

УДК 577.29

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛЕНИЯ БЕЛКА XRCC1 ЧЕЛОВЕКА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЕГО КОМПЛЕКСОВ С КЛЮЧЕВЫМИ ФЕРМЕНТАМИ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ ДНК*,**

© 2020 И.А. Васильева^{1#}, Н.А. Моор^{1#}, О.И. Лаврик^{1,2***}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия;
электронная почта: lavrik@niboch.nsc.ru

² Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 29.11.2019

После доработки 20.01.2020

Принята к публикации 27.01.2020

Эксцизионная репарация оснований (Base Excision Repair, BER) обеспечивает исправление самых многочисленных повреждений ДНК у млекопитающих. Эффективность репарации с помощью этого многоступенчатого процесса, протекающего по разным маршрутам, зависит от координированного действия ферментов, катализирующих отдельные стадии. Важную роль в координации процессов репарации поврежденных оснований и апуринных/апириимидиновых (AP) сайтов по «короткозаплаточному» маршруту и репарации одноцепочечных разрывов играет архитектурный белок XRCC1. В работе впервые с использованием метода флуоресцентного титрования показано образование *in vitro* тройного комплекса белка XRCC1 с ключевыми ферментами «короткозаплаточной» репарации – ДНК-полимеразой β (Pol β) и ДНК-лигазой III α (LigIII α). Зарегистрировано прямое взаимодействие Pol β с LigIII α , но их комплекс уступает по стабильности комплексам XRCC1–Pol β и XRCC1–LigIII α . Исследовано влияние окисления белка XRCC1 и состава мультисубъединичного комплекса на эффективность репаративного синтеза и лигирования ДНК. Образование дисульфидной связи между остатками Cys12 и Cys20 в результате окисления XRCC1, модулирующее сродство белка к Pol β (как показано ранее), оказывает влияние на выход как конечного продукта «короткозаплаточной» репарации, так и нелигируемых ДНК-интермедиатов (субстратов «длиннозаплаточной» репарации). Эффект окисления XRCC1 на выход конечного продукта зависит от присутствия AP-эндонуклеазы 1. Результаты работы и ранее проведенного нами исследования указывают на важную роль окисления XRCC1 в тонкой регуляции процессов формирования и функциональной активности репаративных комплексов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эксцизионная репарация оснований ДНК, белок-белковые взаимодействия, белок XRCC1 человека, ДНК-полимераза β , ДНК-лигаза III α .

DOI: 10.31857/S0320972520030045

Эксцизионная репарация оснований (Base Excision Repair, BER) обеспечивает исправление самых многочисленных повреждений ДНК у млекопитающих – модифицированных оснований, апуринных/апириимидиновых (AP) сайтов и одноцепочечных разрывов [1, 2], и является важнейшей системой для сохранения генома.

Многостадийные процессы коррекции повреждений ДНК по различным маршрутам BER представлены на рис. 1. Удаление поврежденных оснований инициируется ДНК-гликозилазами, специфичными к определенному типу повреждения. Моно- или бифункциональные ДНК-гликозилазы катализируют образование интакт-

Принятые сокращения: AP-сайт – апуринный/апириимидиновый сайт; APE1 – AP-эндонуклеаза 1; dRp – дезоксирибозофосфат; DTT – дитиотреитол; FAM – 5(6)-карбоксифлуоресцеин; FEN1 – флэп-эндонуклеаза 1; gar-ДНК – ДНК-дуплекс с однонуклеотидной брешью; LigI/LigIII α – ДНК-лигаза I/III α ; LP BER – «длиннозаплаточная» эксцизионная репарация оснований; nick-ДНК – ДНК-дуплекс с одноцепочечным разрывом; PARP1/PARP2 – поли(ADP-рибоза)-полимераза 1/2; Pol β /Pol δ /Pol ϵ – ДНК-полимераза β / δ / ϵ ; SP BER – «короткозаплаточная» эксцизионная репарация оснований; XRCC1ox – окисленная форма белка XRCC1.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-338, 02.03.2020.

** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 3, 2020.

*** Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

ного или расщепленного (по механизму β - или β/δ -элиминации) AP-сайта. Интактный AP-сайт гидролизуетсЯ AP-эндонуклеазой 1 (APE1); затем ДНК-полимераза β (Pol β) удаляет остаток дезоксирибозофосфата (dRp) на 5'-конце разрыва с помощью ее dRp-лиазной активности. Продукты действия бифункциональных ДНК-гликозилаз содержат 3'- или 5'-концевые блокирующие группы, которые удаляются с помощью фосфатазной активности полинуклеотидкиназы/фосфатазы (PNKP) или 3'-фосфатазной и 3'-фосфодиэстеразной активностей APE1. Основным путем репарации оснований по «короткозаточному» пути (short patch, SP BER) включает заполнение однонуклеотидной брешы с помощью ДНК-полимеразной активности Pol β и восстановление целостности цепи с помощью ДНК-лигазы III α (LigIII α). Другой путь, известный как «длиннозаточная» репарация (long patch, LP BER), реализуется в случае модификации 5'-dRp-остатка (не удаляемого с помощью лиазной активности Pol β). Синтез с вытеснением цепи инициируется Pol β и продолжается с

участием репликативных ДНК-полимераз δ и ϵ (Pol δ , Pol ϵ), свисающая структура (флэп) удаляется флэп-эндонуклеазой 1 (FEN1), и конечное лигирование разрыва завершает ДНК-лигаза I (LigI). Репарация одноцепочечных разрывов в ДНК, возникающих под действием повреждающих факторов или в процессе репарации модифицированных оснований и AP-сайтов, включает детекцию разрыва, удаление блокирующих групп, заполнение брешы и лигирование разрыва. Основным детектором разрывов в ДНК является поли(ADP-рибоза)-полимераза 1 (PARP1); в деблокировании 3'- и 5'-концов участвуют APE1, PNKP, апратаксин (APTX) и тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1); Pol β и LigIII α катализируют заполнение брешы и лигирование. Взаимодействуя с поврежденной ДНК, PARP1 активируется и катализирует синтез поли(ADP-рибозы) (PAR) и ее присоединение к себе и другим белкам-участникам репарации. Основной мишенью этой модификации (PARилирования) в процессе BER является белок XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1), в привлече-

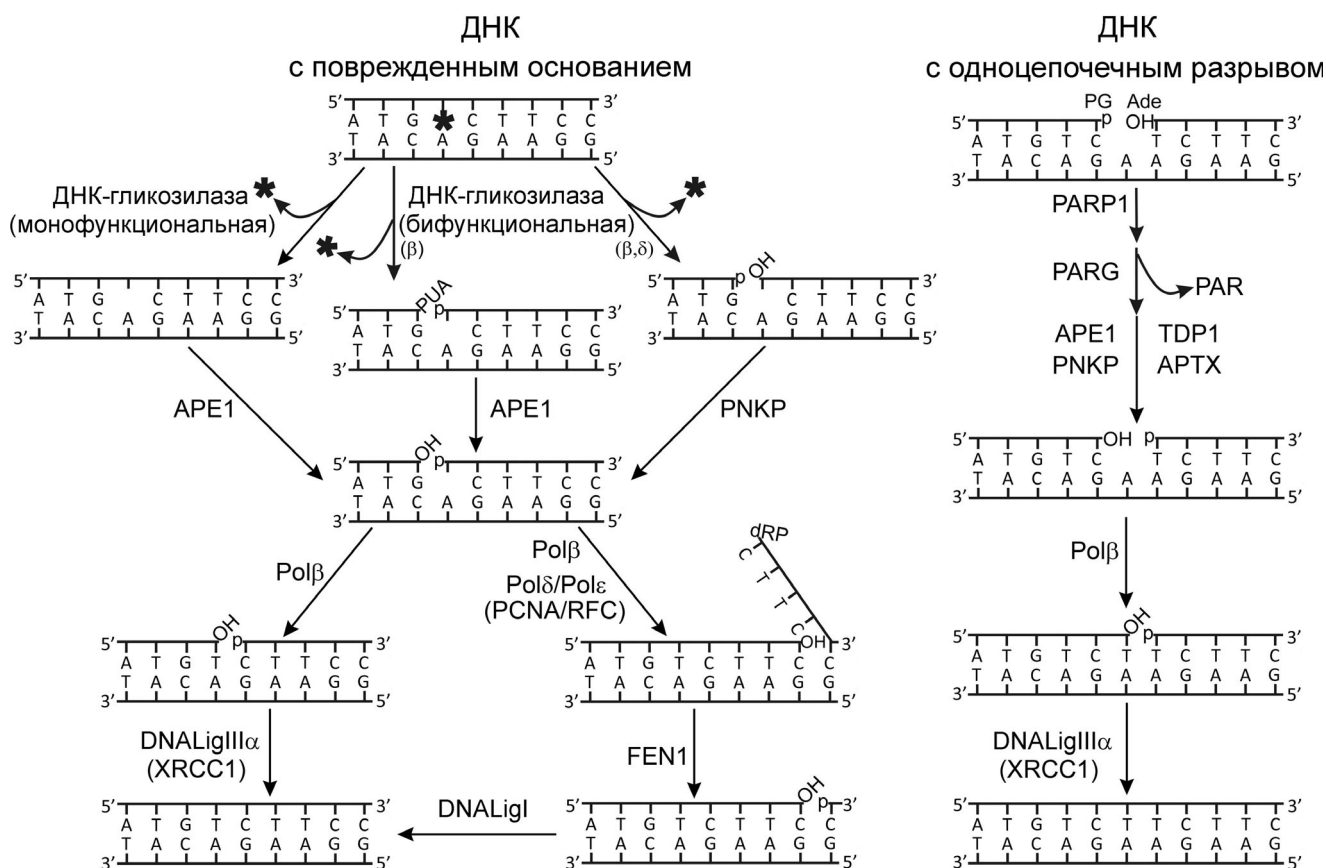


Рис. 1. Схематическое представление путей репарации поврежденных оснований и одноцепочечных разрывов в ДНК. Обозначения белков описаны в тексте. Обозначения концевых блокирующих групп в разрывах ДНК следующие: PUA – 3'-фосфо- α,β -ненасыщенный альдегид, p – 3'-/5'-фосфат, OH – 3'-/5'-ОН-группа, dRP – 5'-дезоксирибозофосфат, PG – 3'-фосфогликолят, Ade – 5'-альдегидная группа. Рисунок воспроизводится из обзора [5] с разрешения издателя

нии которого к одноцепочечным разрывам хромосомной ДНК PARP1 играет главную роль [1, 3]. XRCC1 не имеет ферментативной активности и выполняет функцию «платформы» в организации комплекса BER [3–5]. Практически для всех белков-участников BER локализованы сайты связывания в XRCC1, в формировании которых вовлечены все его структурные фрагменты: N-концевой (NTD), центральный (BRCTa) и C-концевой домены (BRCTb) и неупорядоченные линкеры XL1 и XL2 [4, 5].

Эффективность репарации с помощью многоступенчатого процесса BER зависит от координированного действия ферментов, катализирующих отдельные стадии. Один из механизмов координации предполагает формирование мультибелковых комплексов, «репарасом», с участием ферментов и архитектурных белков, каким является XRCC1 [1, 6]. Ранее было показано, что комплекс XRCC1 с LigIII α критически важен для стабилизации этого фермента и репарации *in vivo* [7, 8]. Этот комплекс был зарегистрирован в клеточном экстракте неравновесным методом гель-фильтрации и рассматривался как самый устойчивый среди белковых комплексов с участием XRCC1 [9]. С использованием равновесного и неравновесного методов нами зарегистрирован комплекс XRCC1 с Pol β , и впервые оценена его стабильность в сравнении с комплексами других белков [10]. Необходимость этого комплекса для эффективной репарации *in vitro* и *in vivo* и взаимной защиты белков от протеасомной деградации была установлена в других работах [11–13]. Учитывая, что сайты связывания Pol β и LigIII α сформированы разными доменами XRCC1 (NTD и BRCTb соответственно) и не перекрываются с сайтами связывания других участников BER, мы предположили существование тройного комплекса этих белков, как устойчивой «платформы» для формирования более динамичных мультибелковых ансамблей [10]. Для подтверждения этой гипотезы в настоящей работе исследовано взаимодействие LigIII α с XRCC1 и Pol β методом флуоресцентного титрования, использованным нами ранее для характеристики комплекса XRCC1 с Pol β [10], чтобы сравнить сродство разных белков друг к другу в одинаковых условиях. Этот равновесный метод позволил зарегистрировать комплексы разных белков-участников BER, не детектируемые часто используемыми неравновесными методами аффинного соосаждения и гель-фильтрации [5, 10]. Кроме этого, мы исследовали роль тройного комплекса в регуляции эффективности SP BER *in vitro* в зависимости от существования XRCC1 в обычной (восстановленной) или окисленной форме. Образование

дисульфидной связи между остатками Cys12 и Cys20 в результате окисления XRCC1 индуцирует структурную реорганизацию NTD и его комплекса с Pol β , как показано с помощью рентгеноструктурного анализа комплекса соответствующих доменов белков, и усиливает сродство белков друг к другу [4]. Блокирование образования окисленной формы XRCC1 (XRCC1ox) в клетках млекопитающих заменой белка XRCC1 дикого типа на Cys12Ala мутант снижает выживаемость клеток в условиях окислительного стресса [14, 15]. Авторы этих исследований предполагают, что образование более прочного комплекса XRCC1ox с Pol β необходимо для эффективной репарации окислительных повреждений ДНК *in vivo*. Однако влияние окисления XRCC1 на собственно процесс репаративного синтеза ДНК до сих пор не изучено.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. В работе использованы [γ - 32 P]АТФ (с удельной радиоактивностью 5 Ки/мкмоль) производства лаборатории биотехнологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; N-оксисукцинимидный эфир 5(6)-карбоксихлорофлуоресцеина (FAM-SE) и трис(2-карбоксиил)фосфин (TCEP) («Sigma», США); глутатион окисленный (GSSG) («ICN Biomedicals», США); реактивы для электрофореза и реактивы, входящие в состав буферных растворов, производства фирмы «Sigma» (США) или отечественного производства (квалификации о.с.ч.). В работе использованы рекомбинантные белки эксцизионной репарации оснований ДНК млекопитающих. Плазмидные векторы для экспрессии в клетках *Escherichia coli* белков APE1 человека и Pol β крысы любезно предоставлены доктором Вильсоном (National Institute of Health, North Carolina, США), XRCC1 человека – доктором Радичеллой (UMR217 CNRS/CEA, Франция) и LigIII α человека – доктором Диановым (Oxford University, Великобритания). Pol β , XRCC1 и APE1 получали как описано ранее [16–18]. LigIII α получали по оригинальному методу, описанному ниже. Конечные препараты белков диализовали против буфера хранения, содержащего 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 200 mM NaCl, 0,5 mM ЭДТА, 5 mM дитиотреитол (DTT) и 40%-ный (v/v) глицерин, и хранили при -30 °C. ДНК-олигонуклеотиды (5'-GGAAGACCCCTGACGTTACCCAACTTAATCGCC-3' – матрица, 5'-GGCGATTAAGTTGGG-3' – праймер 1, 5'-GGCGATTAAGTTGGGT-3' – праймер 2 и 5'-pAACGTCAGGGTCTTCC-3' – запирающий

праймер) были синтезированы в лаборатории Медицинской химии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. ^{32}P -Мечение олигонуклеотидов по 5'-концу было выполнено с использованием $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и T4 полинуклеотидкиназы («Биосан», Россия) по протоколу, рекомендованному производителем. 32-звенные ДНК-дуплексы с одноцепочечным разрывом (nick-ДНК) или однонуклеотидной брешью (gap-ДНК) в середине цепи были подготовлены как описано нами ранее [10].

Получение окисленной формы белка XRCC1. Для получения XRCC1_{ox} использован метод мягкого окисления SH-групп в белках [19]. XRCC1 (100 мкМ) инкубировали с GSSG (10 мМ) в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,8), содержащем 100 мМ NaCl, в течение 18 ч в темноте при 4 °С. Белок диализовали против буфера хранения, не содержащего DTT. Для получения обычной полностью восстановленной формы XRCC1 исходный препарат белка инкубировали с 10 мМ TCEP в течение 18 ч при 4 °С и диализовали против буфера хранения. Содержание SH-групп в препаратах XRCC1 и XRCC1_{ox} анализировали колориметрическим методом с использованием реактива Элмана [20].

Экспрессия и очистка ДНК-лигазы III α . Полноразмерный ядерный белок LigIII α человека с полигистидиновой последовательностью на N-конце экспрессировали в клетках *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta 2. После трансформации плазмидой клетки подращивали при 30 °С в среде LB до A_{600} 0,6 и после индукции 1 мМ изопропил- β -D-1-тиогаалактопиранозидом инкубировали 4 ч при 18 °С; клетки осаждали центрифугированием (7000 об./мин при 4 °С) («Beckman Coulter Inc», США) и хранили при -40 °С. Биомассу оттаивали на льду и ресуспендировали в предварительно охлажденном буфере для лизиса, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 300 мМ NaCl, 1%-ный (v/v) детергент NP-40, 1 мМ β -меркаптоэтанол (β -ME), 10%-ный (v/v) глицерин, 1 мМ фенолметилсульфонил фторид (PMSF), 1 мМ бензамидин (Bz) и таблетку ингибиторного коктейля («Roche», Швейцария). После инкубации с лизоцимом (1,5 мг/мл; «Boehringer Mannheim», Германия) в течение 20 мин во льду клетки разрушали ультразвуком («Vandelin», Германия) до получения гомогенной суспензии, и клеточный дебрис отделяли центрифугированием (18000 об./мин при 4 °С) («Beckman Coulter Inc», США). К супернатанту добавляли имидазол (pH 8,0) до 5 мМ, и сорбировали белки на Ni-сефарозе (Ni Sepharose 6 Fast Flow, «GE Healthcare», Швейцария), уравновешенной буфером А (50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 300 мМ NaCl, 3 мМ β -ME, 1 мМ PMSF, 1 мМ Bz и 5 мМ имидазол). Белки элюи-

ровали градиентом 5–600 мМ имидазола (pH 8,0) в буфере А. Целевой белок отделяли от примесей с помощью последовательных хроматографий на колонках с гепарин-сефарозой (Heparin Sepharose 6 Fast Flow, «GE Healthcare», Швейцария) и ss-ДНК-целлюлозой («USB», США), уравновешенных буфером Б (50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 100 мМ NaCl, 10 мМ β -ME, 0,5 мМ ЭДТА, 5%-ный (v/v) глицерин), используя градиент 0,1–1,0 М NaCl в буфере Б. Анализ фракций проводили с помощью электрофореза в 10%-ном (m/v) Ds-Na-ПААГ. Фракции, содержащие очищенный белок, концентрировали и диализовали против буфера хранения в микродиализных ячейках 10 кДа («Sartorius», Германия). Функциональную активность LigIII α тестировали в реакции лигирования синтетического 32-звенного дуплекса, содержащего одноцепочечный разрыв (nick-ДНК). Реакционную смесь (10 мкл), содержащую 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 7 мМ DTT, 1 мМ АТФ, 50 нМ 5'-[^{32}P]-меченный ДНК-субстрат и 100–400 нМ LigIII α , инкубировали 30 мин при 37 °С. Реакцию инициировали добавлением фермента и останавливали добавлением равного объема буфера для нанесения образцов на денатурирующий ПААГ (90%-ный (v/v) формамид, 20 мМ ЭДТА, 0,05%-ный (m/v) бромфеноловый синий и 0,05%-ный (m/v) ксиленианол). Образцы инкубировали 2 мин при 90 °С, и продукты реакции разделяли электрофорезом в 20%-ном (m/v) ПААГ с мочевиной. Для визуализации гелей и количественного анализа продуктов реакции использовали сканер Turphoon FLA 9500 («GE Healthcare», Швейцария) и программу Quantity One («Bio-Rad», США).

Флуоресцентное мечение ДНК-лигазы III α и исследование образования белковых комплексов методом флуоресцентного титрования. Мечение LigIII α N-оксисукцинимидным эфиром 5(6)-карбоксихлорофлуоресцеина (FAM-SE) по N-концевой аминоксигруппе белка проводили по методу, разработанному нами ранее [10]. Белок диализовали 4 раза против буфера, содержащего 100 мМ Mes (pH 7,0) и 200 мМ NaCl, используя микродиализную ячейку 10 кДа. Реакцию с FAM-SE проводили в этом же буфере, инкубируя 20–50 мкМ LigIII α с 40–200 мкМ реагентом в течение 18 ч при 4 °С в темноте. Реакцию останавливали добавлением к реакционной смеси (30–50 мкл) буфера, содержащего 100 мМ Hepes (pH 8,0), 200 мМ NaCl и 10 мМ DTT, до конечного объема 500 мкл. Белок отделяли от избытка реагента гель-фильтрацией на микроколонке Spin Trap G-25 («GE Healthcare», Швейцария). После концентрирования к белку добавляли глицерин до 40% для хранения при -30 °С и цетиловый эфир по-

лиоксиэтилена Brij 58 («Sigma», США) до 0,001% для предотвращения агрегации белка. Концентрацию белка и степень его мечения определяли спектрофотометрически на приборе CLARIOstar («GMB Labtech GmbH», Германия), используя коэффициенты экстинкции для FAM ϵ_{494} 80445 M⁻¹·см⁻¹ и для LigIII α ϵ_{280} 79300 M⁻¹·см⁻¹. Специфическую активность меченого фермента тестировали в реакции лигирования ³²P-меченой nick-ДНК как описано выше.

Эксперименты по связыванию FAM-LigIII α другими белками выполняли титрованием меченого белка (при фиксированной концентрации 40 нМ) отдельными белками Pol β и XRCC1 (в отсутствие или в присутствии второго партнера в концентрации 200 нМ) или эквимольной смесью XRCC1 и Pol β . Буфер связывания содержал 50 мМ Hepes (pH 8,0), 100 мМ NaCl и 5 мМ DTT. Измерения интенсивности флуоресценции образцов (объемом 12 мкл) проводили в непрозрачных полипропиленовых планшетах («Corning», США) с использованием микропланшетного флуориметра CLARIOstar («GMB Labtech GmbH», Германия). Длина волны возбуждения флуоресценции составляла 485 нм, изменение интенсивности флуоресценции детектировали на длине волны эмиссии 530 нм. В каждом независимом эксперименте измерения интенсивности флуоресценции при каждой концентрации белка-партнера проводились для трех одинаковых образцов. Количественную обработку экспериментальных данных выполняли в программе MARS Data analysis («GMB Labtech GmbH», Германия). Кривые связывания описываются уравнением:

$$F = F_0 + (F_\infty - F_0) / [1 + (EC_{50}/C)^n],$$

где F_0 , F и F_∞ – интенсивность флуоресценции раствора FAM-LigIII α в отсутствие других белков, в присутствии белка-партнера в данной (C) и насыщающей концентрации соответственно, EC_{50} – концентрация белка-партнера, при которой $F - F_0 = (F_\infty - F_0)/2$, n – коэффициент Хилла. Все независимые эксперименты были выполнены не менее трех раз. Кривые связывания по усредненным экспериментальным данным построены в программе OriginPro 8.6; степень связывания, соответствующая максимальному сигналу при насыщающей концентрации белка-партнера ($F_\infty - F_0$), принята за единицу, а степень связывания при данной концентрации определена как отношение $(F - F_0)/(F_\infty - F_0)$.

Регистрация продуктов репарации ДНК, содержащей однонуклеотидную брешь, в присутствии ферментов и белков-участников SP BER. Стандартная реакционная смесь (объемом

10 мкл) содержала 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 50 мМ NaCl, 6 мМ MgCl₂, 50 нМ ³²P-меченную gap-ДНК, 10–50 нМ Pol β . Реакцию инициировали добавлением смеси нуклеотидов dATP, dGTP, dTTP и ddCTP до конечной концентрации каждого нуклеотида 10 мМ. Смеси инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. При изучении влияния белков на выход продуктов стандартная смесь содержала 50 нМ Pol β , 50–200 нМ XRCC1 или XRCC1 α , 10–50 нМ APE1, 10–50 нМ LigIII α (в присутствии 1 мМ АТФ), как указано в подписях к рисункам. Реакцию останавливали добавлением равного объема буфера для нанесения образцов на денатурирующий ПААГ. Образцы инкубировали 2 мин при 90 °С, и продукты реакции разделяли электрофорезом в денатурирующем 20%-ном (m/v) ПААГ с мочевиной. Гели визуализировали с помощью сканера Typhoon FLA 9500 и анализировали выход продуктов реакции с помощью программы Quantity One.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование взаимодействия ДНК-лигазы III α с белком XRCC1 и ДНК-полимеразой β . Взаимодействие LigIII α с архитектурным белком XRCC1 и ферментом Pol β , катализирующим в процессе «короткозаплаточной» репарации синтез субстрата LigIII α , было исследовано методом флуоресцентного титрования путем измерения интенсивности флуоресценции FAM-меченой LigIII α в отсутствие и в присутствии немеченых белков (XRCC1, Pol β). Для мечения LigIII α N-оксисукцинимидным эфиром 5(6)карбоксийфлуоресцеина (FAM-SE) преимущественно по N-концевой аминокислоте белка реакцию модификации проводили при pH 7,0 [21]. Условия реакции были оптимизированы варьированием концентрации белка и реагента для получения полностью активного белка, содержащего не более одного остатка флуоресцеина на молекулу белка. Такой препарат со стехиометрией мечения ~0,5 моль FAM на 1 моль белка был получен при инкубации 50 мкМ белка с 200 мкМ реагента.

Типичные кривые титрования FAM-LigIII α немечеными белками (LigIII α , Pol β и XRCC1) и соответствующие кривые связывания белков представлены на рис. 2. Максимальное увеличение интенсивности флуоресценции меченого белка в присутствии насыщающих концентраций белков-партнеров не превышало 20%, в отличие от зарегистрированных нами ранее для других FAM-меченых белков изменений в 1,5–2 раза [10]. Такое различие может быть обусловле-

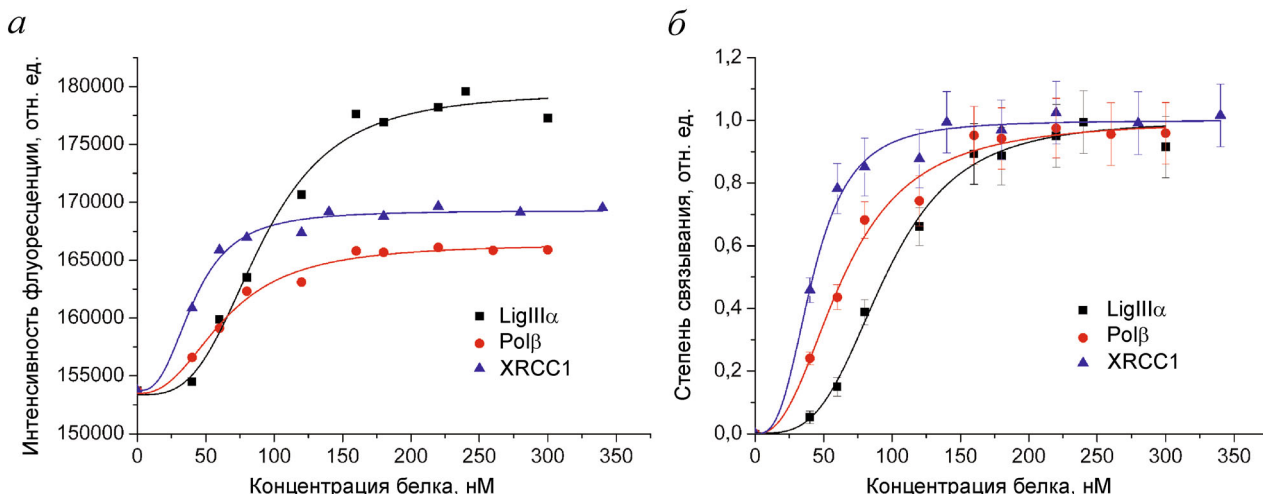


Рис. 2. Исследование гомо- и гетеро-ассоциации LigIII α с белками-участниками BER методом флуоресцентного титрования. На панели *a* представлены типичные экспериментальные кривые титрования FAM-меченой LigIII α (40 нМ) немечеными белками (LigIII α , Pol β и XRCC1), на панели *б* – кривые связывания, рассчитанные из данных 3–5 независимых экспериментов (на графиках приведены средние значения \pm стандартные отклонения).

С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

но удаленностью флуорофора в FAM-LigIII α от C-концевого BRCT-домена, на котором локализованы сайты как гомо-ассоциации LigIII α , так и ее гетеро-ассоциации с белком XRCC1 [5]. Эффективная концентрация белка-партнера (EC_{50}), при которой увеличение интенсивности флуоресценции по сравнению с начальным уровнем ($F - F_0$) составляет половину от максимального увеличения при насыщающей концентрации [$(F_{\infty} - F_0)/2$], представляет собой кажущуюся

равновесную константу диссоциации комплекса. Сравнение этих характеристик для разных белков (таблица) указывает на образование более прочных комплексов при гетеро-ассоциации, чем при гомо-ассоциации LigIII α . Средство LigIII α к XRCC1 ($EC_{50} = 42$ нМ) в 1,5 раза выше, чем к Pol β ($EC_{50} = 64$ нМ). В то же время XRCC1 обладает более высоким сродством к Pol β ($EC_{50} = 23$ нМ [10]), чем к LigIII α . В целом, комплексы белка XRCC1 с Pol β и LigIII α являются самыми прочными среди всех комплексов белков-участников BER, охарактеризованных нами одним и тем же равновесным методом [10].

Чтобы зарегистрировать формирование тройного комплекса XRCC1 с LigIII α и Pol β к смеси FAM-LigIII α с одним из партнеров (Pol β или XRCC1), присутствующим в высокой (практически насыщающей) концентрации, добавляли в возрастающей концентрации третий белок (XRCC1 или Pol β). В каждом эксперименте измеряли параллельно интенсивность флуоресценции FAM-LigIII α при титровании соответствующим белком. Более высокий нулевой сигнал флуоресценции (F_0) для смеси FAM-LigIII α с Pol β или XRCC1 в сравнении с FAM-LigIII α (рис. 3, *a* и *б*) обусловлен образованием двойного комплекса. Увеличение этого сигнала при добавлении XRCC1 к смеси FAM-LigIII α с Pol β (рис. 3, *a*) свидетельствует о взаимодействии XRCC1 с FAM-LigIII α , несмотря на присутствие в смеси более предпочтительного для XRCC1 партнера в избыточной концентрации. Величи-

Количественные характеристики взаимодействия LigIII α с белками BER

Меченый белок ^a	Белок-партнер ^б	EC_{50} ^в , нМ
FAM-LigIII α	LigIII α	91 \pm 16
FAM-LigIII α	Pol β	64 \pm 11
FAM-LigIII α	XRCC1	42 \pm 8
FAM-LigIII α	Pol β + XRCC1	46 \pm 8
FAM-LigIII α + Pol β	XRCC1	70 \pm 13
FAM-LigIII α + XRCC1	Pol β	н.о. ^г

^a Титрование FAM-LigIII α (40 нМ) белком-партнером проводилось в отсутствие или в присутствии предварительно добавленного белка (Pol β или XRCC1) в избыточной концентрации (200 нМ).

^б Титрование FAM-LigIII α отдельными белками или эквивалентной смесью Pol β и XRCC1.

^в Кажущиеся равновесные константы диссоциации комплексов белков. Приведены средние значения \pm стандартные отклонения 3–5 независимых экспериментов.

^г Не определена из-за отсутствия изменения интенсивности флуоресценции.

на EC_{50} для связывания FAM-LigIII α с XRCC1 в тройной смеси (70 нМ) ниже суммарной концентрации XRCC1, необходимой для независимого связывания половины FAM-LigIII α (42 нМ) и половины Pol β (не менее 100 нМ), что указывает на формирование тройного комплекса белков. Отсутствие изменения нулевого сигнала флуоресценции смеси FAM-LigIII α с XRCC1 при добавлении Pol β (рис. 3, б) свидетельствует о том, что связывание Pol β с XRCC1 при образовании тройного комплекса не оказывает существенного влияния на взаимодействие между XRCC1 и FAM-LigIII α . Титрование FAM-LigIII α эквимольной смесью Pol β и XRCC1 показало увеличение интенсивности флуоресценции до более высокого уровня, чем при титровании белком Pol β (рис. 3, в), что указывает на

различное окружение флуорофора при образовании двойного комплекса FAM-LigIII α с Pol β или тройного комплекса с Pol β и XRCC1. Величина EC_{50} для связывания FAM-LigIII α в тройной смеси (46 нМ) сопоставима с величиной EC_{50} для ее двойного комплекса с XRCC1 (42 нМ). Совокупность этих фактов свидетельствует о преимущественном взаимодействии LigIII α с белком XRCC1 в их тройном комплексе с Pol β . Таким образом, впервые показано прямое взаимодействие между ферментами Pol β и LigIII α , катализирующими последовательные стадии SP BER, а также образование их тройного комплекса с координирующим белком XRCC1 (Pol β • XRCC1 • LigIII α). Ранее было показано прямое взаимодействие Pol β с ферментом LigI, завершающим LP BER [22].

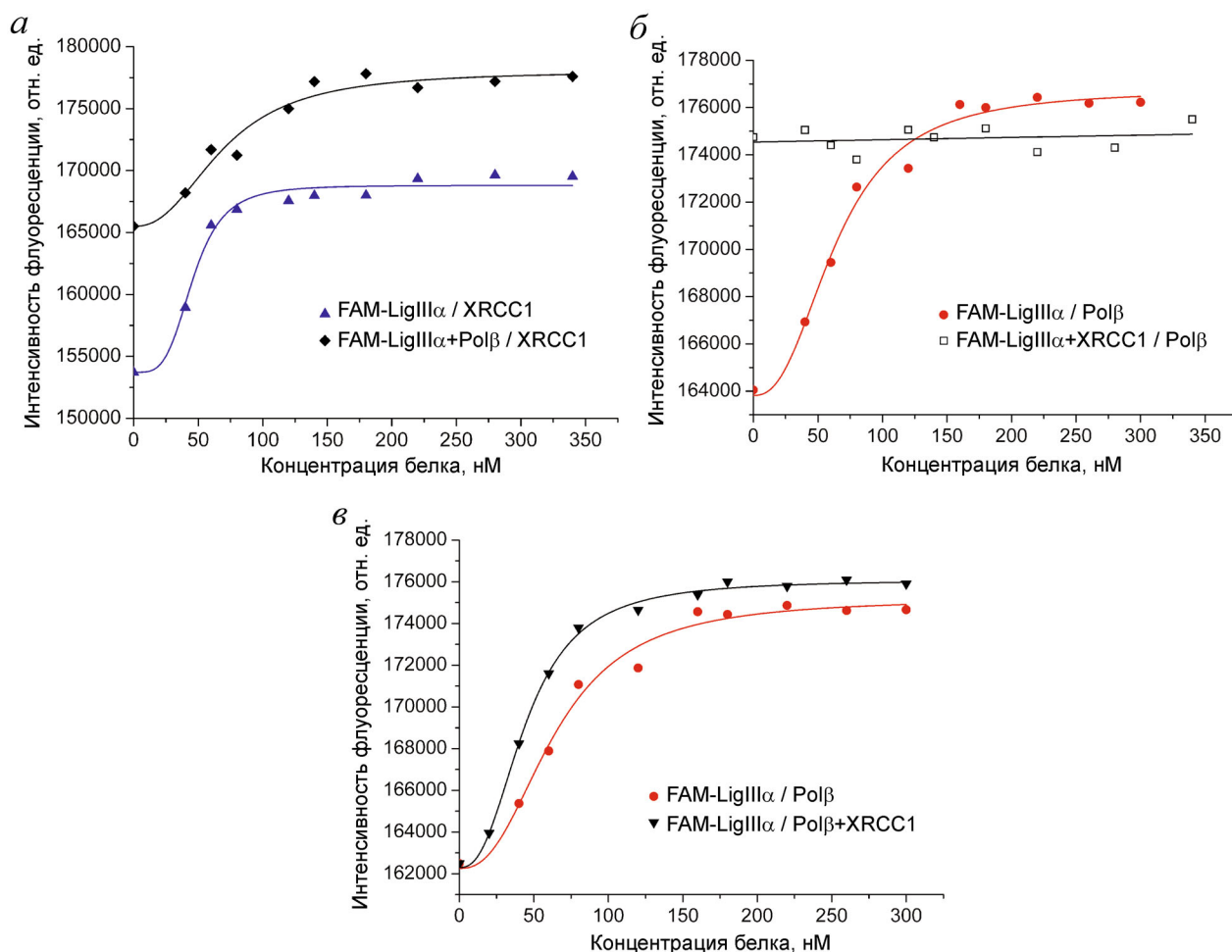


Рис. 3. Исследование формирования тройного комплекса LigIII α с Pol β и XRCC1. Типичные кривые флуоресцентного титрования (а) FAM-LigIII α (40 нМ) в отсутствие и в присутствии Pol β (200 нМ) белком XRCC1; (б) FAM-LigIII α (40 нМ) в отсутствие и в присутствии XRCC1 (200 нМ) белком Pol β ; (в) FAM-LigIII α (40 нМ) белком Pol β или эквимольной смесью белков Pol β и XRCC1. Кривые связывания, рассчитанные из усредненных данных независимых экспериментов, приведены на рис. S1 в Приложении к статье.

С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

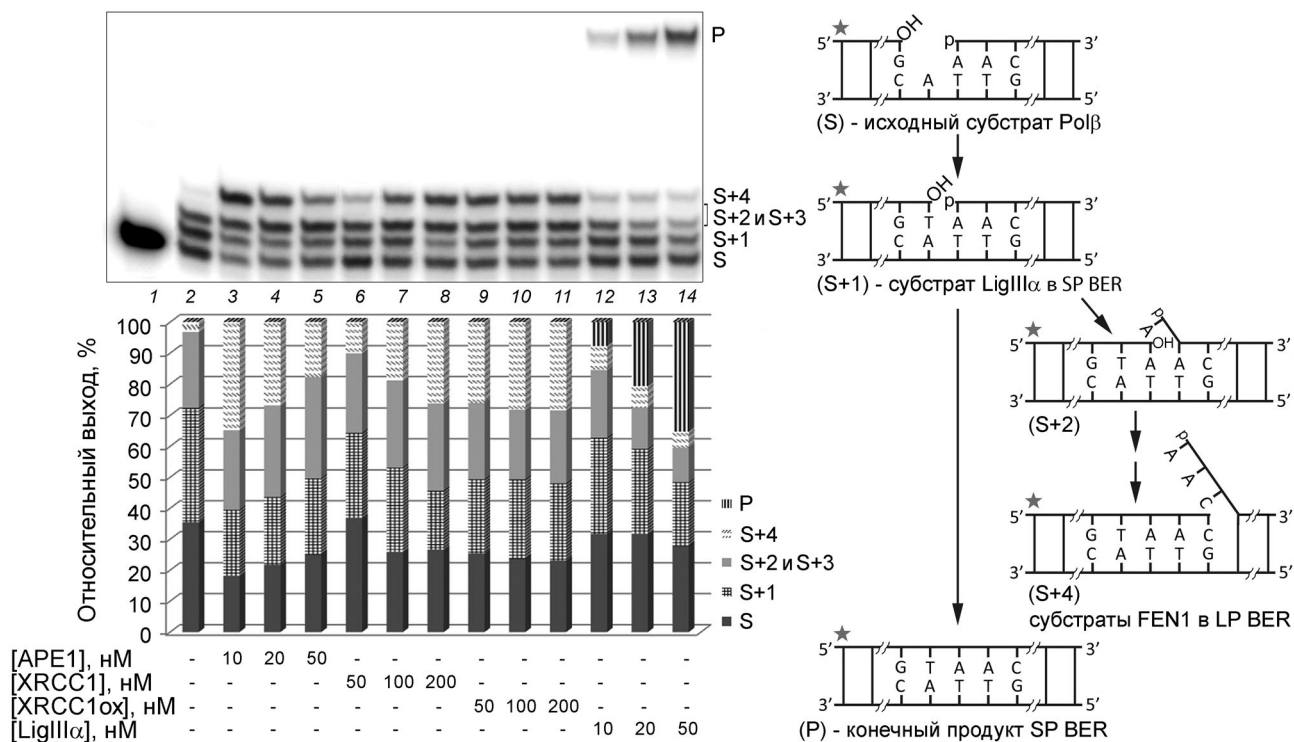


Рис. 4. Влияние на активность Polβ в репаративном синтезе ДНК белков-участников BER при их различных концентрациях. Представлены радиоавтограф геля после разделения продуктов репаративного синтеза ДНК, катализируемого Polβ в отсутствие и в присутствии других белков, и гистограмма относительных выходов продуктов удлинения и лигирования цепи ДНК в соответствующих образцах. ³²P-меченную gar-ДНК (50 нМ) инкубировали с Polβ (50 нМ) и смесью dATP, dGTP, dTTP и ddCTP (10 мкМ каждого) в течение 30 мин при 37 °С (дорожки 2–14) в отсутствие или в присутствии APE1 (10–50 нМ), XRCC1 или XRCC1ox (50–200 нМ) или LigIIIα (10–50 нМ). Остальные условия реакции описаны в Методах исследования. Обозначения: S – ³²P-меченный праймер (15-мер) в исходной ДНК, S+1 – S+4 – продукты удлинения праймера, P – конечный продукт репарации цепи после лигирования (32-мер); соответствующие структуры дуплексов (интермедиатов разных стадий SP/LP BER) приведены на схеме справа, где звездочкой показано положение ³²P-метки. Для продуктов включения одного/двух остатков dAMP (S+2 и S+3), не разрешенных в геле, приведен их суммарный выход. Представлены данные одного из трех независимых экспериментов; отклонения значений относительных выходов от средних значений составляли 2–10%

Исследование влияния на репаративный синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой β, других белков. Для исследования влияния белковых комплексов различного состава на активность Polβ в репаративном синтезе предварительно были найдены концентрации отдельных белков, при которых наблюдали активацию Polβ (рис. 4). Условия реакции были оптимизированы по концентрации Polβ и времени инкубации, чтобы тестировать продукты «коротко-» и «длиннозаплаточного» синтеза ДНК (заполнения бреши в gar-ДНК и синтеза с вытеснением цепи соответственно) при неполном превращении субстрата. Для ограничения длины продуктов синтеза с вытеснением цепи включением четырех нуклеотидов, реакцию проводили в присутствии соответствующего дидезоксинуклеотида (ddCTP). Стимулирующее влияние обычной формы XRCC1 на синтез ДНК с вытеснением цепи возрастало с увеличением концен-

трации белка от 50 до 200 нМ: доля продукта, соответствующего включению одного нуклеотида в репарируемую цепь (S+1) уменьшалась, а доля продукта, соответствующего включению 4-х нуклеотидов (S+4) увеличивалась (рис. 4, дорожки 6–8). В случае окисленной формы XRCC1 (XRCC1ox) не обнаружено зависимости эффектов от концентрации белка, варьируемой в том же диапазоне (рис. 4, дорожки 9–11). Для сравнения XRCC1 и в последующих экспериментах (в присутствии других участников) была выбрана концентрация 100 нМ, при которой наблюдали влияние обычной формы на общую эффективность превращения исходного субстрата и различия двух форм в оказываемых эффектах. LigIIIα наряду с каталитическим превращением продукта заполнения бреши (S+1) в конечный продукт «короткозаплаточной» репарации (P) стимулировала синтез с вытеснением цепи; этот эффект уменьшался с уве-

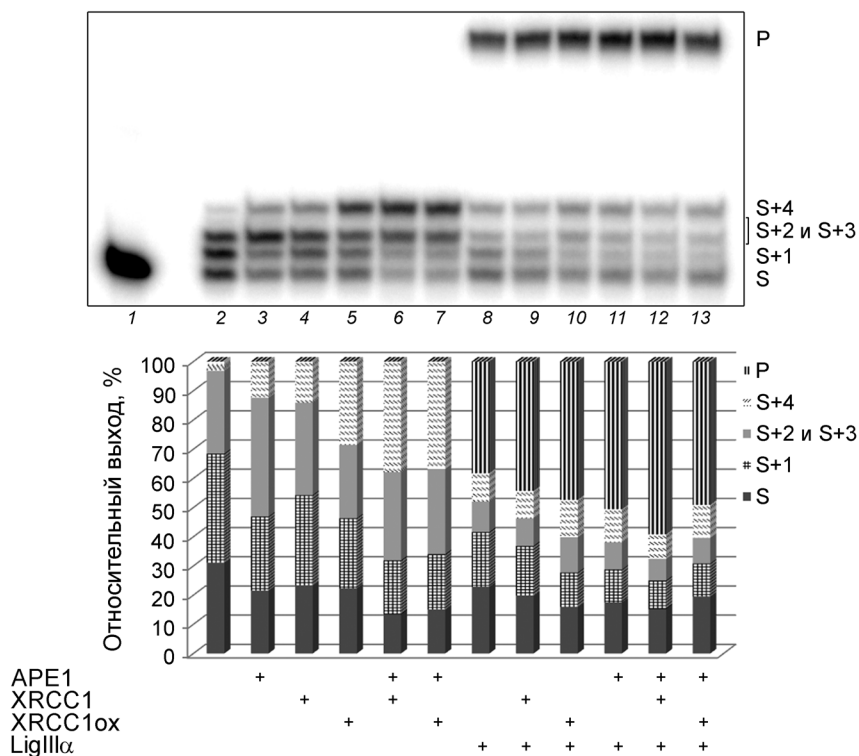


Рис. 5. Влияние белков-участников BER на репаративный синтез ДНК, катализируемый Pol β . Представлены радиоавтограф геля после разделения продуктов репаративного синтеза ДНК, катализируемого Pol β в отсутствие и в присутствии других белков (APE1, XRCC1, XRCC1ox и LigIII α), и гистограмма относительных выходов продуктов удлинения и лигирования цепи ДНК в соответствующих образцах. 32 P-меченую гар-ДНК (50 нМ) инкубировали с Pol β (50 нМ) и смесью dATP, dGTP, dTTP и ddCTP (10 мкМ каждого) в течение 30 мин при 37°C (дорожки 2–13), в отсутствие или в присутствии (+) APE1 (50 нМ), разных форм XRCC1 (100 нМ) или LigIII α (50 нМ). Остальные условия реакции описаны в «Методах исследования». Для продуктов включения одного/двух остатков dAMP (S+2 и S+3), не разрешенных в геле, приведен их суммарный выход. Обозначения регистрируемых в геле ДНК расшифрованы в подписи к рис. 4. Представлены данные одного из трех независимых экспериментов; отклонения значений относительных выходов от средних значений составили 2–10%

личением концентрации фермента из-за более эффективного лигирования (рис. 4, дорожки 12–14). В качестве оптимальной была выбрана концентрация 50 нМ, при которой заметно уменьшалась доля исходного субстрата. Стимулирующее влияние APE1 на синтез ДНК с вытеснением цепи и общую эффективность превращения исходного субстрата уменьшалось с увеличением концентрации белка от 10 до 50 нМ из-за 3'-5'-экзонуклеазной активности фермента (рис. 4, дорожки 3–5), но еще наблюдалось при концентрации 50 нМ, используемой в последующих экспериментах.

Как видно из данных, представленных на рис. 5, отдельные белки APE1, XRCC1, XRCC1ox и LigIII α оказывают сравнимые эффекты на общую эффективность превращения исходного субстрата: его доля в их присутствии уменьшается на ~10% (дорожки 3, 4, 5 и 8 по сравнению с дорожкой 2). По стимулирующему

действию на синтез с вытеснением цепи (увеличению выхода S+4) белки можно расположить в следующий ряд: XRCC1ox > XRCC1 > APE1 > LigIII α . Окисленная форма XRCC1 значительно превосходит обычную форму в этом действии: доля S+4 в присутствии XRCC1ox больше в 2 раза, чем в присутствии XRCC1. Такое различие может быть объяснено более высоким средством XRCC1ox к Pol β [4].

APE1 усиливает стимулирующий эффект XRCC1 на синтез с вытеснением цепи в большей степени, чем стимулирующий эффект XRCC1ox: доля S+4 увеличивается в 2,7 раза в первом случае и в 1,3 раза во втором (рис. 5, дорожки 6 и 7 по сравнению с дорожками 4 и 5). В результате этого в присутствии APE1 нивелируются различия между разными формами XRCC1. Формирование тройного комплекса XRCC1 с Pol β и APE1 показано нами ранее [10]. Сайт связывания APE1 локализован в линкер-

ной области (XL1), примыкающей к *N*-концевому домену XRCC1 (NTD), где локализован сайт связывания Pol β [4]. Не исключено, что окисление XRCC1 индуцирует перестройку не только NTD, где образуется (–S–S–) связь между остатками Cys12 и Cys20, но и в трехмерной структуре белка в целом. Более прочное связывание XRCC1ox с Pol β может оказывать негативное влияние на формирование их тройного комплекса с APE1.

Совместное действие LigIII α и XRCC1ox на общую эффективность превращения субстрата несколько превосходит действие LigIII α и XRCC1 (рис. 5, дорожка 10 по сравнению с дорожкой 9). LigIII α подавляет стимулирующий эффект обеих форм XRCC1 на синтез с вытеснением цепи, но превосходство XRCC1ox над XRCC1 в стимуляции этого синтеза сохраняется и в присутствии LigIII α (дорожки 9 и 10 по сравнению с дорожками 4 и 5 и по сравнению друг с другом). В свою очередь, обе формы XRCC1 усиливают активность LigIII α : выход конечного продукта репарации увеличивается на 6% и 9% в присутствии XRCC1 и XRCC1ox соответственно (дорожки 9 и 10 по сравнению с дорожкой 8). Интересно отметить, что суммарные выходы лигируемого интермедиата (S+1) и конечного продукта «короткозаплаточной» репарации (P) очень близки в присутствии LigIII α и XRCC1 (61%) или LigIII α и XRCC1ox (59%), но степень превращения S+1 в конечный продукт выше во втором случае (72% и 80% соответственно). Можно предположить, что формирование тройного комплекса белков и стабилизация взаимодействия Pol β с XRCC1ox (по сравнению с комплексом Pol β с XRCC1) способствуют передаче ДНК-интермедиата от одного фермента другому.

Общая эффективность превращения субстрата при совместном присутствии APE1 и LigIII α несколько превышает соответствующие уровни в присутствии отдельных белков (рис. 5, дорожка 11 по сравнению с дорожками 3 и 8). APE1 стимулирует активность LigIII α более эффективно, чем XRCC1 и XRCC1ox: выход конечного продукта увеличивается на 12% (дорожка 11 по сравнению с дорожками 9 и 10). В свою очередь, LigIII α подавляет стимулирующий эффект APE1 на синтез нелигируемых интермедиатов (S+2, S+3 и S+4): их выход в присутствии APE1 и LigIII α в 2,5 раза ниже, чем в присутствии APE1 и почти такой же, как в присутствии LigIII α (дорожка 11 по сравнению с дорожками 3 и 8). Активирующее действие APE1 на лигирование ДНК известно для LigI и указывает на активную роль фермента, ответственного за деблокирование 3'-концов в разрывах, в координации всего процесса репарации [23].

Наличие в реакционной смеси всех белковых участников SP BER показывает наиболее эффективную репарацию в комплексе с обычной формой XRCC1: в ее присутствии выход конечного продукта на 10% выше, чем в присутствии XRCC1ox (рис. 5, дорожка 12 по сравнению с дорожкой 13). Кроме этого, эффективность репарации в присутствии APE1, LigIII α и XRCC1 выше, чем в присутствии APE1 и LigIII α (на 9%) или LigIII α и XRCC1 (на 15%) (дорожка 12 по сравнению с дорожками 11 и 9). Такой результат может быть обусловлен комбинацией более сильного действия APE1 по сравнению с XRCC1 или XRCC1ox на активность LigIII α и пониженным стимулирующим действием XRCC1 по сравнению с XRCC1ox на синтез нелигируемых ДНК-интермедиатов, что в целом может указывать на формирование в случае XRCC1 более устойчивого мультибелкового ансамбля с участием всех белков. Действительно, распределение продуктов в присутствии LigIII α и XRCC1ox меняется незначительно при добавлении APE1 (дорожка 10 по сравнению с дорожкой 13). Таким образом, влияние окисления белка XRCC1 на эффективность репарации ДНК-субстрата, катализируемой Pol β по «короткозаплаточному» маршруту, зависит от состава «репарасомы».

С использованием равновесного метода флуоресцентного титрования нами впервые показано образование *in vitro* тройного комплекса ключевых участников SP BER – архитектурного белка XRCC1 с ферментами Pol β и LigIII α . Pol β и LigIII α , прямое взаимодействие которых в отсутствие XRCC1 зарегистрировано впервые, образуют менее прочный комплекс по сравнению с комплексами Pol β -XRCC1 и LigIII α -XRCC1. Эти результаты объясняют, почему образование тройного комплекса может обеспечить более эффективную координацию заключительных стадий процесса BER. Тройной комплекс белков не был зарегистрирован в цельноклеточном экстракте [9], что может быть обусловлено его нестабильностью в неравновесных условиях гель-фильтрации и/или дестабилизирующим действием других белков экстракта. В то же время, в другой работе показано совместное присутствие XRCC1, Pol β и LigIII α в целом ряде мультибелковых комплексов BER, выделенных из ядерных экстрактов [24]. В пользу существования тройного комплекса *in vivo* указывает синхронная локализация XRCC1, Pol β и LigIII α на повреждениях ДНК [25].

Стабильность комплекса XRCC1 с Pol β регулируется окислением архитектурного белка с образованием дисульфидной связи между остатками Cys12 и Cys20 в *N*-концевом домене, где

локализован сайт связывания Pol β [4]. XRCC1 α присутствует в клетках млекопитающих, и от относительного содержания этой формы XRCC1 зависит цитотоксичность окислительных агентов, обусловленная дефицитом BER [14, 15]. Значительное различие клеток, экспрессирующих XRCC1 дикого типа или его Cys12Ala мутант (не образующий окисленной формы), в их выживаемости обнаружено лишь в экстремальных условиях окисления — при подавлении активности системы, синтезирующей глутатион [15]. Показано, что наличие окисленной формы XRCC1 ускоряет аккумуляцию Pol β на повреждениях ДНК [14, 15], но до сих пор не установлено как окислительная модификация XRCC1 может влиять на формирование репаративных комплексов и собственно процесс репарации. С использованием реконструированной системы мы показали, что от образования тройного комплекса и окисления белка XRCC1 зависит эффективность репарации ДНК по «короткозаплаточному» маршруту BER. XRCC1 α превосходит обычную форму XRCC1 в стимулирующем действии на каталитическую активность Pol β и LigIII α . Однако в присутствии APE1 окисление XRCC1 снижает выход конечного продукта репарации. Таким образом, стимуляция репаративного синтеза ДНК окислением XRCC1 может иметь значение для эффективного восстановления некоторых повреждений ДНК. Так, репарация поврежденных оснований, удаляемых бифункциональными ДНК-гликозилазами по механизму β/δ элиминации, и ряда одноцепочечных разрывов не требует участия APE1 (рис. 1).

Состав белковых комплексов BER зависит от типа и уровня повреждений ДНК, и репарация при высоких уровнях любых повреждений требует участия PARP1 для более эффективной сборки репаративных комплексов [24]. Уровень автомодификации PARP1 синтезируемым полимером ADP-рибозы (PAR) влияет на сродство PARP1 к ДНК-интермедиатам BER и рассматривается как фактор регуляции процесса репарации ДНК [1, 3]. XRCC1 обладает высоким сродством к PAR и играет первостепенную роль в сборке комплексов репарации с участием PARP1 [26]. Кроме этого, XRCC1 является эффективной мишенью ADP-рибозилирования и регулирует уровень автомодификации PARP1, подавляя элонгацию PAR [27]. Как нами недавно установлено, окисление XRCC1 оказывает негативное влияние на взаимодействие этого белка с PAR и акцепторную активность в реакции ADP-рибозилирования, что подавляет ингибирующее действие белка на автомодификацию PARP1 [28]. Различия между разными фор-

мами XRCC1 в их способности регулировать уровень автомодификации PARP1 усиливается в присутствии Pol β [28], что указывает на возможную кооперацию XRCC1 и Pol β в этом процессе. Таким образом, соотношение уровней XRCC1 и XRCC1 α может регулировать время жизни комплекса PAR–PARP1 с поврежденной ДНК. В настоящем исследовании мы обнаружили, что присутствие в большинстве исследованных комплексов XRCC1 α вместо XRCC1 увеличивает долю нелигируемых ДНК-интермедиатов, что требует их более эффективной репарации в повторном цикле. Их репарация может происходить по «длиннозаплаточному» маршруту с участием Pol β и FEN1. В свою очередь, активность Pol β в LP BER регулируется PARP1 и его PARилированием: PARP1 подавляет синтез ДНК и FEN1-зависимую стимуляцию репарации, но его ингибирующее действие снижается при автомодификации PARP1 [29]. В то же время взаимодействие PARP1 с ДНК-интермедиатами SP BER не влияет на эффективность репарации по этому маршруту из-за отсутствия ингибирующего действия PARP1 на dRp-лиазную активность Pol β и лигирующую активность LigIII α [29–31]. Таким образом, обеспечивая тонкую регуляцию уровня автомодификации PARP1, окисление XRCC1 может способствовать более эффективной репарации нелигируемых ДНК-интермедиатов в повторном цикле с участием PARP1. Совокупность результатов ранее проведенного [28] и настоящего исследования позволяет заключить, что окислительно-восстановительный статус XRCC1 может влиять на эффективность BER как на стадии формирования репаративных комплексов регуляцией уровня автомодификации PARP1, так и на стадии репаративного синтеза.

Финансирование. Нарботка рекомбинантных белков для исследования выполнена при поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. (№ АААА-А17-117020210022-4); исследование белок-белковых взаимодействий поддержано грантом Российского Научного Фонда (проект № 19-14-00107).

Благодарности. Авторы благодарны доктору С. Вильсону (Dr. S.H. Wilson, National Institute of Health, North Carolina, США), доктору Х.П. Радичелле (Dr. J.P. Radicella, UMR217 CNRS/CEA, Франция) и доктору Г. Дианову (Dr. G. Dianov, Oxford University, UK) за предоставленные плазмидные векторы для экспрессии белков. Авторы выражают глубокую благодарность студенту Новосибирского государственного университета

Чжао Минсин за участие в экспериментах по флуоресцентному титрованию.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит исследований с участием людей

или использованием животных в качестве объектов.

Приложение к статье. Дополнительные материалы размещены в электронной версии журнала на сайтах: <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>; <https://link.springer.com/journal/10541>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abbotts, R., and Wilson, D.M. 3rd (2017) Coordination of DNA single strand break repair, *Free Radic. Biol. Med.*, **107**, 228–244, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.039.
- Whitaker, A.M., Schaich, M.A., Smith, M.R., Flynn, T.S., and Freudenthal, B.D. (2017) Base excision repair of oxidative DNA damage: from mechanism to disease, *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, **22**, 1493–1522, doi: 10.2741/4555.
- Caldecott, K.W. (2014) DNA single-strand break repair, *Exp. Cell. Res.*, **329**, 2–8, doi: 10.1016/j.yexcr.2014.08.027.
- London, R.E. (2015) The structural basis of XRCC1-mediated DNA repair, *DNA Repair (Amst.)*, **30**, 90–103, doi: 10.1016/j.dnarep.2015.02.005.
- Moor, N.A., and Lavrik, O.I. (2018) Protein–protein interactions in DNA base excision repair, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 411–422, doi: 10.1134/S0006297918040120.
- Dutta, A., Yang, C., Sengupta, S., Mitra, S., and Hegde, M.L. (2015) New paradigms in the repair of oxidative damage in human genome: mechanisms ensuring repair of mutagenic base lesions during replication and involvement of accessory proteins, *Cell. Mol. Life Sci.*, **72**, 1679–1698, doi: 10.1007/s00018-014-1820-z.
- Caldecott, K.W., McKeown, C.K., Tucker, J.D., Ljungquist, S., and Thompson, L.H. (1994) An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III, *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 68–76, doi: 10.1128/mcb.14.1.68.
- Kubota, Y., and Horiuchi, S. (2003) Independent roles of XRCC1's two BRCT motifs in recovery from methylation damage, *DNA Repair (Amst.)*, **2**, 407–415, doi: 10.1016/s1568-7864(02)00242-2.
- Parsons, J.L., Dianova, I.I., Allinson, S.L., and Dianov, G.L. (2005) DNA polymerase beta promotes recruitment of DNA ligase III alpha-XRCC1 to sites of base excision repair, *Biochemistry*, **44**, 10613–10619, doi: 10.1021/bi050085m.
- Moor, N.A., Vasil'eva, I.A., Anarbaev, R.O., Antson, A.A., and Lavrik, O.I. (2015) Quantitative characterization of protein-protein complexes involved in base excision DNA repair, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 6009–6022, doi: 10.1093/nar/gkv569.
- Kubota, Y., Nash, R.A., Klungland, A., Schär, P., Barnes, D.E., and Lindahl, T. (1996) Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein, *EMBO J.*, **15**, 6662–6670, doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb01056.x.
- Wong, H.K., and Wilson, D.M. 3rd (2005) XRCC1 and DNA polymerase beta interaction contributes to cellular alkylating-agent resistance and single-strand break repair, *J. Cell. Biochem.*, **95**, 794–804, doi: 10.1002/jcb.20448.
- Fang, Q., Inanc, B., Schamus, S., Wang, X.H., Wei, L., Brown, A.R., Svilar, D., Sugrue, K.F., Goellner, E.M., Zeng, X., Yates, N.A., Lan, L., Vens, C., and Sobol, R.W. (2014) HSP90 regulates DNA repair via the interaction between XRCC1 and DNA polymerase beta, *Nat. Commun.*, **5**, 5513, doi: 10.1038/ncomms6513.
- Horton, J.K., Stefanick, D.F., Gassman, N.R., Williams, J.G., Gabel, S.A., Cuneo, M.J., Prasad, R., Kedar, P.S., Deroose, E.F., Hou, E.W., London, R.E., and Wilson, S.H. (2013) Preventing oxidation of cellular XRCC1 affects PARP-mediated DNA damage responses, *DNA Repair (Amst.)*, **12**, 774–785, doi: 10.1016/j.dnarep.2013.06.004.
- Horton, J.K., Seddon, H.J., Zhao, M.L., Gassman, N.R., Janoshazi, A.K., Stefanick, D.F., and Wilson, S.H. (2017) Role of the oxidized form of XRCC1 in protection against extreme oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.*, **107**, 292–300, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.005.
- Kumar, A., Widen, S.G., Williams, K.R., Kedar, P., Karpel, R.L., and Wilson, S.H. (1990) Studies of the domain structure of mammalian DNA polymerase beta. Identification of a discrete template binding domain, *J. Biol. Chem.*, **265**, 2124–2131.
- Belousova, E.A., Vasil'eva, I.A., Moor, N.A., Zatsopin, 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, doi: 10.1371/journal.pone.0068576.
- Strauss, P.R., Beard, W.A., Patterson, T.A., and Wilson, S.H. (1997) Substrate binding by human apurinic/aprimidinic endonuclease indicates a Briggs-Haldane mechanism, *J. Biol. Chem.*, **272**, 1302–1307, doi: 10.1074/jbc.272.2.1302.
- Chim, N., Harmston, C.A., Guzman, D.J., and Goulding, C.W. (2013) Structural and biochemical characterization of the essential DsbA-like disulfide bond forming protein from *Mycobacterium tuberculosis*, *BMC Struct. Biol.*, **13**, 23, doi: 10.1186/1472-6807-13-23.
- Wunderlich, M., and Glockshuber, R. (1993) Redox properties of protein disulfide isomerase (DsbA) from *Escherichia coli*, *Protein Sci.*, **2**, 717–726, doi: 10.1002/pro.5560020503.
- Haugland, R.P. (2005) *The Handbook – a Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 10th edn., Invitrogen Corp., USA.
- Dimitriadis, E.K., Prasad, R., Vaske, M.K., Chen, L., Tomkinson, A.E., Lewis, M.S., and Wilson, S.H. (1998) Thermodynamics of human DNA ligase I trimerization and association with DNA polymerase beta, *J. Biol. Chem.*, **273**, 20540–20550, doi: 10.1074/jbc.273.32.20540.
- Ranalli, T.A., Tom, S., and Bambara, R.A. (2002) AP endonuclease 1 coordinates flap endonuclease 1 and DNA ligase I activity in long patch base excision repair, *J. Biol. Chem.*, **277**, 41715–41724, doi: 10.1074/jbc.M207207200.
- Hanssen-Bauer, A., Solvang-Garten, K., Sundheim, O., Peña-Díaz, J., Andersen, S., Slupphaug, G., Krokan, H.E., Wilson, D.M. 3rd, Akbari, M., and Otterlei, M. (2011) XRCC1 coordinates disparate responses and multiprotein repair complexes depending on the nature and context of the DNA damage, *Environ. Mol. Mutagen.*, **52**, 623–635, doi: 10.1002/em.20663.
- Lan, L., Nakajima, S., Oohata, Y., Takao, M., Okano, S., Masutani, M., Wilson, S.H., and Yasui, A. (2004) *In situ* analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 13738–13743, doi: 10.1073/pnas.0406048101.
- Polo, L.M., Xu, Y., Hornyak, P., Garces, F., Zeng, Z., Hailstone, R., Matthews, S.J., Caldecott, K.W., Oliver, A.W.,

- and Pearl, L.H. (2019) Efficient single-strand break repair requires binding to both poly(ADP-ribose) and DNA by the central BRCT domain of XRCC1, *Cell Rep.*, **26**, 573–581, doi: 10.1016/j.celrep.2018.12.082.
27. Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller S., Menissier-de Murcia, J. and de Murcia, G. (1998) XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage, *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 3563–3571, doi: 10.1128/mcb.18.6.3563.
 28. Vasil'eva, I.A., Moor, N.A., and Lavrik, O.I. (2019) Role of oxidation of XRCC1 protein in regulation of mammalian DNA repair process, *Doklady Biochem. Biophys.*, **489**, doi: 10.1134/S1607672919060012.
 29. Sukhanova, M., Khodyeva, S., and Lavrik, O. (2010) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates activity of DNA polymerase beta in long patch base excision repair, *Mutat. Res.*, **685**, 80–89, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.08.009.
 30. Prasad, R., Lavrik, O.I., Kim, S.J., Kedar, P., Yang, X.P., Vande Berg, B.J., and Wilson, S.H. (2001) DNA polymerase beta-mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis, *J. Biol. Chem.*, **276**, 32411–32414, doi: 10.1074/jbc.C100292200.
 31. Leppard, J.B., Dong, Z., Mackey, Z.B., and Tomkinson, A.E. (2003) Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair, *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 5919–5927, doi: 10.1128/mcb.23.16.5919-5927.2003.

INFLUENCE OF HUMAN XRCC1 PROTEIN OXIDATION ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF ITS COMPLEXES WITH KEY ENZYMES OF DNA BASE EXCISION REPAIR^{*,**}

I. A. Vasil'eva^{1#}, N. A. Moor^{1#}, and O. I. Lavrik^{1,2***}

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: lavrik@niboch.nsc.ru*

² *Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia*

Received November 29, 2019

Revised January 20, 2020

Accepted January 27, 2020

Base Excision Repair (BER) ensures correction of the most abundant DNA lesions in mammals. The efficiency of this multistep repair process occurring via various sub-pathways depends on the coordinated action of enzymes catalyzing individual steps. Scaffold XRCC1 protein plays an important coordinating role in the repair of base damages and apurinic/aprimidinic (AP) sites via short patch sub-pathway and in the repair of single-strand breaks. In this study we showed for the first time the *in vitro* formation of a ternary complex of XRCC1 protein with the key enzymes of short patch BER, DNA polymerase β (Pol β) and DNA ligase III α (LigIII α), using fluorescence titration technique. Pol β interacts directly with LigIII α , but this complex is less stable than XRCC1–Pol β and XRCC1–LigIII α complexes. The influence of both XRCC1 oxidation and composition of the multiprotein complex on the efficiency of DNA repair synthesis and DNA ligation has been explored. The oxidation-induced formation of disulfide bond between Cys12 and Cys20 of XRCC1, modulating, as shown previously, the protein affinity for Pol β , affects the yield of both the final product of short-patch BER and the non-ligated DNA intermediates (substrates of long-patch BER). The effect of XRCC1 oxidation on the yield of the final product depends on the presence of AP endonuclease 1. Our cumulative (previous and present) results indicate the important role of XRCC1 oxidation in fine regulation of the formation and functional activity of BER complexes.

Keywords: DNA base excision repair, protein–protein interactions, human XRCC1 protein, DNA polymerase β , DNA ligase III α