

УДК 577.15: 541.128

# Поиск поврежденных участков ДНК метил-CpG-связывающим ферментом MBD4

Д. А. Яковлев<sup>1</sup>, А. А. Кузнецова<sup>1</sup>, О. С. Федорова<sup>1,2\*</sup>, Н. А. Кузнецов<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

\*E-mail: fedorova@niboch.nsc.ru, nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 12.05.2016

Принята к печати 04.07.2016

**РЕФЕРАТ** Метил-CpG-связывающий фермент MBD4 инициирует процесс деметилирования ДНК, удаляя модифицированное азотистое основание и формируя апуриновые/апиримидиновые сайты в ДНК. MBD4 содержит два домена – метилцитозинсвязывающий, обеспечивающий локализацию фермента в CpG-доменах ДНК, и ДНК-гликозилазный, отвечающий за каталитическую активность. Изучены механизмы специфического узнавания сайтов деметилирования и образования каталитически активного комплекса между модельными ДНК-субстратами и каталитическим N-гликозилазным доменом MBD4<sup>cat</sup>. Методом остановленной струи в режиме реального времени по изменению интенсивности флуоресценции остатков триптофана в MBD4<sup>cat</sup> и флуорофоров в ДНК зарегистрированы конформационные переходы в белке и ДНК-субстратах в процессе их взаимодействия, установлен кинетический механизм и рассчитаны константы скорости образования и распада интермедиатов реакции. Используя дуплексы разной длины, показали, что образованию каталитически активного комплекса MBD4<sup>cat</sup> предшествует стадия первичного связывания с ДНК, на которой происходят поиск и узнавание модифицированного основания. Установлена природа взаимных конформационных перестроек в процессе взаимодействия ДНК-гликозилазы MBD4<sup>cat</sup> с ДНК, содержащей модифицированные нуклеотиды.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** MBD4, деметилирование ДНК, конформационная динамика, предстационарная кинетика, репарация ДНК.

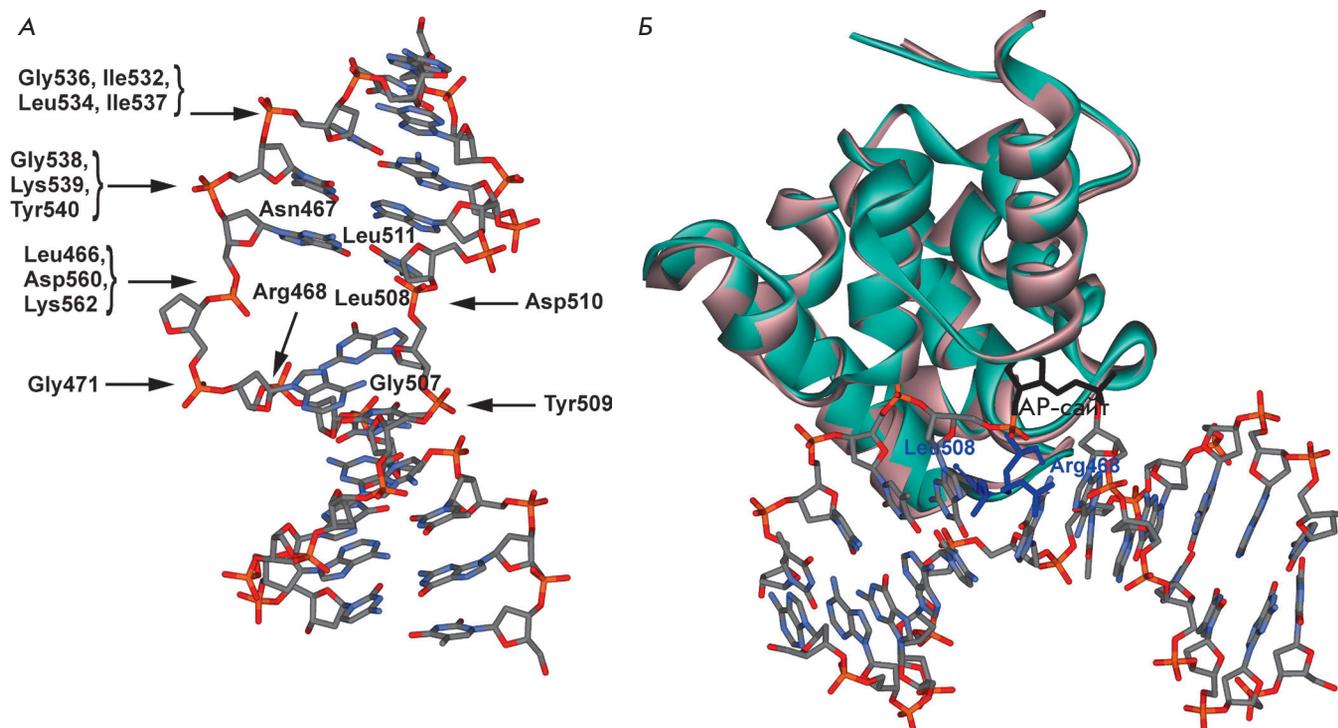
**СОКРАЩЕНИЯ** MBD4<sup>cat</sup> – каталитический домен MBD4 человека (метилцитозинсвязывающий домен 4); 5-hmU – 5-гидроксиметилурацил; AP – апуриновый/апиримидиновый сайт; F – (2R,3S)-2-(оксиметил)-3-окситетрагидрофуран; aPu – 2-аминопурин; FAM – 6-карбоксихлорофлуоресцеин; BHQ1 – тушитель флуоресценции black hole quencher; FRET – резонансный перенос энергии флуоресценции; ПААГ – полиакриламидный гель.

## ВВЕДЕНИЕ

Процессы метилирования и деметилирования ДНК лежат в основе эпигенетической регуляции экспрессии генов, которая играет большую роль в клеточной дифференцировке, геномном импринтинге, канцерогенезе, а также во многих возрастных изменениях организмов. Известно, что в процессе деметилирования ДНК участвуют различные ферментативные системы: ДНК-метилтрансферазы, диоксигеназы и ДНК-гликозилазы [1, 2]. ДНК-гликозилазы инициируют процесс деметилирования путем удаления метилированного основания ДНК, поэтому для восстановления исходного нуклеотида необходимы

и другие ферменты, такие, как AP-эндонуклеазы (APE1), ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы [3–5].

ДНК-гликозилаза MBD4 [КФ 3.2.2.-] содержит два домена – метилцитозинсвязывающий и ДНК-гликозилазный. Каталитический N-гликозилазный домен MBD4<sup>cat</sup> состоит из 138 аминокислотных остатков (остатки 437–574), образующих девять  $\alpha$ -спиралей, которые формируют глобулярную структуру и карман активного центра [6]. Структура MBD4<sup>cat</sup> позволяет отнести его к семейству «спираль-шпилька-спираль» (HhH), названному так из-за мотива  $\alpha$ 7-петля- $\alpha$ 8, характерному для различных белков этого семейства.



**Рис. 1.** Схематическое изображение пространственной структуры комплекса MBD4<sup>cat</sup> с ДНК. А – функционально важные аминокислотные остатки, участвующие в образовании специфических контактов между ферментом и ДНК [12]. Б – сравнение структуры свободного фермента MBD4<sup>cat</sup> (розовый, PDB ID 4E9E, [11]) и комплекса фермента MBD4<sup>cat</sup> с ДНК (зеленый, PDB ID 4DK9, [12]). AP-сайт (черный) вывернут из дуплекса и расположен в активном центре фермента, аминокислотные остатки Arg468 и Leu508 (синий) встроены в дуплекс ДНК

Основным субстратом MBD4 является ДНК, содержащая некоплементарные пары G · T либо G · U [2]. MBD4 также активен в отношении 5-гидроксиметилурацила (5-hmU) [7]. Считается, что 5-hmU образуется в качестве интермедиата в многостадийном пути активного деметилирования, в котором 5-meC гидроксилируется ТЕТ-диоксигеназами с образованием 5-гидроксиметилцитозина (5-hmC). Затем 5-hmC дезаминируется дезаминазой AID с образованием 5-hmU и удаляется при участии MBD4 в процессе эксцизионной репарации [8]. MBD4 активен и в отношении некоторых галогенированных субстратов: 5-ClU и 5-BrU, образующихся при воспалительных процессах, и 5-FU, который может возникать при химиотерапии [9]. Более того, фермент активен по отношению к 3,N<sup>4</sup>-этенцитозину (εC), который образуется при перекисном окислении липидов и метаболизме винилхлорида [10].

В настоящее время определены структуры MBD4<sup>cat</sup> в свободном состоянии и в комплексах с ДНК-дуплексами, содержащими пары 5-hmU/G, T/G и AP/G [11, 12]. Как показано на *рис. 1А*, в комплексе с продуктом реакции фермент взаимодействует преимущественно с пятью нуклеотидами

поврежденной цепи ДНК. Образование фермент-субстратного комплекса не приводит к значительным конформационным перестройкам по сравнению со свободным белком (*рис. 1Б*). В то же время ДНК-дуплексы в комплексе с MBD4<sup>cat</sup> изогнуты в области модифицированного нуклеотида, нуклеотид вывернут из двойной спирали, а азотистое основание находится в активном центре. MBD4<sup>cat</sup> образует прямые контакты с пятью фосфатными группами, расположенными с 5'- и 3'-стороны от вывернутого нуклеотида [12]. Два аминокислотных остатка, Arg468 и Leu508, встраиваются в ДНК через малую бороздку и заполняют пространство в дуплексе, которое образуется после выворачивания модифицированного нуклеотида. Предполагается, что гидролиз N-гликозидной связи протекает по механизму нуклеофильного замещения [7]. Нуклеофильная атака на С1'-атом осуществляется либо координированной в активном центре фермента молекулой воды, либо карбоксильной группой Asp560 [7, 12].

Ранее в работе [13] была изучена предстационарная кинетика накопления продукта реакции N-гликозилирования G/T-содержащего ДНК-субстрата в ходе катализируемого MBD4 процесса

в условиях одного оборота фермента в течение 15 с – 10 ч. Показано, что кинетика процесса характеризуется двумя фазами: начальной быстрой и следующей за ней медленной фазой, возникающей из-за прочного связывания фермента с продуктом реакции – AP-сайтом.

Цель настоящей работы состояла в изучении механизмов узнавания ферментом специфического сайта в субстрате и формирования каталитически компетентного состояния. Для этого исследовали конформационную динамику MBD4<sup>cat</sup> и модельных ДНК-субстратов на коротких временах в интервале 2 мс–200 с в условиях, соответствующих или близких «одному обороту фермента». Изменения конформации белка регистрировали по изменению флуоресценции остатков триптофана (Trp), а конформации ДНК – по изменению флуоресценции остатка 2-аминопурина (aPu) или по эффективности резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) пары красителей FAM/BHQ1. В качестве субстратов использовали дуплексы, содержащие пару U : G, а в качестве аналога продукта – дуплексы, содержащие неразрезаемый аналог AP-сайта – остаток (2R,3S)-2-(оксиметил)-3-окситетрагидрофурана (F-сайт). Влияние длины дуплекса на связывание фермента с ДНК и поиск повреждения изучали с использованием субстратов разной длины: 12, 17 и 28 п.н. На основании полученных данных определили кинетический механизм взаимных конформационных перестроек в процессе взаимодействия ДНК-гликозилазы MBD4<sup>cat</sup> с ДНК, содержащей модифицированные нуклеотиды.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

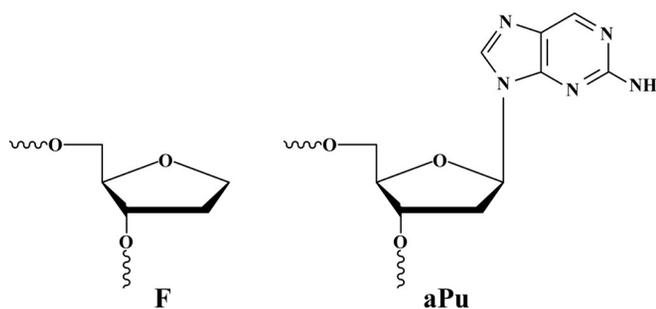
В работе использовали реактивы производства Sigma-Aldrich (США): акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, дитиотреит, мочевины, EDTA, ацетонитрил, глицерин, трис-(гидроксиметил)-аминометан, а также отечественные реактивы квалификации «ос. ч.». Все растворы готовили на дважды дистиллированной воде.

### ДНК-субстраты

Дезоксирибоолигонуклеотиды синтезированы в лаборатории бионанотехнологий ИХБФМ СО РАН на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 («Биоссет», Новосибирск, Россия) с использованием коммерческих амидофосфитов нуклеозидов и CPG-носителей (GlenResearch, США). Нативные и модифицированные дезоксирибоолигонуклеотиды выделяли с помощью ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1200 (США), используя колонку Zorbax SB-C18 (5 мкм) 4.6 × 150 мм, в линейном градиенте ацетонитрила (0 → 50%) в присутствии 20 мМ ацетата три-

**Таблица 1.** Нуклеотидные последовательности дезоксирибоолигонуклеотидов и структуры модифицированных нуклеотидов

| Сокращенное название         | Последовательность   |
|------------------------------|--|
| U <sub>12</sub> -субстрат    | CTCTC (U) CCTTCC<br>GAGAG G GGAAGG                                 |
| F <sub>12</sub> -лиганд      | CTCTC (F) CCTTCC<br>GAGAG G GGAAGG                                 |
| FaPu <sub>12</sub> -лиганд   | CTCTC (F) (aPu) CTTCC<br>GAGAG G C GAAGG                           |
| U <sub>17</sub> -субстрат    | GCTCA (U) GTACAGAGCTG<br>CGAGT G CATGTCTCGAC                       |
| UaPu <sub>17</sub> -субстрат | GCTCA (U) (aPu) TACAGAGCTG<br>CGAGT G C ATGTCTCGAC                 |
| FAM-U-BHQ1-субстрат          | FAM-GCTCA (U) GTACAGAGCTG<br>CGAGT G CATGTCTCGAC-BHQ1              |
| U <sub>28</sub> -субстрат    | GTGTCACCACTGCTCA (U) GTACAGAGCTG<br>CACAGTGGTGACGAGT G CATGTCTCGAC |



этиламмония, pH 7, в течение 30 мин при скорости элюции 2 мл/мин. Фракции, содержащие дезоксирибоолигонуклеотиды, высушивали под вакуумом, растворяли в воде и осаждали 2% LiClO<sub>4</sub> в ацетоне. После промывки чистым ацетоном и высушивания осадки дезоксирибоолигонуклеотидов растворяли в воде и хранили при –20°C до использования. Гомогенность очищенных дезоксирибоолигонуклеотидов подтверждали с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях (20% полиакриламидный гель, 8 М мочевины, 0.1 М трис-боратный буфер, pH 8.3). Дезоксирибоолигонуклеотиды визуализировали с помощью красителя Stains-All (Sigma, США). Субстраты и лиганды фермента представляли собой 12-, 17- и 28-звенные дезоксирибоолигонуклеотидные дуплексы, представленные в табл. 1.

### Фермент MBD4<sup>cat</sup>

Каталитический домен ДНК-гликозилазы человека MBD4<sup>cat</sup> (аминокислотные остатки 426–580) был вы-

делен из клеток *Escherichia coli* Rosetta 2, трансформированных плазмидой pET29b-MBD4<sup>cat</sup> как описано ранее [11, 14]. Плазмида pET29b-MBD4<sup>cat</sup>, содержащая ген MBD4<sup>cat</sup>, была любезно предоставлена М.К. Сапарбаевым (Groupe Réparation de l'ADN, Université Paris-Sud XI, Institut Gustave Roussy, Франция). Культуру клеток *E. coli* Rosetta 2 выращивали в среде LB (1 л), содержащей 50 мкг/мл канамицина, при температуре 37°C до оптической плотности 0.6–0.7 на длине волны 600 нм. После этого температуру понижали до 20°C и индуцировали транскрипцию, добавляя изопропил-β-D-тиогалактопиранозид до 0.2 мМ. После индукции клетки инкубировали в течение 16 ч, затем осаждали центрифугированием (10 мин при 12000 об/мин) и готовили суспензию клеток в 30 мл буферного раствора I (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.8), содержащего 50 мМ KCl. Клетки лизировали под давлением при помощи Френч-пресса SIM AMINCO. Все последующие процедуры проводили при 4°C. Клеточный лизат центрифугировали (40 мин при 30000 об/мин), супернатант наносили на колонку I (Q-Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences, Швеция) и промывали буферным раствором I (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.8), содержащим 50 мМ KCl. Фракции, содержащие белок, собирали и наносили на колонку II (HiTrap-Helating™, Amersham Biosciences, Швеция) в буферном растворе II (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.8), содержащем 500 мМ NaCl и 20 мМ имидазол. Хроматографию проводили в буферном растворе II и линейном градиенте 20 → 500 мМ имидазола. Оптическую плотность раствора регистрировали на длине волны 280 нм. Чистоту белка определяли с помощью гель-электрофореза. Фракции, содержащие белок MBD4<sup>cat</sup>, диализовали в буфере (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.5, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 250 мМ NaCl, 50% глицерин) и хранили при -20°C. Концентрацию фермента рассчитывали из значения оптической плотности раствора белка на длине волны 280 нм и коэффициента молярной экстинкции 54493 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> [15].

Все эксперименты по исследованию ферментативной реакции проводили в буферном растворе: 50 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 50 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 9% глицерин при 25°C.

### Электрофорез в ПААГ

Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с использованием меченных <sup>32</sup>P по 5'-концу олигонуклеотидов, содержащих модифицированное основание. Мечение олигонуклеотидов по 5'-концу проводили согласно [16]. Зависимости степени превращения субстрата от времени определяли следующим об-

разом. К 10 мкл буферного раствора, содержащего <sup>32</sup>P-меченый олигонуклеотид и эквимольное количество комплементарного олигонуклеотида, добавляли 10 мкл 2.0–4.0 мкМ фермента в том же буферном растворе. Реакционную смесь быстро перемешивали и через определенные промежутки времени отбирали аликвоты объемом 2 мкл, которые переносили в предварительно подготовленные пробирки, содержащие 2 мкл раствора 7 М мочевины, 0.1% бромфенолового синего и 0.1% ксиленианола. Затем добавляли 1 мкл 1 М NaOH и инкубировали при 56°C в течение 15 мин для гидролиза фосфодиэфирных связей в AP-сайтах. Раствор нейтрализовали эквивалентным количеством соляной кислоты, наносили на ПААГ и проводили электрофорез при напряженности 50 В/см. Количество образующегося продукта определяли путем сканирования радиоавтографа на приборе Molecular Imager FX phosphorimager (Bio-Rad, США) и обработки данных в программном пакете Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, США). Степень накопления продуктов рассчитывали как отношение площадей пиков продуктов к сумме площадей пиков продуктов и пика исходного олигонуклеотида. Ошибка определения, как правило, не превышала 20%.

### Изучение кинетики процесса методом остановленной струи

Кинетические кривые флуоресценции регистрировали методом остановленной струи на спектрометре SX.18MV (Applied Photophysics, Великобритания). Белок MBD4<sup>cat</sup> содержит восемь остатков Trp и семь остатков Tyr. Возбуждение флуоресценции MBD4<sup>cat</sup> проводили на длине волны 290 нм, регистрацию флуоресценции – на длинах волн более 320 нм (фильтр WG-320, Schott, Германия). В этих условиях основной вклад в флуоресценцию белка обеспечивают остатки Trp (> 90%). При использовании субстратов, содержащих остатки aPu, флуоресценцию возбуждали на длине волны 310 нм, а регистрацию проводили на длинах волн более 370 нм (фильтр LG-370, Corion, США). Для анализа эффективности переноса энергии FRET пары FAM/ВНQ1 флуоресценцию красителя FAM возбуждали на длине волны 494 нм. Флуоресценцию красителя FAM регистрировали на длинах волн более 515 нм при использовании светофильтра OG-515 (Schott, Германия). «Мертвое» время прибора составляло 1.4 мс. Каждую кинетическую кривую получали, усредняя, как минимум, три экспериментальные кривые.

### Анализ кинетических данных

Для получения минимальной кинетической схемы, описывающей взаимодействие фермента с субстра-

тами, и расчета констант скорости конформационных переходов в ходе всех элементарных стадий получали набор кинетических кривых для разных концентраций фермента или субстрата. Количественную обработку результатов проводили с помощью программы DynaFit (BioKin, США) [17] путем оптимизации значений параметров, входящих в кинетические схемы, как описано ранее [18–20].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Взаимодействие MBD4<sup>cat</sup> с 28-звенным ДНК-дуплексом

На рис. 2А представлены кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp в процессе взаимодействия MBD4<sup>cat</sup> с 28-звенным субстратом U<sub>28</sub>. Поскольку MBD4<sup>cat</sup> образует контакты лишь с пятью нуклеотидами ДНК, использование в качестве субстрата 28-звенного ДНК-дуплекса приводит к значительному вкладу в суммарную скорость процесса стадии поиска остатка урацила в ДНК. Действительно, из полученных кинетических кривых (рис. 2А) видно, что интенсивность флуоресценции Trp уменьшается в широком временном диапазоне – 2 мс–10 с. Затем следует фаза роста интенсивности флуоресценции Trp (10–100 с).

Анализ накопления продуктов реакции с помощью электрофоретического разделения реакционной смеси в ПААГ (рис. 2Б) показал, что процесс характеризуется двумя фазами: быстрой (до ~200 с) и медленной (до 1600 с и выше). На начальном участке кинетических кривых (до 200 с) наблюдается «скачок», за которым следует медленный рост. Такой вид кривых свидетельствует о существовании скоростьлимитирующей стадии после каталитической реакции. Увеличение концентрации U<sub>28</sub> с 0.25 до 1.0 мкМ приводит к увеличению количества расщепляемого субстрата на стадии «скачка» до 0.7 мкМ. Однако при дальнейшем увеличении концентрации U<sub>28</sub>-субстрата до 2.0 мкМ это значение незначительно увеличивается до 0.9 мкМ, что свидетельствует о насыщении активной формы фермента ДНК-субстратом. Таким образом, данные о накоплении продуктов реакции показывают, что концентрация активной формы фермента равна примерно 1.0 мкМ. Достаточно низкое значение активной формы каталитического домена MBD4<sup>cat</sup> (~ 25%), по-видимому, связано с особенностями сборки полипептида в функциональный белок в клетках *E. coli*, что согласуется с данными [13].

Таким образом, можно предположить, что падение интенсивности флуоресценции Trp в области 2 мс–~10 с характеризует образование первичного комплекса и поиск модифицированного основания,

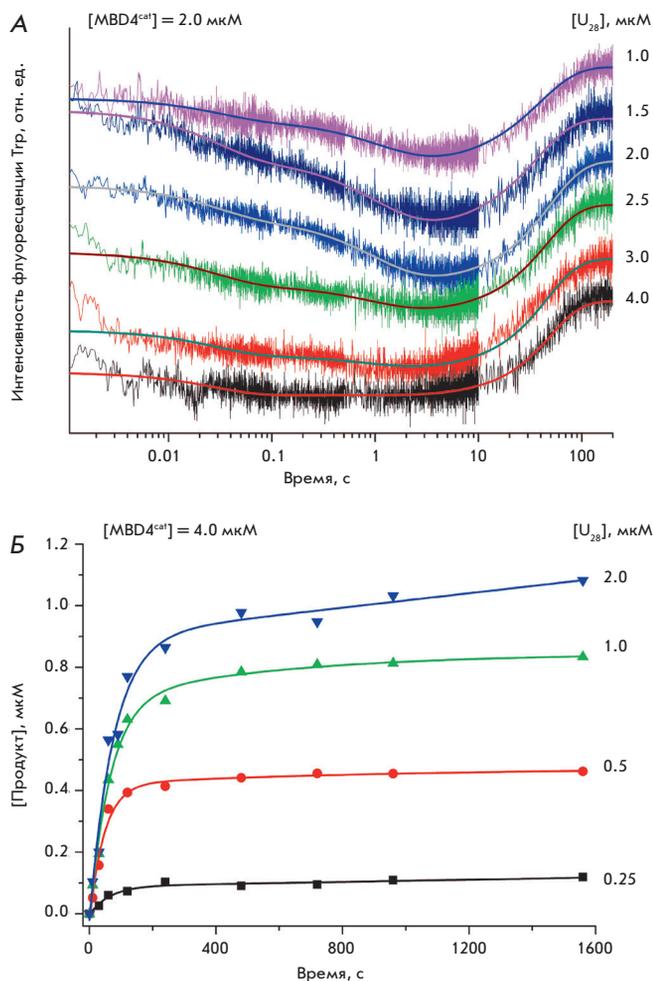


Рис. 2. Кинетика взаимодействия MBD4<sup>cat</sup> с U<sub>28</sub>-субстратом. А – экспериментальные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp и расчетные кривые, полученные путем обработки данных согласно схеме. [MBD4<sup>cat</sup>] = 2.0 мкМ, концентрация U<sub>28</sub> изменяется от 1.0 до 4.0 мкМ. Б – накопление продукта реакции по данным электрофореза в ПААГ. [MBD4<sup>cat</sup>] = 4.0 мкМ, концентрация U<sub>28</sub> изменяется от 0.25 до 2.0 мкМ

а рост в интервале ~10–100 с – каталитически-компетентной конформации фермента и начало процесса накопления продукта. Необходимо отметить, что повышение интенсивности флуоресценции Trp в интервале 10–100 с (рис. 2А) совпадает по времени с началом накопления продуктов реакции (рис. 2Б). Скоростьлимитирующей стадией ферментативного процесса скорее всего является стадия диссоциации комплекса фермент–продукт, что согласуется с выводами, сделанными ранее [10].

Количественный анализ кинетических кривых взаимодействия MBD4<sup>cat</sup> с 28-звенным ДНК-

субстратом (рис. 2А) позволил предложить минимальную кинетическую схему, удовлетворительно описывающую экспериментальные данные. Две равновесные стадии характеризуют первичное связывание ДНК и последующий процесс перестройки конформации фермента, приводящий к образованию каталитически компетентного комплекса, в котором N-гликозидная связь подвергается необратимому гидролизу. Завершает ферментативный цикл равновесная стадия диссоциации комплекса фермента и ДНК-продукта. Константы скорости и константы равновесия, характеризующие приведенные на схеме стадии, представлены в табл. 2. Используя константы скорости элементарных стадий, получены значения стационарных параметров ферментативного процесса ( $K_m$  и  $k_{cat}$ ), которые хорошо согласуются с данными [11, 13].

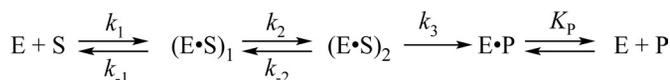
Используя уравнение (1), на основании данных ( $e_0 = 4.0$  мкМ,  $s_0 = 0.5$  мкМ, рис. 2Б) оценили фактическую скорость стационарной фазы реакции  $V_{st} \approx (3.2 \pm 1.2) \times 10^{-5}$  мкМ/с. Ожидаемое значение максимальной скорости каталитической реакции, оцененное по формуле  $V_{max} = k_{cat} \times e_0$ , где  $e_0$  – исходная концентрация фермента, с учетом 25% активности фермента равно  $4.6 \times 10^{-2}$  мкМ/с. Это означает, что лимитирующей является не химическая стадия, а, вероятно, диссоциация комплекса фермента с продуктом реакции, что коррелирует с наличием «скачка» на кинетических кривых накопления продукта.

$$V_{st} = \Delta[P]/\Delta t, \quad (1)$$

где  $\Delta[P]$  – прирост концентрации продукта P за время  $\Delta t$ .

### Взаимодействие MBD4<sup>cat</sup> с 17-звенным ДНК-дуплексом

Кинетические кривые, полученные при взаимодействии MBD4<sup>cat</sup> с более коротким 17-звенным ДНК-субстратом, имеют две фазы изменения интенсивности флуоресценции Trp, как и в случае с 28-звенным дуплексом (рис. 3А). Анализ продуктов реакции с помощью электрофоретического разделения реакционной смеси в ПААГ (рис. 3Б) показал, что в случае U<sub>17</sub>-субстрата накопление продуктов происходит в интервале времени < 1000 с. Кинетические кривые имеют выраженный «скачок» накопления продукта в интервале времени до 200 с с последующим медленным увеличением концентрации продукта. Последующее замедление накопления продуктов реакции свидетельствует о том, что процесс диссоциации комплекса фермент-продукт является скоростьюлимитирующим, как и для U<sub>28</sub>-субстрата.



Кинетический механизм взаимодействия MBD4 с ДНК-субстратами. E – фермент, S – субстрат, (E · S)<sub>1</sub> и (E · S)<sub>2</sub> – комплексы фермента с субстратом, (E · P) – комплекс фермента с продуктом, P – продукт превращения субстрата,  $k_1$  и  $k_{-1}$  – константы скорости прямых и обратных реакций равновесных стадий,  $k_3$  – константа скорости каталитической стадии,  $K_p$  – равновесная константа диссоциации комплекса E · P

Анализ кривых кинетики флуоресценции, представленных на рис. 3А, показал, что они описываются минимальной кинетической схемой. Константы скорости и равновесия, характеризующие эти стадии, представлены в табл. 2. Интересно отметить, что уменьшение на 11 нуклеотидов неспецифического участка дуплекса U<sub>17</sub>-субстрата по сравнению с U<sub>28</sub>-субстратом не приводит к значительным изменениям констант скорости образования и распада первичного комплекса (E · S)<sub>1</sub>. Тем не менее уменьшение длины дуплекса привело к увеличению константы равновесия  $K_2$ , характеризующей образование каталитического комплекса (E · S)<sub>2</sub>, в 2.4 раза по сравнению с U<sub>28</sub>-субстратом (13.0 и 5.5 соответственно). Это должно быть связано с уменьшением времени поиска поврежденного участка, который происходит как путем одномерной диффузии вследствие скольжения и небольших «прыжков» (hopping) [21–23] фермента по цепи ДНК, так и трехмерной диффузии, включающей множественные акты ассоциации-диссоциации.

Как и в случае U<sub>28</sub>-субстрата, у U<sub>17</sub>-субстрата фактическая стационарная скорость накопления продукта  $V_{st}$  составляет  $\sim (6.2 \pm 0.9) \times 10^{-5}$  мкМ/с при  $e_0 = 4.0$  мкМ,  $s_0 = 0.5$  мкМ, и меньше значения  $V_{max} = 4.2 \times 10^{-2}$  почти в 1000 раз. Это различие, а также «скачок» на кинетических кривых накопления продукта реакции (рис. 3Б) свидетельствуют о том, что диссоциация комплекса фермента с продуктом реакции лимитирует скорость ферментативного процесса.

### Взаимодействие MBD4<sup>cat</sup> с 12-звенным ДНК-дуплексом

На рис. 4 представлены кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp, соответствующие процессу взаимодействия MBD4<sup>cat</sup> с 12-звенным субстратом U<sub>12</sub>. Из рис. 4А видно, что кинетические кривые имеют две фазы: падения интенсивности (10–500 мс) и роста с выходом на плато (0.5–10 с). Кинетика накопления продуктов

Таблица 2. Константы скорости и константы равновесия процессов взаимодействия MBD4<sup>cat</sup> с различными субстратами, полученные из анализа флуоресцентных данных

| Константы \ Субстраты                                   | U <sub>28</sub>                | U <sub>17</sub>                | U <sub>12</sub>      | F <sub>12</sub>      |
|---|--------------------------------|--------------------------------|----------------------|----------------------|
| $k_1 \times 10^{-6}, \text{c}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ | $7.0 \pm 2.0$                  | $12.0 \pm 3.0$                 | $0.5 \pm 0.2$        | $10.0 \pm 4.0$       |
| $k_{-1}, \text{c}^{-1}$                                 | $30 \pm 10$                    | $45 \pm 20$                    | $3.3 \pm 0.5$        | $8.0 \pm 4.0$        |
| ${}^a K_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$                | $0.2 \pm 0.1$                  | $0.3 \pm 0.1$                  | $0.15 \pm 0.06$      | $1.2 \pm 0.8$        |
| $k_2, \text{c}^{-1}$                                    | $2.1 \pm 0.3$                  | $3.0 \pm 1.0$                  | $0.18 \pm 0.04$      | $0.08 \pm 0.01$      |
| $k_{-2}, \text{c}^{-1}$                                 | $0.38 \pm 0.05$                | $0.23 \pm 0.05$                | $0.12 \pm 0.01$      | $0.03 \pm 0.01$      |
| ${}^a K_2$  | $5.5 \pm 1.1$                  | $13.0 \pm 5.0$                 | $1.5 \pm 0.3$        | $2.7 \pm 0.9$        |
| $k_3, \text{c}^{-1}$                                    | $0.056 \pm 0.007$              | $0.046 \pm 0.002$              | $< 0.01$             |                      |
| $K_p, \text{M}$   | $(1.0 \pm 0.2) \times 10^{-7}$ | $(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-7}$ |                      |                      |
| ${}^b K_d, \text{M}$                                    | $6.6 \times 10^{-7}$           | $2.7 \times 10^{-7}$           | $2.6 \times 10^{-6}$ | $2.2 \times 10^{-7}$ |
| ${}^b K_m, \text{M}$                                    | $7.4 \times 10^{-7}$           | $3.2 \times 10^{-7}$           |                      |                      |
| ${}^r k_{\text{cat}}, \text{c}^{-1}$                    | $4.6 \times 10^{-2}$           | $4.2 \times 10^{-2}$           |                      |                      |

$${}^a K_1 = k_1/k_{-1}, K_2 = k_2/k_{-2},$$

$${}^b K_d = 1/K_{\text{ass}}, K_{\text{ass}} = K_1 + K_1 \times K_2,$$

$${}^b K_m = (k_2 k_3 + k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3)/k_1 (k_2 + k_{-2} + k_3),$$

$${}^r k_{\text{cat}} = k_2 k_3 / (k_2 + k_{-2} + k_3).$$

ферментативной реакции, определенная с помощью электрофоретического разделения реакционной смеси в ПААГ (рис. 4Б), свидетельствует о том, что каталитическая стадия проходит на временах порядка ( $\geq 1000$  с), т.е. значительно медленнее стадий, соответствующих изменению интенсивности Trp. Следовательно, изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp, зарегистрированные в интервале времени до 200 с, скорее всего отражают начальные конформационные изменения фермента в ходе образования фермент-субстратного комплекса и дальнейшую перестройку конформации фермента. При этом каталитически компетентное состояние формируется неэффективно, и реакция гидролиза N-гликозидной связи значительно замедляется по сравнению с 17- и 28-звенными субстратами. Поэтому для анализа серии кинетических кривых использовали только равновесные стадии связывания ДНК, характеризующие образование комплексов (E · S)<sub>1</sub> и (E · S)<sub>2</sub> на схеме. Константы скорости, характеризующие эти стадии и полученные путем анализа кинетических кривых изменения интенсивности флуоресценции фермента (рис. 4А), представлены в табл. 2.

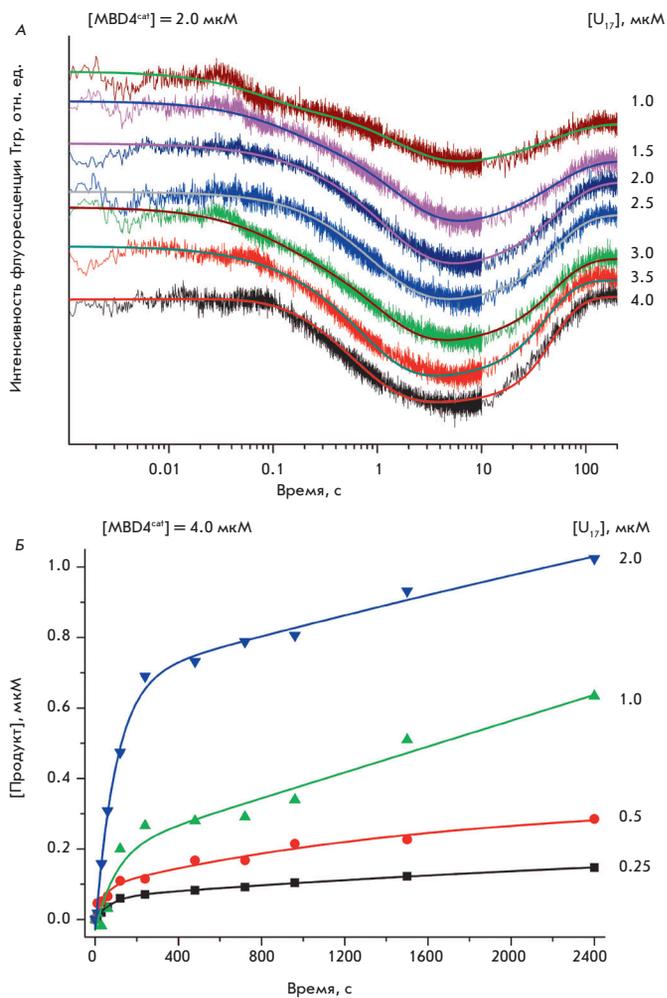
Сравнение констант скорости взаимодействия MBD4<sup>cat</sup> с 12- и 17-звенными субстратами показывает, что при уменьшении длины дуплекса на пять нуклеотидов значительно уменьшается скорость как образования первичного комплекса (E · S)<sub>1</sub>, характеризуемого константой скорости  $k_1$ , так и его распада,  $k_{-1}$ , – в 24 и 14 раз соответственно. При этом константа ассоциации E и S с образованием комплекса (E · S)<sub>1</sub>,  $K_1$ , уменьшается лишь в 2 раза. Можно

предположить, что неспецифический участок U<sub>17</sub>-субстрата выполняет функцию матрицы, с которой в условиях быстрого равновесия образуется первичный комплекс (E · S)<sub>1</sub>, что позволяет ферменту производить эффективный поиск поврежденного участка. Действительно, константа образования  $k_2$  каталитического комплекса (E · S)<sub>2</sub> в случае U<sub>17</sub>-субстрата в 17 раз больше, чем в случае U<sub>12</sub>-субстрата. Таким образом, увеличение неспецифического участка дуплекса на пять нуклеотидов в U<sub>17</sub>-субстрате по сравнению с U<sub>12</sub>-субстратом приводит к уменьшению общей константы диссоциации  $K_d$  в 10 раз (табл. 2). Отсутствие в U<sub>12</sub>-субстрате неспецифического участка, по-видимому, препятствует образованию правильно ориентированной активной конформации фермента.

### Взаимодействие MBD4<sup>cat</sup> с аналогом продукта

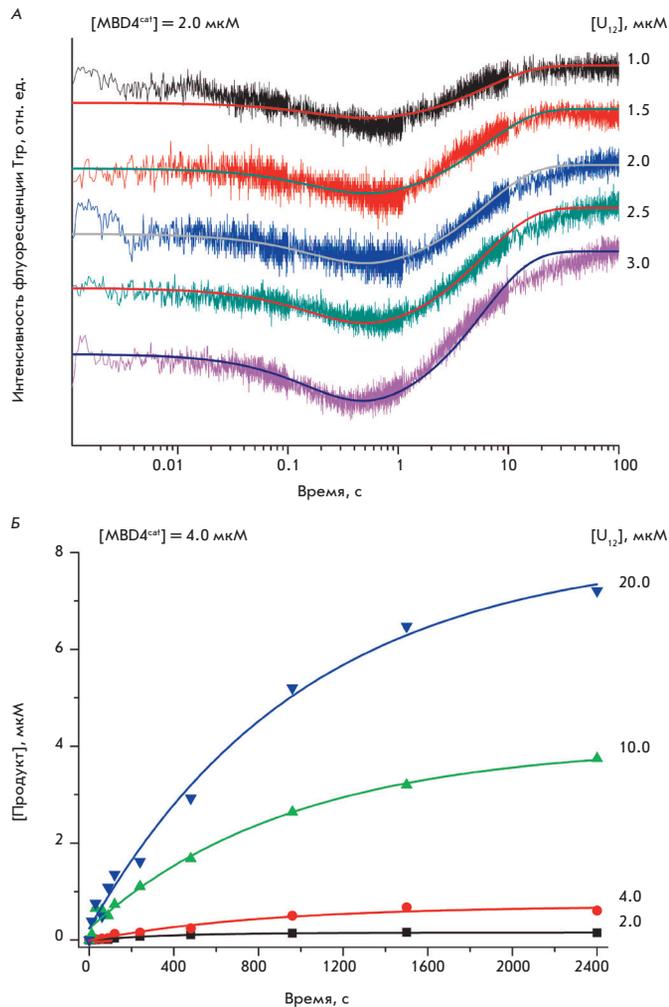
Удаление модифицированного основания ферментом MBD4 приводит к образованию AP-сайта в ДНК. Для того чтобы идентифицировать природу конформационных изменений фермента и ДНК, происходящих в процессе связывания продукта реакции, содержащего AP-сайт, использовали его стабильный аналог, представляющий собой остаток (2R,3S)-2-(оксиметил)-3-окситетрагидрофурана (F-сайт), не содержащий OH-группу в положении C1' дезоксирибозы. Взаимодействие MBD4<sup>cat</sup> с F<sub>12</sub>-лигандом должно приводить к формированию комплекса, имитирующего комплекс фермента с продуктом реакции после осуществления каталитической стадии ферментативного процесса.

Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции Trp при взаимодействии MBD4<sup>cat</sup>



**Рис. 3.** Кинетика взаимодействия  $MBD4^{cat}$  с  $U_{17}$ -субстратом. А – экспериментальные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp и расчетные кривые, полученные путем обработки данных согласно схеме.  $[MBD4^{cat}] = 2.0 \mu\text{M}$ , концентрация  $U_{17}$  изменяется от 1.0 до 4.0  $\mu\text{M}$ . Б – накопление продукта реакции, по данным электрофореза в ПААГ.  $[MBD4^{cat}] = 4.0 \mu\text{M}$ , концентрация  $U_{17}$  изменяется от 0.25 до 2.0  $\mu\text{M}$

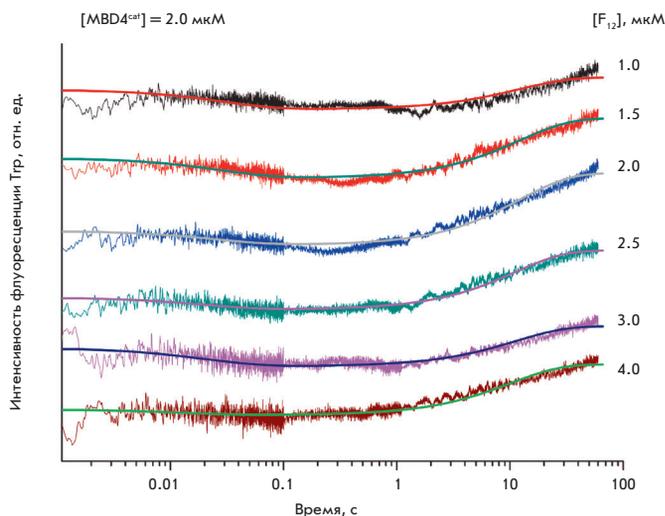
и  $F_{12}$ -лиганда имеют двухфазный профиль (рис. 5), как и в случае  $U_{12}$ -субстрата (рис. 4). Можно предположить, что уменьшение и последующий рост интенсивности флуоресценции Trp имеют такую же природу, как и у ДНК-дуплекса, содержащего уридин. Таким образом, независимо от природы модифицированного нуклеотида первичное связывание и дальнейшая перестройка конформации фермента в процессе взаимодействия  $MBD4^{cat}$  с ДНК приводят к образованию каталитически активного комплекса



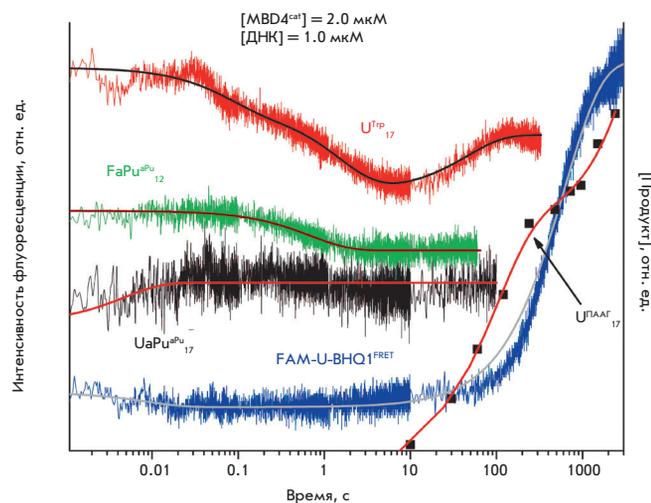
**Рис. 4.** Кинетика взаимодействия  $MBD4^{cat}$  с  $U_{12}$ -субстратом. А – экспериментальные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp и расчетные кривые, полученные путем обработки данных согласно схеме (стадии 1 и 2);  $[MBD4^{cat}] = 2.0 \mu\text{M}$ , концентрация  $U_{12}$  изменяется от 1.0 до 3.0  $\mu\text{M}$ . Б – накопление продукта реакции, оцененное методом электрофореза в ПААГ;  $[MBD4^{cat}] = 4.0 \mu\text{M}$ , концентрация  $U_{12}$  изменяется от 2.0 до 20.0  $\mu\text{M}$

(рис. 5). Полученные кинетические кривые удовлетворительно описываются двухстадийной равновесной кинетической схемой. Константы скорости, характеризующие эти стадии, представлены в табл. 2.

Сравнение констант скорости и равновесия (табл. 2), характеризующих взаимодействие  $MBD4^{cat}$  с  $U_{12}$ -субстратом и  $F_{12}$ -лигандом, показывает, что с аналогом продукта реакции первичный комплекс образуется примерно в 10 раз более эффективно. Нужно отметить, что константы равновесия



**Рис. 5.** Кинетика взаимодействия  $MBD4^{cat}$  с  $F_{12}$ -лигандом. Экспериментальные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp и расчетные кривые, полученные путем обработки данных согласно схеме (стадии 1 и 2).  $[MBD4^{cat}] = 2.0$  мкМ, концентрация  $F_{12}$  изменяется от 1.0 до 4.0 мкМ



**Рис. 6.** Сравнение кинетических кривых, зарегистрированных по изменению интенсивности флуоресценции остатков Trp, аРи или FRET-сигнала в процессе взаимодействия  $MBD4^{cat}$  с  $U_{17}$ ,  $UaPu_{17}$ ,  $FaPu_{12}$  и  $FAM-U-BHQ1$ -субстратами и по накоплению продуктов реакции. Показаны экспериментальные и теоретические кинетические кривые. Концентрация ДНК-субстратов равна 1.0 мкМ,  $[MBD4^{cat}] = 2.0$  мкМ

второй стадии отличаются менее чем в 2 раза. Таким образом, можно сделать заключение, что поиск и связывание поврежденного участка ДНК ферментом  $MBD4^{cat}$  происходят более эффективно в случае дестабилизированного F-сайтом ДНК-дуплекса.

### Сравнительный анализ конформационных изменений фермента и ДНК

Для того чтобы уточнить природу процессов, происходящих при образовании каталитического комплекса и зарегистрированных по изменению интенсивности остатков Trp фермента, использовали модельные ДНК-дуплексы, несущие флуоресцентные остатки (табл. 1) в качестве «сенсоров» конформационных изменений ДНК. Известно, что интенсивность флуоресценции аРи в ДНК зависит от микроокружения флуорофора и изменяется, например, в результате локального плавления дуплекса в непосредственной близости от флуорофора [24–26]. В двухцепочечных структурах ДНК при образовании стэкинга с соседними основаниями интенсивность флуоресценции остатков аРи резко уменьшается по сравнению с одноцепочечной ДНК. Использование  $UaPu_{17}$ -субстрата, несущего остаток аРи с 3'-стороны от уридина, позволило зарегистрировать конформационные изменения в ДНК, происходящие при взаимодействии с  $MBD4^{cat}$ , вероятно, в результате вы-

ворачивания поврежденного нуклеотида из ДНК и встраивания в образовавшуюся полость остатков Arg468 и Leu508. Как видно из рис. 6, на кинетической кривой, характеризующей взаимодействие  $MBD4^{cat}$  и  $UaPu_{17}$ -субстрата, имеется фаза быстрого роста (1–50 мс) интенсивности флуоресценции аРи, свидетельствующая о дестабилизации центральной части дуплекса на начальных этапах фермент-субстратного взаимодействия.

Кроме того, для исследования изменений структуры ДНК-субстрата применили метод FRET. Для этого использовали  $FAM-U-BHQ1$ -субстрат, содержащий красители FAM и BHQ1 на 5'-концах олигонуклеотидов, формирующих дуплекс, что позволило зарегистрировать конформационные изменения дуплекса, связанные с изменением расстояния между красителями. Видно (рис. 6), что на начальном участке кинетической кривой (1–50 мс) происходит небольшое уменьшение FRET-сигнала, свидетельствующее об изгибании дуплекса. Сравнение с кривой изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp показывает, что в этот момент времени (< 100 мс) фермент не претерпевает значительных конформационных изменений. Поэтому можно предположить, что в процессе первичного связывания ДНК происходит изгибание спирали и частичное плавление центральной части дуплекса. По-видимому, именно

такие индуцированные ферментом изменения структуры дуплекса позволяют MBD4<sup>cat</sup> различать модифицированные и немодифицированные основания в процессе скольжения по двойной спирали ДНК.

Интересно, что фаза роста интенсивности флуоресценции остатков Trp (10–100 с), совпадающая с начальным накоплением продукта реакции, не приводит к изменению FRET-сигнала. Однако скорость-лимитирующая стадия диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции вызывает медленный рост FRET-сигнала в интервале времени 100–3000 с, а также приводит к медленному накоплению продуктов реакции (рис. 6).

Интенсивность флуоресценции aPu при связывании ДНК-дуплексов, содержащих урацил (UaPu<sub>17</sub>) и F-сайт (FaPu<sub>12</sub>), изменяется разнонаправленно (рост и падение соответственно) и в разные промежутки времени ( $t < 0.1$  с и  $0.1$  с  $< t < 1$  с соответственно). Фазу роста интенсивности флуоресценции aPu для UaPu<sub>17</sub>-субстрата, отражающую локальное плавление дуплекса при образовании первичного комплекса, невозможно зарегистрировать в случае FaPu<sub>12</sub>-лиганда, поскольку расположенный с 3'-стороны от F-сайта остаток aPu уже находится в менее гидрофобном окружении, чем в канонической ДНК. Однако при взаимодействии MBD4<sup>cat</sup> с FaPu<sub>12</sub>-лигандом наблюдается хорошо выраженное уменьшение интенсивности флуоресценции aPu на более поздних временах (до 1 с). Уменьшение интенсивности флуоресценции aPu, связанное с увеличением гидрофобности окружения остатка aPu, скорее всего свидетельствует о встраивании аминокислотных остатков MBD4<sup>cat</sup> (Arg468 и Leu508) в дуплекс на этих временах.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Опираясь на данные рентгеноструктурного анализа [11, 12], можно предположить, что при взаимодействии MBD4<sup>cat</sup> с ДНК в начальный момент времени образуется первичный комплекс, в котором аминокислотные остатки образуют систему неспецифических контактов с рибозофосфатным остовом, позволяющую ферменту за счет тепловых движений двигаться вдоль двойной спирали в поиске поврежденного нуклеотида. Известно, что поиск ферментами специфических сайтов в молекуле ДНК происходит путем сочетания одномерной (1D) и трехмерной (3D) диффузии: без диссоциации фермент-субстратного комплекса за счет «скольжения» фермента и небольших «прыжков» по цепи ДНК, и путем множественных актов диссоциации-ассоциации соответственно [21, 23]. Длина участков 1D-диффузии отличается у разных ДНК-гликозилаз. Показано, что урацил-ДНК-гликозилаза UNG между актами диссоциации способна пере-

мещаться на длину, примерно соответствующую четырем нуклеотидам [27]. У 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы hOGG1 это расстояние может составлять от 60 [28] до 400 [29] нуклеотидов. ДНК-гликозилазы Fpg, Nei, Nth и hOGG1 [30–32] в процессе поиска поврежденного участка в молекуле ДНК используют некоторые остатки в качестве детекторов поврежденного участка ДНК. Если в ДНК-связывающем центре фермента оказывается модифицированный нуклеотид, то это приводит к формированию специфических контактов, выворачиванию этого нуклеотида из ДНК-дуплекса, встраиванию модифицированного основания в активный центр фермента и перемещению аминокислотных остатков-детекторов в образовавшуюся полость в ДНК-дуплексе. Такие конформационные перестройки не позволяют ферменту смещаться со специфического сайта на ДНК и заканчиваются формированием каталитически компетентного комплекса. Интересно отметить, что фермент MBD4<sup>cat</sup>, относящийся вместе с hOGG1 и Nth к структурному семейству ДНК-гликозилаз с мотивом HhH, также встраивает Arg468 и Leu508 в ДНК-дуплекс при образовании каталитического комплекса. Поэтому, эти аминокислотные остатки могут выполнять функцию детекторов в процессе поиска поврежденного нуклеотида.

Сравнение кривых кинетики флуоресценции для 12-, 17- и 28-звенных ДНК-субстратов свидетельствует о том, что с увеличением длины дуплекса происходит замедление фазы уменьшения интенсивности флуоресценции Trp, характеризующей поиск модифицированного основания в процессе скольжения или перепрыгивания MBD4<sup>cat</sup> по цепи ДНК. С использованием флуоресцентно меченных UaPu<sub>17</sub>- и FaPu<sub>12</sub>-субстратов показано, что в первичном комплексе происходят изгибание ДНК-дуплекса и его локальное плавление. В последующий момент времени поврежденный нуклеотид выворачивается из дуплекса, и аминокислотные остатки фермента встраиваются в образовавшуюся полость. Результаты, полученные с использованием флуоресцентно меченного аналога продукта реакции FaPu<sub>12</sub>, показывают, что встраивание Arg468 и Leu508 в ДНК-дуплекс предшествует фазе роста интенсивности флуоресценции Trp. Встраивание аминокислотных остатков в ДНК обеспечивает специфическое узнавание модифицированного основания. Фаза роста интенсивности флуоресценции Trp характеризует образование каталитически-активного комплекса и во всех случаях заканчивается к 100–200 с, что совпадает с начальным скачком накопления продуктов реакции. Диссоциация комплекса фермента с продуктом реакции является скоростью-лимитирующей стадией всего процесса. Наблюдаемая скорость каталитической реакции заметно увеличивается с увели-

чением длины дуплекса. Это указывает на возможное участие соседних с модифицированным основанием неповрежденных участков ДНК в формировании правильно ориентированной и активной конформации MBD4<sup>cat</sup>.

Таким образом, впервые в режиме реального времени зарегистрированы конформационные переходы в ферменте MBD4 и ДНК-субстратах в ходе их взаимодействия, установлен кинетический механизм, рассчитаны константы скорости образования и распада промежуточных фермент-субстратных комплексов и определена природа взаимных кон-

формационных перестроек в процессе узнавания повреждения и его удаления.

*Работа поддержана программой РАН «Молекулярная и клеточная биология» (№ 6.11), грантами РФФИ (№ 16-04-00037 О.С.Ф., № 15-04-00467 К.А.А., № 15-34-20121 Н.А.К.). За счет средств гранта РФФ № 16-14-10038 выполнен предстационарный кинетический анализ взаимодействия фермента MBD4<sup>cat</sup> с ДНК-субстратами.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zheng G., Fu Y., He C. // *Chem. Rev.* 2014. V. 114. P. 4602–4620.
- Sjolund A.B., Senejani A.G., Sweasy J.B. // *Mutat. Res.* 2013. V. 743–744. P. 12–25.
- Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W., Wood R.D., Schultz R.A., Ellenberger T. *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington: ASM Press, 2006. P. 1161.
- Barnes D.E., Lindahl T. // *Annu. Rev. Genet.* 2004. V. 38. P. 445–476.
- Gros L., Saparbaev M.K., Laval J. // *Oncogene*. 2002. V. 21. P. 8905–8925.
- Zhang W., Liu Z., Crombet L., Amaya M.F., Liu Y., Zhang X., Kuang W., Ma P., Niu L., Qi C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. V. 412. P. 425–428.
- Hashimoto H., Zhang X., Cheng X. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. P. 8276–8284.
- Hill P.W., Amouroux R., Hajkova P. // *Genomics*. 2014. V. 104. P. 324–333.
- Turner D.P., Cortellino S., Schupp J.E., Caretti E., Loh T., Kinsella T.J., Bellacosa A. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 7686–7693.
- Petronzelli F., Riccio A., Markham G.D., Seeholzer S.H., Genuardi M., Karbowski M., Yeung A.T., Matsumoto Y., Bellacosa A. // *J. Cell Physiol.* 2000. V. 185. P. 473–480.
- Morera S., Grin I., Vigouroux A., Couve S., Henriot V., Saparbaev M., Ishchenko A.A. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. P. 9917–9926.
- Manvilla B.A., Maiti A., Begley M.C., Toth E.A., Drohat A.C. // *J. Mol. Biol.* 2012. V. 420. P. 164–175.
- Petronzelli F., Riccio A., Markham G.D., Seeholzer S.H., Stoerker J., Genuardi M., Yeung A.T., Matsumoto Y., Bellacosa A. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 32422–32429.
- Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1840. P. 3042–3051.
- Gill S.C., von Hippel P.H. // *Anal. Biochem.* 1989. V. 182. P. 319–326.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1989. P. 1626.
- Kuzmic P. // *Anal. Biochem.* 1996. V. 237. P. 260–273.
- Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., Vorobiev Y.N., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Fedorova O.S. // *Biochemistry*. 2007. V. 46. P. 424–435.
- Koval V.V., Kuznetsov N.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S. // *Mutat. Res.* 2010. V. 685. P. 3–10.
- Kuznetsov N.A., Vorobiev Y.N., Krasnoperov L.N., Fedorova O.S. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. P. 7384–7392.
- Halford S.E., Szczelkun M.D. // *Eur. Biophys. J.* 2002. V. 31. P. 257–267.
- Friedman J.I., Stivers J.T. // *Biochemistry*. 2010. V. 49. P. 4957–4967.
- Lee A.J., Warshaw D.M., Wallace S.S. // *DNA Repair (Amst.)*. 2014. V. 20. P. 23–31.
- Jean J.M., Hall K.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. P. 37–41.
- Rachofsky E.L., Osman R., Ross J.B.A. // *Biochemistry*. 2001. V. 40. P. 946–956.
- Kuznetsov N.A., Kladova O.A., Kuznetsova A.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Zharkov D.O., Fedorova O.S. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. P. 14338–14349.
- Schonhoft J.D., Stivers J.T. // *Nat. Chem. Biol.* 2012. V. 8. P. 205–210.
- Rowland M.M., Schonhoft J.D., McKibbin P.L., David S.S., Stivers J.T. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. P. 9295–9303.
- Blainey P.C., van Oijen A.M., Banerjee A., Verdine G.L., Xie X.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 5752–5757.
- Kuznetsov N.A., Bergonzo C., Campbell A.J., Li H., Mechetin G.V., de los Santos C., Grollman A.P., Fedorova O.S., Zharkov D.O., Simmerling C. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. P. 272–281.
- Nelson S.R., Dunn A.R., Kathe S.D., Warshaw D.M., Wallace S.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. P. E2091–2099.
- Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1840. P. 387–395.