

Репарация ДНК в интермедиатах транскрипции семейством спираль-два поворота-спираль ДНК-гликозилаз

Научный руководитель – Жарков Дмитрий Олегович

Макашева Кристина Андреевна

Студент (магистр)

Новосибирский государственный университет, Факультет естественных наук,
Новосибирск, Россия

E-mail: kristmak6@gmail.com

Окислительные повреждения широко распространены в клетках эукариот, что обусловлено постоянным присутствием в них активных форм кислорода. 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.

Цель работы заключалась в получении транскрипционных элонгационных комплексов с РНК-полимеразой, исследовании активности ДНК-гликозилаз суперсемейства Fpg/Nei в отношении таких интермедиатов и в получении и характеристике изоформ NEIL2b, NEIL2c.

Олигонуклеотидные субстраты содержали поврежденное основание (8-оксогуанин или 5-гидроксиурацил) в различных положениях в «глазках» разного размера (6-30 нуклеотидов) или в D-петлях, образованных с третьей цепью ДНК или РНК. Также были получены тройные открытые комплексы с РНК-полимеразой *E. coli*.

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

Кинетические параметры K_M и k_{cat} реакции, катализируемой ДНК-гликозилазой Fpg *E. coli*, 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.

В присутствии РНК-полимеразы активность ДНК-гликозилазы Fpg *E. coli* снижалась вследствие стерических затруднений, вызванных экранированием субстрата РНК-полимеразой. Показано, что эксцизионная репарация 8-оксогуанина в составе кодирующей цепи ферментом Fpg не подавляет процесс транскрипции.

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.

Источники и литература

- 1) Dou H., Mitra S., Hazra T. K. Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2 // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. No. 50. P. 49679–49684.