

Апуриновая/апириமிдиновая эндонуклеаза 1 человека: анализ эффективности связывания и гидролиза метилированных и неметилированных фрагментов промотора гена *TERT*

Научный руководитель – Кубарева Елена Александровна

Гришин В.Д.¹, Сныга В.Г.²

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия, *E-mail: vg_scientist@mail.ru*; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Химический факультет, Кафедра химии природных соединений, Москва, Россия, *E-mail: snyga.viktoria000@gmail.com*

В поддержании геномной стабильности и регуляции экспрессии генов ключевую роль играет метилирование цитозина в CpG-сайтах [2]. Промотор гена *hTERT*, кодирующего каталитическую субъединицу теломеразы человека, содержит CpG-участки в G-богатой цепи. Онкогенные мутации в этом регионе представлены заменами G>A в позициях -124, -146 и -138/-139 относительно сайта инициации транскрипции [1].

Были сконструированы 96-звенные ДНК-дуплексы, воспроизводящие последовательность промотора *hTERT* и содержащие тетрагидрофуран (THF) — стабильный структурный аналог AP-сайта — в позициях -124, -138/-139, -146 и -139 в качестве контроля. Часть субстратов была метилирована по всем 11 CpG-динуклеотидам матричной цепи («полуметилированные» субстраты), остальные оставались неметилированными.

Цель работы заключалась в оценке влияния метилирования промотора гена *hTERT* на эффективность связывания и каталитическую активность AP-эндонуклеазы 1 человека (APE1) — ключевого фермента эксцизионной репарации оснований.

Взаимодействие APE1 с субстратами исследовали методом биослойной интерферометрии (BLI) на приборе BLItz (ForteBio, США), позволяющем определять константу диссоциации (K_d) комплекса фермент–субстрат в режиме реального времени. Эффективность гидролиза оценивали методом электрофореза в денатурирующих условиях.

Метилирование значительно повышает сродство APE1 к ДНК-субстратам во всех исследованных позициях. Для субстрата с THF в позиции -146 значение K_d снижалось в 3,0 раза, в позиции -124 — в 2,3 раза, при двойной модификации в позициях -138/-139 — в 1,8 раза по сравнению с соответствующими неметилированными субстратами. Наблюдаемая константа скорости гидролиза (k_{obs}) метилированных субстратов превышала таковую для неметилированных в 3 раза для позиции -138/-139 и в 2 раза для позиции -146; для остальных позиций различия не достигали статистической значимости.

Таким образом, впервые показано, что APE1 связывает полуметилированные ДНК-субстраты в 2–3 раза эффективнее, чем неметилированные аналоги. Каталитическая активность APE1 также зависит от метилирования и носит позиционно-специфический характер. Полученные данные указывают на потенциальную роль APE1 в считывании эпигенетических меток и могут свидетельствовать о его участии в метилирование-зависимой регуляции транскрипции онкогенно значимых участков, в частности, промотора гена *hTERT*.

Работа поддержана грантом РФФ № 25-14-00126.

Источники и литература

- 1) Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science*. 2013 Feb 22;339(6122):957-9.
- 2) Jones, P. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13, 484–492 (2012).