



ДНК С 2-ПИРИДИЛДИТИОГРУППОЙ ПРИ С2'-АТОМЕ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ФИКСАЦИИ БЕЛКА MutS С СОХРАНЕНИЕМ ЕГО ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

© 2021 г. С. А. Перри*, Е. А. Кубарева*, М. В. Монахова*^{*,#}, Р. М. Трикин**, Е. М. Косарецкий*, Е. А. Романова*, В. Г. Метелев*, П. Фридрихс***, Т. С. Орецкая*

* Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, химический факультет и факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

** ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

*** Институт биохимии, FB 08, Университет Ю. Либиха, D-35392 Гуссен, Германия, Heinrich-Buff-Ring, 17

Поступила в редакцию 01.10.2020 г.

После доработки 18.10.2020 г.

Принята к публикации 20.10.2020 г.

Нековалентные ДНК-белковые взаимодействия лежат в основе жизнедеятельности клеток. Ковалентные связи между ДНК и белком, возникающие при воздействии различных эндогенных и экзогенных факторов, а также химиотерапевтических агентов, как правило, нарушают нормальное функционирование ДНК-связывающих белков. Олигодезоксирибонуклеотиды с реакционноспособной группировкой используются как инструменты для подтверждения элементов структуры и механизмов действия таких белков. Для фиксации белка MutS, являющегося сенсором системы MMR (система репарации “мисматчей”, mismatch repair system) из *Escherichia coli*, через остаток цистеина предложено использовать ДНК с 2'-дезоксид-2'-[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]группой в составе нуклеозидов в заданном положении олигомерной цепи и с двумя флуорофорами. Дуплекс представляет собой набор комплементарных олигонуклеотидов с разрывами в “верхней” и “нижней” цепях. Это позволяет варьировать место введения реакционноспособной группировки, синтезируя только центральный фрагмент ДНК минимальной длины. Конъюгат MutS с ДНК был получен реакцией тиол-дисульфидного обмена с количественным выходом и очищен от непрореагировавшей ДНК с использованием эксклюзионной хроматографии. Методом флуоресцентного резонансного переноса энергии показано, что белок MutS в составе конъюгата сохраняет способность изменять свою конформацию и конформацию ДНК, что свидетельствует о сохранении его активности.

Ключевые слова: реакционноспособные ДНК, ковалентная фиксация белков на ДНК, тиол-дисульфидный обмен, репарация неканонических пар нуклеотидов, MutS

DOI: 10.31857/S0132342321020202

ВВЕДЕНИЕ

Метод ковалентного связывания (“кросслин-кинг”) белков с ДНК позволяет зафиксировать комплекс, образующийся в результате взаимодействия биомолекул, а также изучить особенности его формирования, локализацию белков на ДНК

Сокращения: FRET – флуоресцентный резонансный перенос энергии; МАНТ-АДР – 2'/3'-O-(N-метилантранилоил)аденозин-5'-дифосфат; MMR – система репарации “мисматчей” в ДНК (mismatch repair system); PDB – база данных Protein Data Bank; $\underline{\text{U}}$ – остаток 2'-дезоксид-2'-[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]уридина. Префикс “d” (дезокси) при обозначении олигодезоксирибонуклеотидов и ДНК-дуплексов опущен.

Автор для связи (тел.: +7 (495) 939-31-48; эл. почта: monakhovamv@gmail.com).

и расположение всех компонентов комплекса относительно друг друга и ДНК. Данный подход предусматривает следующие этапы исследования: 1) конструирование модельной системы, состоящей из белка и нуклеиновой кислоты, содержащих реакционноспособные группировки, и позволяющей с высоким выходом получить конъюгат белка с ДНК-лигандом; 2) выделение конъюгата в гомогенном состоянии; 3) проверка функциональной активности белка в составе конъюгата.

Для ковалентного связывания компонентов белково-нуклеинового комплекса предложено множество реакционноспособных группировок, различающихся по природе образующейся химической связи, скорости и эффективности ее формирования [1–8].

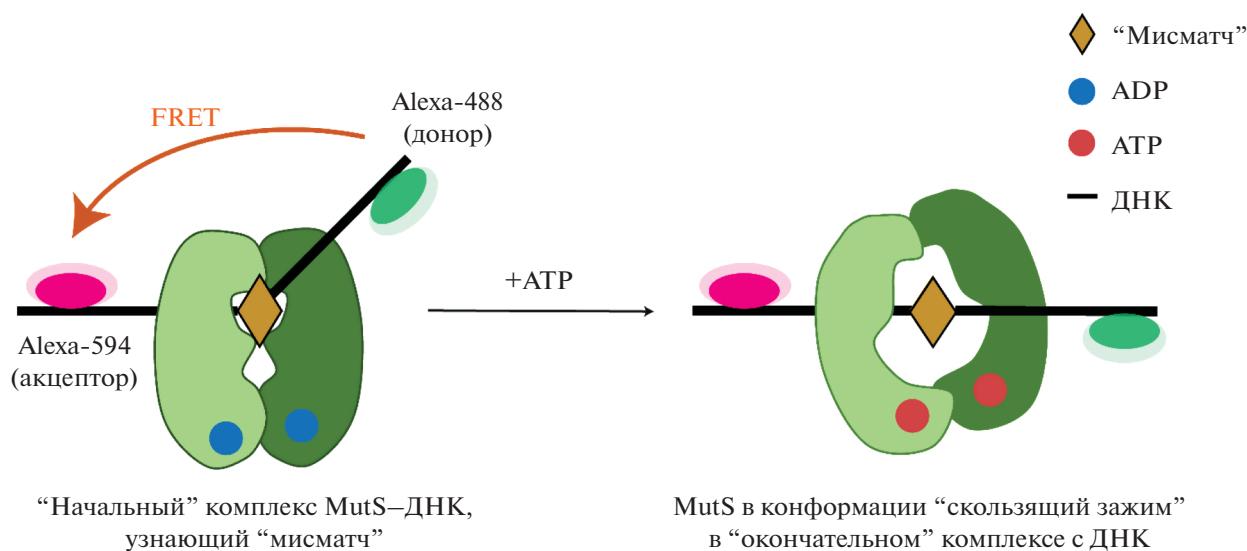


Рис. 1. Конформационные переходы ДНК в комплексе с белком MutS (по данным Putnam [22]).

Мы сосредоточили свои усилия на разработке методов “кроссликинга” белков с ДНК, основанных на реакции тиол-дисульфидного обмена [9–16]. В данной работе продолжено изучение свойств ДНК, содержащих 2'-дезоксид-2'-[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]группу в составе нуклеозида в заданном положении цепи. Эта группировка позволяет зондировать электростатические контакты белка с углеводофосфатным остовом ДНК. Она успешно использовалась при изучении свойств фактора транскрипции NF-κB [14] и нуклеазы *VspD61* [15]. В данной работе мы поставили задачу выделить ковалентно связанный комплекс белка с ДНК, содержащей 2'-дезоксид-2'-[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]группу, и выяснить, сохраняет ли он свою функциональную активность в составе конъюгата.

В качестве модели для изучения свойств разрабатываемых нами ДНК-реагентов хорошо зарекомендовал себя белок MutS из системы репарации неканонических пар нуклеотидов или “мисматчей” (MMR) *Escherichia coli*. MutS представляет собой сенсор, сканирующий ДНК в поисках “мисматча”. В присутствии ADP MutS узнает и связывает “мисматч”-содержащую ДНК, образуя с ней стабильный “начальный” комплекс. Связывание MutS приводит к изгибу линейной ДНК на 60° в случае пары G/T. Известно, что большинство контактов белка MutS с ДНК являются электростатическими, и аминокислотные остатки в районе “мисматча” сближены именно с углеводофосфатным остовом [17–21].

В присутствии ATP происходит формирование “окончателного” комплекса, в котором MutS переходит в конформацию “скользящий зажим”, что сопровождается уходом белка от некомплементарной пары и распрямлением ДНК [22–24]. Описанные конформационные переходы ДНК в

комплексе с MutS можно наблюдать по изменению сигнала флуоресцентного резонансного переноса энергии [9, 25, 26] (рис. 1).

Ранее нами уже были получены и выделены конъюгаты MutS с ДНК и показана возможность проверки функциональной активности зафиксированного белка [9, 16]. В первом случае конъюгаты представляли собой мутантные формы MutS, “сшитые” с 3'-концевой [3-(3-гидроксипропил)дитио]пропил]фосфатной группой, что являлось определенным ограничением для последующих исследований взаимодействия MutS с другими белковыми партнерами. Во втором случае модификация в ДНК вводилась по C5-атому тимидина, содержащему гексаметиленовый линкер. В зависимости от модифицирующего агента в работе были синтезированы ДНК, содержащие пиридилдитиогруппу на различном расстоянии от ДНК (18–50 Å). Однако такие ДНК-реагенты не позволяют реализовать “сшивку нулевой длины”, т.е. фиксировать контакты белка на более близком (~10 Å) расстоянии от ДНК.

Использование пиридилдитиогруппы, включенной в 2'-положение нуклеотида, дает возможность синтезировать ДНК-реагент без разрыва в месте модификации и получить конъюгат MutS–ДНК на коротком линкере (~7 Å). 17-Звенный олигодезоксирибонуклеотид, несущий 2'-дезоксид-2'-[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]группу, являлся фрагментом дуплекса (I), составленного из четырех комплементарных олигонуклеотидов, два из которых содержат флуорофоры (рис. 2). Такой ДНК-дуплекс может работать как “конструктор”, аналогично предложенному нами ранее в работе Perevozchikova et al. [25]. Дизайн дуплекса позволяет менять только один олигонуклеотид с реакционноспособной группой, если нуж-

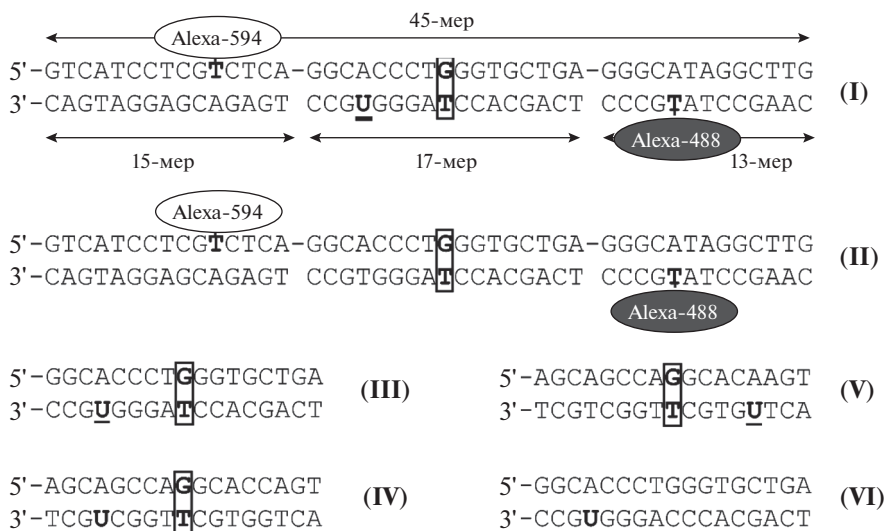


Рис. 2. Модифицированные ДНК-дуплексы, использованные в данной работе. $\underline{\text{U}}$ – 2'-дезоксид-2'-[3-(2-пиридил-дитио)пропионамидо]урдин.

но варьировать положение модификации относительно “мисматча” и флуоресцентных меток.

В представленной работе подобраны оптимальные условия ковалентного связывания мутантных форм MutS из *E. coli* – MutS(A469C/Δ801–853) и MutS(N497C/Δ801–853) – с ДНК. Оптимизирован метод эксклюзионной хроматографии, позволивший выделить конъюгат MutS–ДНК. Основываясь на изменении интенсивности сигнала FRET, мы показали, что зафиксированный на ДНК белок MutS является функционально активным: находясь в составе конъюгата, он способен изменять конформацию ДНК в присутствии АТР.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование модельных реакционноспособных фрагментов ДНК. В качестве базового ДНК-лиганда был использован 45-звенный дуплекс (II) (рис. 2), представляющий собой фрагмент последовательности плазмиды pUC-MMR, который хорошо себя зарекомендовал в экспериментах по исследованию инициации репарации “мисматчей” ДНК с помощью белков MutS, MutL и MutH *in vitro* [27]. Этот дуплекс в центральной позиции содержит G/T-пару, которая является одним из повреждений, наиболее эффективно узнаваемых и репарируемых системой MMR [28].

Предложенный ДНК-дуплекс имеет важную особенность: он содержит в своем составе FRET-пару, состоящую из флуорофоров Alexa-488 (донор, максимумы $\lambda_{\text{погл}}/\lambda_{\text{исп}} = 495/519$ нм) и Alexa-594 (акцептор, максимумы $\lambda_{\text{погл}}/\lambda_{\text{исп}} = 590/617$ нм). Эти флуорофоры присоединены к С5-атому остатка тимидина через гексаметиленовые линкеры и находятся в разных цепях ДНК-дуплекса на

расстоянии 12 п.н. от “мисматча”. В работе Cristóvão et al. [17] было показано, что такие модифицированные гетероциклические основания в составе ДНК не являются субстратами системы репарации MMR и могут быть использованы в качестве флуоресцентных меток. Ранее нами было продемонстрировано, что FRET-пара в составе дуплекса (II) позволяет следить за изменением его пространственной структуры [25].

Для получения 45-звенного ДНК-дуплекса (II) мы использовали гибридизацию на олигонуклеотиде-матрице (“верхняя” цепь), содержащем остаток G в “мисматче” и флуорофор Alexa-594, трех олигонуклеотидов (“нижняя” цепь): 13-мера с Alexa-488, 17-мера с остатком T в “мисматче” и 15-мера. Предложенная конструкция дуплекса позволяет варьировать структуру как 15-, так и 17-мера, вводя в заданную позицию модифицированное звено с пиридилдисульфидной группой, не меняя олигонуклеотид-матрицу и сохраняя оптимальное расположение FRET-пары (например, дуплекс (I), рис. 2). Наличие разрывов в цепи ДНК не влияет на характер связывания MutS с ДНК-лигандом, содержащим некомплементарную пару [17, 25].

Следующим этапом работы был выбор места введения пиридилдисульфидной группировки в 17-звенный фрагмент “нижней” цепи 45-звенного дуплекса. Ранее для “кросслинкинга” белка с дисульфид-содержащей ДНК нами были успешно использованы мутантные формы MutS, содержащие остаток Суs в положениях A469 или N497, локализованных в составе домена “зажим”. Эти аминокислотные остатки эффективно взаимодействовали с ДНК, несущими дисульфидную группировку, присоединенную к 3'-концу седь-

Таблица 1. Кристаллические структуры MutS с ДНК*

ДНК-лиганд (5'–3') (3'–5')	Кофакторы	Разрешение, Å	Код PDB	Ссылка
AGCTGCCAGGCACCAGTGTCTAGCGTCCSTAT TCGACGGTTCGTGGTTCACAGTTCGCAGGATA	АТР, Mg ²⁺	2.27	1W7A	[29]
AGCTGCCAAGCACCAGTGTCTAGCGTCCSTAT TCGACGGTTCGTGGTTCACAGTTCGCAGGATA	АДР, Mg ²⁺	2.40	1OH6	[20]
AGCTGCCAGGCACCAGTGT TCGACGGTTCGTGGTTCACA	АДР, Mg ²⁺	2.10	1WB9	[30]
AGCTGCCAGGCACCAGTGT TCGACGGTTCGTGGTTCACA	АДР, Mg ²⁺	2.50	1WBB	[30]
AGCTGCCAGGCACCAGTGTCTAGCGTCCSTAT TCGACGGTTCGTGGTTCACAGTTCGCAGGATA	АДР, Mg ²⁺	2.20	1E3M	[31]
AGCTGCCACGCACCAGTGTCTAGCGTCCSTAT TCGACGGTTCGTGGTTCACAGTTCGCAGGATA	АДР, Mg ²⁺	2.90	1OH5	[20]
AGCTGCCAGGCACCAGTGTCTAGCGTCCSTAT TCGACGGTTCGTGGTTCACAGTTCGCAGGATA	АДР, Mg ²⁺	2.50	1OH7	[20]
AGCTGCCA–GGCACCAGTGTCTAGCGTCCSTAT TCGACGGTTCGTGGTTCACAGTTCGCAGGATA	АДР, Mg ²⁺	2.90	1OH8	[20]
AGCTGCCAGGCACCAGTGT TCGACGGTTCGTGGTTCACA	АДР, Mg ²⁺	2.40	1WBD	[20]
AGCTGCCAGGCACCAGTGTCTA TCGACGGTTCGTGGTTCACAGT	АДР, Mg ²⁺	3.10	3ZLJ	[32]

* Все структуры получены для MutS из *Escherichia coli* (штамм K12) P23909. Кристаллизовали один и тот же полноразмерный белок длиной 800 а.о. Полужирным шрифтом выделены неканонические пары в ДНК-дуплексах.

мого нуклеотида в 3'-направлении от остатка Т “мисматча” (положение –7) [16].

В базе данных Protein Data Bank (PDB) найдены 10 структур комплексов MutS с ДНК [20, 29–32] (табл. 1). Анализ трех кристаллических структур MutS в комплексе с дуплексом, содержащим “мисматч” (PDB: 1W7A, 1OH7, 1E3M), а также данных литературы [20, 30] показал, что А469 или N497 сближены с нуклеотидами не только в положении –7, но и в пятом положении в 5'- или 3'-направлении от Т “мисматча” (положения +5 и –5), независимо от молекулы кофактора, а также дли-

ны дуплекса (табл. 2, рис. 3). Мы рассчитали расстояния (Å) от первого атома углерода (СВ) боковой цепи А469 и N497 до атома С2' нуклеотидов в 5'- или 3'-направлении от Т “мисматча” (табл. 2). При замене А469 и N497 на Сус и введении в нуклеотид модифицированной группировки расстояние между реагирующими группами может сократиться до 3–4 Å. Такое расстояние должно обеспечить возможность протекания химической реакции между MutS и 2-пиридилдисульфидной группой в 2'-положении углеводного фрагмента ДНК.

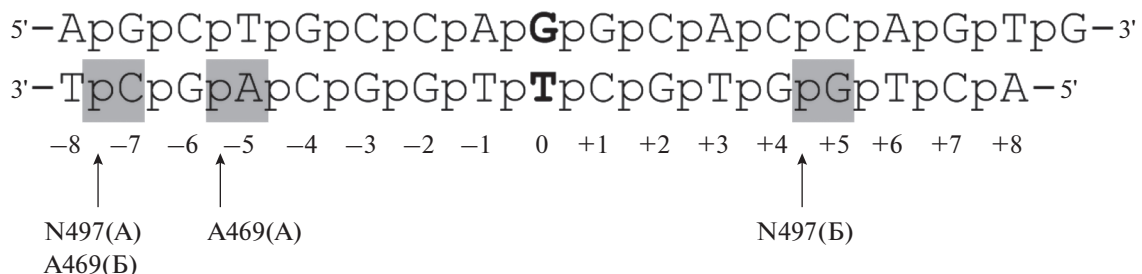


Рис. 3. Контакты углеводного фрагмента и фосфатного остатка нуклеотидов в положениях –7, –5 и +5 ДНК-дуплекса с субъединицами А и В гомодимера MutS в белково-нуклеиновом комплексе (PDB: 1WB9).

Таблица 2. Рассчитанные расстояния от атома СВ боковой цепи А469 и N497 до атома С2' нуклеотида в структурах комплексов MutS–ДНК*

Положение нуклеотида**	Расстояние, Å			
	A469		N497	
	субъединица А	субъединица Б	субъединица А	субъединица Б
–7	19.29	8.51	9.05	22.22
	19.18	9.92	8.29	22.55
	19.30	9.71	8.14	22.61
–5	9.54	15.44	13.19	17.96
	9.62	15.25	13.39	17.89
	9.61	15.23	13.40	17.98
+5	22.43	28.05	30.27	8.56
	22.54	27.90	30.55	8.54
	22.37	27.83	30.51	8.48

* Рассматривались структуры комплексов с кодами PDB: 1WB9 (первая строка для каждого из рассматриваемых нуклеотидов), 1E3M – вторая строка, 1W7A – третья строка.

** Указано положение нуклеотида относительно Т “мисматча” (со знаком минус – в 3'-направлении, со знаком плюс – в 5'-направлении).

Для проверки этого предположения была сконструирована серия 17-звенных ДНК-дуплексов (рис. 2). ДНК-дуплекс (III) входит в состав предложенной нами 45-звенной системы. Последовательность в дуплексах (IV) и (V) соответствует последовательности фрагмента дуплекса, использовавшегося при кристаллизации комплекса MutS с ДНК [31]. В этих дуплексах единственный остаток U введен в 5-ю позицию с одной или другой стороны от Т “мисматча”. Поскольку контакты MutS с ДНК (кроме области “мисматча”) носят неспецифический характер, мы посчитали возможным заменить в “нижней” цепи остаток А (5-й с 3'-конца от “мисматча”) на U. В качестве контроля синтезирован модифицированный дуплекс (VI), который является аналогом дуплекса (III), но не содержит “мисматча”. Белок MutS, отвечающий за узнавание “мисматча”, должен взаимодействовать с таким дуплексом менее эффективно по сравнению с остальными. Для получения дуплексов (III–VI) 2'-дисульфидсодержащие 17-звенные олигонуклеотиды, синтезированные по методике Metelev et al. [15], гибридизовали с комплементарными матрицами.

Характеристика мутантных форм белка MutS с единичным остатком цистеина. Для создания белков MutS, содержащих единственный остаток Cys (SC, Single Cys), мы использовали вариант белка MutS – CFMutS(Δ801–853), который не имеет остатков Cys (Cys Free), а также не содержит 53 С-концевые аминокислоты, практически не важные для процесса репарации “мисматчей” [33], но участвующие в тетрамеризации MutS [31]. В реакциях ковалентного связывания MutS с модифицированными ДНК, требующих высокой концентрации биомолекул, олигомеризация белка нежелательна. Ранее было доказано, что CFMutS(Δ801–853) имеет то же сродство к ДНК с G/Т-парой, что

и белок дикого типа (WTMutS) [34]. Далее для белка CFMutS и мутантных форм, полученных на его основе, обозначение (Δ801–853) опущено. В качестве контроля в данной работе использовали полноразмерный WTMutS, содержащий шесть остатков Cys на мономер белка.

Генетические конструкции для экспрессии мутантных форм SCMutS(A469C) и SCMutS(N497C) были получены ранее сайт-направленным мутагенезом [16]. Белки выделяли, как описано в работах Heinze et al. [16] и Feng et al. [35]. Характеристика их свойств в сравнении с WTMutS и CFMutS приведена ниже. Далее по тексту аббревиатура SC опускается. Согласно имеющимся данным [16, 25, 36], при связывании белка MutS с ДНК даже канонического строения происходит ускорение обмена ADP (вплоть до 10-кратного) в АТР-разных доменах гомодимера WTMutS. Сравнительную характеристику мутантных форм по этому признаку выполняли с использованием флуоресцентного аналога ADP – 2'/3'-O-(N-метилантранилоил)аденозин-5'-дифосфата (МАНТ-ADP) – в отсутствие и в присутствии 30-звенного дуплекса (VII) 5'-CAAGCCTATGCCCTCAGCACCCAGG-GTGCC-3'/3'-GTTTCGGATACGGGAGTCGTG-GGTCCCACGG-5', не содержащего “мисматч” (концентрация 500 нМ).

В отсутствие ДНК в реакционной смеси значения констант скорости высвобождения МАНТ-ADP оказались сходными (в пределах погрешности) для всех вариантов MutS (0.007–0.012 с⁻¹) (табл. 3). В присутствии ДНК для WTMutS, CFMutS и MutS(A469C) получены близкие значения k_{off} (0.043–0.049 с⁻¹). Таким образом, обмен МАНТ-ADP на ADP в АТР-разных доменах этих вариантов MutS в присутствии ДНК в условиях наших экспериментов происходил в 4–6 раз быстрее по

Таблица 3. Эффективность обмена МАНТ-ADP на ADP в АТРазных доменах различных форм MutS

Белок	Скорость высвобождения МАНТ-ADP из комплекса с белком MutS, k_{off} , с^{-1} *		Ускорение обмена ADP в MutS в присутствии ДНК, $k_{\text{off}}(+\text{ДНК})/k_{\text{off}}(-\text{ДНК})$
	в отсутствие дуплекса (VII), $k_{\text{off}}(-\text{ДНК})$	в присутствии дуплекса (VII), $k_{\text{off}}(+\text{ДНК})$	
WTMutS	0.012 ± 0.001	0.043 ± 0.002	3.6
CFMutS	0.008 ± 0.002	0.047 ± 0.001	5.6
MutS(A469C)	0.011 ± 0.005	0.049 ± 0.007	4.3
MutS(N497C)	0.007 ± 0.003	0.015 ± 0.003	2.3

* Приведены средние значения трех экспериментов \pm s.d.

сравнению с реакционной смесью в отсутствие ДНК. Для MutS(N497C) наблюдалось не столь эффективное ускорение обмена ADP в АТРазных доменах – в 2.3 раза (табл. 3), что может быть связано либо с меньшим сродством рассматриваемой мутантной формы MutS к ДНК, либо с некоторым нарушением взаимной регуляции АТРазных и ДНК-связывающего доменов в этом белке.

Для характеристики функциональных свойств полученных мутантных форм белков была исследована способность MutS(A469C), MutS(N497C) и CFMutS активировать гидролиз суперскрученной (сс) плазмиды pUC-MMR, содержащей неканоническую G/T-пару и последовательность 5'-GATC-3'/3'-CTm⁶AG-5', эндонуклеазой MutH в присутствии белка MutL (рис. 4). Об активности MutH судили по образованию ДНК с разрывом только в одной из цепей (оц – одноцепочечный разрыв). Реакционные смеси анализировали в агарозном геле, содержавшем бромид этидия. Оценивали увеличение в ходе реакции интенсивности зоны, соответствующей плазмиде с одноцепочечным разрывом.

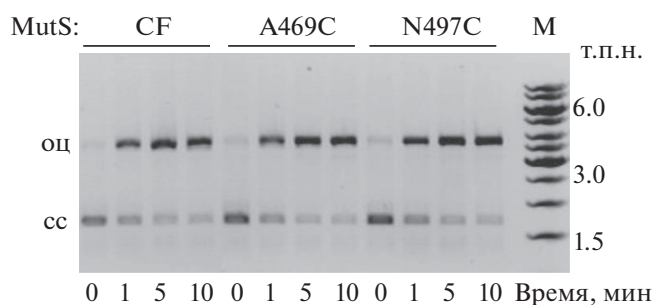


Рис. 4. Анализ продуктов гидролиза белком MutH плазмиды pUC-MMR, содержащей неканоническую пару G/T и монометилированную последовательность 5'-GATC-3'/3'-CTm⁶AG-5', в присутствии MutL и мутантных форм MutS методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле с бромидом этидия. Верхние зоны соответствуют ДНК с разрывом только в одной из цепей (оц), а нижние – суперскрученной плазмиде (сс). М – маркер длины ДНК GeneRuler™ 1 kb.

В наших экспериментах уже за 5 мин наблюдался практически полный переход ДНК-субстрата с G/T-“мисматчем” в ДНК с одноцепочечным разрывом в присутствии CFMutS (рис. 4). Эффективность гидролиза ДНК эндонуклеазой MutH в присутствии MutS(A469C) и MutS(N497C) в пределах ошибки близка к таковой для CFMutS. Интересно, что мутантная форма MutS(N497C), характеризующаяся пониженной способностью к обмену ADP в присутствии ДНК, активировала последующие этапы репарации.

Таким образом, мутантные формы MutS, содержащие единственный остаток Cys на мономер в положениях 469 и 497, сохраняют основные биохимические свойства белка MutS и в дальнейшем могут использоваться для структурно-функциональных исследований системы MMR.

Взаимодействие мутантных форм MutS с 17-звенными ДНК-дуплексами с 2'-пиридилдисульфидной группировкой. Схема реакции между гомодимером мутантной формы MutS, содержащим единственный остаток Cys на мономер, и ДНК с одним остатком 2'-дезоксидеокси-2'-[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]уридина представлена на рис. 5.

45-Звенный дуплекс (I), предложенный нами для последующих экспериментов, содержит в своем составе 17-звенный дуплекс (III) с реакционноспособной группировкой. Поэтому взаимодействие именно дуплекса (III) с мутантными формами MutS было охарактеризовано нами в первую очередь. В экспериментах использовали белок MutS(A469C), т.к. он проявлял наибольшее сходство с белком дикого типа. Более того, остаток 469 субъединицы А гомодимера MutS находится также на расстоянии $< 10 \text{ \AA}$ от положения –5 G/T-содержащего дуплекса, использованного в PCA (рис. 3, табл. 2).

Ковалентное связывание мутантной формы MutS(A469C) с 5'-³²P-меченным ДНК-дуплексом (III) проводили в буфере, содержащем 1 mM ADP, в течение 30 мин при 37°C. Для достижения максимального выхода конъюгата использовали 5-кратный избыток ДНК по отношению к белку. Как видно из изображений геля, окрашенного раствором кумасси G250, и его радиоавтографа

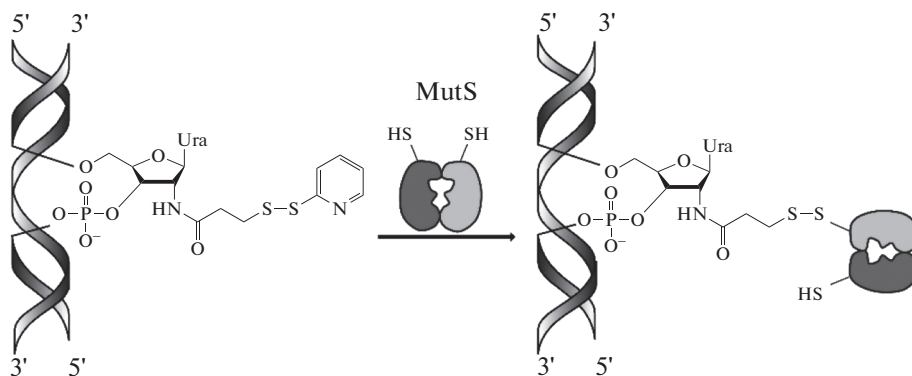


Рис. 5. Схема реакции тиол-дисульфидного обмена между остатком цистеина MutS и 2'-дезоксид-2'-[3-(2-пиридил-дифио)пропионамидо]уридином в составе ДНК-дуплекса.

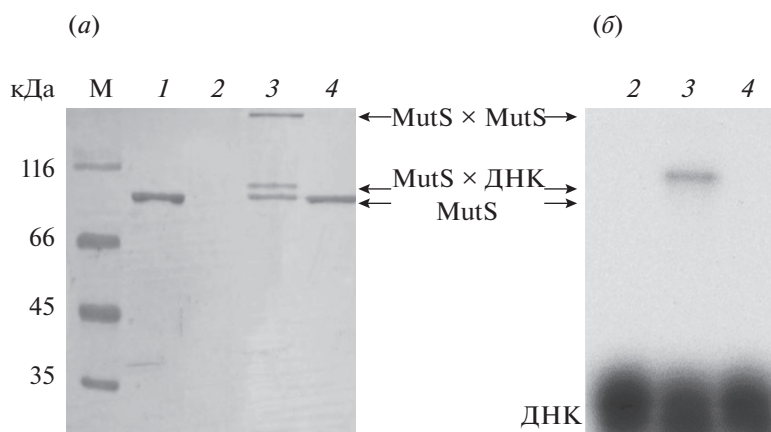


Рис. 6. Анализ продуктов ковалентного связывания мутантной формы MutS(A469C) и дуплекса (III) методом электрофореза в 8%-ном SDS-ПААГ. (а) – Фотография геля, окрашенного раствором кумасси G250; (б) – радиоавтограф геля. Дорожка 1 – препарат MutS(A469C) с 10 мМ DTT (а); дорожка 2 – препарат дуплекса (III); дорожки 3 и 4 – реакционные смеси в буфере А, не содержащем и содержащем 10 мМ DTT соответственно. М – маркер молекулярной массы PageRuler™ (10–200 кДа).

(рис. 6), кроме зоны, соответствующей белку (молекулярная масса ~90 кДа), наблюдалась дополнительная зона с большей молекулярной массой (MutS × ДНК). В этой зоне обнаруживалась радиоактивность, что подтверждало наличие в ней ДНК и позволяло считать эту зону продуктом “кросслинкинга”. Из двух остатков Cys гомодимеров мутантных форм MutS только один способен образовывать ковалентную связь с реакционноспособной ДНК. Таким образом, 100%-ному выходу конъюгатов мутантных форм MutS с модифицированными ДНК в расчете на белок соответствует 50%-ная модификация этих белков. Выход конъюгата MutS(A469C) с ДНК-дуплексом (III) составлял >80%, т.к. >40% белка находилось в составе зоны, соответствующей конъюгату (рис. 6а, дорожка 3). Кроме зоны, соответствующей конъюгату MutS(A469C) с ДНК-дуплексом, наблюдалась зона с очень низкой подвижностью в 8%-ном SDS-ПААГ (>200 кДа), соответствующая димеру MutS (MutS × MutS). Образованию белок-белковой сшивки через дисульфидный мо-

стик в данном случае способствует сближение остатков Cys в гомодимере мутантной формы MutS(A469C). При добавлении 10 мМ DTT в реакционную смесь зоны, соответствующие конъюгату и димеру белка, исчезают (рис. 6, дорожки 4), что подтверждает наличие в них дисульфидной связи.

Для оценки специфичности предложенного ДНК-реагента было изучено взаимодействие дуплексов (IV)–(VI), содержащих единичный остаток 2'-дезоксид-2'-[3-(2-пиридилдифио)пропионамидо]уридина, с белками CFMutS, MutS(A469C) и MutS(N497C). В качестве примера на рис. 7 приведены результаты анализа реакционных смесей для дуплекса (IV) и различных форм белка MutS. CFMutS, не содержащий остатков Cys, как и ожидалось, не образовывал ковалентный комплекс ни с одним ДНК-дуплексом (рис. 7а). Эффективности образования ковалентного связанного комплекса при оценке по белку для всех дуплексов и мутантных форм MutS(A469C) и MutS(N497C) составляла 60–100%. Тем не менее наблюдались различия в эффективности образования конъю-

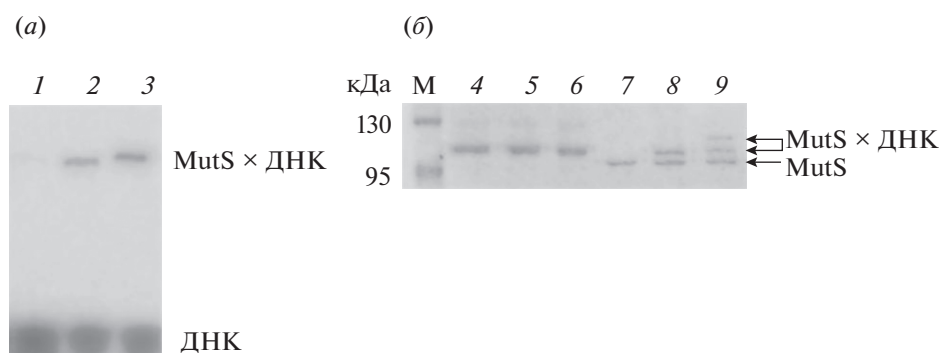


Рис. 7. Взаимодействие WT MutS и мутантных форм CFMutS, MutS(A469C), MutS(N497C) с ^{32}P -мечеными ДНК-дуплексами (IV)–(VI), содержащими единственный остаток 2'-дезоксид-2'-[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]уридина. Радиоавтограф (а) и фотография (б) 8%-ного SDS-ПААГ, окрашенного раствором кумасси G250. Дорожки 1–3 – реакционные смеси, содержащие CFMutS, MutS(A469C), MutS(N497C) и дуплекс (IV) соответственно; дорожка 4 – препарат WT MutS; дорожки 5 и 6 – реакционные смеси, содержащие WT MutS и дуплекс (V) или (VI) соответственно; дорожка 7 – препарат MutS(A469C); дорожки 8 и 9 – реакционные смеси, содержащие MutS(A469C) и дуплекс (V) или (VI) соответственно. М – маркер молекулярной массы PageRuler™ (10–200 кДа).

югатов для MutS(N497C) и MutS(A469C) с дуплексами (III)–(VI). Например, по данным РСА, реакционноспособная группировка ДНК-дуплекса (V) должна быть сближена с остатком 497 из субъединицы Б MutS (табл. 2, рис. 3). Образование конъюгата этого ДНК-дуплекса с мутантной формой MutS(N497C) происходило с максимальной эффективностью (90–100% по белку) и менее эффективно – с мутантной формой MutS(A469C) (60–70% по белку) (рис. 7). В условиях наших экспериментов образование ковалентного комплекса с ДНК-дуплексом (VI) канонического строения также происходило с высоким выходом (до 60% в расчете на белок). Ранее такой факт наблюдался в случае фактора транскрипции NF-κB и никующей эндонуклеазы BspD6I, которые имеют высокое сродство к неспецифической ДНК [14, 15]. Этим же свойством обладает белок MutS [31, 33, 34]. Возможно, остатки Cys мутантных форм MutS сближаются с реакционноспособной группировкой ДНК в процессе поиска “мисматча” и успевают образовать с ней ковалентную связь. В случае MutS при взаимодействии с ДНК-дуплексом (VI) на геле наблюдаются несколько зон, соответствующих конъюгатам. Это связано с тем, что 17-звенный дуплекс канонического строения более устойчив по сравнению с “мисматч”-содержащим и не полностью денатурирует в условиях гель-электрофореза. Наблюдаемые продукты, по-видимому, соответствуют конъюгатам MutS с одной цепью и ДНК-дуплексом. Вместе с тем кинетический анализ реакции “кросслинкинга” MutS(A469C) с ДНК-реагентами, содержащими 3'-концевую пиридилдисульфидную группу, показал в 4 раза большую скорость образования конъюгата с “мисматч”-содержащим дуплексом по сравнению с каноническим [16]. В то же время гомодимер WT MutS, имеющий в своем составе 12 остатков Cys, не формировал конъюга-

ты с дуплексами (III)–(VI), содержащими 2'-пиридилдисульфидное звено.

В совокупности представленные в данной работе и описанные нами ранее результаты [9, 14–16] подтверждают, что для образования ковалентной связи необходимо непосредственное сближение Cys с описываемой реакционноспособной группировкой – либо в процессе сканирования ДНК, либо при образовании специфического ДНК-белкового комплекса.

“Кросслинкинг” 45-звенного дуплекса (I) с MutS(A469C) и выделение ДНК-белкового конъюгата. Выбранный и оптимизированный нами метод ковалентного присоединения мутантных форм MutS к 17-звенным дуплексам оказался очень эффективным. Мы использовали его для получения конъюгата 45-звенного дуплекса (I), содержащего FRET-пару, с MutS(A469C), а также для выделения полученного комплекса и проверки функциональной активности его белкового компонента.

В составе ДНК-дуплекса (I) присутствуют довольно короткие ДНК-фрагменты. Наиболее короткие из них – 15-звенный и 13-звенный, содержащий Alexa-488 – имеют расчетную температуру плавления $\sim 44.5^\circ\text{C}$ (рассчитана в программе OligoAnalyzer, см. “Эксперим. часть”). По результатам гель-электрофореза в неденатурирующих условиях наблюдалась частичная диссоциация этих коротких дуплексов. Было подобрано молярное соотношение олигонуклеотидов, содержащих флуорофоры, при котором наблюдалась максимальная эффективность FRET, и при этом избыток 13-звенного или 15-звенного олигонуклеотида был минимален (45-мер : 13-мер = 45-мер : 15-мер = 1.0 : 1.1). Поскольку в данной работе измерялись относительные изменения флуоресценции, незначительный избыток однотяжевых ДНК, присутствовавший во всех экспериментах в равном количестве, не влиял

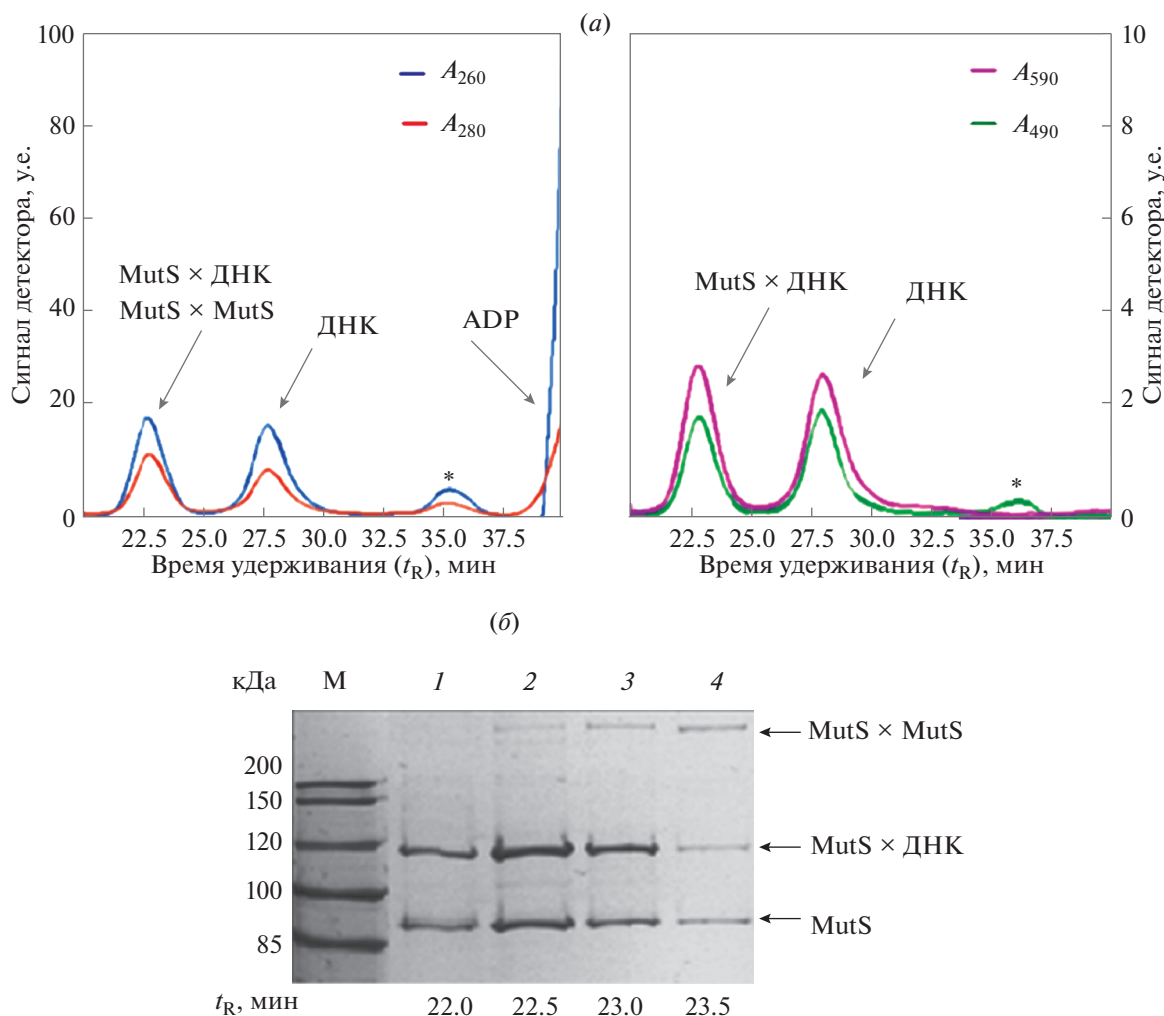


Рис. 8. Выделение конъюгата MutS(A469C) с дуплексом (I) методом эксклюзионной ВЭЖХ на колонке с сорбентом Superdex200 ТМ. (а) – Хроматограммы смеси, содержащей ДНК-белковый конъюгат. Детектировали оптическую плотность раствора при 260, 280, 490 и 590 нм; (б) – электрофоретический анализ фракций, полученных в результате эксклюзионной хроматографии конъюгата в градиентном 4–20%-ном SDS-ПААГ. Дорожки 1–4 соответствуют временам удерживания 22.0–23.5 мин. М – маркер молекулярной массы PageRuler™ (10–200 кДа). Гель окрашивали раствором солей серебра.

на общую тенденцию. Образование дуплекса (I) контролировали методом гель-электрофореза в неденатурирующих условиях, как описано в работе Ede et al. [37]. Для повышения стабильности ДНК-дуплексов их формировали и хранили в присутствии 5 мМ $MgCl_2$. Кроме того, эксперименты выполняли при температуре 20°C.

“Кросслинкинг” проводили в буфере А (см. “Эксперим. часть”), содержащем 1 мМ ADP, 5 мкМ ДНК-дуплекс (I) и 1 мкМ MutS(A469C). Выход продукта был близок к количественному (рис. 8). Для выделения конъюгата MutS(A469C) с дуплексом (I) использовали эксклюзионную хроматографию с условиями разделения, описанными ранее [16]. Отметим, что выделение конъюгатов MutS с протяженным дуплексом, имеющим составную “нижнюю” цепь и флуорофоры в разных цепях, методом эксклюзионной хромато-

графии выполнено впервые. Наличие флуорофоров в составе этого дуплекса позволяет эффективно контролировать разделение компонентов и оценивать стабильность ДНК в процессе очистки. За ходом разделения следили не только при 260 и 280 нм, но и при 480 нм (поглощение Alexa-488) и 590 нм (поглощение Alexa-594). На рис. 8а приведен пример хроматограммы разделения компонентов реакции между MutS(A469C) и дуплексом (I).

Для определения состава фракций использовали соотношение A_{260}/A_{280} . Время удерживания (t_R) конъюгата MutS(A469C) с дуплексом (I) с массой ~200 кДа составляло ~22.5 мин ($A_{260}/A_{280} = 1.4$). Время удерживания ДНК-дуплекса (I) (с массой ~30 кДа) составляло ~28 мин ($A_{260}/A_{280} = 1.9$).

На хроматограмме наблюдался небольшой пик (на рис. 8а он обозначен звездочкой) с $t_R \approx 36$ мин и увеличенным поглощением в области 488 нм. По его поглощению можно предположить, что он соответствует 13-звенному ДНК-фрагменту, содержащему флуорофор Alexa-488, т.к. значение A_{260}/A_{280} для него составляло 1.8. Как упоминалось, этот олигонуклеотид добавляли в незначительном избытке при составлении ДНК-дуплекса, что обеспечивало наиболее эффективное формирование ДНК-системы (I).

При электрофоретическом анализе образцов собранных фракций в градиентном 4–20%-ном SDS-ПААГ (рис. 8б) наблюдалось образование двух зон, соответствующих конъюгату мономера MutS(A469C) с дуплексом (I) и свободному белку в мономерной форме, а также образование зоны стабильного димера MutS(A469C), обладающего низкой подвижностью в условиях электрофореза. Во фракции пика с $t_R = 22$ мин практически не наблюдалось примеси димера белка (рис. 8б, дорожка 1), поэтому именно эта фракция была использована в дальнейшем для функциональных исследований конъюгата. Таким образом, в ходе эксклюзионной хроматографии конъюгат MutS с ДНК был очищен от непрореагировавшей ДНК (двучепочечной ДНК и олигонуклеотидов), однако полностью отделить его от непрореагировавшего белка не удалось.

Изменение флуоресцентных свойств дуплекса (I), ковалентно связанного с MutS(A469C), при добавлении АТР. В следующей серии экспериментов мы использовали выделенный конъюгат дуплекса (I) с MutS(A469C) и контрольный образец – “несшитый” комплекс MutS(A469C) с дуплексом (II), который аналогичен дуплексу (I), но не содержит реакционноспособную группировку (рис. 2). Эти образцы применяли для изучения конформационных перестроек ДНК при переходе “начального” комплекса, узнающего “мисматч”, в “окончательный”, в котором MutS находится в конформации “скользящий зажим” (рис. 1). Как упоминалось выше, в ходе этого процесса, протекающего в присутствии АТР, происходит разгибание ДНК, что сопровождается значительным уменьшением эффективности переноса энергии между флуорофорами в дуплексах (I) и (II).

Для регистрации образования “начального” комплекса, узнающего некоплементарную пару, записывали спектры испускания при возбуждении Alexa-488 и определяли значения анизотропии обоих флуорофоров. В условиях контрольного эксперимента вся ДНК была связана с белком MutS(A469C): соотношение концентраций дуплекса (II) и MutS(A469C) составляло 1 : 10 в расчете на мономер белка.

Для количественной интерпретации изменений, наблюдавшихся в спектрах флуоресценции, использовали отношение $\Delta(F_{\max}/Red)$, где F_{\max} –

максимум интенсивности флуоресценции акцептора при возбуждении донора флуоресценции, а Red – максимум флуоресценции донора в условиях его возбуждения; Δ указывает на изменение величины F_{\max}/Red в ходе связывания MutS с ДНК. При расчетах вычитали значения F_{\max}/Red после связывания с MutS из значений F_{\max}/Red для раствора ДНК-дуплекса. Значение $\Delta(F_{\max}/Red)$ нивелирует эффект разведения реакционной смеси, что неизбежно в ходе эксперимента, и позволяет говорить об изменении эффективности переноса энергии между донором и акцептором флуоресценции во FRET-паре. Поскольку $\Delta(F_{\max}/Red)$ является отношением двух значений интенсивности флуоресценции, эта величина не имеет размерности.

Из спектров флуоресценции (рис. 9, образцы 1) следует, что для конъюгата MutS(A469C) с дуплексом (I) и не связанного ковалентно комплекса MutS(A469C) с дуплексом (II) наблюдался эффективный перенос энергии между флуорофорами. Значение $\Delta(F_{\max}/Red)$ составляло ~ 0.13 для дуплексов (I) и (II), что свидетельствует о наличии в растворах “начального” комплекса, узнающего “мисматч” (где ДНК изогнута на 60°) [31]. После добавления 1 мМ АТР к этим комплексам наблюдалось значительное уменьшение эффективности переноса энергии, что видно по изменению спектра флуоресценции (рис. 9, образцы 2). Значения $\Delta(F_{\max}/Red)$ изменились до 0.012. Такое изменение эффективности переноса энергии, по видимому, свидетельствует об исчезновении изгиба ДНК, характерного для “начального” комплекса. “Скользящий зажим” MutS, формирующийся после добавления АТР, сразу диссоциирует, и ДНК-белковый комплекс разрушается (за исключением ДНК-фрагментов с заблокированными концами [26]). Именно поэтому в случае комплекса MutS(A469C) с дуплексом (II) значения анизотропии уменьшались с 0.3 до 0.15: $\Delta r(\text{Alexa-594}) = 0.15$ (рис. 9). Однако в случае “сшитого” комплекса наблюдалось практически полное отсутствие изменения анизотропии Alexa-594: $\Delta r(\text{Alexa-594}) = 0.01$. Добавление в реакционную смесь восстановителя (10 мМ DTT) приводило к разрушению конъюгата (*данные не приведены*). Значения анизотропии флуорофоров для такого препарата, равные $r(\text{Alexa-488}) = 0.06$ и $r(\text{Alexa-594}) = 0.15$, свидетельствуют о наличии в растворе свободного ДНК-дуплекса. Полученные результаты показывают, что ковалентная связь между ДНК и Cys469 в домене “зажим” белка MutS не препятствует изменению конформации белка и его переходу в “скользящий зажим” при связывании АТР. В дальнейшем важно понять, возможны ли в конъюгате MutS–ДНК другие конформационные перестройки белка, например, изменение положения “мисматч”-связывающего [38, 39] и

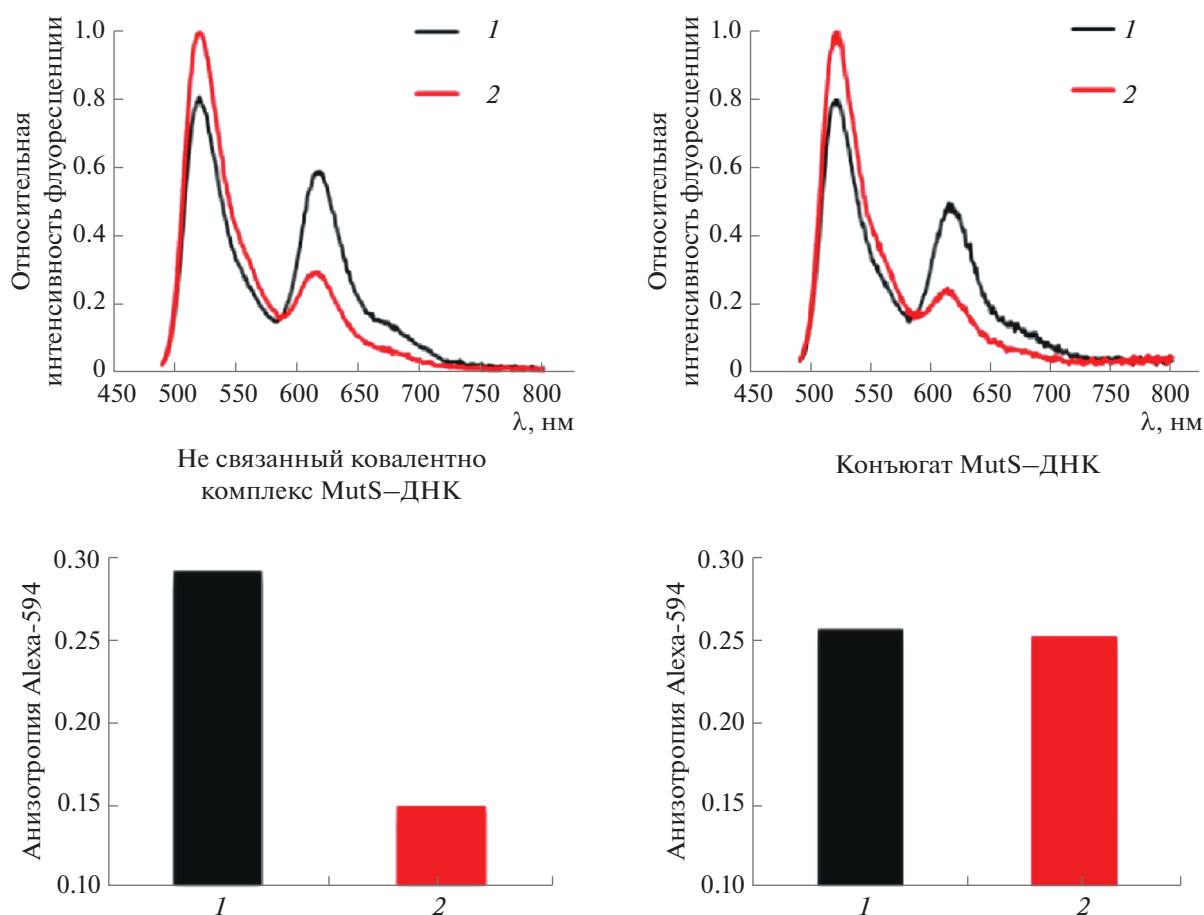


Рис. 9. Анализ конформационных перестроек ДНК при образовании “окончательного” узнающего комплекса методами, основанными на измерениях интенсивности и анизотропии флуоресценции. На верхних панелях представлены спектры испускания (в диапазоне 500–800 нм) при возбуждении Alexa-488; нижние панели – диаграммы, демонстрирующие изменение анизотропии флуорофора Alexa-594 в ходе эксперимента; 1 – конъюгат MutS(A469C) с дуплексом (I) и не связанный ковалентно комплекс MutS(A469C) с дуплексом (II); 2 – те же образцы после добавления АТФ (1 мМ).

“коннекторного” доменов [40], а также взаимодействие MutS с белком MutL [40–42].

Полученные результаты согласуются с предшествующими данными. В работе Monakhova et al. [9] ДНК содержала пиридилдисульфидную группу в 5-м положении Т, а конъюгат MutS–ДНК выделяли методом анионообменной хроматографии (препарат не содержал примеси белка). Наблюдаемые нами эффекты не противоречат общепринятой модели: в присутствии АТФ происходят конформационные изменения в MutS и “выпрямление” ДНК в белково-нуклеиновом комплексе [24].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. *N*-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат, наборы белков-маркеров молекулярной массы PageRuler™ (10–200 кДа), набор ДНК-маркеров GeneRuler™ 1 kb (250–10000 п.н.), раствор PageBlue™ на основе кумасси G250, ADP, АТФ (Thermo Fisher Scientific, США); *trео*-2,3-

дигидрокси-1,4-димеркаптобутан (1,4-дителиотрит, DTT); γ -³²P-АТФ с удельной радиоактивностью 1000 Кюри/моль и концентрацией 2 мкМ (ИМБ РАН, Россия); МАНТ-АДР – 2′/3′-*O*-(*N*-метилантранилоил)аденозин-5′-дифосфат (BIOLOG Life Science Institute, Германия).

Ферменты и белки. Т4 полинуклеотидкиназа (Thermo Fisher Scientific, США). MutS и мутантные варианты получены согласно методикам, опубликованным ранее [16, 35].

Плазмидная ДНК (pUC-MMR), содержащая G/T-пару и участок узнавания MutH, описана и получена согласно методике, опубликованной ранее [27].

Олигодезоксирибонуклеотиды 5′-GTCATCCTC-GT^{Alexa594}CTCAGGCACCCTGGGTGCTGAGGG-CATAGGCTTG-3′ и 5′-CAAGCCTAT^{Alexa488}GCCC-3′ синтезированы компанией Eurogentec (Бельгия). Флуорофоры Alexa-488 и Alexa-594 присоединены по С5-атому тимидина через 2-(6-аминогексилкарбамоил)виниловый линкер. Олигодезок-

сирибонуклеотиды с включениями 2'-дезоксидеокси-2'-аминоуридина получали по стандартному протоколу амидофосфитного олигонуклеотидного синтеза на автоматическом синтезаторе ABI 380V (Applied Biosystems, США) с использованием 5'-*O*-диметокситритил-2'-трифторацетиламино-2'-дезоксидеокси-3'-(*N,N*-диизопропиламида)цианэтилфосфита уридина (ChemGenes, США). Немодифицированные олигодезоксирибонуклеотиды синтезированы ЗАО "Евроген" (Россия).

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов с единичным 2'-дисульфид-содержащим уридиновым звеном. Исходными соединениями для получения 2-пиридилдисульфид-содержащих олигонуклеотидов служили синтетические олигонуклеотиды с единичным 2'-амино-2'-дезоксидеоксиуридиновым звеном. Модификацию проводили согласно методике, опубликованной ранее [15]. Процент превращения исходного соединения в целевой 2-пиридилдисульфид-содержащий олигонуклеотид оценивали методом ВЭЖХ в ион-парном варианте или методом электрофореза в 20%-ном ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

Конструирование флуоресцентно- и ³²P-меченных ДНК-дуплексов. ³²P-метку в олигонуклеотиды вводили с помощью полинуклеотидкиназы Т4 (10 ед. акт.) и [γ -³²P]АТФ (200 нМ) в 10 мкл буфера с 50 мМ Трис-НСl (рН 7.6), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ DTT, 100 мкМ спермидина в течение 30 мин при 37°C. Непрореагировавший [γ -³²P]АТФ удаляли из смеси, используя электрофорез в 20%-ном ПААГ, содержащем 7 М мочевины, с последующим извлечением олигонуклеотида из геля. Растворы ДНК-дуплексов готовили смешиванием эквимольных количеств комплементарных олигонуклеотидов. При приготовлении составных ДНК-дуплексов использовали 10%-ный избыток 13- и 15-звенных олигонуклеотидов по отношению к 45-звенной ДНК-матрице. Смесь нагревали до 80°C и медленно охлаждали до комнатной температуры. В раствор флуоресцентно-меченных ДНК-дуплексов добавляли MgCl₂ до концентрации 5 мМ для повышения стабильности ДНК-дуплексов. Готовые ДНК-дуплексы хранили при 4°C.

Кинетика обмена ADP в АТРазных доменах белка MutS и его мутантных форм. Обмен ADP на АТФ в АТРазных доменах белка MutS изучали с использованием МАНТ-ADP. Кинетику изменения интенсивности флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (США). Измерения проводили при комнатной температуре в кварцевой кювете (Hellma, Германия). Реакционная смесь представляла собой буфер А (25 мМ HEPES (рН 7.5), 125 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂) с 0.05% (v/v) Tween-20 и 500 нМ МАНТ-ADP, а также содержала (или не содержала) ДНК-дуплекс (VII) (концентрация 500 нМ). Добавляли MutS (или мутантную форму белка) в концентрации 500 нМ (в расчете на мономер). Зависимость

интенсивности флуоресценции от времени измеряли при $\lambda_{\text{возб.}} = 355$ нм и $\lambda_{\text{исп.}} = 448$ нм и напряжении детектора 600 В. После записи начального участка спектра (белок, связанный с МАНТ-ADP) в кювету добавляли ADP до концентрации 1 мМ, быстро перемешивали и продолжали запись спектра до выхода на плато. Суммарный объем смеси составлял 75 мкл. Измерения повторяли не менее трех раз.

Кривые обрабатывали с помощью программы GraphPad Prism[®] 5 (<http://www.graphpad.com>). Экспоненциальные участки аппроксимировали согласно уравнению, соответствующему кинетической схеме процесса:

$$I_t = (I_0 - I_\infty)e^{-kt} + I_\infty.$$

Во всех случаях коэффициент корреляции составлял >0.98.

Активация начальных этапов репарации "мисматчей" в ДНК. Процесс репарации, включая этап гидролиза "дочерней" цепи ДНК, наблюдали *in vitro* с использованием рекомбинантных белков MutS (дикого типа или описанных в данной работе мутантных форм), MutL и MutH. Для этого раствор рUC-MMR (25 нМ) инкубировали с MutS (400 нМ в расчете на мономер белка), а затем добавляли равный объем смеси белков MutL (400 нМ в расчете на мономер белка) и MutH (100 нМ), предварительно выдержанных с 1 мМ АТФ при 0°C. Реакцию проводили в 20 мкл в буфере А при 37°C. В интервале 1–10 мин отбирали аликвоты по 5 мкл, к которым добавляли 5 мкл раствора, содержащего 250 мМ EDTA, 50% глицерина и 0.1% красителя бромфенолового синего. Реакционные смеси анализировали методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле, содержащем бромид этидия. Фотографии гелей, полученные при облучении УФ-светом, обрабатывали с помощью программы GelAnalyser 2010A (<http://www.gelanalyzer.com>). Измеряли интенсивность зон, соответствующих ДНК с одноцепочечным разрывом.

Ковалентное связывание белка MutS с реакционноспособными ДНК-лигандами. "Кросслинкинг" мутантных форм MutS с различными модифицированными ДНК-дуплексами (I), (III)–(VI) проводили в буфере А, содержащем 1 мМ ADP. Концентрация мутантной формы MutS в расчете на мономер составляла 1 мкМ, концентрация ДНК-дуплекса – 5 мкМ. Продукты реакции разделяли в 6%-ном или 8%-ном денатурирующем SDS-ПААГ с 4%-ным концентрирующим слоем. При проведении реакций с ³²P-меченными фрагментами ДНК гель после электрофореза высушивали и закладывали в кассету BAS Cassette2 2340 с экраном, чувствительным к β -излучению. Электрофограммы получали с помощью прибора FLA-3000 (FujiFilm, Япония). Затем гель помещали в воду и окрашивали раствором кумасси G250 для визуализации белка. Выход конъюгата опре-

деляли денситометрически с использованием фотографий гелей, окрашенных раствором кумасси G250. Рассчитывали интенсивность зоны геля, соответствующей конъюгату, по отношению к суммарной интенсивности зон, содержащих белок в дорожке. Этот метод не позволяет получить точные данные о количестве вещества в той или иной зоне геля (ошибка ~10%), однако дает возможность проследить общую тенденцию.

Выделение ДНК-белковых конъюгатов методом эксклюзионной хроматографии. Конъюгаты мутантных форм MutS(A469C) и MutS(N497C) с 2-пиридилдисульфид-содержащим ДНК-дуплексом (I) выделяли с использованием системы для ВЭЖХ Elite LaChrom VWR-Hitachi L-2455 (Япония). Перед нанесением на колонку препарат конъюгата центрифугировали 15 мин при 12000 об./мин. Использовали хроматографическую колонку размерами 10 × 300 мм с сорбентом Superdex200 TM (GE Healthcare Life Sciences, США). Колонку уравновешивали буфером Б (10 мМ HEPES (pH 7.9), 1 мМ EDTA, 200 мМ KCl, 10% (v/v) глицерина), который затем служил элюентом. Объем наносимого на колонку препарата составлял 100 мкл, расход элюента – 0.5 мл/мин. За ходом разделения следили по поглощению при 260, 280, 490 и 590 нм. Рассчитывали значения A_{260}/A_{280} для элюата. При элюции белка с колонки соотношение A_{260}/A_{280} составляло 0.7, при элюции конъюгата – 1.4, при элюции ДНК – 1.9. Концентрацию белка во фракциях определяли на приборе NanoDrop ND-1000 (PegLab, США). Гомогенность конъюгата анализировали в 6%-ном SDS-ПААГ. Гель окрашивали раствором кумасси G250 или раствором солей серебра с использованием набора The PageSilver™ (Thermo Fisher Scientific, США). Раствор очищенного конъюгата хранили при 0°C. Все эксперименты с конъюгатом проводили в течение 4 ч после выделения, т.к. далее активность белка значительно уменьшалась.

Измерение анизотропии и сигнала FRET в конъюгате MutS–ДНК. Раствор конъюгата MutS(A469C)–ДНК (50 нМ) в 100 мкл буфера А с 0.05% (v/v) Tween-20 помещали в кварцевую кювету и измеряли сигнал флуоресценции и анизотропию для двух флуорофоров – Alexa-488 (донор) и Alexa-594 (акцептор) – на спектрофлуориметре FluoroMax-4 (Horiba, Япония) при комнатной температуре. Затем к раствору добавляли АТФ до конечной концентрации 1 мМ, инкубировали 5 мин при комнатной температуре и проводили измерения повторно. В контрольном эксперименте измеряли интенсивность флуоресценции не зафиксированного ковалентно комплекса MutS–ДНК. Концентрации белка и ДНК в этом случае составляли 20 и 200 нМ соответственно. Флуорофоры возбуждали при длинах волн 470 и 575 нм (Alexa-488 и Alexa-594 соответственно). При записи спектров флуоресценции излучение детектировали в диапазоне длин волн 490–800 или 595–800 нм для доно-

ра и акцептора соответственно. Максимальное значение интенсивности флуоресценции измеряли при 535 нм для Alexa-488 и 620 нм для Alexa-594. Для измерения FRET препарат облучали светом с длиной волны 470 нм, детектировали испускание флуоресценции в диапазоне 500–800 нм (при 525 нм наблюдался максимум испускания Alexa-488, при 625 нм – максимум испускания Alexa-594, F_{\max}). Также образец возбуждали при 575 нм и детектировали испускание флуоресценции Alexa-594 в диапазоне 600–800 нм (для вычисления значения *Red*, интенсивности испускания Alexa-594 при 625 нм). В ходе экспериментов вычисляли $\Delta(F_{\max}/Red)$.

Расстояние от аминокислоты до ДНК (от первого углеродного атома боковой цепи аминокислотного остатка (СВ) до атома С2' ближайшего нуклеотида в ДНК) в комплексах MutS–ДНК (PDB: 1W7A, 10N7 и 1E3M) определяли в программе Jmol [43] с помощью команды “measure”.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на примере двух мутантных форм MutS нами продемонстрировано, что ДНК-фрагменты с 2-пиридилдителио группой при С2'-атоме могут быть использованы для фиксации белка MutS через остаток цистеина, сближенный с ДНК. Высокого выхода ДНК-белкового конъюгата с последующим его выделением в количествах, необходимых для дальнейшего анализа активности MutS, удалось достигнуть благодаря следующим факторам: 1) химической природе реакционноспособной группировки, 2) правильно подобранному месту модификации в ДНК, 3) дополнительной детекции белково-нуклеинового конъюгата в ходе эксклюзионной хроматографии за счет наличия флуорофоров в ДНК. Установлено, что MutS в составе конъюгата сохраняет способность изменять свою конформацию и конформацию ДНК. Таким образом, предложенный нами дизайн конъюгатов с функционально активным белковым компонентом может быть использован для изучения последовательности и характера перестроек в белково-нуклеиновых комплексах.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность доктору Р. Хайнцу (Институт биохимии, Университет Ю. Либиха, г. Гиссен, Германия) за помощь в проведении экспериментов по “кросслинкингу”.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке грантов Немецкого научно-исследовательского общества (ННИО) и РФФИ-ННИО (проекты GRK 1384 и № 14-04-91343), реализуемых в рамках образовательной программы

“Международные исследовательские группы с участием молодых ученых”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dolinnaya N., Zubin E., Kubareva E., Zatsepina T., Oretskaya T. // *Curr. Org. Chem.* 2009. V. 13. P. 1029–1049. <https://doi.org/10.2174/138527209788680745>
2. Ilna E.S., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. // *Biochimie.* 2018. V. 150. P. 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.04.027>
3. Ide H., Nakano T., Salem A.M.H., Shoukamy M.I. // *DNA Repair.* 2018. V. 71. P. 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.024>
4. Stasińska A.R., Putaj P., Chmielewski M.K. // *Bioorg. Chem.* 2020. V. 95. P. 103518. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103518>
5. Wong S.S., Jameson D.M. // *Chemistry of Protein and Nucleic Acid Cross-Linking and Conjugation*, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, 2011. 622 pp.
6. Khodyreva S., Lavrik O. // *DNA Repair (Amst).* 2020. V. 90. P. 102847. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102847>
7. Hyjek-Składanowska M., Stasińska A.R., Napiórkowska-Gromadzka A., Bartłomiejczak A., Seth P.P., Chmielewski M.K., Nowotny M. // *Bioorganic Med. Chem.* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115741>
8. Friedhoff P., Manelyte L., Giron-Monzon L., Winkler I., Groothuizen F.S., Sixma T.K. // *Methods in Enzymology.* 2017. V. 592. P. 77–101. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.03.025>
9. Monakhova M., Ryazanova A., Hentschel A., Viryasov M., Oretskaya T., Friedhoff P., Kubareva E. // *J. Chromatogr. A.* 2015. V. 1389. P. 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.045>
10. Monakhova M., Ryazanova A., Kunetsky V., Li P., Shilkin E., Kisil O., Rao D.N., Oretskaya T., Friedhoff P., Kubareva E. // *Biochimie.* 2020. V. 171–172. P. 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.02.004>
11. Metelev V.G., Kubareva E.A., Vorob'eva O.V., Romanenkov A.S., Oretskaya T.S. // *FEBS Lett.* 2003. V. 538. P. 48–52. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00122-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00122-4)
12. Воробьева О.В., Романенков А.С., Метелев В.Г., Карягина А.С., Лаврова Н.В., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. // *Молекуляр. биология.* 2003. Т. 37. С. 906–915. [Vorob'eva O.V., Romanenkov A.S., Metelev V.G., Kariagina A.S., Lavrova N.V., Oretskaya T.S., Kubareva E.A. // *Mol. Biol. (Mosk.).* 2003. V. 37. P. 906–915.]
13. Романенков А.С., Кисиль О.В., Зацепин Т.С., Ямскова О.В., Карягина А.С., Метелев В.Г., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. // *Биохимия.* 2006. Т. 1. С. 1648–1658. [Romanenkov A.S., Kisil O.V., Zatsepina T.S., Yamskova O.V., Karyagina A.S., Metelev V.G., Oretskaya T.S., Kubareva E.A. // *Biochemistry (Mosc.).* 2006. V. 71. P. 1341–1349.] <https://doi.org/10.1134/S0006297906120091>
14. Абросимова Л.А., Самсонова А.А., Перевязова Т.А., Юнусова А.К., Артюх Р.И., Романова Е.А., Железная Л.А., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. // *Молекуляр. биология.* 2020. Т. 54. С. 599–610. [Abrosimova L.A., Samsonova A.A., Perevyazova T.A., Yunusova A.K., Artyukh R.I., Romanova E.A., Zheleznaya L.A., Oretskaya T.S., Kubareva E.A. // *Mol. Biol. (Mosk.).* 2020. V. 54. P. 599–610.] <https://doi.org/10.1134/S0026893320040020>
15. Metelev V., Romanenkov A., Kubareva E., Zubin E., Polouchine N., Zatsepina T., Molochkov N., Oretskaya T. // *IUBMB Life.* 2006. V. 58. P. 654–658. <https://doi.org/10.1080/15216540600981750>
16. Heinze R.J., Sekerina S., Winkler I., Biertümpfel C., Oretskaya T.S., Kubareva E., Friedhoff P. // *Mol. Biosyst.* 2012. V. 8. P. 1861–1864. <https://doi.org/10.1039/c2mb25086a>
17. Cristóvão M., Sisamakís E., Hingorani M.M., Marx A.D., Jung C.P., Rothwell P.J., Seidel C.A.M., Friedhoff P. // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. P. 5448–5464. <https://doi.org/10.1093/nar/gks138>
18. Warren J.J., Pohlhaus T.J., Changela A., Iyer R.R., Modrich P.L., Beese L.S. // *Mol. Cell.* 2007. V. 26. P. 579–592. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.018>
19. Biswas I., Hsieh P. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 13355–13364. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.20.13355>
20. Natrajan G. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. 4814–4821. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg677>
21. Перевозчикова С.А., Романова Е.А., Орецкая Т.С., Фридрих П., Кубарева Е.А. // *Acta Naturae.* 2013. Т. 5. С. 18–35. [Perevoztchikova S.A., Romanova E.A., Oretskaya T.S., Friedhoff P., Kubareva E.A. // *Acta Naturae.* 2013. V. 5. P. 17–34.] <https://doi.org/10.32607/20758251-2013-5-3-17-34>
22. Putnam C.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2020. V. 117. P. 20351–20353. <https://doi.org/10.1073/pnas.2013560117>
23. Bhairosing-Kok D., Groothuizen F.S., Fish A., Dharadhar S., Winterwerp H.H.K., Sixma T.K. // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. P. 8888–8898. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz649>
24. Liu J., Hanne J., Britton B.M., Bennett J., Kim D., Lee J.-B., Fishel R. // *Nature.* 2016. V. 539. P. 583–587. <https://doi.org/10.1038/nature20562>
25. Perevoztchikova S.A., Trikin R.M., Heinze R.J., Romanova E.A., Oretskaya T.S., Friedhoff P., Kubareva E.A. // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e104963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104963>
26. Hura G.L., Tsai C.-L., Claridge S.A., Mendillo M.L., Smith J.M., Williams G.J., Mastroianni A.J., Alivisatos A.P., Putnam C.D., Kolodner R.D., Tainer J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. 17308–17313. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308595110>

27. Heinze R.J., Giron-Monzon L., Solovyova A., Elliot S.L., Geisler S., Cupples C.G., Connolly B.A., Friedhoff P. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. P. 4453–4463. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp380>
28. Kramer B., Kramer W., Fritz H.-J. // *Cell.* 1984. V. 38. P. 879–887. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90283-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90283-6)
29. Lamers M.H., Georgijevic D., Lebbink J.H., Winterwerp H.H.K., Agianian B., de Wind N., Sixma T.K. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 43879–43885. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406380200>
30. Lebbink J.H.G., Georgijevic D., Natrajan G., Fish A., Winterwerp H.H.K., Sixma T.K., de Wind N. // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 409–419. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600936>
31. 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. <https://doi.org/10.1038/35037523>
32. Groothuizen F.S., Fish A., Petoukhov M.V., Reumer A., Manelyte L., Winterwerp H.H.K., Marinus M.G., Lebbink J.H.G., Svergun D.I., Friedhoff P., Sixma T.K. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. P. 8166–8181. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt582>
33. Bjornson K.P., Modrich P. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 18557–18562. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301101200>
34. Manelyte L., Urbanke C., Giron-Monzon L., Friedhoff P. // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. P. 5270–5279. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl489>
35. Feng G., Winkler M.E. // *Biotechniques.* 1995. V. 19. P. 956–965.
36. Lebbink J.H.G., Fish A., Reumer A., Natrajan G., Winterwerp H.H.K., Sixma T.K. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 13131–13141. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.066001>
37. Ede N.J., Tregear G.W., Haralambidis J. // *Bioconjug. Chem.* 1994. V. 5. P. 373–378. <https://doi.org/10.1021/bc00028a016>
38. Qiu R., Sakato M., Sacho E.J., Wilkins H., Zhang X., Modrich P., Hingorani M.M., Erie D.A., Weninger K.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. P. 10914–10919. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505655112>
39. LeBlanc S.J., Gauer J.W., Hao P., Case B.C., Hingorani M.M., Weninger K.R., Erie D.A. // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. P. 10782–10795. <https://doi.org/10.1093/nar/gky865>
40. Groothuizen F.S., Winkler I., Cristóvão M., Fish A., Winterwerp H.H., Reumer A., Marx A.D., Hermans N., Nicholls R.A., Murshudov G.N., Lebbink J.H., Friedhoff P., Sixma T.K. // *Elife.* 2015. V. 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.06744>
41. Hao P., LeBlanc S.J., Case B.C., Elston T.C., Hingorani M.M., Erie D.A., Weninger K.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. P. 17775–17784. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918517117>
42. Liu J., Lee R., Britton B.M., London J.A., Yang K., Hanne J., Lee J.-B., Fishel R. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 5294. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13191-5>
43. Herráez A. // *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2006. V. 34. P. 255–261. <https://doi.org/10.1002/bmb.2006.494034042644>

DNA with a 2-Pyridyldithio Group at the C2' Atom – a Promising Tool for the Crosslinking of the MutS Protein which Keeps Its Functional Activity

S. A. Perry*, E. A. Kubareva*, M. V. Monakhova*., #, R. M. Trikin**, E. M. Kosaretskiy*, E. A. Romanova*, V. G. Metelev*, P. Friedhoff***, and T. S. Oretskaya*

#Phone: +7 (495) 939-31-48; e-mail: monakhovamv@gmail.com

*Lomonosov Moscow State University, A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Department of Chemistry and Department of Bioengineering and Bioinformatics, Leninskie gory 1, Moscow, 119991 Russia

**I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Trubetskaya 8, str. 2, Moscow, 119991 Russia

***Institute for Biochemistry, FB 08, Justus Liebig University, Heinrich-Buff-Ring 58, Giessen, D-35392 Germany

Non-covalent interactions between DNA and proteins are vital for the cells. DNA-protein crosslinking may occur due to various endogenous and exogenous factors, as well as chemotherapeutic agents, and often affects the performance of DNA-binding proteins. Oligodeoxyribonucleotides with a reactive group can serve as a tool to investigate the structure and mechanism of action of DNA-binding proteins. Here, we report the crosslinking of MutS – the sensor protein of DNA mismatch repair (MMR) in *Escherichia coli* – via the protein's cysteine. For this, we used DNA that harbours a 2'-deoxy-2'-[3-(2-pyridyldithio)propionamide] group as part of a nucleoside at a given position, and two fluorophores. The proposed DNA duplex consists of complementary oligonucleotides with breaks in the top and bottom strands. This feature allows to introduce the reactive group at different positions. Because of this, it is necessary to synthesise only the central fragment of the DNA with a minimal length. The MutS–DNA conjugate was obtained by thiol-disulphide exchange with quantitative yield and separated from the unreacted DNA by size exclusion chromatography. Fluorescence resonance energy transfer was used to show that MutS remained functionally active within the conjugate, since the protein was able to change its conformation and DNA conformation.

Keywords: reactive DNA, DNA-protein crosslinking, thiol-disulphide exchange, mismatch repair (MMR), MutS