

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Монахова Майя Викторовна

**Белки MutS и MutL: межмолекулярные взаимодействия на
начальных этапах репарации «мисматчей» в ДНК**

Специальность 1.4.9. Биоорганическая химия (химические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений химического факультета и в НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научный руководитель – **Кубарева Елена Александровна,**
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты – **Речкунова Надежда Ивановна,**
доктор химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биоорганической химии ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Хандажинская Анастасия Львовна,
доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Субач Федор Васильевич,
кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярного конструирования Федерального государственного бюджетного учреждения Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»)

Защита диссертации состоится «28» ноября 2023 г. в 16 ч 00 мин на заседании диссертационного совета МГУ.014.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы д. 1, стр. 40, ауд. 501.

E-mail: agapkina@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале:
<http://dissovet.msu.ru/dissertation/014.2/2707/>

Автореферат разослан «__» октября 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Ю.Ю. Агапкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Двойная спираль ДНК постоянно подвергается воздействию различных мутагенных факторов, что приводит к изменению закодированной в ДНК генетической информации и, как следствие, к нарушениям нормальной жизнедеятельности всего организма. Для передачи генетической информации в неизменном виде в живых организмах имеются системы репарации повреждений ДНК.

Система репарации неканонических пар нуклеотидов в ДНК (MMR, от англ. mismatch repair) обнаружена во всех царствах живых организмов. Функцией этой системы является выявление и удаление единичных неканонических пар нуклеотидов («мисматчей»), а также коротких инсерционных/делеционных петель в ДНК. К появлению таких «ошибок» приводят неточная работа ДНК-полимераз при копировании матричной цепи и воздействие мутагенных факторов среды. «Мисматчи», среди которых наиболее распространенным является пара G/Т, узнаются и восстанавливаются системой репарации MMR, снижая частоту мутаций при репликации в 10^2 – 10^3 раз. Кроме того, белки этой системы принимают участие в регуляции клеточного цикла, поддержании длины микросателлитов, предотвращении рекомбинации между сходными последовательностями ДНК, образовании пар хромосом при мейозе, при сегрегации генома и др. Большое разнообразие биологических функций определяет актуальность исследования системы репарации «мисматчей» ДНК. Нарушение функционирования MMR на одном из её этапов приводит к накоплению мутаций, результатом этого является возникновение в организме человека опухолей различной природы. Существование связи между онкологическими заболеваниями и MMR обуславливает необходимость выявления деталей её функционирования. Система MMR характеризуется высокой консервативностью первичной структуры её ключевых белков MutS и MutL от бактерий до высших эукариот. Предполагается, что основные механизмы репарации «мисматчей» сходны для всех организмов.

Функционирование MMR обусловлено координированным действием более 10 белков, в результате которого происходит удаление протяженного одноцепочечного фрагмента вновь синтезированной цепи ДНК, содержащей «мисматч», с дальнейшим застраиванием образовавшейся «бреши». Ключевыми белками системы MMR являются MutS и MutL. Репарация «мисматчей» инициируется после узнавания неканонической пары белком MutS и формирования комплекса MutS–MutL, необходимого для активации следующих этапов репарации. MutS – сенсорный белок, который сканирует и идентифицирует «мисматчи» и повреждения в ДНК – довольно хорошо изучен. Белок MutL отвечает за белок-белковые взаимодействия и в большинстве организмов (за исключением некоторых бактерий) за выявление «дочерней» цепи ДНК с «ошибкой». В таких организмах MutL обладает эндонуклеазной функцией – вносит одноцепочечный разрыв в ДНК. Структуры MutS и MutL являются динамически подвижными и характеризуются разнообразием конформаций, что затрудняет исследование взаимодействия этих белков с молекулярными партнерами. В

связи с этим, актуальна разработка новых или оптимизация имеющихся подходов к изучению свойств таких конформационно подвижных белков и их комплексов с ДНК.

Цель и задачи исследования. Целью работы является детализация механизма взаимодействия белков MutS и MutL из системы MMR с ДНК с помощью новых типов реакционноспособных ДНК-дуплексов.

Сформулированы следующие задачи.

1. Клонировать и выделить ранее неизученный белок MutL из организма *Rhodobacter sphaeroides*, охарактеризовать его структуру и функции в сравнении с MutL из *Neisseria gonorrhoeae*.

2. Изучить свойства ДНК, содержащих пиридилдисульфидную или акриламидную группу при С5-атоме 2'-дезоксиридина, а также β-дикетогруппу в 2'-положении углеводного фрагмента, в реакциях аффинной модификации («кросслинкинга») MutS и MutL бактерий.

3. С помощью предложенных ДНК-реагентов:

- исследовать взаимодействия MutL с ДНК, а именно, провести зондирование ДНК-связывающего центра в N-концевом домене MutL из *E. coli*, определить сближенность остатков цистеина с ДНК в эндонуклеазном центре MutL из *N. gonorrhoeae*;
- установить локализацию ДНК в комплексе с MutS из *E. coli* в «активной» конформации (в присутствии АТФ);
- проверить необходимость «скольжения» MutS из *E. coli* по ДНК для формирования тройного комплекса MutS–MutL–ДНК.

Научная новизна. Впервые клонирован и выделен белок MutL из организма *Rhodobacter sphaeroides* (rsMutL). Особенностью этой бактерии является способность выживать в различных стрессовых условиях, что должно быть связано с эффективной работой ее систем репарации. Установлено, что rsMutL, как и его наиболее близкий с эволюционной точки зрения гомолог MutL из *Neisseria gonorrhoeae* (ngMutL), способен вносить одноцепочечный разрыв в плазмидную ДНК. Эффективность этого процесса зависит от природы Me^{2+} и наличия АТФ в среде. Показано, что rsMutL значительно быстрее гидролизует АТФ по сравнению с другими охарактеризованными MutL бактерий, что может свидетельствовать о большей скорости его перехода в активную конформацию.

Впервые предложено использовать дикарбонильные производные олигонуклеотидов для модификации гуанидиновой группы остатков Arg в белках, взаимодействующих с ДНК. Продемонстрировано образование конъюгатов белков MutS и MutL из системы MMR *E. coli* (esMutS и esMutL) с 17-звенными ДНК-дуплексами, содержащими остаток 2'-деокси-2'-(4,6-диоксогептиламидо)уридина. Показана эффективность и региоспецифичность ДНК-дуплексов, содержащих акриламидную группу при С5-атоме dU для аффинной модификации остатков Cys мутантных форм esMutS. С помощью этих ДНК-реагентов нами зафиксировано новое, ранее не описанное конформационное состояние esMutS, в комплексе с ДНК, в которой пара G/T находится за 2 пары нуклеотидов от 3'-конца дуплекса.

Комбинацией методов «кросслинкинга» и флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET) впервые показано, что зафиксированный на ДНК белок esMutS сохраняет свою активность и способен взаимодействовать с esMutL.

Теоретическая значимость. Впервые предложены модифицированные ДНК, содержащие β -дикетогруппу в качестве реагентов, способных взаимодействовать с остатками Arg белков. Показано, что такие ДНК образуют конъюгаты с esMutS и esMutL. Эти результаты важны для дальнейшей разработки эффективных и селективных реакционноспособных олигонуклеотидов на Arg с целью зондирования ДНК-связывающих центров белков.

Полученные данные о механизме взаимодействия бактериальных MutS и MutL с ДНК на различных этапах работы системы MMR дополняют существующие сведения о структуре ДНК-белковых комплексов этих белков. Так, впервые показано положение ДНК в комплексе с esMutS в различных конформациях. Также сделано заключение о том, что способ взаимодействия esMutS с «мисматчем» на конце ДНК-дуплекса отличается от классического способа, когда «мисматч» расположен в центре дуплекса. Кроме этого, уточнена локализация ДНК-связывающего центра esMutL и продемонстрирована сближенность остатков Cys эндонуклеазного центра ngMutL с ДНК-субстратом.

Представленные результаты позволяют приблизиться к пониманию принципов функционирования более сложной эукариотической системы MMR.

Практическая значимость. Полученные в данной работе ДНК с реакционноспособными группировками могут быть использованы для изучения любых лабильных комплексов белков с ДНК. Разработана универсальная методика выделения белково-нуклеиновых конъюгатов с сохранением функциональной активности белковой компоненты. Практически значимой является предложенная методология сочетания «кросслинкинга» и FRET, которая позволяет оценивать способность белков взаимодействовать друг с другом в условиях отсутствия «скольжения» по ДНК.

Обнаруженные особенности функционирования rsMutL и ngMutL важны для понимания роли MMR в адаптации бактерий *R. sphaeroides* и *N. gonorrhoeae* к различным условиям среды. Полученные данные могут быть использованы при варьировании выживаемости этих бактерий, что позволит расширить границы практического применения *R. sphaeroides* и может быть использовано в терапии гонореи.

Личный вклад автора. Во всех опубликованных работах вклад автора является определяющим. Автором проделана экспериментальная работа: выделение белков MutS и MutL и их мутантных форм [1,2,4–7], клонирование rsMutL [6], получение модифицированных ДНК, содержащих β -дикето- и пиридилдисульфидную группы [4,5,7], исследование стабильности модифицированных ДНК [1,5], аффинная модификация MutS и MutL реакционноспособными ДНК [1,2,4,5,7], подбор условий выделения ковалентно связанных комплексов MutS–ДНК [7] и исследование их активности с помощью FRET. В обзорной статье [3] собраны литературные данные о строении и функционировании белков MutL в различных организмах. Синтез ДНК с акриламидной группой проведен доцентом

Сколковского института науки и технологий Зацепиным Т.С. Биоинформатический анализ последовательности rsMutL выполнен совместно с ведущим научным сотрудником НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ Алексеевским А.В.

Положения, выносимые на защиту

1. MutL из бактерии *R. sphaeroides* содержит в своем составе все мотивы, характерные для белков MutL с эндонуклеазной функцией. rsMutL, как и его гомолог из *N. gonorrhoeae*, обладает АТФазной и эндонуклеазной активностями. Внесение одноцепочечного разрыва обоими белками ингибируется в присутствии АТФ и ионов Zn^{2+} . Остатки Cys каталитического центра белка ngMutL сближены с ДНК-лигандом.

2. Аминокислоты в положениях 218, 251 и 282 в N-концевом домене esMutL находятся в ДНК-связывающем центре белка. Присутствие esMutS повышает эффективность взаимодействия остатка Cys мутантных форм esMutL(T218C), esMutL(A251C) и esMutL(A282C) с ДНК, содержащими пиридилдисульфидную группу на линкерах длиной 18,6 и 31,7 Å при C5-атоме dU.

3. ДНК-реагенты с β-дикетогруппой в углеводном фрагменте способны взаимодействовать с остатками аргинина. esMutS и esMutL образуют конъюгаты с 17-звенными ДНК, содержащими β-дикетогруппу.

4. ДНК-лиганды, содержащие остаток dU с акриламидной группой на линкерах различной длины, эффективно и региоспецифично взаимодействуют с остатком Cys белков esMutS(A469C) и esMutS(N497C). esMutS в комплексе с «мисматчем», расположенным на конце ДНК, может находиться в новом, ранее не описанном, конформационном состоянии.

5. ДНК меняет свое положение в комплексе с гомодимером esMutS при замене АДФ на АТФ в АТФазном центре белка. Зафиксированный на ДНК белок esMutS сохраняет свою активность и способен взаимодействовать с esMutL.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 7 статей в российских и международных рецензируемых периодических изданиях. Результаты исследований были представлены на 18 различных международных и всероссийских конференциях в виде устных и стендовых докладов. Работа была доложена на заседании кафедры химии природных соединений химического факультета и на заседании Ученого совета НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ.

Структура и объем диссертационной работы. Текст диссертации состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, списка литературы, который включает 287 источников. Объем диссертации 168 страницы, материал иллюстрирован 67 рисунками и содержит 13 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Общая характеристика объектов исследования

Объектами исследования выбраны гомодимерные *esMutS* и *esMutL*, а также белки *rsMutL* и *ngMutL*. *rsMutL* клонирован и выделен в этой работе впервые. Схемы получения *ngMutL*, *esMutS* и *esMutL* разработаны ранее (*Duppatla et al.*, 2009; *Feng et al.*, 1995).

1.1. Получение и характеристика *MutL* из *Rhodobacter sphaeroides*

Методами молекулярного клонирования получена плазмидная ДНК, содержащая ген *MutL* из *R. sphaeroides* штамма 2.4.1. Рекомбинантный *rsMutL* выделяли хроматографией на Ni-NTA-агарозе с последующей дополнительной очисткой эксклюзионной хроматографией (рис. 1).

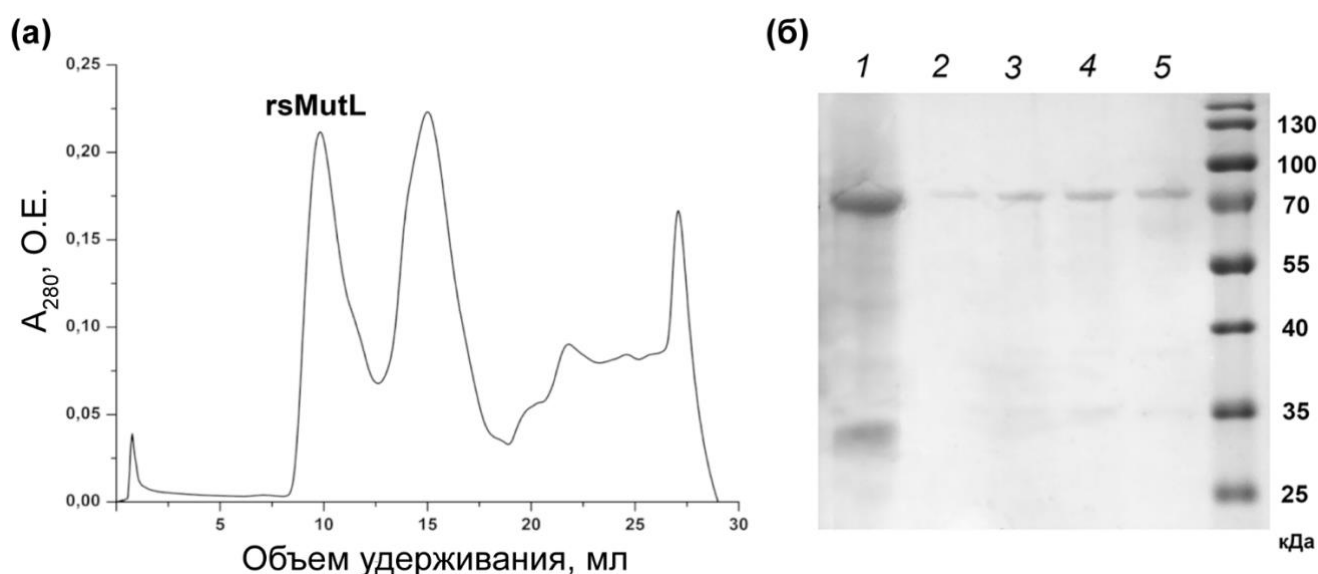


Рис. 1. Выделение белка *rsMutL* методом эксклюзионной хроматографии. (а) – Хроматограмма разделения *rsMutL* и белков с более низкой молекулярной массой; (б) – анализ фракций методом электрофореза: дорожка 1 – *rsMutL* до проведения эксклюзионной хроматографии; дорожки 2–5 – фракции с объемом удерживания 9–10 мл.

Проанализирована первичная и предсказана вторичная структуры этого белка. При анализе аминокислотной последовательности *rsMutL* обнаружены все 16 мотивов, характерных для белков *MutL*, обладающих эндонуклеазной активностью. Также продемонстрировано, что *rsMutL* с эволюционной точки зрения наиболее близок к гомологу из *N. gonorrhoeae*, для которого показано наличие эндонуклеазной активности (*Duppatla et al.*, 2009). Вероятно, *rsMutL* также обладает способностью гидролизовать ДНК.

1.2. Сравнительный анализ биохимических свойств *rsMutL* и *ngMutL*

Эндонуклеазная функция

Показано эффективное внесение одноцепочечного разрыва в плазмидную ДНК белком *rsMutL* (рис. 2). Реакцию гидролиза ДНК проводили в присутствии $MnCl_2$ и других Me^{2+} . Степень расщепления плазмиды белком *rsMutL* уменьшается в ряду $Mn^{2+} > Co^{2+} \gg Mg^{2+} >$

Cd^{2+} . Ионы Ni^{2+} , Ca^{2+} и Zn^{2+} не стимулируют гидролиз ДНК ферментом, а Zn^{2+} и АТФ ингибируют эндонуклеазную функцию *rsMutL* в присутствии $MnCl_2$.

В случае *ngMutL* только Mn^{2+} и Mg^{2+} стимулируют гидролиз плазмиды. В присутствии других Me^{2+} продукты гидролиза не зафиксированы, что опровергает данные *Duppatla et al., 2009*, где продемонстрирована активация эндонуклеазной функции *ngMutL* в присутствии Ca^{2+} .

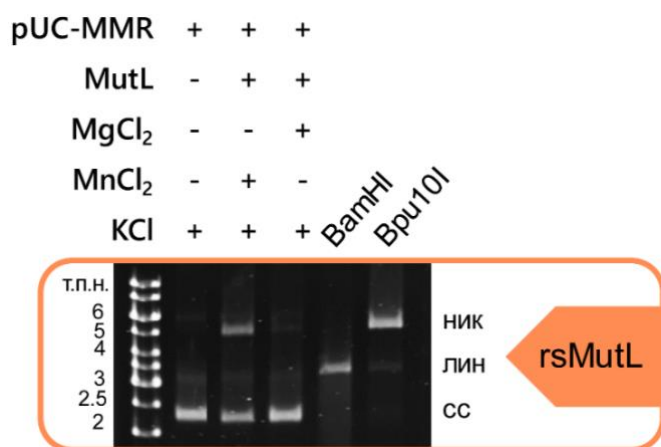


Рис. 2. Гидролиз плазмиды рUC-MMR белком *rsMutL* при 37°C в течение 60 мин. Фотография 1%-ного агарозного геля, окрашенного бромидом этидия. Справа указаны формы кольцевой ДНК: суперскрученная (сс), с разрывом в одной цепи (ник), линейная ДНК (лин).

ДНК-связывающая активность

Для анализа ДНК-связывающей активности *ngMutL* и *rsMutL* методом «торможения в геле» использованы ДНК-дуплексы (дцДНК) длиной 16, 20, 30, 41, 76 пар нуклеотидов (п.н.) и одноцепочечные ДНК (оцДНК) той же длины. В выбранных условиях не удалось зафиксировать комплексообразование *rsMutL* с ДНК, в то время как *ngMutL* связывался уже с 30-звенным ДНК-дуплексом. По мере увеличения длины ДНК эффективность её связывания с *ngMutL* возрастала. Комплексообразование *ngMutL* с 41- и 76-звенными дцДНК и оцДНК охарактеризовано кажущимися константами диссоциации (табл. 1). Продемонстрировано, что «место посадки» полноразмерного белка *ngMutL* на ДНК превышает 41 п.н. оцДНК связываются с белком менее эффективно по сравнению с ДНК-дуплексами.

Таблица 1. Кажущиеся константы диссоциации комплексов *ngMutL* с ДНК различной длины.

Длина ДНК	K_d^{app} , мкМ	
	оцДНК	дцДНК
16	–	–
20	–	–
30	–	+
41	$1,99 \pm 0,02$	$1,39 \pm 0,05$
76	$1,11 \pm 0,01$	$0,86 \pm 0,03$

Примечание: – нет связывания, + комплексообразование детектируется, но определение K_d^{app} невозможно.

АТФазная активность

Впервые колориметрическим методом охарактеризована АТФазная активность двух полноразмерных белков rsMutL и ngMutL (табл. 2). Значения K_M реакции гидролиза АТФ белком ngMutL почти в два раза ниже, чем для rsMutL, что свидетельствует о более высоком сродстве ngMutL к АТФ. Важно заметить, что rsMutL значительно быстрее гидролизует АТФ по сравнению с ngMutL, что может свидетельствовать о большей конформационной подвижности белка из *R. sphaeroides*.

Таблица 2. Параметры гидролиза АТФ белками rsMutL и ngMutL.

Объект	K_M , мкМ	k_{cat} , с ⁻¹
ngMutL	196 ± 48	$3,2 \times 10^{-3}$
rsMutL	350 ± 38	$1,7 \times 10^{-2}$

2. Аффинная модификации MutS и MutL новыми типами ДНК-реагентов

Метод аффинной модификации белков реакционноспособными аналогами ДНК («кросслинкинг») позволяет получить дополнительную информацию о структуре специфического ДНК-белкового комплекса и фиксировать короткоживущие макромолекулярные ассоциаты, образующиеся на разных стадиях ДНК-белкового узнавания. В состав центров связывания белков, взаимодействующих с ДНК, часто входят положительно заряженные остатки Arg. Для селективной модификации гуанидиновой группы остатков аргинина нами впервые предложено использовать фрагменты ДНК, содержащие β -дикетогруппу при С2'-атоме углеводного фрагмента (рис. 3а).

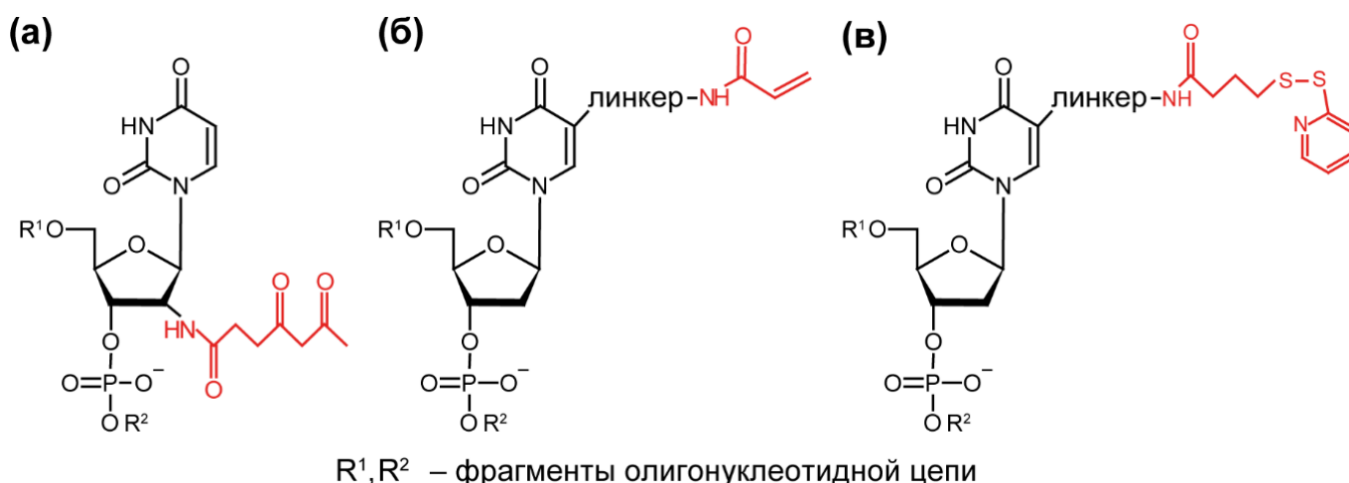


Рис. 3. Используемые в работе модифицированные ДНК, содержащие (а) β -дикетогруппу при 2'-атоме; (б) 2-пиридилдисульфидную и (в) акриламидную группу при С5-атоме dU.

Для получения белково-нуклеиновых конъюгатов хорошо себя зарекомендовал метод сайт-направленного ковалентного связывания белка, содержащего единственный остаток цистеина, с ДНК, имеющей в области контакта с белком тиол-специфичную

реакционноспособную группировку. В данной работе для модификации белков предложено использовать ДНК, содержащие пиридилдисульфидную и акриламидную группы при С5-атоме 2'-дезоксинуридина (рис. 3б, в). Эти реакционноспособные группы локализованы в большой бороздке ДНК, где осуществляются большинство контактов нуклеиновой кислоты с белком.

2.1. Взаимодействие ДНК-лигандов, содержащих β-дикетогруппу при С2'-атоме углеводного фрагмента, с есMutS и есMutL

Фрагменты ДНК с β-дикетогруппой при С2'-атоме углеводного фрагмента получены впервые путем постсинтетической модификации олигонуклеотидов с включением 2'-амино-2'-дезоксинуридина. Ацилирование 2'-аминосодержащего олигонуклеотида 4,6-диоксогептановой кислотой проходило с выходом продукта реакции 75–95%. Синтезированные олигонуклеотиды с β-дикетогруппой вводили в реакцию с гуанидином и гидрофобными производными Arg. Были зафиксированы продукты реакции (анализ методом MALDI-TOF и обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте). Таким образом, полученные ДНК с β-дикетогруппой потенциально способны образовывать конъюгаты с Arg белков.

Из олигонуклеотидов, содержащих β-дикетогруппу, формировали 17-звенные дуплексы I–IV, которые использовали в реакции с белками есMutS и есMutL (рис. 4а). Дуплексы I–III кроме модифицированного звена в различных положениях содержали G/T-пару. В качестве контроля использовали дуплекс IV без «мисматча», но с реакционноспособной группировкой.

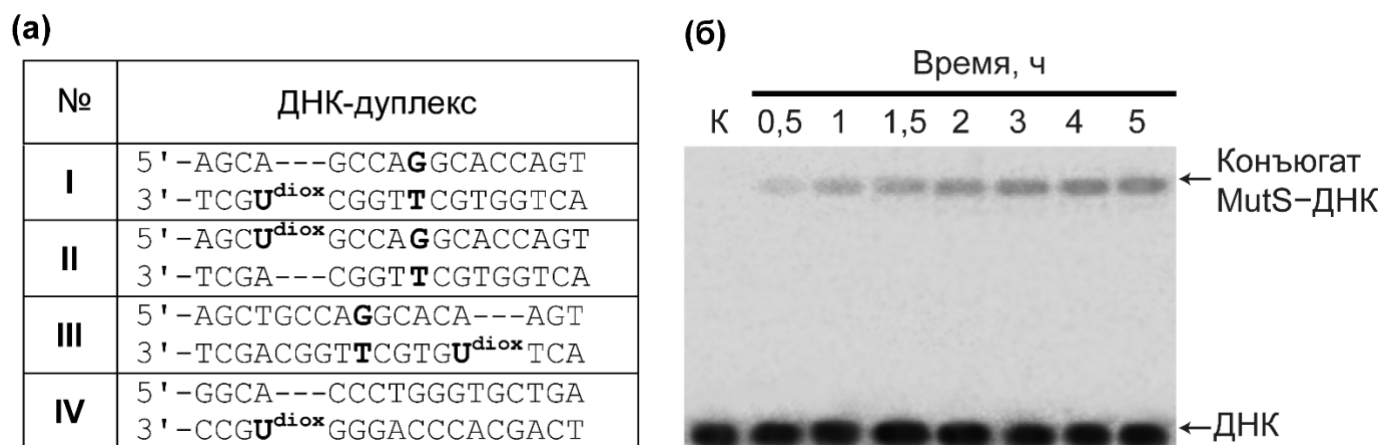


Рис. 4. ДНК-дуплексы с β-дикетогруппой. (а) Структура дуплексов. (б) Зависимость выхода конъюгата есMutS с ДНК-лигандом I от времени. Анализ продуктов реакции в 8%-ном ПААГ, содержащем ДСН. Дорожка К – исходная ДНК; над дорожками геля указано время реакции.

В ходе аффинной модификации белков есMutS и есMutL предложенными ДНК-реагентами получены ковалентные комплексы с выходом до 5% (рис. 4б). Наибольший выход конъюгата наблюдался при взаимодействии есMutS с ДНК-лигандом I; дуплекс без

«мисматча» образовывал «сшивку» с белком примерно в 2 раза менее эффективно. Отметим, что зафиксировать взаимодействие *esMutL* с 17-звенными ДНК удалось впервые.

Соединения, содержащие β -дикетогруппу, кроме остатка Arg могут модифицировать остатки Lys белков. Продукт такого взаимодействия разрушается при действии гидроксилamina. Для проверки селективности реакции β -дикетосодержащих фрагментов ДНК по отношению к остаткам Arg белков в реакционную смесь добавляли раствор гидроксилamina. Показано, что образующиеся конъюгаты устойчивы к действию этого реагента. Следовательно, предложенные нами ДНК-лиганды с β -дикетогруппой, взаимодействуют с остатками Arg.

2.2. ДНК-дууплексы, содержащие пиридилдисульфидную группировку, для исследования ДНК-белковых и белок-белковых взаимодействий в системе MMR

В качестве реагентов для аффинной модификации белков по остаткам Cys мы использовали новый тип ДНК-дууплексов с пиридилдисульфидной (pyrSS) группировкой (рис. 3в). В состав 59-звенной ДНК включен модифицированный остаток dU, содержащий pyrSS при C5-атоме на линкерах различной длины (схема 1). Такую группу вводили в состав олигонуклеотида с помощью реакции между dU, содержащим алифатическую аминогруппу, и бифункциональными реагентами с pyrSS и N-гидроксисукцинимидной группами. Взаимодействие полученных модифицированных ДНК-дууплексов с Cys белка представлена на схеме 1.

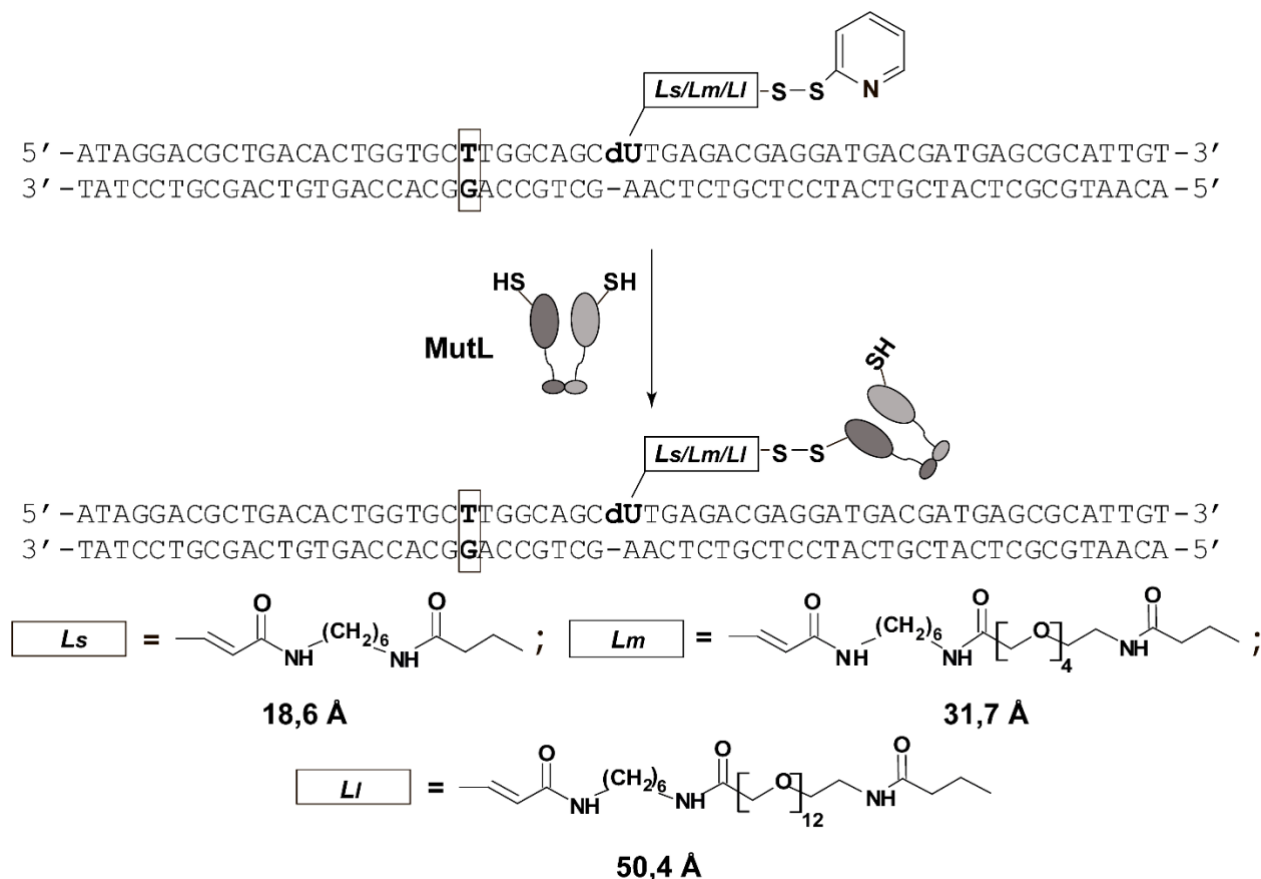


Схема 1

Зондирование ДНК-связывающего центра в N-концевом домене *ecMutL*

Кристаллическую структуру комплекса полноразмерного MutL с ДНК получить не удастся из-за высокой конформационной подвижности белка. Остается неизвестной локализация ДНК-связывающего центра в *ecMutL*. Согласно данным литературы, ДНК-связывающий центр *ecMutL* находится в N-концевом домене белка в участке, богатом положительно заряженными аминокислотами (*Guarné et al., 2004*). Для верификации этой гипотезы мы использовали метод «кросслинкинга» с 59-звенными ДНК, содержащими *purSS*-группу на линкерах различной длины (схема 1). Стратегия эксперимента состояла из: выбора аминокислотных остатков *ecMutL*, потенциально вовлеченных в связывание с ДНК; получения мутантных форм *ecMutL* с единственным остатком Cys в заданном положении; аффинной модификации мутантных форм *ecMutL* с реакционноспособными ДНК; анализ продуктов реакции.

Согласно модели (*Groothuizen et al., 2015*) остатки Thr218, Ala251, Ala282 и His297 потенциально сближены с ДНК, а остатки Gln118 и Asn131 достаточно удалены от ДНК и не могут входить в ДНК-связывающую область белка (рис. 5). Были получены мутантные формы *ecMutL*, содержащие единственный остаток Cys: *ecMutL*(T218C), *ecMutL*(A251C), *ecMutL*(A282C) и *ecMutL*(H297C). Мутантные формы *ecMutL*(Q118C) и *ecMutL*(N131C) использовались в качестве отрицательного контроля.

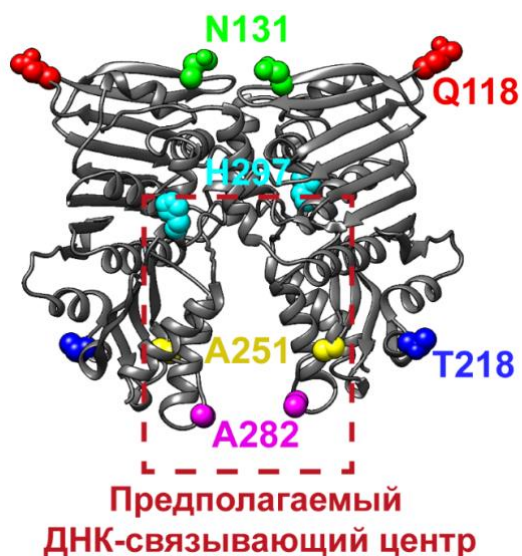


Рис. 5. Позиции аминокислотных остатков в N-концевом домене димера *ecMutL* (PDB: 1B63), выбранные для замены на Cys.

Впервые получены конъюгаты мутантных форм белка *ecMutL* с ДНК, содержащими *purSS*-группу при C5-атоме dU на линкерах *Ls*, *Lm*, *Ll* (схема 1, рис. 6). Продемонстрировано, что остатки Cys в позициях 218, 251 и 282 белка *ecMutL* наиболее сближены с ДНК-лигандом. Присутствие *ecMutS* в реакционной смеси увеличивает выход и скорость образования конъюгатов мутантных форм MutL с ДНК, содержащей группу *purSS* на

линкере *Lm*. Выход ряда конъюгатов составил 30–60%, что позволяет их выделять и использовать для дальнейших исследований системы MMR.

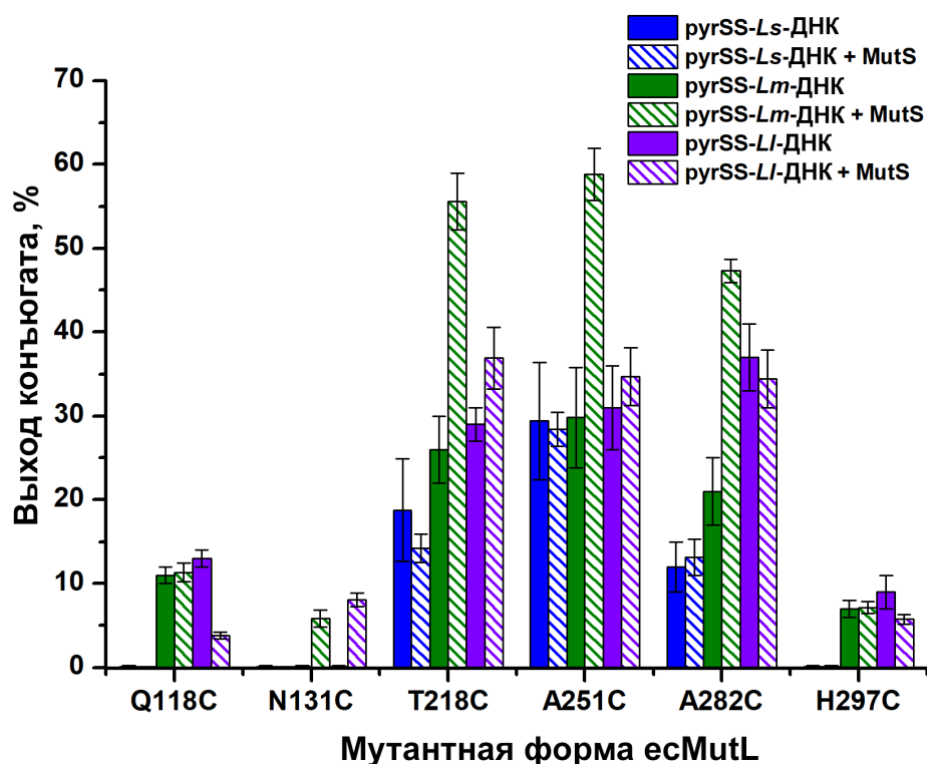


Рис. 6. Выходы ДНК-белковых конъюгатов в реакции аффинной модификации мутантных форм еsMutL с pyrSS-содержащими ДНК в отсутствие еsMutS (колонки без штриховки) и в присутствии еsMutS (колонки со штриховкой).

Аффинная модификация ngMutL pyrSS-содержащими ДНК

ngMutL содержит остатки Cys в положениях 171, 251, 528, 604, 635. Два из них (Cys604 и Cys635) входят в состав консервативных мотивов, составляющих каталитический центр белка (мотивы [A/S]C \underline{K} и C[P/N]HGRP). Ранее продемонстрировано, что эти остатки Cys необходимы для функционирования системы MMR (Fukui et al., 2008). Мы поставили задачу методом «кросслинкинга» ngMutL с pyrSS-*Ls*-ДНК, pyrSS-*Lm*-ДНК и pyrSS-*Ll*-ДНК (схема 1) определить, сближены ли остатки Cys эндонуклеазного домена этого белка с ДНК.

Обнаружено, что выход ДНК-белкового конъюгата повышается с увеличением длины линкера между реакционной группой и ДНК. Остатки Cys белка ngMutL могут находиться на расстоянии примерно 18–50 Å от ДНК. Эффективность ковалентного связывания ngMutL с ДНК зависит от присутствия нуклеотидных кофакторов: наличие АДФ не влияет на образование конъюгата, в то время как АТФ незначительно снижает выход (рис. 7). Ионы Zn²⁺, которые вступают в координационные взаимодействия с остатками Cys эндонуклеазного центра ngMutL, ингибируют образование конъюгата белка с pyrSS-*Ll*-ДНК (рис. 7). Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что аффинной модификации pyrSS-ДНК подвергаются остатки Cys604 и/или Cys635 консервативных мотивов [A/S]C \underline{K} и C[P/N]HGRP ngMutL.

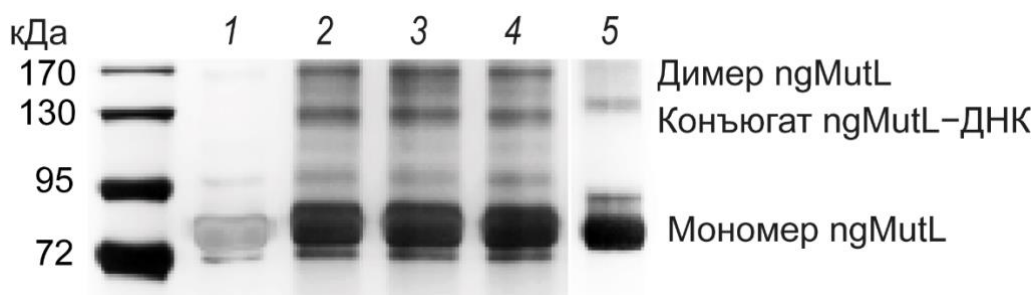


Рис. 7. Анализ продуктов ковалентного связывания ngMutL (4 мкМ) с pyrSS-L1-ДНК (1 мкМ) методом электрофореза в 8%-ном ПААГ, содержащем ДСН (дорожка 2). Гель окрашен солями серебра. Дорожка 1 – исходный белок. Дорожки 3–4 соответствуют реакционным смесям, содержащим кроме ngMutL и pyrSS-L1-ДНК кофактор АДФ или АТФ (1 мМ), соответственно. Дорожка 5 – анализ продуктов ковалентного связывания ngMutL с pyrSS-L1-ДНК в присутствии 1 мМ ZnCl₂.

Положение ДНК в комплексе с esMutS на начальных стадиях репарации «мисматчей»

Ранее продемонстрированы кардинальные изменения в структуре esMutS при его взаимодействии с АТФ, при этом детектировать ДНК в таком комплексе не удалось (Groothuizen *et al.*, 2015). В этой работе также предполагается, что ДНК, взаимодействующая первоначально с доменом «зажим» esMutS, опускается в полость, формирующуюся при переходе белка в активную конформацию в присутствии АТФ (рис. 8).

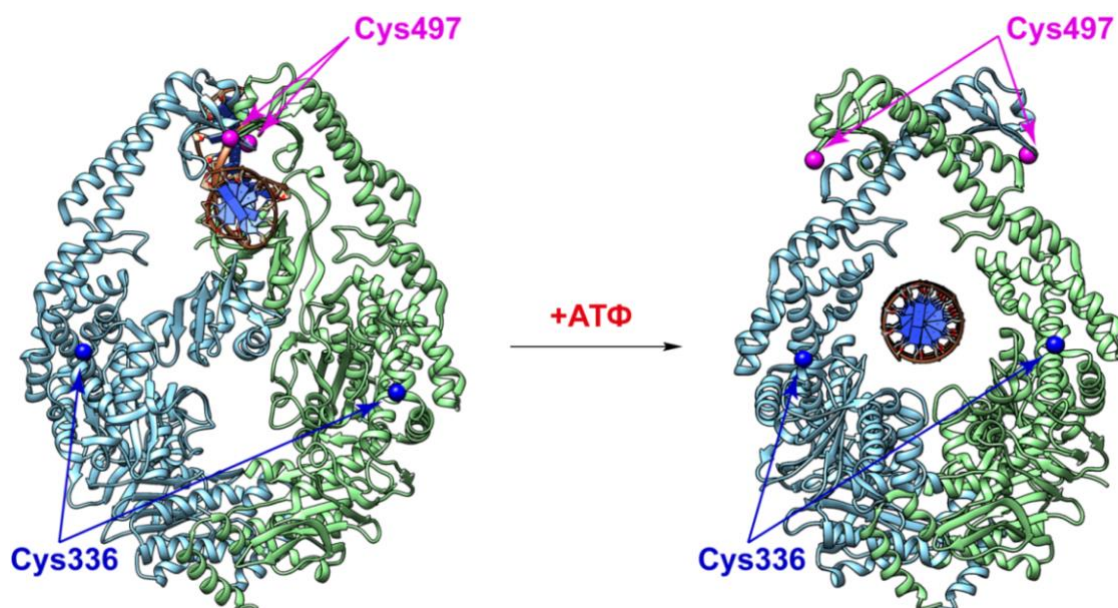


Рис. 8. Схема конформационных перестроек в комплексе MutS–ДНК при связывании АТФ. Предложено на основе кристаллических структур комплексов esMutS–ДНК и esMutS–MutL (PDB: 1E3M и 5AKB).

Согласно данным PCA Asn497 белка esMutS контактирует с фосфатной группой между 7 и 8 нуклеотидом от «мисматча» (Lamers *et al.*, 2000). Из модели комплекса esMutS с ДНК (Groothuizen *et al.*, 2015) следует, что нуклеиновая кислота сближается с Ala336 в результате конформационных перестроек в белке при его переходе в активную конформацию. Для

проверки этой гипотезы использован метод «кросслинкинга» с участием 59-звенных *purSS-Ls*-ДНК, *purSS-Lm*-ДНК и *purSS-Ll*-ДНК, содержащих модифицированный dU в 8-ом положении от пары G/T (схема 1), и двух моноцистеиновых форм *ecMutS(N497C)* и *ecMutS(A336C)*.

Показано, что *ecMutS(N497C)* эффективно формирует конъюгаты со всеми ДНК вне зависимости от наличия АТФ в реакционной смеси (рис. 9). В случае *ecMutS(A336C)* формирование ковалентно связанных комплексов наблюдается только в присутствии АТФ. Таким образом, ДНК действительно меняет свое положение в комплексе с *ecMutS* после связывания белком АТФ.

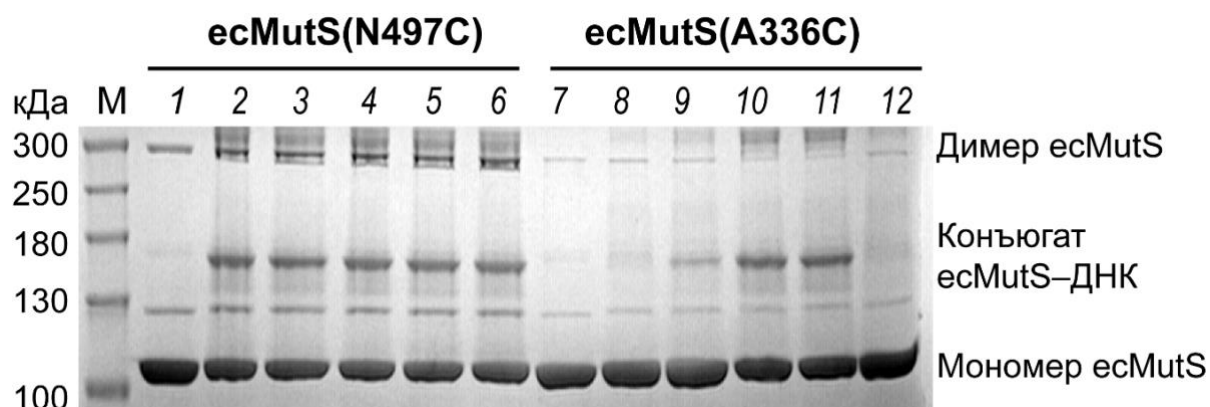


Рис. 9. Анализ продуктов ковалентного связывания *ecMutS(N497C)* и *ecMutS(A336C)* с дуплексом *purSS-Lm*-ДНК. Дорожки 3–6 и 9–12 – «кросслинкинг» *ecMutS(N497C)* и *ecMutS(A336C)* в присутствии 10 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ АТФ и 1 мМ АДФ соответственно. Дорожки 1 и 7 – исходные белки *ecMutS(N497C)* и *ecMutS(A336C)* соответственно. Дорожки 2 и 8 – «кросслинкинг» *ecMutS(N497C)* и *ecMutS(A336C)* соответственно в отсутствие нуклеотидных кофакторов.

Применение метода «кросслинкинга» для изучения особенностей взаимодействия белков *ecMutS* и *ecMutL*

Сочетание методов «кросслинкинга» и FRET позволило нам ответить на вопрос, насколько необходимо «соскальзывание» MutS с «мисматча» в ДНК для эффективного формирования комплекса с MutS–MutL.

Стратегия эксперимента представлена на схеме 2. К ковалентному комплексу *ecMutS*–ДНК добавляется Sytox Blue – интеркалирующий краситель, флуоресценция которого при взаимодействии с ДНК увеличивается. Далее вводится белок *ecMutL*, модифицированный флуорофором Alexa-594, который составляет FRET-пару с Sytox Blue. В отсутствие АТФ *ecMutS* не может принимать активную конформацию. При добавлении АТФ в структуре *ecMutS* происходят конформационные перестройки, одну из которых мы описали выше. В результате в *ecMutS* формируется поверхность, необходимая для связывания *ecMutL* и эффективного образования комплекса *ecMutS*–*ecMutL*–ДНК. Происходит сближение флуорофора в *ecMutL* с флуоресцентно меченной ДНК, что приводит к увеличению сигнала FRET (схема 2).

Для реализации этой стратегии получены и выделены в препаративных количествах ковалентно связанные комплексы *ecMutS*–ДНК, в которых белок остается в димерной форме; проверена способность белка в конъюгатах связывать и гидролизовать АТФ; получен меченный флуорофором Alexa-594 функционально активный вариант *ecMutL*, оценена возможность взаимодействия конъюгатов *ecMutS*–ДНК с *ecMutL*.

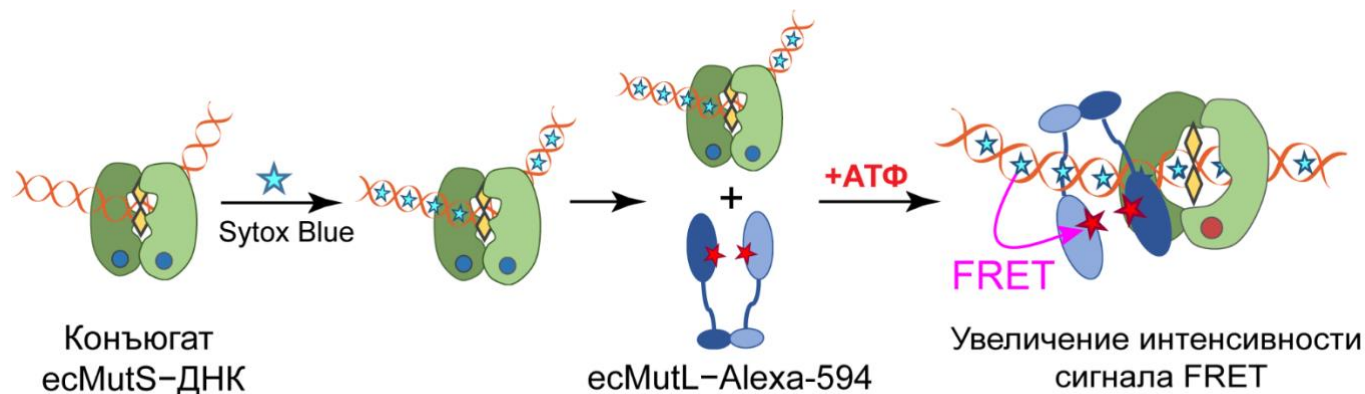


Схема 2

Для получения функционально активных «сшитых» комплексов *ecMutS*–ДНК подобраны условия его выделения, при которых сохраняются гомодимерная структура *ecMutS*, ДНК-связывающая и АТФазная активности *ecMutS*, двуспиральная структура ДНК. Для этого использовали анионообменную хроматографию (ступенчатый градиент KCl (500, 650, 750 мМ) в буфере, содержащем 10 мМ HEPES/КОН (pH 7,9), 1 мМ ЭДТА, глицерин 10%). Впервые в гомогенном состоянии получены конъюгаты мутантной формы *ecMutS*(N497C) с ДНК-дуплексами *purSS-Ls*-ДНК, *purSS-Lm*-ДНК и *purSS-Ll*-ДНК.

Измеряя сигнал флуоресценции, нам удалось показать эффективное формирование комплексов *ecMutL* с ковалентно связанными комплексами *ecMutS*(N497C)–ДНК и изучить кинетику этого процесса. Образование комплекса *ecMutL*(H297C)–Alexa-594 с конъюгатами *ecMutS*(N497C)–ДНК в присутствии 10 мкМ АТФ характеризуется одностадийной кинетикой с выходом на плато после 20 с измерения (рис. 10а). В случае 1 мМ АТФ образование комплекса *ecMutL*(H297C)–Alexa-594 с конъюгатами происходит в две стадии (рис. 10б). Первая стадия, связанная с образованием тройного комплекса, является очень быстрой, что не позволяет оценить точные значения констант скорости этого процесса. Наличие второй стадии в наблюдаемой нами кинетической картине, возможно, связано с конформационными переходами в *ecMutL*.

Таким образом, согласно полученным данным, зафиксированный на расстоянии 7 п.н. от ДНК-«мисматча» белок *ecMutS* способен взаимодействовать с *ecMutL*, что может свидетельствовать в пользу стационарной модели образования репарационных комплексов, при которых отсутствует «скольжение» белков по ДНК.

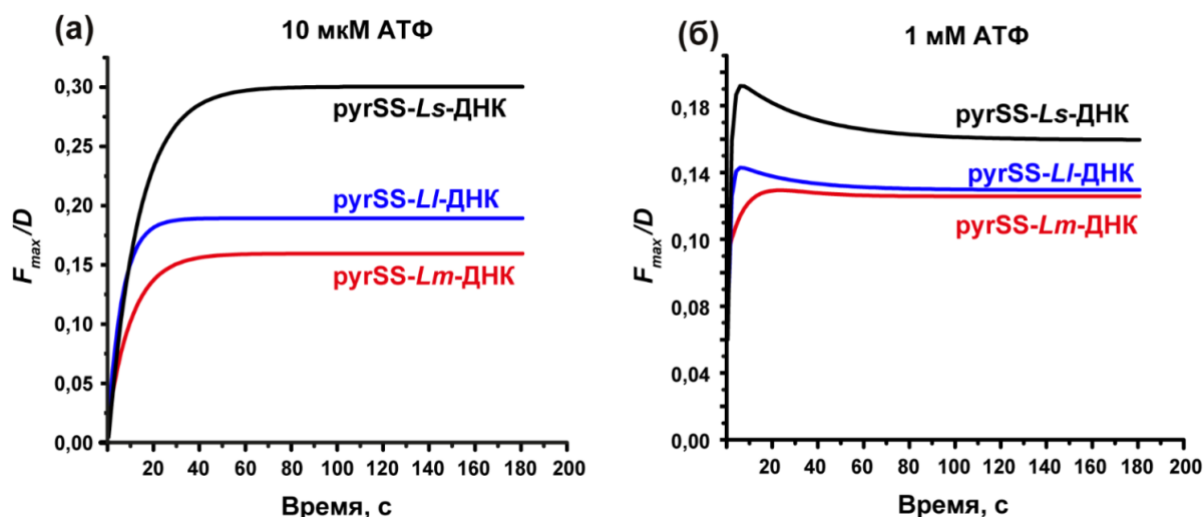


Рис. 10. Зависимость изменения относительного сигнала FRET в реакционной смеси, содержащей конъюгаты есMutS(N497C)–ДНК, Sytox Blue и есMutL(H297C)–Alexa-594 при добавлении 10 мкМ АТФ (а) или 1 мМ АТФ (б) от времени.

2.3. Синтез и свойства модельных фрагментов ДНК, содержащих акриламидную группировку при С5-атоме dU

В качестве реагентов на остатки Cys белков в работе получены новые фрагменты ДНК, содержащие акриламидную группировку на линкерах различной длины (схема 3). Олигонуклеотиды, содержащие акриламидную группу при С5-атоме 2'-дезоксидуридина на линкерах различной длины, были получены по реакции диполярного [1,3]-циклоприсоединения олигомера, несущего терминальную алкиновую группировку, с N-(3-азидопропил)алкиламидом (синтез проведен доцентом Сколковского института науки и технологий (Сколтех) к.х.н. Т.С. Зацепиным).

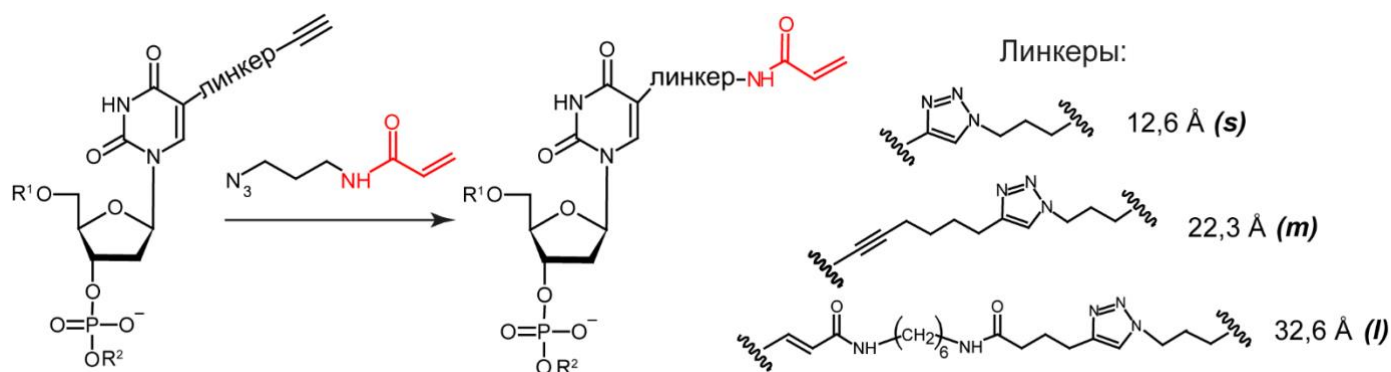


Схема 3

Модификация вводилась в 17-звенные ДНК-дуплексы в три различные положения относительно «мисматча»:

5-ое положение

5' -AGC-A-GCCAGGCACCAGT
 3' -TCGdU_RCGGTTCGTGGTCA

8-ое положение

5' -AGC-A-GCCAAGCGCCAGT
 3' -TCGdU_RCGGTTCGTGGTCA

11-ое положение

5' -AGC-A-GCCAAGCACCGGT
 3' -TCGdU_RCGGTTCGTGGTCA

R – «короткий», «средний» или «длинный» линкер (s, m, l, соответственно) между С5-атомом урацила и акриламидной группой

В качестве объекта для изучения свойств этих модифицированных ДНК использован *esMutS*. По данным РСА Ala469 и Asn497 *esMutS* сближены с нуклеотидами в 5-ом и 8-ом положениях в ДНК с 3'-конца относительно Т «мисматча» (*Lamers et al., 2000*). При этом пара G/T находится в середине цепи ДНК. Исходя из этого, для «кросслинкинга» выбраны две моноцистеиновые мутантные формы *esMutS*(A469C) и *esMutS*(N497C).

Продемонстрирована региоселективность 17-acyl-dU_R-5 и 17-acyl-dU_R-8 по отношению к остаткам Cys469 и Cys497: *esMutS*(A469C) образовывал конъюгаты с ДНК, содержащей модификацию в 5-ом положении от «мисматча» (выход 25%), в то время как *esMutS*(N497C) наиболее эффективно взаимодействовал с ДНК, содержащей акриламидную группу в 8-ом положении (выход 76%). Полученные результаты коррелируют с данными РСА (*Groothuizen et al., 2013*) (табл. 3).

Таблица 3. Рассчитанные расстояния между ДНК и A469/N497 в *esMutS* и выход конъюгатов *esMutS*–ДНК

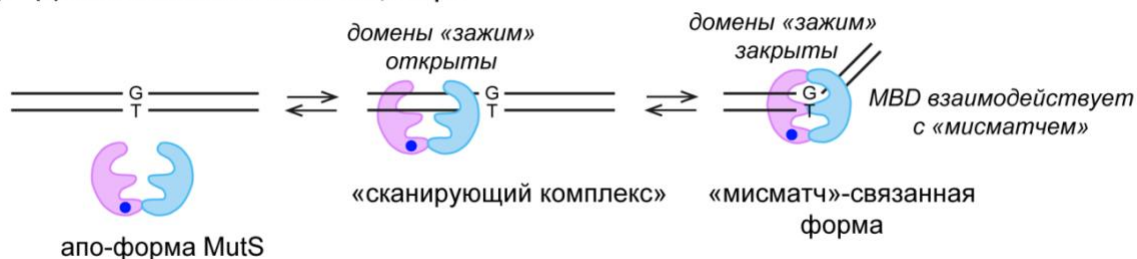
Положение остатка Cys в <i>esMutS</i>		Расстояние между позициями 469/497 в <i>esMutS</i> и ДНК, Å	Выход конъюгата <i>esMutS</i> –ДНК, % (длина линкера, Å)		
			<i>s</i> (12,6 Å)	<i>m</i> (22,3 Å)	<i>l</i> (32,6 Å)
<i>Модификация в положении 5 от «мисматча»</i>					
469	Субъединица А	10	2±1	27±4	15±1
	Субъединица Б	13			
497	Субъединица А	14	2±1	4±1	6±1
	Субъединица Б	20			
<i>Модификация в положении 8 от «мисматча»</i>					
469	Субъединица А	19	1	2±1	5±1
	Субъединица Б	12			
497	Субъединица А	9	12±1	76±2	53±6
	Субъединица Б	25			
<i>Модификация в положении 11 от «мисматча»</i>					
469	Субъединица А	31	2±1	42±2	17±3
	Субъединица Б	19			
497	Субъединица А	19	2±1	4±2	3±1
	Субъединица Б	37			

Отметим, что в условиях наших экспериментов практически не наблюдалось образования ковалентно связанного комплекса мутантных форм *esMutS* с модифицированными ДНК без «мисматча». Также *esMutS* дикого типа, содержащий 12 остатков Cys, и его бесцистеиновая мутантная форма не образовывали конъюгатов с модифицированными ДНК. Таким образом, *esMutS* специфично взаимодействует с «мисматч»-содержащими ДНК-реагентами с акриламидной группировкой.

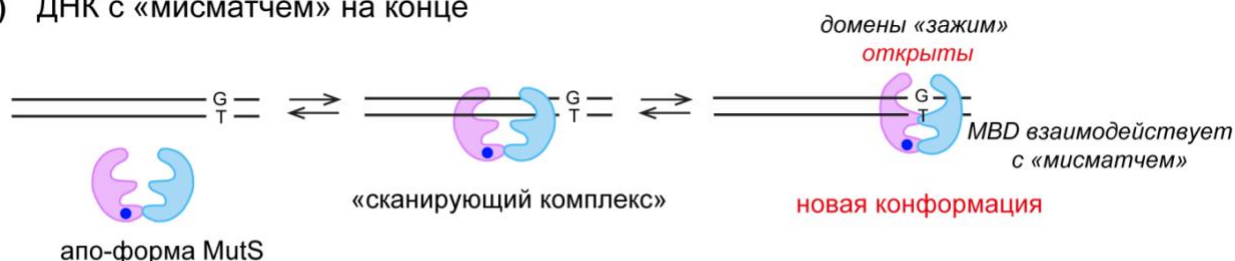
Взаимодействие мутантных форм есMutS с положением 11 в ДНК в 3'-направлении от Т «мисматча» интересно по двум причинам: отсутствие данных РСА, характеризующих это взаимодействие, и близость «мисматча» к концу ДНК. При взаимодействии белка с такой ДНК будут осуществляться два конкурирующих процесса: связывание есMutS с G/Т-парой и неспецифическое взаимодействие белка с концом ДНК. Согласно построенной нами модели комплекса есMutS–ДНК, ожидалось, что дуплексы с 17-acyl-dU_R-11 будут наиболее эффективно взаимодействовать с есMutS(N497C). Однако только есMutS(A469C) реагировал с такими дуплексами (выходы ~20–40%).

Для объяснения результатов проанализирована полученная с использованием криоэлектронной микроскопии структура комплекса есMutS с ДНК канонического строения, где домены «зажим» находятся в «открытом» состоянии («сканирующий комплекс»). В таком неспецифическом комплексе позиция 469 в есMutS расположена на расстоянии ~15 Å от модифицированного нуклеотида, а позиция 497 слишком удалена от него. Таким образом, образование неспецифического комплекса могло бы объяснить полученные результаты «кросслинкинга». Однако есMutS(A469C) не формировал конъюгаты с модифицированными ДНК, не содержащими «мисматч», что свидетельствует о специфическом взаимодействии белка с дуплексами 17-acyl-dU_R-11. Возможно, при локализации пары G/Т на конце ДНК специфический комплекс есMutS с «мисматчем» формируется частично. Мы полагаем, что есMutS взаимодействует с такой ДНК особым, еще не установленным образом: белок формирует специфические контакты с «мисматчем», при этом домены «зажим» остаются в «открытом» состоянии из-за невозможности изгиба ДНК на 60 градусов на ее конце (как в случае «сканирующего комплекса») (рис. 11).

(а) ДНК с «мисматчем» в центре



(б) ДНК с «мисматчем» на конце



• АДФ

MBD: «мисматч»-связывающий домен

Рис. 11. Взаимодействие MutS с «мисматчем», находящимся в центре и на конце ДНК-дуплекса (панели (а) и (б) соответственно).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена изучению начальных этапов функционирования системы репарации «мисматчей», основная функция которой заключается в поддержании целостности генома и безошибочной передаче генетической информации при клеточном делении. Необходимыми участниками инициации процесса репарации «мисматча» являются белки MutS и MutL. Из-за динамической структуры самих белков и их комплексов с ДНК изучение строения последних затруднено.

Нами предложены новые типы реакционноспособных ДНК для аффинной модификации белков. Их применение позволило получить данные о строении и функционировании комплексов MutS и MutL бактерий с ДНК. В частности, прозондированы контакты MutL с ДНК, впервые получены данные о сближенности эндонуклеазного домена MutL с ДНК, продемонстрировано изменение положения ДНК при конформационных перестройках MutS. Показано, что для активации дальнейших стадий репарации белку MutS необязательно покидать «мисматч», что может являться доказательством стационарной модели активации процесса репарации «мисматчей». Впервые предложены ДНК, способные взаимодействовать с остатками Arg, и показано их взаимодействие с MutS и MutL. Предложено новое, ранее не описанное конформационное состояние MutS, характерное для взаимодействия с ДНК, содержащей «мисматч» на расстоянии двух нуклеотидов от ее 3'-конца. Разработан метод выделения ДНК-белковых конъюгатов, позволяющих сохранять свойства его компонентов, и метод изучения функций белков, основанный на сочетании «кросслинкинга» и FRET.

ВЫВОДЫ

1. Сконструированы новые типы лигандов для аффинной модификации белков MutS и MutL из системы репарации «мисматчей»: ДНК-дуплексы, содержащие β -дикетогруппу в 2'-положении dU; ДНК-дуплексы, несущие пиридилдисульфидную или акриламидную группу на линкерах различной длины при C5-атоме dU.
2. Впервые установлено, что ДНК-реагенты с β -дикетогруппой в углеводном фрагменте, способны взаимодействовать с остатками Arg белка. Продемонстрировано, что ДНК-лиганды, содержащие остаток dU с акриламидной группой на линкерах различной длины, могут быть использованы для эффективного и региоспецифичного ковалентного связывания остатков Cys мутантных форм белка MutS из *E. coli*.
3. Разработан метод получения и выделения конъюгата белка MutS из *E. coli* с ДНК, содержащей пиридилдисульфидную группу при C5-атоме dU. Доказано, что зафиксированный на ДНК белок MutS сохраняет свою активность и способен взаимодействовать с белком MutL из *E. coli*.
4. Применение предложенных ДНК-реагентов позволило: 1) установить изменение положения ДНК в комплексе с гомодимером MutS из *E. coli* при замене АДФ на АТФ в АТФазном центре этого белка; 2) обнаружить новое конформационное состояние MutS из

E. coli; 3) показать, что аминокислотные остатки в позициях 218, 251 и 282 белка MutL из *E. coli* входят в состав его ДНК-связывающего центра; 4) продемонстрировать сближенность остатков Cys каталитического центра белка MutL из *Neisseria gonorrhoeae* с ДНК-лигандом.

5. Впервые клонирован и выделен белок MutL из *Rhodobacter sphaeroides*. Продемонстрирована его способность вносить одноцепочечный разрыв в ДНК.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.014.2 по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия (химические науки):

1. **Monakhova M.**, Kubareva E., Kolesnikov K., Anashkin V., Kosaretskiy E., Zvereva M., Romanova E., Friedhoff P., Oretskaya T., Zatsepin T. Reactive acrylamide-modified DNA traps for accurate cross-linking with cysteine residues in DNA-protein complexes using mismatch repair protein MutS as a model. *Molecules*, 2022, v. 27, p. 2438. IF = 4.927 (Web of Science).

2. **Монахова М.В.**, Милакина М.А., Савицкая В.Ю., Романова Е.А., Рао Д.Н., Кубарева Е.А. Белок MutL из системы репарации «мисматчей» бактерии *Neisseria gonorrhoeae*: взаимодействие с АТР и ДНК. *Молекулярная биология*, 2021, №2, с. 289-304. IF = 1.540 (Web of Science).

3. **Монахова М.В.**, Милакина М.А., Трикин Р.М., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. Особенности функционирования белка MutL из системы репарации «мисматчей» различных организмов. *Биоорганическая химия*, 2020, т. 46, № 6, с. 563-579. IF = 1.254 (Web of Science).

4. **Monakhova M.**, Ryazanova A., Kunetsky V., Li P., Shilkin E., Kisil O., Rao D.N., Oretskaya T., Friedhoff P., Kubareva E. Probing the DNA-binding center of the MutL protein from the *Escherichia coli* mismatch repair system via crosslinking and Förster resonance energy transfer. *Biochimie*, 2020, v. 171-172, p. 43-54. IF = 4.372 (Web of Science).

5. **Монахова М.В.**, Кубарева Е.А., Романова Е.А., Семкина А.С., Набережных Д.С., Рао Д.Н., Зацепин Т.С., Орецкая Т.С. Синтез фрагментов ДНК, содержащих β-дикетогруппу для аффинной модификации белков. *Биоорганическая химия*, 2019, т. 45, № 3, с. 303-314. IF = 1.254 (Web of Science).

6. **Монахова М.В.**, Пенкина А.И., Павлова А.В., Лящук А.М., Кучеренко В.В., Алексеевский А.В., Лунин В.Г., Фридрих П., Клуг Г., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. Характеристика эндонуклеазной функции белка MutL из системы репарации «мисматчей» *Rhodobacter sphaeroides*. *Биохимия*, 2018, т. 83, № 3, с. 404-418. IF = 2.824 (Web of Science).

7. **Monakhova M.**, Ryazanova A., Hentschel A., Viryasov M., Oretskaya T., Friedhoff P., Kubareva E. Chromatographic isolation of the functionally active MutS protein covalently linked to deoxyribonucleic acid. *Journal of Chromatography A*, 2015, v. 1389, p.19-27. IF = 4.601 (Web of Science).