

А. В. Ендуткин

Новосибирский государственный университет
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
просп. Академика Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия
E-mail: aend@niboch.nsc.ru

УЗНАВАНИЕ ПОВРЕЖДЕННОЙ ДНК С-КОНЦЕВЫМ ДОМЕНОМ 8-ОКСОГУАНИН-ДНК-N-ГЛИКОЗИЛАЗЫ ИЗ *ESCHERICHIA COLI*

Формаидопиримидин-ДНК-N-гликозилаза (Fpg) – один из важнейших ферментов, вовлеченный в репарацию окисленных оснований ДНК *Escherichia coli*. Ранее показано, что в С-концевом домене расположены ДНК-связывающие элементы. Предполагается, что С-концевой домен фермента Fpg играет основную ДНК-связывающую роль. Кроме того известно, что у ряда актинобактерий (*Mycobacterium tuberculosis* и др.) существуют белки с неизвестными функциями, гомологичные исключительно С-концевому домену Fpg. Нами разработана эффективная методика выделения С-домена белка Fpg (С-Fpg) и исследованы его активности. Белок С-Fpg достаточно эффективно связывал поврежденные ДНК-лиганды и, несмотря на отсутствие каталитического домена, обладал остаточной способностью расщеплять субстраты, содержащие апурино-апиримидиновый сайт. Расщепление субстрата происходило по механизму β-элиминирования. В присутствии ионов Mg²⁺ белок С-Fpg приобретал гидролитическую ДНКазную активность, не характерную для исходного белка Fpg. Таким образом, гомологи С-Fpg из актинобактерий также могут быть Mg²⁺-зависимыми эндонуклеазами, вовлеченными в репарацию или другие процессы метаболизма ДНК.

Ключевые слова: ДНК-репарация, ДНК-гликозилазы, С-Fpg, гомологи Fpg.

Постоянно ДНК живой клетки подвергается воздействию множества повреждающих экзогенных и эндогенных факторов. Это неизбежно ведет к окислению, алкилированию, дезаминированию азотистых оснований, образованию апуринов / апиримидиновых сайтов и разрывов цепи ДНК. Существуют различные пути ее репарации. Одним из наиболее распространенных является эксцизионная репарация оснований (ЭРО), посредством которой восстанавливаются поврежденные основания, образующиеся в ходе окисления или алкилирования. Ключевую роль в ЭРО играют ДНК-гликозилазы, способные к узнаванию и последующему удалению модифицированных оснований. Формаидопиримидин-ДНК-N-гликозилаза (Fpg) – один из важнейших ферментов, вовлеченный в репарацию таких оснований в бактериальной ДНК.

Несмотря на обилие исследований репарации у *E. coli*, информации о ее системе в патогенных бактериях чрезвычайно мало. Так, например, в *Mycobacterium tuberculosis* к настоящему времени определены гены,

кодирующие ферменты, необходимые для разных путей репарации [1]. Большинство из них гомологичны белкам из *E. coli*, однако их возможные функции и субстратная специфичность остаются практически неизученными. В частности, один из белков ЭРО из *M. tuberculosis* гомологичен исключительно С-концевому домену фермента Fpg из *E. coli* [2]. Этот домен содержит ДНК-связывающие мотивы, но при этом не имеет каталитических остатков, которые все сосредоточены в N-концевом домене. Свойства данного белка и его роль в репарации остаются неизученными, но имеют важность для детального понимания механизма репарации в микобактериях.

Учитывая ряд технических сложностей при работе непосредственно с *M. tuberculosis* (медленный рост, патогенность штаммов) и при гетерологичной экспрессии GC-богатых генов этого организма в *E. coli*, целью данной работы явилось рассмотрение свойств С-концевой домена Fpg *E. coli* (С-Fpg) в качестве модельной системы. Для этого белок С-Fpg был получен в рекомби-

нантном виде, после чего исследована его способность связывать ДНК и ферментативные свойства.

Материал и методы

Дезоксирибоолигонуклеотиды. В работе использовали дезоксирибоолигонуклеотиды (ОДН) следующих последовательностей:

G: 5'-СТСТСССТТССГТСССТТТСССТСТ-3'
охоG: 5'-СТСТСССТТССХТСССТТТСССТ-
СТ-3' (X = 8-оксогуанин)

F: 5'-СТСТСССТТССХТСССТТТСССТС-
Т-3' (X = тетрагидрофуран)

U: 5'-СТСТСССТТССХТСССТТТСССТС-
Т-3' (X = урацил)

DNU: 5'-СТСТСССТТССХТСССТТТСССТ-
СТ-3' (X = 5,6-дигидроурацил)

I: 5'-СТСТСССТТССХТСССТТТСССТС-
Т-3' (X = гипоксантин)

C': 5'-AGAGGAAAGGAGCGAAGGG-
AGAG-3'

G': 5'-AGAGGAAAGGAGGGAAGGGA-
GAG-3'

T': 5'-AGAGGAAAGGAGTGAAGGGAG-
AG-3'

N' – нуклеотид комплементарной цепи, стоящий напротив повреждения X.

ОДН синтезировали фосфорамидитным методом из коммерчески доступных предшественников и очищали обращеннофазовой жидкостной хроматографией высокого давления. Для получения двуцепочечных (дц) ОДН вели отжиг комплементарных цепей, при этом комплементарная цепь бралась в двукратном избытке по отношению к модифицированной цепи с радиоактивной меткой, введенной по 5'-концу при помощи γ [³²P] АТФ (лаборатория биотехнологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) и полинуклеотидкиназы бактериофага Т4 [3].

Ферменты. Использовали полинуклеотидкиназу бактериофага Т4 (10 ед. акт./мкл) и урацил-ДНК-гликозилазу из *E. coli* (2 000 ед. акт./мл) («New England Biolabs», США). Белки Fpg и APX1 были получены согласно описанным методикам [4; 5].

Для наработки белка C-Fpg клетки *E. coli* BL21(DE3) с плазмидой pET-28a(+), несущей вставку C-Fpg, выращивали в 5 мл среды YT×2 (16 г/л бакто-триптон, 10 г/л бакто-дрожжевой экстракт, 5 г/л NaCl), содер-

жащей 25 мкг/мл канамицина, при 37 °С на качалке при 250 об./мин. в течение ночи. Аликвоты ночной культуры (250 мкл) инокулировали в колбы, содержащие по 50 мл среды YT×2 и 100 мкг/мл канамицина, после чего растили в тех же условиях до $A_{595} = 1,0$, добавляли изопропил-β-D-1-тио-галактопиранозид до концентрации 1 мМ и продолжали выращивание в течение 3 ч. Клетки отделяли от среды центрифугированием (10 мин, 12 000 g, 4 °С), осадок распускали в 30 мл буфера для лизиса (10 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА) и разрушали клетки трехкратным замораживанием при –70 °С и оттаиванием при комнатной температуре. Добавляли фенилметилсульфонилфторид до концентрации 1 мМ и 4 М NaCl до концентрации 1 М и инкубировали 10 мин. Клетки разрушали ультразвуком на приборе УЗДН-2Т 10-ю импульсами по 30 с на максимальной мощности при 22 кГц с выдерживанием на льду в течение 1,5 мин между импульсами. Лизат центрифугировали 30 мин в условиях, описанных ранее. Супернатант осаждали сульфатом аммония (80 % насыщения), осадок растворяли в 5 мл буфера А (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 500 мМ NaCl).

Для выделения белка C-Fpg раствор наносили на колонку «HiTrap Chelating Sepharose» (1 мл, «GE Healthcare», США), уравновешенную NiSO₄, и промывали ее 5 мл буфера А. Элюцию вели порциями по 2 мл этого же буфера, дополнительно содержащего 0, 50, 200 и 500 мМ имидазола. Фракции белка анализировали электрофорезом в трициновом геле с окрашиванием кумасси голубым. Фракции, содержащие белковый продукт нужной подвижности, объединяли, разбавляли 7 объемами буфера В (20 мМ фосфат натрия (pH 7,5), 1 мМ этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), 1 мМ дитиотреитол) и наносили на колонку «HiTrap SP HP» (1 мл, «GE Healthcare», США), уравновешенную этим же буфером, дополнительно содержащим 100 мМ NaCl. Элюцию белка проводили порциями по 2 мл буфера В, дополнительно содержащего 100, 200, 400, 700 и 1 500 мМ NaCl. Фракции белка анализировали электрофорезом; фракции с чистотой не менее 90 % объединяли и наносили на колонку «Superdex 75 HR 10/30» («GE Healthcare», США), уравновешенную буфе-

ром С (50 мМ Tris, 1 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол). Элюцию вели этим же буфером, за выходом белка следили по поглощению при 280 нМ. Фракции белка, не содержащие видимых примесей по данным электрофореза с окрашиванием кумасси голубым, концентрировали при помощи устройств «Centricon-10» («Millipore», США) до объема 400 мкл, разбавляли 400 мкл охлажденного 80 % глицерина и хранили при -20°C .

Ковалентное связывание C-Fpg с ДНК, содержащей апурино-апириимидиновый (AP-) сайт. Реакционная смесь (20 мкл) содержала 20 мМ натрий-фосфатный буфер (рН 6,8), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол и 20 нМ дцОДН U: C'. В смесь добавляли 1 ед. акт. урацил-ДНК-гликозилазы (Ung) и инкубировали в течение 30 мин при 37°C . Затем добавляли C-Fpg до концентрации 2 мкМ и NaBH_4 до 100 мМ. Реакцию вели 30 мин при 37°C , продукты анализировали электрофорезом в системе Лэммли [3], радиоактивность полос определяли радиолюминесцентным сканированием с использованием установки «Molecular Imager FX» («Bio-Rad», США).

Определение константы диссоциации комплекса C-Fpg с поврежденной ДНК. Реакцию вели в объеме 20 мкл в буфере, содержащем 25 мМ Tris-HCl (рН 7,5), 50 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА, 0,5 мМ дитиотреитол и 1 нМ дцОДН F: C', концентрацию белка варьировали от 20 до 2 000 нМ. Электрофорез проводили в неденатурирующих условиях в 8 % полиакриламидном геле, после чего определяли радиоактивность полос, как описано ранее. Значение K_d определяли по данным трех независимых экспериментов с использованием программы «SigmaPlot» 9.0 («SPSS», США).

Определение константы скорости реакции, катализируемой C-Fpg. Реакционная смесь (18 мкл) содержала 20 мМ натрий-фосфатный буфер (рН 7,5), 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА (для AP-лиазной активности) или 2 мМ MgCl_2 (для эндонуклеазной активности), 1 мМ дитиотреитол, 20 нМ дцОДН U: C' и 1 ед. акт. урацил-ДНК-гликозилазы (Ung). Смесь инкубировали 30 мин при 37°C , затем добавляли 2 мкл C-Fpg до концентрации 2 мкМ и инкубировали при 37°C в течение 1–240 мин. Реак-

цию останавливали добавлением 10 мкл раствора 20 мМ ЭДТА, 0,1 % ксиленцианола, 0,1 % бромфенолового синего в формамиде и прогреванием в течение 1 мин при 95°C . Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20 % полиакриламидном геле с 8 М мочевиной [3]. Значение наблюдаемой каталитической константы k_{cat} (k_{obs}) [6] определяли по данным трех независимых экспериментов с использованием программы «SigmaPlot» 9.0. Для определения оптимальных значений рН и ионной силы в той же реакционной смеси варьировали либо значение рН (от 5,8 до 8,0 с применением натрий-фосфатного буфера), либо концентрацию NaCl (от 0 до 200 мМ).

Анализ каталитической активности C-Fpg в присутствии ионов металлов. Реакционная смесь (18 мкл) содержала 20 мМ натрий-фосфатный буфер (рН 5,8), 50 мМ NaCl, 1 мМ дитиотреитол, 20 нМ дцОДН U: C' и 1 ед. акт. урацил-ДНК-гликозилазы (Ung). Смесь инкубировали 30 мин при 37°C и добавляли нужную соль металла до концентрации 5 мМ и C-Fpg до концентрации 2 мкМ. Затем смеси инкубировали 60 мин при 37°C . Для получения стандартов подвижности при определении области расщепления ДНК-субстрата белком C-Fpg в присутствии Mg^{2+} проводили реакцию Максама – Гилберта с олигонуклеотидом U в условиях расщепления по звеньям С и С + Т [3]. Продукты реакции анализировали радиолюминесцентным сканированием после электрофореза в 20 % полиакриламидном геле с 8 М мочевиной.

Анализ нуклеазной активности C-Fpg для разных субстратов. Реакционная смесь содержала 50 мМ Tris-HCl (рН 7,5), 50 мМ NaCl, 2 мМ MgCl_2 , 1 мМ дитиотреитол, 20 нМ дцОДН-субстрат (G: C', F: C', охоG: C', I: T', DHU: G') и 200 нМ C-Fpg. Смесь инкубировали 60 мин при 37°C . Продукты реакции анализировали радиолюминесцентным сканированием после электрофореза в 20 % полиакриламидном геле с 8 М мочевиной.

Результаты исследования и обсуждение

Выделение в рекомбинантном виде C-кислого домена белка Fpg E. coli. Белок, со-

ответствующий С-концевому домену Fpg, получали экспрессией в *E. coli* кодирующего его участка гена Fpg после трансформации штамма BL21(DE3) плазмидой pET-28a (+), несущей необходимую вставку. При индукции экспрессии с помощью IPTG в общем лизате клеток наблюдали появление полосы, соответствующей белковому продукту. Белок C-Fpg был функционализирован по N-концу пептидом из шести остатков His, способным образовывать прочные координационные соединения с ионами некоторых металлов. Последовательное применение аффинной металл-хелатной хроматографии, катионообменной хроматографии и гель-фильтрации позволило получить белок C-Fpg с высокой степенью гомогенности (без посторонних примесей по окрашиванию геля кумасси R-250; данные не приведены).

Ферментативные свойства C-Fpg. В основном благодаря данным рентгеноструктурного анализа сложилось представление о том, что С-концевой домен несет мотив H2TH и мотив цинкового пальца, необходимые для связывания ДНК-субстрата, но не содержит каталитически важных участков [4]. Однако с обнаружением у ряда актинобактерий (*M. tuberculosis* и др.) белков, гомологичных только С-концевому домену Fpg, появляется необходимость дополнительных исследований для понимания функциональной роли этих гомологов.

Как и ожидалось, белок C-Fpg не был способен расщеплять дцОДН-субстраты, содержащие поврежденные основания (8-оксогуанин, урацил, 5,6-дигидроурацил, гипоксантин; данные не приведены), что, скорее всего, связано с отсутствием N-концевой α -спирали, несущей каталитические остатки Pro1 и Glu2 [4]. Несмотря на это, в ходе экспериментов была выявлена активность C-Fpg по отношению к субстрату с альдегидным AP-сайтом (рис. 1), принадлежность которой собственно белку C-Fpg доказана образованием полосы ожидаемого размера при восстановлении NaBH₄ промежуточного ковалентного ДНК-белкового интермедиата реакции (рис. 2).

Для количественной характеристики сродства C-Fpg к поврежденному ДНК-субстрату было получено значение константы диссоциации K_d (табл.). Во избежание

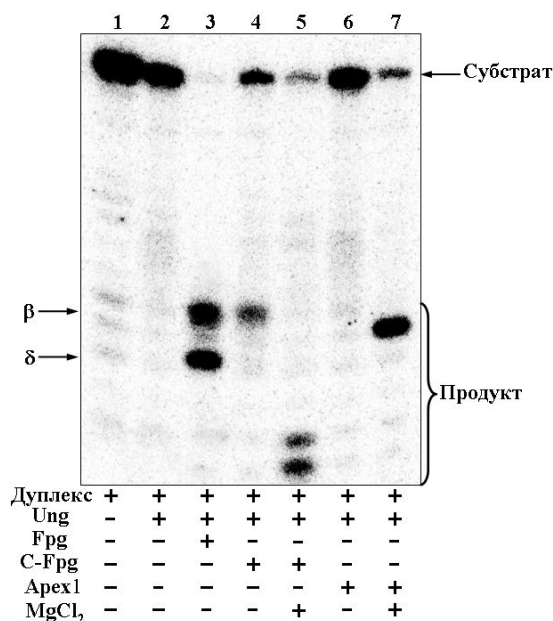


Рис. 1. Радиоавтограмма геля после электрофоретического разделения продуктов реакции расщепления AP-субстрата ферментами Fpg, C-Fpg и APEX1.

Все смеси содержали субстрат U: C' после обработки Ung. Основные компоненты реакционной смеси указаны на рисунке; β и δ – продукты β - и δ -элиминирования соответственно

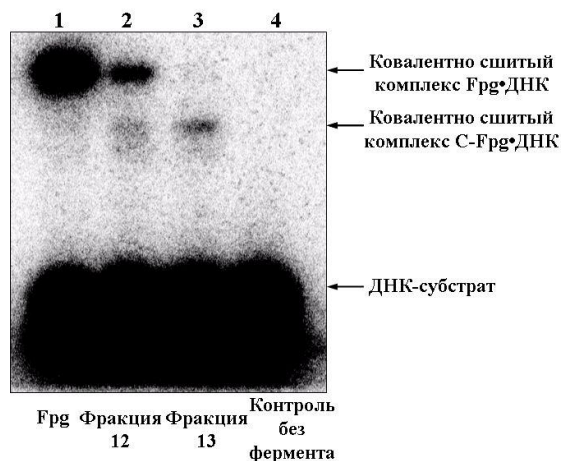


Рис. 2. Радиоавтограмма геля после электрофоретического разделения продуктов сшивки белка C-Fpg и AP-субстрата под действием NaBH₄.

Дорожка 1 содержала фермент Fpg, дорожки 2 и 3 – две фракции после гель-фильтрации в ходе выделения C-Fpg, дорожка 4 – ОДН-субстрат без фермента. Подвижность исходной ДНК и ковалентных комплексов с Fpg и C-Fpg указана стрелками. В дальнейшей работе использовали функционально гомогенную фракцию 13.

Параметры связывания
и расщепления поврежденной ДНК белком С-Fpg

Кинетический параметр	K_d , нМ	k_{cat} , мин ⁻¹
С-Fpg (нуклеазная)	–	$(2,8 \pm 1,0) \times 10^{-2}$
С-Fpg (АР-лиазная)	$(3,8 \pm 1,3) \times 10^2$	$(8,4 \pm 3,4) \times 10^{-3}$
Fpg (АР-лиазная)*	$9,5 \pm 2,8$	$6,4 \pm 0,9$

Примечание: * – данные, получены из источника [8].

расщепления альдегидного АР-сайта в этих экспериментах использовали ОДН, содержащий (3-гидрокситетрагидрофуран-2-ил) метилфосфат (F) – нерасщепляемый аналог АР-сайта, к которому все ДНК-гликозилазы имеют высокое сродство. Значение K_d составило 380 нМ, что в 40 раз превышает значения K_d для полноразмерного белка Fpg (9,5 нМ) и указывает на меньшее сродство С-Fpg к F-лиганду. Согласно данным рентгеноструктурного анализа [4], граница между доменами полноразмерного белка Fpg образует положительно заряженную бороздку, в которой связывается ДНК. При наличии одного С-концевого домена такая структурная комплементарность не реализуется, чем, вероятно, вызвано менее эффективное связывание данного фрагмента с ДНК.

Из-за низкого сродства С-Fpg к АР-ДНК не представлялось возможным получить кинетические параметры (K_M , k_{cat}) в условиях избытка субстрата, однако в условиях одного оборота [6] удалось определить значение каталитической константы k_{cat} , которое составило 0,0084 мин⁻¹. Как и ожидалось, значение k_{cat} для С-Fpg было на несколько порядков ниже соответствующего значения для полноразмерного фермента Fpg (6,4 мин⁻¹; см. табл.). Таким образом, из полученных данных можно заключить, что С-Fpg характеризуется низким сродством к ДНК-субстрату и малым числом оборотов. Несмотря на это, остаточная способность белка связывать и расщеплять АР-ДНК в отсутствие каталитических остатков N-концевого домена заслуживает внимания.

Образование восстанавливаемого NaBH₄ ковалентного комплекса между С-Fpg и АР-субстратом указывает на АР-лиазный механизм реакции, протекающий с элиминированием 3'-фосфата при поврежденном нук-

леотиде. Для подтверждения этого механизма сравнивали подвижность продуктов расщепления АР-субстрата белком С-Fpg. Фермент Fpg последовательно катализирует выщепление поврежденного основания из дцДНК, β- и δ-элиминирование (верхняя полоса продукта на рис. 1) и δ-элиминирования (нижняя полоса продукта на рис. 1). Продукт расщепления АР-сайта белком С-Fpg в отсутствие Mg²⁺ демонстрирует такую же подвижность, что и продукт β-элиминирования, катализируемой полноразмерным ферментом Fpg. Поэтому наиболее вероятным механизмом для расщепления цепи, содержащей АР-сайт, в случае С-Fpg является β-элиминирование. Таким образом, несмотря на отсутствие каталитических остатков, присущих полноразмерному ферменту Fpg, белок С-Fpg способен с некоторой эффективностью катализировать расщепление АР-ДНК. Были определены оптимальные условия реакции расщепления ферментом С-Fpg по АР-лиазному механизму: pH 6,6 и концентрация NaCl 0–50 мМ.

Ферментативные свойства С-Fpg в присутствии ионов Mg²⁺. При анализе подвижности продуктов расщепления АР-субстрата белком С-Fpg достаточно неожиданно выяснилось, что при добавлении в реакционную смесь ионов Mg²⁺ (см. рис. 1) вместо АР-лиазной активности начинает преобладать более интенсивная ферментативная активность, посредством которой субстрат расщепляется на некотором расстоянии с 5'-стороны от АР-сайта. Для полноразмерного фермента Fpg такая активность не характерна. Отсутствие в этой области поврежденных оснований или химически нестабильных сайтов указывает на то, что происходит разрыв фосфодиэфирной связи цепочки ДНК. Следовательно, в присутст-

вии ионов Mg^{2+} белок C-Fpg приобретает нуклеазную активность. Сравнение подвижности продуктов этой реакции с продуктами реакции Максама – Гилберта для того же субстрата показывает, что расщепление белком C-Fpg происходит в районе 3–4-й фосфодиэфирных связей с 5'-стороны от повреждения (данные не приведены). Были определены оптимальные условия нуклеазной активности: pH 5,8 и концентрация NaCl 50 mM.

Поскольку в присутствии ионов Mg^{2+} сродство белка к субстрату не возрастало (данные не приведены), увеличение скорости расщепления по сравнению с AP-лиазной активностью могло быть обусловлено увеличением k_{cat} . В условиях кинетики одного оборота значение k_{cat} для нуклеазной активности составило 0,028 мин⁻¹, что действительно превосходит значение k_{cat} для AP-лиазной более чем в 3 раза, но вместе с тем остается значительно ниже значения k_{cat} для полноразмерного фермента (см. табл.).

Исследована возможность появления нуклеазной активности в присутствии других ионов Me^{2+} (данные не приведены). Расщепление наблюдалось в присутствии Mg^{2+} и Mn^{2+} , а ионы Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} не поддерживали нуклеазную активность C-Fpg. Такой результат не удивителен, поскольку известно, что для многих Mg^{2+} -зависимых ферментов ионы Mg^{2+} и Mn^{2+} взаимозаменяемы [7].

При анализе способности белка C-Fpg расщеплять неспецифические дцОДН (остаток G в положении 11, где в поврежденном ОДН находится модифицированное звено), а также субстраты, содержащие F-звено, 8-оксогуанин, гипоксантин или 5,6-дигидроурацил наблюдались четкие полосы, соответствующие нескольким сайтам расщепления как с 3'-, так и 5'-стороны относительно повреждения (данные нами не приведены).

Заключение

Белок C-Fpg в присутствии Mg^{2+} проявляет себя как эндонуклеаза, специфичная к широкому спектру поврежденных оснований. Можно предположить, что такая широкая специфичность обусловлена способностью фермента узнавать не структуру

конкретных оснований, а разницу в конформационных параметрах или повышенную гибкость ДНК в месте повреждения или прерывания полипиримидинового тракта.

На данный момент нельзя однозначно сказать, как именно белок C-Fpg использует ионы Mg^{2+} в качестве кофактора. Однако уже само наличие такой активности позволяет предположить, что и белки микобактерий, гомологичные C-Fpg, могут являться Mg^{2+} -зависимыми эндонуклеазами широкого спектра действия, вовлеченными в репарацию или другие процессы метаболизма ДНК.

Список литературы

1. Mizrahi V., Andersen S. J. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence? // Mol. Microbiol. 1998. Vol. 29. P. 1331–1339.
2. Сидоренко В. С., Пот М. А., Филипенко М. Л., Невинский Г. А., Жарков Д. О. Новые ДНК-гликозилазы из *Mycobacterium tuberculosis* // Биохимия. 2008. Т. 73, № 8. С. 542–552.
3. Sambrook J., Russell D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. N. Y., 2001.
4. Gilboa R., Zharkov D. O., Golan G., Fernandes A. S., Gerchman S. E., Matz E., Kyrcia J. H., Grollman A. P., Shoham G. Structure of formamidopyrimidine-DNA glycosylase covalently complexed to DNA // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. P. 19811–19816.
5. Sidorenko V. S., Nevinsky G. A., Zharkov D. O. Mechanism of interaction between human 8-oxoguanine-DNA glycosylase and AP endonuclease // DNA Repair. 2007. Vol. 6. P. 317–328.
6. Porello S. L., Leyes A. E., David S. S. Single-turnover and pre-steady-state kinetics of the reaction of the adenine glycosylase MutY with mismatch-containing DNA substrates // Biochemistry. 1998. Vol. 37. P. 14756–14764.
7. Скальный А. В. Химические элементы в физиологии и экологии человека. М., 2004.
8. Tchou J., Bodepudi V., Shibutani S., Antoshechkin I., Miller J., Grollman A. P., Johnson F. Substrate specificity of Fpg protein: Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269. P. 15318–15324.

Материал поступил в редколлегию 22.01.2010

A. V. Endutkin

**Recognition of Damaged DNA by The C-Terminal Domain
of 8-Oxoguanine-DNA N-Glycosylase from *Escherichia Coli***

Formamidopyrimidine-DNA-N-glycosylase (Fpg) is an important enzyme involved in repair of oxidized DNA bases of *Escherichia coli*. Previously it was shown that the C-terminal domain of Fpg harbors DNA-binding elements. Therefore, it was proposed that C-terminal domain of Fpg plays the principal DNA-binding role. Also, it is known that actinobacteria (*Mycobacterium tuberculosis*, etc.) possess proteins with unknown functions homologous to the C-terminal but not N-terminal Fpg domain. We had developed a method to express and purify C-terminal Fpg domain and studied its activities. C-Fpg was rather efficient in binding damaged DNA. Despite the absence of the catalytic domain, C-Fpg possessed a low residual ability to cleave apurine/apyrimidine substrates. The DNA substrate was cleaved by β -elimination. In the presence of Mg^{2+} ions C-Fpg showed DNase activity not observed in the original Fpg protein. Thus C-Fpg homologues from actinobacteria also can be Mg^{2+} -dependent endonucleases involved in DNA repair or DNA metabolism.

Keywords: DNA repair, DNA glycosylases, C-Fpg, Fpg homologues.