

УДК 577.151.42/45

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СРАВНИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ В КЛЕТОЧНЫХ ЭКСТРАКТАХ\*

© 2020 О.А. Кладова<sup>1</sup>, Д.А. Яковлев<sup>1</sup>, Р. Гроисман<sup>2,3</sup>, А.А. Ищенко<sup>2,3</sup>,  
М.К. Сапарбаев<sup>2,3</sup>, О.С. Федорова<sup>1,4\*\*</sup>, Н.А. Кузнецов<sup>1,4\*\*</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия;  
электронная почта: fedorova@niboch.nsc.ru, nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

<sup>2</sup> Groupe "Réparation de l'AND", Equipe Labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer,  
CNRS UMR 8200, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-94805 Villejuif, France

<sup>3</sup> Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, F-94805 Villejuif, France

<sup>4</sup> Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 21.01.2020

После доработки 13.02.2020

Принята к публикации 17.02.2020

Поврежденные азотистые основания ДНК удаляются в процессе эксцизионной репарации оснований. Этот ферментативный процесс начинается с действия одной из ДНК-гликозилаз, которые находят и удаляют поврежденные гетероциклические основания путем гидролиза *N*-гликозидных связей с образованием апуринового/апириимидинового сайта (АР-сайта). Затем апуриновая/апириимидиновая эндонуклеаза АРЕ1 гидролизует фосфодиэфирную связь с 5'-стороны от АР-сайта с образованием одноцепочечного разрыва в ДНК. Снижение функциональной активности отдельных ферментов ВЕР связано с повышенным риском развития сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и онкологических заболеваний. В данной работе проведена разработка и апробация метода флуоресцентного анализа для измерения активности ключевых ДНК-гликозилаз и АР-эндонуклеазы человека в клеточных экстрактах. Эффективность флуоресцентных ДНК-зондов проверяли с помощью очищенных ферментов. Перспективные конструкции зондов были испытаны для определения активности ферментов в экстрактах клеточных линий А549, МСF7, HeLa, WT-7, НЕК293Т и НКС8. Показано, что общий уровень активности ферментов, отвечающих за репарацию АР-сайтов, удаление урацила и 5,6-дигидроурацила, был выше в линиях раковых клеток по сравнению с нормальной линией клеток почек человека НКС8.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ферментативная активность, флуоресценция, ДНК-зонд, ДНК-гликозилаза, АР-эндонуклеаза.

**DOI:** 10.31857/S0320972520040089

Окисление, алкилирование, дезаминирование, апуринизация/апириимидинизация, образование разрывов цепей ДНК – это неполный спектр процессов, которые приводят к повреждению структуры ДНК [1–7]. С одной стороны, такие повреждения ДНК могут инициировать

процесс опухолевой трансформации клеток. С другой стороны, этот же спектр повреждений возникает при химио- и лучевой терапии опухолевых заболеваний [8–10]. Поэтому система защиты клетки от повреждений – ферментативная система репарации ДНК выполняет важную роль в протекании процессов образования и деградации новообразований. Многочисленные исследования показали, что активность некоторых ферментов репарации ДНК влияет на токсичность генотоксинов и/или повреждающих факторов, в том числе, используемых в ходе химио- и лучевой терапии онкологических заболеваний [11, 12]. Также известно, что нарушения работы ферментов репарации ДНК вызывают тяжелые последствия в организме человека и часто ведут к возникновению рака и преждевременному старению [13, 14]. Считается, что главную роль в одном из путей репарации ДНК, экс-

Принятые сокращения: OGG1 – 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза; AAG – алкиладенин-ДНК-гликозилаза; АРЕ1 – АР-эндонуклеаза человека; МBD4 – метилцитозин-связывающий домен 4 человека; TDG – тимин-ДНК-гликозилаза; NEIL1 – эндонуклеаза VIII; NTHL1 – эндонуклеаза II; АР-сайт – апуриновый/апириимидиновый сайт; F-сайт – остаток (2*R*,3*S*)-2-(гидроксиметил)-3-гидрокситетрагидрофурана; εА – 1,Ν6-ε-эноаденозин; охoG – 8-оксогуанозин; DHU – 5,6-дигидроурадин.

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ20-017, 16.03.2020.

\*\* Адресат для корреспонденции.

цизионной репарации оснований (BER), играют ДНК-гликозилазы, которые узнают различные модифицированные и неправильно спаренные основания и катализируют их удаление [15, 16]. Затем апуриновая/апириимидиновая эндонуклеаза (AP-эндонуклеаза) удаляет оставшийся фрагмент 2'-дезоксирибозы. Основная задача этих ферментов состоит в том, чтобы быстро и точно определить местоположение модифицированного основания или апуринового/апириимидинового сайта среди огромного количества неповрежденных азотистых оснований и инициировать процесс репарации.

Показано, что клетки и нокаутные животные, лишенные различных ДНК-гликозилаз, становятся более чувствительными к воздействию факторов, приводящих к повреждению ДНК [17–19]. Генно-инженерное удаление из клеток AP-эндонуклеазы приводит к их гибели, что свидетельствует о критической роли этого фермента в процессе восстановления неповрежденной структуры ДНК [20–22].

Необходимо отметить, что в последнее время интенсивно развиваются методы определения активности ферментов репарации в клеточных экстрактах [23–29]. Для определения ферментативной активности ДНК-гликозилаз было предложено несколько различных подходов. Эти подходы обычно связаны с регистрацией флуоресцентного сигнала, генерируемого ДНК-зондами, содержащими поврежденный нуклеотид, который является субстратом для фермента-мишени [30–32]. Как правило, в качестве источников сигнала используются разнообразные флуоресцентные красители, например, взаимодействующие по принципу резонансной передачи энергии флуоресценции (FRET) или изменяющие интенсивность флуоресценции аналоги азотистых оснований, расположенные в одноцепочечных или двухцепочечных ДНК-зондах [33]. Например, в работе [23] используются ДНК-зонды, дополнительно модифицированные биотином для иммобилизации на магнитных наночастицах. Реакционную смесь, содержащую ДНК-зонд и разное количество фермента (AAG и/или APE1), выдерживали 1 ч, после чего регистрировали интенсивность флуоресценции раствора. Авторы [23] подтверждают, что данные наночастицы деградируют со скоростью 2% в сутки. Таким образом, использование таких конструкций осложняется контролем качества данных наночастиц и контролем концентрации флуоресцентного ДНК-зонда на поверхности этих наночастиц. В другой работе [30] для анализа активности ферментов OGG1 и AAG использовали специализированное оборудование, позволяющее регистрировать сигнал на уровне одной молекулы.

Реакционную смесь выдерживали 1,5 ч, а затем по значению флуоресцентного сигнала, возникающего за счет образования продуктов реакции, определяли специфическую активность. Недавно для определения низких концентраций урацил-ДНК-гликозилазы был предложен метод, основанный на использовании терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы, с помощью которой в образце происходило образование флуоресцентных кластеров меди [34]. Были разработаны также другие способы усиления сигнала для определения активности урацил-ДНК-гликозилазы [35–37]. Однако, несмотря на обилие различных вариантов регистрации ферментативной активности в клеточных экстрактах, некоторые упомянутые способы включают в себя выполнение большого количества подготовительных этапов, специализированного оборудования или требуют использования других ферментов, таких как ДНК-полимераза, ДНК-никаза, рибонуклеаза и даже AP-эндонуклеаза.

Кроме того, необходимо отметить, что количественное определение активности ферментов, как правило, основано на сравнении уровня флуоресцентного сигнала в реакционной смеси через определенное время с уровнем сигнала, который получен для очищенного препарата этого же фермента. Однако множественные литературные данные [38–43] свидетельствуют о том, что активность ферментов репарации значительно изменяется при взаимодействии с другими белками и ферментами, которые могут присутствовать в клеточном экстракте и отсутствуют в «калибровочных кривых». Таким образом, одно и то же количество фермента будет приводить к разному изменению флуоресцентного сигнала в контрольной реакционной смеси и клеточном экстракте.

В настоящей работе проведена апробация метода определения активности основных ферментов эксцизионной репарации оснований (ДНК-гликозилазы и AP-эндонуклеазы человека) в экстрактах различных клеточных линий человека. Основная цель этой работы – это разработка простого в использовании метода измерения активности ферментов BER в клеточных экстрактах. Преимущество представленного FRET-анализа перед другими заключается в простоте, основанной на использовании небольшого количества клеток и синтетического FRET-меченого ДНК-дуплекса, содержащего специфический поврежденный нуклеотид. Новизна данной работы заключается в анализе не только амплитуды изменения сигнала через определенное время, но и скорости расщепления ДНК-зонда.

В ходе работы был синтезирован ряд флуоресцентных ДНК-зондов, содержащих в качестве повреждения такие нуклеотиды, как F-сайт,

**Таблица 1.** Последовательность ДНК-зондов, использованных в работе, содержащих специфическое повреждение для различных ДНК-гликозилаз и AP-эндонуклеазы

Целевой фермент	Поврежденный нуклеотид	Последовательность ДНК-зонда
APE1	<b>F</b>	5'-FAM- GCTCA( <b>F</b> )GTACAGAGCTG-3' 3'-BHQ1-CGAGT( <b>G</b> )CATGTCTCGAC-5'
OGG1	<b>oxoG</b>	5'-FAM-GCTCA( <b>oxoG</b> )GTACAGAGCTG-3' 3'-BHQ1-CGAGT ( <b>C</b> ) CATGTCTCGAC-5'
UNG2, SMUG1, MBD4, TDG	<b>U</b>	Тип I 5'-FAM-GCTCA( <b>U</b> )GTACAGAGCTG-3' 3'-CGAGT( <b>G</b> )CATGTCTCGAC-BHQ1-5'
		Тип II 5'-FAM-GCTCA( <b>U</b> )GTACAGAGCTG-3' 3'-BHQ1-CGAGT( <b>G</b> )CATGTCTCGAC-5'
NEIL1, NTHL1	<b>DHU</b>	5'-FAM-GCTCA( <b>DHU</b> )GTACAGAGCTG-3' 3'-BHQ1-CGAGT ( <b>G</b> ) CATGTCTCGAC-5'
AAG	<b>εA</b>	5'-FAM-GCTCA( <b>εA</b> )GTACAGAGCTG-3' 3'-BHQ1-CGAGT ( <b>T</b> )CATGTCTCGAC-5'
Неспецифическое расщепление	<b>C</b>	5'-FAM-GCTCA( <b>C</b> )GTACAGAGCTG-3' 3'-BHQ1-CGAGT( <b>G</b> )CATGTCTCGAC-5'

Примечание. FAM – остаток 6-карбоксифлуоресцеина, BHQ1 – тушитель флуоресценции «black hole quencher».

5,6-дигидроуридин (DHU), 1, N<sup>6</sup>-этноаденозин (εA), 8-оксогуанозин (oxoG) и уридин (табл. 1). Эффективность данных зондов определена с помощью очищенных препаратов нескольких ДНК-гликозилаз и AP-эндонуклеазы человека. Перспективные конструкции были использованы для определения активности ферментов в экстрактах клеточных линий A549, MCF7, HeLa, WT-7, HEK293T и HNC8. В качестве контроля неспецифического расщепления ДНК-зондов использовали дуплекс, не содержащий поврежденных нуклеотидов, что позволило оценить устойчивость используемых зондов к неспецифическим эндо- и экзонуклеазам в клеточных экстрактах. Было показано, что флуоресцентные ДНК-зонды можно использовать для измерения активности нескольких ДНК-гликозилаз и AP-эндонуклеазы APE1 человека. Чувствительность анализа позволяет измерить активность некоторых ферментов в экстракте, содержащем 10<sup>6</sup> клеток. Анализ различных раковых и нераковых клеточных линий выявил различия в активности ключевых ферментов BER.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Структура ДНК-зондов.** ДНК-зонды содержали FRET-пару красителей FAM/BHQ1 и поврежденный нуклеотид, обеспечивающий специ-

фичность к определенному ферменту или группе ферментов (табл. 1). При удалении поврежденного азотистого основания, входящего в состав ДНК-зонда, происходит либо образование AP-сайта (в случае действия монофункциональных ДНК-гликозилаз, таких как UNG2, SMUG1, MBD4, TDG и AAG), либо образование разрыва в цепи, содержащей повреждение (в случае действия бифункциональных ДНК-гликозилаз, таких как OGG1, NEIL1 и NTHL1). Фермент APE1 также образует одноцепочечный разрыв в цепи, содержащей F-сайт. После образования разрыва происходит плавление коротких участков ДНК-продукта и пространственное отдаление FRET-красителей FAM и BHQ1 друг от друга, что приводит к значительному росту флуоресцентного сигнала FAM.

**Клеточные линии.** Для анализа активности ферментов репарации ДНК с помощью ДНК-зондов использовали клетки человека различных линий: A549, HeLa, MCF7, WT-7, HEK293T и HNC8 (табл. 2). Клетки линий HEK293T, A549, WT-7, HeLa, HNC8 культивировали в среде DMEM («Gibco», «ThermoFisher Scientific», США), клетки линии MCF7 культивировали в среде RPMI-1640 («Gibco», «ThermoFisher Scientific») с 10%-ной фетальной сывороткой теллят («Gibco», «Thermo FS»), 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ед./мл пенициллина в атмосфере 5%-ного CO<sub>2</sub> при 37 °C.

Клетки механически снимали с поверхности культурального флакона, осаждали центрифугированием (1000 об/мин, 2 мин), ресуспендировали в растворе PBS и также осаждали центрифугированием (1000 об/мин, 2 мин). Данную процедуру повторяли два раза.

Подсчет клеток проводили, используя автоматический счетчик клеток Countess II Automated Cell Counter («Thermo FS»). Для этого 10 мкл клеточной суспензии смешивали с 10 мкл трипанового синего, 10 мкл смеси помещали в кассету для подсчета клеток (Bio-Rad, США).

**Подготовка клеточного экстракта.** Для анализа активности ферментов репарации ДНК использовали  $1 \times 10^6$  клеток. Лизис клеток проводили в CHAPS буфере (10 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ EDTA, 0,5%-ный CHAPS, 10%-ный глицерин, 0,1 мМ PMSE, 0,5 мМ β-меркаптоэтанол). Общую концентрацию белка измеряли по методу Бредфорда (концентрация белков, как правило, составляла 1–2 мкг/мкл). Клеточный экстракт хранили при –80 °С и размораживали непосредственно перед работой.

**Определение активности ферментов в клеточном экстракте.** Пробы готовили в 100 мкл буферного раствора (50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 50 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 7%-ный глицерин), содержащего 70 мкл экстракта клеток. ДНК-зонд, содержащий определенный тип поврежденного нуклеотида (табл. 1), добавляли к клеточному экстракту до конечной концентрации 1 мкМ. После быстрого перемешивания ДНК-зонда и клеточного экстракта проводили регистрацию FRET-сигнала, используя прибор FLUOstar Omega («BMG Labtech», Германия). Длина волны возбуждения флуоресценции составляла  $\lambda_{ex} = 485$  нм, регистрацию эмиссии проводили на длине волны  $\lambda_{em} = 520$  нм. Максимальное время реакции составляло 2000 с, температура 37 °С. Каждый эксперимент проводили трижды. Амплитуду FRET-сигнала после инкубирования реакционной смеси в течение 2000 с использовали для определения относительной активности ферментов в разных клеточных линиях.

**Кинетический анализ рекомбинантных ферментов методом «остановленного потока».** Кинетические кривые, характеризующие взаимодействие рекомбинантных ферментов с ДНК-зондом, были получены на спектрометре остановленного потока SX.18MV («Applied Photophysics Ltd.», Великобритания) с регистрацией FRET-сигнала, как описано ранее [44–47]. Длина волны возбуждения флуоресценции FAM составляла  $\lambda_{ex} = 494$  нм, и регистрацию FRET-сигнала проводили при  $\lambda_{em} > 515$  нм с использованием

**Таблица 2.** Клеточные линии человека, использованные в работе

Название	Происхождение клеточной линии
A549	карцинома легкого
HeLa	карцинома шейки матки
MCF7	карцинома молочной железы
WT-7	карцинома почки
HEK293T	эмбриональные клетки почки
HKC8	клетки почки

светофильтра OG-515 («Schott», Германия). Все эксперименты проводили при 25 °С в буфере, состоящем из 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 50 мМ KCl, 1,0 мМ ЭДТА, 1,0 мМ ДТТ, 5,0 мМ MgCl<sub>2</sub> и 7%-ного глицерина.

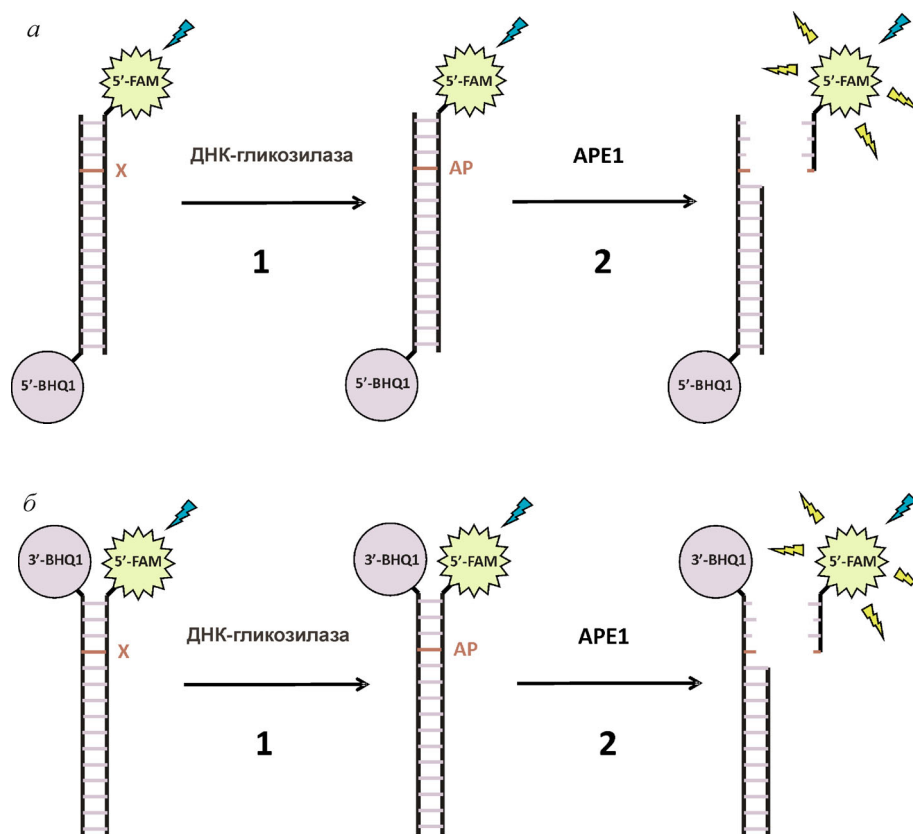
Раствор, содержащий ДНК-гликозилазы или смесь ДНК-гликозилазы и AP-эндонуклеазы в буфере, быстро смешивали в реакционной камере с раствором ДНК-зонда. Мертвое время прибора – 1,4 мс. Концентрация ферментов и ДНК-зонда составляла 1,0 мкМ во всех экспериментах. Указанные концентрации реагентов соответствуют концентрациям в реакционной кювете после смешивания. Как правило, каждую кинетическую кривую, представленную на рисунках, воспроизводили несколько раз. Измерение FRET-сигнала характеризует изменение расстояния между красителем FAM и тушителем BHQ1 как в процессе конформационных изменений ДНК-зонда при образовании каталитического комплекса фермент–ДНК, так и при последующем расщеплении ДНК и диссоциации комплекса фермент–продукт.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для регистрации каталитической активности ДНК-гликозилаз и AP-эндонуклеазы были разработаны ДНК-субстраты, несущие поврежденный нуклеотид, обеспечивающий специфичность к данному ферменту и FRET-пару красителей на концах дуплекса. Для оценки чувствительности использовали два типа ДНК-субстратов (рис. 1): тип I ДНК-субстратов (рис. 1, а) содержал красители FAM и BHQ1 на 5'-концах олигонуклеотидов, а тип II ДНК-субстратов (рис. 1, б) содержал FAM на 5'-конце и BHQ1 на 3'-конце олигонуклеотидов, формирующих дуплекс.

Необходимо отметить, что анализ активности монофункциональных ДНК-гликозилаз, образующих в ДНК-дуплексе AP-сайт, представ-





**Рис. 1.** Принципиальная схема анализа процессов взаимодействия монофункциональных ДНК-гликозилаз с модельными FRET-субстратами: (а) тип I, (б) тип II. Стадия 1 – удаление поврежденного основания X и образование AP-сайта. Стадия 2 – расщепление AP-сайта AP-эндонуклеазой APE1, которое ведет к пространственному отдалению флуорофора FAM и тушителя BHQ1 и значительному росту FRET-сигнала. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

ляет нетривиальную задачу по сравнению с бифункциональными ДНК-гликозилазами и AP-эндонуклеазой, которые формируют одноцепочечный разрыв в модельном ДНК-субстрате. Поэтому чувствительность обоих типов ДНК-субстратов была проанализирована при использовании монофункциональных ДНК-гликозилаз MBD4 и TDG (рис. 2). Взаимодействие MBD4 и TDG с модельными дуплексами, содержащими в качестве повреждения уридин, приводило к удалению урацила и образованию AP-сайта (рис. 1, стадия 1), этот процесс сопровождается медленным ростом FRET-сигнала (рис. 2, а). Сравнение кинетических кривых с ранее полученными данными для MBD4 показывает, что медленный рост FRET-сигнала в интервале времени 100–3000 с совпадает с медленным накоплением продуктов реакции и, по-видимому, характеризует скорость-лимитирующую стадию диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции, содержащим AP-сайт [48].

Второй тип ДНК-субстрата (рис. 1, б), содержащий красители на одном конце ДНК-дуплекса, обладал большей амплитудой изменения FRET-сигнала и, соответственно чувствительностью, при взаимодействии с MBD4 и TDG. Поэтому в последующих экспериментах с участием AP-эндонуклеазы APE1 использовали этот модельный субстрат. Взаимодействие MBD4 и TDG с данным субстратом в присутствии APE1 приводило к значительному ускорению и примерно двукратному увеличению амплитуды фазы роста FRET-сигнала (рис. 2, б), что свидетельствует об образовании одноцепочечного разрыва по AP-сайту, катализируемого AP-эндонуклеазой. Кроме того, ранее было показано, что AP-эндонуклеаза APE1 стимулирует активность ДНК-гликозилаз в условиях множественного оборота фермента [38–43]. Таким образом, присутствие AP-эндонуклеазы в реакционной смеси позволяет увеличить амплитуду изменений FRET-сигнала при взаимодействии с монофункциональными ДНК-гликозилазами и по-

высить чувствительность модельного суб-страта к данным ферментам. На основании полученных данных далее в работе с клеточными экстрактами использовали ДНК-субстраты типа II.

Полученные данные показывают, что в случае ДНК-зонда типа I чувствительность к расщеплению ДНК невысока, но все же достаточна для обнаружения этого процесса *in vitro*. Однако даже такая низкая чувствительность позволяет регистрировать процесс образования AP-сайта, который сопровождается увеличением гибкости дуплекса ДНК после удаления урацила монофункциональными ДНК-гликозилазами и уменьшением расстояния между красителями. ДНК-зонд типа II обладает более высокой чувствительностью к расщеплению ДНК из-за более короткого расстояния между флуорофором и тушителем. Кроме того, в случае одновременного действия ДНК-гликозилазы и AP-эндонуклеазы, который реализуется в клеточном экстракте, амплитуда изменения FRET-сигнала дополнительно увеличивается ~ в 2 раза (рис. 2, б). Поэтому для оценки ферментативной активности в клеточных экстрактах, в которых присутствуют оба фермента, были выбраны более чувствительные ДНК-субстраты типа II.

Для определения активности определенных ферментов репарации были использованы ДНК-субстраты типа II, содержащие определенный поврежденный нуклеотид (табл. 1). В качестве поврежденных нуклеотидов были выбраны модификации, возникающие при окислительном стрессе (8-оксогуанозин и 5,6-дигидроуридин), дезаминировании (уридин), алкилировании (1, N6-этенoadенозин) и апуринизации/апириминизации (AP-сайт). Набор ДНК-зондов, содержащих эти повреждения, позволил охарактеризовать активность всех ключевых ферментов репарации человека. Для определения активности 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы OGG1 использовали ДНК-зонд, содержащий остаток 8-оксогуанозина (охоG-зонд). Для исследования ДНК-гликозилаз UNG2, SMUG1, MBD4 и TDG, специфически узнающих урацил в ДНК, в составе ДНК-зондов присутствовал уридин (U-зонд), для ДНК-гликозилаз NEIL1 и NTHL1 ДНК-зонд содержал остаток 5,6-дигидроуридина (DHU-зонд), а для алкиладенин-ДНК-гликозилазы AAG в составе ДНК-дуплексов был остаток 1, N6-этенoadенозина (εA-зонд). ДНК-зонд, содержащий в составе аналог AP-сайта – остаток (2R,3S)-2-(гидроксиметил)-3-гидрокситетрагидрофурана (F-зонд), являлся субстратом для AP-эндонуклеазы APE1. Поскольку в общих

клеточных экстрактах содержатся экзо- и эндо-нуклеазы, которые могут неспецифически гидролизовать ДНК-зонд, для контроля такого расщепления использовали ДНК-дуплекс, не содержащий поврежденных нуклеотидов в своей структуре (С-зонд) (табл. 1).

Для анализа активности ферментов репарации ДНК с помощью ДНК-зондов были выбраны клетки опухолевых линий человека различного гистологического происхождения (табл. 2). Все подготовленные образцы содержали клеточный экстракт и ДНК-зонд с определенным поврежденным нуклеотидом. На рис. 3 приведены кинетические кривые изменения

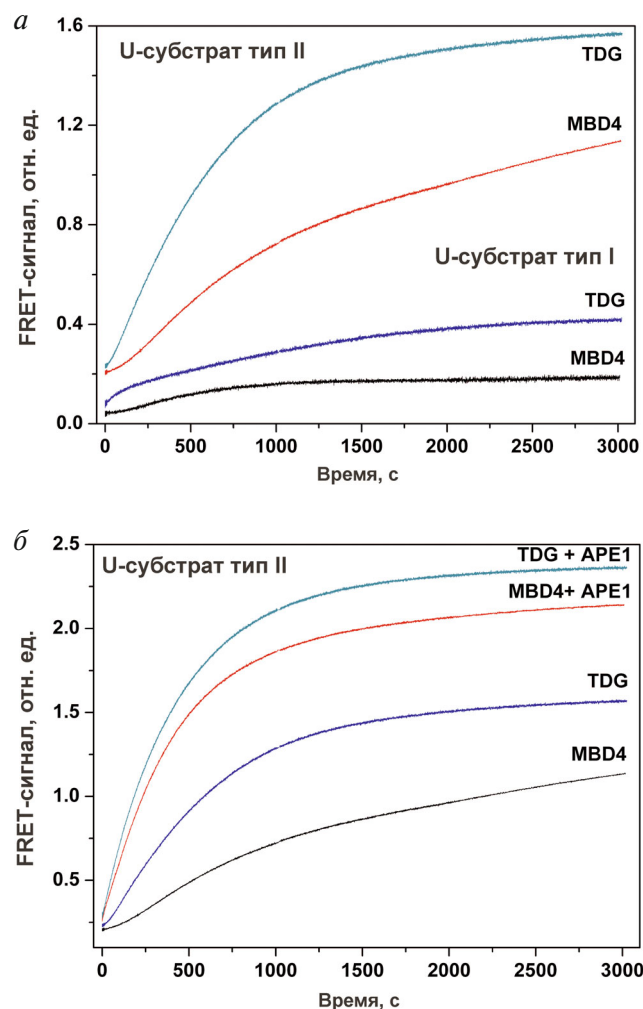
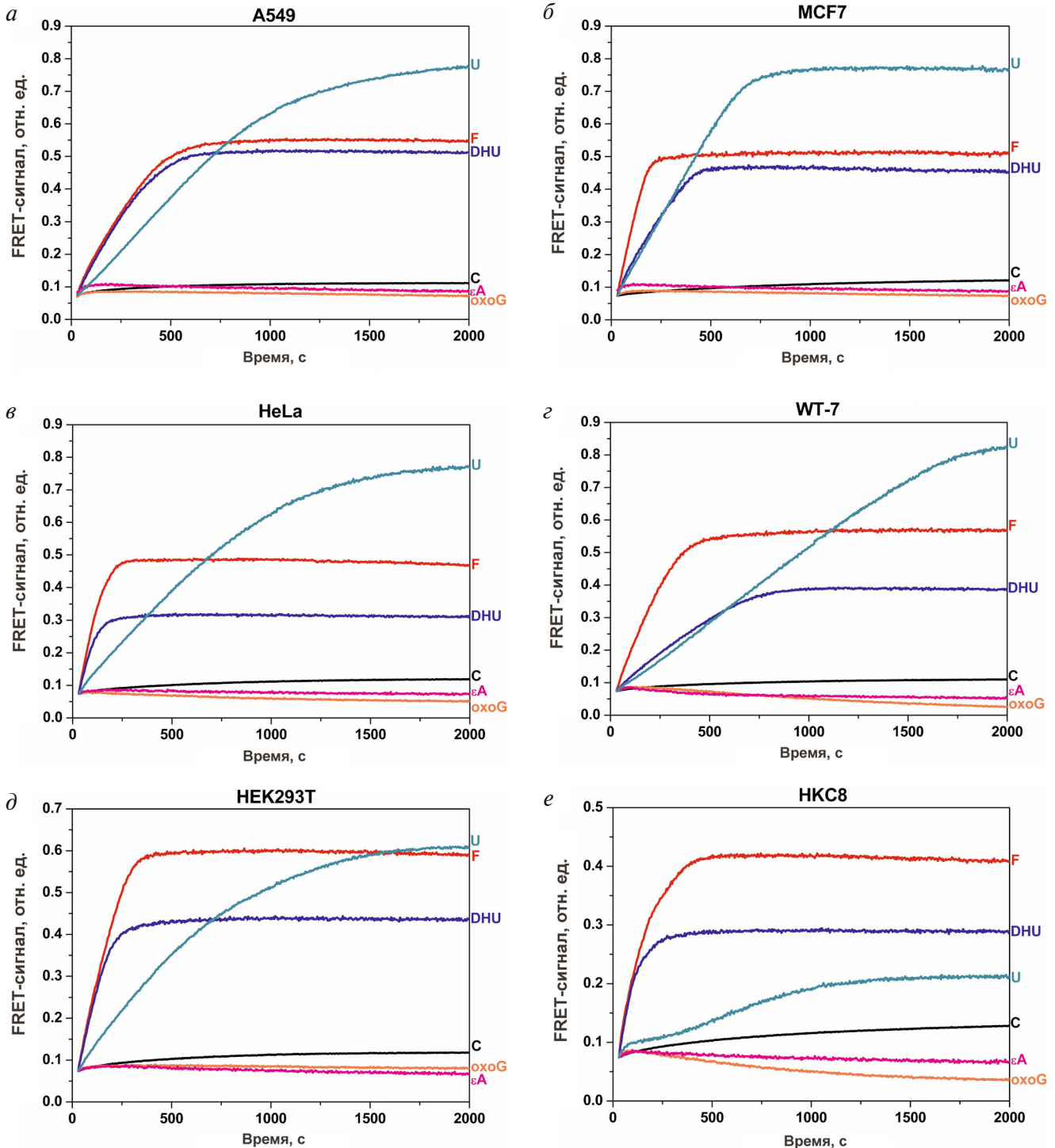


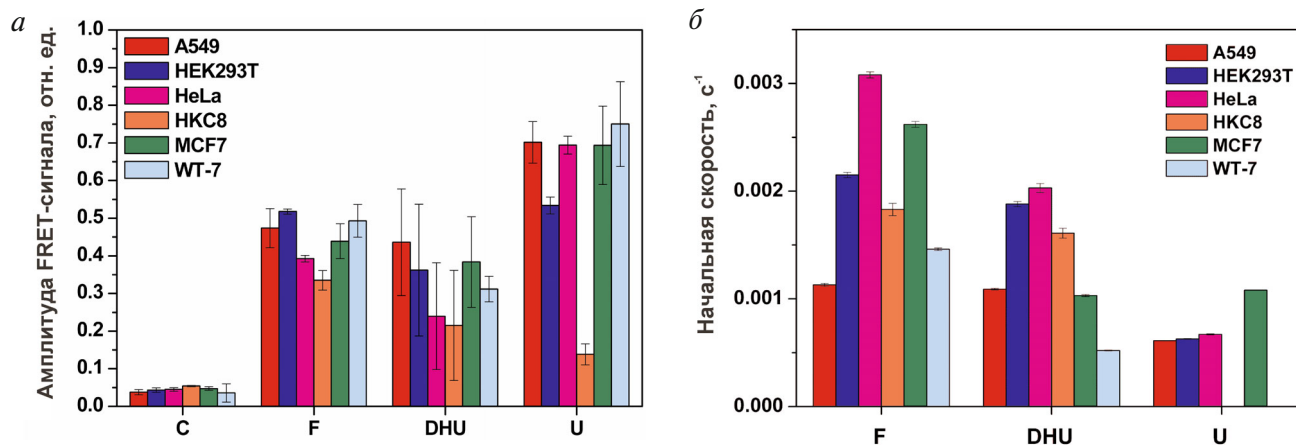
Рис. 2. Кинетические кривые изменения FRET-сигнала при взаимодействии MBD4 и TDG с модельными ДНК-субстратами типа I и типа II, содержащими в качестве повреждения уридин. а – Сравнение чувствительности ДНК-субстратов типа I и типа II при взаимодействии с MBD4 и TDG; б – влияние AP-эндонуклеазы APE1 на взаимодействие MBD4 и TDG с U-субстратом типа II. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

FRET-сигнала, соответствующие расщеплению ДНК-зондов в клеточном экстракте каждой линии. Для всех линий клеток расщепление ДНК-зондов, содержащих F-сайт, уридин и 5,6-ди-

гидроурин, проходило до 2000 с и сопровождалось значительным ростом амплитуды FRET-сигнала, характеризующим активность соответствующих ферментов (табл. 1). Необходимо от-



**Рис. 3.** Изменения FRET-сигнала, характеризующие активность ферментов в клеточных экстрактах линий A549 (а), MCF7 (б), HeLa (в), WT-7 (г), HEK293T (д), HNC8 (е). Буквенное обозначение ДНК-зондов соответствует табл. 1. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>



**Рис. 4.** Относительная активность ферментов репарации в экстрактах клеточных линий A549, MCF7, HeLa, WT-7, HEK293T и HKC8. *a* – Амплитуда изменения FRET-сигнала; *b* – начальная скорость роста FRET-сигнала на кинетических кривых.

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

метить, что расщепление неповрежденного дуплекса (С-зонд) сопровождалось небольшим ростом FRET-сигнала, что свидетельствует о значительно более медленном неспецифическом расщеплении ДНК. Для защиты от экзонуклеазного расщепления используют различные подходы: шпилечные структуры, модифицированные концевые нуклеотиды или фосфатные группы. Однако полученные данные свидетельствуют о том, что использование небольшого количества клеток позволяет пренебречь вкладом неспецифического расщепления ДНК-зондов за время проведения анализа. Таким образом, предлагаемый метод определения активности позволил сопоставить специфическое и неспецифическое расщепление и заключить, что в случае F-, U- и DHU-зондов можно пренебречь деградацией ДНК-зонда клеточными нуклеазами и, соответственно, использовать стандартные олигонуклеотиды без введения дополнительных защитных конструкций в структуру ДНК-зонда.

При этом для всех клеточных линий при использовании охoG- и εA-зондов, расщепляемых ферментами OGG1 и AAG, соответственно, после незначительного роста FRET-сигнала на начальном участке кинетических кривых происходило его уменьшение в диапазоне времени до 2000 с. Такое изменение FRET-сигнала не соответствует модели прямого расщепления ДНК-зонда ни за счет специфического расщепления ферментами OGG1 и AAG, ни за счет неспецифической деградации, так как в обоих случаях такое расщепление должно сопровождаться ростом FRET-сигнала (рис. 1, б). Полученные данные могут свидетельствовать как о более

сложных взаимодействиях данных зондов с ферментами, находящимися в клеточном экстракте, так и о том, что концентрация OGG1 и AAG в клеточном экстракте слишком мала для измерения активности этих ферментов в клеточном экстракте, полученном из  $10^6$  клеток. Таким образом, можно предположить, что в полученных клеточных экстрактах концентрация OGG1, единственной ДНК-гликозилазы, которая отвечает за удаление 8-оксогуанина, и AAG, единственной ДНК-гликозилазы, которая отвечает за удаление метилированных нуклеотидов, значительно ниже, чем концентрация урацил-ДНК-гликозилаз UNG2, SMUG1, MBD4 и TDG, а также ДНК-гликозилаз NEIL1 и NTHL1, отвечающих за удаление поврежденных пиримидиновых нуклеотидов.

Для сравнения относительной активности ферментов в клеточных экстрактах разных линий использовали амплитуду изменения FRET-сигнала через 2000 с после начала регистрации. Как видно на рис. 4, а, неспецифическое расщепление С-зонда происходит с близкой эффективностью во всех линиях клеток. Более значительный рост FRET-сигнала наблюдался для F-, U- и DHU-зондов. Сравнение амплитуд FRET-сигнала в случае F-зонда выявило небольшие различия между клеточными линиями, не превышающими коэффициент 1,5 (между клеточными линиями HKC8 и HEK293T). Следовательно, этот результат показывает, что уровень активности AP-эндонуклеазы незначительно варьирует среди использованных клеточных линий.

В случае анализа активности NEIL1 и NTHL1 с использованием DHU-зонда разли-



чия в амплитудах FRET-сигнала были более значительными и достигли коэффициента 2 при сравнении клеток НКС8 и А549. Анализ суммарной урацил-ДНК-гликозилазной активности, характеризующей концентрацию ферментов UNG2, SMUG1, MBD4 и TDG, выявил пятикратное увеличение амплитуд FRET-сигнала во всех линиях раковых клеток по сравнению с клетками почки человека НКС8. Напротив, уровень урацил-ДНК-гликозилазной активности в эмбриональных клетках почки НЕК293Т был выше, чем в клеточной линии НКС8, только в 3,8 раза. Интересно отметить, что, в целом, уровень репарационной активности для всех ДНК-зондов оказался ниже в клетках линии НКС8.

Для сравнения активности ферментов в различных экстрактах также использовали начальную скорость расщепления ДНК-зондов, которую оценивали как наклон начального участка кинетических кривых (рис. 4, б). Анализ начального участка кинетических кривых может быть выполнен в условиях стационарного протекания процесса расщепления ДНК-зонда. Однако в случае анализа экстракта клеточной линии НКС8 при взаимодействии с ДНК-субстратами, содержащими урацил, изменения FRET-сигнала имели двухфазный характер (рис. 3, е), что не позволило определить начальную скорость расщепления U-зонда. Такое отклонение от стационарного протекания процесса может быть обусловлено сложными белок-белковыми взаимодействиями ферментов, участвующих на начальных этапах пути BER, взаимным влиянием этих ферментов на активность друг друга, а также присутствием в клеточном экстракте нескольких ферментов с одинаковой субстратной специфичностью. Сравнение начальных скоростей расщепления ДНК-зондов во всех остальных случаях показало, что скорость расщепления F-сайта отличается между клеточными линиями не более чем в три раза для клеток А549 и HeLa соответственно. В случае DHU-зонда четырехкратная разница была отмечена между клетками WT-7 и HeLa. Следует отметить, что активность ферментов, катализирующих расщепление F-сайта и DHU в клетках почки человека НКС8, имела среднее значение, по сравнению с опухолевыми линиями. Из-за нестационарной кинетики в случае клеточного экстракта НКС8 с ДНК-зондом, содержащим урацил, наблюдаемая константа скорости расщепления U-зонда не была рассчитана. Тем не менее, различие в активности урацил-ДНК-гликозилаз среди других клеточных линий не превышало коэффициент 2.

В данной работе был апробирован флуоресцентный метод определения активности ключевых ферментов репарации человека в экстрактах клеточных линий НКС8, WT-7, А549, MCF7, НЕК293Т и HeLa. Для этого создан ряд флуоресцентных ДНК-зондов, содержащих различные типы поврежденных нуклеотидов ДНК, в том числе повреждения ДНК, возникающие при химио- и лучевой терапии онкологических заболеваний. Использование ДНК-зондов позволило оценить относительную активность ряда ДНК-гликозилаз и AP-эндонуклеазы человека в здоровых клетках и клетках опухолевых линий. Показано, что неспецифическая дегградация ДНК-зондов в общем клеточном экстракте происходит значительно медленнее, чем специфическое расщепление ДНК, содержащей поврежденный нуклеотид. При этом уровень активности ферментов репарации, процессирующих F-, DHU- и U-зонды, был выше в раковых линиях по сравнению с нормальными клетками почки человека НКС8.

Полученные результаты могут стать основой для создания статистической библиотеки данных об относительной активности ферментов репарации ДНК в индивидуальных линиях раковых клеток, а также клеток опухолевых тканей человека. В перспективе такая молекулярная характеристика клеток может помочь выявить механизмы, лежащие в основе онкогенеза и развития опухолевых заболеваний, а также проводить коррекцию методов терапии с целью повышения ее эффективности.

**Финансирование.** Работа выполнена при частичной финансовой поддержке проекта ПФНИ ГАН (АААА-А17-117020210022-4). Часть работы, включающая апробацию ДНК-субстратов типа I и II на монофункциональных ДНК-гликозилазах MBD4 и TDG, поддержана грантом РФФИ (16-14-10038). Часть работы, включающая дизайн ДНК-зондов и определение активности ферментов репарации в линиях клеток, поддержана грантом РФФИ (18-14-00135). Работа также частично поддержана Ligue National Contre le Cancer «Equipe Labellisee», Electricité de France #RB 2017 (M.S.) и French National Research Agency #ANR-18-CE44-0008, и Fondation ARC #PJA-20181208015 (A.A.I.).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая работа не содержит каких-либо исследований, в которых в качестве объектов были использованы люди или животные.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wallace, S. S. (2002) Biological consequences of free radical-damaged DNA bases, *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 1-14, doi: 10.1016/s0891-5849(02)00827-4.
- Boiteux, S., and Guillet, M. (2004) Abasic sites in DNA, repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*, *DNA Repair*, **3**, 1-12, doi: 10.1016/j.dnarep.2003.10.002.
- Van Loon, B., Markkanen, E., and Hubscher, U. (2010) Oxygen as a friend and enemy. How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine, *DNA Repair (Amst.)*, **9**, 604-616, doi: 10.1016/j.dnarep.2010.03.004.
- Kuznetsova, A. A., Knorre, D. G., and Fedorova, O. S. (2009) Oxidation of DNA and its components with reactive oxygen species, *Russ. Chem. Rev.*, **78**, 659-678, doi: 10.1070/Rc2009v078n07abeh004038.
- Nakamura, J., Walker, V. E., Upton, P. B., Chiang, S. Y., Kow, Y. W., and Swenberg, J. A. (1998) Highly sensitive apurinic/aprimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions, *Cancer Res.*, **58**, 222-225.
- Frederico, L. A., Kunkel, T. A., and Shaw, B. R. (1990) A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination, determination of rate constants and the activation energy, *Biochemistry (Moscow)*, **29**, 2532-2537.
- Burcham, P. C. (1999) Internal hazards, baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism, *Mutat. Res.*, **443**, 11-36.
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M., and Cooke, M. S. (2004) Oxidative DNA damage and disease, induction, repair and significance, *Mutat. Res.*, **567**, 1-61.
- Leandro, G. S., Sykora, P., and Bohr, V. A. (2015) The impact of base excision DNA repair in age-related neurodegenerative diseases, *Mutat. Res.*, **776**, 31-39, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.12.011.
- Coppede, F., and Migliore, L. (2015) DNA damage in neurodegenerative diseases, *Mutat. Res.*, **776**, 84-97, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.11.010.
- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., and Sharma, R. A. (2008) DNA repair pathways as targets for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 193-204, doi: 10.1038/nrc2342.
- Dietlein, F., Thelen, L., and Reinhardt, H. C. (2014) Cancer-specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches, *Trends Genet.*, **30**, 326-339, doi: 10.1016/j.tig.2014.06.003.
- Trushina, E., and McMurray, C. T. (2007) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases, *Neuroscience*, **145**, 1233-1248, doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.10.056.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003) Oxidative DNA damage, mechanisms, mutation, and disease, *FASEB J.*, **17**, 1195-1214.
- Gros, L., Saparbaev, M. K., and Laval, J. (2002) Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage, *Oncogene*, **21**, 8905-8925.
- Zharkov, D. O. (2008) Base excision DNA repair, *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 1544-1565, doi: 10.1007/s00018-008-7543-2.
- Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T., and Barnes, D. E. (1999) Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13300-13305.
- Parsons, J. L., and Elder, R. H. (2003) DNA N-glycosylase deficient mice, a tale of redundancy, *Mutat. Res.*, **531**, 165-175.
- Nilsen, H., Rosewell, I., Robins, P., Skjelbred, C. F., Andersen, S., Slupphaug, G., Daly, G., Krokan, H. E., Lindahl, T., and Barnes, D. E. (2000) Uracil-DNA glycosylase (UNG)-deficient mice reveal a primary role of the enzyme during DNA replication, *Mol. Cell*, **5**, 1059-1065.
- Fung, H., and Demple, B. (2005) A vital role for Ape1/Ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells, *Mol. Cell*, **17**, 463-470, doi: 10.1016/j.molcel.2004.12.029.
- Xanthoudakis, S., Smeyne, R. J., Wallace, J. D., and Curran, T. (1996) The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 8919-8923, doi: 10.1073/Pnas.93.17.8919.
- Unnikrishnan, A., Raffoul, J. J., Patel, H. V., Pritchko, T. M., Anyangwe, N., Meira, L. B., Friedberg, E. C., Cabelof, D. C., and Heydari, A. R. (2009) Oxidative stress alters base excision repair pathway and increases apoptotic response in apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox factor-1 haploinsufficient mice, *Free Radic. Biol. Med.*, **46**, 1488-1499, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.021.
- Gines, G., Saint-Pierre, C., and Gasparutto, D. (2014) On-bead fluorescent DNA nanoprobes to analyze base excision repair activities, *Anal. Chim. Acta*, **812**, 168-175, doi: 10.1016/j.aca.2013.12.038.
- Chaim, I. A., Nagel, Z. D., Jordan, J. J., Mazzucato, P., Ngo, L. P., and Samson, L. D. (2017) *In vivo* measurements of interindividual differences in DNA glycosylases and APE1 activities, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 10379-10388, doi: 10.1073/pnas.1712032114.
- Maksimenko, A., Ishchenko, A. A., Sanz, G., Laval, J., Elder, R. H., and Saparbaev, M. K. (2004) A molecular beacon assay for measuring base excision repair activities, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **319**, 240-246, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.04.179.
- Lebedeva, N. A., Anarbaev, R. O., Kupryushkin, M. S., Rechkunova, N. I., Pyshnyi, D. V., Stetsenko, D. A., and Lavrik, O. I. (2015) Design of a new fluorescent oligonucleotide-based assay for a highly specific real-time detection of apurinic/aprimidinic site cleavage by tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1, *Bioconjug. Chem.*, **26**, 2046-2053, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00451.
- Thomson, G. J., Hamilton, N. S., Hopkins, G. V., Waddell, I. D., Watson, A. J., and Ogilvie, D. J. (2013) A fluorescence-based assay for the apurinic/aprimidinic-site cleavage activity of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1, *Anal. Biochem.*, **440**, 1-5, doi: 10.1016/j.ab.2013.05.003.
- Li, J., Svilar, D., McClellan, S., Kim, J.-H., Ahn, E.-Y. E., Vens, C., Wilson, D. M., and Sobol, R. W. (2018) DNA repair molecular beacon assay, a platform for real-time functional analysis of cellular DNA repair capacity, *Oncotarget*, **9**, 31719-31743, doi: 10.18632/oncotarget.25859.
- Wilson, D. L., and Kool, E. T. (2018) Fluorescent probes of DNA repair, *ACS Chem. Biol.*, **13**, 1721-1733, doi: 10.1021/acscchembio.7b00919.
- Hu, J., Liu, M.-H., Li, Y., Tang, B., and Zhang, C.-Y. (2018) Simultaneous sensitive detection of multiple DNA glycosylases from lung cancer cells at the single-molecule level, *Chem. Sci.*, **9**, 712-720, doi: 10.1039/c7sc04296e.
- Svilar, D., Vens, C., and Sobol, R. W. (2012) Quantitative, real-time analysis of base excision repair activity in cell lysates utilizing lesion-specific molecular beacons, *J. Vis. Exp.*, **66**, 4168, doi: 10.3791/4168.
- Healing, E., Charlier, C. F., Meira, L. B., and Elliott, R. M. (2019) A panel of colorimetric assays to measure enzymatic activity in the base excision DNA repair pathway, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 61, doi: 10.1093/nar/gkz171.
- Zhang, Y., Li, C., Tang, B., and Zhang, C. (2017) Homogeneously sensitive detection of multiple dna glycosylases with intrinsically fluorescent nucleotides, *Anal. Chem.*, **89**, 7684-7692, doi: 10.1021/acs.analchem.7b01655.
- Liu, G., He, W., and Liu, C. (2019) Sensitive detection of uracil-DNA glycosylase (UDG) activity based on terminal deoxynucleotidyl transferase-assisted formation of fluorescent copper nanoclusters (CuNCs), *Talanta*, **195**, 320-326, doi: 10.1016/j.talanta.2018.11.083.

35. Du, Y.-C., Jiang, H.-X., Huo, Y.-F., Han, G.-M., and Kong, D.-M. (2016) Optimization of strand displacement amplification-sensitized G-quadruplex DNAzyme-based sensing system and its application in activity detection of uracil-DNA glycosylase, *Biosens. Bioelectron.*, **77**, 971-977, doi: 10.1016/j.bios.2015.10.080.
36. Zhang, L., Zhao, J., Jiang, J., and Yu, R. (2012) A target-activated autocatalytic DNAzyme amplification strategy for the assay of base excision repair enzyme activity, *Chem. Commun.*, **48**, 8820-8822, doi: 10.1039/c2cc34531e.
37. Wang, L., Ren, M., Zhang, Q., Tang, B., and Zhang, C. (2017) Excision repair-initiated enzyme-assisted bicyclic cascade signal amplification for ultrasensitive detection of uracil-DNA glycosylase, *Anal. Chem.*, **89**, 4488-4494, doi: 10.1021/acs.analchem.6b04673.
38. Kladova, O. A., Bazlekova-Karaban, M., Bacconnais, S., Piétrement, O., Ishchenko, A. A., Matkarimov, B. T., Iakovlev, D. A., Vasenko, A., Fedorova, O. S., Le Cam, E., Tudek, B., Kuznetsov, N. A., and Saparbaev, M. (2018) The role of the N-terminal domain of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1, APE1, in DNA glycosylase stimulation, *DNA Repair (Amst.)*, **64**, 10-25, doi: 10.1016/j.dnarep.2018.02.001.
39. Kuznetsova, A. A., Kuznetsov, N. A., Ishchenko, A. A., Saparbaev, M. K., and Fedorova, O. S. (2014) Pre-steady-state fluorescence analysis of damaged DNA transfer from human DNA glycosylases to AP endonuclease APE1, *Biochim. Biophys. Acta*, **1840**, 3042-3051, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.07.016.
40. Waters, T. R., Gallinari, P., Jiricny, J., and Swann, P. F. (1999) Human thymine DNA glycosylase binds to apurinic sites in DNA but is displaced by human apurinic endonuclease 1, *J. Biol. Chem.*, **274**, 67-74.
41. Xia, L., Zheng, L., Lee, H. W., Bates, S. E., Federico, L., Shen, B., and O'Connor, T. R. (2005) Human 3-methyladenine-DNA glycosylase, effect of sequence context on excision, association with PCNA, and stimulation by AP endonuclease, *J. Mol. Biol.*, **346**, 1259-1274, doi: 10.1016/j.jmb.2005.01.014.
42. Esadze, A., Rodriguez, G., Cravens, S. L., and Stivers, J. T. (2017) AP-endonuclease 1 accelerates turnover of human 8-oxoguanine DNA glycosylase by preventing retrograde binding to the abasic-site product, *Biochemistry (Moscow)*, **56**, 1974-1986, doi: 10.1021/acs.biochem.7b00017.
43. Baldwin, M. R., and O'Brien, P. J. (2009) Human AP endonuclease 1 stimulates multiple-turnover base excision by alkyladenine DNA glycosylase, *Biochemistry*, **48**, 6022-6033, doi: 10.1021/bi900517y.
44. Miroshnikova, A. D., Kuznetsova, A. A., Vorobjev, Y. N., Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2016) Effects of mono- and divalent metal ions on DNA binding and catalysis of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1, *Mol. Biosyst.*, **12**, 1527-1539, doi: 10.1039/c6mb00128a.
45. Kuznetsov, N. A., Koval, V. V., and Fedorova, O. S. (2011) Mechanism of recognition and repair of damaged DNA by human 8-oxoguanine DNA glycosylase hOGG1, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 118-130, doi: 10.1134/S0006297911010123.
46. Kladova, O. A., Kuznetsova, A. A., Fedorova, O. S., and Kuznetsov, N. A. (2017) Mutational and kinetic analysis of lesion recognition by *Escherichia coli* endonuclease VIII, *Genes*, **8**, 1-13, doi: 10.3390/genes8050140.
47. Kuznetsova, A. A., Iakovlev, D. A., Misovets, I. V., Ishchenko, A. A., Saparbaev, M. K., Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2017) Pre-steady-state kinetic analysis of damage recognition by human single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase SMUG1, *Mol. Biosyst.*, **13**, 2638-2649, doi: 10.1039/c7mb00457e.
48. Yakovlev, D. A., Kuznetsova, A. A., Fedorova, O. S., and Kuznetsov, N. A. (2017) Search for modified DNA sites with the human methyl-CpG-binding enzyme MBD4, *Acta Naturae*, **9**, 88-98.

## MEASURING THE ACTIVITY OF BASE EXCISION REPAIR ENZYMES IN CELLULAR EXTRACTS USING FLUORESCENT DNA PROBES\*

**O. A. Kladova<sup>1</sup>, D. A. Iakovlev<sup>1</sup>, R. Groisman<sup>2,3</sup>, A. A. Ishchenko<sup>2,3</sup>,  
M. K. Saparbaev<sup>2,3</sup>, O. S. Fedorova<sup>1,4\*\*</sup>, and N. A. Kuznetsov<sup>1,4\*\*</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, 630090 Novosibirsk, Russia;  
E-mail: fedorova@niboch.nsc.ru, nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru*

<sup>2</sup> *Groupe "Réparation de l'AND", Equipe Labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer,  
CNRS UMR 8200, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-94805 Villejuif, France*

<sup>3</sup> *Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, F-94805 Villejuif, France*

<sup>4</sup> *Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia*

Received January 21, 2020

Revised February 13, 2020

Accepted February 17, 2020

DNA glycosylases remove modified, damaged, or mismatched bases from DNA by hydrolyzing the N-glycosidic bonds and generating an apurinic/apyrimidinic site (AP-site) in DNA. In most cases, the incision reaction of the AP-site is catalyzed by special enzymes called AP-endonucleases. The decrease in the functional activity of individual BER enzymes has been associated with an increased risk of cardiovascular, neurodegenerative, and oncological diseases. Here, we report the fluorescence-based assay for measuring the activity of key human DNA glycosylases and AP endonuclease. The efficacy of fluorescent DNA probes was tested by means of purified enzymes. Promising constructs were chosen to determine the activity of enzymes in the extracts of cell lines A549, MCF7, HeLa, WT-7, HEK293T, and HKC8. It was shown that the level of activity of repair enzymes was higher in cancer cell lines compared to a normal human kidney cell line.

**Keywords:** enzymatic activity, fluorescence, DNA probe, DNA glycosylase, AP endonuclease