

## РЕПАРАЦИЯ КЛАСТЕРНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ И ДНК-ПОЛИМЕРАЗА ЙОТА\*

© 2015 Е.А. Белоусова<sup>1</sup>, О.И. Лаврик<sup>1,2\*\*</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
СО РАН, 630090 Новосибирск; факс: +7(383)333-3677,  
электронная почта: lavrik@niboch.nsc.ru

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет,  
630090 Новосибирск; факс: +7(383)363-4333

Поступила в редакцию 27.11.14  
После доработки 30.01.15

Множественные повреждения ДНК в пределах одного или двух витков спирали — кластеры повреждений, являются источником двойных разрывов ДНК и представляют серьезную опасность для клетки. Репарация кластерных повреждений происходит в несколько этапов. Если кластер представлен повреждениями окислительного характера, то репарация индивидуального повреждения будет идти по механизму эксцизионной репарации оснований (BER), одна из стадий которого включает застройку образовавшейся после выщепления поврежденного основания бреши с помощью специализированной ДНК-полимеразы. В представленной работе был исследован синтез ДНК с использованием поврежденных матриц, катализируемый ДНК-полимеразой йота. В качестве модельных ДНК были использованы два типа ДНК-субстратов: частичные ДНК-дуплексы, содержащие бреши различной длины, и ДНК-дуплексы, содержащие 5-формилурацил (5-foU) и предшественник АП-сайта — урацил — в разных цепях ДНК. Впервые показано, что ДНК-полимераза йота способна катализировать синтез ДНК с использованием в качестве субстратов частичных ДНК-дуплексов, содержащих бреши различной длины. Впервые показана возможность ДНК-полимеразы йота катализировать синтез ДНК в процессе репарации кластера через систему BER при использовании как неповрежденных, так и 5-foU-содержащих матриц. Продемонстрировано, что в данном случае репликативный белок hPCNA (proliferating cell nuclear antigen) увеличивает эффективность синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой йота.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** кластерные повреждения, ДНК-полимераза йота, синтез ДНК через повреждение (TLS), эксцизионная репарация оснований, окисленные основания.

Ионизирующая радиация, УФ-излучение или окислительный стресс приводят к образованию свободных радикалов в клетке; последние взаимодействуют с гетероциклическими основаниями ДНК и продуцируют большое количество повреждений, локализованных в пределах одного или двух витков спирали ДНК, т.е. кластер [1]. Подобные кластеры могут состоять из нескольких различных типов повреждений, механизм репарации которых зависит от их структуры. В частности, повреждения, вызванные действием алкилирующих агентов или активных форм кислорода, в клетках млекопитающих репарируются с помощью системы эксцизионной репарации оснований, BER [2]. Этот процесс начинается с расщепления N-C-гликозидной связи между поврежденным

основанием и сахарофосфатным остовом специфической ДНК-гликозилазой и последующего расщепления цепи ДНК с помощью эндонуклеазной активности АП-эндонуклеазы [3]. Затем 5'-концевой остаток сахара (dRp-фрагмент) выщепляется с помощью лиазной активности и образовавшаяся брешь застраивается ДНК-полимеразой; полученный одноцепочечный разрыв сшивается с помощью ДНК-лигазы. Следует отметить, что в случае BER при репарации кластерного повреждения ДНК-полимераза вынуждена вести синтез ДНК по поврежденной матрице. В клетках млекопитающих основным ДНК-синтезирующим ферментом BER является ДНК-полимераза бета. Она обладает невысокой точностью синтеза и имеет dRp-лиазную активность [4]. В то же время этот фермент способен катализировать синтез ДНК с использованием поврежденных матриц [5, 6]. В последние несколько лет было открыто большое количество новых ДНК-полимераз, функционирующих в клетках человека, в том числе

\* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM 15-323, 12.04.2015.

\*\* Адресат для корреспонденции.

и ДНК-полимераза йота [7]. Клеточная функция этого фермента еще не установлена окончательно, однако понятно, что он обладает ДНК-полимеразной и dRp-лиазной активностями, что позволяет его рассматривать в качестве претендента на роль ДНК-полимеразы в процессе BER [8]. ДНК-полимераза йота относится к структурному семейству Y, члены которого задействованы в процессе синтеза ДНК через повреждение [9]. Кроме того, ДНК-полимераза йота демонстрирует достаточно низкую точность синтеза при копировании неповрежденных матриц, однако этот фермент способен к формированию пар оснований с использованием неканонических взаимодействий, что существенно повышает точность синтеза через повреждение. Этот факт, несомненно, дает основание предполагать возможность участия ДНК-полимеразы йота в таком сложном процессе, как репарация кластерных повреждений ДНК.

В представленной работе была исследована способность ДНК-полимеразы йота катализировать синтез ДНК в процессе эксцизионной репарации, в том числе с использованием поврежденной матрицы. В качестве модельных структур были использованы две группы ДНК-субстратов. Первую группу составляли частичные ДНК-дуплексы, содержащие бреши различной длины – 1, 2 и 5 нуклеотидных звеньев с 3'-гидроксильной и 5'-фосфатной группами на концах. Вторая группа ДНК-субстратов представляла собой двуцепочечные ДНК-дуплексы с 5-формилурацилом и предшественником АП-сайта – урацилом в противоположных цепях ДНК со смещением на одно нуклеотидное звено. АП-сайт получали с помощью фермента урацил-ДНК-гликозилазы, специфически расщепляющего гликозидную связь дезоксиуридина в составе ДНК. Дальнейшую репарацию ДНК-субстрата проводили с использованием белков системы BER. В качестве основного был использован кинетический подход, то есть определение величин  $K_m$ ,  $V_{max}$  и  $k_{cat}$ . Сравнение величин кинетических параметров, полученных при изучении репарации одиночного (АП-сайт) и кластерного (5-foU/АП-сайт) повреждений в присутствии или в отсутствие дополнительных белковых факторов, позволяет оценить эффективность процесса репарации кластера определенного состава. Кроме того, знание кинетических характеристик позволяет судить о специфичности конкретной реакции относительно типа повреждения в составе кластера, а также о возможности участия исследуемого фермента и/или белкового фактора в процессе репарации кластера.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы следующие материалы и реактивы: бычий сывороточный альбумин, БСА («New England Biolabs», Великобритания), T4-полинуклеотидкиназа (5000 е.а./мл) («Биосан», Россия),  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  с удельной активностью 5000 Ки/ммоль (ЛБТ ИХБФМ СО РАН), dNTP («Promega», США), немодифицированные и урацил-содержащие олигонуклеотиды («GenSet», Швейцария), реактивы для электрофореза и основные компоненты буферов («Sigma», США). Остальные использованные реактивы и компоненты буферов отечественного производства имели квалификацию ос.ч. и ч.д.а.

Формильную группу тимина генерировали, как описано в [5].

hPCNA дикого типа (proliferating cell nuclear antigen) был выделен и любезно предоставлен И.О. Петрусевой (ЛБХФ ИХБФМ СО РАН). Урацил-ДНК-гликозилаза, UNG, *E. coli* и апуриновая/апириимидиновая эндонуклеаза 1 человека, APE1, были выделены и любезно предоставлены С.Н. Ходыревой (ЛБХФ ИХБФМ СО РАН).

Рекомбинантная ДНК-полимераза йота человека была выделена из суперпродукта клеток *E. coli* штамма RW644, трансформированного плазмидной ДНК pCT14, согласно методике, описанной в [10]. Плазмидная ДНК была любезно предоставлена Р. Вудгейтом и Е. Франк (Национальный институт здоровья, Роквилл, США). На С-конце рекомбинантная ДНК-полимераза йота содержала гистидиновый тракт, облегчающий очистку целевого белка из клеточного экстракта с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Дальнейшую очистку проводили с использованием гидроксипатита и катионообменной смолы. После диализа целевых фракций выход целевого белка составил 1,15 мг, выделенных из 3 л культуры *E. coli*.

**Получение 5'- $^{32}\text{P}$  радиоактивно меченых олигонуклеотидов.** Введение радиоактивной метки в 5'-конец олигонуклеотида проводили с помощью T4-полинуклеотидкиназы как описано в [11]. Реакционная смесь (10 мкл) содержала 0,5 мкМ олигонуклеотид, 5 МБк  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , 5 е.а. T4-полинуклеотидкиназы. Реакцию проводили при 37° 30 мин, затем в реакционную смесь добавляли АТФ до конечной концентрации 1 мМ и оставляли при 4° в течение ночи. Нуклеотидный материал выделяли из соответствующего участка геля, локализованного радиоавтографией, электроэлюцией на бумагу DE-81. Электродным буфером служил 50 мМ Tris-боратный буфер, pH 8,3. Продукт элюировали с DE-81

5 порциями по 20 мкл горячего раствора 3 M LiClO<sub>4</sub>. К элюату добавляли 1,2 мл охлажденного до 4° ацетона, смесь выдерживали при -40° в течение 1 ч. Выпавший осадок собирали центрифугированием при максимальных оборотах, промывали два раза по 1 мл охлажденного до 4° ацетона, сушили на воздухе, затем растворяли до необходимой концентрации в воде. Полученные радиоактивно меченые олигонуклеотиды использовали для получения двуцепочечных ДНК-субстратов смешиванием растворов нескольких олигонуклеотидов в молярном соотношении 1 : 1, прогреванием смеси при 97° в течение 5 мин и последующим постепенным ступенчатым охлаждением до комнатной температуры.

**АП-сайт** получали непосредственно перед использованием ДНК-субстратов с помощью урацил-ДНК-гликозилазы. Реакционные смеси, содержащие в 10 мкл воды 1 пмоль двуцепочечного 5'-[<sup>32</sup>P]радиоактивно меченого урацил-содержащего ДНК-субстрата и 0,1 е.а. UDG, инкубировали при 37° в течение 30 мин и использовали для дальнейших исследований. Полное высечение урацила подтверждали с помощью гель-электрофореза (указано на рисунках). Все последующие реакции проводили в присутствии 0,15 мМ MgCl<sub>2</sub> или MnCl<sub>2</sub>, а также стандартных компонентов буфера ТДБ: 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 мМ ДТТ, 0,25 мг/мл БСА.

**Синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой йота**, проводили следующим образом. Сначала, если это было необходимо, 5'-[<sup>32</sup>P]радиоактивно меченые двуцепочечные ДНК-субстраты обрабатывали UDG, как описано выше. После этого к реакционным смесям добавляли ТДБ-буфер, MgCl<sub>2</sub> или MnCl<sub>2</sub> и APE1 до конечной концентрации 0,15 мМ и 0,001 мМ, соответственно, и инкубировали при 37° в течение 5 мин для полного расщепления АП-сайт-содержащей цепи ДНК, что подтверждали с помощью гель-электрофореза (указано на рисунках). Синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой йота, проводили в реакционной смеси объемом 10 мкл, содержащей 0,01 мМ ДНК-полимеразу йота, подготовленный 0,01 мМ 5'-[<sup>32</sup>P]меченый ДНК-субстрат, 50 мМ dNTP или их смесь, 0,15 мМ MgCl<sub>2</sub> или MnCl<sub>2</sub> в ТДБ-буфере. Смеси инкубировали в течение 20 мин при 37°. Реакцию останавливали охлаждением проб во льду. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 20%-ном ПААГ в денатурирующих условиях согласно [12] и визуализировали радиоавтографией с помощью «Molecular Imager FX» («BioRad», США). Для сбора и анализа данных использовали программу «Quantity One» («BioRad», США).

**Определение констант Михаэлиса и скоростей реакции синтеза ДНК** для dNTP на различных ДНК-субстратах проводили в два этапа. На первом этапе изучали кинетическую зависимость встраивания dNMP в соответствующие ДНК-субстраты ДНК-полимеразой йота. Реакцию проводили в 80 мкл реакционной смеси, содержащей подготовленный 0,01 мМ 5'-[<sup>32</sup>P]меченый ДНК-субстрат, 0,01 мМ ДНК-полимеразу йота, 50 мМ dNTP, 0,15 мМ MgCl<sub>2</sub> или MnCl<sub>2</sub> в ТДБ-буфере. Реакцию проводили при 37°. Аликвоты по 10 мкл отбирали через определенные интервалы времени (0, 1', 3', 5', 10', 15', 20', 40'). Реакцию останавливали охлаждением проб во льду. Продукты реакции разделяли, как описано выше. Данные обрабатывали в программе «OriginPro7.5» («Microcal Software», США). На втором этапе для определения значений констант Михаэлиса и скоростей реакции синтеза, катализируемого ДНК-полимеразой йота, варьировали концентрации dNTP при фиксированном значении времени проведения реакции, выбранном, исходя из результатов первого этапа экспериментов. Диапазон концентраций dNTP составлял 0,005/200 мМ. Концентрации остальных компонентов реакционных смесей оставались неизменными. Продукты реакции анализировали, как описано выше. Данные обрабатывали с использованием кинетической схемы Михаэлиса—Ментен. Все эксперименты повторяли не менее трех раз.

**Влияние hPCNA на реакцию синтеза ДНК, катализируемую ДНК-полимеразой йота**, изучали следующим образом. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали подготовленный 0,01 мМ 5'-[<sup>32</sup>P]меченый ДНК-субстрат 0,01 мМ ДНК-полимеразу йота, различные концентрации dNTP, 0,15 мМ MgCl<sub>2</sub> или MnCl<sub>2</sub> и hPCNA в конечной концентрации 0, 50 или 100 нг в ТДБ-буфере. Реакцию проводили при 37° 20 мин, останавливали охлаждением проб во льду. Продукты реакции анализировали как описано выше.

**Связывание ДНК-полимеразы йота с ДНК-субстратами** оценивали методом задержки в геле. Для этого реакционные смеси объемом 10 мкл, содержащие подготовленный 0,01 мМ 5'-[<sup>32</sup>P]меченый ДНК-субстрат, 0,15 мМ MgCl<sub>2</sub> в ТДБ-буфере и 0,001 мМ ÷ 2 мМ ДНК-полимеразу йота, инкубировали при 37° 5 мин, после чего добавляли буфер нанесения (4%-ный глицерин и 0,005%-ный бромфеноловый синий) и наносили на гель при напряжении 10–12 в/см. Продукты реакции комплексообразования разделяли в 8%-ном ПААГ (AA : БисAA = 30 : 1) в 1×ТВЕ при 4° и напряжении 10–12 в/см до миграции красителя на половину пути. Гели сушили и визуализировали радиоавтографией с помощью «Mole-

cular Imager FX» («BioRad», США). Для сбора и анализа данных использовали программу «Quantity One» («BioRad», США). Оценку величин констант диссоциации  $K_d$  проводили в программе Microcal Origin 7.5 («Microcal Software», США) с использованием гиперболического уравнения  $y = A \cdot x / (K_d + x)$ , где в качестве переменных использовали концентрации ДНК-полимеразы ( $x$ ) и белок-нуклеинового комплекса ( $y$ ); последнюю определяли как процент радиоактивного комплекса ДНК-белок по отношению к общей радиоактивности в дорожке;  $A$  – максимальная концентрация белок-нуклеинового комплекса, образующегося в ходе реакции.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Азотистые основания нуклеиновых кислот подвергаются химической модификации под воздействием различных факторов окружающей среды или организма. Существование свободных радикалов в клетке приводит к появлению большого количества повреждений геномной ДНК, локализованных в пределах одного-двух витков спирали, т.е. к появлению кластера повреждений [1]. Подобные кластеры могут содержать два или более различных типов повреждений, механизм репарации которых зависит от природы последних. К наиболее распространенным повреждениям геномной ДНК можно отнести АП- сайты и 5-foU [13, 14]. Оба эти повреждения представляют существенную опасность для клетки, поскольку репликативные ДНК-полимеразы способны встраивать любой из четырех dNMP напротив 5-foU, а АП-сайт и вовсе не имеет кодирующего основания. Дополнительную опасность для клетки представляет кластер, содержащий одновременно 5-foU и АП-сайт в качестве индивидуальных повреждений. В общем случае оба эти повреждения репарируются системой BER [15, 16].

Репарация кластерных повреждений – комплексный процесс, приводящий к восстановлению исходной целостности ДНК последовательно, в несколько этапов. Согласно современным представлениям, если в составе двуцепочечного кластерного повреждения присутствует АП-сайт, то в первую очередь будет репарироваться именно он [17]. Подобная стратегия помогает клетке избежать появления двуцепочечных разрывов – наиболее токсичной формы повреждений. Если кластер представлен повреждениями окислительного характера, то репарация индивидуального повреждения будет идти по механизму BER, одна из стадий которого включает застройку образовавшейся после вы-

щепления поврежденного основания бреши. В данном случае ДНК-полимеразе придется использовать поврежденную матрицу, т.е. вести синтез ДНК через повреждение. В клетках млекопитающих эта роль отводится белкам структурного семейства  $\gamma$ , к которым относят ДНК-полимеразу йота [18]. На сегодняшний день роль ДНК-полимеразы йота в клетках высших эукариот пока не ясна. Высказываются предположения о роли этого белка в процессе TLS при репликации поврежденной ДНК и о возможном участии фермента в процессе созревания иммуноглобулиновых генов [19, 20]. Кроме того, ДНК-полимераза йота обладает необходимыми биохимическими свойствами и потенциально способна принимать участие в процессе BER – фермент проявляет ДНК-полимеризующую и dRp-лиазную активность [8].

Учитывая приведенные выше факты, в данной работе в первую очередь была исследована способность этого фермента катализировать синтез ДНК с использованием ДНК-субстратов, содержащих бреши различной длины. В этом случае в качестве модельных были выбраны частичные ДНК-дуплексы с брешиами в 1, 2 и 5 нуклеотидных звеньев, в которых в +1-м положении матричной цепи по отношению к 3'-концу праймера располагался тимидин (табл. 1).

Одной из особенностей ДНК-полимеразы йота как фермента нуклеинового обмена является строгое предпочтение ионов  $Mn^{2+}$  в качестве кофактора в экспериментах *in vitro* [21]. Кроме того, Вудгейт и Франк показали, что: 1) высокие концентрации ионов  $Mg^{2+}$  (>0,5 мМ) или  $Mn^{2+}$  (>0,2 мМ) приводят к существенному снижению активности фермента; 2) способность ДНК-полимеразы йота проходить повреждения матричной цепи в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  или  $Mn^{2+}$  отличается [21]. В рамках представленной работы реакцию проводили в присутствии 0,15 мМ концентрации ионов  $Mg^{2+}$  или  $Mn^{2+}$ . Впервые было показано, что ДНК-полимераза йота способна катализировать встраивание dNMP в частичные ДНК-дуплексы, содержащие бреши различной длины (рис. 1). Несмотря на встраивание корректного нуклеотида dAMP, комплементарного матричному Т, специфичность синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой йота, оказалась крайне низкой, что соответствует общим представлениям о биохимических свойствах фермента [22]. Независимо от размера бреши, ДНК-полимераза йота способна катализировать синтез ДНК в присутствии любого из четырех dNMP.

Одним из основных продуктов окисления метильной группы тимина под действием ионизирующего и UVA-излучения является 5-формил-

Таблица 1. ДНК-субстраты, использованные в работе

Название	Последовательности	Длина праймера <sup>a</sup>
gap1	5'-GGCTTCATCGTTGTC $\underline{\text{X}}$ CAGACCTGGTGGATACCG 3'-CCGAAGTAGCAACAG <sub>p</sub> GTCTGGACCACCTATGGC*	
gap2	5'-GGCTTCATCGTTGTC $\underline{\text{X}}$ CAGACCTGGTGGATACCG 3'-CCGAAGTAGCAACA <sub>p</sub> GTCTGGACCACCTATGGC*	
gap5	5'-GGCTTCATCGTTGTC $\underline{\text{X}}$ CAGACCTGGTGGATACCG 3'-CCGAAGTAGCA <sub>p</sub> GTCTGGACCACCTATGGC*	
5-foU/+1	5'-GACTACATTTTCATCTGGCTTGGGCTTCATCGTTGTC $\underline{\text{U}}$ CAGACCTGGTGGATACCG 3'-CTGATGTAAAGTAGACCCGAACCCGAAGTAGCAACAG A $\underline{\text{Q}}$ TCTGGACCACCTATGGC*	17 нт
5-foU/0	5'-GACTACATTTTCATCTGGCTTGGGCTTCATCGTTGTC $\underline{\text{U}}$ CAGACCTGGTGGATACCG 3'-CTGATGTAAAGTAGACCCGAACCCGAAGTAGCAACAG $\underline{\text{Q}}$ GTCTGGACCACCTATGGC*	18 нт
5-foU/-1	5'-GACTACATTTTCATCTGGCTTGGGCTTCATCGTTGTC $\underline{\text{U}}$ CAGACCTGGTGGATACCG 3'-CTGATGTAAAGTAGACCCGAACCCGAAGTAGCAACA $\underline{\text{Q}}$ A GTCTGGACCACCTATGGC*	19 нт
cTc	5'-GACTACATTTTCATCTGGCTTGGGCTTCATCGTTGTC $\underline{\text{T}}$ CAGACCTGGTGGATACCG 3'-CTGATGTAAAGTAGACCCGAACCCGAAGTAGCAACAG $\underline{\text{Q}}$ GTCTGGACCACCTATGGC*	18 нт

<sup>a</sup> Длина праймера – длина праймирующего олигонуклеотида после действия APE1,  $\underline{\text{X}}$  – тимин или 5-формилурацил,  $\underline{\text{U}}$  – 5-формилурацил,  $\underline{\text{Q}}$  – AP-сайт.

\* <sup>32</sup>P-радиоактивная метка.

урацил, 5-foU. Его присутствие в ДНК не приводит к блокированию репликации на обеих цепях, однако приводит к транзициям и трансверсиям [13]. В том случае, когда 5-foU входит в состав кластерного повреждения, требования к соответствующей репарационной ДНК-полимеразе повышаются. Такой специфической ДНК-полимеразой может быть ДНК-полимераза йота. Именно поэтому на следующем этапе была ис-

следована способность ДНК-полимеразы йота вести синтез ДНК через 5-foU, входящий в состав частичных дуплексов ДНК с брешиами различной длины (рис. 2). Оказалось, что в данном случае фермент также не проявляет четкой специфичности и катализирует встраивание всех четырех dNMP. В целом синтез ДНК через повреждение оказался менее эффективным, чем синтез ДНК при использовании нативных матриц.

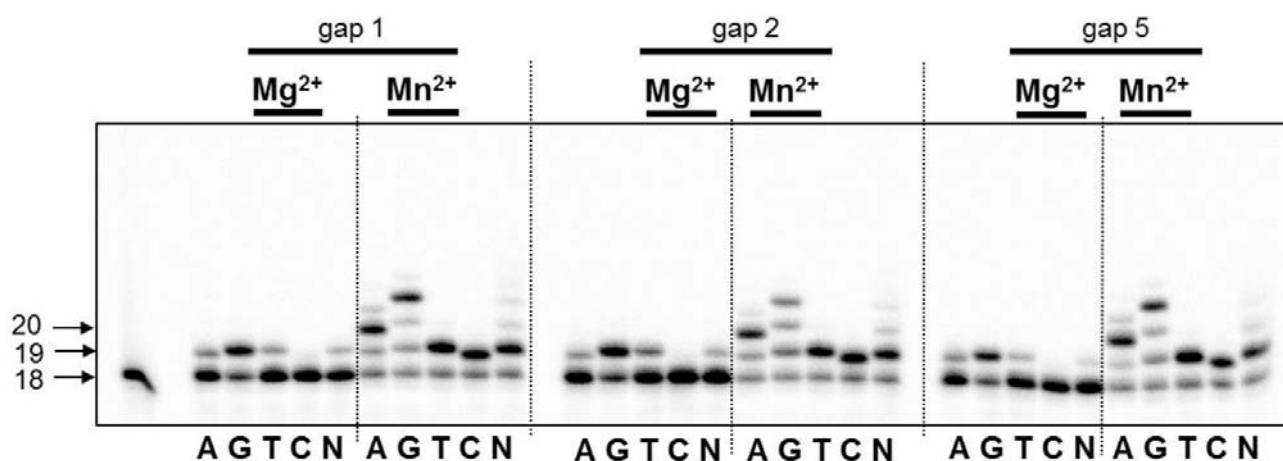
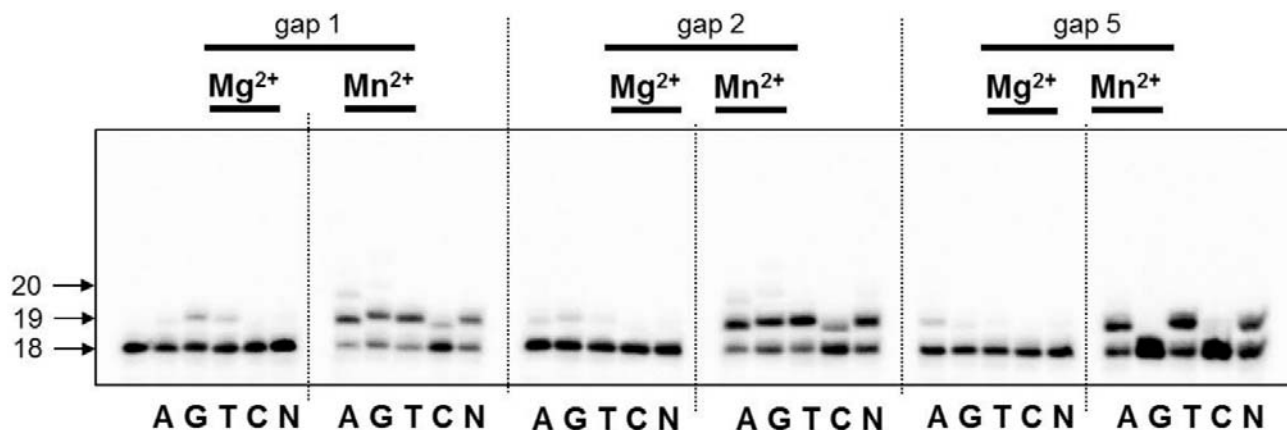


Рис. 1. Специфичность встраивания dNMP, катализируемого ДНК-полимеразой йота в присутствии ионов  $\text{Mg}^{2+}$  или  $\text{Mn}^{2+}$  с использованием ДНК-субстратов, содержащих бреши в 1, 2 и 5 нуклеотидных звеньев. Слева стрелками указано положение 5'-[<sup>32</sup>P]-меченых олигонуклеотидов: 18 – исходный олигонуклеотид, 19, 20 – продукты реакции синтеза ДНК



**Рис. 2.** Специфичность встраивания dNMP, катализируемого ДНК-полимеразой йота в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  или  $Mn^{2+}$  с использованием ДНК-субстратов, содержащих 5-foU в одной цепи и бреши размером 1, 2 и 5 нуклеотидных звеньев в другой. Слева стрелками указано положение 5'- $[^{32}P]$  меченых олигонуклеотидов: 18 – исходный олигонуклеотид, 19, 20 – продукты реакции синтеза ДНК

Известно, что точность и эффективность синтеза ДНК, катализируемого различными ДНК-полимеразами, существенно повышается в присутствии дополнительных белковых факторов. К таким белкам относится ядерный антиген пролиферирующих клеток hPCNA, proliferating cell nuclear antigen. hPCNA выступает не только в роли фактора процессивности, но и отвечает за координацию ДНК-полимераз в процессе синтеза ДНК через повреждение [23, 24]. С помощью своего структурного PIP-мотива

hPCNA взаимодействует с ДНК-полимеразой йота и стимулирует процессивность синтеза ДНК, катализируемого этим ферментом, в зависимости от структуры используемой ДНК-матрицы [23]. В представленной работе эффективность встраивания корректного dAMP в ДНК в присутствии и в отсутствие hPCNA оценивали по изменению соотношения  $k_{cat}/K_m$ , где  $K_m$  – константа Михаэлиса–Ментен, определяемая экспериментально вместе с параметром  $V_{max}$  – максимальной скоростью реакции синтеза ДНК, а  $k_{cat}$  –

**Таблица 2.** Эффективность синтеза ДНК в присутствии корректного dATP, катализируемого ДНК-полимеразой йота, с использованием частичных ДНК-дуплексов с бреши различного размера,  $k_{cat}/K_m$ ,  $\mu M^{-1} \times sec^{-1}$

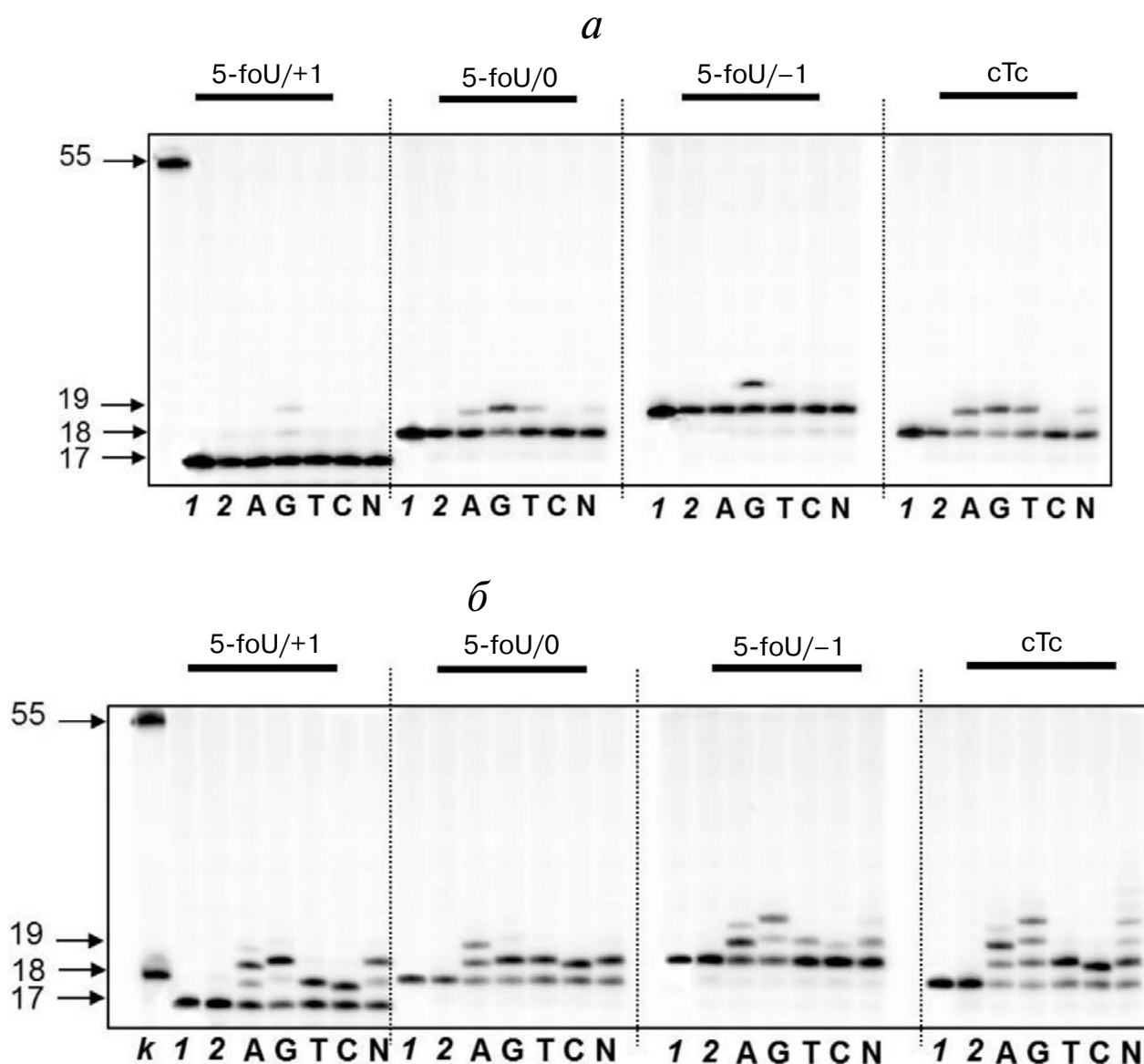
	T		5-foU	
	$Mg^{2+}$	$Mn^{2+}$	$Mg^{2+}$	$Mn^{2+}$
gap1	10,0	4,77	0,021	6,51
+ 50 нг hPCNA	7,66	3,36	0,054	12,0
+ 100 нг hPCNA	6,83	2,31	0,073	69,3
gap2	13,4	5,78	0,012	2,61
+ 50 нг hPCNA	10,0	3,74	0,018	4,28
+ 100 нг hPCNA	7,42	2,64	0,029	6,56
gap5	0,019	2,42	0,011	2,97
+ 50 нг hPCNA	0,016	2,09	0,021	7,84
+ 100 нг hPCNA	0,070	1,17	0,029	21,5

Примечание. Результаты представлены как среднее трех независимых экспериментов, стандартное отклонение не превышало 10%.

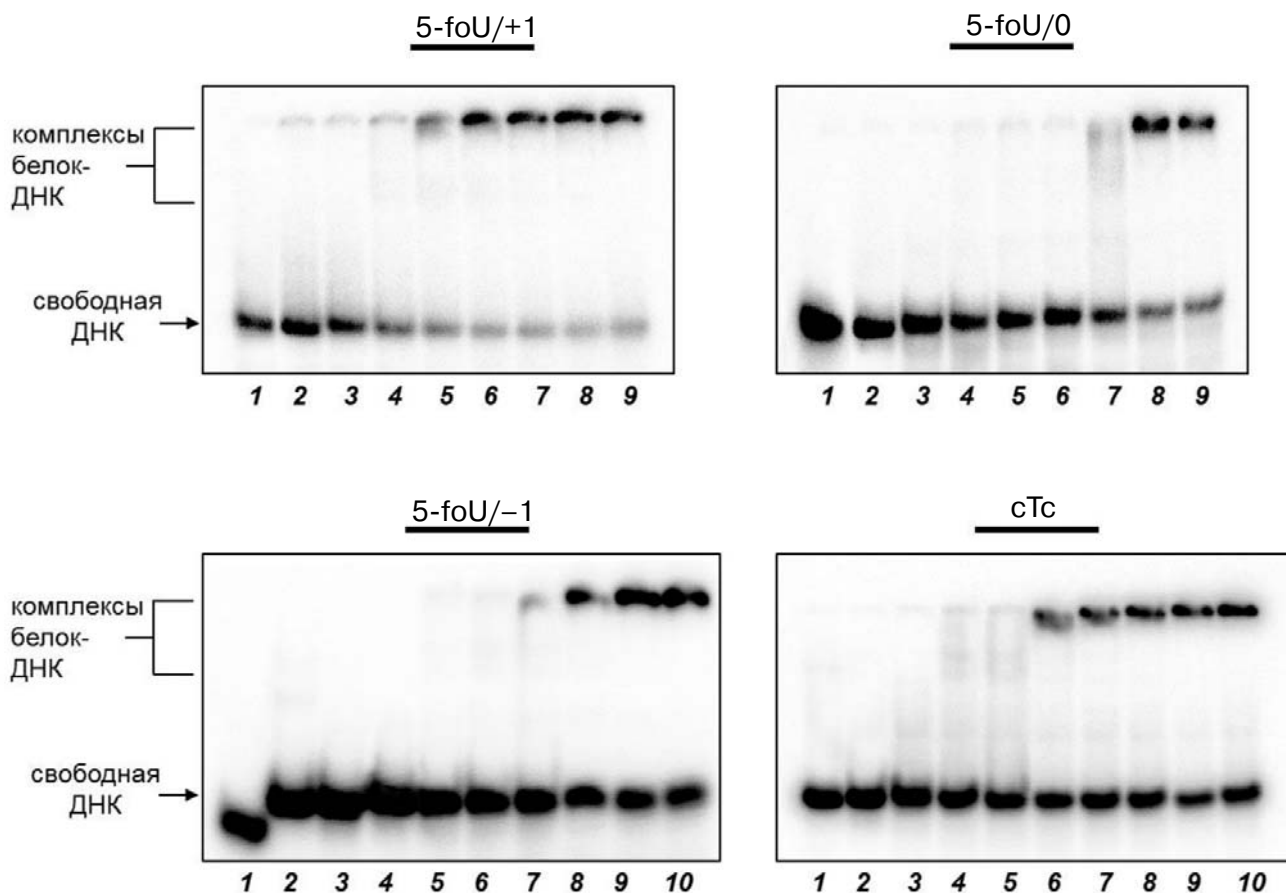
константа скорости каталитической стадии реакции синтеза ДНК, рассчитанная как  $V_{\max}/E_0$ , где  $E_0$  – концентрация ДНК-полимеразы йота в реакционной смеси (табл. 2). В результате было показано, что hPCNA уменьшает эффективность синтеза ДНК при использовании неповрежденных матриц, однако увеличивает эффективность синтеза при прохождении 5-foU ДНК-полимеразой йота. Следует отметить, что совокупный эффект hPCNA, выражаемый в положительном влиянии на эффективность синтеза

ДНК-полимеразой йота через поврежденный нуклеозид и одновременном отрицательном влиянии на эффективность синтеза с использованием нативных матриц, выше при использовании структур *gap1*, непосредственно имитирующих интермедиат процесса BER.

Как уже было отмечено выше, репарация кластерных повреждений происходит последовательно в несколько этапов. В том случае, когда кластер состоит из 5-foU и АП-сайта, репарация будет идти по механизму BER через расщеп-



**Рис. 3.** Специфичность встраивания dNMP, катализируемого ДНК-полимеразой йота в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  (а) или  $Mn^{2+}$  (б) с использованием ДНК-субстратов, содержащих 5-foU в одной цепи и АП-сайт в другой. Слева стрелками указано положение 5'- $[^{32}P]$  меченых олигонуклеотидов: 17, 18, 19 – длина праймирующего олигонуклеотида после действия APE1, 55 – длина исходного олигонуклеотида, *k* – маркерные олигонуклеотиды 18 и 55 нт, 1 – контроль реакционной смеси после действия UDG, 2 – контроль реакционной смеси после действия UDG и APE1



**Рис. 4.** Связывание ДНК-полимеразы йота с различными ДНК-субстратами. 1 – Контроль реакционной смеси после действия UDG; 2 – контроль реакционной смеси после действия UDG и APE1; 3–10 – различные концентрации ДНК-полимеразы йота

ление АП-сайта APE1 и последующего синтеза ДНК через повреждение матричной цепи, катализируемого специфической ДНК-полимеразой. В данном случае была протестирована способность ДНК-полимеразы йота принимать участие в этом процессе (рис. 3). В качестве ДНК-субстратов были использованы ДНК-дуплексы, отличающиеся взаимным расположением 5-формилурацила и АП-сайта (табл. 1).

Эффективность синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой, определяется несколькими факторами, в том числе эффективностью связывания фермента с субстратом, характеризуемой значением константы диссоциации,  $K_d$ , — чем ниже это значение, тем прочнее белок-нуклеиновый комплекс. Связывание ДНК-полимеразы йота с ДНК-дуплексами оценивали методом задержки в геле (рис. 4, табл. 3). Контрольные эксперименты проводили на ДНК-субстратах, не содержащих 5-foU. АП-сайт генерировали с помощью активности урацил-ДНК-гликозилазы. Затем АП-содержащую цепь в составе

ДНК-дуплекса расщепляли с помощью активности APE1. Полученную ДНК, содержащую одноцепочечный разрыв с 3'-ОН- и 5'-dRp-группами в одной цепи и 5-foU в другой, ис-

**Таблица 3.** Значения констант диссоциации комплексов ДНК-полимеразы йота с различными ДНК-субстратами,  $K_d$ , мкМ

	$K_d$ , мкМ
cTc	0,36
5-foU/+1	0,35
5-foU/0	0,27
5-foU/-1	0,34

Примечание. Результаты представлены как среднее трех независимых экспериментов, стандартное отклонение не превышало 10%.



**Таблица 4.** Эффективность синтеза ДНК в присутствии корректного dNTP, катализируемого ДНК-полимеразой йота, с использованием ДНК-субстратов системы BER,  $k_{cat}/K_m$ ,  $\text{мкМ}^{-1} \times \text{сек}^{-1}$ 

	cTc_dG		5-foU/+1_dG		5-foU/0_dA		5-foU/-1_dG	
	Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>
–	0,117	2,93	0,001	2,12	0,002	1,32	0,011	5,39
+ 50 нг hPCNA	0,096	2,59	0,001	1,82	0,003	1,68	0,014	6,04
+ 100 нг hPCNA	0,078	2,38	0,001	2,21	0,004	1,88	0,016	6,87

Примечание. Результаты представлены как среднее трех независимых экспериментов, стандартное отклонение не превышало 10%.

пользовали в качестве субстрата при связывании с ДНК-полимеразой йота.

Оказалось, что как наличие 5-foU, так и его положение в матричной цепи относительно 3'-гидроксильной группы не влияет на сродство ДНК-полимеразы йота к ДНК-субстрату. Следовательно, эффективность синтеза ДНК определяется непосредственно параметром  $k_{cat}/K_m$  (табл. 4). Влияние hPCNA на эффективность синтеза ДНК в присутствии корректного dNTP в ходе процесса BER также оценивали по изменению соотношения  $k_{cat}/K_m$  (табл. 4).

Как видно из приведенных данных, ДНК-полимераза йота отличается достаточно низкой эффективностью синтеза при встраивании корректного dNMP непосредственно напротив 5-foU (5-foU/0) или в том случае, когда 5-foU смещен в 5'-сторону относительно 3'-конца праймера (5-foU/+1). Однако смещение повреждения в 3'-сторону (5-foU/-1) приводит к резкому увеличению значения параметра  $k_{cat}/K_m$ . hPCNA увеличивает эффективность синтеза ДНК вне зависимости от положения 5-foU группы в матричной цепи.

Таким образом, в данной работе впервые было показано, что ДНК-полимераза йота способна катализировать синтез ДНК с использовани-

ем в качестве субстратов частичных ДНК-дуплексов, содержащих бреши различного размера. Кроме того, была исследована способность ДНК-полимеразы йота принимать участие в процессе BER при репарации АП-сайта как в виде индивидуального повреждения, так и в составе кластера с 5-foU. Впервые показано, что ДНК-полимераза йота катализирует встраивание корректного dNMP в процессе репарации кластера через систему BER при использовании 5-foU-содержащих матриц. Кроме того, показано, что hPCNA увеличивает эффективность синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой йота. Более того, максимальную эффективность фермент проявлял при синтезе ДНК с использованием ДНК-структур, в которых 5-foU смещен в праймерную область, т.е. образует проблемный для ряда ДНК-полимераз 3'-конец. Эти данные, с одной стороны, косвенно свидетельствуют о возможном участии ДНК-полимеразы йота в процессе TLS при репликации поврежденной ДНК, а с другой, открывают новое для этого белка ампула – участника процесса репарации кластера повреждений ДНК.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 14-24-00038) и РФФИ (грант 14-04-00268).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eccles, L.J., O'Neill P., and Lomax, M.E. (2011) Delayed repair of radiation induced clustered DNA damage: friend or foe? *Mutat. Res.*, **711**, 134–141.
2. Parikh, S.S., Mol, C.D., and Tainer, J.A. (1997) Base excision repair enzyme family portrait: integrating the structure and chemistry of an entire DNA repair pathway, *Structure*, **5**, 1543–1550.
3. Barzilay, G., and Hickson, I.D. (1995) Structure and function of apurinic/apyrimidinic endonucleases, *Bioessays*, **17**, 713–719.
4. Srivastava, D.K., Berg, B.J., Prasad, R., Molina, J.T., Beard, W.A., Tomkinson, A.E., and Wilson, S.H. (1998) Mammalian a basic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps, *J. Biol. Chem.*, **273**, 21203–21209.
5. Belousova, E.A., Vasil'eva, I.A., Moor, N.A., Zatsepin, T.S., Oretskaya, T.S., and Lavrik, O.I. (2013) Clustered DNA lesions containing 5-formyluracil and AP site: repair via the BER system, *PLoS One*, **8**, e68576.
6. Belousova, E.A., and Lavrik, O.I. (2010) DNA polymerases beta and lambda, and their roles in the DNA replication and repair, *Mol. Biol. (Moscow)*, **44**, 947–965.
7. Burgers, P.M., Koonin, E.V., Bruford, E., Blanco, L., Burtis, K.C., Christman, M.F., Copeland, W.C., Friedberg, E.C.,

- Hanaoka, F., Hinkle, D.C., Lawrence, C.W., Nakanishi, M., Ohmori, H., Prakash, L., Prakash, S., Reynaud, C.A., Sugino, A., Todo, T., Wang, Z., Weill, J.C., and Woodgate, R. (2001) Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature, *J. Biol. Chem.*, **276**, 43487–43490.
8. Vidal, A.E., and Woodgate, R. (2009) Insights into the cellular role of enigmatic DNA polymerase, *DNA Repair*, **8**, 420–423.
  9. Ohmori, H., Friedberg, E.C., Fuchs, R.P., Goodman, M.F., Hanaoka, F., Hinkle, D., Kunkel, T.A., Lawrence, C.W., Livneh, Z., Nohmi, T., Prakash, L., Prakash, S., Todo, T., Walker, G.C., Wang, Z., and Woodgate, R. (2001) The Y-family of DNA polymerases, *Mol. Cell*, **8**, 7–8.
  10. Frank, E.G., McDonald, J.P., Karata, K., Huston, D., and Woodgate, R. (2012) A strategy for the expression of recombinant proteins traditionally hard to purify, *Anal. Biochem.*, **429**, 132–139.
  11. Ямщиков В.Ф. (1990) В кн. *Методы молекулярной генетики и геной инженерии* (под ред. Салганика Р.И.), Наука, Новосибирск, с. 28.
  12. Ямщиков В.Ф. (1990) В кн. *Методы молекулярной генетики и геной инженерии* (под ред. Салганика Р.И.), Наука, Новосибирск, с. 145–154.
  13. Bjelland, S., Anensen, H., Knaevelsrud, I., and Seeberg, E. (2001) Cellular effects of 5-formyluracil in DNA, *Mutat. Res.*, **486**, 147–154.
  14. Lindahl, T., and Nyberg, B. (1972) Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid, *Biochemistry*, **11**, 3610–3618.
  15. Barnes, D.E., Lindahl, T., and Sedgwick, B. (1993) DNA repair, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **5**, 424–433.
  16. Matsubara, M., Masaoka, A., Tanaka, T., Miyano, T., Kato, N., Terato, H., Ohyama, Y., Iwai, S., and Ide, H. (2003) Mammalian 5-formyluracil-DNA glycosylase. 1. Identification and characterization of a novel activity that releases 5-formyluracil from DNA, *Biochemistry*, **42**, 4993–5002.
  17. Georgakilas, A.G., O'Neill, P., and Stewart, R.D. (2013) Induction and repair of clustered DNA lesions: what do we know so far? *Radiat. Res.*, **180**, 100–109.
  18. Zhang, Y., Yuan, F., Wu, X., and Wang, Z. (2000) Preferential incorporation of G opposite template T by the low-fidelity human DNA polymerase iota, *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 7099–7108.
  19. Stallons, L.J., and McGregor, W.G. (2010) Translesion synthesis polymerases in the prevention and promotion of carcinogenesis, *J. Nucleic Acids*, DOI: 10.4061/2010/643857.
  20. Faily, A., Aoufouchi, S., Flatter, E., Guenger, Q., Reynaud, C.A., and Weill, J.C. (2013) Induction of somatic hypermutation in immunoglobulin genes is dependent on DNA polymerase iota, *Nature*, **419**, 944–947.
  21. Frank, E.G., and Woodgate, R. (2007) Increased catalytic activity and altered fidelity of human DNA polymerase iota in the presence of manganese, *J. Biol. Chem.*, **282**, 24689–24696.
  22. Makarova, A.V., and Kulbachinskiy, A.V. (2012) Structure of Human DNA Polymerase iota and the mechanism of DNA synthesis, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 547–561.
  23. Vidal, A.E., Kannouche, P., Podust, V.N., Yang, W., Lehmann, A.R., and Woodgate, R. (2004) Proliferating cell nuclear antigen-dependent coordination of the biological functions of human DNA polymerase iota, *J. Biol. Chem.*, **279**, 48360–48368.
  24. Bienko, M., Green, C.M., Crosetto, N., Rudolf, F., Zapart, G., Coull, B., Kannouche, P., Wider, G., Peter, M., Lehmann, A.R., Hofmann, K., and Dikic, I. (2005) Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis, *Science*, **310**, 1821–1824.

## REPAIR OF CLUSTERED DNA LESIONS AND DNA POLYMERASE IOTA

E. A. Belousova<sup>1</sup>, O. I. Lavrik<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,  
Siberian Branch, Russian Academy of Science, prosp. Lavrentieva 8,  
Novosibirsk 630090, Russia; fax: +7(383)333-3677,  
E-mail: lavrik@niboch.nsc.ru*

<sup>2</sup> *Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk 630090,  
Russia; fax: +7(383)363-4333*

Received November 27, 2014  
Revision received January 30, 2015

Multiple damaged sites within one or two helical turns – clustered damage – could be a source of double-strand breaks and appears to be a serious risk for cell survival. Repair of clustered damage is a staged process. If the cluster is formed by oxidative lesions, repair could be realized using the base excision repair process, BER, which includes gap filling by the special DNA polymerase after removal of the damaged base. Here we studied DNA synthesis catalyzed by DNA polymerase iota using damaged templates. Two types of DNA substrates were used: partial DNA duplexes containing gaps of various sizes, and DNA duplexes with 5-formyluridine, 5-foU, and AP-site precursor – uridine in different strands. It was first shown that DNA polymerase iota is able to catalyze DNA synthesis using gapped DNA substrates. The capability of DNA polymerase iota to carry out DNA synthesis during cluster repair via BER using 5-foU-containing and undamaged templates was demonstrated for the first time. In this case, hPCNA enhanced the efficacy of DNA synthesis catalyzed by DNA polymerase iota.

**Key words:** clustered lesions, DNA polymerase iota, translesion synthesis (TLS), base excision repair, oxidized bases