

УДК 577.322

СТРУКТУРА И АФФИННОСТЬ КОМПЛЕКСОВ МЕЖДУ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИМ ДОМЕНОМ БЕЛКА Swi4 И ДНК

© 2022 г. Д.А. Афонин^{*,*}, О.В. Гераськина^{*}, Т.В. Лосева^{*}, М.П. Кирпичников^{*}, В.М. Студитский^{*,**}, А.В. Феофанов^{*}

^{*}Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

^{**}Центр исследований рака Фокс Чейз, просп. Коттмана, 333, Филадельфия, Пенсильвания, 19111, США

[#]E-mail: afoninmsu@outlook.com

Поступила в редакцию 04.08.2022 г.

После доработки 04.08.2022 г.

Принята к публикации 10.08.2022 г.

Получен рекомбинантный ДНК-связывающий домен белка Swi4, входящего в состав транскрипционного фактора SBF почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. По данным спектроскопии кругового дихроизма в структуре этого домена содержится 29% α -спиралей, 22% β -складчатых листов, 21% β -поворотов и 28% неупорядоченной структуры. Исследовано взаимодействие домена с ДНК, содержащей сайт связывания SBF SCB (Swi4 Cell-cycle Box). Образование комплексов сопровождается конформационной перестройкой в белке, которая затрагивает не менее десяти пептидных связей и приводит к 6%-му увеличению содержания α -спиралей с сопутствующим снижением содержания β -складчатых листов. По данным спектроскопии флуоресценции конформационные перестройки и межмолекулярные взаимодействия не затрагивают области локализации остатков Trp68 и Trp112, находящихся вблизи границ ДНК-связывающего мотива «спираль–поворот–спираль». Установлено, что константа диссоциации комплекса ДНК-связывающего домена белка Swi4 с ДНК составляет 20 ± 3 нМ.

Ключевые слова: SBF, Swi4, SCB, константа диссоциации, круговой дихроизм, флуоресценция.

DOI: 10.31857/S0006302922050039, EDN: JIDJWB

SBF – транскрипционный фактор, который вместе с паралогом MBF контролирует разные ветви транскрипционного ответа при G1-S-переходе клеточного цикла у почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. SBF и MBF гетеродимерны, они содержат общую субъединицу Swi6 и различаются ДНК-связывающими субъединицами – Swi4 и Mbp1, которые связывают промоторы, содержащие специфичные для них сайты – SCB (Swi4 Cell-cycle Box) и MCB (*MluI* Cell-cycle Box) соответственно. SBF ответственен за экспрессию генов, управляющих морфогенезом и почкованием, в то время как MBF контролирует гены репликации и репарации при переходе в S-фазу клеточного цикла [1]. Помимо этого, SBF является

компонентом сети активации транскрипции у нескольких сложно регулируемых промоторов, в частности промотора гена эндонуклеазы *HO*, контролирующего переключение типа спаривания [2].

Несмотря на то, что SBF является объектом интенсивных *in vivo* исследований [3–5], молекулярные механизмы, определяющие преимущественное связывание SBF с сайтом SCB, изучены недостаточно [6]. Опыты по ограниченному протеолизу N-концевого фрагмента Swi4 в комплексе со специфичной ДНК позволили определить границы его ДНК-связывающего домена. Было установлено, что минимальный ДНК-связывающий домен Swi4 включает около 140 аминокислотных остатков и локализован в области с остатка 32 по остаток 172 [7].

Структура комплекса Swi4 с ДНК неизвестна. Анализ кристаллической структуры комплекса ДНК-связывающего домена белка PCG2 (ортологичного ДНК-связывающему домену Mbp1) из фитопатогенных грибов *Magnaporthe oryzae* с ДНК показал, что PCG2 использует для распо-

Сокращения: dSwi4 – ДНК-связывающий домен Swi4 с заменой C50A, слитый на N-конце с полипептидом GSSHH-NHHSSGENLYFQSHM; TCEP – трис(2-карбоксивинил)фосфин; SCB_R – олигонуклеотид gTTTTcTggCACCC; SCB_F – олигонуклеотид [Cy5]ggTACCACg-AAAAC; SCB-ДНК – двуцепочечный 14 п.н. олигонуклеотид, образованный SCB_R и SCB_F, КД – круговой дихроизм.

знавания сайта связывания ДНК спирали α A и α B структурного мотива «спираль—поворот—спираль», а также дополнительные неканонические структуры полипептидной цепи [8]. Несмотря на присутствие аналогичного мотива «спираль—поворот—спираль» у Swi4, использование структуры dPCG2-ДНК для анализа взаимодействий Swi4 с SCB затруднено из-за палиндромности сайта связывания MCB (5'-ACGCGT-3'), которая приводит к образованию двух типов комплекса PCG2-ДНК. Остается неясным, какой тип комплекса следует ожидать в случае взаимодействия Swi4 с ассиметричным сайтом SCB (5'-CACGAAA-3). Ключевые аминокислоты PCG2 (Q82 и Q89), ответственные за распознавание сайта MCB, присутствуют также и у Swi4, что ставит вопрос о механизме специфичного взаимодействия Swi4 с SCB.

Для исследования взаимодействия Swi4 с ДНК, была разработана методика получения рекомбинантного ДНК-связывающего домена Swi4 (dSwi4). Изучено взаимодействие dSwi4 с фрагментом ДНК, содержащим SCB (SCB-ДНК) и определена константа диссоциации комплексов. Методом спектроскопии кругового дихроизма проведен сравнительный анализ структуры dSwi4 в свободном и связанном состоянии. С помощью спектроскопии флуоресценции изучено микроокружение Trp68 и Trp112, фланкирующих ДНК-связывающий мотив «спираль—поворот—спираль», в свободном и связанном dSwi4.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование и экспрессия ДНК-связывающего домена Swi4. Фрагмент гена Swi4 *S. cerevisiae*, кодирующий ДНК-связывающий домен (32–173) [7], амплифицировали с помощью прямого (gCAAACATATgTCAAACCATCCAgTgATTgAAATAgCTACg) и обратного (gCAAACCTCgAgTTATgTTTATTgTAGCTCgATggAgAAgTTATCTTCg) праймеров, в которых подчеркнуты вносимые сайты рестрикции. Полученный ампликон клонировали в вектор для бактериальной экспрессии pET-15b (Novagen, Merck KGaA, Германия) обработкой эндонуклеазами рестрикции NdeI и XhoI с последующим лигированием. Вектор был предварительно модифицирован вставкой дополнительного мини-цистрона для улучшения экспрессии [9]. Полученный конструктор (*pET-15b-2C-TEV-Swi4[DBD]*) был проверен секвенированием по Сэнгеру в ЦКП «Геном» (Россия).

Поскольку ДНК-связывающий домен Swi4 склонен к димеризации в растворе из-за образования межмолекулярной дисульфидной связи (данные не показаны), было решено заменить Cys50 (здесь и далее используется нумерация аминокислотных остатков в полноразмерном белке) на аланин.

Для сайт-направленного мутагенеза Cys50 на аланин использовали измененный прямой праймер (gCAAACATATgTCAAACCATCCAgTgATTgAAATAgCTACgTATTCAgAAACCCgATgTATACgAAG-CgTATATACgTggg). Ампликон, содержащий мутацию, клонировали в вектор pET-15b, а полученную плазмиду проверили секвенированием в ЦКП «Геном» (*pET-15b-2C-TEV-Swi4[DBD]:C19A*). Данная плазмиды кодировала ДНК-связывающий домен Swi4 с мутацией C50A, у которого на N-конце находилась полигистидиновая метка (6×His), слитая с белком с помощью линкера (здесь и далее dSwi4, рис. 1).

Плазмиду трансформировали в клетки *E. coli* экспрессионного штамма Rosetta 2(DE3) (Novagen). Трансформированные клетки выращивали в среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампицилина и 24 мкг/мл хлорамфеникола, в течение 4 ч при 37°C до оптической плотности (на длине волны 600 нм) 0.6–0.8 опт. ед./см. После добавки изопропил- β -D-1-тио-галактопиранозид (1 мМ) клетки инкубировали 4 ч при 37°C, осаждали при 3200 g (30 мин), промывали 50 мл фосфатно-солевого буфера и осаждали 15 мин при 8000 g. Осадок замораживали и хранили при –80°C.

Выделение белка. Клетки разрушали ультразвуковой обработкой (Sonic Dismembrator FB120, Fisher Scientific, США) в буфере А (20 мМ фосфатно-солевого буфера, pH 7.0, 500 мМ NaCl, 0.3% Triton X-100, 1 мМ трис(2-карбокситил)фосфина (ТСЕР)) с добавкой 25 мМ имидазола, 2 мМ фенолметансульфонилфторида и 1 таблетки коктейля ингибиторов протеаз (Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Швейцария).

Лизат клеток центрифугировали при 18500 g (4°C) в течение 40 мин. Супернатант фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм и наносили со скоростью 2 мл/мин на хроматографический картридж HiTrap Chelating HP (5 мл), предварительно уравновешенный буфером А с 25 мМ имидазола. Картридж промывали 50 мл буфера А с 25 мМ имидазола и затем 50 мл буфера А с 80 мМ имидазола. Белок элюировали 10 мл буфера А с 400 мМ имидазола, разводили в 10 раз буфером Б (50 мМ буфера Бизин, pH 9.0, 1 мМ ТСЕР), наносили со скоростью 1 мл/мин на картридж HiTrap SP HP (1 мл), который затем промывали 10 мл буфера Б. Белок элюировали с картриджа буфером Б, повышая концентрацию NaCl до 800 мМ с помощью хроматографа АКТА Purifier (GE, США). Фракции, содержавшие dSwi4 по данным электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле, объединяли, диализовали 14 ч при 4°C против буфера В (50 мМ HEPES, pH 7.8, 200 мМ KCl, 1 мМ ТСЕР) с помощью диализной мембра-

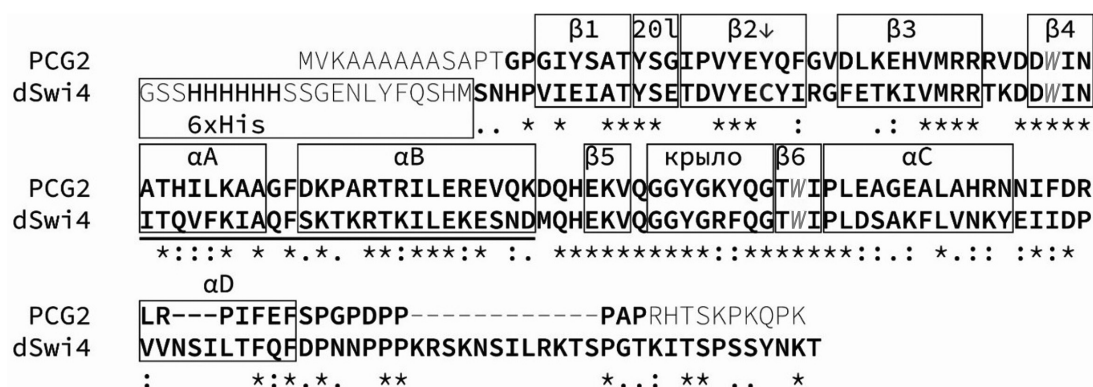


Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей ДНК-связывающих доменов Swi4 и его гомолога PCG2 (82–219) из *Magnaporthe oryzae*, для которого установлена структура в комплексе с ДНК [8]. Кодированный экспрессионным вектором линкер, содержащий полигистидиновую метку (6xHis), выделен в начальной части последовательности dSwi4 рамкой. Жирным шрифтом выделены последовательность ДНК-связывающего домена Swi4 (32–172) [7] и фрагмент PCG2 (95–209), структура которого установлена с высоким разрешением [8]. На основе разрешенной структуры комплекса PCG2 с ДНК (PDB:4UX5) рамками отмечены элементы вторичной структуры, а также «крыло» и петля (20), участвующие в связывании PCG2 с ДНК. Подчеркнут ДНК-связывающий мотив «спираль–поворот–спираль». Подвергнутый мутагенезу Cys50 dSwi4 обозначен стрелкой. Триптофаны Trp68 и Trp112 Swi4, а также гомологичные им Trp129 и Trp173 PCG2 выделены серым цветом и курсивом. Символами “*”, “:” и “.” отмечены соответственно совпадающие, слабо и сильно отличающиеся аминокислотные остатки в сравниваемых белках.

ны Spectra/Por (CE), отсекающей белки >10 кДа. При анализе методом электрофореза в полиакриламидном геле в качестве маркеров использовали реагенты PageRuler Prestained Protein Ladder 10–180 kDa и PageRuler Unstained Low Range Protein Ladder (ThermoFisher Scientific, США), смешанные с интеркалирующим флуоресцентным красителем SYBR Gold (Invitrogen, США).

Ретентант концентрировали до объема ~500 мкл с помощью центрифужного концентратора Amicon Ultra-4 (10 кДа, Merck, Германия), затем центрифугировали при 16100 g (4°C) 30 мин и полученный супернатант очищали методом гель-фильтрации с помощью хроматографа AKTA Purifier и колонки Superdex 75 10/300 GL (Cytiva, Швеция) при скорости потока 500 мкл/мин.

Фракции, содержавшие чистый dSwi4 по данным денатурирующего белкового электрофореза, объединяли. Концентрацию белка (расчетная молекулярная масса – 18825.2 Да) измеряли спектрофотометрически, используя коэффициент молярной экстинкции $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 21400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Чистоту dSwi4 и отсутствие геномной ДНК *E. coli* дополнительно подтверждали спектрофотометрически по соотношению поглощений на длинах волн 260 и 280 нм, которое составляло < 0.6.

Получение комплексов dSwi4 с ДНК. Для получения комплексов dSwi4 с ДНК использовали короткие (14 п.н.) олигонуклеотиды, синтезированные компанией Lumiprobe (Москва, Россия): SC-

B_R (gTTTTCgTggCACC) и SCB_F ([Cy5]ggTAC-CACgAAAAC), меченый по 5'-концу флуоресцентной меткой Cy5.

В опытах по подбору условий формирования двухцепочечной ДНК (SCB-ДНК) SCB_F и SCB_R смешивали в концентрации 10 мкМ в дистиллированной воде категории Milli-Q и либо инкубировали 1 ч при 4°C, либо подвергали двухминутному плавлению при 80°C и инкубировали 1 ч при 30, 37 или 42°C. Образцы подвергали электрофорезу и анализу, как описано ниже. В качестве маркера длин ДНК использовали реагент GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, США), смешанный с интеркалирующим флуоресцентным красителем SYBR Gold (Invitrogen, США).

Для измерения спектров кругового дихроизма (КД) смешивали по 21 мкМ олигонуклеотидов SCB_F и SCB_R и 20 мкМ dSwi4 в буфере, содержащем 12.5 мМ HEPES (pH 8.0), 50 мМ KCl, 250 мкМ TCEP, и инкубировали 1 ч при 4°C. Для измерения спектров флуоресценции смешивали по 200 нМ SCB_F и SCB_R с 190 нМ dSwi4 и инкубировали 1 ч при 4°C.

Для измерения константы диссоциации K_d комплекса dSwi4 с SCB-ДНК смешивали 5 нМ SCB_F и 6 нМ SCB_R без dSwi4 или с возрастающими концентрациями dSwi4 (10–80 нМ) в буфере, содержащем 20 мМ PIPES, 30 мМ KOH (pH 7.3), 120 мМ KCl, 100 мкМ TCEP, 100 мкг/мл

бычьего сывороточного альбумина, 10% (масса/объем) сахарозы. Полученные смеси инкубировали 1 ч при 4°C. Аналогично готовили образцы dSwi4 (10–80 нМ) в смеси с 5 нМ SCB_F.

Анализ комплексообразования методом электрофореза. Смеси SCB_F, SCB_R и dSwi4 или dSwi4 и SCB_F, приготовленные как описано выше, подвергали нативному электрофорезу в полиакриламидном геле, содержащем 10 мМ HEPES-Na, pH 7.8, 0.2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, 18% (масса/объем) полиакриламида (19 частей акриламида на 1 часть бис-акриламида) и 20% (объем/объем) глицерина. Электрофорез проводили при постоянном токе 5 мА в течение 3 ч. Электрофореграммы сканировали с помощью флуоресцентного сканера Amersham Typhoon RGB (Cytiva, Швеция) с возбуждением 632 нм и регистрацией флуоресценции в области 670 нм (пространственное разрешение – 25 мкм). Полученные изображения обрабатывали с помощью программного пакета ImageQuant TL 1D версия 8.1 (Cytiva, Швеция), оценивая яркость полос, соответствующих SCB-ДНК, свободным олигонуклеотидам SCB_F и комплексам dSwi4 с SCB-ДНК.

По измеренным яркостям полос рассчитывали возрастание количества комплекса dSwi4 с SCB-ДНК, а также изменение количества свободных SCB-ДНК и SCB_F при образовании комплексов.

Для анализа образования комплекса строили зависимость яркости полосы комплекса $I_1(C)$ от концентрации dSwi4 (C) и описывали эти зависимости в приближении одного центра связывания формулой:

$$I_1(C) = B_{m1}C/(K_d + C), \quad (1)$$

где C – концентрация dSwi4, B_{m1} – максимальное значение, к которому стремится величина $I_1(C)$, K_d – константа диссоциации комплекса.

Для анализа образования комплекса по уменьшению яркости полосы SCB-ДНК рассчитывали параметр $I_0 - I_2(C)$, где I_0 – яркость контрольной полосы SCB_ДНК в отсутствии dSwi4, $I_2(C)$ – яркость анализируемой полосы при определенной концентрации dSwi4. Строили зависимости параметра $I_0 - I_2(C)$ от концентрации dSwi4 и описывали эти зависимости в приближении одного центра связывания формулой:

$$I_0 - I_2(C) = B_{m2}C/(K_d + C), \quad (2)$$

где B_{m2} – максимальное значение, к которому стремится величина $I_0 - I_2(C)$.

Величины K_d определяли в двух независимых экспериментах и усредняли.

Спектроскопия КД. Спектры КД измеряли с помощью спектрополяриметра Jasco-810 (Jasco, Япония): оптическая ширина щели монохроматора – 1 нм, диапазон сканирования – 190–250 нм, шаг сканирования – 0.2 нм, скорость сканирования – 20 нм/мин. Спектры усредняли по четырем повторным сканам. Для измерений использовали разборную кварцевую кювету с толщиной оптического слоя 0.1 мм (Hellma, Германия).

Из спектров КД раствора dSwi4 или его комплексов с SCB-ДНК вычитали базовую линию, измеренную соответственно от буфера или от раствора SCB-ДНК (21 мкМ). Спектры, полученные в двух независимых экспериментах, усредняли и анализировали с помощью пакета программ CDPPro, используя референсный набор белков SP43 [10].

Спектроскопия флуоресценции. Спектры флуоресценции измеряли с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian, США) в кварцевой ультра-микрокювете 2 × 10 мм (Hellma, Германия). Флуоресценцию возбуждали на длине волны 280 нм и детектировали в диапазоне 295–450 нм. Из спектров вычитали базовую линию, измеренную от буфера или от раствора олигонуклеотидов (200 нМ) в буфере (в случае комплексов Swi4 с SCB-ДНК). Спектры, полученные в двух независимых экспериментах, усредняли.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантного dSwi4. С использованием созданной нами плазмиды *pET-15b-2C-TEV-Swi4[DBD]:C19A* была изучена эффективность экспрессии белка dSwi4 в штаммах *E. coli* BL21(DE3) и Rosetta 2(DE3) (Novagen). Значительную экспрессию dSwi4 наблюдали в штамме Rosetta 2(DE3), что определило выбор этого штамма для дальнейшей работы (рис. 2а). Повышенный уровень экспрессии dSwi4 был достигнут при выращивании клеток после индукции при 37°C. Методика выделения dSwi4 включала в себя стадии металл-аффинной и катион-обменной хроматографии, а также гель-фильтрацию (рис. 2б). Чистота полученного dSwi4 по данным хроматографического анализа превышает 99% (данные не представлены), а его выход составил 5 мг с 1 л культуры *E. coli*.

Подбор условий формирования SCB-ДНК и ее комплексов с dSwi4. Для оптимизации условий формирования комплексов dSwi4 с SCB-ДНК было проведено сравнение несколько вариантов получения SCB-ДНК из одноцепочечных олиго-

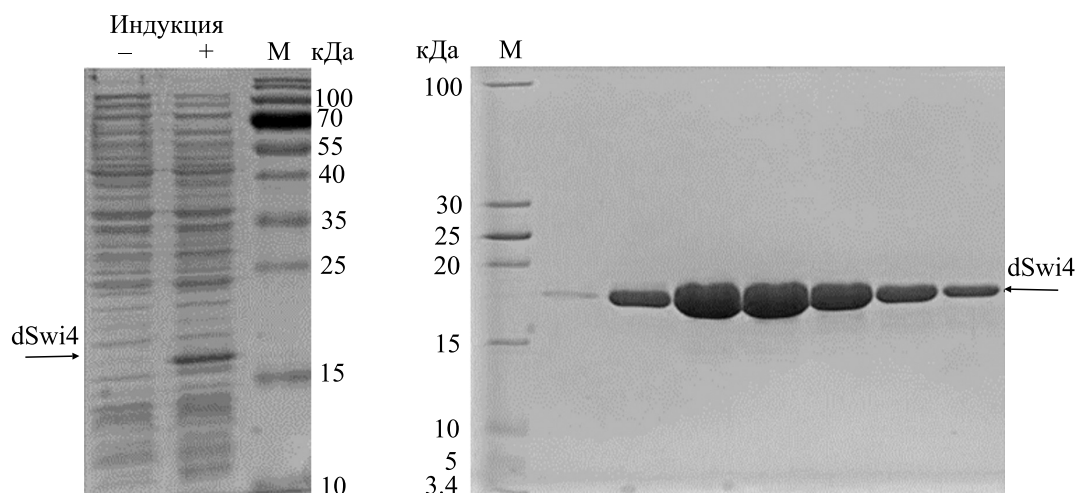


Рис. 2. Результаты гель-электрофореза в денатурирующих условиях лизатов *E. coli* до индукции и после экспрессии dSwi4 (A), а также гель-фильтрационных фракций dSwi4, объединенных для дальнейших опытов с dSwi4. М – маркер.

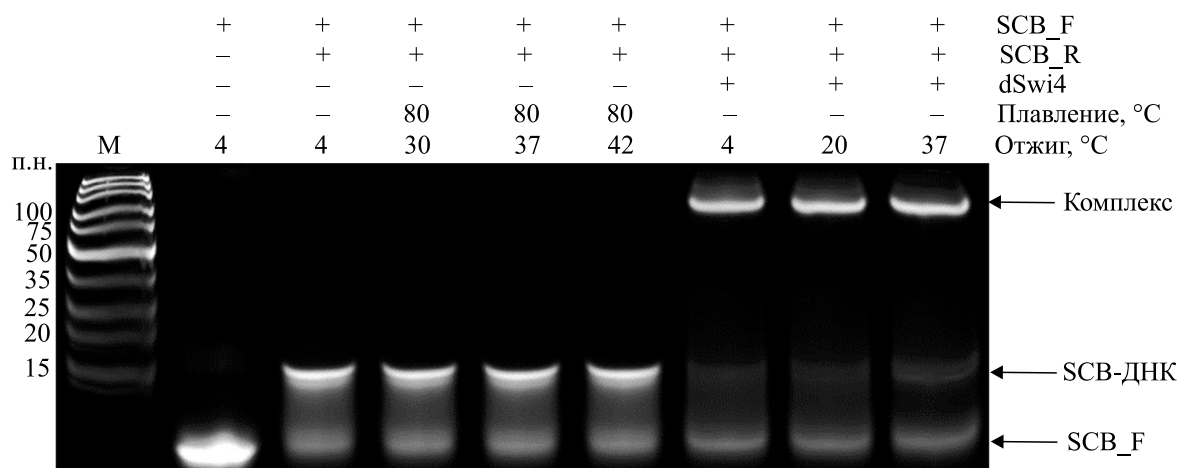


Рис. 3. Анализ формирования дуплекса SCB-ДНК из олигонуклеотидов SCB_F (10 мкМ) и SCB_R (10 мкМ) и образования комплекса SCB-ДНК (10 мкМ) с dSwi4 (10 мкМ) при различных условиях по данным нативного электрофореза в полиакриламидном геле. М – маркер.

нуклеотидов SCB_F и SCB_R. Для этого SCB_F и SCB_R смешивали в концентрации 10 мкМ каждого и либо инкубировали при 4°C, либо подвергали плавлению (2 мин, 80°C) и отжигу (1 ч) при 30, 37 или 42°C. Анализ проб методом электрофореза в полиакриламидном геле в нативных условиях показал, что эффективность образования SCB-ДНК не зависит от наличия стадий плавления и отжига (рис. 3). Во всех случаях на электрофореграмме помимо полосы SCB-ДНК присутствовала полоса одноцепочечного олигонуклеотида, и яркость этих полос была сравнима при разных условиях реакции. Можно предположить, что в смеси SCB_F и SCB_R устанавливается равновесие между двух- и одноцепочечными олиго-

нуклеотидами, и на это равновесие не оказывают влияние стадии плавления и отжига. Наблюдаемая нестабильность двуцепочечной спирали может быть связана с короткой длиной олигонуклеотидов и особенностями нуклеотидной последовательности. Учитывая полученные результаты (рис. 3), было решено формировать SCB-ДНК в упрощенных условиях при 4°C без стадий плавления и отжига. Отметим, что SCB-ДНК соответствует консенсусной последовательности сайта связывания SBF в геноме – RNNYCACgAAAA [11].

Исследована эффективность образования комплекса dSwi4 с SCB-ДНК при разных температурах инкубации смеси (рис. 3). Установлено,

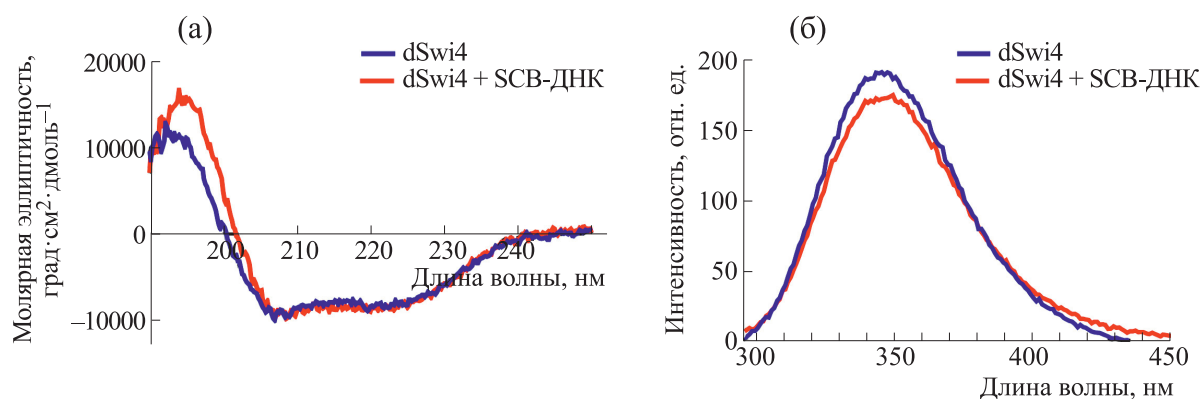


Рис. 4. Спектральный анализ dSwi4 и его комплекса с SCB-ДНК. Представлены спектры КД (а) и флуоресценции (б) dSwi4 и его комплекса с SCB-ДНК.

что эффективность образования комплекса не зависит от температуры в диапазоне 4–37°C, что позволило проводить всю пробоподготовку при 4°C.

Структурный анализ dSwi4 и его комплекса с SCB-ДНК. Анализ спектра КД dSwi4 (рис. 4а) показал, что во вторичной структуре белка преобладают элементы β -структур, включая β -складчатые листы (22%) и β -повороты (21%, табл. 1). В α -спиральной конформации находятся 29% аминокислотных остатков, а 28% остатков расположены в участках с неупорядоченной структурой (табл. 1). Формирование комплекса dSwi4 с SCB-ДНК приводит к изменениям в КД-спектре белка (рис. 4а). Эти изменения соответствуют небольшому увеличению доли аминокислотных остатков, формирующих α -спирали, и сопутствующему снижению доли β -складчатых структур (табл. 1). Изменения затрагивают не менее 10 пептидных связей и позволяют предположить, что образование комплекса сопровождается небольшой структурной перестройкой белка. С учетом наличия в белке ДНК-связывающего мотива «спираль–поворот–спираль» (helix–turn–helix, остатки 71–92) можно предположить, что часть структурных изменений происходит именно в

этой области вследствие стабилизации и/или формирования α -спиральных участков, участвующих в комплексообразовании.

По данным рентгеноструктурного анализа (структура PDB:4ux5) у dPCG2 в комплексе с ДНК, содержащей сайт МСВ (мода А с большим интерфейсом взаимодействия), 26% аминокислотных остатков формируют β -складчатые листы, а 33% остатков – α -спиральные структуры [8]. Хотя доля α -спиралей в структуре комплексов dPCG2 и dSwi4 с ДНК сходна (табл. 1), комплексы заметно отличаются по содержанию β -складчатых листов (табл. 1). Структурные отличия комплексов, по-видимому, во многом связаны с ограниченной гомологией dPCG2 и dSwi4, которая составляет 41% (рис. 1), и указывают на необходимость детального изучения структуры комплекса dSwi4 с ДНК, содержащей сайт SCB.

Вблизи границ ДНК-связывающего мотива dSwi4 «спираль–поворот–спираль» находятся два остатка Trp (W68 и W112, рис. 1), спектры флуоресценции которых, как известно, чувствительны к изменениям полярности микроокружения и взаимодействиям с соседними аминокислотными остатками [12, 13]. Других остатков Trp в исследуемом белке нет. Флуоресценция Trp свободного

Таблица 1. Содержание канонических типов вторичных структур (в %) в составе свободного dSwi4 и в комплексе с SCB-ДНК (по данным КД-спектроскопии)

	α -Спираль	β -Складчатый лист	β -Поворот	Неупорядоченная структура
dSwi4	29 ± 1	22 ± 1	21 ± 1	28 ± 1
dSwi4:SCB-ДНК	35 ± 3	17 ± 1	21 ± 1	27 ± 1

dSwi4 имеет максимум испускания при 345 нм (рис. 4б), что можно объяснить высокой вращательной свободой боковых цепей Trp [14]. Сравнение спектров флуоресценции Trp свободного dSwi4 и в комплексе dSwi4 с ДНК не выявило значимых отличий по форме и положению максимума (рис. 4б). Наблюдаемое небольшое снижение интенсивности флуоресценции может быть вызвано эффектом так называемого внутреннего фильтра, т.е. перепоглощения испускаемого света в кювете вследствие повышения оптической плотности раствора в присутствии ДНК. Отсутствие сдвига максимума спектра позволяет предположить, что взаимодействие с ДНК, а также конформационные перестройки в белке, вызванные образованием комплекса, не распространяются на области локализации остатков Trp68 и Trp112 и не вызывают изменений во вращательной свободе боковых цепей Trp.

Сравнение полученных результатов с данными о микроокружении гомологичных остатков Trp в комплексе dPCG2 с ДНК, содержащей сайт MCB (структура PDB:4ux5), показало, что Trp173 (гомологичен Trp112 у Swi4) образует водородную связь с Tyr169 в участке цепи, формирующем сайт специфического узнавания MCB. Этот участок, скорее всего, меняет свою конформацию при образовании комплекса, что, вероятно, сопровождается изменением микроокружения Trp173. У dSwi4 в гомологичном положении находится фенилаланин, с которым Trp112 водородную связь образовать не может. Остаток Trp129 (гомологичен Trp68 у dSwi4) находится на внешней, не связанной с ДНК, поверхности dPCG2 и не образует связей с другими аминокислотными остатками, что похоже на выявленное по спектрам флуоресценции состояние остатков Trp в dSwi4.

Анализ аффинности dSwi4 к SCB-ДНК. Исследования методом электрофореза в полиакриламидном геле показали, что комплексы dSwi4 с SCB-ДНК образуются в наномолярном диапазоне концентраций белка (рис. 5а). Анализ электрофореграмм показал, что образование комплекса сопровождается характерным увеличением яркости полосы комплекса и сопутствующим снижением яркости полосы SCB-ДНК (рис. 5в,г). Обнаружено зависящее от концентрации dSwi4 снижение яркости полосы одноцепочечного олигонуклеотида SCB_F (рис. 5д), что поставило вопрос о возможном формировании комплекса между dSwi4 и одноцепочечным олигонуклеотидом. Методом электрофореза проведено исследование предполагаемого образования комплекса между dSwi4 и SCB_F, которое не подтвердило данную гипотезу: в отсутствие комплементарно-

го олигонуклеотида яркость полосы SCB_F в диапазоне концентраций dSwi4 10–100 нМ не менялась (рис. 5б,е), и появление новой полосы, соответствующей комплексу, не обнаружено (рис. 5б). С учетом этих данных dSwi4-зависимое уменьшение яркости полосы SCB_F в случае присутствия в растворе комплементарного SCB_R можно объяснить сдвигом равновесия в сторону образования SCB-ДНК в первой реакции из двух в следующей цепи:



который, в свою очередь, происходит из-за ухода свободной SCB-ДНК в комплекс с dSwi4. Формирование дополнительной SCB-ДНК в процессе титрования способно влиять на результаты анализа комплексобразования, приводя к некоторому завышению оцениваемой величины константы диссоциации K_d комплексов dSwi4 с SCB-ДНК.

Расчеты на основе измеренных зависимостей (рис. 5в,г) с использованием формул (1) и (2) дают согласующиеся величины K_d равные 24 ± 4 и 20 ± 3 нМ, которые являются верхней оценкой константы диссоциации комплексов dSwi4 с SCB-ДНК. Полученные значения свидетельствуют о существенно большей аффинности Swi4 к SCB, чем сообщалось ранее ($K_d = 830$ нМ) [7]. Различия в полученных данных могут быть вызваны отличиями в нуклеотидной последовательности исследуемой ДНК. Мы исследовали ДНК, имеющую консенсусную последовательность SCB [11], а в опубликованной ранее работе [7] изучали ДНК, воспроизводящую сайт связывания SBF в одном из промоторов. Кроме того, отличия в константах могут быть частично связаны со снижением потерь катионного dSwi4 из-за неспецифической сорбции, которое было достигнуто нами за счет введения в реакционную смесь бычьего сывороточного альбумина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Транскрипционный фактор *S. cerevisiae* SBF (димер Swi4 и Swi6), контролирует переход от G1-к S-фазе клеточного цикла почкующихся дрожжей, регулируя экспрессию генов, управляющих морфогенезом и почкованием. Связывание SBF с ДНК в геноме дрожжей определяется его субъединицей Swi4. Проведенные нами исследования выявили высокую аффинность ДНК-связывающего домена Swi4 (dSwi4) к консенсусной последовательности сайта связывания SBF в геноме и позволили выяснить характер структурных изменений в белке при образовании комплекса с SCB-

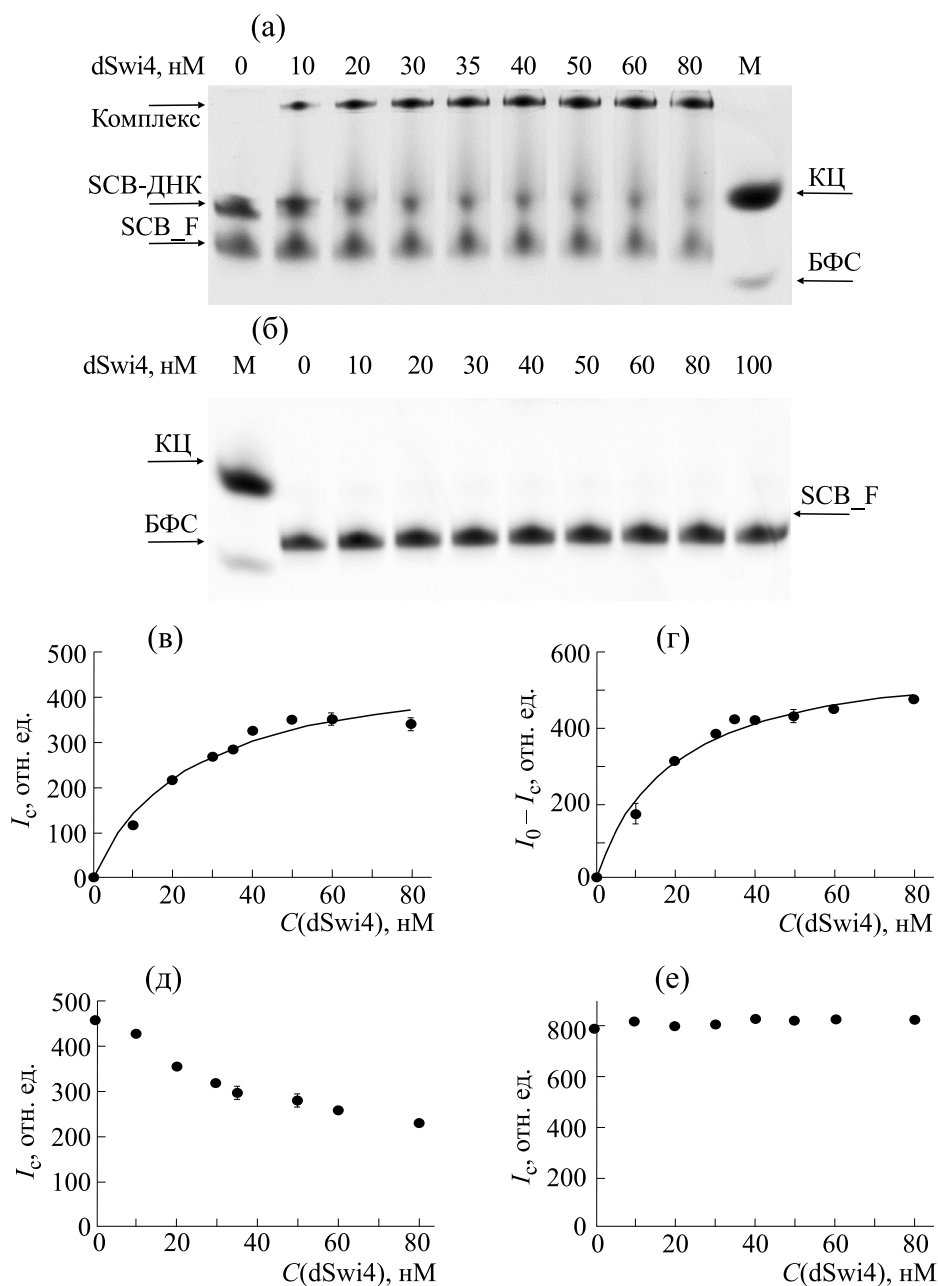


Рис. 5. Анализ взаимодействия dSwi4 с SCB-ДНК и SCB_F. (а), (б) – Нативный гель-электрофорез смесей (а) dSwi4 с SCB_F (5 нМ) и SCB_R (5 нМ), (б) dSwi4 с SCB_F (5 нМ). В качестве маркеров (М) использовали смесь растворов ксиленианола (КЦ) и бромфенолового синего (БФС). (в), (г) – Результаты усредненного денситометрического анализа электрофореграмм, пример которых приведен на рисунке (а), характеризующие образование комплекса dSwi4:SCB-ДНК по увеличению яркости полосы dSwi4:SCB-ДНК (в) и уменьшению яркости полосы SCB-ДНК (г). (д), (е) – Денситометрический анализ изменения яркости полосы SCB_F на электрофореграммах, представленных соответственно на рисунках (а) и (б).

ДНК. С учетом полученных ранее данных [7] можно предположить, что аффинность dSwi4 к сайту SCB существенно зависит от последовательностей нуклеотидов, фланкирующих SCB в составе промоторов. Такая зависимость может являться инструментом тонкой регуляции Swi4-

зависимой экспрессии генов. Таким образом, молекулярные аспекты сайт-специфического узнавания белком Swi4 промоторов, контролируемых фактором SBF, требуют дальнейшего детального изучения и, в том числе, установления структур высокого разрешения комплексов dSwi4 с ДНК.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено с использованием инфраструктурных возможностей Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Соглашения №075-15-2021-1354 от 07.10.2021 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Hendler, E. M. Medina, N. E. Buchler, et al., *Curr. Genetics*, **64** (1), 81 (2018).
2. D. J. Stillman, *Trends Biochem. Sci.*, **38** (9), 467 (2013).
3. S. Takahata, Y. Yu, and D. J. Stillman, *Mol. Cell*, **34** (4), 405 (2009).
4. S. Takahata, Y. Yu, and D. J. Stillman, *EMBO J.*, **28** (21), 3378 (2009).
5. S. Takahata, Y. Yu, and D. J. Stillman, *J. Biol. Chem.*, **286** (40), 34809 (2011).
6. J. M. Bean, E. D. Siggia, and F. R. Cross, *Genetics*, **171** (1), 49 (2005).
7. I. A. Taylor, P. B. McIntosh, P. Pala, et al., *Biochemistry*, **39** (14), 3943 (2000).
8. J. Liu, J. Huang, Y. Zhao, et al., *Nucl. Acids Res.*, **43** (2), 1231 (2015).
9. B. E. Schoner, *Methods Mol. Biol.*, **62**, 89 (1997).
10. N. W. Sreerama, *Anal. Biochem.*, **287**, 252 (2000).
11. D. J. Stillman, A. T. Bankier, A. Seddon, *EMBO J.*, **7** (2), 485 (1988).
12. J. R. Lakowicz, *Topics in fluorescence spectroscopy: biochemical applications* (Kluwer Acad. Publ., New York, 2002).
13. J. T. Vivian and P. R. Callis, *Biophys. J.*, **80** (5), 2093 (2001).
14. V. V. Khrustalev, V. V. Poboinev, A. N. Stojarov, and T. A. Khrustaleva, *Eur. Biophys. J.*, **48** (6), 523 (2019).

Structure and Affinity of Complexes between DNA-Binding Domain of Swi4 and DNA

D.A. Afonin*, O.V. Geras'kina*, T.V. Loseva*, M.P. Kirpichnikov*,
V.M. Studitsky*, **, and A.V. Feofanov*

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

**Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA 19111-2497, USA

A recombinant DNA-binding domain of the Swi4 protein, which is the component of the transcription factor SBF of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, was obtained. Based on the information derived by circular dichroism spectroscopy, a structure of the domain involves α -helices (29%), β -sheets (22%), β -turns (21%) and a random coil (28%). The interaction of the domain with DNA containing the SCB (Swi4 Cell-cycle Box) binding site for SBF was studied. The formation of complexes is accompanied by a conformational rearrangement in the protein, which affects at least 10 peptide bonds and leads to a 6% increase in the α -helical content with a concomitant decrease in the β -sheet content. Fluorescence spectroscopy revealed that conformational rearrangements and intermolecular interactions do not affect the regions of Trp68 and Trp112 residues located near the boundaries of the DNA-binding helix-turn-helix motif. It was found that the dissociation constant of the complex composed of DNA-binding domain of the Swi4 protein and DNA is 20 ± 3 nM.

Keywords: SBF, Swi4, SCB, dissociation constant, circular dichroism, fluorescence