

УДК 577.151.4

АБЕРРАНТНАЯ РЕПАРАЦИЯ 8-ОКСОГУАНИНА В КОРОТКИХ ВЫПЕТЛИВАНИЯХ ДНК

© 2024 г. Д. А. Ерошенко^{1, 2}, Е. А. Дятлова¹, В. М. Голышев¹, А. В. Ендуткин¹,
член-корреспондент РАН Д. О. Жарков^{1, 2, *}

Поступило 20.11.2023 г.

После доработки 25.11.2023 г.

Принято к публикации 25.11.2023 г.

Присутствие повреждений в ДНК может увеличить частоту ошибок репликации ДНК и значительно повысить количество мутаций. В частности, паузы ДНК-полимераз в месте повреждения могут приводить к проскальзыванию полимеразы и образованию коротких выпетливаний длиной 1–2 нуклеотида. Репарация таких структур по неповрежденной ДНК-матрице ведет к микроделециям. Для одного из наиболее часто встречаемых окислительных повреждений ДНК, 8-оксогуанина (охоG), показано образование микроделений по неизвестному на данный момент механизму. В работе изучена аберрантная репарация охроG, находящегося в одно- и двухнуклеотидных выпетливаниях, системами эксцизионной репарации оснований ДНК *Escherichia coli* и человека. Показано, что репарация в таких субстратах может служить механизмом фиксации микроделений у бактерий, но не у человека.

Ключевые слова: повреждение ДНК, мутагенез, репарация ДНК, ДНК-гликозилазы, 8-оксогуанин, Fpg, OGG1.

DOI: 10.31857/S2686738924020031, **EDN:** WGASGM

Ошибки ДНК-полимераз во время репликации могут приводить к образованию коротких выпетливаний длиной 1–2 нуклеотида в матричной или дочерней цепи ДНК. Неспаренные основания в них могут принимать как внутри-, так и внеспиральную конформацию [1–3] в зависимости от условий и нуклеотидного окружения. Такие структуры инициируют мутации со сдвигом рамки считывания — микроинсерции и микроделеции. Основной путь образования коротких выпетливаний — это проскальзывание ДНК-полимераз, что зачастую вызвано временными остановками фермента при наличии в ДНК повреждений [4]. Если ДНК-полимераза, сделав паузу в месте повреждения, включает dNMP, комплементарный первому или второму следующему по ходу нуклеотиду матрицы, возникает выпетливание. Если впоследствии оно удаляется системами репарации ДНК, происходит микроделеция (рис. 1а). Подобные события «аберрантной репарации», закрепляющие мутации, вносят заметный вклад в общую геномную нестабильность [5].

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

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

В число самых распространенных повреждений ДНК входит 8-оксогуанин (охоG, рис. 1б) [6]. Он представляет собой предмутагенное повреждение, поскольку при репликации способен образовывать хугстенговскую пару охроG:А. Однако спектр мутаций, вызванных охроG, этим не ограничивается; среди продуктов репликации в клетках *E. coli* и человека наблюдается заметное число микроделений в месте охроG, что говорит об образовании выпетливаний при попытке ДНК-полимераз пройти повреждение [7–9].

ОхроG удаляется из ДНК по пути эксцизионной репарации оснований, который инициируется ДНК-гликозилазами Fpg (у бактерий) и OGG1 (у эукариот). Эти ферменты негомолотичны и имеют совершенно разную третичную структуру. Тем не менее их субстратная специфичность практически идентична: оба они гидролизуют N-гликозидную связь охроG в парах охроG:С. Далее продукт реакции подвергается последовательно действию апурин-апиримидиновой эндонуклеазы (Xth или Nfo у *E. coli*, APE1 у человека), ДНК-полимеразы (ДНК-полимераза I у *E. coli*, ДНК-полимераза β у человека) и ДНК-лигазы, что восстанавливает целостность ДНК.

Несмотря на то что репарация охроG изучена достаточно подробно, до сих пор практически не

Таблица 1. Кинетические и термодинамические параметры реакций расщепления ДНК-субстратов ферментами Fpg и OGG1

Субстрат	$T_{пл}, ^\circ\text{C}$	Фермент						
		Fpg				OGG1		
		$K_M, \text{нМ}$	$k_{cat}, \text{мин}^{-1}$	$k_{cat}/K_M, \text{нМ}^{-1} \text{мин}^{-1}, \times 10^2$	$K_d, \text{нМ}$	$k_2, \text{мин}^{-1}$	$k_3, \text{мин}^{-1}, \times 10^4$	$K_d, \text{нМ}$
X.0	70.7	35 ± 7	14 ± 1	41 ± 10	7.3 ± 1.6	22 ± 2	210 ± 60	94 ± 29
X.1	60.7	23 ± 8	11 ± 1	49 ± 22	6.7 ± 2.2	0.27 ± 0.03	—	54 ± 16
X.2.1	59.9	190 ± 50	4.3 ± 0.4	2.2 ± 0.7	24 ± 10	0.22 ± 0.09	—	420 ± 110
X.2.2	55.6	96 ± 32	2.6 ± 0.5	2.7 ± 1.5	11 ± 4	0.61 ± 0.12	—	230 ± 70

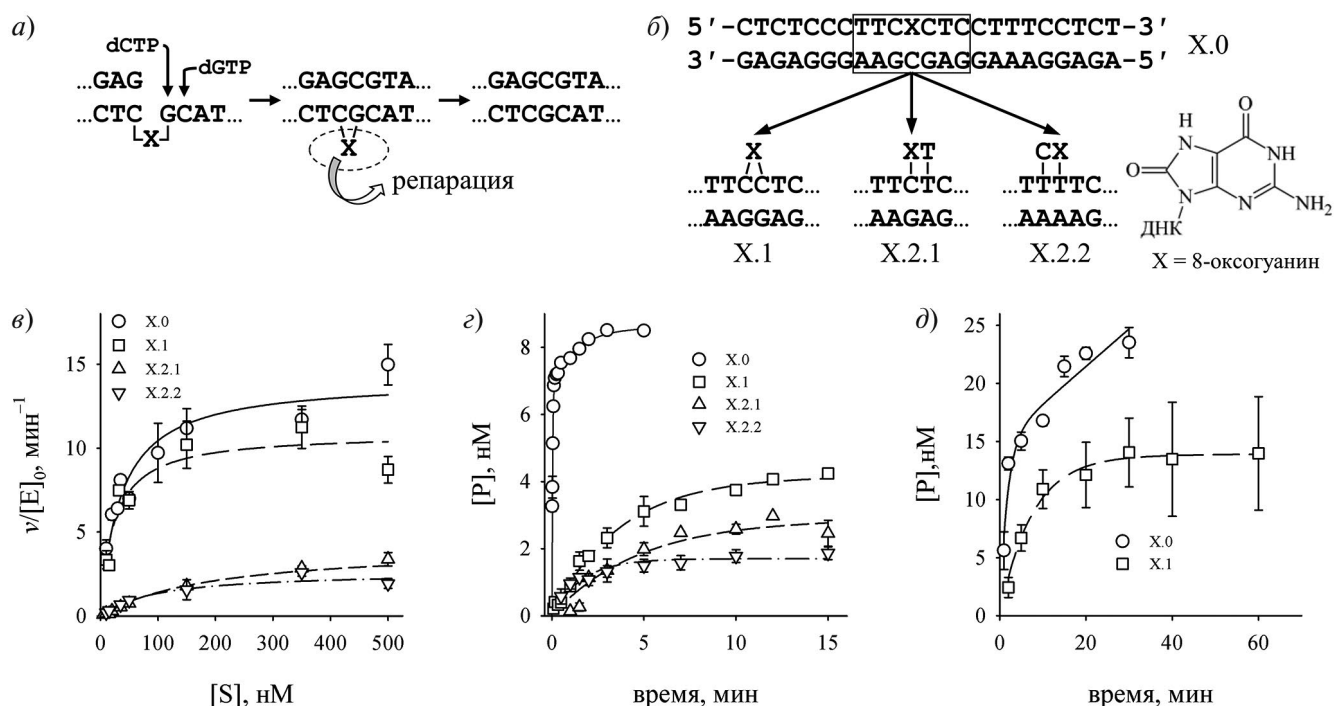


Рис. 1. Схема образования микроделений при проскальзывании ДНК-полимеразы (а); схема строения использованных в работе ДНК-субстратов (б); графики зависимости начальной скорости реакции от исходной концентрации субстрата $[S]$ для фермента Fpg (4.2 нМ) (условия реакции: 25 мМ Трис–HCl pH 7.5, 50 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 37 °С) (в); кинетические кривые расщепления субстратов ферментом OGG1 в том же буфере при $[E]_0 = 5 \text{ мкМ}$, $[S]_0 = 20 \text{ нМ}$ (г) и $[E]_0 = 10 \text{ нМ}$, $[S]_0 = 100 \text{ нМ}$ (д). Для субстратов X.2.1 и X.2.2 расщепления в (д) не наблюдалось. После реакции с OGG1 смеси прогревали со 100 мМ NaOH (5 мин, 95 °С). Во всех случаях продукты реакции разделяли электрофорезом в 20%-ном полиакриламидном геле в присутствии 7 М мочевины и анализировали с помощью установки радиолуминесцентного сканирования Typhoon 9500 (GE Healthcare). На графиках приведены средние значения и стандартные отклонения по трем независимым экспериментам.

затрагивалась проблема его удаления из неканонических структур ДНК, в частности выпетливаний, что важно для понимания механизмов индукции микроделений этим поврежденным основанием. В настоящей работе изучено удаление охoG из выпетливаний ферментами Fpg и OGG1. Исследуемые субстраты представляют собой олигонуклеотидные дуплексы, в которых напротив охoG расположен C или охoG находится в составе одно- или двухнуклеотидного выпетливания; в последнем случае повреждение располагается в первой или

второй позиции внеспирального участка (рис. 1б). Выпетливания снижали стабильность дуплекса, однако температура плавления всех субстратов оставалась заметно выше 37 °С (табл. 1; $T_{пл}$ измеряли, регистрируя поглощение при 260 нм при помощи спектрофотометра Cary 300–Bio Melt, снабженного термостатным блоком). Цепь, содержащая охoG, была помечена по 5'-концу ^{32}P для экспериментов по связыванию и расщеплению ДНК-субстратов или флуорофором Су3 для экспериментов по реконструкции репарации. Белки Fpg *E. coli*, OGG1,

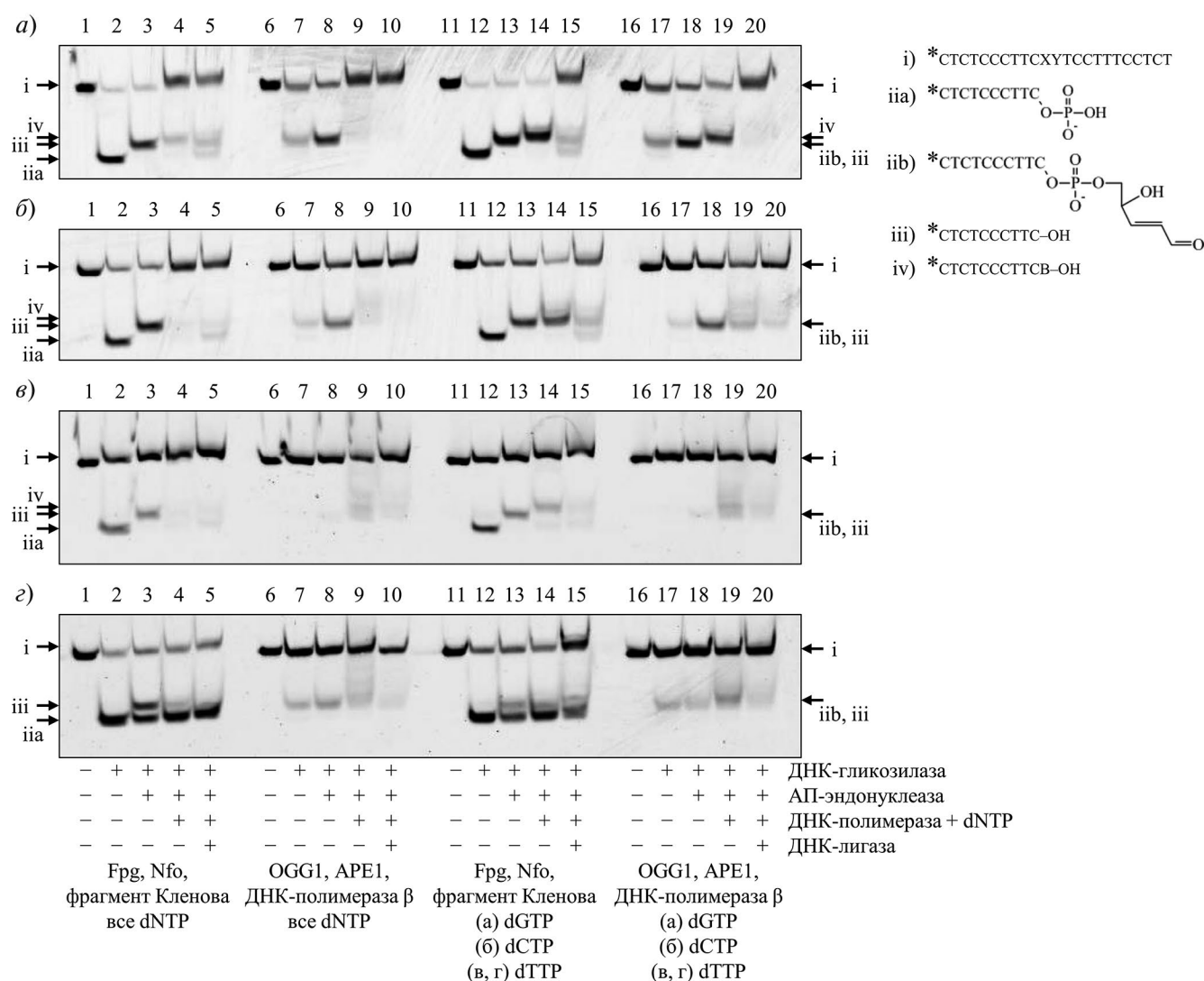


Рис. 2. Репрезентативные флуоресцентные снимки после электрофоретического разделения в денатурирующем 20%-ном полиакриламидном геле продуктов реакции в реконструированной системе репарации субстратов X.0 (а), X.1 (б), X.2.1 (в) и X.2.2 (г). Условия реакции: 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ ДТТ, 1 мМ АТФ, 25 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 50 нМ ДНК-субстрат, 0.5 ед. акт./мкл ДНК-лигазы, 200 нМ прочие ферменты, 250 мкМ dNTP, 30 мин при 37 °С. Структуры расщепляемой цепи ДНК и интермедиатов репарации обозначены римскими цифрами: (i) исходная поврежденная цепь ДНК, (iia) продукт расщепления ферментом Fpg, (iib) продукт расщепления ферментом OGG1, (iii) продукт расщепления АП-эндонуклеазами, (iv) продукт включения одного нуклеотида ДНК-полимеразами. X – охoG, Y – C или T, B – C, G или T, звездочка обозначает 5'-концевую флуоресцентную метку (Су3).

АРЕ1 и ДНК-полимеразу β человека выделяли по описанным методикам [10–13].

Кинетику реакции, катализируемой ферментом Fpg, можно описать стандартной схемой Михаэлиса – Ментен [14]. На рис. 1в приведены графики, отражающие расщепление исследованных субстратов ферментом Fpg. Зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата носила ожидаемый гиперболический характер. Полученные для разных субстратов значения константы Михаэлиса K_M и каталитической константы k_{cat} сведены в табл. 1. Как видно, для субстрата X.1, в котором охoG находится в однонуклеотидном выпетли-

вании, кинетика реакции не отличается от таковой для стандартной пары охoG:C. Известно, что при узнавании охoG фермент Fpg выворачивает его из спирали ДНК в свой активный центр, и вполне вероятно, что однонуклеотидное выпетливание может имитировать структуру ДНК в этом комплексе. Оба субстрата с двухнуклеотидным выпетливанием, X.2.1 и X.2.2, показывали повышение K_M и снижение k_{cat} в несколько раз, вследствие чего показатель специфичности k_{cat}/K_M был для них примерно в 20 раз ниже, чем для субстратов X.0 и X.1 (см. табл. 1). Очевидно, в этих случаях даже при внеспиральной локализации охoG правильное размещение его в

активном центре затруднено. Для всех изученных субстратов количество продукта не менялось при остановке реакции 0.1 М NaOH, который вызывает разрыв ДНК по АП-сайтам. Это свидетельствует о том, что снижение активности фермента Fpg по отношению к субстратам X.2.1 и X.2.2 происходит именно на уровне гидролиза *N*-гликозидной связи, а не последующих стадий реакции.

В отличие от Fpg, для фермента OGG1 скорость реакции лимитируется стадией высвобождения продукта [15], поэтому для канонического субстрата (охоG:C) возможно отдельно измерить константу каталитической стадии (k_2) и константу скорости высвобождения продукта (k_3) в условиях кинетики одного оборота ($[E]_0 \gg [S]_0$) и кинетики фазы всплеска ($[E]_0 \ll [S]_0$) соответственно. Даже в случае одонуклеотидного выпетливания каталитическая константа OGG1 была на 1.5–2.0 порядка ниже, чем для канонического субстрата (см. рис. 1з, табл. 1).

Такое снижение приводило к тому, что стадия высвобождения продукта переставала быть скоростьюлимитирующей, на графике накопления продукта со временем отсутствовала характерная фаза всплеска (см. рис. 1д), и определить константу скорости высвобождения продукта было невозможно (см. табл. 1). Таким образом, OGG1 неэффективно использует охоG в составе одно- и двухнуклеотидных выпетливаний как субстрат. Разница с ферментом Fpg, по-видимому, объясняется разницей в общей пространственной структуре и в архитектуре активного центра этих белков, которые принадлежат к разным структурным суперсемействам. Так, активный центр OGG1 более тесный по сравнению с активным центром Fpg; кроме того, оба белка по-разному взаимодействуют с фосфатами, окружающими поврежденный нуклеозид, для его выво- рачивания из ДНК [16, 17].

Для анализа связывания Fpg и OGG1 с субстратной ДНК без ее расщепления методом сайт-направленного мутагенеза получили их каталитически неактивные варианты Fpg E2Q и OGG1 K249Q [16, 18]. Белки выделяли по тем же схемам, что и белки дикого типа. Связывание определяли по изменению подвижности комплекса в неденатурирующем геле; результаты эксперимента приведены в табл. 1. Образование выпетливаний лишь умеренно влияло на сродство обоих белков к ДНК: максимальное повышение K_d наблюдалось для субстрата X2.1 и составляло 3.3 раза для Fpg и 4.5 раз для OGG1. Интересно, что для субстрата X.1 сродство к ДНК-гликозилазам оставалось неизменным или даже несколько повышалось, что, возможно, отражает лучшее связывание ДНК с внеспиральным поврежденным нуклеотидом. Таким образом, ухудшение связывания ДНК не мо-

жет полностью объяснить снижение активности Fpg и OGG1 на 1.5–2.0 порядка при наличии выпетливаний в ДНК.

Дальнейшие шаги репарации после действия ДНК-гликозилаз изучали при помощи реконструкции цикла репарации из очищенных рекомбинантных белков: Fpg, эндонуклеазы IV (Nfo) и фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I (дефицитного по 3'→5'-экзонуклеазной активности) для системы *E. coli* и OGG1, АП-эндонуклеазы APE1 и ДНК-полимеразы β для системы человека. Эффективность образования лигируемого разрыва оценивали с использованием ДНК-лигазы бактериофага T4. При наличии охоG в дцДНК действие Fpg приводит к образованию 3'-концевого фосфата, который затем удаляется Nfo, вызывая снижение электрофоретической подвижности продукта из-за уменьшения общего заряда олигонуклеотидного фрагмента (рис. 2а, дорожки 1–3). ДНК-полимераза затем ведет синтез с вытеснением цепи (см. рис. 2а, дорожка 4) либо при наличии только dGTP в реакционной смеси включает его с образованием лигируемого разрыва (рис. 2, дорожка 14). Аналогичная картина наблюдалась и для субстрата X.1 с некоторым снижением эффективности всех стадий относительно дцДНК (см. рис. 2б). Однако субстраты X2.1 и X2.2 вели себя по-разному: в первом случае цикл репарации проходил до конца с еще более низкой эффективностью, чем для X.0 и X.1, а во втором ДНК-полимеразная реакция не протекала, и продукт имел ту же подвижность, что и после АП-эндонуклеазной реакции (см. рис. 2в, г). В системе репарации человека фермент OGG1 оставляет на 3'-конце α,β -ненасыщенный альдегид, который удаляется АП-эндонуклеазой APE1, однако подвижности продуктов при этом мало отличаются (рис. 2а, дорожки 7, 8, 17, 18). При этом в присутствии APE1 количество расщепленной ДНК возрастает, поскольку собственная АП-лиазная активность фермента OGG1 невысока по сравнению с его ДНК-гликозилазной активностью. В то время как охоG в составе дцДНК полностью репарировался в системе, реконструированной из ферментов человека, АП-эндонуклеазная реакция проходила только в случае субстрата X.1, а образования разрывов с лигируемыми концами на субстратах с выпетливаниями практически не наблюдалось.

Таким образом, в работе показано, что репарация охоG, находящегося в выпетливаниях длиной 1–2 нуклеотида, может служить механизмом фиксации микроделений в ДНК *E. coli* и, вероятно, других бактерий. Однако система эксцизионной репарации оснований человека неэффективно узнает и процессирует подобные субстраты, и в клетках человека такой механизм маловероятен.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Секвенирование ДНК выполнялось сотрудниками Центра коллективного пользования «Геномика» СО РАН. Белок Nfo был любезно предоставлен А.А. Ищенко (Университет Париж-Саклэ, Франция).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований 21-54-12025 НННО_а.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Соблюдение этических стандартов: в данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Joshua-Tor L., Frolow F., Appella E., et al. // J. Mol. Biol. 1992. V. 225. № 2. P. 397–431.
2. Jiao Y., Stringfellow S., Yu H. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2002. V. 19. № 5. P. 929–934.
3. Shi X., Beauchamp K.A., Harbury P.J.B., Herschlag D. // Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 2014. V. 111. № 15. P. E1473–E1480.
4. Kunkel T.A., Bebenek K. // Annu. Rev. Biochem. 2000. V. 69. P. 497–529.
5. Talhaoui I., Matkarimov B.T., Tchenio T., et al. // Free Radic. Biol. Med. 2017. V. 107. P. 266–277.
6. Fleming A.M., Burrows C.J. // DNA Repair. 2017. V. 56. P. 75–83.
7. Moriya M., Ou C., Bodepudi V., et al. // Mutat. Res. 1991. V. 254. № 3. P. 281–288.
8. Markkanen E., Castrec B., Villani G., Hübscher U. // Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 2012. V. 109. № 50. P. 20401–20406.
9. Pande P., Haraguchi K., Jiang Y.-L., et al. // Biochemistry. 2015. V. 54. № 10. P. 1859–1862.
10. Gilboa R., Zharkov D.O., Golan G., et al. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 22. P. 19811–19816.
11. Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., et al. // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33. № 12. P. 3919–3931.
12. Sidorenko V.S., Nevinsky G.A., Zharkov D. O. // DNA Repair. 2007. V. 6. № 3. P. 317–328.
13. Endutkin A.V., Yudkina A.V., Zharkov T.D., et al. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 21. 13353.
14. Tchou J., Bodepudi V., Shibutani S., et al. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. № 21. P. 15318–15324.
15. Zharkov D.O., Rosenquist T.A., Gerchman S.E., Grollman A. P. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 37. P. 28607–28617.
16. Bruner S.D., Norman D.P.G., Verdine G.L. // Nature. 2000. V. 403. № 6772. P. 859–866.
17. Fromme J.C., Verdine G.L. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 51. P. 51543–51548.
18. Lavrukhin O.V., Lloyd R.S. // Biochemistry. 2000. V. 39. № 49. P. 15266–15271.

ABERRANT REPAIR OF 8-OXOGUANINE IN SHORT DNA BULGES

D. A. Eroshenko^{a, b}, E. A. Diatlova^a, V. M. Golyshev^a, A. V. Endutkin^a,
Corresponding Member of the RAS D. O. Zharkov^{a, b, #}

^aInstitute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

^bNovosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

[#]E-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru

The presence of DNA damage can increase the likelihood of DNA replication errors and promote mutations. In particular, pauses of DNA polymerase at the site of damage can lead to polymerase slippage and the formation of 1–2 nucleotide bulges. Repair of such structures using an undamaged DNA template leads to small deletions. One of the most abundant oxidative DNA lesions, 8-oxoguanine (oxoG), has been shown to induce small deletions but the mechanism of this phenomenon is currently unknown. We have studied the aberrant repair of oxoG, located in one- and two-nucleotide bulges, by the *Escherichia coli* and human base excision repair systems. Our results indicate that the repair in such substrates can serve as a mechanism for fixing small deletions in bacteria but not in humans.

Keywords: DNA damage, mutagenesis, DNA repair, DNA glycosylases, 8-oxoguanine, Fpg, OGG1.