry*, **42**, 10140 (2003)
168. D.N.Frick, D.J.Weber, J.R.Gillespie, M.J.Bessman, A.S.Mildvan. *J. Biol. Chem.*, **269**, 1794 (1994)
169. F.Taddei, H.Hayakawa, M.-F.Bouton, A.-M.Cirinesi, I.Matic, M.Sekiguchi, M.Radman. *Science*, **278**, 128 (1997)
170. V.Saraswat, M.A.Massiah, G.Lopez, L.M.Amzel, A.S.Mildvan. *Biochemistry*, **41**, 15566 (2002)
171. Z.Xia, H.F.Azurmendi, A.S.Mildvan. *Biochemistry*, **44**, 15334 (2005)
172. H.Hayakawa, A.Taketomi, K.Sakumi, M.Kuwano, M.Sekiguchi. *Biochemistry*, **34**, 89 (1995)
173. A.V.Kamath, C.Yanofsky. *Gene*, **134**, 99 (1993)
174. T.Kakuma, J.Nishida, T.Tsuzuki, M.Sekiguchi. *J. Biol. Chem.*, **270**, 25942 (1995)
175. J.P.Cai, T.Kakuma, T.Tsuzuki, M.Sekiguchi. *Carcinogenesis*, **16**, 2343 (1995)
176. Y.Nakabeppu. *Mutat. Res.*, **477**, 59 (2001)
177. K.Sakumi, M.Furuichi, T.Tsuzuki, T.Kakuma, S.Kawabata, H.Maki, M.Sekiguchi. *J. Biol. Chem.*, **268**, 23524 (1993)
178. T.Nunoshiba, R.Ishida, M.Sasaki, S.Iwai, Y.Nakabeppu, K.Yamamoto. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5339 (2004)
179. A.A.Ishchenko, X.Yang, D.Ramotar, M.Saparbaev. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 6380 (2005)
180. D.Yoshimura, K.Sakumi, M.Ohno, Y.Sakai, M.Furuichi, S.Iwai, Y.Nakabeppu. *J. Biol. Chem.*, **278**, 37965 (2003)
181. J.-Y.Mo, H.Maki, M.Sekiguchi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11021 (1992)
182. D.Kang, J.Nishida, A.Iyama, Y.Nakabeppu, M.Furuichi, T.Fujiwara, M.Sekiguchi, K.Takeshige. *J. Biol. Chem.*, **270**, 14659 (1995)
183. M.Mishima, Y.Sakai, N.Itoh, H.Kamiya, M.Furuichi, M.Takahashi, Y.Yamagata, S.Iwai, Y.Nakabeppu, M.Shirakawa. *J. Biol. Chem.*, **279**, 33806 (2004)
184. A.G.Mclennan. *Int. J. Mol. Med.*, **4**, 79 (1999)
185. H.Yang, M.M.Slupska, Y.-F.Wei, J.H.Tai, W.M.Luther, Y.-R.Xia, D.M.Shih, J.-H.Chiang, C.Baikalov, S.Fitz-Gibbon, I.T.Phan, A.Conrad, J.H.Miller. *J. Biol. Chem.*, **275**, 8844 (2000)
186. Y.Sakai, M.Furuichi, M.Takahashi, M.Mishima, S.Iwai, M.Shirakawa, Y.Nakabeppu. *J. Biol. Chem.*, **277**, 8579 (2002)
187. M.Takahashi, F.Maraboeuf, Y.Sakai, H.Yakushiji, M.Mishima, M.Shirakawa, S.Iwai, H.Hayakawa, M.Sekiguchi, Y.Nakabeppu. *J. Mol. Biol.*, **319**, 129 (2002)
188. Y.Fujii, H.Shimokawa, M.Sekiguchi, Y.Nakabeppu. *J. Biol. Chem.*, **274**, 38251 (1999)
189. H.Hayakawa, A.Hofer, L.Thelander, S.Kitajima, Y.Cai, S.Oshiro, H.Yakushiji, Y.Nakabeppu, M.Kuwano, M.Sekiguchi. *Biochemistry*, **38**, 3610 (1999)
190. T.Ishibashi, H.Hayakawa, R.Ito, M.Miyazawa, Y.Yamagata, M.Sekiguchi. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 3779 (2005)
191. J.P.Cai, T.Ishibashi, Y.Takagi, H.Hayakawa, M.Sekiguchi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**, 1073 (2003)
192. M.Sekiguchi. *Genes Cells*, **1**, 139 (1996)
193. T.Ishibashi, H.Hayakawa, M.Sekiguchi. *EMBO Reports*, **4**, 479 (2003)
194. K.Fujikawa, H.Kamiya, H.Yakushiji, Y.Fujii, Y.Nakabeppu, H.Kasai. *J. Biol. Chem.*, **274**, 18201 (1999)
195. K.Fujikawa, H.Kamiya, H.Yakushiji, Y.Nakabeppu, H.Kasai. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 449 (2001)
196. J.Wyrzykowski, M.R.Volkert. *J. Bacteriol.*, **185**, 1701 (2003)
197. C.Colussi, E.Parlanti, P.Degan, G.Aquilina, D.Barnes, P.Macpherson, P.Karran, M.Crescenzi, E.Dogliotti, M.Bignami. *Curr. Biol.*, **12**, 912 (2002)
198. H.Hayakawa, M.Kuwano, M.Sekiguchi. *Biochemistry*, **40**, 9977 (2001)
199. H.Hayakawa, M.Sekiguchi. *Biochemistry*, **45**, 6749 (2006)
200. B.N.Ames, L.S.Gold, W.C.Willett. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5258 (1995)
201. H.Kasai, S.Nishimura. In *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. Vol. 4*. (Ed. H.Sies). Academic Press, London, 1991. P. 99
202. C.Richter, J.-W.Park, B.N.Ames. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6465 (1988)
203. R.Olinski, D.Gackowski, R.Rozalski, M.Foksinski, K.Bialkowski. *Mutat. Res.*, **531**, 177 (2003)
204. M.Hollstein, B.Shomer, M.Greenblatt, T.Soussi, E.Hovig, R.Montesano, C.C.Harris. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 141 (1996)
205. H.Kamiya, K.Miura, H.Ishikawa, H.Inoue, S.Nishimura, E.Ohtsuka. *Cancer Res.*, **52**, 3483 (1992)
206. K.B.Beckman, B.N.Ames. *Physiol. Rev.*, **78**, 547 (1998)

REPAIR OF 8-OXOGUANINE IN DNA. THE MECHANISMS OF ENZYMATIC CATALYSIS**M.V.Rogacheva, S.A.Kuznetsova***Department of Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University
Leninskie Gory, 119991 Moscow, Russian Federation, Fax +7(495)939–3181*

Data are summarised on the key enzymes involved in the repair of 8-oxoguanine, which is one of the most abundant DNA oxidative damage products possessing mutagenic activity. The literature data on the substrate specificity of prokaryotic and eukaryotic 8-oxoguanine DNA N-glycosylases, adenine DNA N-glycosylases and 8-oxoguanosine triphosphatases, their active site structures and structural functional features are presented. Special attention is given to the chemical aspects of the mechanisms of the catalytic action of these enzymes including stereochemistry of the catalytic processes.

Bibliography — 206 references.

Received 18th January 2008