

УДК 577.217.5

## ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА БЕЛКА muRif1 МЕЧЕННОГО МВР С G-КВАДРУПЛЕКСАМИ ДНК С ПОМОЩЬЮ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

© 2021 Н. Ghadiri<sup>1</sup>, S. Alavi<sup>2</sup>, B. Dabirmanesh<sup>1</sup>, and K. Khajeh<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran; E-mail: Khajeh@modares.ac.ir

<sup>2</sup> Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Поступила в редакцию 11.11.2020

После доработки 06.06.2021

Принята к печати 07.06.2021

Rap1-взаимодействующий фактор 1 (Rif1) является одним из ключевых участников временной регуляции репликации, специфичной для каждого типа клеток. Белок Rif1 состоит из N-концевого и C-концевого доменов, разделённых внутренне неупорядоченной областью. Было высказано предположение, что обе N- и C-концевые области Rif1 могут связываться с ДНК, обнаруживая наибольшее сродство к крестообразным структурам ДНК. В настоящей работе C-концевой домен мышинового Rif1, связанный с мальтозо-связывающим белком (МВР-muRif1-CTD), был экспрессирован в растворимом виде и очищен. Биологическая активность очищенного белка была исследована методами анализа сдвига электрофоретической подвижности (EMSA) и поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Результаты, полученные в работе, показывают, что МВР-muRif1-CTD связывает G-квадруплекс (G4) с высокой аффинностью ( $K_D$  19,0 ± 0,8 нМ), как и предполагалось ранее. Это исследование является первым шагом в изучении взаимодействия МВР-Profinity eXact-muRif1-CTD и G4 с помощью SPR.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** мышинный Rap1-взаимодействующий фактор 1 (muRif1), поверхностный плазмонный резонанс, мальтозо-связывающий белок (МВР), G-квадруплекс (G4), анализ сдвига электрофоретической подвижности.

DOI: 10.31857/S0320972521070113

### ВВЕДЕНИЕ

Репликация генома эукариотов происходит согласно особому временному порядку, специфичному для каждого типа клеток [1]. Эволюционно-консервативный белок, Rap1-взаимодействующий фактор 1 (Rif1), был изначально обнаружен в почкующихся дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* как компонент теломерного комплекса, участвующего в регуляции длины теломер [2, 3]. Так как Rif1 вовлечён во многие метаболические пути поддержания целостности генома, его рассматривают как ключевой регулятор инициации репликации, функции которого сохранились на пути эволюции от дрожжей до человека [4–6]. Анализ структуры белка Rif1 по-

казывает, что она включает три области: N-концевой домен (NTD), C-концевой домен (CTD) и внутренне неупорядоченную область (IDP) между ними. Считается, что NTD и CTD могут участвовать во взаимодействиях ДНК–белок и белок–белок. NTD содержит  $\alpha$ -спиральный мотив HEAT-повторов, который необходим для привлечения мышинового Rif1 (muRif1) к месту двухцепочечного разрыва в ДНК [7]. Неструктурированный CTD включает три субдомена, из которых только третий является неконсервативным [8–10], а второй субдомен предположительно имеет участок связывания крестообразной ДНК [9–11]. Согласно предыдущим работам, Rif1 из делящихся дрожжей и клеток млекопитающих связываются с G-квадруплексами (G4) [12, 13]. Более того, предполагается, что этот белок мультимеризуется посредством взаимодействий между CTD; однако окончательная организация субдоменов Rif1 млекопитающих ещё не установлена [9, 14].

Связывание muRif1-CTD с G4-структурами и со структурами, не образующими G4, было детально изучено в работах Moriyama et al. [13] и Masai et al. [15], где авторы исследовали связы-

Принятые сокращения: МВР – мальтозо-связывающий белок (maltose binding protein); КД – круговой дихроизм; CTD – C-концевой домен; NTD – N-концевой домен; EMSA – анализ сдвига электрофоретической подвижности (electrophoretic mobility shift assay); G4 – G-квадруплекс; Rif1 – Rap1-взаимодействующий фактор 1 (Rap1-interacting factor 1); SPR – поверхностный плазмонный резонанс (surface plasmon resonance).

\* Адресат для корреспонденции.

вание различных последовательностей, способных образовывать G4-структуры с Rif1, используя метод анализа сдвига электрофоретической подвижности (EMSA или gel shift assay). Авторы установили, что последовательность T<sub>6</sub>G<sub>24</sub> (G4) связывалась лучше всего с Rif1 из дрожжей и клеток млекопитающих, экспрессируемых в эукариотических системах [13, 15]. Более того, они проанализировали влияние различных конкурентов связывания Rif1 с T<sub>6</sub>G<sub>24</sub>. Оказалось, что структурированная G4-последовательность (T<sub>6</sub>G<sub>24</sub>) связывалась лучше, чем все другие исследованные структуры ДНК [13].

В недавних работах было установлено, что существует ассоциация между Rif1 и такими заболеваниями человека, как рак и некоторые наследственные болезни; соответственно, этот белок может рассматриваться как потенциальный биомаркер [16–18]. Для того, чтобы выяснить биологическую активность целевого белка, необходимо идентифицировать партнёров, с которыми этот белок взаимодействует и определить аффинность этого взаимодействия, что поможет в поисках подходящего партнёра или потенциального лекарственного препарата, способного предотвратить функционирование целевого белка или помешать ему исполнять свои нормальные функции [19].

Взаимодействие между различными типами биологических молекул, представляющих клинический интерес, может быть исследовано с помощью различных методов, основанных на плазмонном резонансе [19]. Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) — это одна из наиболее универсальных технологий, применяемых для создания биосенсоров в различных областях науки. Биосенсоры, основанные на SPR, демонстрируют превосходные аналитические характеристики, не требуют введения меток и позволяют отслеживать взаимодействия в реальном времени [20].

В данной работе muRif1-CTD, меченый MBP и Profinity eXact™, был экспрессирован в растворимой форме, и его биологическая активность оценивалась с помощью EMSA и более точных методов SPR. В будущем мы планируем сосредоточиться на более детальном исследовании этого взаимодействия, используя другие возможности SPR.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Дизайн muRif1-CTD конструкций и клонирование.** Ген *muRif1-CTD* был клонирован с помощью ПЦР, используя двойную рестрикцию, и вставлен в вектор pPAL («Bio-Rad», США) с

меткой Profinity eXact™ на N-конце. Эта конструкция была использована для химической трансформации компетентных клеток *Escherichia coli* DH5α. Рекомбинантные клоны были отобраны на чашках с агаром Luria Bertani (LB), содержащим ампициллин (30 мкг/мл), и проанализированы с помощью двойной рестрикции и секвенирования конструкции после выделения плазмиды. Такая же процедура была использована для химической трансформации компетентных клеток *E. coli* BL21 (DE3).

Для конструирования нового вектора экспрессии MBP-Profinity eXact tag-muRif1-CTD ген *muRif1-CTD* был амплифицирован, подвергнут двойной рестрикции и лигирован в вектор pMXB10 («New England Biolabs», США). Затем этот вектор был подвергнут двойной рестрикции теми же ферментами, и 5 мкл полученного раствора были использованы для химической трансформации компетентных клеток *E. coli* DH5α. Позитивные клоны были отобраны на чашках с LB-агаром, содержащих 30 мкг/мл ампициллина. Наличие рекомбинантных клонов было подтверждено с помощью ПЦР, двойной рестрикции и секвенирования.

**Очистка белка MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD.** Анализ экспрессии белка и степени его очистки проводили с помощью денатурирующего электрофореза (SDS-PAGE) по Лэммли [21]. Подробный протокол экспериментов и результаты очистки приведены на рис. S1 и S2 в Приложении). Экспрессию белка инициировали 1 mM IPTG при 18 °C в течение 20 ч, и полученные клеточки были использованы для очистки белка.

Конструкция MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD содержит в своём составе две метки на N-конце, Profinity eXact и мальтозо-связывающий белок (MBP). Соответственно, экспрессированный белок может быть очищен либо с использованием колонки Profinity eXact, либо на амилозной смоле. Описание первого метода приведено ниже, второй метод был заменён на колонку, заполненную рисовой мукой или цельным рисовым зерном.

Очистку белка, основанную на Profinity eXact-метке, проводили путём уравнивания колонки (считая агароза Superflow™ («Bio-Rad Laboratories», США), несущая конъюгированный мутантный субтилизин) буфером, использованным для лизиса клеток (100 mM фосфат натрия, pH 7,4) со скоростью потока 1 мл/мин. В буфере, используемом для связывания, не должно быть хлорид-иона, чтобы предотвратить расщепление целевой белковой метки на этапе загрузки лизата, поэтому хлорид натрия был за-

менён на ацетат натрия. После загрузки колонку промывали десятью свободными объёмами вышеупомянутого буфера, чтобы удалить неспецифически-связанные примесные белки. После промывки целевой белок был элюирован посредством инкубации колонки с раствором 100 мМ фторида натрия и 100 мМ фосфата натрия, pH 7,4, в течение 30 мин при комнатной температуре. При этих условиях протеаза проводила контролируемое расщепление и удаление метки из слитого белка, что позволило элюировать очищенный белок без метки. Profinity eXact-колонка была регенерирована с помощью 0,1 М фосфорной кислотой ( $H_3PO_4$ ) путём удаления расщеплённой метки Profinity eXact с фермента. Все фракции были собраны и проанализированы с помощью денатурирующего электрофореза. Наличие полосы белка с молекулярной массой ~38 кДа (29,7 кДа – 270 а.о. в muRif1-CTD и 8 кДа – ~70 а.о. в Profinity eXact-метке) указывает на экспрессию белка Profinity eXact-muRif1-CTD.

Аффинная очистка, основанная на связывании белка с MBP, была проведена путём уравнивания 10-мл колонки, заполненной либо рисом (предварительно замоченным в воде на 2 ч), либо рисовой мукой, буфером, использованным для лизиса (50 мМ фосфат калия, 500 мМ NaCl, pH 7,4), и пропускания раствора под действием силы тяжести. Такая аффинная очистка может выполняться либо в периодическом, либо в колоночном формате, но без использования перистальтического насоса, так как создаваемое насосом давление может слишком уплотнить носитель и заблокировать колонку из-за присутствия очень мелких частиц в рисовой муке. Целевой белок элюировали с колонки 10 мМ раствором мальтозы. Все фракции были проанализированы с помощью денатурирующего электрофореза в ПААГ. Элюирующий буфер был заменён на связывающий буфер для анализа сдвига электрофоретической подвижности с помощью центрифужных фильтров Amicon-10 или Microcon (предел отсечения по массе – 10 кДа) («Millipore», США).

**Изучение образования G4.** Синтезированную и очищенную с помощью ВЭЖХ последовательность ( $T_6G_{24}$ ) («Bio Basic Inc.», Канада), которая способна образовывать G4-структуру, растворяли в воде для инъекций до конечной концентрации 100 мкМ и хранили при  $-20^\circ C$ . G4-структуру формировали, используя циклы тепловой денатурации-ренатурации. Предполагаемую последовательность структуры G4 (при концентрации 4 мкМ) денатурировали нагреванием при  $90^\circ C$  в течение 5 мин, затем разбавляли до концентрации 1 мкМ буфером, содержа-

щим 20 мМ Tris-HCl (pH 7,4) и 100 мМ KCl, и постепенно охлаждали до комнатной температуры в течение 2 ч [22, 23]. Образование G4-структуры отслеживалось по флуоресценции катиона 3,6-диметил-2-(4-диметиламинофенил) бензотиазолия (ThT) [22, 23]. Спектроскопия кругового дихроизма (КД) [24] была использована для подтверждения типа G4-структуры, образованной в этом процессе.

Концентрацию ThT определяли по поглощению водного раствора при 412 нм (принимая коэффициент экстинкции равным  $36\ 000\ M^{-1}\cdot cm^{-1}$ ), измеренного с помощью UV-Vis спектрофотометра Lambda 5 («Perkin Elmer», США). Готовили 5 мМ исходный раствор ThT с концентрацией 5 мМ. Затем при комнатной температуре готовили смесь ThT и олигонуклеотида с концентрациями 1 и 0,5 мкМ соответственно. Спектры флуоресценции были получены с помощью флуоресцентного спектрометра LS 55 («Perkin Elmer») в диапазоне 450–700 нм с шагом 2 нм и возбуждении при 425 нм. Наблюдалось образование сильно флуоресцирующего 1 : 1 комплекса с максимум эмиссии при 490 нм [22].

КД-спектры были получены с помощью Jasco J-715 спектрополяриметра («Jasco», Япония) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см при  $20^\circ C$ . Сканирование проводилось в диапазоне 220–320 нм со скоростью 200 нм/мин, шагом 1 нм и шириной полосы пропускания 1 нм. Концентрация ДНК была 4 мкМ. Для каждого эксперимента в среднем регистрировали два сканирования, спектр буфера (20 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 100 мМ KCl) вычитали из спектра образца, и данные корректировали на ноль при 320 нм. Этот эксперимент повторяли с HEPES-буфером (pH 7,4) вместо Tris-HCl, так как этот буфер использовался как связывающий буфер.

**Исследование взаимодействия белка с нуклеиновой кислотой с помощью анализа сдвига электрофоретической подвижности (EMSA) и поверхностного плазмонного резонанса (SPR).** Образцы белка в 25 мМ буферном растворе карбоната аммония, pH 8,8, содержащем 1 М KCl, были лиофилизированы, и анализ EMSA был проведён, используя радиоактивно меченный G4 (предоставлен Moriyama et al.) и очищенный белок, реконструированный в HEPES-КОН, согласно протоколу, описанному Moriyama et al. [13].

Взаимодействие MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD с иммобилизованным биотинилированным олигонуклеотидом G4 ( $T_6G_{24}$ ) исследовали с помощью двухканального прибора Xantec SR7500DC («XanTec Bioanalytics», Германия), оборудованного автоматической проточно-инъекционной системой. Изменения показателя

преломления представлены в микроединицах индекса преломления (мкRIU). В работе был использован SAD 200-сенсор («XanTec Bioanalytics») с поверхностью, модифицированной стрептавидином, позволяющий иммобилизовать биотинилированный G4.

Поверхность сенсора предварительно обрабатывали стрептавидином, а затем промывали 50 mM NaOH в течение 60 с, чтобы удалить слабосвязанный стрептавидин. Ранее сформированные структуры G4, биотинилированные по 5'-концу (см. Исследование образования G4) и подтвержденные КД-спектрами, иммобилизовали на поверхности сенсора и использовали как наживку в SPR-анализе. Для этой цели 25 нМ раствор биотинилированного G4 пропускали через проточную ячейку со скоростью 20 мкл/мин. Сигнал, показывающий полное связывание, был установлен на уровне 400 мкRIU. Несвязанный лиганд отмывали буфером (20 mM HEPES, pH 7,4, содержащий 1 mM EDTA и 1 M KCl).

Взаимодействие между G4-DNA (в качестве лиганда) и очищенным белком MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD исследовали для четырех различных концентраций при 25 °C (скорость потока 100 мкл/мин, 20 mM HEPES (pH 7,4), 1 mM EDTA и 0,5 M KCl с добавлением 0,005% (w/v) Tween-20). Температуру поверхности сенсора поддерживали 25 °C.

Стадию связывания ( $k_a$ ) наблюдали в течение 60 с, а стадию диссоциации ( $k_d$ ) наблюдали в течение не менее 120 с. Полная диссоциация комплекса достигалась пропуском буфера над поверхностью сенсора. Когда экспериментальные данные соответствовали ожидаемым квалификационным требованиям (где форма и диапазон интенсивности сигналов при различных концентрациях близки к теоретическому расчёту), результирующие сенсограммы, полученные из безлигандного эталонного канала, вычитались из сигналов, записанных в тестовом канале, чтобы учесть эффекты буфера и неспецифического фонового связывания. Полученная нормализованная сенсограмма была проанализирована с помощью программы Scrubber

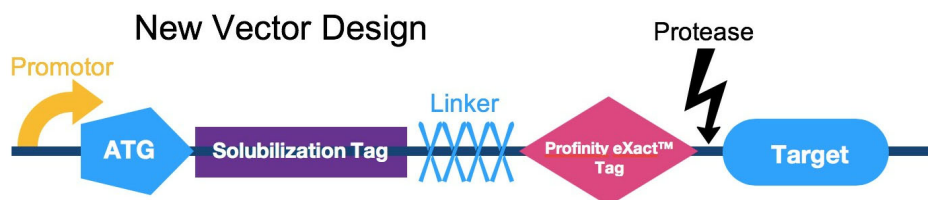
(«BioLogic Software Pty. Ltd.», Австралия) в соответствии с моделью 1 : 1 связывания лиганда Ленгмюра, и кинетические параметры связывания были рассчитаны с помощью этой программы на основании всех введенных экспериментальных данных. Специфичность биосенсора была оценена, используя в качестве контроля другой белок – меченый MBP (MBP-уриказа). Дополнительно в процессе каждого анализа проводили инъекции буфера без аналита, чтобы определить уровень фонового сигнала. Каждый анализ был проведен в трёх повторах, и все данные были введены в программу Scrubber для расчётов. Три повторные инъекции были сделаны в произвольном порядке.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

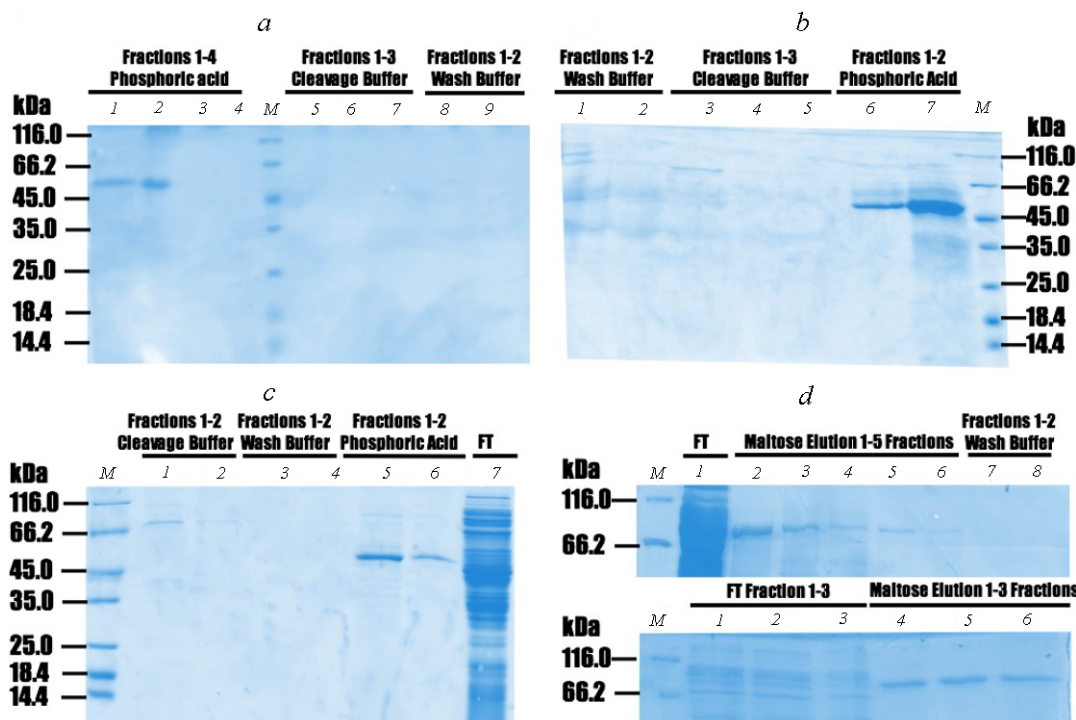
**Клонирование, экспрессия и очистка белка muRif1-CTD.** Результаты ПЦР, двойной рестрикции и секвенирования подтвердили успешное включение гена *muRif1-CTD* в векторы pPAL и pMXB10 без изменений или замен нуклеотидных оснований в последовательностях продуктов клонирования. На рис. 1 показано положение каждого элемента в векторе, содержащем целевой ген.

Экспрессию белка muRif1-CTD, меченного Profinity eXact, проводили при 37 °C в течение 3 ч в среде LB при постоянном перемешивании (220 об./мин). При этих условиях белки были экспрессированы в нерастворимой форме (рис. S1 в Приложении). Чтобы разрешить эту проблему, температуру инкубации при экспрессии понизили до 18 °C, а продолжительность экспрессии увеличили до 20 ч (рис. S1 в Приложении).

Введение MBP-метки перед Profinity eXact в pMXB10-векторе, понижение температуры до 18 °C и увеличение времени экспрессии до 20 ч привело к получению хорошего выхода растворимой формы белка (рис. S2 в Приложении). Ранее в работе Xu et al. [9] было показано, что введение MBP-метки способствовало солюби-



**Рис. 1.** Схематическое изображение недавно сконструированного прокариотического вектора, содержащего метки солюбилизации MBP и Profinity eXact™ на N-конце гена *muRif1-CTD*. Линкер введен между метками, чтобы облегчить расщепление Profinity eXact™-метки. (С цветными вариантами рисунков можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)



**Рис. 2.** Результаты очистки MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD на колонке Profinity eXact и колонке, заполненной рисом. *a* – Очистка MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD на колонке Profinity eXact с использованием фосфорной кислоты для смыва метки с колонки. М – Маркеры молекулярной массы. Дорожки: 1–4 – фракции 1–4 при элюировании фосфорной кислотой; 5–7 – фракции 1–3 при элюировании буфером для расщепления; 8 и 9 – последние фракции перед расщеплением. *b* – Введение 10% глицерина в расщепляющий буфер при очистке белка на колонке Profinity eXact. Дорожки: 1 и 2 – проточные фракции 1–2; 3–5 – фракции 1–3 при элюировании расщепляющим буфером, содержащим 10% глицерина; 6 и 7 – фракции 1–2 при элюировании фосфорной кислотой. Проточные фракции (FT). *c* – Введение 1 М NaCl в расщепляющий буфер при очистке на колонке Profinity eXact. Дорожки: 1 и 2 – фракции 1–2 при элюировании расщепляющим буфером, содержащим 1 М NaCl; 3 и 4 – фракции 1–2 при элюировании промывочным буфером непосредственно перед расщепляющим буфером; 5 и 6 – фракции 1–2 при элюировании фосфорной кислотой; 7 – проточная фракция. *d* – Очистка на колонке, заполненной рисом. Очистка на колонке, заполненной цельным рисовым зерном (верхняя панель); дорожки (слева направо): 1 – проточная фракция; 2–6 – фракции 1–5 при элюировании 10 мМ раствором мальтозы с колонки, заполненной цельным рисовым зерном; 7 и 8 – последние промывочные фракции с колонки, заполненной цельным рисовым зерном перед элюированием мальтозой. Очистка на колонке, заполненной рисовой мукой (нижняя панель); дорожки слева направо: 1–3 – проточные фракции 1–3; 4–6 – фракции при элюировании 10 мМ мальтозой с колонки, заполненной рисовой мукой

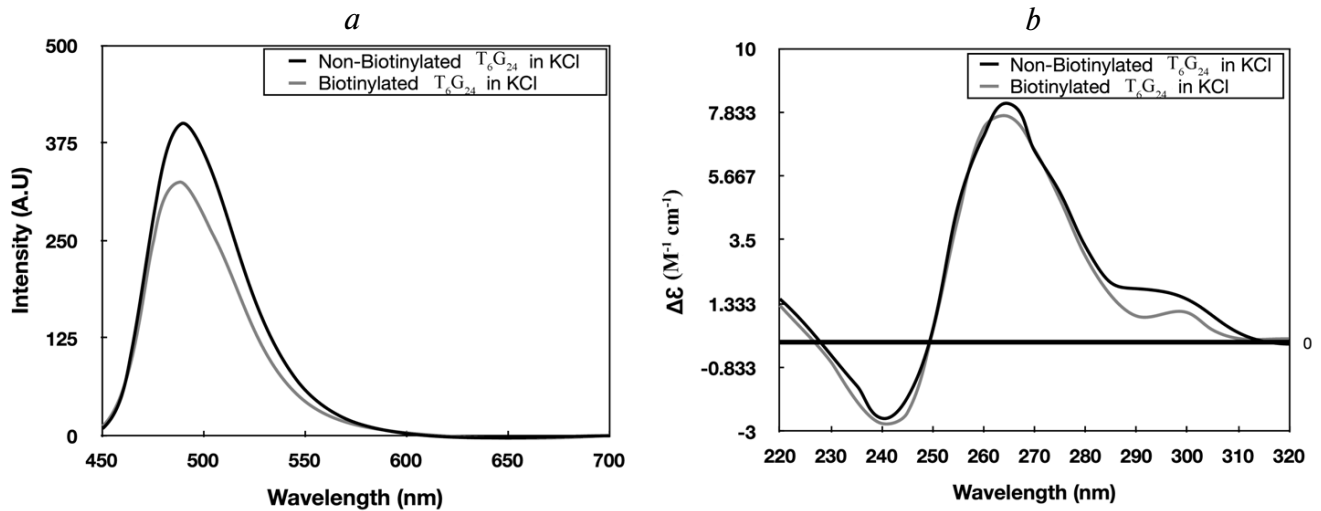
лизации С-концевого домена человеческого Rif1. Однако в работе было почёркнуто, что белок был не очень стабилен и склонен к агрегации. Это затрудняло его применение в аналитических и структурных методах, требующих значительных количеств монодисперсного очищенного белка [11]. В этом исследовании нам впервые удалось получить достаточное количество растворимого белка MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD. По проведённым оценкам, выход целевого белка в предлагаемом методе был 1 мг солилизованного белка на 100 мл культуральной среды. Далее в работе белок MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD будет обозначаться как MBP-muRif1-CTD.

Хроматография на колонке Profinity eXact привела к получению очищенного белка. Однако после расщепления детектировалась только

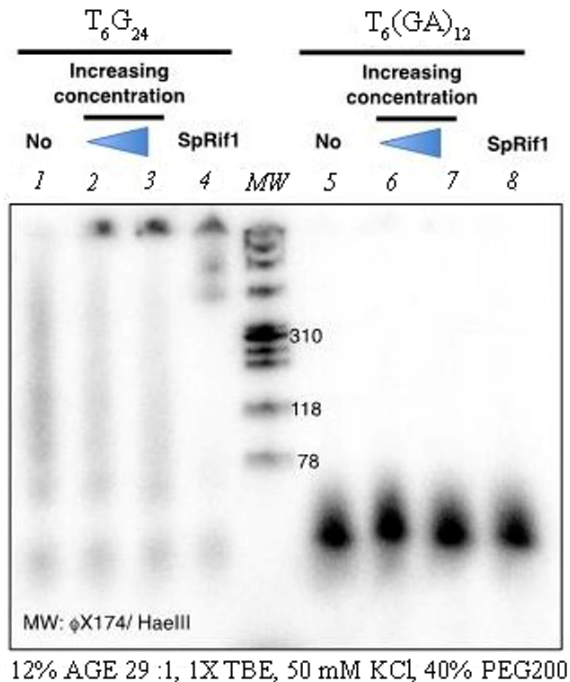
MBP-Profinity eXact-метка (50 кДа, рис. 2, *a*), что указывало на нестабильность белка без MBP (42 кДа), приводящую к его агрегации на колонке. Более того, введение 10% глицерина (рис. 2, *b*) и 1 М NaCl (рис. 2, *c*) в буфер для расщепления для стабилизации muRif1-CTD не привело к появлению в геле полосы, соответствующей muRif1-CTD.

Использование колонок, заполненных рисом и рисовой мукой, оказалось очень эффективными для очистки белка, меченного MBP, была получена чёткая полоса, соответствующая чистому белку MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD (рис. 2, *d*).

**Биологическая активность рекомбинантного MBP-меченного С-концевого домена Rif1 в реакции взаимодействия с G4.** После того, как достаточное количество растворимого белка было по-



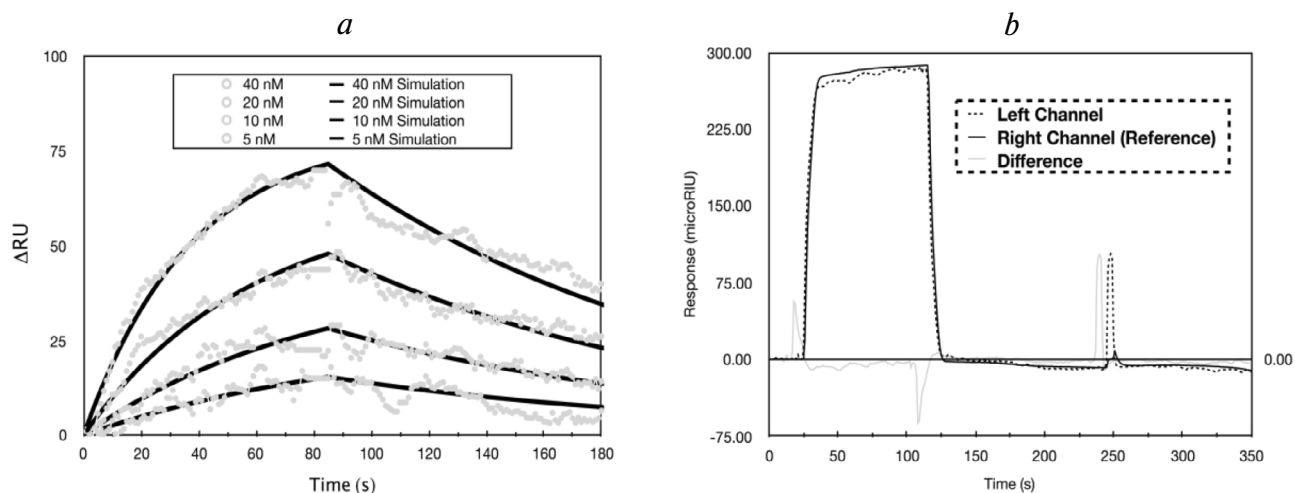
**Рис. 3.** Исследование образования G4-структуры биотинилированной (серая линия) и небитинилированной (черная линия) последовательности G4 ( $T_6G_{24}$ ) в присутствии 100 мМ KCl. *a* – Спектры флуоресценции. *b* – Спектры кругового дихроизма



**Рис. 4.** EMSA-анализ взаимодействий олигонуклеотида  $T_6G_{24}$  с параллельной G4-структурой и не способной образовывать G4-структуру с белком MBP-muRif1-CTD. Дорожки: 1 – G4 ( $T_6G_{24}$ ) в присутствии связывающего буфера без белка; 2 – G4 с 5 мкг/мл белка; 3 – G4 с 10 мкг/мл белка; 4 – G4 с SpRif1 [*Schizosaccharomyces pombe* Rif1, который, как было показано ранее, связывается с  $T_6G_{24}$  (G4)], MW – Маркеры; 5 – олигонуклеотид  $T_6(GA)_{12}$ , не способный образовывать G4-структуры в связывающем буфере без белка; 6 –  $T_6(GA)_{12}$ , не способный образовывать G4-структуру с 5 мкг/мл белка; 7 –  $T_6(GA)_{12}$ , не способный образовывать G4-структуру с 10 мкг/мл белка; 8 –  $T_6(GA)_{12}$ , не способный образовывать G4-структуру с SpRif1. Размазывание полосы наблюдаемое для G4, вероятно, связано с олигомеризацией последовательности G4 [13]

лучено, мы изучили процесс сворачивания последовательности G4. Ранее было установлено, что ThT связывается преимущественно с параллельными G4-структурами [22], служащими в качестве флуоресцентного светового зонда, который можно использовать для распознавания структуры сформированного G4. Мы обнаружили увеличение флуоресценции при 490 нм в растворе, содержащем ThT и последовательность  $T_6G_{24}$ , свернутую в присутствии KCl, что указывало на образование G4-структуры (рис. 3, *a*). В качестве контроля спектры флуоресценции ThT в присутствии и отсутствии KCl также были получены (рис. S3 в Приложении). Для этой цели был использован раствор образца G4 (4 мкМ). Мы также включили контроли (только ThT) и оценили влияние KCl на интенсивность флуоресценции ThT (рис. S3 в Приложении). Чтобы подтвердить тип G4-структуры, образовавшейся в присутствии KCl, были получены КД-спектры. Полученные спектры КД последовательности G4 ( $T_6G_{24}$ ) имели положительную полосу ~260 нм и отрицательную полосу ~240 нм, что указывало на образование параллельной структуры G4 в присутствии KCl.

EMSA был проведён, чтобы определить функциональность и специфичность связывания очищенного белка со сформированной структурой G4 перед тем, как проводить SPR-исследование. Результаты EMSA показали, что MBP-muRif1-CTD, экспрессированный в *E. coli*, может эффективно связываться с радиоактивно меченным G4. Интенсивные полосы меченных G4 наблюдались на старте геля, показывая, что G4 связываются с MBP-muRif1-



**Рис. 5.** Анализ взаимодействий с помощью поверхностного плазмонного резонанса. *a* – Сенсограмма взаимодействия между иммобилизованной биотинилированной G4-структурой ( $T_6G_{24}$ ) и очищенной конструкцией C-концевого домена MBP-Profinity eXact-muRif1, используемой в качестве аналита. Экспериментальные данные для различных концентраций аналита (40, 20, 10, 5 нМ) представлены серыми точками, а расчётные кривые для модели связывание лиганда Ленгмюра 1 : 1 – черными линиями. *b* – Сенсограмма взаимодействия контрольного белка (уриказы, меченая MBP) с иммобилизованной биотинилированной G4-структурой ( $T_6G_{24}$ ), показывающая сигналы от правого и левого канала и их разницу

CTD (рис. 4). С другой стороны, полоса, соответствующая последовательности  $T_6(GA)_{12}$ , которая не способна образовывать G4-структуру и связываться с MBP-muRif1-CTD не сдвигалась (рис. 4).

Мы также исследовали сохраняется ли G4-структура после связывания с MBP-muRif1-CTD при тех же условиях связывания, которые использовались для анализа сдвига геля. Спектры КД и флуоресценции подтвердили, что G4-структура сохраняется после связывания с MBP-muRif1-CTD (рис. S3 и S4 в Приложении). Следовательно, экспрессированный MBP-muRif1-CTD был способен специфически связываться со структурой  $T_6G_{24}$ , и взаимодействие этих двух молекул может быть далее исследовано с помощью SPR.

**Кинетические параметры взаимодействия Rif1 CTD с G4.** На следующем этапе функциональность очищенного MBP-muRif1-CTD была проанализирована с помощью SPR, используя четыре различные концентрации белка в проточном буфере (40, 20, 10, и 5 нМ). Кривые ассоциации и диссоциации из трёх независимых

экспериментов были смоделированы с использованием классической модели связывания лиганда Ленгмюра в соотношении 1 : 1 (рис. 5). Рассчитанные кинетические константы приведены в таблице.

Величина SPR-сигнала при наименьшей концентрации белка (2,5 нМ) была на уровне предела количественного определения для используемого прибора (10 мкRIU); поэтому эта концентрация не была включена в расчёты и не использовалась в нашем анализе. Как указано в таблице, величина  $K_D$  была  $19,0 \pm 0,8$  нМ, а наблюдаемая величина  $R_{max}$  была  $111 \pm 2$ . Остаточное стандартное отклонение рассчитывали путём вычитания значений аппроксимирующей кривой из экспериментальных значений, введенных в программу (данные представлены в таблице). Контрольный белок, меченный MBP, не показал никакого связывания, так как не было разницы между сигналами от канала сравнения и канала с иммобилизованным лигандом. Чтобы исключить объёмный эффект, измерение  $R_{maxOBS}$  проводилось через 15 с после окончания инъекции аналита.

Кинетические параметры взаимодействия MBP-muRif1-CTD с G4

Кинетические параметры	$k_a$ ( $M \cdot c^{-1}$ )	$k_d$ ( $c^{-1}$ )	$R_{max}$	$K_D$ (нМ)	Стандартное отклонение, SD**
MBP-muRif1-CTD	$6,1(2) \times 10^5*$	$0,0116(5)*$	$111(2)*$	$19,0(8)*$	2,644

\* Ошибки в последней указанной значащей цифре представлены в скобках.

\*\* Стандартное отклонение: разница между наблюдаемой и расчётной величиной.

Полученная в данной работе величина  $K_D$  для взаимодействия MBP-muRif1-CTD с G4, измеренная впервые с помощью SPR, чётко демонстрирует функциональность очищенного белка. Данная величина  $K_D$  хорошо согласуется с величиной  $K_D$  (18 нМ), приведённой в работе Masai et al. [13], в которой для оценки  $K_D$  использовался EMSA; надо отметить, что SPR считается более чувствительным методом.

Учитывая высокую вероятность олигомеризации белка [13, 14, 20], приведённые в данной работе оценки аффинности были получены только на основании кинетического анализа. Ни более высокие концентрации белка, ни более продолжительное взаимодействие компонентов не рассматривались.

В заключение необходимо отметить, что высокая концентрация соли (500 мМ), необходимая для поддержания белка в растворимом состоянии, и присутствие MBP-метки в составе белка, которая не может быть удалена в виду нестабильность белка, тоже могут влиять на состояние белка и связывание с поверхностью сенсора. Более того, медленный процесс олигомеризации белка может отразиться на данных, получаемых в SPR-эксперименте. Поэтому в будущих исследованиях мы планируем заменить солюбилизирующую метку на меньшую и предпринять попытки изменить конфигурацию SPR-сенсора так, чтобы белок сохранял связь с сенсором посредством нековалентного связывания, что делает возможным его повторное использование.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование было попыткой экспрессии и солюбилизации muRif1-CTD. Представленная платформа для солюбилизации и очистки Rif1-CTD потенциально может быть использована для других нестабильных белков. Было отмечено, что высокие концентрации соли (например, 1 М NaCl/KCl/CH<sub>3</sub>COONa) мо-

гут продлить растворимое состояние белка, тем не менее необходимо провести дальнейшие исследования для получения немеченого растворимого белка muRif1-CTD, который может быть использован для изучения его свойств и структуры в кристаллографических исследованиях.

В дополнение, в этой работе мы представили наши исследования кинетики связывания белка MBP-muRif1-CTD со специфической последовательностью G4 (T<sub>6</sub>G<sub>24</sub>), которая, как ранее сообщалось, связывает белок Rif1 с высокой аффинностью [15]. Впервые в этой работе нам удалось измерить  $K_D$  для взаимодействия MBP-muRif1-CTD с G4 с помощью SPR, таким образом доказывая биологическую активность очищенного белка. В наших будущих исследованиях мы планируем работать над другими стратегиями солюбилизации и дополнительно исследовать взаимодействие этого белка с его партнёром G4 посредством SPR. Было бы интересно изучить влияние G-повторов на аффинность связывания.

**Финансирование.** Работа была поддержана исследовательским бюджетом Tarbiat Modares University, Иран (грант № IG-39707).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность Prof. Masai и Dr. Kenji из Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Япония, за мудрые советы и щедрый подарок различных конструкций muRif1 и помощь в проведении EMSA.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала Biochemistry (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 86, вып. 7, 2021.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rhind, N., and Gilbert, D. M. (2013) DNA replication timing, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a010132, doi: 10.1101/cshperspect.a010132.
2. Hardy, C. F., Sussel, L., and Shore, D. (1992) A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation, *Genes Dev.*, **6**, 801-814.
3. Kedziora, S., Gali, V. K., Wilson, R. H. C., Clark, K. R. M., Nieduszynski, C. A., et al. (2018) Rif1 acts through protein phosphatase 1 but independent of replication timing to suppress telomere extension in budding yeast, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 3993-4003, doi: 10.1093/nar/gky132.
4. Cornacchia, D., Dileep, V., Quivy, J. P., Foti, R., Tili, F., et al. (2012) Mouse Rif1 is a key regulator of the replication-timing programme in mammalian cells, *EMBO J.*, **31**, 3678-3690, doi: 10.1038/emboj.2012.214.
5. Hayano, M., Kanoh, Y., Matsumoto, S., Renard-Guillet, C., Shirahige, K., and Masai, H. (2012) Rif1 is a global regulator of timing of replication origin firing in fission yeast, *Genes Dev.*, **26**, 137-150, doi: 10.1101/gad.178491.111.
6. Yamazaki, S., Ishii, A., Kanoh, Y., Oda, M., Nishito, Y., and Masai, H. (2012) Rif1 regulates the replication timing domains on the human genome, *EMBO J.*, **31**, 3667-3677, doi: 10.1038/emboj.2012.180.



7. Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J. T., et al. (2013) A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice, *Mol. Cell*, **49**, 872-883, doi: 10.1016/j.molcel.2013.01.001.
8. Silverman, J., Takai, H., Buonomo, S. B., Eisenhaber, F., and de Lange, T. (2004) Human Rif1, ortholog of a yeast telomeric protein, is regulated by ATM and 53BP1 and functions in the S-phase checkpoint, *Genes Dev.*, **18**, 2108-2119, doi: 10.1101/gad.1216004.
9. Xu, D., Muniandy, P., Leo, E., Yin, J., Thangavel, S., et al. (2010) Rif1 provides a new DNA-binding interface for the Bloom syndrome complex to maintain normal replication, *EMBO J.*, **29**, 3140-3155, doi: 10.1038/emboj.2010.186.
10. Sreesankar, E., Senthilkumar, R., Bharathi, V., Mishra, R. K., and Mishra, K. (2012) Functional diversification of yeast telomere associated protein, Rif1, in higher eukaryotes, *BMC Genomics*, **13**, 255, doi: 10.1186/1471-2164-13-255.
11. Sukackaite, R., Jensen, M. R., Mas, P. J., Blackledge, M., Buonomo, S. B., and Hart, D. J. (2014) Structural and biophysical characterization of murine rif1 C-terminus reveals high specificity for DNA cruciform structures, *J. Biol. Chem.*, **289**, 13903-13911, doi: 10.1074/jbc.M114.557843.
12. Kanoh, Y., Matsumoto, S., Fukatsu, R., Kakusho, N., Kono, N., et al. (2015) Rif1 binds to G quadruplexes and suppresses replication over long distances, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 889-897, doi: 10.1038/nsmb.3102.
13. Moriyama, K., Yoshizawa-Sugata, N., and Masai, H. (2018) Oligomer formation and G-quadruplex binding by purified murine Rif1 protein, a key organizer of higher-order chromatin architecture, *J. Biol. Chem.*, **293**, 3607-3624, doi: 10.1074/jbc.RA117.000446.
14. Kobayashi, S., Fukatsu, R., Kanoh, Y., Kakusho, N., Matsumoto, S., et al. (2019) Both a unique motif at the C-terminus and an N-terminal HEAT repeat contribute to G-quadruplex binding and origin regulation by the Rif1 protein, *Mol. Cell. Biol.*, **39**, doi: 10.1128/MCB.00364-18.
15. Masai, H., Fukatsu, R., Kakusho, N., Kanoh, Y., Moriyama, K., et al. (2019) Rif1 promotes association of G-quadruplex (G4) by its specific G4 binding and oligomerization activities, *Sci. Rep.*, **9**, 8618, doi: 10.1038/s41598-019-44736-9.
16. Wang, H., Zhao, A., Chen, L., Zhong, X., Liao, J., et al. (2009) Human RIF1 encodes an anti-apoptotic factor required for DNA repair, *Carcinogenesis*, **30**, 1314-1319, doi: 10.1093/carcin/bgp136.
17. Mei, Y., Peng, C., Liu, Y. B., Wang, J., and Zhou, H. H. (2017) Silencing RIF1 decreases cell growth, migration and increases cisplatin sensitivity of human cervical cancer cells, *Oncotarget*, **8**, 107044-107051, doi: 10.18632/oncotarget.22315.
18. Liu, Y. B., Mei, Y., Long, J., Zhang, Y., Hu, D. L., and Zhou, H. H. (2018) RIF1 promotes human epithelial ovarian cancer growth and progression via activating human telomerase reverse transcriptase expression, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **37**, 182, doi: 10.1186/s13046-018-0854-8.
19. Mariani, S., and Minunni, M. (2014) Surface plasmon resonance applications in clinical analysis, *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 2303-2323, doi: 10.1007/s00216-014-7647-5.
20. Nguyen, H. H., Park, J., Kang, S., and Kim, M. (2015) Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications, *Sensors (Basel)*, **15**, 10481-10510, doi: 10.3390/s150510481.
21. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
22. Gabelica, V., Maeda, R., Fujimoto, T., Yaku, H., Murashima, T., et al. (2013) Multiple and cooperative binding of fluorescence light-up probe thioflavin T with human telomere DNA G-quadruplex, *Biochemistry*, **52**, 5620-5628, doi: 10.1021/bi4006072.
23. Renaud de la Faverie, A., Guedin, A., Bedrat, A., Yatsunyk, L. A., and Mergny, J. L. (2014) Thioflavin T as a fluorescence light-up probe for G4 formation, *Nucleic Acids Res.*, **42**, e65, doi: 10.1093/nar/gku111.
24. Carvalho, J., Queiroz, J. A., and Cruz, C. (2017) Circular dichroism of G-quadruplex: a laboratory experiment for the study of topology and ligand binding, *J. Chem. Educ.*, **94**, 1547-1551, doi: 10.1021/acs.jchemed.7b00160.

## CHARACTERIZATION OF INTERACTION OF THE MBP-TAGGED muRif1-C-TERMINAL DOMAIN WITH G-QUADRUPLEX DNA BY SPR

H. Ghadiri<sup>1</sup>, S. Alavi<sup>2</sup>, B. Dabirmanesh<sup>1</sup>, and K. Khajeh<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran; E-mail: Khajeh@modares.ac.ir

<sup>2</sup> Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

One of the main players in the cell-specific replication timing pattern is Rap1 interacting factor-1 (Rif1). Rif1 protein consists of N-terminal and C-terminal domains and an intrinsically disordered region in between. It has been suggested that both N- and C-termini of Rif1 are capable of binding to DNA with particularly high affinity to cruciform DNA structures. In the present study, we expressed, solubilized, and purified the maltose-binding protein-tagged murine Rif1 C-terminal domain (MBP-muRif1-CTD). Biological activity of the purified protein was assessed by the electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and surface plasmon resonance (SPR). Our results show that the MBP-muRif1-CTD binds G-quadruplex (G4) structure with high affinity ( $K_D$  19.0 ± 0.8 nM), as was previously suggested. This study is the first step in investigation of the interaction of MBP-Profinity eXact-muRif1-CTD and G4 by SPR.

**Keywords:** murine Rap1 interacting factor 1 (muRif1), surface plasmon resonance, maltose-binding protein (MBP), G-Quadruplex (G4), gel shift assay