

**АКТИВНОСТЬ ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗ СУПЕРСЕМЕЙСТВА FPG/NEI В ИНТЕРМЕДИАТАХ
ТРАНСКРИПЦИИ**

К.А. Макашева

Научный руководитель: профессор РАН, д.б.н. Д.О. Жарков

Новосибирский государственный университет,

Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, 633090

E-mail: kristmak6@gmail.com

**EXCISION OF DAMAGED BASES FROM TRANSCRIPTION INTERMEDIATES BY FPG/NEI
SUPERFAMILY DNA GLYCOSYLASES**

K.A. Makasheva

Scientific Supervisor: Prof. RAS, Dr. D.O. Zharkov

Novosibirsk State University, Russia, Novosibirsk, Pirogov str., 2, 633090

E-mail: kristmak6@gmail.com

Abstract. Oxidative lesions are abundant due to constant presence of reactive oxygen species in living cells. Repair of oxidative base lesions is initiated by DNA glycosylases. For example, bacterial Fpg and Nei DNA glycosylases excise oxidized purines and pyrimidines, respectively, from DNA. Their human homologs, NEIL1 and NEIL2, have been reported to show preference towards oxidized lesions in DNA bubbles. From these observations, it had been hypothesized that NEIL proteins may be involved in the repair of lesions in DNA bubbles generated during transcription. However, it is not presently clear how NEILs would behave on bubbles more closely resembling transcription intermediates (e. g., containing the RNA strand), and bacterial homologs Fpg and Nei had never been investigated with bubble substrates. We have studied excision of either 8-oxoguanine (8-oxoG) or 5,6-dihydrouracil (DHU) by *E. coli* Fpg and Nei and human NEIL1 and NEIL2 from single-strand oligonucleotides, perfect duplexes, bubbles with different number of unpaired bases (6 to 30), D-loops with DNA or RNA and from complexes with RNA polymerase. Fpg, NEIL1 and NEIL2 efficiently excised DHU located inside a bubble. Fpg and NEIL1 was generally more active than NEIL2 in excision of 8-oxoG from ssDNA and bubbles. Nei, on the other hand, was active only on DHU located in dsDNA (either perfect duplex or DNA/DNA D-loop). Fpg and NEIL1 also have shown activity in D-loops with RNA. The activity of Fpg was observed in pre-assembled transcriptional complexes with *E. coli* RNA polymerase and depended on the position of the lesion in the transcription bubble, possibly reflecting local accessibility of the lesion within the elongation complex.

Введение. Окислительные повреждения широко распространены в клетках эукариот, что обусловлено постоянным присутствием в них активных форм кислорода. Эксцизионная репарация оснований — система репарации, исправляющая большинство повреждений в ДНК и восстанавливающая исходную последовательность нуклеотидной цепи. (Рис. 1). ДНК-гликозилазы человека NEIL1 и NEIL2 (эукариотические гомологи белков Fpg и Nei *Escherichia coli*) проявляют повышенную активность в удалении окислительных повреждений из «глазков» — двуцепочечных участков, не стабилизированных комплементарными связями [1]. Предполагается, что это может

указывать на участие белков NEIL в репарации поврежденных оснований в транскрибируемых и реплицируемых последовательностях ДНК, но прямые доказательства такого участия отсутствуют [2].

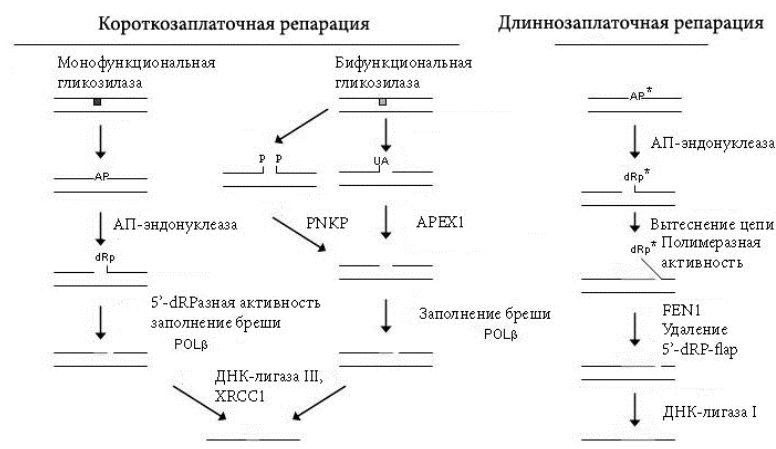


Рис. 1. Общая схема процесса эксцизионной репарации оснований у высших эукариот[3]. AP — AP-сайт, UA — α,β -ненасыщенный альдегид

Цель работы заключалась в получении транскрипционных элонгационных комплексов с РНК-полимеразой и исследовании активности ДНК-гликозилаз суперсемейства Fpg/Nei в отношении таких интермедиатов.

Материалы и методы исследования. Олигонуклеотидные субстраты содержали поврежденное основание (8-оксогуанин или 5,6-дигидроурацил) в различных положениях в «глазках» разного размера (6–30 нуклеотидов) или в D-петлях, образованных с третьей цепью ДНК или РНК. Затем были получены транскрипционные элонгационные комплексы с РНК-полимеразой II *E. coli* (Рис. 2) и исследована активность ДНК-гликозилазы Fpg *E. Coli* в отношении таких комплексов и также транскрипция в присутствии Fpg *E. Coli*.

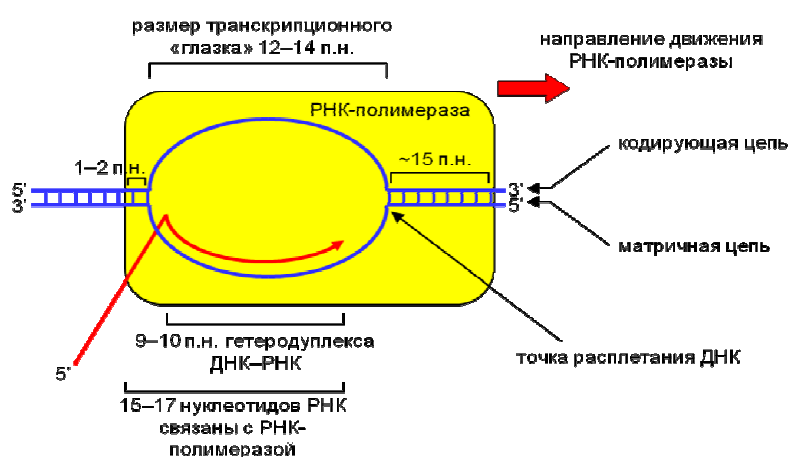


Рис. 2. Структура транскрипционного элонгационного комплекса

Для определения кинетических параметров реакции, катализируемой ферментом Fpg была исследована кинетика Михаэлиса–Ментен.

Результаты. Как NEIL1, так и NEIL2 активно удаляли повреждения из одноцепочечного участка D-петли с РНК или ДНК, причем активность NEIL1 была заметно выше активности NEIL2. Для обоих ферментов 5,6-дигидроурацил был лучшим субстратом, чем 8-оксогуанин. Было показано также влияние размера «глазка» и положения повреждения в нем на активность ферментов.

Кинетические параметры реакции, катализируемой ДНК-гликозилазой Fpg, свидетельствуют о том, что образование фермент-субстратного комплекса с двуцепочечными областями ДНК происходит более эффективно, чем с одноцепочечными, в то время как каталитическая стадия реакции для всех типов субстратов протекает с примерно одинаковой скоростью (Табл. 1).

Таблица 1

Кинетические параметры реакции расщепления различных субстратов с ohoG ферментом Fpg

S	оцДНК- охоG	дцДНК- охоG	«глазок»18- охоG	дц-Дпетля- охоG	оц-Дпетля- охоG	дцДНК- охоG*
k_{cat} , мин ⁻¹	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,12 ± 0,01	–	0,13 ± 0,01
K_M , нМ	300 ± 150	3,3 ± 0,9	170 ± 50	83 ± 17	–	8,1 ± 2,3
$k_{cat}/K_M \times 10^3$, 1/(мин×нМ)	0,37 ± 0,15	31 ± 9	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,3	1,3 ± 0,1	9,3 ± 3,9

*дц-субстраты длиной 23 п.н., значения взяты из [4].

В присутствии РНК-полимеразы II активность ДНК-гликозилазы Fpg *E. coli* снижалась вследствие стерических затруднений, вызванных экранированием субстрата РНК-полимеразами. Показано, что эксцизионная репарация ohoG в составе кодирующей цепи ферментом Fpg не подавляет процесс транскрипции.

Выводы. Полученные результаты показывают, что белки NEIL действительно могут быть задействованы в репарации повреждений в ходе транскрипции, однако для прямого определения возможности этого необходимо исследование активности этих ферментов на интермедиатах транскрипции в комплексе с РНК-полимеразой человека и получение изоформы 2с фермента NEIL2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dou H., Mitra S., Hazra T. K. (2003). Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2. *Journal of Biological Chemistry*, no. 50, pp. 49679–49684.
2. Грин И. Р., Жарков Д. О. Эукариотические гомологи эндонуклеазы VIII: новые элементы системы эксцизионной репарации оснований ДНК // *Биохимия*. – 2011. – Т. 76. – No. 1. – С. 99–114.
3. Zharkov D. O. (2008). Base excision DNA repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*, no. 10, pp. 1544–1565.
4. Tchou J., Bodepudi V., Shibutani S., Antoshechkin I., Miller J., Grollman A. P., Johnson F. (1994). Substrate specificity of Fpg protein: Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA. *Journal of Biological Chemistry*, no. 21, pp. 15318–15324.