



СИНТЕЗ ФРАГМЕНТОВ ДНК, СОДЕРЖАЩИХ β -ДИКЕТОГРУППУ, ДЛЯ АФФИННОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ

© 2019 г. М. В. Монахова*, Е. А. Кубарева*, Е. А. Романова*, А. С. Семкина**, Д. С. Набережнов***, Д. Н. Рао****, Т. С. Зацепин*****, Т. С. Орецкая*.#

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет и НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Россия, 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1

**Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1

***Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина, Россия, 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24

****Department of Biochemistry, Indian Institute of Science, C.V. Raman Road, Bangalore, 560012 India

*****Сколковский институт науки и технологий, Россия, 121205, г. Москва, ул. Нобеля, 3

Поступила в редакцию 10.07.2018 г.

После доработки 27.07.2018 г.

Принята к публикации 01.08.2018 г.

Для модификации гуанидиновой группы остатков аргинина в белках, взаимодействующих с ДНК, предложено использовать дикарбонильные производные олигонуклеотидов. В ДНК-фрагменты с включением 2'-амино-2'-дезоксинуридина, полученные с помощью химического автоматического синтеза, вводили β -дикетогруппу путем ацилирования 2'-аминогруппы 4,6-диоксогептановой кислотой в присутствии водорастворимого *N*-[3-(диметиламино)пропил]-*N'*-этилкарбодиимида (EDC). Проявлена способность олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих β -дикетогруппу, вступать в реакции с гуанидином, N^{α} -Вос-*L*-аргинином и N^{α} -Dns-*L*-аргинином. Введение такой модификации в одну из цепей 15-звенного ДНК-дуплекса приводит к его дестабилизации. Впервые показано образование конъюгатов белков MutS и MutL из системы репарации неканонических пар нуклеотидов *E. coli* с 17-звенными ДНК-дуплексами, содержащими остаток 2'-дезоксидеокси-2'-(4,6-диоксогептиламидо)уридина. Для повышения селективности модификации остатков аргинина в белках ДНК-лигандами с β -дикетогруппой реакционную смесь обрабатывали раствором гидроксиланамина, что приводило к разрушению оснований Шиффа, образованных с участием остатков лизина.

Ключевые слова: модифицированные ДНК, β -дикетогруппа, репарация “мисматчей”, белки MutS и MutL, конъюгаты ДНК-белок

DOI: 10.1134/S0132342319020076

ВВЕДЕНИЕ

Сиквенс-специфические ДНК-белковые контакты являются определяющими во многих биологических процессах, таких как транскрипция и ее регуляция, репарация, метилирование и гидролиз ДНК и другие. Для исследования белково-

нуклеиновых комплексов сегодня применяют ряд методов, которые можно разделить на инструментальные, молекулярно-биологические и химические. Инструментальные методы, например, криоэлектронная микроскопия, рентгеноструктурный анализ и метод ядерно-магнитного резонанса, применяются для установления структуры комплексов белков с нуклеиновыми кислотами, а молекулярно-биологические и химические — в основном для характеристики отдельных стадий формирования таких комплексов в процессе функционирования.

Особое место среди химических методов занимает метод аффинной модификации белков реак-

Сокращения: BSA — бычий сывороточный альбумин; EDC — *N*-[3-(диметиламино)пропил]-*N'*-этилкарбодиимид; DTT — дитиотреит, трео-2,3-дигидрокси-1,4-димеркаптобутан; Uⁿ — остаток 2'-дезоксидеокси-2'-аминоуридина; U^{diox} — остаток 2'-дезоксидеокси-2'-(4,6-диоксогептиламидо)уридина; FAM — флуоресцентная метка на основе амидов карбоксифлуоресцеина. Префикс “d” (дезоксидеокси) при обозначении олигодезоксирибонуклеотидов и ДНК-дуплексов опущен.

Автор для связи (тел.: +7 (495) 939-54-11; факс: +7 (495) 939-31-81; эл. почта: oretskaya@belozersky.msu.ru).

ционнспособными аналогами ДНК, который позволяет получить дополнительную информацию о структуре специфического комплекса и фиксировать короткоживущие макромолекулярные ассоциаты, образующиеся на разных стадиях ДНК-белкового узнавания. Существует множество способов ковалентного присоединения молекул ДНК к белку, наиболее распространенные из которых основаны на использовании ДНК-реагентов, нацеленных на специфическое взаимодействие с остатками цистеина и лизина [1, 2]. Расширение набора эффективных и специфических реакций между боковыми радикалами аминокислот в составе белка и химически модифицированными реакционноспособными звеньями нуклеиновых кислот позволит более системно изучать особенности белково-нуклеиновых взаимодействий, оценивать возможность специфического ингибирования этих белков и получать стабильные ковалентно связанные комплексы белок-ДНК.

Положительно заряженные остатки аргинина часто располагаются в активных центрах ДНК-связывающих белков [3]. Для модификации гуанидиновой группы аргинина используются α - и β -дикарбонильные соединения [4–7]. Так как α -дикетоны и диальдегиды взаимодействуют также с остатками гуанина [8], то этот тип реагентов не подходит для изучения НК-белковых комплексов. Реакция производных гуанидина с β -дикетонами проходит в щелочной среде (рН 9–11), приводит к образованию замещенных пиримидинов с высоким выходом и широко используется в синтетической практике [9, 10]. Однако как метод модификации белков эта реакция описана только для низкомолекулярных соединений, таких как 2,4-пентандион [4], пропандиаль [5], натриевая соль нитропропандиоля [11], 4,6-диоксогептановая кислота [12]. Известны примеры синтеза β -дикето- и β -диальдегидных производных нуклеиновых кислот [13–16], однако их взаимодействие с производными гуанидина не описано.

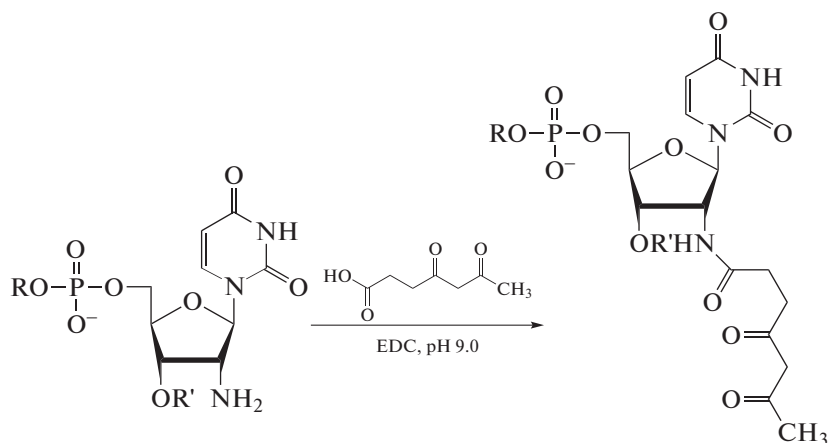
ДНК-реагент для аффинной модификации белков должен селективно взаимодействовать с остатками аминокислот белка в составе специфического комплекса. В данной работе в качестве таких реагентов предлагается использовать фрагменты ДНК, содержащие β -дикетогруппу при С2'-атоме углеводного фрагмента. Объектами исследования были выбраны белки системы репарации неканонических пар нуклеотидов (“мисматчей”) в ДНК (MMR) *E. coli* MutS и MutL.

Для белка MutS имеются данные РСА, демонстрирующие, что остатки аргинина непосредственно вовлечены во взаимодействие с ДНК [17], поэтому MutS является удобной моделью для валидации нового реагента для аффинной модификации. ДНК-связывающая область MutL из *E. coli* детально не охарактеризована. Это обусловлено тем, что комплекс MutL с ДНК динамически подвижен, однако предполагается, что остатки Arg162, Arg266 и Arg316 АТФазного и α - β -“сэндвичевого” субдоменов N-концевого домена участвуют во взаимодействии с ДНК [18]. Это предположение подтверждают недавние работы, выполненные для гомологичных белков MutL из дрожжей (Pms1) и бактерии *Aquifex aeolicus*, согласно которым остатки аргинина и лизина этих субдоменов действительно могут быть вовлечены во взаимодействие с ДНК [19, 20]. В ходе нашей работы предполагалось выяснить, возможно ли взаимодействие коротких 17-звенных ДНК-дуплексов с белком MutL из *E. coli*, и ответить на вопрос, сближены ли остатки аргинина белка MutL с ДНК в отсутствие белка MutS.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез фрагментов ДНК, содержащих β -дикетогруппу

Впервые были синтезированы фрагменты ДНК с β -дикетогруппой при С2'-атоме углеводного фрагмента путем постсинтетической модификации олигонуклеотидов с включением 2'-амино-2'-дезоксинуридина. 2'-Аминосодержащие олигонуклеотиды хорошо зарекомендовали себя в наших предшествующих исследованиях, продемонстрировав высокую реакционную способность в реакциях ацилирования [21, 22]. В работе [12] β -дикетопроизводное антибиотика цефалексина синтезировали ацилированием лактоном, полученным обработкой 4,6-диоксогептановой кислоты карбодиимидом. Первоначально для синтеза олигонуклеотидов с β -дикетогруппой мы использовали именно эту методику, однако ацилирование 2'-аминосодержащего олигонуклеотида лактоном в смеси DMSO-вода при рН 8.5 не позволяло достичь степени превращения выше 60%. Ацилирование 2'-аминосодержащего олигонуклеотида 4,6-диоксогептановой кислотой в смеси DMSO-вода в присутствии EDC при рН 9.0 (см. схему 1) дало возможность увеличить выход продукта реакции до 75–95%.



R,R' – фрагменты олигонуклеотидной цепи

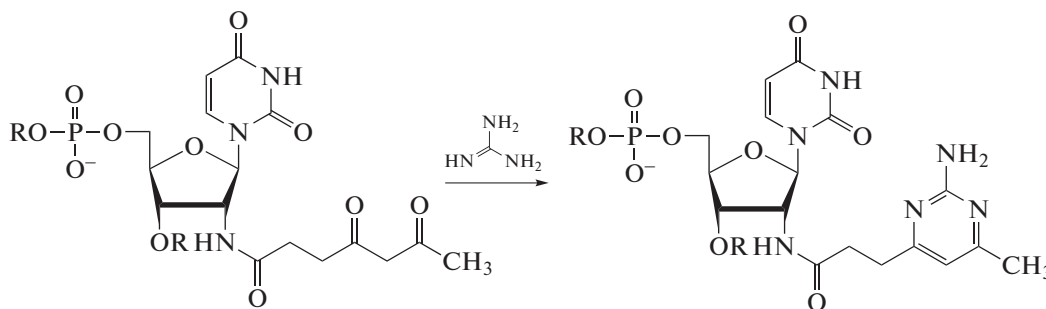
Схема 1.

В качестве примера на рис. 1 приведена хроматограмма разделения реакционной смеси, содержащей олигонуклеотид 5'-TCGGAAAGUⁿ-CCCTC (1), где Uⁿ – остаток 2'-амино-2'-дезоксиримидина, и продукт его модификации (2). Их строение подтверждено методом времяпролетной масс-спектрометрии. Так, рассчитанная масса олигонуклеотида 5'-TCGGAAAGU^{diox}CCCTC (2), где U^{diox} – остаток 2'-дезоксиримидина (4655.0) совпадает с величиной, определенной масс-спектрометрически (4655.7). В контрольных экспериментах было показано отсутствие в условиях реакции продуктов

ацилирования 4,6-диоксогептановой кислотой и ее лактоном экзоциклических аминогрупп гетероциклических оснований природных олигонуклеотидов.

Реакционная способность фрагментов ДНК, содержащих β-дикетогруппу

Для проверки способности синтезированных олигонуклеотидов с β-дикетогруппой взаимодействовать с остатками аргинина использовали олигонуклеотиды (2) и 5'-TCGGAU^{diox}AGTCCCTC (3).



R,R' – фрагменты олигонуклеотидной цепи

Схема 2.

Реакцию олигонуклеотида (2) с гуанидином (схема 2) проводили в натрий-карбонатном буфере с концентрацией 0.5 М при pH 8.8 и 0.1 М при pH 9.2, однако ВЭЖХ и гель-электрофорез в ПААГ не позволили отделить продукт от исходного производного олигонуклеотида. Реакционную смесь анализировали методом MALDI-TOF. Был зафиксирован продукт присоединения гуанидина к олигонуклеотиду (2).

Для упрощения анализа реакционной смеси нами были использованы гидрофобные производные аргинина. При проведении реакции β-дикетосодержащего олигонуклеотида (2) с N^α-Boc- и N^α-Dns-производными L-аргинина наилучшие результаты по данным обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте (степень превращения 18 и 15% соответственно) были получены в том же буфере (pH 9.2).

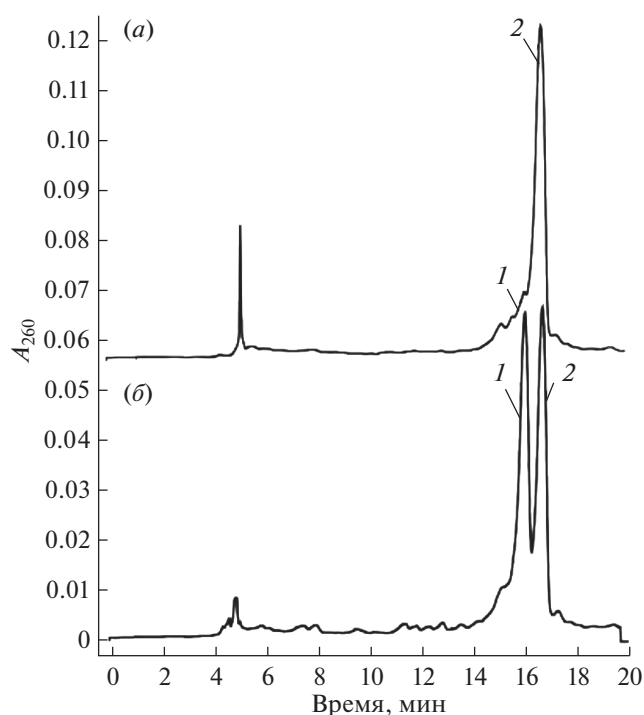


Рис. 1. Хроматограммы разделения методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте: (а) реакционной смеси, содержащей олигонуклеотид 5'-TCGGAAAGUⁿCCCCTC (1) и продукт его модификации (2); (б) реакционной смеси с добавлением исходного 2'-аминосодержащего олигонуклеотида (1).

Интересно отметить, что олигонуклеотиды с β -дикетогруппой, очищенные методом электрофореза в ПААГ, не вступали в реакцию с модельным соединением — N^α -Вос-*L*-аргинином. Анализ олигонуклеотида (3) после очистки в ПААГ методом масс-спектрометрии показал полное отсутствие искомого конъюгата ($m/z [M]^+$ рассчитано: 4883.4), а масса основного продукта в анализируемом образце ($m/z [M]^+$ найдено: 4718.0) соответствовала массе продукта присоединения

акриламида к дикетопроизводному олигонуклеотида. Таким образом, зафиксировано образование аддукта с акриламидом в результате С/О-алкилирования β -дикетогруппы. Поэтому ПААГ не применялся для очистки синтезированных β -дикетопроизводных.

Также мы показали, что дикетогруппа не взаимодействует с гуанином в составе дуплекса. Для этого были сформированы ДНК-дуплексы, содержащие гуанозин “напротив” модифицированного нуклеозида в противоположной цепи. Это позволяет использовать предложенные ДНК-реагенты для аффинной модификации белков, не опасаясь их побочной реакции с самой ДНК.

Термическая устойчивость дуплексов с остатком 2'-дезоксидеокси-2'-(4,6-диоксогептиламидо)уридина

Нами впервые методом УФ-спектроскопии исследовано влияние остатка 4,6-диоксогептановой кислоты, введенного по 2'-аминогруппе 2'-дезоксидеоксиуридина одной из цепей, на термическую стабильность образованного ею и комплементарным олигодезоксирибонуклеотидом ДНК-дуплекса (табл. 1). Температура плавления дуплексов (I)–(III) понижается на 6°C при повышении pH раствора от 6.9 до 9.2. Введение остатка 2'-амино-2'-дезоксидеоксиуридина в одну из цепей дуплекса (I) приводит к его дестабилизации ($\Delta T_{пл}$ 4°C) по сравнению с немодифицированным дуплексом (III), что согласуется с данными работ [23, 24] (рис. 2). 2'-Дезокси-2'-(4,6-диоксогептиламидо)уридин понижает $T_{пл}$ на 11°C. При модификации 2'-положения углеводного фрагмента наблюдается изменение гипохромного эффекта, что свидетельствует о локальном нарушении межплоскостных взаимодействий гетероциклических оснований.

Таблица 1. Термическая устойчивость модифицированных ДНК-дуплексов

ДНК-дуплекс	Структура дуплекса 5'→3' 3'←5'	pH 6.9		pH 9.2	
		$T_{пл}$, °C (± 1)	гипохромный эффект, % (± 1)	$T_{пл}$, °C (± 1)	гипохромный эффект, % (± 1)
(I)	TCGGAAAGU ^{diox} CCCCTC (2) TAAGCCTTTCA---GGGGAGTT	52	23	46	13
(II)	TCGGAAAGU ⁿ CCCCTC (1) TAAGCCTTTCA-GGGGAGTT	59	27	53	24
(III)	TCGGAAAGTCCCCTC TAAGCCTTTTCAGGGGAGTT	63	26	57	20

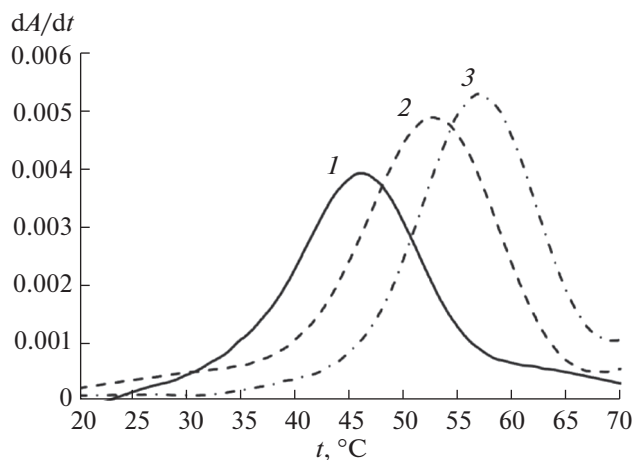


Рис. 2. Графики зависимости оптической плотности растворов ДНК-дуплексов (I)–(III) (кривые 1–3 соответственно) (рН 9.2) от температуры в дифференциальной форме.

Взаимодействие ДНК-лигандов, содержащих β-дикетогруппу при С2'-атоме углеводного фрагмента, с белком MutS

Белок MutS играет ключевую роль в репарации “мисматчей”. В случае *E. coli* он представляет собой гомодимер [17]. MutS действует как сенсор, сканирующий ДНК в поисках неканонических пар нуклеотидов и небольших инсерционно-делеционных петель [25]. В специфическом комплексе аминокислотные остатки из обеих субъединиц MutS взаимодействуют с ДНК, однако связывание происходит асимметрично – каждая субъединица образует множество контактов, но они

различны. Общая площадь поверхности ДНК-белковых контактов составляет ~1850 Å² [26]. Большинство контактов MutS с ДНК являются гидрофильными (аминокислотные остатки взаимодействуют с углеводофосфатным остовом ДНК) и не зависят от нуклеотидной последовательности. Благодаря этому MutS способен функционировать в различных нуклеотидных контекстах [27].

Для аффинной модификации белка MutS были сконструированы 17-звенные ДНК-дуплексы (табл. 2), одна из цепей которых представляла собой олигонуклеотид с единичным включением β-дикетогруппы: 5'-ACTGGTGCTTGGCU^{diox}GCT (4), 5'-AGCU^{diox}GCCAGGCACCAGT (5), 5'-ACTU^{diox}GTGCTTGGCAGCT (6), 5'-TCAGCACCCAGG-GU^{diox}GCC (7). Нуклеотидная последовательность дуплекса (IV) соответствует последовательности дуплекса, использовавшегося при кристаллизации комплекса MutS с ДНК [17]. Дуплекс (IV) состоит из олигонуклеотида (4) с β-дикетогруппой в модифицированном звене U^{diox} и ему комплементарного, и содержит G•T-пару (нуклеотид T в модифицированной цепи), которую узнает белок MutS. Согласно анализу структуры комплекса MutS с G•T-содержащей ДНК (PDB код 1E3M) в программе PyMOL Viewer, 2'-дезоксид-2'-(4,6-диоксогептиламидо)уридиновое звено в дуплексе (IV) удалено от остатка Arg500 не более чем на 7 Å, что достаточно для взаимодействия β-дикетогруппы с остатком аргинина (схема 3). Для контроля за ходом реакции на 5'-конец ДНК-дуплекса (IV) вводилась радиоактивная ³²P-метка или флуорофор – производное флуоресцеина (FAM).

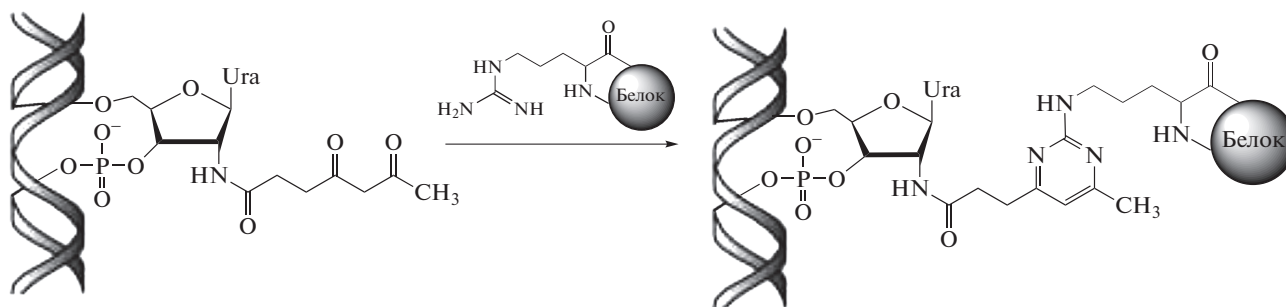


Схема 3.

На первом этапе проводился подбор условий для аффинной модификации MutS реакционно-способной ДНК. Варьировали соотношение концентраций ДНК-реагента (IV) и белка. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 30 мин, затем ее анализировали методом гель-электрофореза в неденатурирующих условиях (рис. 3). Наибольшая степень комплексообразования зафиксирована при 5–20-кратном избытке MutS по отношению к лиганду. Для дальнейших

исследований использовали соотношение ДНК–белок 1 : 10.

На следующем этапе была изучена кинетика образования конъюгата белка MutS с ³²P-меченым лигандом (IV). Время реакции составляло от 0.5 до 5 ч. Пробы из реакционной смеси, отобранные через определенные промежутки времени, анализировали методом гель-электрофореза в неденатурирующих условиях (рис. 4). Чтобы повы-

Таблица 2. ДНК-дуплексы для аффинной модификации белка MutS

ДНК-дуплекс	Структура дуплекса 5'→3' 3'←5'	Расстояние от положения модификации до Arg500, Å
(IV)	AGCA---GCCAGGCACCAGT TCGU ^{diox} CGGTTCGTGGTCA (4)	7
(V)	AGCU ^{diox} GCCAGGCACCAGT (5) TCGA---CGGTTCGTGGTCA	10
(VI)	AGCTGCCAGGCACA---AGT TCGACGGTTCGTGU ^{diox} TCA (6)	10
(VII)	GGCA---CCCTGGGTGCTGA CCGU ^{diox} GGGACCCACGACT (7)	7

суть эффективность анализа, то есть зафиксировать продукт реакции и вместе с тем “задержать” в геле исходную ДНК, использовали комбинированный ПААГ, два верхних слоя которого аналогичны используемым в классическом геле-электрофорезе по Лэммли, а третий слой представлял собой 20% ПААГ с 0.1% SDS. В ходе такого анализа ДНК оставалась в 20% ПААГ, в то время как ДНК-белковый конъюгат – в 8% ПААГ. В геле наблюдалось появление дополнительной зоны, содержащей радиоактивность и имеющей существенно меньшую подвижность, чем исходный ДНК-реагент (рис. 4). Исходя из полученных данных было решено проводить аффинную модификацию белка MutS ДНК-лигандами с β-дикетогруппой в течение 3 ч. Инкубирование реакционной смеси более длительное время не увеличило значительно выход ДНК-белкового конъюгата.

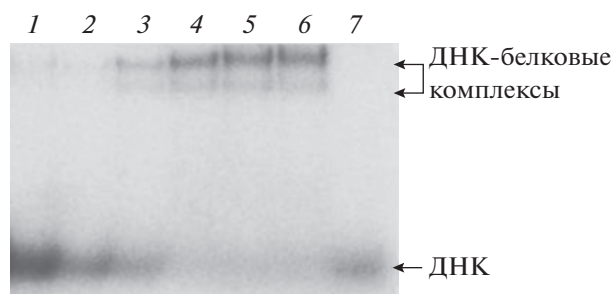


Рис. 3. Анализ в 6% ПААГ в неденатурирующих условиях продуктов связывания белка MutS с ДНК-дуплексом (IV) (1 мкМ), содержащим 5'-³²P-метку. Условия реакции: 30 мин, 37°C. Соотношение концентраций MutS - ДНК 0.5 : 1 (дорожка 1), 1 : 1 (дорожка 2), 2 : 1 (дорожка 3), 5 : 1 (дорожка 4), 10 : 1 (дорожка 5), 20 : 1 (дорожка 6). Дорожка 7 – исходный ДНК-дуплекс (IV). Положение ДНК-белковых комплексов указано стрелками.

Образование ковалентно связанного ДНК-белкового комплекса детектировали по появлению в геле дополнительной зоны белка с меньшей подвижностью. Для этого реакционную смесь, содержащую MutS и пятикратный избыток 5'-FAM-меченного ДНК-дуплекса (IV), инкубировали 3 ч при 37°C и анализировали методом геле-электрофореза в денатурирующих условиях. Свободную ДНК и ДНК в составе конъюгата детектировали в геле по наличию флуоресценции при 473 нм. Затем гель окрашивали раствором солей серебра для визуализации белка. Наличие белка и ДНК в зоне с меньшей подвижностью доказывало образование ДНК-белкового конъюгата (рис. 5).

Для исследования специфичности предложенных нами ДНК-реагентов использовали 5'-FAM-меченные лиганды (V)–(VI), различающиеся между собой положением реакционноспособной группы относительно “мисматча”, что приводит к изменению расстояния между модифицированным нуклеотидом в составе ДНК-дуплекса и Arg500 белка MutS (табл. 2). Дуплексы (V) и (VI) содержат некомплементарную пару G•T, но в дуплексе (V), в отличие от (IV), модифицированный нуклеотид с β-дикетогруппой располагается в противоположной цепи, содержащей остаток G “мисматча” на расстоянии 4 нт от 3'-конца. ДНК-лиганд (VI) аналогичен (IV), но модифицированный нуклеотид располагается с другой стороны от “мисматча” G•T. Учитывая индифферентность MutS к первичной структуре ДНК вокруг “мисматча” [28, 29], в качестве отрицательного контроля в реакции “кросслинкинга” использовали ДНК-дуплекс (VII) произвольной последовательности. В этом дуплексе отсутствует некомпле-

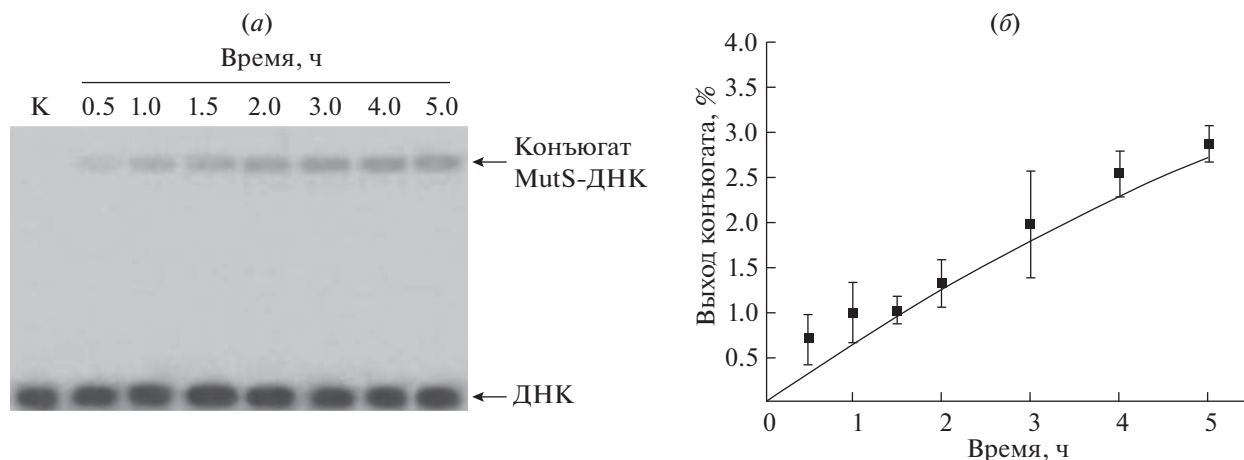


Рис. 4. Зависимость выхода конъюгата белка MutS (10 мкМ) с ДНК-лигандом (IV) (1 мкМ), содержащим 5'-³²P-метку, от времени при 37°C: (а) анализ продуктов реакции в денатурирующем ПААГ (электрофореграмма); дорожка К – исходная ДНК; над дорожками геля указано время реакции; положение ДНК-белкового конъюгата указано стрелкой; (б) график зависимости выхода продукта от времени протекания реакции; на графике приведено стандартное отклонение от среднего значения.



Рис. 5. Анализ в денатурирующем ПААГ, содержащем SDS, продуктов ковалентного связывания белка MutS (1 мкМ) с 5'-FAM-мечеными ДНК-дуплексами (IV)–(VII) (5 мкМ). Условия реакции: 3 ч, 37°C. Электрофореграммы: (а) детектирование зон по флуоресценции ДНК; (б) окрашивание геля раствором солей серебра. Дорожка М – маркер молекулярной массы белков, дорожки I и 2 – белок MutS и ДНК-фрагмент (V) соответственно. Остальные дорожки – реакционные смеси, содержащие MutS и ДНК-дуплексы (IV)–(VII) (указаны над дорожками геля). Положение ДНК-белковых конъюгатов указано стрелками.

ментарная пара, то есть он является каноническим. Вместе с тем, он содержит нуклеотид с β-дикетогруппой в 4-ом положении с 3'-конца “нижней” цепи как и в случае ДНК-лиганда (IV).

Установлено, что выход ДНК-белкового конъюгата зависит от положения модифицированного нуклеотида в составе ДНК-дуплекса (рис. 5). Наибольший выход конъюгата наблюдался при взаимодействии MutS с ДНК-лигандом (IV), в комплексе с которым расстояние от β-дикетогруппы до остатка Arg минимально. С увеличением расстояния от β-дикетогруппы в составе ДНК-лигандов (V) и (VI) до остатка Arg500 в MutS до 10 Å выход ДНК-белкового конъюгата уменьшал-

ся. На основании полученных данных можно предположить, что реакция между белком и лигандом в данном случае протекает селективно. Появление на геле в ряде случаев нескольких зон, соответствующих ДНК-белковым конъюгатам, может быть обусловлено взаимодействием двух молекул 5'-FAM-меченного ДНК-фрагмента с белком. Известно, что белок MutS предпочтительнее образует комплексы с двуцепочечными ДНК-фрагментами, содержащими “мисматч”, чем с каноническими дуплексами. Меньшая эффективность образования продуктов реакции ковалентного связывания MutS с дуплексом (VII) произвольной последовательности без пары G•T

по сравнению с дуплексом (IV) подтвердила эти данные.

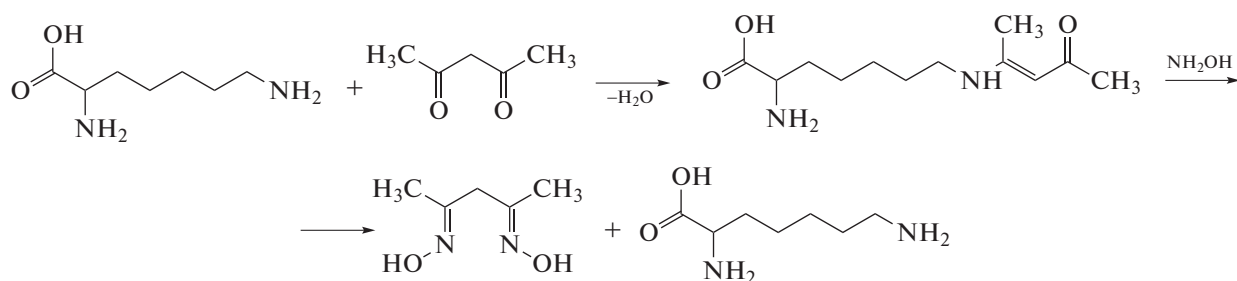


Схема 4.

Lys496 сближен с тем же участком углеводофосфатного остова ДНК, что и Arg500 [17].

В работе [4] показано, что соединения, содержащие β -дикетогруппу, способны, помимо остатка аргинина, модифицировать в белках остаток лизина. Особенность реакции с аминокислотной группой лизина состоит в том, что ее продукт может быть разрушен при воздействии гидросиламина (схема 4). Для проверки селективности реакции по отношению к остаткам Arg 32 P-меченный дуплекс (IV) инкубировали 3 ч с MutS, затем в реакционную смесь добавляли раствор гидросиламина и выдерживали 15 мин при 37°C. Анализ в ПААГ в денатурирующих условиях показал наличие белково-нуклеинового конъюгата, однако его выход уменьшился (рис. 6). Следовательно, предложенный нами ДНК-лиганд с β -дикетогруппой действительно взаимодействует с остатком аргинина. Вероятно, модифицированный ДНК-лиганд (IV) также способен взаимодействовать с одним из остатков лизина MutS. Например, остаток

Взаимодействие ДНК-лигандов с β -дикетогруппой с белком MutL

После образования специфических контактов с “мисматч”-содержащей ДНК белок MutS связывает белок MutL, который в свою очередь выполняет функцию молекулярного координатора остальных участников системы репарации, таких как β -“зажим” (β -субъединица ДНК-полимеразы III), хеликаза UvrD и, в случае *E. coli*, никующая эндонуклеаза MutH [30–32]. Показано, что гомологи белка MutL способны связывать как одноцепочечную, так и двуцепочечную ДНК вне зависимости от наличия “мисматча” [33–35]. Согласно современным представлениям, ДНК-связывающий центр MutL находится в N-концевом домене белка [36]. Считается, что основные аминокислотные остатки двух субдоменов MutL – АТФазного и α - β -“сэндвичевого”, образуют положительно заряженную полость, в которой происходит связывание ДНК. Эта гипотеза была предложена для дрожжевого аналога MutL – Pms1 и подтверждена с помощью ограниченного протеолиза ДНК-белкового комплекса и методом “футпринтинга” с помощью гидроксил-радикалов [19]. Недавно такая положительно заряженная полость была обнаружена в кристаллической структуре N-концевого домена белка MutL из бактерии *Aquifex aeolicus* [20]. Установлено, что входящие в ее состав остатки Arg156, Lys158, Arg259 и Lys265 необходимы для эффективного связывания ДНК. Кроме того, показано, что мутантная форма MutL из *E. coli* с заменами на Glu остатков Arg162, Arg266 (АТФ-азный субдомен) и Arg316 (α - β -“сэндвичевый” субдомен) не способна взаимодействовать с ДНК [18, 37, 38].

Эффективность комплексообразования MutL, как и других ДНК-связывающих белков, определяется длиной ДНК: чем протяженнее ДНК, тем стабильнее ДНК-белковый комплекс [20, 39]. Используя стандартный метод “торможения” в геле в неденатурирующих условиях, нам не удалось, в отличие от MutS, зафиксировать комплекс MutL *E. coli* с 17-звенными ДНК-дуплексами. Ра-

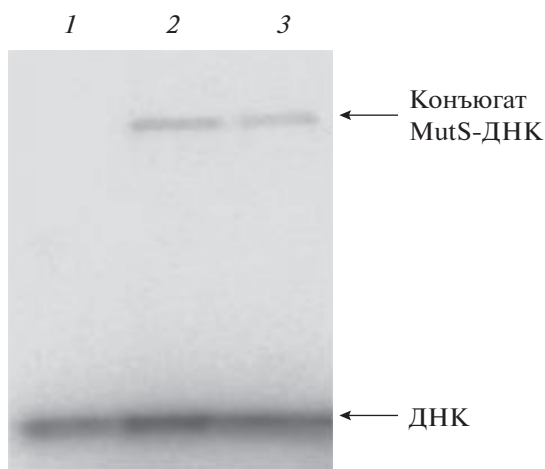


Рис. 6. Анализ в денатурирующем ПААГ продуктов ковалентного связывания белка MutS (10 мкМ) с 5'- 32 P-меченным ДНК-дуплексом (IV) (1 мкМ). Условия реакции: 3 ч, 37°C. Дорожка 1 – исходная ДНК, дорожка 2 – реакционная смесь, содержащая MutS и ДНК-дуплекс (IV), дорожка 3 – реакционная смесь, содержащая MutS и ДНК-дуплекс (IV), после добавления раствора гидросиламина.

нее по изменению сигнала поляризации флуоресценции было показано взаимодействие MutL *E. coli* только с 41-звенным дуплексом [18]. Мы предприняли попытку ковалентной фиксации MutL с помощью 5'-³²P-меченных дуплексов (IV)–(VI) в условиях, подобранных для MutS: 10-кратный избыток ДНК-реагента по отношению к MutL, 37°C, 3 ч. Буфер, согласно рекомендациям [37], не содержал в своем составе KCl. В ходе аффинной модификации белка ДНК-реагентами с β-дикетогруппой нам удалось получить конъюгаты MutL с ДНК, то есть впервые показать взаимодействие MutL из *E. coli* с короткими 17-звенными ДНК-дуплексами и продемонстрировать взаимодействие ДНК с остатками аргинина в ДНК-связывающем центре этого белка.

Несмотря на низкую эффективность процесса, образование продуктов аффинной модификации MutL наблюдалось для всех ДНК-дуплексов, независимо от местоположения химически активной группы по отношению к G•T-паре, а также для дуплекса (VII) без “мисматча” (рис. 7). Таким образом, в отсутствие MutS взаимодействие MutL с ДНК носит неспецифический характер, что согласуется с данными работ [33–35].

Как и в случае MutS, была исследована селективность предложенных 17-звенных ДНК-реагентов по отношению к остаткам аргинина в MutL. При обработке раствором гидроксилamina реакционной смеси, содержащей ДНК-белковый конъюгат, после 3 ч инкубации его выход снижался примерно в 2 раза (данные не приведены). Этот результат свидетельствует о возможном взаимодействии модифицированного ДНК-лиганда также с остатками лизина в MutL.

В заключение следует отметить, что нами впервые предложено использовать дикарбонильные производные олигонуклеотидов для модификации гуанидиновой группы остатков аргинина в белках, взаимодействующих с ДНК. Была продемонстрирована способность фрагментов ДНК, содержащих β-дикетогруппу, вступать в реакции с гуанидином, N^α-Woc-L-аргинином и N^α-Dns-L-аргинином. Впервые показано образование конъюгатов белков MutS и MutL из системы репарации неканонических пар нуклеотидов *E. coli* с 17-звенными ДНК-дуплексами, содержащими остаток 2'-дезоксидезокси-(4,6-диоксогептил-амидо)уридина. Несмотря на невысокий выход конъюгатов ДНК с белками, дуплексы с β-дикетогруппой – это первый пример ДНК-реагентов, которые могут взаимодействовать с остатками аргинина. Для повышения селективности реакции аффинной модификации белка можно использовать обработку реакционной смеси гидроксил-амином, что позволит исключить побочную реакцию ДНК-лигандов, содержащих β-дикетогруппу, с аминокислотной группой остатка лизина.

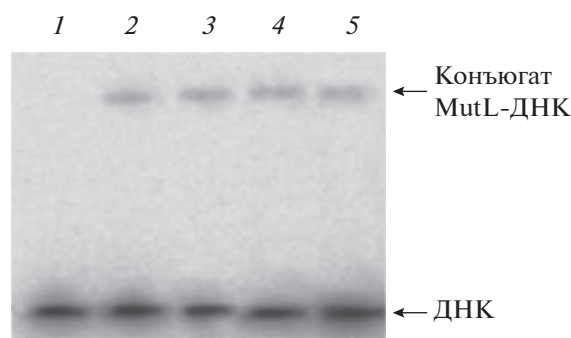


Рис. 7. Анализ в денатурирующем ПААГ продуктов ковалентного связывания белка MutL (10 мкМ) с 5'-³²P-меченными ДНК-дуплексами (1 мкМ): (V) (дорожка 2), (IV) (дорожка 3), (VI) (дорожка 4) и (VII) (дорожка 5). Дорожка 1 – исходный ДНК-дуплекс (V). Условия реакции: 3 ч, 37°C.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы: 4,6-диоксогептановая кислота, N^α-Dns-L-аргинин, DMSO, N-[3-(диметиламино)пропил]-N'-этилкарбодиимид (EDC), ADP, ампициллин, рифампицин (Sigma-Aldrich, США); трео-2,3-дигидрокси-1,4-димеркаптобутан (дитиотреит, DTT), N^α-Woc-L-аргинин (Fluka, Швейцария); SDS, Трис, N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота (HEPES), EDTA, глицин (Хеликон, Россия); наборы белков–маркеров молекулярной массы PageRuler™ (10–200 кДа), набор ДНК–маркеров молекулярной массы GeneRuler™ (1000 п.о.) (ThermoFisher Scientific, США); бромфеноловый синий (Reanal, Венгрия); Ni-NTA-агароза (Novagen, Германия). Мини-колонки и микро-колонки для гель-фильтрации: NAP-5, NAP-10, Ultra MicroSpin G-50 (GE HealthCare, США).

Ферменты. T4-полинуклеотидкиназа – коммерческий препарат производства “ThermoFisher Scientific”, США. Рекомбинантные белки MutS-Δ801-853 и MutL дикого типа выделены из культуры клеток *E. coli* (штамм HMS174(λDE3)) методом аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе по стандартной методике [40] с дальнейшим диализом в буфере, содержащем 10 мМ HEPES-KOH (pH 7.9), 1 мМ EDTA, 200 мМ KCl, 10% глицерина. Плазмидные конструкции, несущие гены белков, были любезно предоставлены проф. П. Фридрихом, Университет имени Ю. Либиха, Германия (P. Friedhoff, Justus Liebig University, Germany).

Модифицированные олигодезоксирибонуклеотиды и олигодезоксирибонуклеотиды природного строения синтезировали на автоматическом синтезаторе ДНК/РНК ASM-2000 (БИОССЕТ, Россия) по стандартному регламенту амидофосфитного синтеза с применением коммерческих реагентов (Glen Research, США). Для получения

олигонуклеотидов с включениями 2'-дезоксидеокси-2'-аминоуридина использовали 5'-*O*-диметокситри-тил-2'-трифторацетамидо-2'-дезоксидеокси-3'-(*N,N*-ди-изопропиламино)цианэтилфосфит уридина (ChemGenes, США). Масс-спектры олигонуклеотидов регистрировали на масс-спектрометре Bruker Microflex MALDI-TOF (Германия). В качестве матрицы использовали смесь 3-гидрокси-пиколиновой кислоты и гидроцитрата аммония.

ВЭЖХ-анализ реакционных смесей, полученных при синтезе олигонуклеотидов, контроль чистоты и анализ продуктов их взаимодействия с низкомолекулярными соединениями проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте на хроматографе фирмы "Waters" (США). Использовали колонку 4.6 × 250 мм с сорбентом Luna C-18(2) (размер частиц 5 мкм). Условия аналитического разделения: температура колонки 45°C; элюент 48 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7.0), содержащий 2 мМ дигидрофосфат тетрабутиламмония, специально рассчитанный градиент ацетонитрила: 5–19.6% за 1 мин, 19.6–22.2% за 4 мин, 22.2–23.4% за 5 мин, 23.4–24.5% за 10 мин, 24.5–25.7% за 20 мин (шаг элюции 1 звено в мин) и 5–21.2% за 1 мин, 21.2–23.8% за 4 мин, 23.8–25.0% за 5 мин, 25.0–26.1% за 10 мин, 26.1–27.3% за 20 мин (шаг элюции 2 звена в мин); скорость потока 1 мл/мин.

Получение модифицированных олигонуклеотидов (2)–(7), содержащих остаток 2'-дезоксидеокси-2'-(4,6-диоксогептиламино)уридина. К раствору 4,6-диоксогептановой кислоты (1 мг, 6.3 мкмоль) и циклогексилкарбодиимида (1 мг, 6.0 мкмоль) в 50 мкл DMSO добавляли 4 нмоль олигонуклеотида, содержащего 2'-дезоксидеокси-2'-аминоуридин, в 100 мкл натрий-карбонатного буфера (0.1 М, рН 9.2), выдерживали в течение 16–18 ч. Затем проводили гель-фильтрацию раствора на колонке NAP-5. Реакционную смесь анализировали методом ВЭЖХ, строение подтверждали методом MALDI-TOF.

Изучение возможности образования ковалентной связи между тяжками ДНК-дуплекса, содержащего β-дикетогруппу. Смешивали 1.6 нмоль олигонуклеотида (2) и 2.2 нмоль комплементарного олигонуклеотида 5'-TTGAGGGGACTTTCCGAAT, 5 мкл 2 М раствора NaCl и добавляли воду до объема 150 мкл. Смесь нагревали до 80°C и оставляли охлаждаться до 20°C. Затем добавляли 100 мкл натрий-карбонатного буфера (0.1 М, рН 9.2), инкубировали 2 сут, проводили гель-фильтрацию на колонке NAP-5. Продукты реакции анализировали методом ВЭЖХ.

Реакция олигонуклеотидов, содержащих β-дикетогруппу, с гуанидином и производными аминокислот. К 4 нмоль олигонуклеотида (2), (3) добавляли раствор 1 мг гидрохлорида гуанидина (*N*^α-*Woc*-*L*-аргинина, *N*^α-*Dns*-*L*-аргинина) в 30 мкл буфера. При проведении реакции с гуанидином использо-

вали натрий-карбонатный буфер с концентрацией 0.5 М при рН 8.8 и 0.1 М при рН 9.2, а с *Dns*-аргинином только последний (0.1 М, рН 9.2). С *Woc*-аргинином кроме карбонатного буфера (0.5 М, рН 8.8 и 0.1 М, рН 9.2) использовали также 0.1 М калий-фосфатный (рН 9.0) и 0.1 М Трис-боратный (рН 8.2). Реакционные смеси инкубировали 16–18 ч, проводили гель-фильтрацию на колонке NAP-5 и анализировали ВЭЖХ. Времена удерживания продукта присоединения *Woc*-аргинина и *Dns*-аргинина к олигонуклеотиду (2) составляют 17.8 и 18.9 мин соответственно, исходного олигонуклеотида (2) – 15.9 мин. Наличие продукта реакции подтверждали методом спектрометрии MALDI TOF. Для продукта присоединения к олигонуклеотиду (2) гуанидина *m/z* [*M*]⁺ найдено: 4669.6, рассчитано: 4669.0; *N*^α-*Woc*-*L*-аргинина – *m/z* [*M*]⁺ найдено: 4884.9, рассчитано: 4684.4. В случае *Dns*-аргинина продукт присоединения выделить не удалось.

Зависимость устойчивости ДНК-дуплексов от температуры изучали на спектрофотометре Hitachi U-2900 (Япония). Использовали термостатируемые кварцевые кюветы Hellma (Германия) с длиной оптического пути 10 мм. УФ-поглощение фиксировали при длине волны 260 нм, соблюдая следующий температурный режим: термостатирование при 25°C – 16 мин, нагрев от 20 до 80°C – 120 мин. Измерение проводили в двух растворах: 0.01 М калий-фосфатный буфер рН 6.9 с 0.1 М NaCl и 0.1 М натрий-карбонатный буфер рН 9.2 с 0.1 М NaCl. Концентрация дуплексов составляла 1 мкМ.

Для введения 5'-³²P-метки 30–40 пмоль ДНК-фрагмента инкубировали в 10 мкл 50 мМ буфера Трис-HCl (рН 7.6), содержащего 10 мМ MgCl₂, 5 мМ ДТТ, 100 мкМ спермидин и 0.3 мкМ [γ -³²P]АТФ, с Т4-полинуклеотидкиназой (1 ед. акт.) в течение 1 ч при 37°C. После проведения реакции смесь очищали с помощью гель-фильтрации на колонке Ultra MicroSpin G-50. ³²P-Меченные и немеченные ДНК-дуплексы формировали путем последовательной денатурации-ренатурации комплементарных цепей в соотношении 1 : 1.

Комплексообразование белка MutS с ДНК-дуплексом (IV). Смеси ³²P-меченного ДНК-дуплекса (IV) (5 пмоль) с белком MutS (5–100 пмоль) инкубировали в 20 мМ буфере HEPES-KOH (рН 8.0), содержащем 125 мМ KCl, 1 мМ ADP, 5 мМ MgCl₂, 1 мг/мл BSA, 1 мМ ДТТ, при 37°C в течение 20 мин. Затем пробы анализировали методом электрофореза в 6% ПААГ (18 × 22 × 0.15 см), содержащем 5.81% акриламида и 0.19% *N,N'*-метиленбисакриламида в буфере, содержащем 40 мМ Трис-CH₃COOH (рН 7.5), 1 мМ EDTA, в течение 3 ч при температуре 4°C при силе тока 15 мА и напряжении 100 В (напряженность поля 4.5 В/см).

Визуализацию в геле зон, содержащих ³²P- и FAM-метку, и обсчет данных проводили на приборах FLA-3000 (Fujifilm, Япония) и Typhoon FLA 9500 (GE HealthCare, США), используя компьютерные программы AIDA (Automatic Imaging Data Analysis Program) и ImageQuant TL (GE HealthCare, США).

Аффинная модификация белков MutS и MutL реакционноспособными ДНК-дуплексами. Белок MutS или MutL (количество варьировали от 10 до 100 пмоль) инкубировали в 10 мкл буфера 20 mM HEPES-KOH (pH 8.0), содержащего 125 mM KCl, 1 mM ADP, 5 mM MgCl₂, 1 мг/мл BSA, 1 mM DTT (в случае белка MutL буфер не содержал KCl), с меченым ДНК-дуплексом (количество варьировали от 5 до 50 пмоль) при 37°C в течение 0.5–5 ч. Продукты реакции анализировали в денатурирующем ПААГ (толщиной 1 мм) в 25 mM буфере Трис-НСl, содержащем 250 mM глицин (pH 8.3), 0.1% SDS при напряженности поля 14 В/см. Концентрирующий гель имел в своем составе 0.125 M Трис-НСl (pH 6.8), 4% акриламида, 0.1% N,N'-метиленбисакриламида, 0.1% SDS. Разделяющий гель состоял из двух слоев. Верхний содержал 0.375 M Трис-НСl (pH 8.8), 8% акриламида, 0.5% N,N'-метиленбисакриламида, 0.1% SDS; нижний — 0.375 M Трис-НСl (pH 8.8), 20% акриламида, 1% N,N'-метиленбисакриламида, 0.1% SDS. Пробы наносили на гель в 20 мкл 50 mM буфера Трис-НСl (pH 6.8), 2.5% SDS, 10% глицерина, 0.5% β-меркаптоэтанола, 0.01% бромфенолового синего. Перед нанесением на гель пробы прогревали в течение 5 мин при 95°C. ПААГ с SDS окрашивали раствором нитрата серебра с помощью набора PageSilver Silver Staining Kit (ThermoFisher Scientific, США) по протоколу фирмы-производителя. Эксперименты проводили не менее трех раз.

Обработка конъюгатов MutS-ДНК и MutL-ДНК гидроксиламином. После проведения аффинной модификации белков MutS и MutL к реакционным смесям добавляли 1 мкл 2 M водного раствора гидрохлорида гидроксиламина, инкубировали при 37°C в течение 15 мин и анализировали методом электрофореза в денатурирующем ПААГ по методике, описанной выше.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят проф. П. Фридриха (P. Friedhoff) за предоставленные плазмидные конструкции, несущие гены белков MutS и MutL. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-54-45126 ИНД_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dolinnaya N.G., Zubin E.M., Kubareva E.A., Zetsepina T.S., Oretskaya T.S. // *Cur. Org. Chem.* 2009. V. 13. P. 1029–1049.

2. Verdine G.L., Norman D.P. // *Annu. Rev. Biochem.* 2003. V. 72. P. 337–366.
3. Luscombe N.M., Austin S.E., Berman H.M., Thornton J.M. // *Genome Biol.* 2000. V. 1. P. 1–10.
4. Gilbert H., O'Leary M. // *Biochemistry.* 1975. V. 14. P. 5194–5199.
5. King T. // *Biochemistry.* 1966. V. 5. P. 3454–3459.
6. Grossberg A., Pressman D. // *Biochemistry.* 1968. V. 4. P. 272–279.
7. Takahashi K. // *J. Biol. Chem.* 1968. V. 243. P. 6171–6179.
8. Basu A.K., O'Hara S.M., Valladier P., Stone K., Mols O., Marnett L.J. // *Chem. Res. Toxicol.* 1988. V. 1. P. 53–59.
9. Selig Ph. (Ed.) *Guanidines as Reagents and Catalysts I. Ser. Topics in Heterocyclic Chemistry.* Springer International Publishing, 2017. V. 50. P. 181.
10. Selig Ph. (Ed.) *Guanidines as Reagents and Catalysts II. Ser. Topics in Heterocyclic Chemistry.* Springer International Publishing, 2017. V. 51. P. 207.
11. Signor A., Bonora G., Biondi L., Nisato D., Marzotto A., Scoffone E. // *Biochemistry.* 1971. V. 10. P. 2748–2752.
12. Kinzel O., Budzikiewicz H. // *J. Peptide Res.* 1999. V. 53. P. 618–625.
13. Gao K., Orgel L.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 14837–14842.
14. Onizuka K., Taniguchi Y., Sasaki S. // *Bioconjugate Chem.* 2009. V. 20. P. 799–803.
15. Onizuka K., Shibata A., Taniguchi Y., Sasaki S. // *Chem. Commun.* 2011. V. 47. P. 5004–5006.
16. Onizuka K., Nishioka T., Li Z., Jitsuzaki D., Taniguchi Y., Sasaki S. // *Chem. Commun.* 2012. V. 48. P. 3969–3971.
17. Lamers M.H., Perrakis A., Enzlin J.H., Winterwerp H.H.K., de Wind N., Sixma T.K. // *Nature.* 2000. V. 407. P. 711–717.
18. Groothuizen F.S., Winkler I., Cristovao M., Fish A., Winterwerp H.H., Reumer A., Marx A.D., Hermans N., Nicholls R.A., Murshudov G.N., Lebbink G.H., Friedhoff P., Sixma T.K. // *eLife.* 2015. V. 4. P. e06744.
19. Schorzman A.N., Perera L., Cutalo-Patterson J.M., Pedersen L.C., Pedersen L.G., Kunkel T.A., Tomer K.B. // *DNA Repair (Amst.).* 2011. V. 10. P. 454–465.
20. Fukui K., Iino H., Baba S., Kumazaki T., Kuramitsu S., Yano T. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2017. V. 1865. P. 1178–1187.
21. Кузнецова Л.Г., Волков Е.М., Романова Е.А., Ташлицкий В.Н., Орецкая Т.С., Шабарова З.А. // *Биоорганическая химия.* 1991. Т. 17. С. 1289–1291 [Kuznetsova L.G., Volkov E.M., Romanova E.A., Tashlitsky V.N., Oretskaya T.S., Shabarova Z.A. // *Bioorg. Khim. (Moscow).* 1991. V. 17. P. 1289–1291].
22. Зацепин Т.С., Долинная Н.Г., Кубарева Е.А., Ивановская М.Г., Метелев В.Г., Орецкая Т.С. // *Успехи химии.* 2005. Т. 74. С. 84–103.
23. Кузнецова Л.Г., Романова Е.А., Волков Е.М., Ташлицкий В.Н., Орецкая Т.С., Крынецкая Н.Ф., Шабарова З.А. // *Биоорганическая химия.* 1993. Т. 19. С. 455–466. [Kuznetsova L.G., Romanova E.A., Volkov E.M., Tashlitsky V.N., Oretskaya T.S., Krynetskaya N.F., Shabarova Z.A. // *Bioorg. Khim. (Moscow).* 1993. V. 19. P. 455–466].

24. Зубин Е.М., Анцыпович С.И., Орецкая Т.С., Романова Е.А., Волков Е.М., Ташлицкий В.Н., Шабарова З.А. // Биорган. химия. 1997. Т. 23. С. 809–816. [Zubin E.M., Antsyrovich S.I., Oretskaya T.S., Romanova E.A., Volkov E.M., Tashlitsky V.N., Shabarova Z.A. // Russian Journal of Bioorg. Chem. 1997. V. 23. P. 730–736].
25. Iyer R.R., Pluciennik A., Burdett V., Modrich P.L. // Chem. Rev. 2006. V. 106. P. 302–323.
26. Natrajan G., Lamers M.H., Enzlin J.H., Winterwerp H.H.K., Perrakis A., Sixma T.K. // Nucl. Acids Res. 2003. V. 31. P. 4814–4821.
27. Sharma A., Doucette C., Biro F.N., Hingorani M.M. // J. Mol. Biol. 2013. V. 425. P. 4192–4205.
28. Yang Y., Sass L.E., Du C., Hsieh P., Erie D.A. // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. P. 4322–4334.
29. Tessmer I., Yang Y., Zhai J., Du C., Hsieh P., Hingorani M.M., Erie D.A. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 36646–36654.
30. Modrich P. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 6597–6600.
31. Au K.G., Welsh K., Modrich P. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 12142–12148.
32. Friedhoff P., Li P., Gotthardt J. // DNA Repair (Amst.). 2016. V. 38. P. 50–57.
33. Mechanic L.E., Frankel B.A., Matson S.W. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 38337–38346.
34. Bende S.M., Grafström R.H. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 1549–1555.
35. Drotschmann K., Hall M.C., Shcherbakova P.V., Wang H., Erie D.A., Brownell F.R., Kool E.T., Kunkel T.A. // Biol. Chem. 2002. V. 383. P. 969–975.
36. Guarne A., Ramon-Maiques S., Wolff E.M., Ghirlando R., Hu X., Miller J.H., Yang W. // EMBO J. 2004. V. 23. P. 4134–4145.
37. Ban C., Junop M., Yang W. // Cell. 1999. V. 97. P. 85–97.
38. Robertson A., Pattishall S.R., Matson S.W. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 8399–8408.
39. Hall M.C., Wang H., Erie D.A., Kunkel T.A. // J. Mol. Biol. 2001. V. 312. P. 637–647.
40. Feng G., Winkler M.E. // Biotechniques. 1995. V. 19. P. 956–965.

Synthesis of β -Diketone DNA Derivatives for Affine Modification of Proteins

M. V. Monakhova*, E. A. Kubareva*, E. A. Romanova*, A. S. Semkina**, D. S. Nabereznov***, D. N. Rao****, T. S. Zatsepin*****, and T. S. Oretskaya*.*

*Phone: +7 (495) 939-54-11; e-mail: oretskaya@belozersky.msu.ru

*Chemistry Department and Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russia

**Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia

***Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health, Kashirskoe sh. 24, Moscow, 115478 Russia

****Department of Biochemistry, Indian Institute of Science, C.V. Raman Road, Bangalore, 560012 India

*****Skolkovo Institute of Science and Technology, Nobelya ul. 3, Moscow, 121205 Russia

Diketone DNA derivatives were proposed to modify the guanidine group of Arg in proteins. β -Diketo group at the C2'-atom of the sugar-phosphate moiety was introduced in DNA by acylation of oligonucleotide precursors – DNA fragments with 2'-amino-2'-deoxyuridine, obtained by chemical automatic synthesis. The 4,6-dioxoheptanoic acid and water-soluble 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) were used in the reaction. The ability of oligodeoxyribonucleotides containing 2'- β -diketo group to react with guanidine, N^α-Boc-L-arginine and N^α-Dns-L-arginine was demonstrated. It is shown that the introduction of such a modification into one of the strand of 15-mer DNA duplex leads to its destabilization. The conjugate formation of MutS and MutL proteins from *E. coli* mismatch repair system with 17-mer DNA duplexes containing the 2'-deoxy-2'-(4,6-dioxoheptylamido)uridine residue was detected for the first time. To increase the selectivity of DNA ligands with the β -diketo group in reaction with Arg residues of proteins, it has been proposed to treat the reaction mixture with hydroxylamine solution. Such treatment leads to destruction of Schiff-bases formed with the lysine residue participation.

Keywords: modified DNA, the β -diketo group, mismatch repair, MutS and MutL proteins, DNA-protein conjugates