

УДК 577.123

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК НА 3'→5'-ЭКЗОНУКЛЕАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ОСНОВНОЙ АПУРИН-АПИРИМИДИНОВОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ ЧЕЛОВЕКА APEX1

© 2022 А.В. Ендуткин¹, Д.Д. Яценко¹, Д.О. Жарков^{1,2*}

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

² Новосибирский государственный университет, факультет естественных наук, 630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 28.07.2021

После доработки 23.11.2021

Принята к публикации 24.11.2021

Апурин-апиримидиновые (АП) эндонуклеазы – ключевые ферменты пути эксцизионной репарации оснований ДНК, гидролизующие фосфоэфирную связь АП-сайта, который образуется после удаления повреждённого основания. Основная АП-эндонуклеаза человека APEX1, помимо этого, проявляет 3'-фосфодиэстеразную и 3'→5'-экзонуклеазную активности. Биологические функции последней не выяснены; предполагается, что она может корректировать ошибки репаративного синтеза ДНК. При повреждении ДНК с 3'-стороны вблизи 5-метилцитозина (mC) проявление 3'→5'-экзонуклеазной активности может вызывать изменение статуса эпигенетического метилирования CpG-динуклеотидов. Остаётся открытым вопрос: вносит ли 3'→5'-экзонуклеазная активность APEX1 вклад в процесс активного эпигенетического деметилирования или, напротив, она лимитирована в метилированных CpG-динуклеотидах для сохранения эпигенетического статуса при репарации случайных повреждений ДНК. В работе впервые систематически исследована эффективность удаления ферментом APEX1 3'-концевых нуклеотидов из субстратов, представляющих собой интермедиаты репарации ДНК в CpG-динуклеотидах. Показано, что во всех интермедиатах олигонуклеотиды с некомплементарными матрице основаниями на 3'-конце представляют собой наилучшие, а с mC – наихудший субстрат для проявления 3'→5'-экзонуклеазной активности APEX1. Наличие mC в комплементарной цепи значительно снижает константу скорости реакции даже для некомплементарных 3'-концевых звеньев. Таким образом, эффективность 3'→5'-экзонуклеазной реакции, катализируемой APEX1, ограничена в метилированных CpG-динуклеотидах, что, вероятно, связано с необходимостью поддержания эпигенетического статуса при репарации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: повреждение ДНК, репарация ДНК, эпигенетическое деметилирование, АП-эндонуклеаза, 3'→5'-экзонуклеаза, APEX1, 5-метилцитозин.

DOI: 10.31857/S0320972522010018

ВВЕДЕНИЕ

Спонтанный гидролиз и реакции с активными формами кислорода входят в число основных причин повреждения ДНК в клетках человека [1, 2]. Они приводят к появлению в ДНК широкого круга повреждённых нуклеотидов, которые обладают высоким цитотоксичным и промутагенным потенциалом и исправляются

по механизму эксцизионной репарации оснований (ЭРО) [1]. Этот процесс инициируется различными ДНК-*N*-гликозилазами, которые могут либо катализировать гидролиз *N*-гликозидной связи между повреждённым основанием и остатком дезоксирибозы, либо дополнительно вносить одноцепочечный разрыв в ДНК по механизму β- или β,δ-элиминирования [1, 3]. Образующиеся при этом апурин-апиримидиновые сайты (АП-сайты) или 3'-концевые α,β-ненасыщенные альдегиды служат субстратами для АП-эндонуклеаз, которые гидролизуют их 5'-фосфодиэфирную связь [1]. Процесс ЭРО далее протекает с участием ДНК-полимераз и ДНК-лигаз, которые восстанавливают каноническую структуру ДНК. Кроме борьбы с повреждениями ДНК, ЭРО лежит в основе процесса активного эпигенетического деметилирования, которое у человека запускается направленным и

Принятые сокращения: АП – апурин-апиримидиновый(ая); ОДН – олигодезоксирибонуклеотид; ЭРО – эксцизионная репарация оснований; APEX1 – апурин-апиримидиновая эндо/экзонуклеаза 1; dmCMP – 5-метилцитозин-2'-деоксирибонуклеотид; F – 2-(гидроксиметил)тетрагидрофуранол-3; mC – 5-метилцитозин; OGG1 – 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза 1; ohoG – 8-оксогуанин; TET – белки семейства Ten–Eleven Translocation.

* Адресат для корреспонденции.

контролируемым диоксигеназами семейства TET (Ten–Eleven Translocation) окислением 5-метилцитозина (mC) с дальнейшим удалением продуктов окисления из ДНК [4, 5] (рис. 1, *a*).

Основная АП-эндонуклеаза человека – белок APEX1 – помимо собственно АП-эндонуклеазной и 3′→5′-фосфодиэстеразной активности, обладает 3′→5′-экзонуклеазной активностью [6–8]. Поскольку она преимущественно удаляет нуклеотиды в составе неканонических пар, высказывалось предположение, что одна из функций этой активности состоит в коррекции ошибок ДНК-полимераз при репликативном или репаративном синтезе ДНК [6]. Однако считается, что у человека корректирующие функции при репликации выполняют 3′→5′-экзонуклеазы TREX1 и TREX2 [9], а кроме того, ДНК-полимеразы δ и ϵ сами обладают способностью корректировать ошибки [10]. Гораздо больше оснований полагать, что APEX1 может проявлять 3′→5′-экзонуклеазную активность в ходе ЭРО; продукты экзонуклеазной реакции часто наблюдают в реконструированных системах ЭРО, включающих ДНК-гликозилазы, APEX1, ДНК-полимеразу β и ДНК-лигазу [11–14]. С другой стороны, экзонуклеазная активность APEX1 ингибируется образующимся при репарации 5′-концевым остатком 2′-дезоксирибо-5′-фосфата [15]. Поэтому возможные функции фермента APEX1 как экзонуклеазы при репарации ДНК остаются неясными.

Недавно было достаточно неожиданно обнаружено, что 8-оксогуанин (охоG), одно из самых распространённых окисленных оснований ДНК, служит ключевым элементом активации генов факторами транскрипции ER α [16],

c-Мyc [17], RAR α [18] и Hif-1 α [19]. Показано, что факторы транскрипции связываются с сайтами-мишенями и привлекают деметилазу гистонов LSD1, которая в ходе окислительного деметилирования форм гистонов H3K4me2 и H3K9me2 производит в качестве одного из продуктов H₂O₂, вызывающую окисление основания гуанина в непосредственной близости от места своего возникновения. Получившиеся основания охоG удаляются из ДНК системой ЭРО с участием ДНК-гликозилазы OGG1 и APEX1, что каким-то образом приводит к активации транскрипции. Высказывалось предположение, что активирующим фактором служат возникающие в ходе репарации одноцепочечные разрывы ДНК, вызывающие релаксацию хроматина. Однако в других системах разрывы при репарации охоG в промоторах ингибируют инициацию транскрипции [20, 21]. Кроме того, показано, что одноцепочечные разрывы могут служить и «точкой входа» для экзонуклеаз либо геликаз и эндонуклеаз, которые гидролизуют более протяжённые участки цепи ДНК и могут вызывать деметилирование на значительных расстояниях от места разрыва (рис. 1, *б*) [22, 23]. Преимущество такого механизма для быстрой активации генов связано с возможностью удаления многих остатков mC за один раз. Однако до сих пор не была исследована потенциальная возможность эпигенетического деметилирования, связанная с репарацией охоG в метилированных CpG-динуклеотидах за счёт 3′→5′-экзонуклеазной активности APEX1 (рис. 1, *в*). С одной стороны, такой процесс мог бы служить дополнительным механизмом локального активного деметилирования при контролируемом повреждении ДНК.

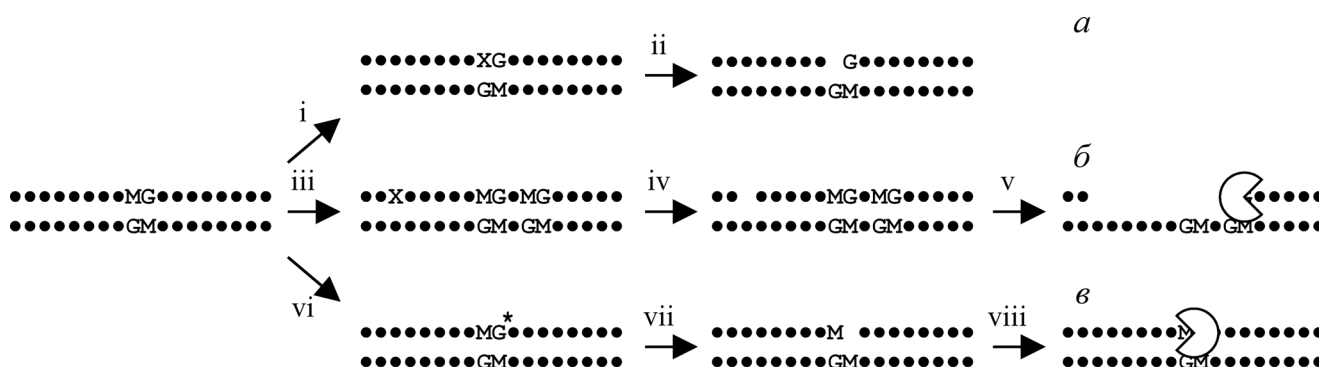


Рис. 1. Возможные пути активного деметилирования ДНК в клетках человека. Канонический путь активного деметилирования (*a*): направленное регулируемое повреждение 5-метилцитозина диоксигеназами TET (i) и удаление этого повреждения системой ЭРО (ii). Альтернативный путь (*б*): повреждение ДНК на некотором расстоянии от сайта метилирования (iii), внесение разрыва в этом месте при репарации (iv) и деградация участка ДНК экзонуклеазами (v). ОхоG-зависимый путь (*в*): окисление гуанина в метилированном CpG-динуклеотиде (vi), удаление охоG системой ЭРО (vii) и сопутствующий процессинг разрыва 3′→5′-экзонуклеазной активностью фермента APEX1 (viii). Условные обозначения: М – 5-метилцитозин, X – поврежденное основание, G* – 8-оксогуанин, сегментированный круг – фермент, обладающий экзонуклеазной активностью

С другой стороны, удаление mC в ходе экзонуклеазной реакции при случайном ненаправленном повреждении ДНК внутри или в непосредственной близости от CpG-сайтов изменяет статус метилирования, что даже при деметилировании единичных сайтов может иметь последствия для экспрессии генов за счёт изменения связывания регуляторных белков [24, 25] и смещения динамического равновесия между метилированием и деметилированием ДНК [26, 27].

В настоящем исследовании впервые проведён сравнительный анализ кинетики удаления ферментом АРЕХ1 канонических dNMP и 5-метилцитозин-2'-дезоксирибомонофосфата (dmCMP) с 3'-конца олигонуклеотидов в составе конструкций, моделирующих продукты ЭРО в CpG-динуклеотидах, где комплементарная цепь содержит либо не содержит mC. Показано, что dmCMP хуже всего процессируется 3'→5'-экзонуклеазной активностью АРЕХ1. Таким образом, система ЭРО, вероятно, оптимизирована для сохранения статуса метилирования при репарации случайных повреждений ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Олигонуклеотиды и белки. Олигодезоксирибонуклеотиды (ОДН), использованные в работе, синтезировали в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН с использованием коммерчески доступных амидофосфитов («Glen Research», США). Последовательности ОДН приведены в таблице. Все ОДН подвергали очистке с помощью обращённо-фазовой жидкостной хроматографии высокого давления на колонке LiChrosorb RP-18 («Merck», США), а затем с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. После обессоливания обращённо-фазовой хроматографией на сорбенте C₁₈ NenSorb ОДН при необходимости метили по 5'-концу с использованием $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и полинуклеотидкиназы бактериофага Т4 («Биосан», Россия) и отжигали с необходимыми комплементарными цепями. Белок АРЕХ1 человека выделяли в рекомбинантном виде, как описано ранее [28].

Условия определения экзонуклеазной активности белка АРЕХ1. Реакцию проводили в объёме 60 мкл в буфере, содержащем 20 mM HEPES-NaOH (pH 6,8), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM дитиотреитол, 4 нМ АРЕХ1 и 20 нМ ОДН-субстрат. Реакционную смесь инкубировали в течение 1–20 мин при 37 °С, отбирая аликвоты (10 мкл), которые смешивали с 5 мкл раствора 20 mM ЭДТА, 0,1%-ного ксиленцианола, 0,1%-ного бромфенолового синего в формами-

де и прогревали при 95 °С в течение 5 мин. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20%-ном полиакриламидном геле, содержащем 7,2 М мочевины, визуализировали при помощи радиолуминесцентного сканера Turphoon FLA 9500 Imager («GE Healthcare», США) и об- считывали с использованием программы Quantity One v4.6.8 («Bio-Rad Laboratories», США).

Ферментативная кинетика. Для определения параметров стационарной кинетики экзонуклеазной реакции, катализируемой ферментом АРЕХ1, реакцию проводили в объёме 10 мкл в описанном выше реакционном буфере в течение 5 мин при 37 °С. Концентрации субстрата составляли 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 и 100 нМ. Были подобраны такие концентрации фермента и время реакции, при которых расщепление субстрата не превышало 10–30%, чтобы зависимость накопления продукта от времени была близка к линейной. В большинстве случаев использовали концентрации фермента 0,5–1 нМ, что ниже минимальной концентрации субстрата, и лишь для наихудших субстратов концентрацию фермента повышали до 2–4 нМ. Реакцию останавливали и анализировали её продукты, как описано выше; для удобства об- счёта на гель наносили объёмы реакционной смеси, содержащие одинаковое количество радиоактивности. Полученные экспериментальные данные описывали уравнением Михаэлиса–Ментен, параметры уравнения определяли из данных 3–5 независимых экспериментов нелинейной регрессией гиперболической функции $v_0 = k_{\text{cat}}[E]_0[S]_0/(K_M + [S]_0)$ в программе SigmaPlot v9.0 («SPSS Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Дизайн ДНК-субстратов. Поскольку 3'→5'-экзонуклеазная активность фермента АРЕХ1 проявляется в ходе ЭРО [11–14], для её систематического исследования были сконструированы субстраты, имитирующие некоторые интермедиаты этого процесса. При этом представляло интерес сравнить экзонуклеазную активность для ДНК-субстратов, в которых комплементарная цепь содержит или не содержит mC. В связи с этим были разработаны 4 серии субстратов, каждая из которых включала две группы, различающиеся наличием C либо mC в составе CpG-динуклеотида в комплементарной цепи (таблица). Субстраты серии 1 (субстраты 1.1.1–1.1.5; 1.2.1–1.2.5) представляли собой двуцепочечные ОДН с выступающим 5'-одноцепочечным участком («праймер–матрица»), традиционно используемые для изучения активности 3'→5'-

Структуры олигонуклеотидных субстратов, использованных в работе

3'-концевой нуклеотид и статус метилирования*		Структура субстрата**.
Праймер–матрица (серия 1)		
X = C 1.1.1. N = C 1.1.2. N = T 1.1.3. N = A 1.1.4. N = G 1.1.5. N = M	X = M 1.2.1. N = C 1.2.2. N = T 1.2.3. N = A 1.2.4. N = G 1.2.5. N = M	GGTACAATTCGAGTGAGAN CCATGTATAGCTCACTCTG <u>X</u> AGTTCAACCCGAATGAGTCC
Одноцепочечный разрыв (серия 2)		
X = C 2.1.1. N = C 2.1.2. N = T 2.1.3. N = A 2.1.4. N = G 2.1.5. N = M	X = M 2.2.1. N = C 2.2.2. N = T 2.2.3. N = A 2.2.4. N = G 2.2.5. N = M	GGTACAATTCGAGTGAGAN GTCAAGTTGGGCTTACTCAGG CCATGTATAGCTCACTCTG~ <u>X</u> AGTTCAACCCGAATGAGTCC
Одноцепочечный разрыв при 5'-концевом АП-сайте (продукт АП-эндонуклеазной реакции) (серия 3)		
X = C 3.1.1. N = C 3.1.2. N = T 3.1.3. N = A 3.1.4. N = G 3.1.5. N = M	X = M 3.2.1. N = C 3.2.2. N = T 3.2.3. N = A 3.2.4. N = G 3.2.5. N = M	GGTACAATTCGAGTGAGAN FCAAGTTGGGCTTACTCAGG CCATGTATAGCTCACTCTG~ <u>X</u> AGTTCAACCCGAATGAGTCC
Однонуклеотидная брешь (серия 4)		
X = C 4.1.1. N = C 4.1.2. N = T 4.1.3. N = A 4.1.4. N = G 4.1.5. N = M	X = M 4.2.1. N = C 4.2.2. N = T 4.2.3. N = A 4.2.4. N = G 4.2.5. N = M	GGTACAATTCGAGTGAGAN TCAAGTTGGGCTTACTCAGG CCATGTATAGCTCACTCTG <u>X</u> AGTTCAACCCGAATGAGTCC

Примечание. * М – 5-метилцитозин; ** F – 2-(гидроксиметил)тетрагидрофуранол-3.

*** Верхняя цепь записана в направлении 5'→3'.

эксонуклеаз. Субстраты серии 2 (2.1.1–2.1.5; 2.2.1–2.2.5) содержали разрыв с 3'-стороны от удаляемого дезоксинуклеотида. Субстраты серии 3 (3.1.1–3.1.5; 3.2.1–3.2.5) также содержали разрыв, при этом на 5'-конце примыкающего к разрыву ОДН содержался остаток 2-(гидроксиметил)тетрагидрофуранола-3 (F) – аналога 2'-дезоксирибозы, не подверженного β-элиминированию, и потому гораздо более стабильного в физиологических условиях по сравнению с АП-сайтом; этот модифицированный нуклеотид часто применяется в исследованиях мутагенеза

и репарации ДНК [29, 30]. Субстраты такого строения моделируют структуру интермедиата репарации, образующегося после действия монофункциональной ДНК-гликозилазы и АП-эндонуклеазы. Остаток F не содержал 5'-концевой фосфатной группы, которая заметно снижает 3'→5'-эксонуклеазную активность АРЕХ1 [15]. Наконец, субстраты серии 4 (субстраты 4.1.1–4.1.5; 4.2.1–4.2.5) содержали однонуклеотидную брешь с 3'-стороны от удаляемого дезоксинуклеотида; они служат моделью интермедиата репарации, образующегося после β-эли-

минирования и действия АП-эндонуклеазы, либо после β, δ -элиминирования. Во всех случаях напротив удаляемого 3'-концевого звена располагалось основание G, которое с 5'-стороны в своей цепи соседствовало либо с C (субстраты 1.1.1–1.1.5; 2.1.1–2.1.5; 3.1.1–3.1.5; 4.1.1–4.1.5), либо с mC (субстраты 1.2.1–1.2.5; 2.2.1–2.2.5; 3.2.1–3.2.5; 4.2.1–4.2.5). На 3'-конце гидролизуемого ОДН содержались либо dCMP или dmCMP полностью комплементарные матрице, либо некомплементарные нуклеотиды.

3'-концевой dmCMP неэффективно удаляется 3'→5'-экзонуклеазной активностью АРЕХ1. На примере субстратов серии 1, не содержащих дополнительного примыкающего ОДН, была исследована общая эффективность удаления комплементарных и некомплементарных 3'-концевых dNMP ферментом АРЕХ1 (рис. 2). Во всех случаях для субстратов, содержащих неканонические пары, наблюдался более высокий уровень накопления продуктов реакции, что в целом согласуется с литературными данными [6–8]. Скорость реакции для субстратов группы 1.1 уменьшалась в ряду $T \sim A > G > C > mC$, аналогичная закономерность наблюдалась для группы 1.2: $T > A \sim G > C > mC$. Разные неканонические пары (A/G, G/G, T/G) незначительно отличались друг от друга по эффективности расщепления. Удаление 3'-концевого dmCMP, полностью комплементарного матрице, в использованных условиях было ещё менее эффективно, чем удаление dCMP. Предпочтительное удаление некомплементарных 3'-концевых нуклеотидов сохранялось при метилировании комплементарной цепи, однако во всех случаях наблюдалась тенденция к замедлению реакции при

наличии в комплементарной цепи остатка mC (ср. рис. 2, а и б).

3'→5'-экзонуклеазная активность АРЕХ1 зависит от природы разрыва в ДНК. Для количественного анализа 3'→5'-экзонуклеазной активности фермента АРЕХ1 были определены параметры стационарной кинетики этой реакции для субстратов, различающихся окружением деградируемого 3'-конца (серии 1–4, см. выше). На рис. 3 приведены результаты типичных экспериментов по определению кинетических параметров (K_M , k_{cat}) реакции.

При рассмотрении профилей значений константы Михаэлиса (K_M), константы скорости реакции (k_{cat}) и константы специфичности ($k_{sp} = k_{cat}/K_M$) (рис. 4) выявляются некоторые закономерности их зависимости от природы субстрата. В системе типа «праймер–матрица» наибольшая константа скорости реакции наблюдалась для всех субстратов с некомплементарным 3'-концевым нуклеотидом, однако K_M для них была выше, чем для субстратов с полностью комплементарным праймером, и в результате значения k_{sp} были близки. Праймер с 3'-концевым mC в такой системе характеризовался значениями k_{cat} , близкими к таковым для полностью комплементарного праймера, при высокой K_M , таким образом, mC удалялся с 3'-конца хуже всего.

Наличие примыкающего ОДН, отделённого разрывом или одноцепочечной брешью от 3'-конца праймера, несколько изменяло субстратные предпочтения 3'→5'-экзонуклеазной активности АРЕХ1. Наивысшая константа скорости реакции в обоих случаях наблюдалась для праймера с dTMP на 3'-конце, однако при этом для

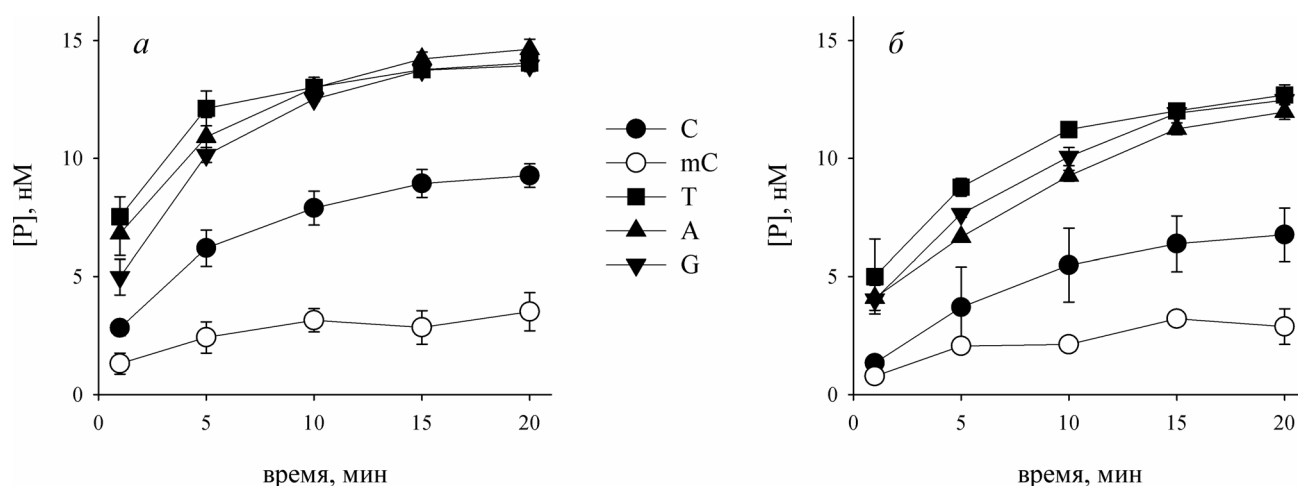


Рис. 2. Зависимость накопления продукта экзонуклеазного расщепления субстратов 1.1.1–1.1.5 (а) и 1.2.1–1.2.5 (б) ферментом АРЕХ1 от времени (фермент – 4 нМ, субстрат – 20 нМ, условия реакции описаны в разделе «Материалы и методы»). Приведены средние значения и стандартные ошибки ($n = 3$)

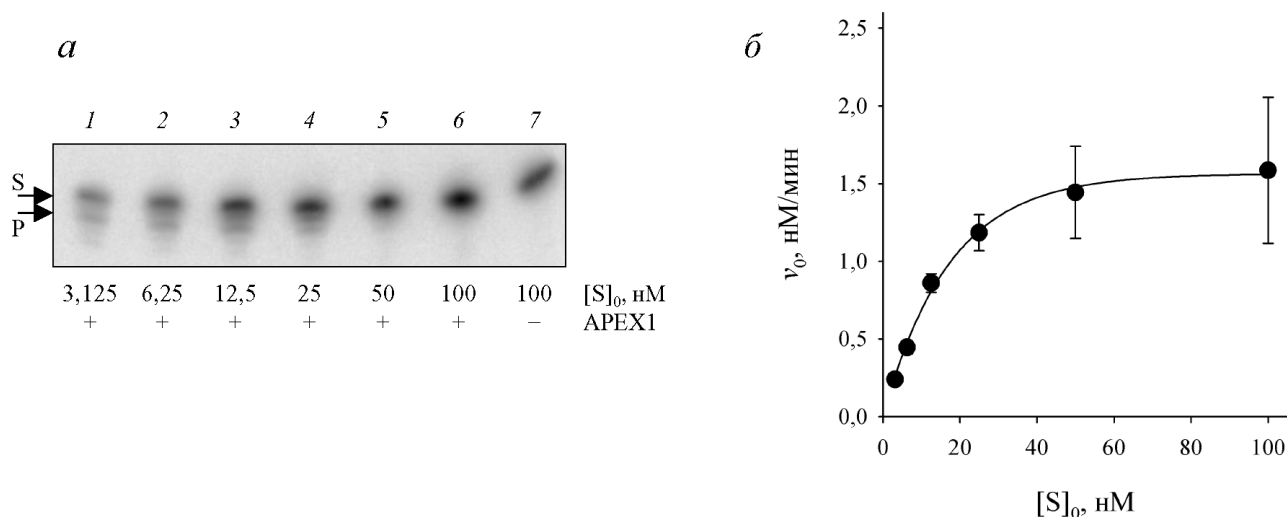


Рис. 3. Репрезентативный радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов 3'→5'-экзонуклеазной реакции (а, субстрат 2.1.3) и зависимость скорости накопления продукта от концентрации субстрата (б). Концентрации субстрата указаны на рисунке. Концентрация фермента составляла 3 нМ, время реакции – 5 мин

него повышалось и значение K_M , в результате чего константы специфичности для всех субстратов с некомплементарными 3'-концами были сходны. Значения k_{cat} для субстратов с С или mС на 3'-конце были заметно ниже, чем для субстратов с некомплементарными 3'-концами. При наличии бреши в несколько раз снижались значения K_M для субстратов с А и G на конце праймера. В целом при отсутствии метилирования специфичность АРЕХ1 по отношению к разным 3'-концевым нуклеотидам была похожа для субстратов без примыкающего ОДН, с разрывом и с брешью.

В присутствии остатка F на 5'-конце примыкающего ОДН значение K_M для субстратов с 3'-концевым С возрастало (рис. 4, а). Поскольку остаток F служит аналогом 5'-концевого остатка 2'-деоксирибо-5'-фосфата, возникающего как интермедиат ЭРО, этот результат согласуется с литературными данными о низкой 3'→5'-экзонуклеазной активности АРЕХ1 в таких субстратах [15]. Однако примечательно, что для 3'-концевого mС эффективность экзонуклеазной реакции АРЕХ1 не изменялась, вследствие чего С и mС удалялись с близкой константой специфичности (рис. 4, д).

3'→5'-экзонуклеазная активность АРЕХ1 снижена при метилировании комплементарной цепи. Наличие остатка mС в комплементарной цепи ДНК-субстрата оказывало неожиданно большое влияние на 3'→5'-экзонуклеазную активность АРЕХ1. При сравнении действия фермента АРЕХ1 по отношению к субстратам групп 1.1–4.1 и 1.2–4.2 заметно снижались (в 4–23 раза) значения k_{cat} для всех типов субстратов с не-

комплементарным 3'-концевым нуклеотидом (субстраты 2, 3 и 4 в каждой группе), если комплементарная цепь была метилирована, в то время как последствия модификации субстратов с комплементарным 3'-концевым нуклеотидом (С и mС; субстраты 1 и 5 в каждой группе) были гораздо ниже или вовсе не наблюдались (рис. 4, в и г). Метилирование комплементарной цепи в некоторых случаях оказывало влияние и на K_M : так, по сравнению с неметилированной комплементарной цепью эта величина повышалась в 5 раз для субстрата 4.2.1 с С на 3'-конце при однонуклеотидной бреши и снижалась в 7 раз для субстрата 3.2.4 с G на 3'-конце при 5'-концевом остатке F, однако эти изменения не носили столь систематического характера. На уровне специфичности, выраженной константой k_{sp} , удаление 3'-концевого mС из субстратов без примыкающего ОДН (1.1.5 и 1.2.5) и с разрывом (2.1.5 и 2.2.5) было наименее эффективно по сравнению с удалением других нуклеотидов вне зависимости от статуса метилирования комплементарной цепи. Однако при наличии бреши или остатка F при разрыве эффективность удаления mС из полностью метилированного субстрата (3.2.5 и 4.2.5) была сравнима с эффективностью удаления С (3.2.1 и 4.2.1; рис. 4, д и е).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3'→5'-экзонуклеазная активность основной АП-эндонуклеазы человека АРЕХ1 была описана довольно давно [31–33], но долгое время счи-

талась биологически неважной, поскольку она намного ниже, чем АП-эндонуклеазная, 3'-фосфоэстеразная и 3'-фосфатазная активности, принадлежащие этому полипептиду. Однако

позднее было установлено, что 3'→5'-экзонуклеазная активность АРЕХ1 более специфична для некомплементарных оснований на 3'-конце субстрата типа «праймер-матрица» [6–8, 34,

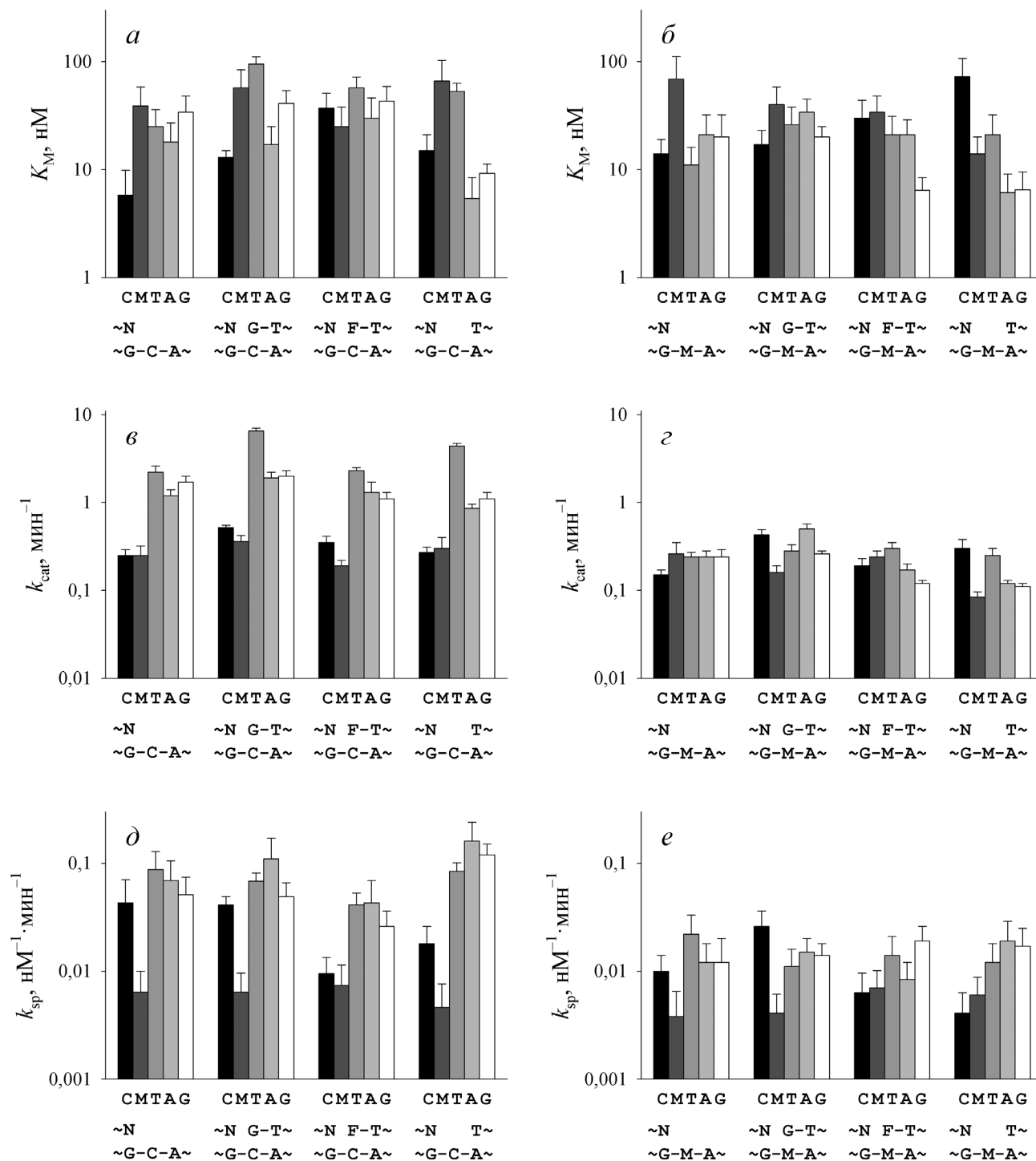


Рис. 4. Значения K_M (а, б), k_{cat} (в, г) и k_{sp} (д, е) 3'→5'-экзонуклеазной реакции, катализируемой ферментом АРЕХ1 для разных субстратов. Под каждым графиком приведены схематические изображения окружения удаляемого нуклеотида (N, природа удаляемого нуклеотида указана под соответствующими столбцами). М – 5-метилцитозин, F – 2-(гидроксиметил)тетрагидрофуранол-3

35], и некоторые авторы рассматривают АРЕХ1 как фермент, участвующий в коррекции ошибок при репликативном или, что более вероятно, репаративном синтезе ДНК [6, 14]. Помимо неправильно включенных канонических нуклеотидов, корректирующая экзонуклеазная активность АРЕХ1 удаляет из ДНК и многие 3'-концевые остатки нуклеозидных ингибиторов ДНК-полимераз и других неканонических нуклеотидов [36–40]. Недавно было показано, что в ходе репарации одноцепочечных разрывов ДНК после удаления 3'-концевого остатка ферментом АРЕХ1 3'→5'-экзонуклеазная реакция продолжается с участием нуклеазы АРЕХ2 – гомолога АРЕХ1, не проявляющего заметной АП-эндонуклеазной активности [41].

В исследовании были получены данные о гидролизе 40 субстратов, которые относились к 4 структурным сериям, различающимся наличием и природой примыкающего с 3'-стороны ОДН. В каждой серии на 3'-конце субстрата находился либо нуклеотид, комплементарный G в противоположной цепи (dCMP, dmCMP), либо некомплементарный нуклеотид (dAMP, dGMP, dTMP). Следует отметить, что примыкающие олигонуклеотиды в составе субстратов не содержали 5'-концевого фосфата, который заметно снижает эффективность 3'→5'-экзонуклеазной реакции АРЕХ1 во всех типах разрывов [8, 15, 34].

Полученные в работе результаты согласуются с литературными данными о том, что 3'→5'-экзонуклеазная активность фермента АРЕХ1 даже для некомплементарных нуклеотидов на 3'-конце заметна ниже его АП-эндонуклеазной активности. Значения k_{cat} экзонуклеазной реакции лежали в диапазоне 0,084–6,5 мин⁻¹, в то время как для АП-эндонуклеазной реакции они составляют 1–10 с⁻¹ в стационарном режиме [42–45], т.е. выше на 1–4 порядка, а константа скорости химической стадии реакции, не осложнённой распадом комплекса фермент–продукт, по данным предстационарной кинетики, превышает 700–850 с⁻¹ [46, 47]. В случае экзонуклеазной реакции её скорость, по-видимому, лимитируется именно высвобождением продукта [35]. С другой стороны, значения k_{cat} экзонуклеазной реакции сравнимы с таковыми для действия АРЕХ1 в так называемой «инцизионной репарации нуклеотидов» – гидролизе 5'-фосфодиэфирной связи модифицированных нуклеотидов, содержащих основания (5,6-дигидроурацил, αdA, rU) [48, 49]. Интересно, что значения K_M во всех этих случаях показывают значительно меньшую вариабельность и находятся внутри диапазона 1–100 нМ.

Наблюдавшаяся специфичность экзонуклеазной активности АРЕХ1 по отношению к раз-

ным типам субстратной ДНК в целом согласуется с литературными данными, полученными для более узких серий аналогичных субстратов, отличающихся последовательностью на 3'-конце [6–8, 34, 35]. Как и в этих работах, все субстраты с 3'-концевыми некомплементарными нуклеотидами расщеплялись ферментом лучше, чем субстраты с 3'-концевыми комплементарными нуклеотидами. В большинстве случаев наилучшие субстраты содержали на 3'-конце dTMP в составе неправильной пары Т/Г, что ранее наблюдалось для субстратов типа «праймер–матрица» [6]. Что касается природы примыкающих ОДН, то в целом субстраты с 5'-концевым остатком F использовались ферментом несколько хуже, чем субстраты с разрывом и с однонуклеотидной брешью (рис. 4, e), однако эта разница была менее выражена по сравнению с описанными различиями, зависящими от наличия 5'-фосфата [8, 15, 34]. В тех случаях, когда возможно прямое сравнение субстратов с разными примыкающими ОДН и однотипными 5'-концами (фосфат или ОН-группа) разница в активности АРЕХ1 между такими субстратами не превышает 2 раз [8, 15, 34]. Ряд структур комплексов АРЕХ1 с ДНК, отражающих разные стадии экзо- и экзонуклеазной реакции, позволяет установить ключевые различия между этими двумя активностями фермента [50–55]. Для катализа АП-эндонуклеазной реакции АП-сайт переводится во внеспиральное состояние и связывается в активном центре фермента, а его фосфатная группа координируется водородными связями с остатками Tyr171, Asn174, Asn212 и His309 (рис. 5, a). При этом в спираль ДНК внедряются два боковых аминокислотных радикала: Arg177 заполняет полость, образовавшуюся при выворачивании повреждённого нуклеотида, а Met270 вклинивается напротив него между основаниями комплементарной цепи и вызывает её локальный излом в сторону большой бороздки на ~25°. Ион Mg²⁺, координируемый карбоксильными группами остатков Asp70, Glu96 и Asp308, поляризует связь Р=О в фосфатной группе АП-сайта, а роль атакующего нуклеофила выполняет молекула воды, активированная взаимодействием с карбоксильной группой остатка Asp210 (рис. 5, a). Структуры субстрата для 3'→5'-экзонуклеазной реакции до сих пор удалось получить лишь при наличии некомплементарного основания на 3'-конце в системе с одноцепочечным разрывом ДНК (аналогичной серии 2 в настоящей работе) [53, 55]. Общая организация активного центра в этом случае остаётся неизменной (рис. 5, б), однако, поскольку его объём не позволяет связать вывернутый из спирали нуклеотид с присут-

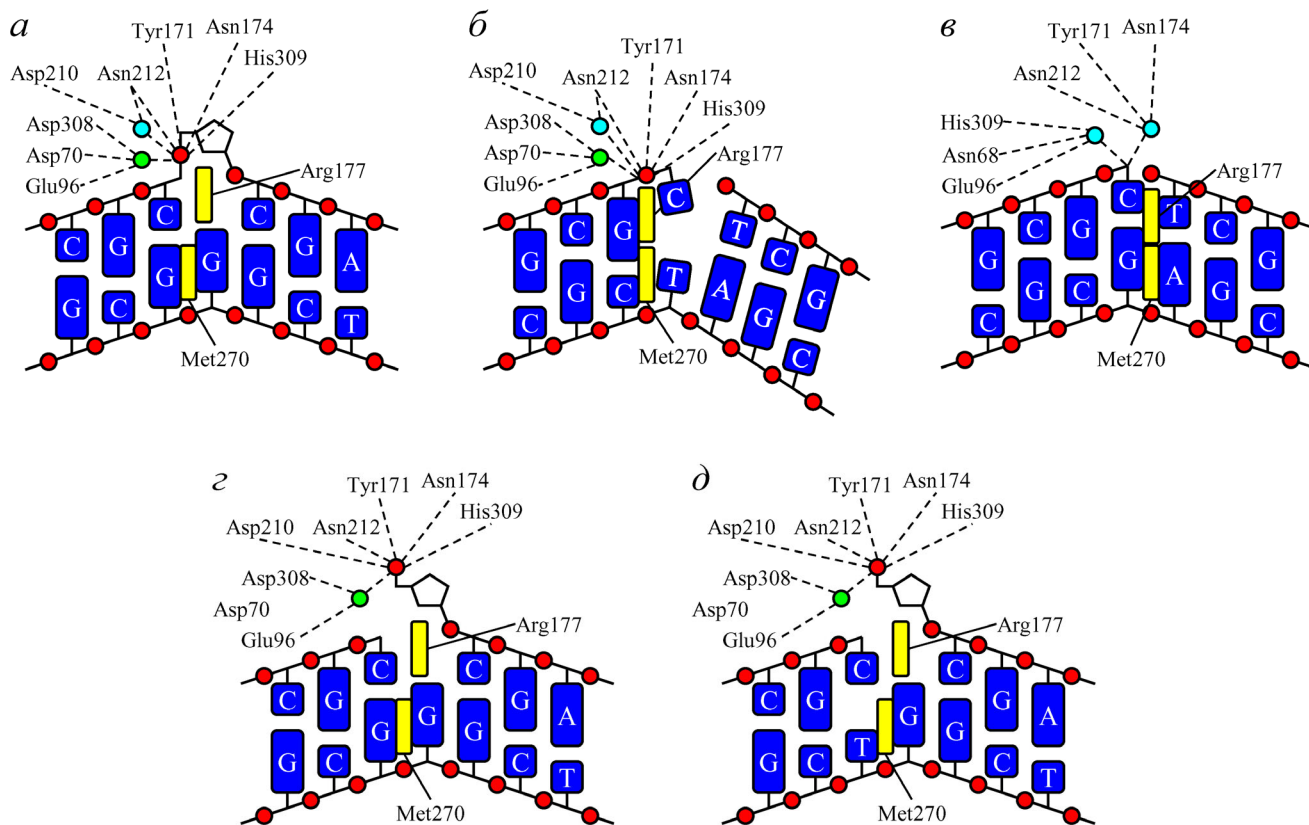


Рис. 5. Схема организации активного центра АРЕХ1 при взаимодействии фермента с ДНК, содержащей остаток F (*a*; на основе структуры 5DG0 [52]), одноцепочечный разрыв рядом с некомплементарной парой оснований C/T (*б*; на основе структуры 5WN5 [53]), одноцепочечный разрыв рядом с комплементарной парой оснований C/G (*в*; на основе структуры 5WN0 [53]), аналог интермедиата ЭРО рядом с комплементарной парой оснований C/G (*г*; на основе структуры 5DFF [52]) и аналог интермедиата ЭРО рядом с некомплементарной парой оснований C/T (*д*; на основе структуры 6W2P [55]). Голубым кружком обозначена молекула воды, зелёным – ион Mg^{2+} , красными – межнуклеозидные фосфаты

ствующим основанием, внедрение остатков Arg177 и Met270 сопровождается гораздо более выраженным локальным изломом ДНК (~65°). Возможно, именно с этим связано наблюдаемое в настоящей работе влияние mC на активность АРЕХ1: известно, что наличие C5-метильной группы в большой бороздке вызывает стерические затруднения при изломе ДНК и повышает её жёсткость [56, 57]. Если же рядом с разрывом ДНК на 3'-конце находится комплементарная пара нуклеотидов, гидролизуемая фосфодиэфирная связь в структуре располагается вне активного центра, а ион металла в таких структурах отсутствует, несмотря на его наличие в кристаллизационном растворе, заменяясь на молекулу воды (рис. 5, в). Arg177 и Met270 находятся в месте разрыва, взаимодействуя с ароматическими системами 3'-концевого основания и комплементарного ему основания. Этими структурными особенностями, очевидно, объясняется низкая 3'→5'-экзонуклеазная активность фермента АРЕХ1 по отношению к

субстратам с комплементарными 3'-концевыми парами.

Несмотря на то что 3'→5'-экзонуклеазная активность АРЕХ1 часто наблюдается в реконструированной из рекомбинантных белков системе ЭРО [11–14], субстраты серии 3, моделирующие возникающий после действия монофункциональной ДНК-гликозилазы и АП-эндонуклеазы интермедиат ЭРО, оказались в целом наименее подходящими для её проявления (ср. значения k_{sp} на рис. 4, д). Со структурной точки зрения, это объясняется, скорее всего, тем, что после гидролиза фосфодиэфирной связи АП-сайт остаётся связанным в активном центре фермента, сохраняя большую часть взаимодействий с аминокислотными остатками и ионом металла, что затрудняет перенос в активный центр другого фосфата ДНК даже при наличии некомплементарной пары на 3'-конце (рис. 5, г и д). С функциональной же точки зрения, корректирующая активность АРЕХ1 в процессе ЭРО должна наблюдаться после включения ДНК-полимеразой β

неверного dNMP, что сопровождается вытеснением и удалением остатка 2'-дезоксирибо-5'-фосфата N-концевым доменом ДНК-полимеразы β [58, 59]. Поэтому для 3'→5'-экзонуклеазной реакции более актуальны, как модели ЭРО, субстраты с разрывом ДНК без модификации 5'-конца примыкающего ОДН, на которых APEX1 показывает наивысшую экзонуклеазную активность.

Комплементарный матрице 3'-концевой dmCMP удалялся ферментом APEX1 даже менее эффективно, чем dCMP. Аналогичный результат был недавно получен с использованием метода остановленного потока для субстратов типа «праймер–матрица» [35]. Поскольку пара mC/G термодинамически более стабильна, чем C/G [60, 61], это наблюдение согласуется с предположением о стабильности 3'-концевой нуклеотидной пары как ключевого фактора, определяющего эффективность 3'→5'-экзонуклеазной реакции APEX1 [34]. Однако интересно, что именно в случае F-содержащего субстрата (серия 3) разницы между удалением dmCMP и dCMP не наблюдалось. Низкая эффективность удаления dmCMP и снижение 3'→5'-экзонуклеазной активности фермента APEX1 при наличии mC в неповрежденной цепи позволяет предположить, что эта активность вряд ли играет значительную роль в активном деметилировании ДНК в клетках человека. Напротив, впол-

не вероятно, что в процессе ЭРО этап, катализируемый AP-эндонуклеазой, оптимизирован в том числе для сохранения статуса метилирования CpG-динуклеотидов. Экспериментально наблюдаемая ohoG/OGG1/APEX1-зависимая активация некоторых промоторов [16, 17, 19] может объясняться другими причинами, например, связанным с репарацией ремоделированием хроматина [62, 63] или непосредственным взаимодействием OGG1 и APEX1 с транскрипционными факторами [64–67]. Появление новых методов картирования повреждений ДНК с нуклеотидным разрешением [68–71] в сочетании с mC-специфичным секвенированием поможет в будущем прояснить связь между процессами повреждения ДНК, репарации и эпигенетической регуляции в геноме человека.

Финансирование. Исследование поддержано Российским научным фондом (грант № 17-14-01190П, экспериментальная биохимическая часть) и государственным заданием 0245-2021-0002 (структурный анализ).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A., et al. (2006) *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington, D.C., 1118 pp.
- Halliwel, B., and Gutteridge, J. M. C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine, 4th Edn.*, Oxford University Press, Oxford, 704 pp.
- Stivers, J. T., and Jiang, Y. L. (2003) A mechanistic perspective on the chemistry of DNA repair glycosylases, *Chem. Rev.*, **103**, 2729–2760, doi: 10.1021/cr010219b.
- Kohli, R. M., and Zhang, Y. (2013) TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation, *Nature*, **502**, 472–479, doi: 10.1038/nature12750.
- Wu, X., and Zhang, Y. (2017) TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond, *Nat. Rev. Genet.*, **18**, 517–534, doi: 10.1038/nrg.2017.33.
- Chou, K.-M., and Cheng, Y.-C. (2002) An exonucleolytic activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease on 3'-mispai red DNA, *Nature*, **415**, 655–659, doi: 10.1038/415655a.
- Chou, K.-M., and Cheng, Y.-C. (2003) The exonuclease activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1): biochemical properties and inhibition by the natural dinucleotide Gp₄G, *J. Biol. Chem.*, **278**, 18289–18296, doi: 10.1074/jbc.M212143200.
- Wilson, D. M., III (2003) Properties of and substrate determinants for the exonuclease activity of human apurinic endonuclease Ape1, *J. Mol. Biol.*, **330**, 1027–1037, doi: 10.1016/S0022-2836(03)00712-5.
- Mazur, D. J., and Perrino, F. W. (1999) Identification and expression of the TREX1 and TREX2 cDNA sequences encoding mammalian 3'→5' exonucleases, *J. Biol. Chem.*, **274**, 19655–19660, doi: 10.1074/jbc.274.28.19655.
- Albertson, T. M., Ogawa, M., Bugni, J. M., Hays, L. E., Chen, Y., et al. (2009) DNA polymerase ϵ and δ proofreading suppress discrete mutator and cancer phenotypes in mice, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **106**, 17101–17104, doi: 10.1073/pnas.0907147106.
- Kasymov, R. D., Grin, I. R., Endutkin, A. V., Smirnov, S. L., Ishchenko, A. A., et al. (2013) Excision of 8-oxoguanine from methylated CpG dinucleotides by human 8-oxoguanine DNA glycosylase, *FEBS Lett.*, **587**, 3129–3134, doi: 10.1016/j.febslet.2013.08.008.
- Beaver, J. M., Lai, Y., Xu, M., Casin, A. H., Laverde, E. E., et al. (2015) AP endonuclease 1 prevents trinucleotide repeat expansion via a novel mechanism during base excision repair, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 5948–5960, doi: 10.1093/nar/gkv530.
- Çağlayan, M., Horton, J. K., Dai, D.-P., Stefanick, D. F., and Wilson, S. H. (2017) Oxidized nucleotide insertion by pol β confounds ligation during base excision repair, *Nat. Commun.*, **8**, 14045, doi: 10.1038/ncomms14045.
- Liu, T.-C., Lin, C.-T., Chang, K.-C., Guo, K.-W., Wang, S., et al. (2021) APE1 distinguishes DNA substrates in exonucleolytic cleavage by induced space-filling, *Nat. Commun.*, **12**, 601, doi: 10.1038/s41467-020-20853-2.
- Wong, D., DeMott, M. S., and Demple, B. (2003) Modulation of the 3'→5'-exonuclease activity of human

- apurinic endonuclease (Ape1) by its 5'-incised abasic DNA product, *J. Biol. Chem.*, **278**, 36242-36249, doi: 10.1074/jbc.M306065200.
16. Perillo, B., Ombra, M. N., Bertoni, A., Cuozzo, C., Sacchetti, S., et al. (2008) DNA oxidation as triggered by H3K9me2 demethylation drives estrogen-induced gene expression, *Science*, **319**, 202-206, doi: 10.1126/science.1147674.
 17. Amente, S., Bertoni, A., Morano, A., Lania, L., Avvedimento, E. V., et al. (2010) LSD1-mediated demethylation of histone H3 lysine 4 triggers Myc-induced transcription, *Oncogene*, **29**, 3691-3702, doi: 10.1038/onc.2010.120.
 18. Zuchegna, C., Aceto, F., Bertoni, A., Romano, A., Perillo, B., et al. (2014) Mechanism of retinoic acid-induced transcription: Histone code, DNA oxidation and formation of chromatin loops, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 11040-11055, doi: 10.1093/nar/gku823.
 19. Pastukh, V., Roberts, J. T., Clark, D. W., Bardwell, G. C., Patel, M., et al. (2015) An oxidative DNA "damage" and repair mechanism localized in the VEGF promoter is important for hypoxia-induced VEGF mRNA expression, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **309**, L1367-L1375, doi: 10.1152/ajplung.00236.2015.
 20. Allgayer, J., Kitsera, N., Bartelt, S., Epe, B., and Khobta, A. (2016) Widespread transcriptional gene inactivation initiated by a repair intermediate of 8-oxoguanine, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 7267-7280, doi: 10.1093/nar/gkw473.
 21. Müller, N., and Khobta, A. (2021) Regulation of GC box activity by 8-oxoguanine, *Redox Biol.*, **43**, 101997, doi: 10.1016/j.redox.2021.101997.
 22. Grin, I., and Ishchenko, A. A. (2016) An interplay of the base excision repair and mismatch repair pathways in active DNA demethylation, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 3713-3727, doi: 10.1093/nar/gkw059.
 23. Woodrick, J., Gupta, S., Camacho, S., Parvathaneni, S., Choudhury, S., et al. (2017) A new sub-pathway of long-patch base excision repair involving 5' gap formation, *EMBO J.*, **36**, 1605-1622, doi: 10.15252/embj.201694920.
 24. Murayama, A., Sakura, K., Nakama, M., Yasuzawa-Tanaka, K., Fujita, E., et al. (2006) A specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promoter is an epigenetic memory, *EMBO J.*, **25**, 1081-1092, doi: 10.1038/sj.emboj.7601012.
 25. Cuomo, M., Keller, S., Punzo, D., Nuzzo, T., Affinito, O., et al. (2019) Selective demethylation of two CpG sites causes postnatal activation of the *Dao* gene and consequent removal of D-serine within the mouse cerebellum, *Clin. Epigenetics*, **11**, 149, doi: 10.1186/s13148-019-0732-z.
 26. Turker, M. S. (2002) Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation, *Oncogene*, **21**, 5388-5393, doi: 10.1038/sj.onc.1205599.
 27. Ehrlich, M., and Lacey, M. (2013) DNA hypomethylation and hemimethylation in cancer, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **754**, 31-56, doi: 10.1007/978-1-4419-9967-2_2.
 28. Sidorenko, V. S., Nevinsky, G. A., and Zharkov, D. O. (2007) Mechanism of interaction between human 8-oxoguanine-DNA glycosylase and AP endonuclease, *DNA Repair*, **6**, 317-328, doi: 10.1016/j.dnarep.2006.10.022.
 29. Takeshita, M., Chang, C.-N., Johnson, F., Will, S., and Grollman, A. P. (1987) Oligodeoxynucleotides containing synthetic abasic sites: model substrates for DNA polymerases and apurinic/apyrimidinic endonucleases, *J. Biol. Chem.*, **262**, 10171-10179, doi: 10.1016/S0021-9258(18)61093-2.
 30. Kroeger, K. M., Goodman, M. F., and Greenberg, M. M. (2004) A comprehensive comparison of DNA replication past 2-deoxyribose and its tetrahydrofuran analog in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5480-5485, doi: 10.1093/nar/gkh873.
 31. Seki, S., Hatsushika, M., Watanabe, S., Akiyama, K., Nagao, K., et al. (1992) cDNA cloning, sequencing, expression and possible domain structure of human APEX nuclease homologous to *Escherichia coli* exonuclease III, *Biochim. Biophys. Acta*, **1131**, 287-299, doi: 10.1016/0167-4781(92)90027-W.
 32. Wilson, D. M., III, Takeshita, M., Grollman, A. P., and Demple, B. (1995) Incision activity of human apurinic endonuclease (Ape) at abasic site analogs in DNA, *J. Biol. Chem.*, **270**, 16002-16007, doi: 10.1074/jbc.270.27.16002.
 33. Lebedeva, N. A., Khodyreva, S. N., Favre, A., and Lavrik, O. I. (2003) AP endonuclease 1 has no biologically significant 3'→5'-exonuclease activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 182-187, doi: 10.1016/S0006-291X(02)02808-5.
 34. Dyrkheeva, N. S., Lomzov, A. A., Pyshnyi, D. V., Khodyreva, S. N., and Lavrik, O. I. (2006) Efficiency of exonucleolytic action of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 towards matched and mismatched dNMP at the 3'-terminus of different oligomeric DNA structures correlates with thermal stability of DNA duplexes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1764**, 699-706, doi: 10.1016/j.bbapap.2006.01.004.
 35. Kuznetsova, A. A., Fedorova, O. S., and Kuznetsov, N. A. (2018) Kinetic features of 3'-5' exonuclease activity of human AP-endonuclease APE1, *Molecules*, **23**, 2101, doi: 10.3390/molecules23092101.
 36. Chou, K.-M., Kukhanova, M., and Cheng, Y.-C. (2000) A novel action of human apurinic/apyrimidinic endonuclease: excision of L-configuration deoxyribonucleoside analogs from the 3' termini of DNA, *J. Biol. Chem.*, **275**, 31009-31015, doi: 10.1074/jbc.M004082200.
 37. Lam, W., Park, S.-Y., Leung, C.-H., and Cheng, Y.-C. (2006) Apurinic/apyrimidinic endonuclease-1 protein level is associated with the cytotoxicity of L-configuration deoxycytidine analogs (troxacitabine and β-L-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-5-fluorocytidine) but not D-configuration deoxycytidine analogs (gemcitabine and β-D-arabinofuranosylcytosine), *Mol. Pharmacol.*, **69**, 1607-1614, doi: 10.1124/mol.105.021527.
 38. Dyrkheeva, N. S., Khodyreva, S. N., Sukhanova, M. V., Safronov, I. V., Dezhurov, S. V., et al. (2006) 3'-5' exonuclease activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 towards DNAs containing dNMP and their modified analogs at the 3' end of single strand DNA break, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 200-210, doi: 10.1134/S0006297906020131.
 39. Dyrkheeva, N. S., Khodyreva, S. N., and Lavrik, O. I. (2008) Quantitative parameters of the 3'-5' exonuclease reaction of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 with nicked DNA containing dYMP or a modified dCMP analogue, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **34**, 192-200, doi: 10.1134/S1068162008020088.
 40. Dyrkheeva, N. S., Lebedeva, N. A., Sherstyuk, Y. V., Abramova, T. V., Silnikov, V. N., et al. (2018) Excision of carbohydrate-modified dNMP analogues from DNA 3' end by human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1), *Mol. Biol. (Mosk)*, **52**, 922-928, doi: 10.1134/S0026893318060067.
 41. Lin, Y., Raj, J., Li, J., Ha, A., Hossain, M. A., et al. (2020) APE1 senses DNA single-strand breaks for repair and signaling, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 1925-1940, doi: 10.1093/nar/gkz1175.
 42. Strauss, P. R., Beard, W. A., Patterson, T. A., and Wilson, S. H. (1997) Substrate binding by human apurinic/apyrimidinic endonuclease indicates a Briggs-Haldane mechanism, *J. Biol. Chem.*, **272**, 1302-1307, doi: 10.1074/jbc.272.2.1302.

43. Mantha, A. K., Oezguen, N., Bhakat, K. K., Izumi, T., Braun, W., et al. (2008) Unusual role of a cysteine residue in substrate binding and activity of human AP-endonuclease 1, *J. Mol. Biol.*, **379**, 28–37, doi: 10.1016/j.jmb.2008.03.052.
44. Kanazhevskaya, L. Y., Koval, V. V., Zharkov, D. O., Strauss, P. R., and Fedorova, O. S. (2010) Conformational transitions in human AP endonuclease 1 and its active site mutant during abasic site repair, *Biochemistry*, **49**, 6451–6461, doi: 10.1021/bi100769k.
45. Adhikari, S., Manthena, P. V., Kota, K. K., Karmahapatra, S. K., Roy, G., et al. (2012) A comparative study of recombinant mouse and human apurinic/aprimidinic endonuclease, *Mol. Cell. Biochem.*, **362**, 195–201, doi: 10.1007/s11010-011-1142-5.
46. Maher, R. L., and Bloom, L. B. (2007) Pre-steady-state kinetic characterization of the AP endonuclease activity of human AP endonuclease 1, *J. Biol. Chem.*, **282**, 30577–30585, doi: 10.1074/jbc.M704341200.
47. Schermerhorn, K. M., and Delaney, S. (2013) Transient-state kinetics of apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease 1 acting on an authentic AP site and commonly used substrate analogs: The effect of diverse metal ions and base mismatches, *Biochemistry*, **52**, 7669–7677, doi: 10.1021/bi401218r.
48. Gros, L., Ishchenko, A. A., Ide, H., Elder, R. H., and Saparbaev, M. K. (2004) The major human AP endonuclease (Ape1) is involved in the nucleotide incision repair pathway, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 73–81, doi: 10.1093/nar/gkh165.
49. Kim, S.-E., Gorrell, A., Rader, S. D., and Lee, C. H. (2010) Endoribonuclease activity of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 revealed by a real-time fluorometric assay, *Anal. Biochem.*, **398**, 69–75, doi: 10.1016/j.ab.2009.11.024.
50. Mol, C. D., Izumi, T., Mitra, S., and Tainer, J. A. (2000) DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 and DNA repair coordination, *Nature*, **403**, 451–456, doi: 10.1038/35000249.
51. Tsutakawa, S. E., Shin, D. S., Mol, C. D., Izumi, T., Arvai, A. S., et al. (2013) Conserved structural chemistry for incision activity in structurally non-homologous apurinic/aprimidinic endonuclease APE1 and endonuclease IV DNA repair enzymes, *J. Biol. Chem.*, **288**, 8445–8455, doi: 10.1074/jbc.M112.422774.
52. Freudenthal, B. D., Beard, W. A., Cuneo, M. J., Dyrkheeva, N. S., and Wilson, S. H. (2015) Capturing snapshots of APE1 processing DNA damage, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 924–931, doi: 10.1038/nsmb.3105.
53. Whitaker, A. M., Flynn, T. S., and Freudenthal, B. D. (2018) Molecular snapshots of APE1 proofreading mismatches and removing DNA damage, *Nat. Commun.*, **9**, 399, doi: 10.1038/s41467-017-02175-y.
54. Fairlamb, M. S., Whitaker, A. M., and Freudenthal, B. D. (2018) Apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease 1 processing of AP sites with 5' mismatches, *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.*, **74**, 760–768, doi: 10.1107/S2059798318003340.
55. Whitaker, A. M., Stark, W. J., Flynn, T. S., and Freudenthal, B. D. (2020) Molecular and structural characterization of disease-associated APE1 polymorphisms, *DNA Repair*, **91–92**, 102867, doi: 10.1016/j.dnarep.2020.102867.
56. Nathan, D., and Crothers, D. M. (2002) Bending and flexibility of methylated and unmethylated *EcoRI* DNA, *J. Mol. Biol.*, **316**, 7–17, doi: 10.1006/jmbi.2001.5247.
57. Teng, X., and Hwang, W. (2018) Effect of methylation on local mechanics and hydration structure of DNA, *Biophys. J.*, **114**, 1791–1803, doi: 10.1016/j.bpj.2018.03.022.
58. Prasad, R., Beard, W. A., Strauss, P. R., and Wilson, S. H. (1998) Human DNA polymerase β deoxyribose phosphate lyase: substrate specificity and catalytic mechanism, *J. Biol. Chem.*, **273**, 15263–15270, doi: 10.1074/jbc.273.24.15263.
59. Sobol, R. W., Prasad, R., Evenski, A., Baker, A., Yang, X.-P., et al. (2000) The lyase activity of the DNA repair protein β -polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity, *Nature*, **405**, 807–810, doi: 10.1038/35015598.
60. Hoheisel, J. D., Craig, A. G., and Lehrach, H. (1990) Effect of 5-bromo- and 5-methyldeoxycytosine on duplex stability and discrimination of the *NotI* octadeoxynucleotide: quantitative measurements using thin-layer chromatography, *J. Biol. Chem.*, **265**, 16656–16660, doi: 10.1016/S0021-9258(17)46271-5.
61. Lebedev, Y., Akopyants, N., Azhikina, T., Shevchenko, Y., Potapov, V., et al. (1996) Oligonucleotides containing 2-aminoadenine and 5-methylcytosine are more effective as primers for PCR amplification than their nonmodified counterparts, *Genet. Anal.*, **13**, 15–21, doi: 10.1016/1050-3862(96)00139-8.
62. Menoni, H., Gasparutto, D., Hamiche, A., Cadet, J., Dimitrov, S., et al. (2007) ATP-dependent chromatin remodeling is required for base excision repair in conventional but not in variant H2A. Bbd nucleosomes, *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 5949–5956, doi: 10.1128/MCB.00376-07.
63. Azzouz, D., Khan, M. A., and Palaniyar, N. (2021) ROS induces NETosis by oxidizing DNA and initiating DNA repair, *Cell Death Discov.*, **7**, 113, doi: 10.1038/s41420-021-00491-3.
64. Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., Pan, Y.-C. E., and Curran, T. (1992) Redox activation of Fos–Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme, *EMBO J.*, **11**, 3323–3335, doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05411.x.
65. Carrero, P., Okamoto, K., Coumailleau, P., O'Brien, S., Tanaka, H., et al. (2000) Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1 α , *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 402–415, doi: 10.1128/MCB.20.1.402-415.2000.
66. Ando, K., Hirao, S., Kabe, Y., Ogura, Y., Sato, I., et al. (2008) A new APE1/Ref-1-dependent pathway leading to reduction of NF- κ B and AP-1, and activation of their DNA-binding activity, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 4327–4336, doi: 10.1093/nar/gkn416.
67. Fleming, A. M., Ding, Y., and Burrows, C. J. (2017) Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 2604–2609, doi: 10.1073/pnas.1619809114.
68. Liu, Z. J., Martínez Cuesta, S., van Delft, P., and Balasubramanian, S. (2019) Sequencing abasic sites in DNA at single-nucleotide resolution, *Nat. Chem.*, **11**, 629–637, doi: 10.1038/s41557-019-0279-9.
69. Fang, Y., and Zou, P. (2020) Genome-wide mapping of oxidative DNA damage via engineering of 8-oxoguanine DNA glycosylase, *Biochemistry*, **59**, 85–89, doi: 10.1021/acs.biochem.9b00782.
70. Gorini, F., Scala, G., Di Palo, G., Dellino, G. I., Coccozza, S., et al. (2020) The genomic landscape of 8-oxodG reveals enrichment at specific inherently fragile promoters, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 4309–4324, doi: 10.1093/nar/gkaa175.
71. Roychoudhury, S., Pramanik, S., Harris, H. L., Tarpley, M., Sarkar, A., et al. (2020) Endogenous oxidized DNA bases and APE1 regulate the formation of G-quadruplex structures in the genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 11409–11420, doi: 10.1073/pnas.1912355117.

DNA METHYLATION AFFECTS THE 3'→5' EXONUCLEASE ACTIVITY OF THE MAJOR HUMAN ABASIC SITE ENDONUCLEASE, APEX1**A. V. Endutkin¹, D. D. Yatsenko¹, and D. O. Zharkov^{1,2*}**¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru*² *Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia*

Apurinic/aprimidinic (AP) endonucleases are key enzymes in the DNA base excision repair pathway that hydrolyze the phosphodiester bond of the AP site formed after the removal of a damaged base. The major human AP endonuclease APEX1 additionally possesses 3'-phosphodiesterase and 3'→5' exonuclease activities. The biological roles of the latter are not established at present; it is assumed to correct errors in the DNA repair synthesis. If DNA is damaged 3' of a 5-methylcytosine (mC) residue, the 3'→5' exonuclease activity can change the epigenetic methylation status of the CpG dinucleotide. It remains unclear whether the 3'→5' exonuclease activity of APEX1 contributes to the process of active epigenetic demethylation or, on the contrary, is limited in methylated CpG dinucleotides to preserve the epigenetic status during the repair of accidental DNA damage. Here we report the first systematic study of the efficiency of removal of 3'-terminal nucleotides from substrates modeling DNA repair intermediates in CpG dinucleotides. In all intermediates, oligonucleotides with 3'-terminal bases non-complementary to the template were the best, and those with mC, the worst substrates for the 3'→5' exonuclease activity of APEX1. The presence of mC in the complementary strand significantly reduced the reaction rate even for non-complementary 3'-termini. Thus, the efficiency of the 3'→5' exonuclease reaction catalyzed by APEX1 is limited in the methylated CpG context, which likely reflects the need to maintain the epigenetic status during the repair.

Keywords: DNA damage, DNA repair, epigenetic demethylation, AP endonuclease, 3'→5' exonuclease, APEX1, 5-methylcytosine