

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ И НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ ИМЕНИ
А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО**

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)

ДИССЕРТАЦИЯ

**на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор,
Кубарева Елена Александровна

Москва 2023

Оглавление

Список использованных сокращений.....	4
I. Введение.....	6
Актуальность работы.....	6
Степень разработанности проблемы.....	7
Цели и задачи работы.....	8
Объект исследования.....	9
Предмет исследования.....	9
Научная новизна.....	9
Теоретическая значимость работы.....	10
Практическая значимость работы.....	11
Методология диссертационного исследования.....	11
Личный вклад автора.....	12
Положения, выносимые на защиту.....	12
Апробация работы.....	13
Публикации.....	13
Структура и объём диссертации.....	14
II. Обзор литературы.....	15
II.1. Общие представления о функционировании системы репарации «мисматчей» в ДНК.....	15
II.1.1. Общие представления о системе репарации «мисматчей».....	15
II.1.2. Система репарации «мисматчей» в <i>E. coli</i>	16
II.1.3. Система репарации «мисматчей» в организмах, не содержащих MutH.....	19
II.2. Существующие модели активации системы MMR.....	23
II.3. Белки MutS и MutL как ключевые участники процесса репарации «мисматчей» в ДНК.....	25
II.3.1. Структурная организация белков MutS.....	25
II.3.2. Различные конформации MutS.....	27
II.4. Строение белков MutL и их функции.....	33
II.4.1. АТФазная функция MutL.....	35
II.4.2. ДНК-связывающая функция MutL.....	37
II.4.3. Линкерная область MutL.....	39
II.4.4. Эндонуклеазная функция MutL.....	40
III. Материалы и методы.....	49
III.1. Реактивы и растворы.....	49
III.2. Приборы и методы.....	51
III.3. Общие методики.....	54
III.3.1. Синтез модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов.....	54
III.3.2. Выделение белков MutS и MutL из <i>E. coli</i> , их мутантных форм и оценка их активности.....	56
III.3.3. Клонирование, выделение и оценка активности белков MutL из <i>R. sphaeroides</i> и MutL из <i>N. gonorrhoeae</i>	57
III.3.4. Комплексообразование MutS и MutL с ДНК-лигандами.....	59
III.3.5. Флуоресцентные методы.....	62
III.3.5. Биоинформатические методы.....	64

IV. Белки MutS и MutL: межмолекулярные взаимодействия на начальных этапах репарации «мисматчей» в ДНК.....	66
IV.1. Общая характеристика объектов исследования.....	69
IV.1.1. MutS из <i>E. coli</i>	69
IV.1.2. MutL из <i>E. coli</i>	69
IV.1.3. MutL из <i>N. gonorrhoeae</i>	72
IV.1.4. MutL из <i>R. sphaeroides</i>	72
IV.2. Сравнительный анализ биохимических свойств белков MutL из <i>R. sphaeroides</i> и <i>N. gonorrhoeae</i>	76
IV.2.1. Анализ эндонуклеазной активности rsMutL и ngMutL в присутствии различных ионов металлов.....	76
IV.2.2. Влияние АТФ на гидролиз ДНК белками ngMutL и rsMutL.....	80
IV.2.3. Анализ ДНК-связывающей активности ngMutL и rsMutL.....	81
IV.2.4. Анализ АТФазной активности ngMutL и rsMutL.....	83
IV.3. Аффинная модификация белков фрагментами ДНК, содержащими β-дикетогруппу при С2'-атоме углеводного фрагмента.....	85
IV.3.1. Синтез и свойства ДНК с единичной β-дикетогруппой.....	85
IV.3.2. Взаимодействие ДНК-лигандов, содержащих β-дикетогруппу при С2'-атоме углеводного фрагмента, с MutS и MutL из <i>E. coli</i>	88
IV.4. Использование ДНК-дуплексов, содержащих пиридилдисульфидную группу, для исследования ДНК-белковых и белок-белковых взаимодействий в системе MMR.....	93
IV.4.1. Зондирование ДНК-связывающего центра в N-концевом домене MutL из <i>E. coli</i> ..	93
IV.4.2. Аффинная модификация MutL из <i>N. gonorrhoeae</i> модифицированными ДНК, содержащими пиридилдисульфидную группу.....	108
IV.5. Положение ДНК в комплексе с MutS из <i>E. coli</i> на начальных стадиях репарации «мисматчей».....	111
IV.6. Применение метода «кросслинкинга» для изучения особенностей взаимодействия белков MutS и MutL из <i>E. coli</i>	114
IV.6.1. Получение в препаративных количествах и выделение конъюгатов esMutS-ДНК	115
IV.6.2. Проверка способности белка в конъюгатах esMutS-ДНК изменять конформацию ДНК.....	120
IV.6.3. Кинетика разгибания ДНК в ковалентно связанном комплексе esMutS-ДНК.....	122
IV.6.4. Проверка способности ковалентно связанного esMutS с ДНК формировать комплекс с esMutL.....	123
IV.7. Аффинная модификация мутантных форм MutS из <i>E. coli</i> фрагментами ДНК, содержащими акриламидную группу при С5-атоме dU на линкерах различной длины.....	130
IV.7.1. Синтез и свойства ДНК с акриламидной группой.....	130
IV.7.2. Взаимодействие мутантных форм MutS из <i>E. coli</i> с 17-звенными ДНК-дуплексами с акриламидной группировкой на линкерах различной длины.....	136
V. Заключение.....	142
VI. Выводы.....	143
Благодарности.....	143
Список литературы.....	145

Список использованных сокращений

Для обозначения аминокислотных остатков, гетероциклических оснований, нуклеозидов, нуклеотидов, олиго- и полинуклеотидов использовали символы, рекомендованные Комиссией по номенклатуре Международного союза чистой и прикладной химии (IUPAC) и Международного союза биохимиков (IUB).

Префикс «d» (дезокси) при обозначении олигодезоксирибонуклеотидов и ДНК-дуплексов опущен.

а.о.	аминокислотный остаток
АДФ	аденозин-5'-дифосфат
АТФ	аденозин-5'-трифосфат
АТФ γ S	аденозин-5'-(3-тио-трифосфат)
БСА	бычий сывороточный альбумин
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДСН	додecilсульфат натрия
ДТТ	1,4-дитиотреит, <i>трео</i> -2,3-дигидрокси-1,4-димеркаптобутан
ИПТГ	изопропил- β -D-тиогалактопиранозид
н.о.	нуклеотидный остаток
НЭ	никующая эндонуклеаза
О.Е.	оптические единицы
п.н.	пара нуклеотидов
ПААГ	полиакриламидный гель
т.п.н.	тысяч пар нуклеотидов
Трис	<i>трис</i> -(гидроксиметил)аминометан
ЭДТА	этилендиаминтетраацетат, динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты
ЭР	эндонуклеаза рестрикции
<i>A. aeolicus</i>	<i>Aquifex aeolicus</i>
aaMutL	MutL из <i>A. aeolicus</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bsMutL	MutL из <i>B. subtilis</i>

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ecMutH	MutH из <i>E. coli</i>
ecMutL	MutL из <i>E. coli</i>
ecMutS	MutS из <i>E. coli</i>
FRET	флуоресцентный резонансный перенос энергии
GHKL	G yrase, h eat-shock protein 90, histidine k inase, Mut L , семейство АТФаз
HEPES	N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота
LB	бактериальная питательная среда Luna-Bertam
MMR	M ismatch R epair, репарация неканонических пар нуклеотидов («мисматчей»)
MutL-CTD	C - T erminal D omain of MutL, С-концевой домен белка MutL
MutL-NTD	N - T erminal D omain of MutL, N-концевой домен белка MutL
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
ngMutL	MutL из <i>N. gonorrhoeae</i>
Ni-NTA	никель-нитрилтриуксусная кислота
PCNA	P roliferating c ell n uclear a ntigen, ядерный антиген пролиферирующих клеток
PMSF	фенилметансульфонилфторид
<i>R. sphaeroides</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
rsMutL	MutL из <i>R. sphaeroides</i>
<i>T. aquaticus</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
TEMED	N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
ttMutL	MutL из <i>T. thermophilus</i>
v_0	начальная скорость
X	любой нуклеотид (A, G, C, T)

I. Введение

Актуальность работы

Двойная спираль ДНК постоянно подвергается воздействию различных мутагенных факторов, что приводит к изменению закодированной в ДНК генетической информации и может приводить к нарушениям нормальной жизнедеятельности всего организма [1]. Мутагенные факторы как экзогенные (УФ- или радиоактивное облучение), так и эндогенные (свободные радикалы, активные формы кислорода) возникают в процессе клеточного метаболизма. Для передачи генетической информации в неизменном виде в живых организмах имеются различные системы репарации повреждений ДНК [1]. В случае серьезных повреждений ДНК, которые не могут быть восстановлены, инициируется запрограммированная клеточная смерть (апоптоз) [2].

Система репарации неканонических пар нуклеотидов в ДНК (MMR, от англ. mismatch repair) обнаружена во всех царствах живых организмов. К появлению неканонических пар нуклеотидов или «мисматчей» кроме воздействия мутагенных факторов среды приводит неточная работа ДНК-полимераз при копировании матричной цепи [3]. «Мисматчи», среди которых наиболее распространенным является пара G/T, узнаются и восстанавливаются системой репарации MMR, снижая частоту мутаций при репликации в 10^2 - 10^3 раз [4]. Кроме того, белки этой системы принимают участие в регуляции клеточного цикла, в поддержании длины микросателлитов, в предотвращении рекомбинации между сходными последовательностями ДНК, в образовании пар хромосом при мейозе, при сегрегации генома и др. [5]. 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 [6]. Открытие 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 [7]. 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 «брешии» [4]. 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 [8]. Белок MutL отвечает за белок-белковые взаимодействия и в большинстве организмов за выявление «дочерней» цепи ДНК с «ошибкой». В таких организмах (за исключением некоторых бактерий) MutL обладает эндонуклеазной функцией – вносит одноцепочечный разрыв в ДНК. MutS и MutL обладают динамическими структурами, характеризующимися 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.

Степень разработанности проблемы

Несмотря на важность системы репарации «мисматчей» для организмов, а также наличие большого числа исследований, посвященных этому вопросу, до сих пор остается множество «темных пятен», касающихся механизма действия MMR.

Наиболее спорным вопросом в механизме MMR является то, каким образом сигнал о наличии «мисматча» передается к месту гидролиза ДНК, которое может находиться достаточно далеко от «ошибки» в ДНК (до 2000 пар нуклеотидов (п.н.)) [9]. В результате многолетних попыток ответить на этот вопрос, было сформулировано несколько моделей, каждая из которых имеет экспериментальное подтверждение [9]. Однако на сегодняшний день все больше доказательств появляется в пользу модели «скользящий зажим» [10,11]. Тем не менее есть экспериментальные свидетельства о том, что MutS может не покидать «мисматч» для взаимодействия с MutL и активации системы репарации.

Накопленные знания о структуре MutS на различных этапах его функционирования, оставляют много нерешенных вопросов о строении комплекса MutS-MutL-ДНК. Так, была получена структура ковалентно связанного комплекса еMutS с N-концевым доменом еMutL, однако установить местоположение ДНК в таком комплексе не удалось [12].

Бактериальные системы репарации «мисматчей», в которых белок MutL обладает эндонуклеазной активностью, изучены существенно хуже, чем системы репарации *Escherichia coli* и даже человека [5]. MutL, содержащие эндонуклеазный домен, были выделены из 5 бактерий: *Aquifex aeolicus*, *Bacillus subtilis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Thermus thermophilus*, получены первые данные о их свойствах [5]. Однако, эти белки обладают индивидуальными особенностями, связанными с влиянием различных факторов на эндонуклеазную функцию, которые требуют уточнения.

Интересно, что ключевая АТФазная активность количественно охарактеризована для N-концевых доменов гомологов белка MutL из трех бактерий: *A. aeolicus*, *B. subtilis* и *E. coli* [13–15]. Данные для полноразмерного MutL присутствуют только для белка из *B. subtilis* [13].

Представляется значимым исследование АТФазных активностей полноразмерных белков MutL из других организмов, что важно для понимания общих принципов их функционирования.

ДНК-связывающая область белков MutL детально не охарактеризована. Кристаллическая структура полноразмерного MutL до сих пор не получена из-за наличия в его структуре подвижного линкера, соединяющего N- и С-домены белка. Согласно современным представлениям ДНК-связывающий центр MutL находится в N-концевом домене белка [16]. Известно, что MutL не имеет участка узнавания в ДНК, и специфичность внесения им одноцепочечного разрыва на данный момент еще не установлена. ДНК-связывающая активность белков MutL может зависеть от множества факторов, таких как длина ДНК, наличие кофакторов (АДФ, АТФ, негидролизруемые аналоги АТФ) и ионная сила раствора [17]. Исследования, направленные на изучение взаимодействий бактериальных MutL с ДНК, представляют особый интерес с точки зрения понимания строения его комплексов с ДНК в процессе репарации.

Для изучения конформационно подвижных белков и их комплексов с ДНК в работе использован метод аффинной модификации или ковалентного связывания («кросслинкинга») белков с ДНК, содержащими реакционноспособную группу. Известно, что остатки Arg часто находятся в ДНК-связывающей области белков [18]. В данной работе впервые предлагаются новые ДНК-реагенты, содержащие β -дикетогруппу в 2'-положении, позволяющие прозондировать контакты Arg белка с ДНК.

Распространенными ДНК-реагентами являются модифицированные ДНК, специфически взаимодействующие с остатками Cys белка [19,20]. Ранее успешно применялся метод модификации Cys с помощью тиол-специфичной реакции для различных ДНК-связывающих белков [21–27]. В данной работе впервые использовались для исследования взаимодействий с MutS и MutL ДНК, содержащие пиридилдисульфидную группу при С5-атоме dU. Такая группа локализована в большой бороздке ДНК, где в основном реализуются взаимодействия белков с ДНК.

Кроме того, в качестве реагентов на Cys нами предложены фрагменты ДНК, содержащие акриламидную группу на линкерах различной длины. Ранее уже предпринималась попытка введения акриламидной группировки в ДНК, но такие ДНК-реагенты продемонстрировали невысокую эффективность в реакции с модельным пептидом [28]. Мы сконструировали акриламидсодержащие ДНК другого строения. Используя их, удалось получить ДНК-белковые конъюгаты с высоким выходом.

Цели и задачи работы

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*¹, 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:

1. 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*;
2. установить локализацию ДНК в комплексе с MutS из *E. coli* в «активной» конформации (в присутствии АТФ);
3. проверить необходимость «скольжения» MutS из *E. coli* по ДНК для формирования тройного комплекса MutS-MutL-ДНК.

Объект исследования

Объектами исследования являются: 1) новые типы ДНК-реагентов для аффинной модификации белков, содержащих пиридилдисульфидную или акриламидную группу при С5-атоме 2'-дезоксиридина и β-дикетогруппу в 2'-положении углеводного фрагмента; 2) белки MutS и MutL из *E. coli* (ecMutS и ecMutL) и их мутантные формы без остатков Cys или с единственным остатком Cys на мономер; белки MutL из *Rhodobacter sphaeroides* (rsMutL) и *Neisseria gonorrhoeae* (ngMutL) с эндонуклеазной функцией.

Предмет исследования

Основным предметом исследования является изучение: 1) специфичности, эффективности и региоселективности новых типов ДНК с реакционноспособными группами для аффинной модификации белков; 2) взаимодействие ecMutS, ecMutL, rsMutL и ngMutL с реакционноспособными ДНК (контакты ecMutL и ngMutL с ДНК, конформационные изменения ecMutS, свойства ecMutS в составе конъюгата с ДНК).

Научная новизна

Впервые клонирован и выделен MutL из организма *R. sphaeroides*. Особенностью этой бактерии является способность выживать в различных стрессовых условиях, что должно быть

¹ В настоящее время эта бактерия переименована в *Cereibacter sphaeroides*. Однако на момент начала работы её род назывался *Rhodobacter*, поэтому в представленной работе используется данный базисим.

связано с эффективной работой ее систем репарации. Установлено, что rsMutL, как и его наиболее близкий с эволюционной точки зрения гомолог ngMutL, способен вносить одноцепочечный разрыв в плазмидную ДНК. Эффективность этого процесса зависит от природы иона металла 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* с 17-звенными ДНК-дуплексами, содержащими остаток 2'-дезоксидеокси-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 белка MutS из *E. coli*. С помощью этих ДНК-реагентов нами зафиксировано новое, ранее не описанное конформационное состояние MutS, 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 работы

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 работы

Полученные в данной работе ДНК с различными реакционными группами могут быть использованы для изучения любых лабильных комплексов белков с ДНК. Предложенная методика выделения белково-нуклеиновых конъюгатов с сохранением функциональной активности белковой компоненты является универсальной. Практически значимой является предложенная методология сочетания «кросслинkinга» и FRET, которая позволяет оценивать способность белков взаимодействовать друг с другом в условиях отсутствия «скольжения» по ДНК.

В последние годы получили развитие разные направления исследований пурпурных бактерий в связи с их использованием в биотехнологических процессах. К числу таковых относится применение пурпурных бактерий, в частности *R. sphaeroides*, для очистки сточных вод, в качестве продуцентов аммиака и молекулярного водорода. Также клетки *R. sphaeroides* перспективны для клонирования в них генов, так как эти клетки быстро растут на простых и дешевых средах, причем не только при освещении, но и в темноте. Обнаруженные особенности функционирования rsMutL и ngMutL важны для понимания роли MMR в адаптации бактерий *R. sphaeroides* и *N. gonorrhoeae* к различным условиям. Полученные данные могут найти применение при варьировании выживаемости этих бактерий, что позволит расширить границы практического применения *R. sphaeroides* и может быть использовано в терапии гонореи.

Методология диссертационного исследования

При проведении экспериментов использовали современные методы биохимии и молекулярной биологии. Методами молекулярного клонирования впервые получена плазмидная ДНК, содержащая ген MutL из *R. sphaeroides* штамма 2.4.1. Рекомбинантный rsMutL впервые выделен хроматографией на Ni-NTA-агарозе с последующей дополнительной очисткой эксклюзионной хроматографией. Колориметрическим методом изучена АТФазная активность rsMutL и ngMutL. Способность вносить одноцепочечный разрыв в ДНК белками rsMutL и ngMutL анализировали электрофоретически в агарозном геле. Эффективность связывания ngMutL с ДНК различного строения показана методом «торможения в геле».

В работе для фиксации конформационно подвижных MutS и MutL использованы новые типы реакционноспособных ДНК. Введение модификации в ДНК осуществлялось постсинтетически; строение модифицированных ДНК подтверждали методом масс-спектрометрии MALDI TOF.

Для проведения «кросслинkinга» получены 6 мутантных форм esMutL, содержащих единственный остаток Cys в выбранном положении белка. Их активность в системе MMR проверяли по способности инициировать внесение esMutH одноцепочечного разрыва в

плазмидную ДНК. За ходом реакции «кросслинкинга» между реакционноспособными ДНК и MutS или MutL следили методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях. Конъюгаты мутантных форм *esMutS(N497C)* и *esMutS(A336C)* с пиридилдисульфидсодержащими ДНК выделяли методом анионнообменной хроматографии. Функциональная активность *esMutS* в конъюгатах продемонстрирована флуоресцентными методами. Способность *esMutS(N497C)* «разгибать» флуоресцентно-меченную ДНК в конъюгате при связывании АТФ показана методом «остановленного потока». Также методом FRET показано, что *esMutS* в ковалентно связанном комплексе эффективно взаимодействует с *esMutL*.

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 есMutS(A469C) и есMutS(N497C). есMutS в комплексе с «мисматчем», расположенным на конце ДНК, может находиться в новом, ранее неопisanном, конформационном состоянии.

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

Апробация работы

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.

Публикации

По результатам работы опубликовано 7 статей в российских и международных рецензируемых научных журналах, а также представлены в сборниках тезисов научных конференций.

Статьи по теме диссертации:

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 АТФ 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., Набережнов 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).

Структура и объём диссертации

Текст диссертации состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, списка литературы, который включает 287 источников. Объём диссертации 168 страниц, материал иллюстрирован 67 рисунками и содержит 13 таблиц.

II. Обзор литературы

II.1. Общие представления о функционировании системы репарации «мисматчей» в ДНК

II.1.1. Общие представления о системе репарации «мисматчей»

В процессе репликации из-за неточности работы полимераз в ДНК возникают некомплементарные пары нуклеотидов («мисматчи») и короткие инсерционные/делеционные петли, являющиеся источником последующих мутаций в генах [29]. Система репарации «мисматчей» в ДНК (MMR) является одним из нескольких путей эксцизионной репарации ДНК, которая узнает и исправляет подобные «ошибки» ДНК-полимераза.

Помимо исправления «мисматчей», MMR участвует в клеточных ответах на широкий спектр мутагенных повреждений ДНК, включая метилированные нуклеотиды (O⁶-метилгуанозин), окислительные повреждения ДНК (8-оксогуанозин), межцепочечные сшивки в ДНК и деформирующие двойную спираль модификации [30–34]. К последним относятся различные типы повреждений нуклеотидов, в том числе внутрицепочечные поперечные «сшивки», индуцированные УФ-светом, и объемные аддукты нуклеотидов, образующиеся при воздействии гетероциклических аминов [30,35,36].

Дефекты в одном из генов белков системы MMR у человека (MSH2, MSH6, MLH1 или PMS2) вызывают увеличение общего уровня мутаций и генетической неустойчивости, что является признаками синдрома Линча. Люди с синдромом Линча (наследственный неполипозный рак прямой кишки) подвержены повышенному риску возникновения опухолевых образований в толстой и тонкой кишке, желудке, печени, поджелудочной железе, желчном пузыре, яичниках, предстательной железе, мочевыводящих путях, мозге и сальных железах [37,38]. Среди всех описанных наследственных состояний, приводящих к развитию рака, синдром Линча является наиболее распространенным (один случай на 400 человек) [39]. С мутациями в генах белков MMR связано еще одно редкое наследственное состояние, называемое конституциональным дефицитом системы репарации «мисматчей» (constitutional mismatch repair-deficiency или CMMRD). CMMRD - синдром детской предрасположенности к различным видам онкологических заболеваний, в том числе к раку крови, мозга и кишечника [40].

Помимо исправления ошибок репликации белки системы MMR координируют связанную с транскрипцией эксцизионную репарацию нуклеотидов, мейотическую рекомбинацию, вовлечены в контроль клеточного цикла и апоптоз [41]. Так, обнаружение белками MMR алкильных повреждений и внутрицепочечных сшивок в ДНК приводит к остановке клеточного цикла и последующему апоптозу в том случае, если повреждения многочисленны. В свою

очередь опухолевые клетки, в которых не происходит процесс репарации, чрезвычайно устойчивы к воздействию алкилирующих агентов [42]. Важность дополнительных функций белков системы MMR подтверждает тот факт, что приблизительно одна четверть всех спорадических раковых заболеваний связана с нарушениями функционирования системы репарации ДНК-«мисматчей» [43].

MMR состоит из четырех основных стадий: узнавание повреждения; распознавание «дочерней» цепи с ошибочно встроенным нуклеотидом; деградация фрагмента ДНК, содержащего «ошибку»; повторный синтез цепи ДНК и лигирование. Однако, функционирование системы MMR в разных организмах может отличаться.

II.1.2. Система репарации «мисматчей» в *E. coli*

MMR была впервые открыта в *E. coli* группой д-ра Меселсона [44,45] и впоследствии полностью реконструирована *in vitro* из выделенных компонентов [46]. За выяснение механизма функционирования MMR в *E. coli* в 2015 г. была присуждена Нобелевская премия проф. Молдричу. Несмотря на то, что в этой бактерии репарация «мисматчей» протекает отличным от большинства организмов образом, механизм узнавания некомплементарной пары в *E. coli* послужил моделью для понимания процесса MMR в других организмах.

MMR, характерная для *E. coli*, осуществляется только в некоторых γ -протеобактериях: в классах *Enterobacteriales* (куда входит *E. coli*), *Pasteurellales*, *Vibrionales*, *Aeromonadales*, а также в бактериях, которые, как предполагается, приобрели данный механизм MMR в результате горизонтального переноса генов [47]. В вышеперечисленных организмах ДНК-метилтрансфераза Dam модифицирует №6 положение аденозина в палиндромной последовательности 5'-GATC-3'/3'-CTAG-5' [48]. Сразу после прохождения репликации участки узнавания Dam на очень короткий промежуток времени остаются монометилированными, так как метилирование в «дочерней» цепи не успевает пройти полностью. Образующиеся монометилированные участки являются маркером для распознавания «дочерней» цепи системой MMR. Такой механизм носит название метил-направленной MMR [45,49]. В клетках отсутствие метилирования аденозина, или, напротив, его метилирование в обеих цепях участка узнавания Dam приводит к накоплению мутаций, что подтверждает необходимость наличия монометилированных участков для правильного протекания MMR [50,51]. Время, за которое монометилированные участки полностью метилируются, составляет от нескольких секунд (в случае плазмидных субстратов) до минут (для хромосом) [52–54]. Такая быстрая потеря сигнала дискриминации двух цепей ДНК требует эффективного узнавания и исправления «мисматчей» системой MMR.

Процесс репарации «мисматчей» обеспечивается взаимодействием более 10 белковых компонентов, скоординированном во времени и пространстве (табл. 1, рис. 1). Процесс репарации «мисматчей» начинается с узнавания некомплементарной пары белком MutS (в

бактериях гомодимер). MutS узнает почти все некоплементарные пары, которые затем исправляются системой MMR, однако сродство белка к ДНК и эффективность репарации могут зависеть от природы «мисматча» и нуклеотидной последовательности вокруг него [55]. В экспериментах *in vitro* продемонстрировано, что поиск «мисматча» MutS заключается в трехмерном скольжении белка по ДНК, которое включает в себя поступательное и вращательное движения белка вдоль углеводофосфатного остова [11,56]. Такой комплекс MutS с ДНК называют «сканирующим комплексом». Недавно структура этого комплекса была получена с помощью крио-электронной микроскопии. Показано, что ДНК, не содержащая «мисматч», в составе «сканирующего комплекса» частично изогнута. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что MutS постоянно сгибает-разгибает ДНК в поисках некоплементарной пары оснований [57]. После нахождения «мисматча» MutS образует стабильный комплекс с ДНК, изгибая ее на ~45-60° в месте «ошибки», что необходимо для эффективного формирования π -взаимодействий между одним из оснований «мисматча» и консервативным остатком Phe «мисматч»-связывающего домена одной из субъединиц белка [8,55,57]. В комплексе MutS с «мисматчем» домены белка располагаются таким образом, что при связывании с АТФ MutS переходит в конформацию «скользящий зажим». Такой сценарий не реализуется в случае комплекса MutS с ДНК канонического строения. Это объясняется тем, что формирование специфического комплекса MutS с «мисматчем» снимает стерические препятствия для дальнейших конформационных переходов [57]. При дальнейшем взаимодействии MutS с АТФ происходит ряд структурных перестроек в белке, при которых MutS больше не образует специфические контакты с «мисматчем», и ДНК перестает быть изогнутой в таком комплексе («скользящий зажим»). MutS в конформации «скользящий зажим» способен быстро перемещаться в обоих направлениях от «мисматча» по ДНК и формировать комплекс со следующим ключевым участником системы MMR – белком MutL (рис. 1) [57–59].

Бактериальные белки MutL представляют собой гомодимерные АТФазы, принадлежащие к семейству GHKL. В состав семейства входят ДНК-гиразы, белки теплового шока Hsp90, гистидинкиназы и белки MutL (*gyrase*, *Hsp90*, *histidine kinase* и *MutL*) [60]. Основная роль MutL – координация белок-белковых взаимодействий в процессах узнавания повреждения и удаления фрагмента одной из цепей ДНК, поэтому этот белок был исторически классифицирован как «молекулярный посредник» [61]. На сегодняшний день экспериментально продемонстрировано образование белком MutL «скользящего зажима» после взаимодействия с MutS, ДНК и АТФ, который способен передвигаться по ДНК в обоих направлениях и даже преодолевать ДНК-белковые комплексы [10,58,62]. Формирование тройного комплекса между MutS, MutL и ДНК, содержащей «мисматч», достаточно для того, чтобы активировать эндонуклеазу MutH из *E. coli*.

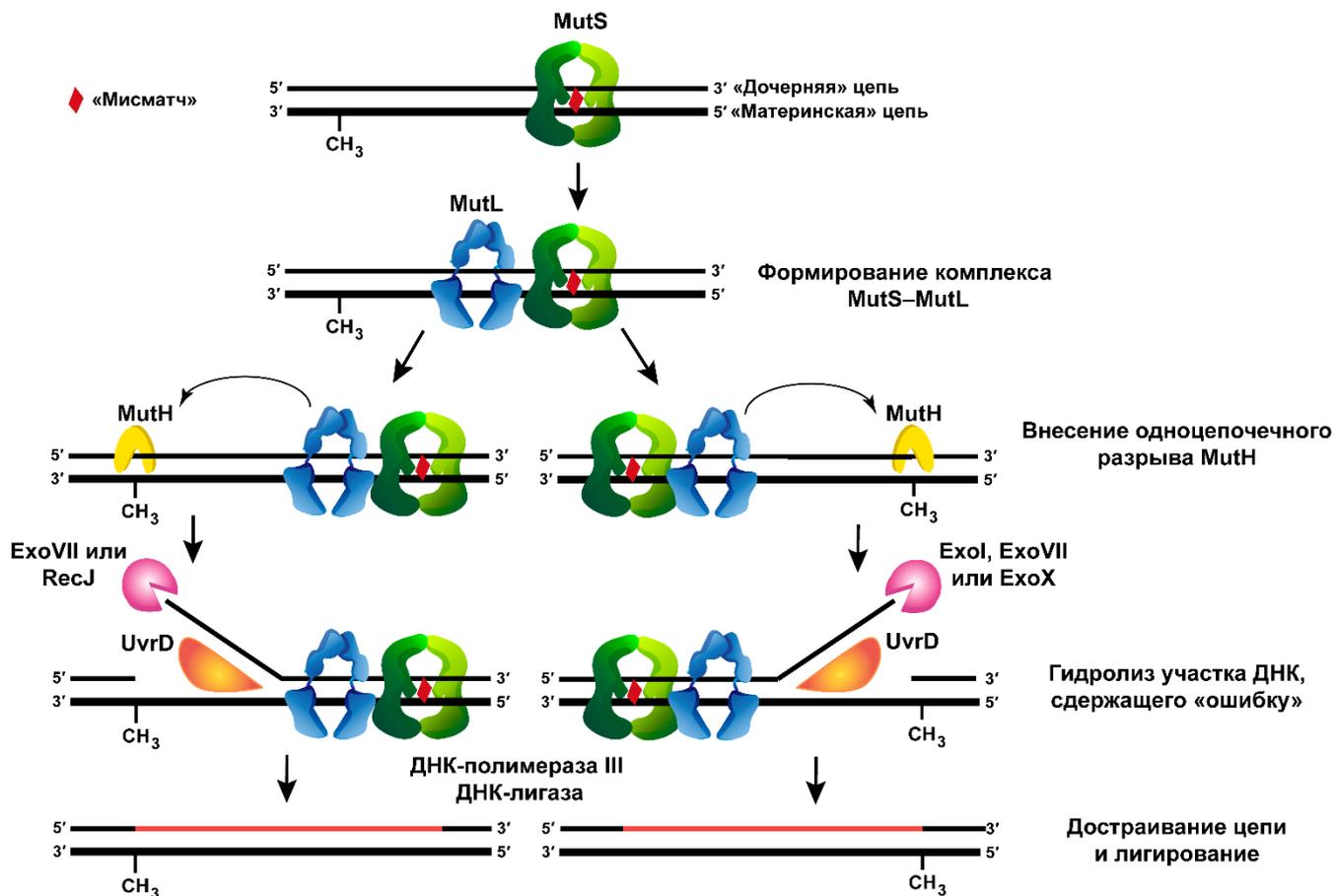


Рис 1. Общая схема процесса MMR в клетках *E. coli*.

MutH – сайт-специфическая никующая эндонуклеаза, которая вносит одноцепочечный разрыв («ник») в неметилированную цепь монометилированного участка 5'-Gm⁶ATC-3'/3'-СТАG-5' (рис. 1) [63]. MutH представляет собой мономерную эндонуклеазу того же семейства, что и эндонуклеаза рестрикции Sau3AI, и узнает неметилированный аденозин «дочерней» цепи используя остаток тирозина (в *E. coli* Y212) [64–66]. Низкая индивидуальная эндонуклеазная активность белка MutH увеличивается в 20–70 раз при взаимодействии с комплексом MutS–MutL [67–69]. Таким образом, белок MutH является связующим звеном между белками MMR, распознающими некомплементарную пару в ДНК, и метилтрансферазой Dam, обеспечивающей условия для дискриминации новосинтезированной цепи.

Тройной комплекс MutS-MutL-ДНК также активирует ДНК-хеликазу II (UvrD) [70]. UvrD использует одноцепочечный разрыв, внесенный MutH, как стартовую точку для начала расплетания цепей ДНК вне зависимости от того, находится ли разрыв в направлении с 5' или 3' от «мисматча» [71,72]. Высвободившийся участок дочерней ДНК гидролизует определённый набор экзонуклеаз: в случае если одноцепочечный разрыв локализован в 5'-направлении от «мисматча», MutH «привлекает» экзонуклеазы RecJ или ExoVII для удаления вновь синтезированной цепи. Если MutH гидролизировал ДНК в 3'-направлении от «мисматча» в

процессе репарации участвуют экзонуклеазы ExoI, ExoVII или ExoX. Как только цепь, содержащая «ошибку», удалена, белок, связывающий одноцепочечную ДНК (SSB – single-strand binding protein), стабилизирует одноцепочечный фрагмент материнской ДНК. Затем ДНК-полимераза III синтезирует правильную нуклеотидную последовательность, и ДНК-лигаза ликвидирует разрыв в олигонуклеотидной цепи [73].

II.1.3. Система репарации «мисматчей» в организмах, не содержащих MutH

Как уже упоминалось, гомологи белка MutH обнаружены только в некоторых γ -протеобактериях; в большинстве организмов эндонуклеазную функцию выполняет белок MutL. Гомологи MutL в таких организмах имеют консервативный эндонуклеазный мотив, который обеспечивает внесение одноцепочечного разрыва в «дочернюю» цепь ДНК [5] (см. далее). Бактериальные системы MMR, не содержащие MutH и, следовательно, метилнезависимые, мало изучены. Бактериальные MutL с эндонуклеазной функцией были выделены и охарактеризованы только для нескольких микроорганизмов: *A. aeolicus*, *B. subtilis*, *N. gonorrhoeae*, *T. thermophiles*, *P. aeruginosa* [13,74–77]. В данной работе был клонирован и выделен белок MutL из *R. sphaeroides* и получены первые сведения о его свойствах (см. раздел IV.1.4. и [78]). У белков MutL с эндонуклеазной функцией отсутствует сайт-специфичность, и они способны гидролизовать ДНК независимо от нуклеотидной последовательности [79,80]. Именно то обстоятельство, что бактериальные MutL являются гомодимерами, определяет необходимость четкой регуляции их действия во избежание внесения ими двуцепочечных разрывов в ДНК. Однако вопрос о том, как происходит узнавание «дочерней» цепи в большинстве бактерий, до сих пор остается нерешенным.

Следует отметить, что значительный прогресс в понимании механизма метилнезависимой репарации «мисматчей» был достигнут в случае эукариот. В эукариотах, в отличие от прокариот, гомологи MutS и MutL – гетеродимеры (табл. 1). Важнейшими компонентами системы MMR эукариот являются белки MutS α (гетеродимер MSH2–MSH6) и MutL α (в клетках человека: гетеродимер MLH1–PMS2; в клетках дрожжей *S. cerevisiae*: гетеродимер MLH1–PMS1) [81–83]. MutS α взаимодействует с «мисматчем» и короткими инсерционными/делеционными петлями. При возникновении в ДНК более длинных петель (2–12 пар нуклеотидов, п.н.) вместо MutS α в узнавании дефекта ДНК участвует MutS β (гетеродимер MSH2–MSH3) [84,85]. Белок MutL α является эндонуклеазой; после формирования комплекса MutS α –MutL α или MutS β –MutL α он вносит одноцепочечный разрыв в «дочернюю» цепь ДНК (табл. 1).

В дополнение к основным белкам в эукариотическую систему MMR входят и многие другие белки: экзонуклеаза EXO1 [88–91]; фактор процессивности ДНК-полимеразы δ (PCNA) и

Таблица 1. Белки, вовлеченные в процесс репарации ДНК-«мисматчей» [86].

γ-Протеобактерии (<i>E. coli</i>)	Другие эубактерии	Эукариоты (клетки человека)	Функции
MutS	MutS	MutSα (MSH2–MSH6)	Узнавание «мисматчей» и инсерций/делеций 1-2 нуклеотидов
		MutSβ (MSH2–MSH3)	Узнавание инсерций/делеций >2 нуклеотидов
-	MutS2*	MSH4-MSH5	Узнавание структур Холлидея и участие в мейозе
MutL	MutL**	MutLα (MLH1–PMS2**)	Молекулярный посредник в MMR
		MutLβ (MLH1–PMS1)	?
		MutLγ (MLH1–MLH3*)	Молекулярный посредник в мейозе
MutH	-	-	Вносит разрыв в монометилированную последовательность в ДНК
RecJ, ExoVII	RecJ, ExoVII	ExoI	5'-3'-экзонуклеаза
ExoVII, ExoI, ExoX	-	-	3'-5'-экзонуклеаза
Хеликаза II (UvrD)	Хеликаза II (UvrD)	-	3'-5'-хеликаза
Полимераза III	Полимераза III	Полимераза δ	Синтез ДНК
β-субъединица полимеразы III	β-субъединица полимеразы III	PCNA	Субъединица процессивности (β-«зажим»)
γ-комплекс	γ-комплекс	RFC	Комплекс локализации «зажима»
SSB	SSB	RPA	Защита одноцепочечной ДНК от деградации и дестраивания
Лигаза A	Лигаза	Лигаза I	Лигирование разрыва после дестраивания ДНК

* присутствует в некоторых эубактериях [87]

** - белок обладает дополнительной эндонуклеазной активностью

PCNA (proliferating cell nuclear antigen) – ядерный антиген пролиферирующих клеток

RFC (cellular replication factor) – фактор репликации клеток

RPA (replication protein A) – репликативный белок A

репликативный фактор С (RFC), необходимый для посадки PCNA на ДНК [92–96]; репликативный белок А (RPA), связывающий одноцепочечные участки ДНК [95,97,98]; ДНК-полимераза δ (Pol δ) [94,99–102]; эндонуклеаза MutL γ (гетеродимер MLH1–MLH3) [103–105]; ДНК-лигаза I [99] и РНКазы H2 [106,107] (табл. 1). Также было показано взаимодействие белков системы репарации «мисматчей» с поли(АДФ-рибоза)-полимеразой 1 (PARP1) [108] и продемонстрировано влияние белкового комплекса CAF-1 [109,110] и метилирования гистона H3K36 [111] на функционирование MMR.

Репарация «мисматчей» в клетках эукариот может проходить по EXO1-зависимому и EXO1-независимому путям (рис. 2). Основным механизмом MMR у эукариот считается EXO1-зависимая репарация. Белок EXO1 является 5'-3'-экзонуклеазой, поэтому наличие «ника» с 5'-стороны от «мисматча» используется EXO1 в качестве отправной точки для 5'-3'-направленного удаления фрагмента «дочерней» цепи, содержащей «ошибку». Однако, как и в клетках *E. coli*, в эукариотах MMR бинаправлена, но в данном случае ход процесса определяется тем, с какой стороны от «мисматча» (5' или 3') локализованы одноцепочечные разрывы. Если «ник» находится с 3'-конца от «мисматча», то активированная эндонуклеаза MutL α гидролизует такую ДНК, внося разрывы с 5'-стороны от «мисматча», таким образом обеспечивая EXO1-зависимую репарацию [112]. В этом случае белок RFC, помимо посадки PCNA на ДНК, регулирует активность EXO1, тем самым защищая ДНК от нежелательной деградации [95]. Наличие «ника» с 5'-конца от «мисматча» достаточно для инициации MMR, и внесение дополнительного разрыва в ДНК белком MutL α не требуется. В этом случае EXO1 может непосредственно контактировать с MutS α , что стимулирует экзонуклеазную функцию фермента [113].

В отсутствие EXO1 система MMR может обойтись без стадии удаления фрагмента ДНК (EXO1-независимый механизм) [102]. Для реализации этого механизма необходимы белки MutS α , MutL α , PCNA, RFC и Pol δ , а также наличие «ника» в «дочерней» цепи. В этом случае MutL α гидролизует «дочернюю» цепь ДНК, внося одноцепочечный разрыв с 5'-стороны от «мисматча». Pol δ синтезирует новый фрагмент ДНК, используя в качестве стартовой позиции образующийся в месте разрыва 3'-конец. За счет синтеза новой цепи холоферментом Pol δ происходит вытеснение цепи, содержащей «ошибку». В ходе процесса происходит активация белка RPA, который связывает одноцепочечную ДНК, препятствуя образованию ДНК-дуплекса (рис. 2). Показано, что скорость EXO1-независимой MMR значительно ниже, чем скорость репарации с участием EXO1, поэтому в клетках, вероятнее всего, процесс репарации «мисматчей» проходит по EXO1-зависимому механизму [102].

Ключевой особенностью MMR является ее специфичность, которая гарантирует исправление «мисматча» в «дочерней» цепи, а не в «материнской». Удаление нуклеотида,

находящегося в «материнской» цепи, из некомплементарной пары превращает «ошибку» репликации в мутацию. Одним из сигналов дискриминации «дочерней» цепи ДНК в эукариотах являются одноцепочечные разрывы («ники»), возникающие при репликации ДНК. Процесс репликации ДНК по своей природе является ассиметричным и протекает по разным механизмам в случае «лидирующей» и «отстающей» цепей. Синтез «лидирующей» цепи ведется непрерывно, в то время как «отстающая» цепь синтезируется короткими фрагментами (фрагменты Оказаки). Наличие разрывов между фрагментами Оказаки в «дочерней» цепи считается основным фактором дискриминации цепей при репарации «мисматчей» в «отстающей» цепи ДНК [114].

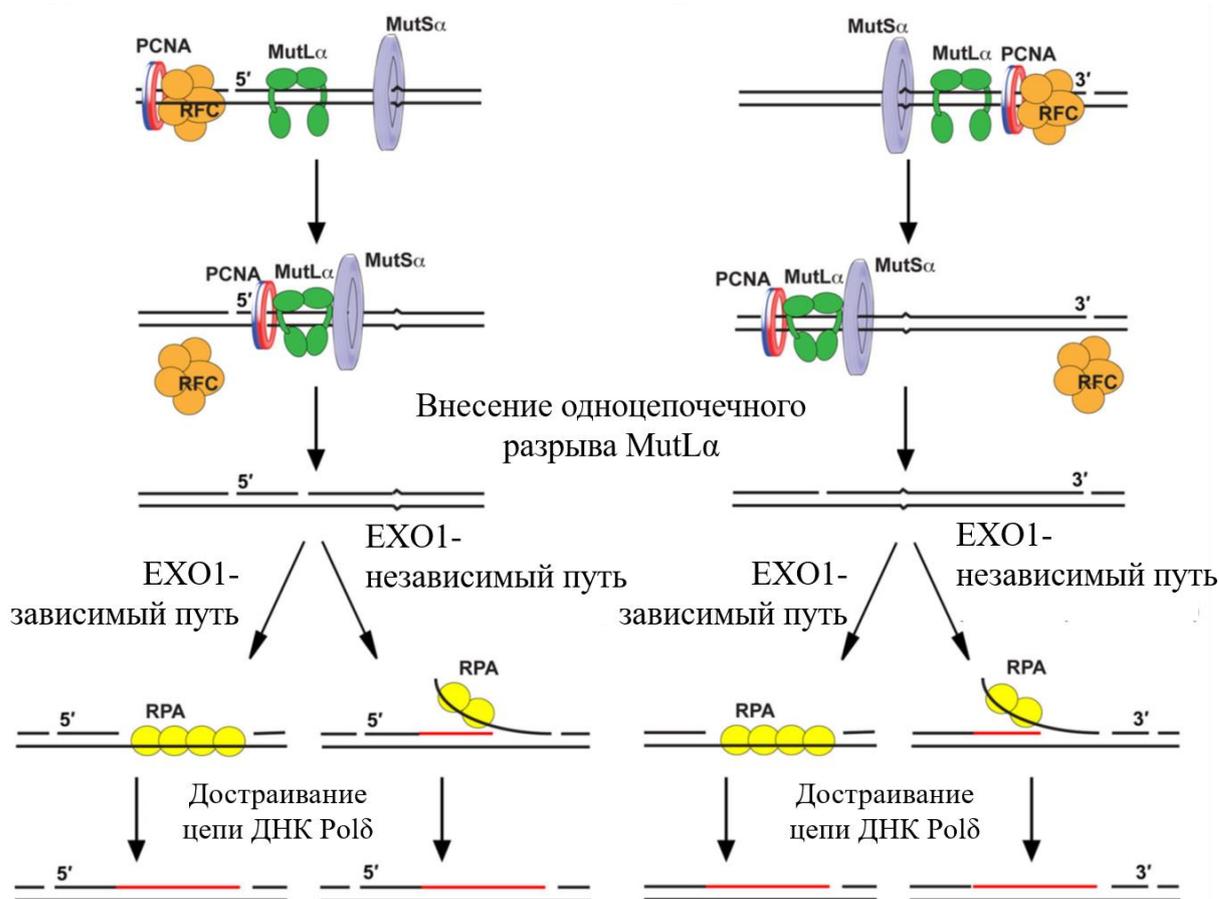


Рис. 2. Модели EXO1-зависимой и EXO1-независимой MMR в клетках человека [113].

Полагают, что одноцепочечные разрывы, направляющие действие MMR, возникают в «лидирующей» цепи в ходе эксцизионной репарации рибонуклеотидов (RER – *ribonucleotide excision repair*). Показано, что ДНК-полимеразы ϵ , δ и α дрожжей встраивают один рибонуклеотид на 1250, 500 и 625 нуклеотидных остатков (н.о.) соответственно. Эти рибонуклеотиды удаляются РНКазой H2 на первой стадии процесса RER. Одноцепочечные разрывы, образующиеся при этом, находятся только в «дочерней» цепи, что может быть сигналом для направленного действия MMR [114].

II.2. Существующие модели активации системы MMR

Вопрос о том, каким образом сигнал о распознавании «мисматча» передаётся на большое расстояние до места гидролиза «дочерней» цепи (до 1-2 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.)), вызывает наибольшие дискуссии. Экспериментальные данные, касающиеся механизма MMR, противоречивы и позволили сформировать несколько разных возможных моделей функционирования системы репарации «мисматчей» [9].

В целом существующие модели активации MMR можно разделить на мобильные и стационарные (рис. 3). В мобильных моделях предполагается движение белков по ДНК после узнавания «мисматча», а в стационарных MutS остаётся связанным с «мисматчем». Так, основываясь на данных электронной микроскопии и изучении АТФазной активности MutS, предложена модель, в которой циклический гидролиз АТФ молекулами MutS ведёт к его направленному движению от «мисматча» к месту гидролиза [115,116]. Ещё одной мобильной моделью является образование «скользящего зажима», которая предполагает движение комплекса MutS-MutL по ДНК [58,117–119].

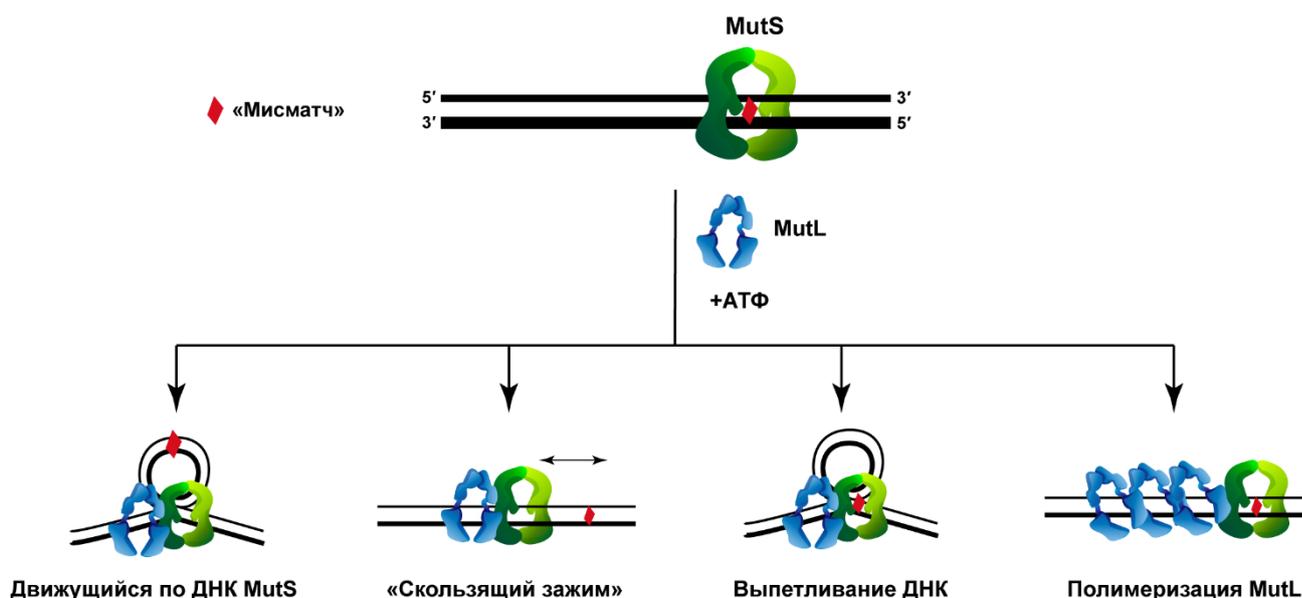


Рис. 3. Модели активации системы репарации «мисматчей».

В противовес мобильным моделям стационарные предполагают прямое взаимодействие белков системы репарации с местом гидролиза. Такое взаимодействие может быть осуществлено с помощью выпетливания ДНК [119]. Однако показано, что каталитически неактивный EcoRI(E111Q), связанный с ДНК между «мисматчем» и монометилированной последовательностью 5'-Gm⁶АТС-3'/3'-СТАГ-5', ингибировал активацию MutH [120]. В тоже время, продемонстрировано, что фиксация MutS в области «мисматча» не препятствует активации системы MMR [121].

Визуализация белков MMR в живых клетках *S. cerevisiae* показала, что MSH2-MSH6 во время фазы синтеза (S-фазы) находится в центрах репликации, в то время как скопления MLH1-PMS1 редко находятся в том же месте, несмотря на тот факт, что для привлечения белков MutL необходим MutS [120]. Одно из возможных объяснений заключается в том, что MSH2-MSH6, связанный с «мисматчем», привлекает большое количество молекул MLH1-PMS1 [120]. Основываясь на этом была сформулирована «модель полимеризации». Эта стационарная модель предполагает, что молекулы MLH/PMS «нанизываются» на ДНК от MSH, связанного с «мисматчем», до места гидролиза. Исследование отдельных молекул MutS и MutL из *T. aquaticus* с помощью FRET показывают, что MutL, по-видимому, удерживает MutS на «мисматче» или вблизи него после того, как MutS распознал «ошибку» [122]. Как и клеточные исследования *S. cerevisiae*, эти наблюдения, согласуются с тем, что многие молекулы MutL, по-видимому, взаимодействуют с MutS, связанным с «мисматчем», что приводит к полимеризации MutL на ДНК [122].

Опровергая «модель полимеризации», Горман и соавт. визуализировали отдельные MSH2-MSH6 и MLH1-PMS1 из *S. cerevisiae* на ДНК фага λ (48,5 т.п.н.), которая содержала три повторяющихся «мисматча» G/T [11]. Исследования на уровне одной молекулы в режиме реального времени показали, что MLH1-PMS1 взаимодействует с MSH2-MSH6, связанным с «мисматчем», а затем этот комплекс диффундирует от «мисматча» независимо от гидролиза АТФ, что подтверждает модель образования «скользящего зажима». Однако модель полимеризации MutL не может полностью отвергнута, поскольку концентрация MLH1-PMS1 (5 ~ 20 нМ) в экспериментальных условиях может быть намного ниже его физиологической концентрации, а также зонды, прикрепленные к белкам, могли помешать полимеризации. Несмотря на обширные усилия по решению этих спорных вопросов, ни для одного организма не был четко установлен механизм взаимодействия MSH и MLH/PMS.

Недавно был сконструирован тройной комплекс компонентов MMR на ДНК с «мисматчем» с использованием есMutS, есMutL и есMutH, меченных флуорофорами [10]. Визуализация в реальном времени отдельных белков есMutS, есMutL и есMutH на ДНК размером 17,3 т.п.н. с «мисматчем» позволила провести анализ динамических характеристик каждого белка и промежуточных взаимодействий между ними. В этих исследованиях обнаружено, что есMutL взаимодействует с есMutS, связанным с АТФ, образуя «скользящий зажим», после «соскальзывания» с «мисматча». Интересно, что комплекс есMutS-есMutL находится между состояниями ассоциации и диссоциации. Более того, идентифицирован стабильный «скользящий зажим» есMutL, который быстро диффундирует вдоль ДНК. Для формирования «скользящего зажима» есMutL требовалось, чтобы как есMutL, так и есMutS связал АТФ. «Скользящий зажим» есMutL или комплекс есMutS-есMutL, связанные с АТФ,

привлекают *ecMutH*, образуя комплексы *ecMutL-ecMutH* или *ecMutS-ecMutL-ecMutH*, способные осуществлять поиск метилированного участка узнавания *Dam* путем одномерной диффузии вдоль ДНК за счет контактов с углеводофосфатным остовом ДНК. Интересно, что время жизни «скользящего зажима» *MutL*, связанного с АТФ, на ДНК (~ 800 с) в четыре раза больше, чем *MutS*, связанного с АТФ (~200 с). Таким образом, множество «скользящих зажимов» *ecMutL* может быть «загружено» на ДНК благодаря *MutS*. Это наблюдение, по-видимому, объясняет избыток комплексов *MLH1-PMS1*, образовавшихся на расстоянии многих нуклеотидных пар от *MSH2-MSH6* в живых клетках *S. cerevisiae*, описанное ранее [120].

Рассмотренные исследования убедительно показали, что «скользящие зажимы» гомологов *MutS* и *MutL* способны достигать места гидролиза «дочерней» цепи путем диффузии, по крайней мере, в *E. coli*. Таким образом, на сегодняшний момент наибольшее количество экспериментальных данных свидетельствует в пользу образования «скользящих зажимов».

II.3. Белки *MutS* и *MutL* как ключевые участники процесса репарации «мисматчей» в ДНК

II.3.1. Структурная организация белков *MutS*

Белки *MutS* различных организмов структурно очень схожи друг с другом. Они образуют димеры (гомодимеры в прокариотах и гетеродимеры в эукариотах), каждая субъединица которых состоит из нескольких доменов: «мисматч»-связывающего, соединительного, рычажного, АТФазного, домена «зажим», корового и мотива «спираль–поворот–спираль». Расположение доменов в *MutS* и количество аминокислотных остатков (а.о.) в них входящих изображено на рис. 4.

Белки *MutS* принадлежат к семейству АТФаз ABC (от англ. АТР binding cassette), представители которого используют АТФ для регуляции своей активности [123]. *MutS* имеет характерную консервативную петлю, выступающую из одной субъединицы и дополняющую активный центр АТФазного домена в другой субъединице димера [124]. Ключевым в АТФазном домене является остаток аспарагиновой кислоты (*Asp693* в *ecMutS*), которая координирует две молекулы воды через ион магния. В *MutS* для катализа гидролиза АТФ необходим также остаток *Glu*. Замены этих а.о. приводят к частичной или полной инактивации системы репарации [124].

Белки *MutS* имеют две основных функции: АТФазную и ДНК-связывающую. Обе эти функции необходимы для прохождения процесса репарации «мисматчей» *in vivo* [29,125–127].

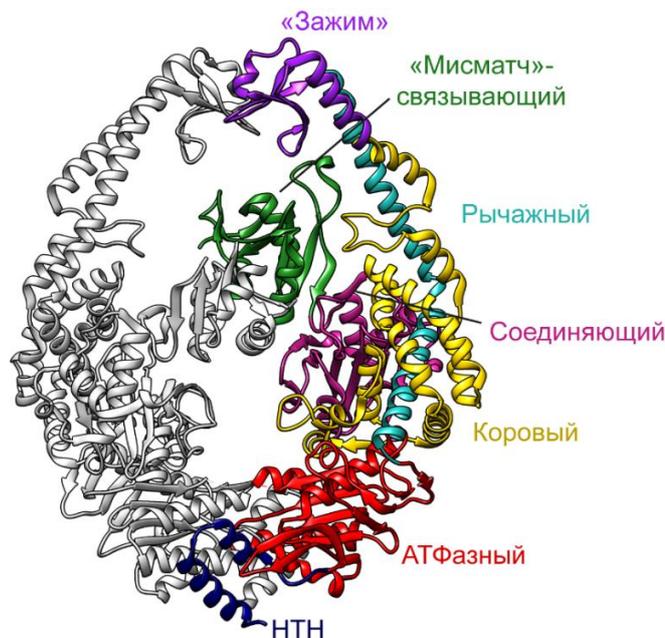


Рис. 4. Строение гомодимера MutS из *E. coli* (PDB: 1E3M). На субъединице А «мисматч»-связывающий домен (а.о. 2-115) выделен зелёным цветом, соединяющий домен (а.о. 116-266) – розовым, коровый домен (а.о. 267-443) – желтым, рычажный домен (а.о. 504-567) – голубым, домен «зажим» (а.о. 444-503) – фиолетовым, АТФазный домен (а.о. 568-765) – красным, мотив НТН (а.о. 766-800) – синим. Субъединица Б MutS изображена серым цветом.

Каждая субъединица MutS вносит свой вклад в связывание ДНК и АТФазную активность димера. Координация между субъединицами и обеими функциями важна для эффективной работы белка. В связывании ДНК участвуют два разных домена: домен «зажим» и «мисматч»-связывающий домен. Домены «зажим» в димере охватывают спираль ДНК, при этом специфическое взаимодействие с «мисматчем» осуществляется мотивом Phe-X-Glu «мисматч»-связывающего домена только одной субъединицы (субъединица А) в прокариотическом гомодимере [8,55] или MSH6 в MutS α [128] и преимущественно MSH3 в MutS β [129].

«Мисматч»-связывающий домен контактирует с соединительным доменом, который важен для взаимодействия с белками MutL [130]. Коровый и АТФазный домены также участвуют в этом взаимодействии [131]. Ближе к С-концу димера белка находится домен «спираль–поворот–спираль», который стабилизирует димер, контактируя с АТФазным доменом противоположной субъединицы [132].

есMutS может образовывать тетрамеры путем взаимодействия между С-концевыми доменами димеров MutS [133,134]. Образующиеся тетрамеры белка нестабильны. В растворе белок всегда существует в равновесии димер-тетрамер. Роль тетрамеризации MutS неизвестна. Предполагается, что она важна для осуществления антирекомбинационной функции MutS [135]. Для протекания MMR тетрамеризация не важна; это было показано биохимически с использованием мутантных форм MutS, которые не способны формировать тетрамеры [136,137].

II.3.2. Различные конформации MutS

Конформационные изменения в MutS позволяют переключать различные стадии в процессе MMR: сканирование ДНК, узнавание и связывание ДНК в месте «мисматча», активация белка MutL и последующие этапы репарации. Образование MutS множества конформаций связано с особым статусом белка, в котором он использует АТФ для распознавания некомплементарной пары в ДНК. В растворе две субъединицы как в гомодимерах MutS, так и в гетеродимерах MutS α и MutS β не одинаково гидролизуют АТФ [138–140] в процессе сложного АТФазного цикла [122,141–143] (рис. 5). После узнавания «мисматча» АДФ в MutS быстро обменивается на АТФ [144–146], а гидролиз АТФ ингибируется [139,144,147,148]. Взаимодействие с АТФ индуцирует конформационные изменения в MutS, которые необходимы для активации MutL и инициации репарации [139,145–147]. Если MutS не находит «мисматч», связывание АТФ приводит к диссоциации комплекса белка с ДНК.

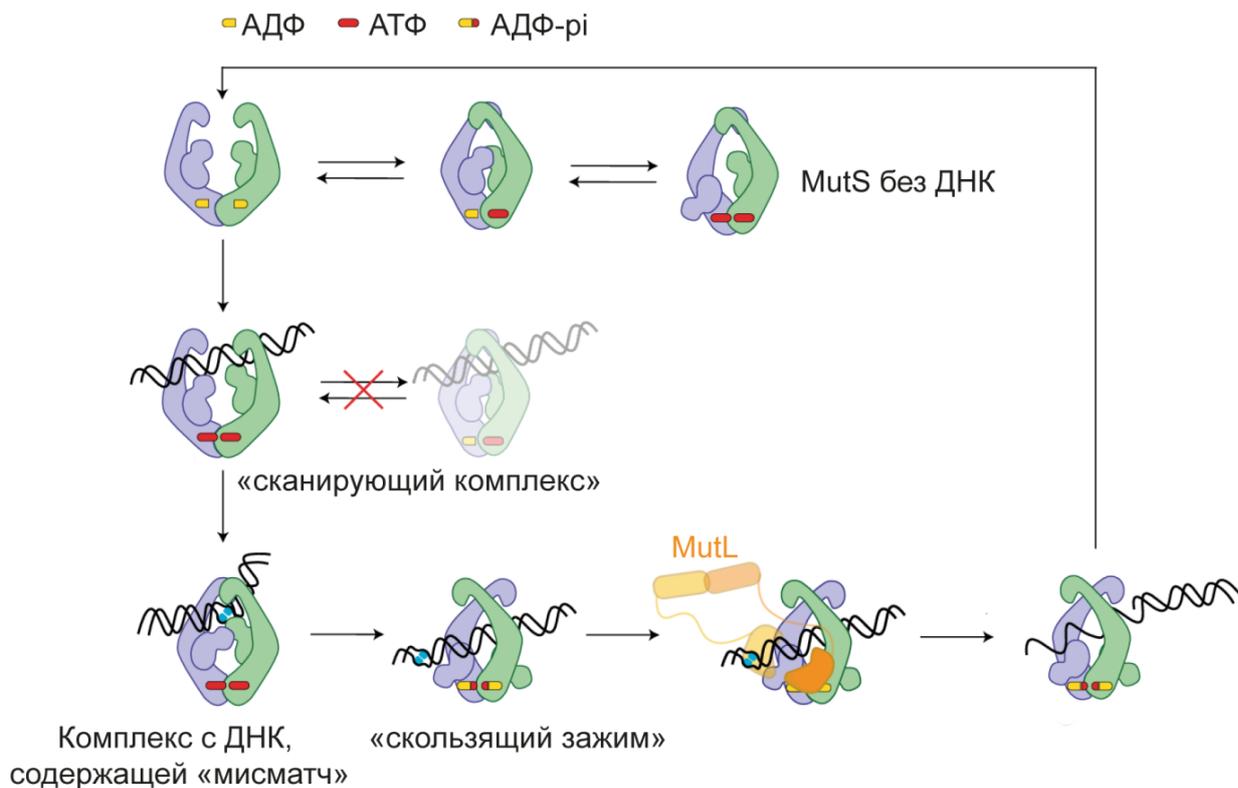


Рис. 5. Схема АТФазного цикла MutS, предложенная согласно работе [149]. В отсутствие ДНК гомодимер MutS при связывании и гидролизе АТФ существует как в «открытом», так и в «закрытом» состояниях. После образования комплекса с ДНК, не содержащей «мисматча» («сканирующий комплекс»), димер MutS больше не может переходить в «закрытую» форму и гидролизовать АТФ; способность обменивать АДФ на АТФ сохраняется. После узнавания и связывания «мисматча» MutS трансформируется в «скользящий зажим», который способен гидролизовать АТФ. В этой конформации MutS образует на ДНК комплекс с MutL (обозначен оранжевым цветом) и инициирует процесс репарации. При обнаружении одноцепочечного участка ДНК MutS покидает ДНК и принимает «открытую», связанную с АДФ, форму, которая способна снова взаимодействовать с ДНК-лигандом. Неорганический фосфат обозначен как рi.

Несмотря на большое количество исследований, долгие годы на многие вопросы о структуре и функционировании MutS на ДНК не удавалось ответить из-за конформационной мобильности белка и его динамической подвижности. В недавно опубликованных работах с помощью крио-электронной микроскопии получены четыре структуры есMutS без ДНК, а также четыре комплекса MutS-ДНК на различных стадиях его функционирования [57,149]. В результате удалось уточнить АТФазный цикл MutS, установить структурную взаимосвязь между связыванием белком «мисматча» и дальнейшим его переходом в состояние «скользящий зажим» и зафиксировать MutS в «сканирующем комплексе» [57,149].

II.3.2.1. MutS, не связанный с ДНК (apo-форма)

Кристаллические структуры белков MutS, не содержащие ДНК, демонстрируют неструктурированность в области доменов «зажим» [8,150]. Не так давно была получена кристаллическая структура есMutS, где наблюдается значительный изгиб в рычажном домене одной из субъединиц белка [151] (рис. 6). Такая конформационная гибкость необходима для «открытия» белка. В результате ДНК проникает в ДНК-связывающий центр есMutS. Также «открытие» доменов позволяет диссоциировать комплексу есMutS-ДНК, в случае если «мисматч» не найден. Формирование комплекса есMutS с ДНК стабилизирует закрытое состояние доменов «зажим». В этом состоянии есMutS сканирует ДНК, вращаясь вдоль ее углеводофосфатного остова [11,56,122,152].

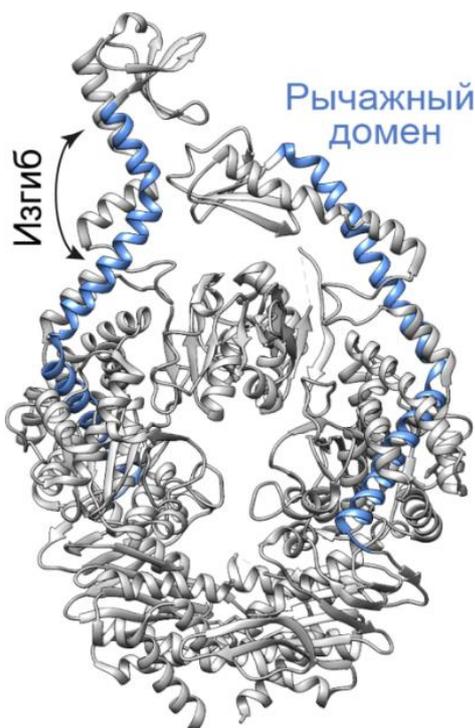


Рис. 6. Кристаллическая структура апо-формы есMutS (PDB: 6I5F). Голубым обозначен рычажный домен.

Описано четыре структуры есMutS без ДНК. В них есMutS содержит: две молекулы АДФ (конформация АДФ₂); одну молекулу АДФ и одну АТФ (конформация АДФ:АТФ); два

негидролизуемых аналога аденозин-5'-(β,γ -имида)трифосфата – AMPPNP (конформация AMPPNP₂); две молекулы ванадата АДФ, эмитирующие переходную стадию между АТФ и продуктами его гидролиза, в которой нуклеофильная атака на атом фосфора уже произошла, а уходящая группа ещё не диссоциировала (конформация АДФ-Vi₂) [149]. При рассмотрении полученных структур наблюдается переход от «открытого» состояния димера белка (форма АДФ₂) к «закрытой» (АДФ:АТФ) и затем к самому компактному состоянию в случае AMPPNP₂ и АДФ-Vi₂ (обе конформации идентичны) (рис. 7а). В структурах, полученных крио-электронной микроскопией, при переходе от конформации АДФ₂ к АДФ:АТФ наблюдается смещение двух мономеров есMutS друг к другу на 35°. Такой АТФ-зависимый переход для есMutS наблюдали ранее методами малоуглового рассеяния, электронной микроскопии и в результате флуоресцентных исследований [118,122,153–155]. Интересно, что

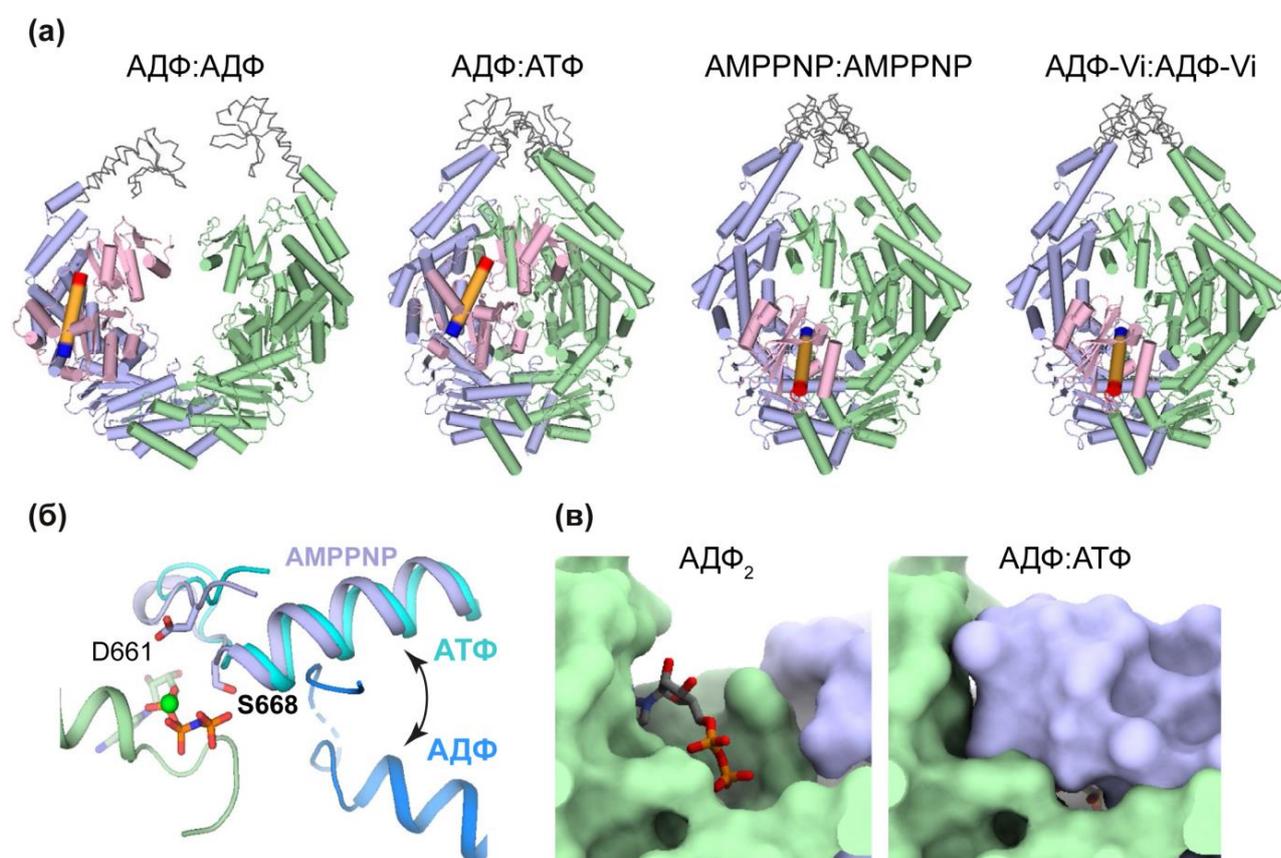


Рис. 7. Структуры апо-форм есMutS, полученных с помощью крио-электронной микроскопии [149]. **(а)** Структуры есMutS, содержащие две молекулы АДФ, АДФ и АТФ, две молекулы AMPPNP и две молекулы АДФ-Vi. Серыми линиями обозначено приблизительное положение домена «зажим» и рычажного домена, структуры которых четко не определены. Соединительный и «мисматч»-связывающий домены субъединицы Б окрашены в розовый цвет. **(б)** Конформационные изменения в АТФазном центре есMutS при связывании АТФ. Субъединица А окрашена в зеленый, субъединица Б в синий (форма АДФ₂), голубой (форма АДФ:АТФ) или сиреневый (форма AMPPNP₂). **(в)** Поверхность центра связывания нуклеотидов в «открытой» (слева) и «закрытой» (справа) формах.

структуры есMutS, связанного с АТФ или AMPPNP, полученные методом рентгеноструктурного анализа (РСА) не демонстрируют «закрытие» димера, возможно, из-за

упаковки белка в кристалл, что ограничивает движение доменов [124,150]. Таким образом, авторы [149] продемонстрировали, что *esMutS* изначально взаимодействует с ДНК только в «открытой» форме, содержащей две молекулы АДФ, когда нуклеиновая кислота может проникнуть в ДНК-связывающий центр белка.

Также авторы [149] с помощью полученных четырех структур демонстрируют как АТФазный центр *esMutS* достраивается с участием АТФазных доменов обеих субъединиц белка. В ходе конформационных изменений при связывании белком АТФ Ser668 субъединицы Б взаимодействует с γ -фосфатом АТФ [123,156] (рис. 7б). Остаток Ser668 является частью характерного для семейства ABC АТФаз мотива GXSTF [157]. В структуре с АДФ₂ такой контакт не образуется; АТФазный центр открыт для взаимодействия с молекулами АТФ из раствора (рис. 7в). В структурах АДФ:АТФ, АМРРNP₂ и АДФ-Vi₂ АТФазный сайт закрыт от окружающей среды второй субъединицей белка. Предполагается участие His728 в активации молекулы воды, необходимой для нуклеофильной атаки на γ -фосфат АТФ в процессе гидролиза. Такое предположение сделано на основании ранее опубликованных данных для АТФаз семейства ABC (Rad50 и HlyB) [158,159].

II.3.2.2. *MutS* в комплексе с ДНК канонического строения («сканирующий комплекс»)

MutS неспецифически взаимодействует с ДНК прежде, чем найдет и свяжет «мисматч». Исследования на уровне одной молекулы, проведенные для дрожжевого *MutSa* и *MutS* из *T. aquaticus*, показывают, что белок сканирует тысячи п. н. при каждом связывании с ДНК со скоростью 700 пар в секунду [11,56,152]. ДНК в таком комплексе находится между «мисматч»-связывающим доменом и доменом «зажим» в распрямленном состоянии [57] (рис. 8а). Однако усреднение нескольких полученных структур продемонстрировало небольшой изгиб в ДНК, что свидетельствует о «попытке» *MutS* распознать «мисматч», сгибая-разгибая ДНК, как это предполагалось в работе [57].

II.3.2.3. *MutS* в комплексе с «мисматч»-содержащей ДНК

Опубликовано достаточно много кристаллических структур *MutS* или его гомологов в комплексе с «мисматч»-содержащей ДНК: *MutS* из *E. coli* в комплексе с различными «мисматчами» [55,124,133,160,161], *MutS* из *T. aquaticus*, взаимодействующий с неспаренным тимидином [8], комплексы *MutS* человека с разными ДНК-лигандами [128,129]. Также, как упоминалось выше, получена структура *esMutS*, связанного с «мисматчем», с помощью крио-электронной микроскопии [57]. Все эти структуры имеют схожее строение, напоминающее греческую букву θ (рис. 8б).

При формировании специфического комплекса *MutS* изгибает ДНК примерно на 40-60° в месте «мисматча» [8,55,128,160]. Во взаимодействии с ДНК участвуют «мисматч»-

связывающий домены и домены «зажим» белка, образуя в основном электростатические контакты с углеводофосфатным остовом ДНК. Несмотря на то, что бактериальные белки MutS являются гомодимерами, две субъединицы белка взаимодействуют с ДНК различным образом. Так, только субъединица А образует специфические контакты с «мисматчем». За это взаимодействие отвечает мотив Phe-X-Glu, в котором Phe (Phe36 для *E. coli*) участвует в межплоскостном («стэкинг») взаимодействии с одним из оснований «мисматча», а Glu (Glu38 для *E. coli*) формирует водородные связи с тем же основанием. Замена любой из этих аминокислот приводит к потере способности белком узнавать «мисматч» [162,163]. Интересно, что подобная асимметрия во взаимодействии с ДНК наблюдается и в эукариотических системах MMR. Известно, что в гетеродимере MutS α (MSH2–MSH6) и MutS β (MSH2–MSH3) только MSH6 или MSH3 участвует в формировании специфических взаимодействий с «мисматчем» или инсерционной/делеционной петлей (подобно субъединице А есMutS), в то время как MSH2 взаимодействует с белком MutL α (подобно субъединице Б есMutS) [128–130]. В недавнем исследовании, используя аминокислотные замены в субъединицах гомодимера есMutS получили функционально активный гетеродимер [57]. Таким образом, авторы делают вывод, что наблюдаемая асимметрия в функционировании бактериальных гомодимеров MutS является эволюционным предвестником гетеродимерной организации их эукариотических аналогов.

II.3.2.3. Конформация MutS «скользящий зажим»

При узнавании MutS некомплементарной пары происходит быстрый обмен АДФ на АТФ в АТФазных центра белка, что инициирует конформационные изменения, которые в итоге образуют долгоживущий «скользящий зажим» на ДНК [56,118,141,152]. Образование «скользящего зажима» впервые предположили в экспериментах, в которых MutS быстро «соскальзывает» с концов ДНК в присутствии АТФ, тогда как в случае ДНК с заблокированными концами MutS остается стабильно связанным [118,133,164]. Состояние «скользящий зажим» достигается только в том случае, если «мисматч» образует связь с глутаматом (Glu38 в случае *E. coli*) [161]. Если формирование водородной связи Glu38 с «мисматчем» невозможно, «скользящий зажим» не образуется, и репарации ДНК не происходит.

Конформация есMutS «скользящий зажим» впервые продемонстрирована в кристаллической структуре, где белок находится в ковалентно связанном комплексе с N-концевым доменом есMutL (рис. 8в) [12]. Такое состояние белка очень сильно отличается от

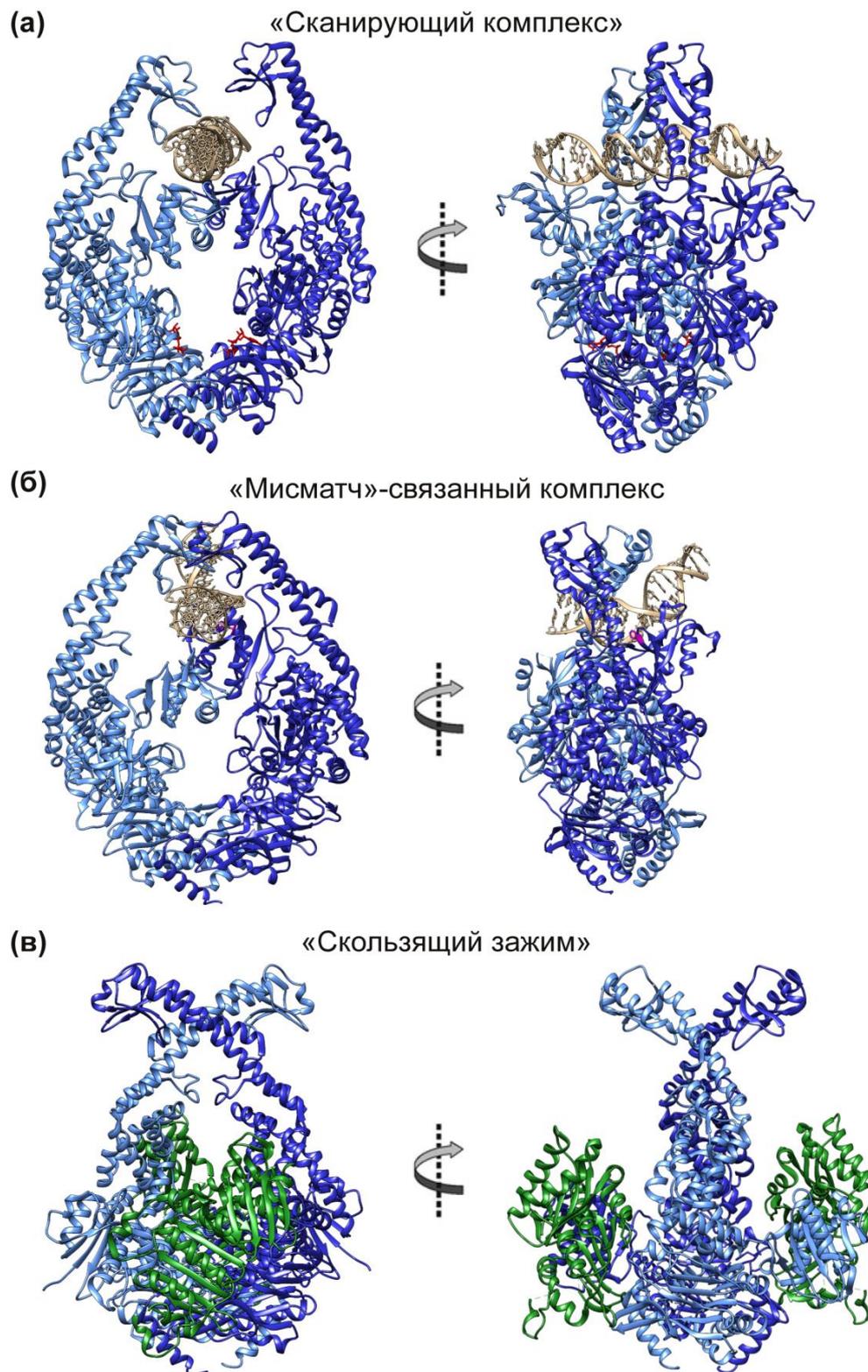


Рис. 8. Кристаллические структуры различных конформаций eMutS в двух проекциях. Субъединица А выделена темно-синим цветом, субъединица Б – голубым. ДНК обозначена бежевым цветом. (а) Структура «сканирующего комплекса» eMutS (PDB: 7AI5). В структуре имеется две молекулы АТФ (выделены красным). (б) Строение eMutS в комплексе с G/T-содержащей ДНК (PDB: 1E3M). Phe36, участвующий во взаимодействии с «мисматчем», выделен розовым цветом. (в) eMutS в конформации «скользящий зажим» в ковалентном связанном комплексе с N-концевым доменом MutL (PDB: 5AKB). N-концевой домен eMutL обозначен зеленым.

«мисматч»-связанной структуры. В конформации «скользящий зажим» субъединицы в димере есMutS наклонены друг относительно друга примерно на 30°, при этом «мисматч»-связывающие и соединительные домены вывернуты на 160°. Конформационное изменение есMutS обуславливает перемещение ДНК вглубь новообразовавшейся полости белка, контакты есMutS с ДНК ослабевают; в результате есMutS может «соскальзывать» с концов ДНК [11,56,152]. В состоянии «скользящего зажима» в структуре есMutS создается новый сайт связывания для есMutL, в который вносят вклад обе субъединицы есMutS, одна за счет АТФазного домена, а другая за счет изменения положения соединительного домена [12]. Структура «скользящего зажима» была подтверждена недавно методом крио-электронной микроскопии [57]. Интересно, что в большом количестве полученных структур (42%) наблюдается изгиб на 45° в рычажном домене субъединицы Б. Похожий изгиб наблюдался ранее для есMutS без ДНК [151] (рис. 6). Таким образом, изгиб рычажного домена есMutS возможен не только на начальных стадиях связывания MutS с ДНК, но и участвует в дальнейших стадиях репарации, способствуя переходу MutS в конформацию «скользящий зажим».

Предполагается, что после распознавания «мисматча» «скользящий зажим» MutS высвобождается из комплекса с ДНК. Это происходит в районе одноцепочечных участков [152], где репликация еще не завершена, или где уже началось удаление фрагмента дочерней цепи с «ошибкой». Затем MutS возвращается в состояние, в котором он находится до распознавания «мисматча», и снова доступен для новых циклов репарации. В случае если «мисматч» еще не устранен, MutS может снова образовать с ним комплекс. Это позволяет предположить, что несколько белков MutS связываются с ДНК при распознавании «мисматча», чтобы активировать последующие процессы до тех пор, пока «ошибка» не будет устранена.

II.4. Строение белков MutL и их функции²

Кроме MMR белки MutL участвуют в других клеточных процессах [29,113,165]. Наряду с MutL α в эукариотических клетках присутствуют другие гетеродимеры – MutL β (MLH1–PMS1) и MutL γ (MLH1–MLH3) – роль которых в клетке до конца не выяснена. Субъединица MLH3 в MutL γ обладает эндонуклеазной активностью. Несмотря на то, что MutL γ может частично заменять MutL α в процессе репарации «мисматчей», показано, что основной его функцией является участие в поздней стадии мейотической рекомбинации, которая заключается в «процессировании» соединенных между собой молекул (таких как структуры Холлидея) в кроссоверные ДНК [166,167]. Третий гетеродимер, MutL β , не обладает

² При подготовке данного раздела диссертации использована публикация [253].

эндонуклеазной активностью, однако он также играет роль в мейотической рекомбинации. MutL β взаимодействует с мейотической хеликазой Mer3, привлекая ее к местам рекомбинации независимо от распознавания «мисматчей» [168]. Недавние исследования показали участие MutL β и MutL γ в экспансии тринуклеотидных повторов [169–175]. Также было продемонстрировано, что эндонуклеазная функция MutL γ активируется только в присутствии MutS β и инициирует собственный механизм удаления повреждения [176].

Несмотря на различные роли, которые выполняют белки MutL из разных организмов, все гомологи этих белков имеют два домена – N-концевой и C-концевой, соединенные варибельным линкером (рис. 9). Первичная структура N-концевого домена MutL является высококонсервативной, в то время как первичная структура C-концевого домена MutL может быть варибельной. Однако локализация и укладка в пространстве основных элементов вторичной структуры являются строго определенными [177]. N-Концевая область белка содержит АТФазный домен. Также в N-концевой области находится ДНК-связывающий центр MutL. C-Концевая область MutL содержит субдомен, участвующий в димеризации, а также внешний субдомен, обращенный к растворителю, который также называют регуляторным. Между димеризационным и внешним субдоменами расположен металлсвязывающий мотив, играющий важную роль в гидролизе ДНК (эндонуклеазный субдомен).

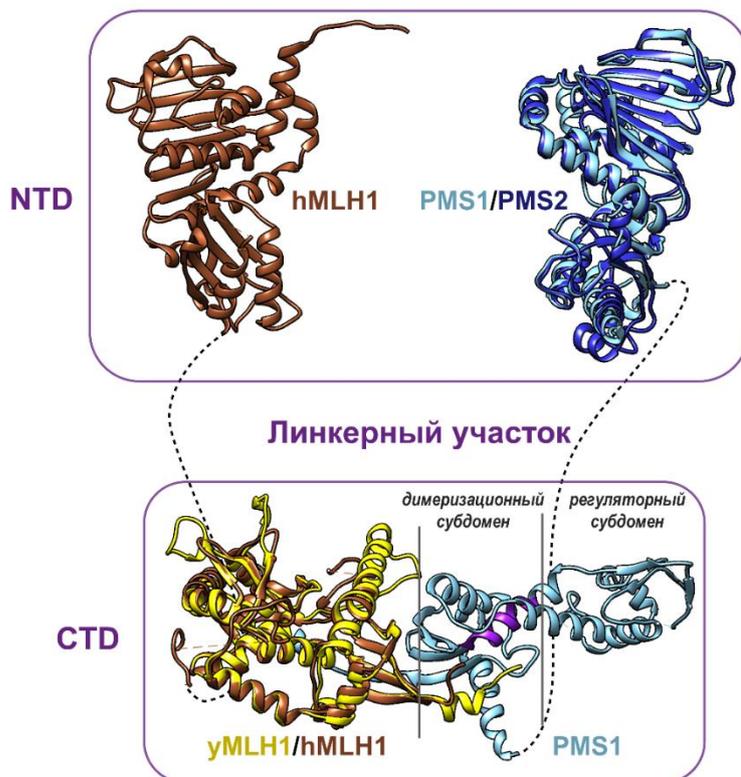


Рис. 9. Совмещение кристаллических структур белков MutL α дрожжей (PDB: 4E4W и 3H41) и человека (PDB: 3RBN, 3NA3 и 1H7S). Субъединицы MLH1 дрожжей (yMLH1) и человека (hMLH1) обозначены желтым и коричневым цветами соответственно; субъединицы PMS1 и PMS2 – голубым и синим соответственно. Рамками выделены N- и C-концевые домены белков (NTD и CTD). Фиолетовым цветом обозначен эндонуклеазный мотив DQNA(X)₂E(X)₄E. Пунктиром обозначены линкерные участки. Предложено согласно [178].

Описанная выше архитектура белков MutL необходима и достаточна для их функционирования. Она предполагает существенные конформационные перестройки белковой молекулы, которые происходят под действием различных факторов и требуются для протекания процесса MMR.

II.4.1. АТФазная функция MutL

Получены кристаллические структуры N-концевых доменов MutL из *E. coli* и *A. aeolicus*, а также белков MLH1, PMS2 и PMS1 человека и дрожжей [14,15,179–181]. Эти домены состоят из двух субдоменов. Первый субдомен имеет в своем составе 5 консервативных мотивов (VVKELVENALDAGA, DNGXGM, TLGFRGEALXS, GT и NGR), отвечающих за связывание и гидролиз молекулы АТФ [78,182]. Нарушение АТФазной функции белка может приводить к нарушениям в работе системы MMR. Так, а.о. N38 и D63 (MLH1 человека) и N45 и D70 (PMS2) из мотивов VVKELVNALDAGA, DNGXGM необходимы для связывания АТФ. Аминокислотами, играющими ключевую роль в гидролизе АТФ, являются E34 (MLH1 человека) и E31 (PMS2) из мотива VVKELVENALDAGA [14]. Введение замен N38A, D63N в MLH1, а также N45A, D70N в PMS2 приводит к инактивации системы MMR [183]. При этом мутантные формы с единичной заменой MLH1(E34A) и PMS2(E41A) не препятствуют протеканию MMR. Двойная замена MLH1(E34A) и PMS2(E41A) в гетеродимере MLH1–PMS2 приводит к полному «выключению» репарации «мисматчей», блокируя способность MutLα вносить разрыв в ДНК в присутствии MutSα, PCNA, RFC, АТФ, Mg²⁺ и «мисматч»-содержащей ДНК [183].

Второй субдомен N-концевого домена MutL, предположительно, отвечает за ДНК-связывающую активность белка [180]. При сравнении полученных кристаллических структур для белков MLH1, PMS2 и PMS1 обнаружено схожее взаимное расположение двух субдоменов [5]. Стоит отметить, что паралоги PMS обладают заметно меньшим сродством к АТФ по сравнению с белками MLH [5]. Такое различие, возможно, объясняется особенностями структуры АТФазного домена: белок PMS2 человека (и его гомолог PMS1 в дрожжах) имеет уникальные инсерции, которые находятся во втором субдомене (рис. 10, обозначены синим цветом). Инсерции могут влиять на взаимное расположение субдоменов и, как результат, оказывать воздействие на способность белка связывать АТФ.

Большинство членов семейства GHKL формируют димеры, которые претерпевают значительные конформационные изменения при связывании или гидролизе АТФ [184] (рис. 11). В апо-состоянии С-концевые домены находятся в димерной форме, в то время как N-концевые домены остаются в виде мономеров («открытая» форма). Связывание АТФ приводит к димеризации двух АТФазных доменов и образованию более компактной «закрытой» формы. Последующий гидролиз АТФ и диссоциация комплекса АДФ с белком

возвращают NTD MutL в мономерное состояние. Интересно, что для эукариотических клеток методом атомно-силовой микроскопии зафиксированы ассиметричные конформационные изменения, связанные с различным сродством двух субъединиц MutL α к АТФ [185]. Цикл конформационных перестроек MutL сравнивают с аналогичным циклом для другого белка семейства GHKL, Hsp90, N-концевые домены которого тоже димеризуются при связывании АТФ [186]. Конформационные изменения и стабилизация N-концевого домена Hsp90 в результате связывания нуклеотидов позволяют ему взаимодействовать с другими белками. Похожая модель функционирования предложена и для белка есMutL, формирующего комплексы с белками MMR [187].

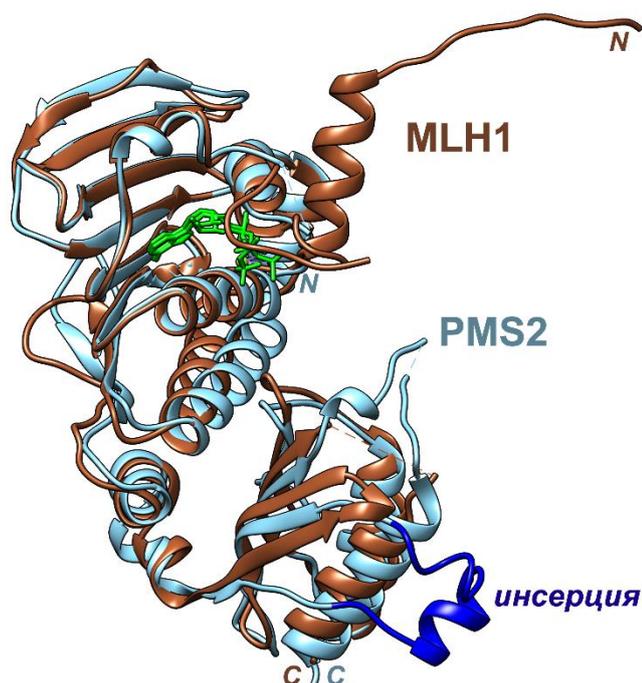


Рис. 10. Совмещение кристаллических структур АТФазных доменов белков MLH1 и PMS2 в комплексе с АТФ и АТФ γ S соответственно (PDB: 3NA3, 1H7U). Синим цветом обозначена инсерция пептида в белке PMS2, зеленым – нуклеотидные кофакторы АТФ и АТФ γ S.

Конформационные изменения при связывании и гидролизе молекулы АТФ белками MutL обуславливают регуляцию эндонуклеазной функции их С-концевого домена [75]. Эндонуклеазная активность MutL α человека и дрожжей стимулируется присутствием АТФ [112]. С другой стороны, по данным литературы нельзя сделать однозначный вывод о влиянии АТФ на эффективность гидролиза ДНК белками MutL из различных бактерий. Способность белков MutL из *T. thermophilus* и *N. gonorrhoeae* (ttMutL и ngMutL) вносить одноцепочечный разрыв в ДНК ингибируется добавлением АТФ в реакционную смесь [75,77]. Показано, что эндонуклеазная функция aaMutL может и активироваться [188], и ингибироваться [77] в зависимости от концентрации АТФ и ионов Mn²⁺. Низкие концентрации АТФ стимулируют

гидролиз ДНК белком MutL из *B. subtilis* (bsMutL), а высокие – ингибируют [13]. Таким образом, различия во влиянии АТФ на эндонуклеазную активность белков MutL из различных организмов могут говорить об отличающихся механизмах активации белка, которые еще предстоит установить.

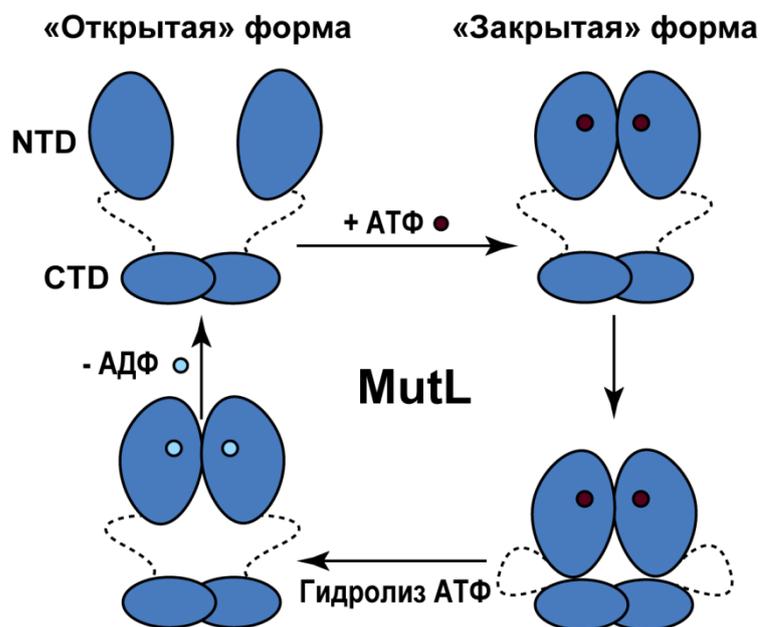


Рис. 11. Схематическое изображение конформационных перестроек MutL, вызванных связыванием и гидролизом АТФ. Бордовые и голубые точки обозначают АТФ и АДФ соответственно. N- и C-концевые домены обозначены как NTD и CTD соответственно.

II.4.2. ДНК-связывающая функция MutL

Кристаллическую структуру комплекса полноразмерного MutL с ДНК получить не удастся из-за высокой конформационной подвижности белка. Известно, что белки MutL взаимодействуют с ДНК с низкой эффективностью. ДНК-связывающий центр MutL локализован в N-концевом домене белка [16]. Полагают, что ДНК связывается в участке MutL, который богат положительно заряженными аминокислотными остатками и сформирован АТФазным субдоменом и α/β -субдоменом N-концевого домена (рис. 12). Так, в дрожжевых гомологах MutL замены аминокислот Arg273 и Arg274 (в MLH1) в α/β -субдомене или Lys197 и Arg198 (в PMS1) в АТФазном субдомене снижают эффективность комплексообразования MutL с ДНК и приводят к понижению способности системы MMR исправлять «мисматчи» [181,189,190]. Двойная замена R273E/R274E в дрожжевом белке MLH1 блокирует MMR [125]. В работе [15] был обнаружен положительно заряженный участок в N-концевом домене MutL из *A. aeolicus*, и было продемонстрировано, что а.о. Arg156, Lys158, Arg259 и Lys265 являются необходимыми для связывания белком ДНК. В случае esMutL также показано, что замена

Arg162, Arg266 и Arg316, находящихся в АТФазном и α/β -субдоменах, на Glu приводит к полной потере способности есMutL образовывать комплексы с ДНК [12,163,180,191].

Показано, что N-концевой домен гомологов белка есMutL из *E. coli*, человека и дрожжей способен связывать ДНК самостоятельно. Однако наличие С-концевого домена увеличивает сродство N-концевого домена к ДНК [180,181].

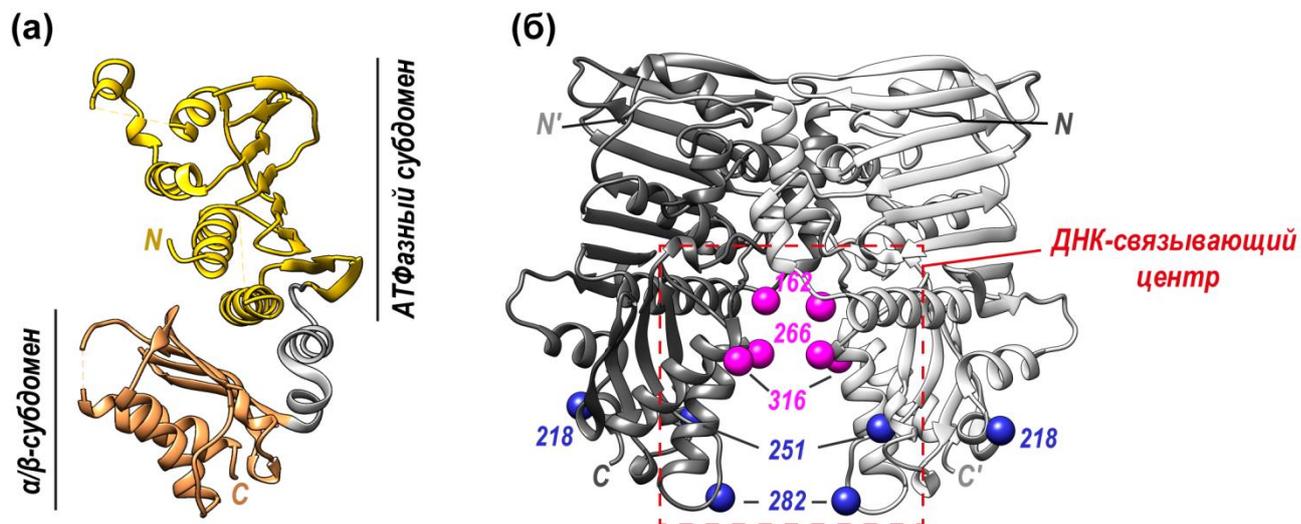


Рис. 12. Строение N-концевого домена есMutL. **(а)** Кристаллическая структура мономера MutL-NTD (PDB: 1BKN). Желтым цветом отмечен АТФазный субдомен, коричневым – α/β -субдомен. **(б)** Кристаллическая структура димера есMutL-NTD в комплексе с АМРРNP (PDB: 1B63). Розовыми сферами обозначены остатки Arg, необходимые для связывания ДНК согласно [12], синими – остатки, сближенные с ДНК в процессе функционирования белка согласно [192]. Красной пунктирной рамкой указана предполагаемая ДНК-связывающая область есMutL.

Белок MutL и его гомологи связывают как одноцепочечную, так и двуцепочечную ДНК независимо от ее нуклеотидной последовательности [85] и наличия в ней «мисматча» [79,80]. Эффективность комплексообразования MutL с ДНК зависит от многих факторов: ионной силы раствора, длины ДНК и наличия кофакторов (АДФ, АТФ, негидролизруемых аналогов АТФ). Показано, что наиболее стабильные комплексы с ДНК белки MutL формируют при низкой ионной силе раствора [17]. Эффективность образования комплексов с ДНК растет по мере увеличения длины последней. Так, при первом исследовании ДНК-связывающей активности белка есMutL обнаружено, что эффективнее всего белок образует комплексы с ДНК длиной более 100 п.н. [79]. С развитием методов детекции было зафиксировано связывание есMutL с 41-звенной ДНК [12]. В случае белка MutL из *A. aeolicus*, который содержит удивительно короткий линкерный участок (5 а.о.), авторами работы [15] была предложена модель взаимодействия MutL с ДНК, а также было показано, что «место посадки» такого белка на ДНК составляет 30 п.н.

ДНК-связывающая функция гомологов MutL влияет на их АТФазную активность, как и в случае белков MutS [58,193]. Например, наличие одноцепочечной и двуцепочечной ДНК в реакционной смеси может значительно повышать АТФазную активность есMutL [180]. В то же время эффективность комплексообразования есMutL с ДНК практически не изменяется при связывании белком АТФ. Показано, что АТФ не требуется для образования комплекса есMutL с ДНК, но необходим для формирования комплекса есMutS–есMutL [12]. В недавней работе убедительно продемонстрировано на системе из *E. coli*, что основная функция связывания АТФ белком есMutL – это образование «скользящего зажима» на ДНК [10]. Образующийся стабильный долгоживущий комплекс есMutS–есMutL «скользит» по ДНК в поисках места гидролиза белком есMutH. Кроме того, авторы предполагают, что «скользящий» по ДНК комплекс включает в себя не только белки есMutS и есMutL, но и есMutH. Таким образом, связывание и гидролиз АТФ необходимы белку MutL для активации дальнейших стадий репарации.

II.4.3. Линкерная область MutL

Как упоминалось ранее, два функциональных домена MutL в различных организмах соединены гибким линкером различной длины и последовательности (рис. 9). Линкер способствует конформационным изменениям в белке, наблюдаемым при атомно-силовой микроскопии для MutL α дрожжей и человека [185]. Сравнение аминокислотных последовательностей белков MutL показывает, что линкерная область MutL богата остатками пролина и неконсервативна [182]. Предсказание вторичной структуры показало, что линкерный участок не обладает выраженной вторичной структурой и сильно неупорядочен в растворе [16]. Длина линкера в случае бактериальных белков обычно составляет 100-150 а.о. (в есMutL 100 а.о.), однако есть группа бактерий, в которых в MutL линкерная область очень короткая (менее 50 а.о.) [182]. Примером очень короткого линкера является MutL из *A. aeolicus* — всего 5 а.о. [76]. Благодаря такому особенному строению белка с помощью данных малоуглового рассеяния рентгеновских лучей получена модель полноразмерного белка, а также предсказан механизм взаимодействия MutL с ДНК [15]. Авторами продемонстрировано, что в NTD белка MutL из *A. aeolicus* есть два ДНК-связывающих центра, которые действуют одновременно (две молекулы NTD связывают одну ДНК). Также с помощью полученной модели белка показано, что минимальное место посадки MutL на ДНК составляет 30 п.н., что соответствует расстоянию между двумя Lys 158 разных NTD, участвующих во взаимодействии с ДНК. Однако, из-за особенностей строения MutL *A. aeolicus*, эти данные не могут быть экстраполированы на все бактериальные белки MutL.

Среди эукариотических аналогов MutL длина линкера также варьируется. Например, субъединица PMS2 имеет более длинный линкер (290 а.о. у дрожжей и 285 а.о. у человека),

чем субъединица MLH1 (173 а.о. у дрожжей и 165 а.о. у человека). Большинство аминокислотных замен в линкерной области *S. cerevisiae* MLH1 (остатки 400—500) не влияли на функции белка [194]. Однако, замены R401 и D403 на Ala приводили к накоплению мутаций в клетках, несмотря на то, MLH1(R401A) и MLH1(D403A) сохраняют способность формировать комплексы с PMS1 и MSH2–MSH6 [194]. Полагают, что уменьшение эффективности MMR в этом случае связано с нарушением взаимодействия MLH1 с другими белковыми комплексами. Биоинформатическое исследование также продемонстрировало, что для MLH1 человека большинство аминокислотных замен в линкерном домене не ассоциированы с синдромом Линча [195]. Такое наблюдение может являться подтверждением полученных для бактериальных белков данных о том, что важна не аминокислотная последовательность линкера, а его длина [195].

Удаление 40 а.о. линкера есMutL не приводит к снижению эффективности MMR *in vivo*. Однако делеция области линкера, ближайшей к АТФазному домену, ингибирует MMR *in vivo*, несмотря на сохранение ДНК-связывающей и АТФазной активности есMutL [16]. Интересно, что удаление ~15% а.о. в MLH1 или PMS1 дрожжей влияет по-разному на работу MMR в клетках: при удалении части линкера PMS1 эффективность MMR в клетках сравнима с белком без делеций, а в случае MLH1 наблюдается появление большого количества мутаций [196].

Долгое время считалось, что наиболее важной ролью линкера, является обеспечение физической связи и, предположительно, участие во взаимодействии между N- и С-доменами. Однако С-концевая часть линкера MutL α человека (в субъединице MLH1) включает сигнал ядерной локализации, который регулирует перенос белка в ядро [197–199]. Также недавно установлена важность линкера в преодолении есMutL препятствий в виде белков, связанных с ДНК [62]. Комплексы белков с ДНК могут мешать эффективному поиску «мисматчей» и, соответственно, их исправлению. Так присутствие белка dCas на ДНК не влияет на способность есMutL взаимодействовать с есMutH, что обеспечивает эффективный гидролиз ДНК. Использование мутантной формы есMutL с делецией 40 а.о. в линкерной области приводит блокированию гидролиза ДНК эндонуклеазой есMutH [62].

II.4.4. Эндонуклеазная функция MutL

Кристаллографический анализ С-концевых доменов (CTD) бактериальных и эукариотических гомологов MutL показал, что каждый домен состоит из регуляторного и димеризационного субдоменов [13,113,200]. Сравнение аминокислотных последовательностей белков MutL выявило наличие 5 консервативных мотивов (DQHA(X)₂E(X)₄E, [A/S]C[K/R], SPHGRP, FXR и GQ), образующих каталитический центр (рис. 13) [182].

Моделирование структуры С-концевого домена MutL из *B. subtilis* (bsMutL-CTD) с ДНК показало, что мотив DQHA(X)₂E(X)₄E и фосфодиэфирная связь в ДНК находятся на расстоянии, которое позволяет карбоксильной группе остатка Asp в первой позиции этого мотива катализировать гидролиз ДНК [13]. Замена Asp в этом мотиве на Asn в MutL из *B. subtilis* и *T. thermophilus* инактивирует их эндонуклеазную функцию и, соответственно, препятствует протеканию MMR [13,77]. В работе [75] получены несколько мутантных форм, содержащих а.о. замены в DQHA(X)₂E(X)₄E-мотиве ngMutL. Мутантные формы с одной заменой D491N и E497Q оказались активными на 70% по сравнению с «диким типом»; белок ngMutL с двойной заменой D491N/E497Q в С-концевом домене сохранял эндонуклеазную активность лишь на 15%, что может дополнительно свидетельствовать о важности остатков Asp и Glu для осуществления белком гидролитической функции.

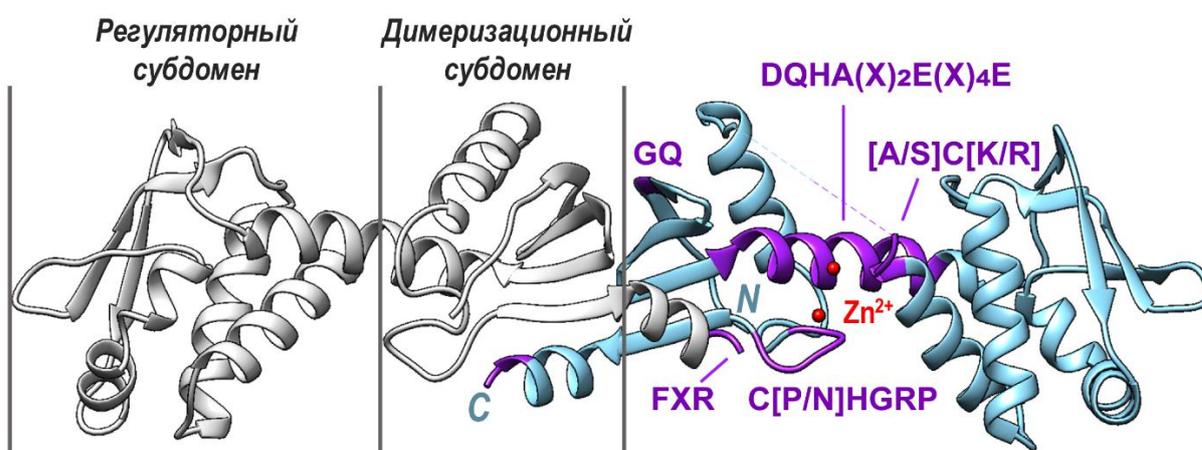


Рис. 13. Кристаллическая структура С-концевого домена bsMutL (PDB: 3KDK). Консервативные мотивы эндонуклеазного центра белка указаны фиолетовым цветом. Ионы цинка обозначены красными сферами. Предложено согласно [13].

В случае эукариотических гомологов MutL замены в консервативных мотивах, формирующих эндонуклеазный центр белка, также приводят к нарушению эндонуклеазной функции. Так, замены D699N и E705K в мотиве 699-DQHA(X)₂E(X)₄E-710 в субъединице PMS2 белка MutL α человека приводят к полной потере эндонуклеазной активности [102,112]. Подобная замена в дрожжевом белке PMS1(E707K) не только нарушает способность MutL α гидролизовать ДНК, но и подавляет связанную с MMR гомологическую рекомбинацию [201]. Также при исследовании мотива DQHA(X)₂E(X)₄E субъединицы PMS2 MutL α человека было показано, что аминокислотный остаток H701 является необходимым для функционирования MutL α , а консервативный остаток E710 – нет [202]. Это может свидетельствовать об участии этой аминокислоты в другой, еще невыясненной, функции MutL α . В целом, исследования гидролитической активности эукариотических белков MutL α показывают, что эндонуклеазная

функция необходима не только для реализации процесса MMR, но и для протекания гомологической рекомбинации и апоптоза [203].

II.4.4.1. Влияние ионов двухвалентных металлов на гидролиз ДНК белком MutL

Несмотря на то, что и бактериальные, и эукариотические белки MutL содержат консервативные мотивы в С-концевом домене, катализ гидролиза ДНК этими белками имеет ряд индивидуальных особенностей, связанных с влиянием ионов двухвалентных металлов на этот процесс. Показано, что MutL α человека и дрожжей проявляют эндонуклеазную функцию только в присутствии ионов Mn²⁺ [112,201], в то время как их бактериальные аналоги активны в присутствии ионов разных двухвалентных металлов. Например, MutL из *T. thermophilus* (ttMutL) гидролизует суперскрученную плазмиду в присутствии ионов Mn²⁺, Ni²⁺ или Co²⁺, но не в присутствии ионов Mg²⁺, Zn²⁺ или Ca²⁺ [77]. Белок MutL из *A. aeolicus* (aaMutL), помимо Mn²⁺, Ni²⁺ или Co²⁺, гидролизует плазмиду и в присутствии ионов Zn²⁺, но, как и ttMutL, не проявляет эндонуклеазную активность в присутствии Mg²⁺ или Ca²⁺ [76]. В работе [75] показано, что ngMutL и его С-концевой домен способны вносить разрыв в плазмидную ДНК в присутствии ионов Mn²⁺ или Mg²⁺, но не в присутствии ионов Ca²⁺. Белок bsMutL проявляет гидролитическую активность только в присутствии ионов Mn²⁺. Интересно, что добавление в реакционную смесь, содержащую bsMutL и ионы Mn²⁺, второго иона металла (Ca²⁺, Zn²⁺, Co²⁺) увеличивает количество «никованной», а также линейной формы ДНК по сравнению с действием только Mn²⁺ в тех же условиях [13].

Важное место среди ионов двухвалентных металлов занимают ионы Zn²⁺. При анализе кристаллической структуры С-концевого домена bsMutL, как и в случае MutL α дрожжей, показано, что мотивы DQHA(X)₂E(X)₄E и [A/S]C[K/R] координируют два иона Zn²⁺ (рис. 14). Основная разница в структурах bsMutL и MutL α дрожжей заключается в характере связывания ионов Zn²⁺. В случае bsMutL-CTD только один ион Zn²⁺ (номер 1) полностью координирован а.о. Glu468, Cys604, His606 и молекулой воды (рис. 14a), в то время как в координационную сферу второго иона Zn²⁺ (номер 2) только частично включены функциональные группы а.о. His464, Glu468, Cys573 [13]. Замены консервативных аминокислотных остатков, входящих в каталитический и предполагаемый Zn²⁺-связывающий центры, нарушают действие MutL *in vitro* [201].

В отличие от bsMutL-CTD, в MutL α дрожжей задействован четвертый консервативный мотив – FXR, который имеет строгую консенсусную последовательность (FERC). В структуре дрожжевого белка MutL α мотив FERC находится в непосредственной близости от каталитического центра PMS1 и координирует два иона Zn²⁺ (рис. 14б) [200]. В бактериальном MutL этот мотив не имеет консервативного остатка Cys, контактирующего с Zn²⁺ [202]. Таким

образом, в структуре MutL α -CTD оба иона Zn²⁺ полностью координированы а.о. из четырех консервативных эндонуклеазных мотивов.

Подобная разница в сродстве MutL из разных организмов к ионам Zn²⁺ может свидетельствовать о том, что ионы металла выполняют в этих белках разную роль. Так, схожий с MutL α механизм хелатирования наблюдается у нескольких нуклеаз, где а.о. из четырех мотивов также координируют два иона металла [204]. Предполагают, что ионы Me²⁺ входят в каталитический центр белка [200]. В случае bsMutL из-за меньшего сродства белка к ионам Zn²⁺ считается, что Zn²⁺-связывающий центр имеет скорее структурную, а не каталитическую роль [13].

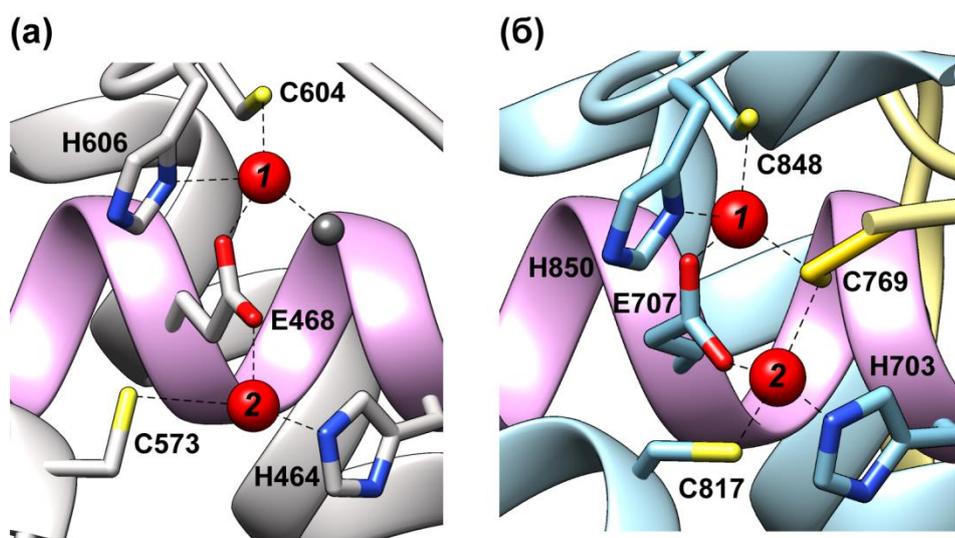


Рис. 14. Структура эндонуклеазных доменов (а) bsMutL (PDB: 3KDK) и (б) MutL α дрожжей (PDB: 4E4W). Красными сферами обозначены ионы цинка; розовым цветом показан мотив DQHA(X)₂E(X)₄E. Предложено согласно [177].

В работе [13] bsMutL-CTD был закристаллизован в трех различных формах – в условиях, соответствующих увеличению концентрации Zn²⁺ в среде. Структурный анализ этих форм показал существенное сближение друг с другом а.о., ответственных за гидролиз ДНК, благодаря комплексообразованию с Zn²⁺. Связывание bsMutL с ионами двухвалентных металлов также обеспечивает устойчивую взаимную ориентацию димеризационных и регуляторных субдоменов гомодимера белка, которые в отсутствие ионов металлов более подвижны.

В пользу предположения о структурной, а не каталитической роли ионов Zn²⁺ свидетельствует и отмеченное в работе [13] сходство первичной и вторичной структур MutL-CTD и белков семейства IdeR (iron-dependent repressors), а также конформационные изменения, вызванные связыванием ионов металлов. Так, IdeR из *Mycobacterium tuberculosis* имеет два металлсвязывающих центра, один из которых является функциональным и имеет

высокое сродство к Fe^{2+} , а второй – структурный – обладает сродством к Zn^{2+} . В работе [205] показано, что при одновременном присутствии ионов Fe^{2+} и Zn^{2+} степень связывания ДНК белком IdeR значительно выше, чем в присутствии только ионов Fe^{2+} в той же концентрации. Таким образом, предполагается, что связывание ионов Zn^{2+} способствует предварительной организации IdeR, приводящей к конформационному переходу в структуру, обеспечивающую более эффективное связывание Fe^{2+} .

В противоположность данным, полученным для bsMutL, в кристаллической структуре ngMutL-CTD не наблюдались значительные конформационные перестройки при связывании ионов Zn^{2+} , что может говорить о различной функциональной роли ионов цинка для этих белков [206].

В работе [207] была получена кристаллическая структура aaMutL-CTD (PDB: 5Z42). В ней визуализировались три иона цинка, расположенные около спиралей $\alpha 1$ и $\alpha 2$ и петли L2, которые включают мотивы DQHAX₂EX₄E, ACR и CPHGRP (рис. 15а). Ион Zn^{2+} в позиции 1 координируется а.о. Glu357, Cys402 и His404; в позиции 2 – His353, Glu357 и Cys371 (рис. 15б). Ион Zn^{2+} в позиции 3 координируется Cys371 спирали $\alpha 2$. Ионы Zn^{2+} в позициях 1 и 2 в структуре aaMutL-CTD занимают схожую позицию с их локализацией в структуре bsMutL-CTD.

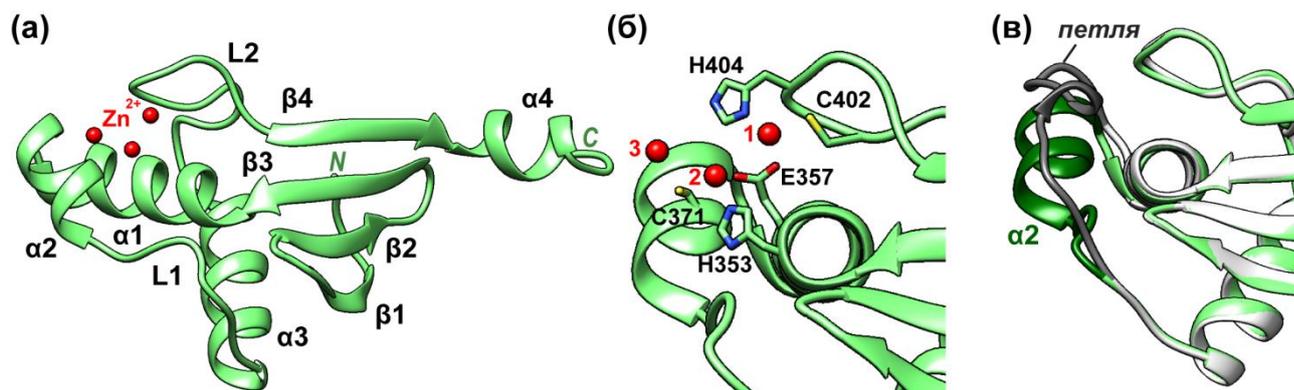


Рис. 15. Кристаллические структуры С-концевого домена MutL из *A. aeolicus* (aaMutL-CTD). (а) Кристаллическая структура мономера aaMutL-CTD с тремя ионами цинка (PDB: 5Z42); (б) цинк-связывающий центр aaMutL-CTD; (в) совмещение двух структур aaMutL-CTD (PDB: 5Z42 и 5Z41) – с тремя ионами цинка (зеленый цвет) и с одним ионом цинка (серый цвет). Петля в структуре 5Z41 с единственным ионом цинка и α -спираль, образуемая при связывании трех ионов цинка в структуре 5Z42, обозначены темно-серым и темно-зеленым цветами соответственно. Предложено согласно [207].

В работе [207] также была предпринята попытка получить кристаллическую структуру aaMutL-CTD в отсутствие ионов металла. Однако этого сделать не удалось; в результате структурного анализа в aaMutL-CTD было обнаружено присутствие одного иона Zn^{2+} в позиции 1 (PDB: 5Z41). Этот единственный ион Zn^{2+} координируется а.о. Glu357, Cys371, Cys402 и His404. Отметим, что взаимодействие иона Zn^{2+} с Cys371 отсутствовало в структуре

с тремя ионами металла. При совмещении структур с одним и тремя ионами цинка (PDB: 5Z41 и 5Z42) была замечена значительная разница в организации некоторых участков полипептидной цепи (рис. 15в). Так, а.о. 367–374 в присутствии трех ионов Zn^{2+} формируют спираль $\alpha 2$, в то время как в присутствии одного иона Zn^{2+} в этой области образуется петля [208]. Авторы работы [208] отмечают, что способность белка aaMutL связывать большее число ионов цинка (по сравнению с другими полученными бактериальными MutL) может являться следствием особенностей строения данного белка (отсутствия регуляторного домена). Предполагают, что связывание нескольких ионов цинка необходимо для формирования правильной структуры каталитического центра aaMutL. В доказательство этого предположения продемонстрировано, что способность гидролизовать ДНК у aaMutL, связанного с тремя ионами Zn^{2+} , в три раза превышает активность aaMutL с одним ионом Zn^{2+} .

Белок aaMutL – единственный из изученных гомологов, эндонуклеазная функция которого активируется в присутствии ионов цинка [208]. Наличие в реакционной смеси только ионов Zn^{2+} не стимулирует гидролиз суперскрученной плазмиды для всех остальных выделенных бактериальных MutL [78]. Очевидно, что различное влияние ионов Zn^{2+} на структуру белков MutL обуславливает и различное влияние этих ионов на эндонуклеазную функцию белков.

II.4.4.2. PCNA и β -«зажим» как факторы активации эндонуклеазной функции белков MutL

Согласно современным воззрениям, в дискриминации «дочерней» цепи в эукариотических клетках принимает участие белок PCNA [209]. PCNA является гомотримером и по форме напоминает кольцо, которое имеет две неэквивалентные стороны: С и N (рис. 16). «Посадка» PCNA на двуцепочечную ДНК в месте образования «ника» осуществляется белком RFC таким образом, что С-сторона PCNA обращена к свободному 3'-концу ДНК, при этом PCNA приобретает форму кольца, которое скользит по ДНК [210]. Продемонстрировано, что С-сторона PCNA имеет гидрофобную область, с которой контактирует большинство белков-партнеров [211]. На сегодняшний день показано взаимодействие с PCNA белков MSH(2/3/6) и обеих субъединиц MutL α человека и дрожжей [92,212,213]. Субъединицы MutL α содержат консервативный мотив, отвечающий за связывание с С-стороной PCNA (QXXIXP). Считается, что взаимодействие MutL α с PCNA обеспечивает ориентацию MutL α , необходимую для внесения одноцепочечного разрыва селективно в «дочернюю» цепь ДНК. Так, в недавней работе [213] продемонстрировано, что аминокислотные замены в мотиве 721-QRLIAP белка PMS2 (723-QKLIIP для дрожжевого PMS1) приводят к снижению эффективности взаимодействия PCNA с MutL α , и, как следствие, к потере способности MMR исправлять «мисматчи». Замены в PCNA-связывающем мотиве

субъединицы MLH1 (562-QILYDF) мало влияют на образование комплекса PCNA–MutL α и не «выключают» MMR, хотя и снижают эффективность процесса.

PCNA также вовлечен в активацию эндонуклеазной функции MutL α . На сегодняшний день существуют две альтернативные модели этого процесса [113]. Первая модель предполагает первоначальное образование комплекса между MutL α и находящимся около разрыва PCNA (рис. 16, *слева*). После формирования комплекса MutL α –PCNA MutL α распознает «дочернюю» цепь по наличию в ней одноцепочечных разрывов. Затем комплекс MutL α –PCNA скользит по ДНК и контактирует с MutS α , который активирует MutL α [117].

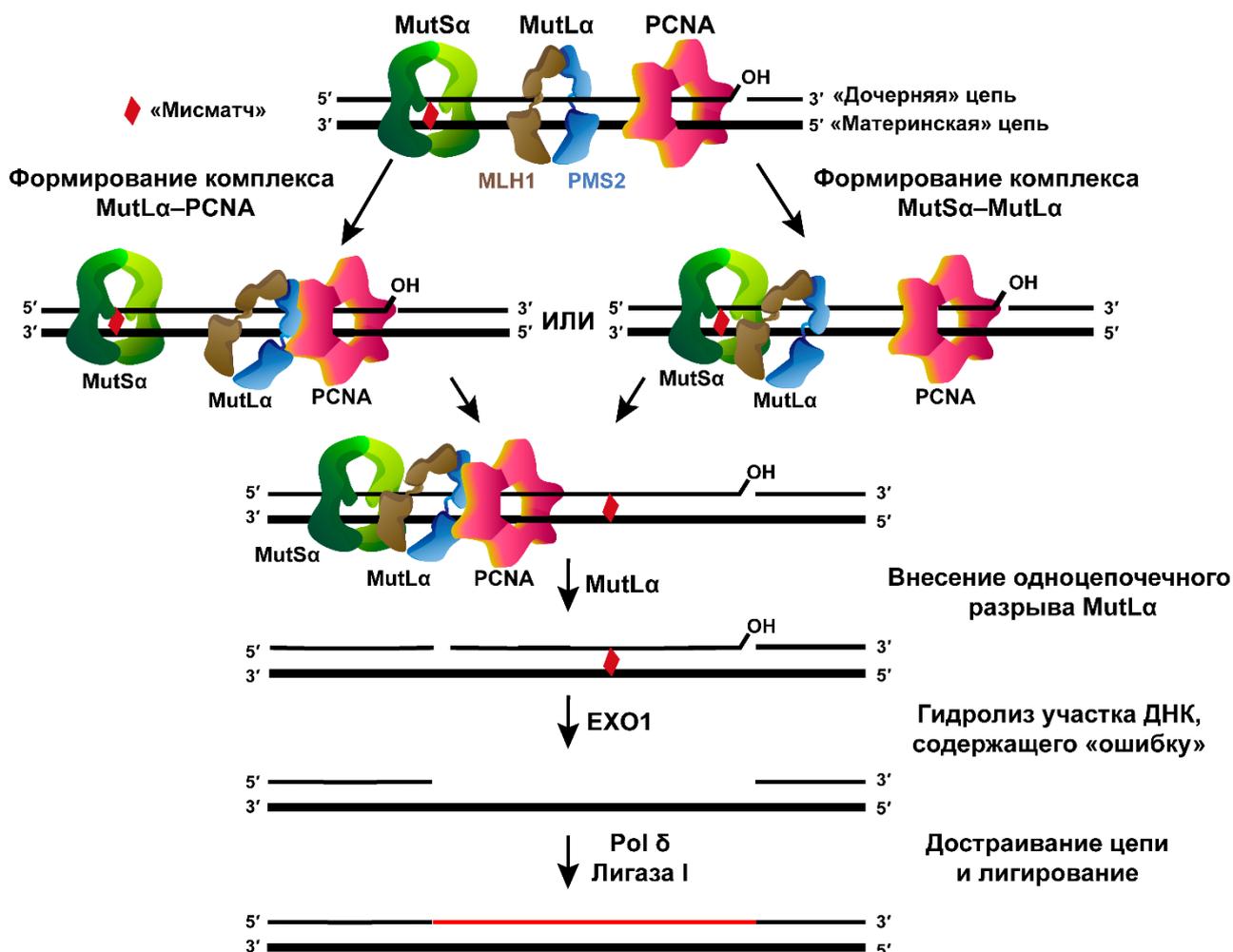


Рис. 16. Схема возможных механизмов активации MutL, внесения белком одноцепочечного разрыва в «дочернюю» цепь ДНК с 5'-стороны от некомплементарной пары и последующей EXO1-зависимой MMR в клетках человека. Предложено согласно [113].

Другая модель предполагает, что первоначально формируется комплекс MutS α и MutL α на ДНК, содержащей «мисматч» (рис. 16, *справа*). Этот комплекс перемещается по ДНК. MutL α в его составе взаимодействует с PCNA, что приводит к образованию тройного комплекса MutS α –MutL α –PCNA. Когда этот комплекс достигает места одноцепочечного разрыва, MutL α распознает «никованную» цепь и принимает активную конформацию. Затем комплекс MutS α –

MutL α -PCNA возобновляет движение по ДНК, и MutL α гидролизует «дочернюю» цепь. Несмотря на то, что обе модели согласуются с существующими экспериментальными данными, фактические механизмы активации MutL α до сих пор не ясны.

Бактериальным аналогом PCNA является β -«зажим» (β -субъединица ДНК-полимеразы III) [64]. Структурные мотивы, обеспечивающие контакт с β -«зажимом», были найдены во многих бактериальных белках, вовлеченных в репликацию и репарацию ДНК [214]. Так, β -«зажим» стимулирует эндонуклеазную активность bsMutL [64]. В работе [26] показано, что регуляторный субдомен С-концевого домена bsMutL содержит мотив QEMIVP, взаимодействующий с β -«зажимом» (рис. 17). Аминокислотные замены в этом мотиве MutL инактивируют функционирование системы MMR *in vivo* [215,216]. Для объяснения стимулирующего эффекта эндонуклеазной активности белков MutL при взаимодействии с β -«зажимом» была предложена модель, согласно которой скопление отрицательно заряженных а.о. на поверхности С-концевого домена bsMutL препятствует связыванию фермента с ДНК. Взаимодействие bsMutL с β -«зажимом» нейтрализует эти отрицательные заряды, облегчая формирование белково-нуклеинового комплекса [24]. bsMutL относят к β -«зажим»-зависимым MutL, образующим подсемейство I этих белков. Несмотря на то, что бактериальные эндонуклеазы MutL являются гомодимерами, их взаимодействие с β -«зажимом» происходит аналогично взаимодействию MutL α с PCNA. Только один из двух мотивов С-концевого домена bsMutL контактирует с β -«зажимом» [217].

<i>PMS2 H. sapiens</i>	GFIIITKL----NEDIFIVDQHATDEKYNFEMLQQHTV---LQGQRLLIAPOTLNLTAV--- 734	
<i>PMS1 S. cerevisiae</i>	GFIIIVTRKVDNKYDLFIVDQHASDEKYNFETLQAVTV---FKSQKLIIPQPVLSVI--- 767	
<i>B. subtilis</i>	TYILAQN----ENGLYIIDQHAAQERIKYEYFREKVGEVEPEVQEMIVPLTFHYSTN--- 502	Подсемейство I
<i>T. thermophilus</i>	SYLLAEA----GDTLYVVDQHAHERILYEDLLKRVAEGRPLPR---PLLVLLEPE--- 399	Подсемейство II
<i>A. aeolicus</i>	TFILVKD----SEYLYFVDQHLLLEERINYEKLEKDE----- 367	Подсемейство III
	: . . : . . . : * . : . . :	

QXXIXP

Рис. 17. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей эукариотических и бактериальных белков MutL. Розовой рамкой показан консервативный мотив MutL, участвующий во взаимодействии с PCNA или β -«зажимом». Три подсемейства бактериальных белков MutL указаны справа.

Кроме подсемейства I, среди бактериальных MutL выделены подсемейства II и III, которые не имеют характерного β -«зажим»-связывающего мотива и отрицательно заряженного кластера, а их эндонуклеазная активность не зависит от присутствия β -«зажима». Примерами таких белков являются ttMutL – представитель подсемейства II, у которого β -«зажим»-связывающий мотив присутствует, но не отличается консервативностью; и aaMutL – представитель подсемейства III, у которого такой мотив отсутствует (рис. 17) [208].

Авторами [208] показано, что β -«зажим» не влияет на эффективность внесения одноцепочечного разрыва в ДНК белками aaMutL и ttMutL; гидролиз ДНК происходит даже в отсутствие β -«зажима». В работе [218] была реконструирована *in vitro* система с

использованием белков MutL и MutS из *T. thermophilus*. Однако ttMutL гидролизует обе цепи ДНК-дуплекса, несмотря на наличие «ников» в одной из цепей, β -«зажима» и белка, осуществляющего «посадку» β -«зажима» на ДНК, то есть дискриминация цепей в этом случае отсутствовала.

Таким образом, β -«зажим» по-разному влияет на эндонуклеазную активность бактериальных белков MutL. Это свидетельствует не только о различиях в механизме дискриминации цепей системами MMR бактерий и эукариот, но и о различиях среди самих бактериальных систем MMR, содержащих MutL с эндонуклеазной функцией.

Несмотря на значительное количество информации о функционировании MMR, которая имеется на сегодняшний день, многие детали механизма этого процесса только предстоит узнать. На основе проведенного нами анализа данных литературы представляется возможным наметить направления дальнейших исследований этой системы репарации: разработка методов и подходов для изучения механизма активации комплекса MutS-MutL и последующего внесения одноцепочечного разрыва в «дочернюю» цепь ДНК; зондирование ДНК-связывающего центра белка MutL; изучение эндонуклеазной и ДНК-связывающей активностей бактериальных белков MutL и различных факторов, влияющих на данные функции.

Нужно отметить, что система репарации «мисматчей» не только устраняет повреждения в ДНК, но и взаимодействует с белками, участвующими в работе других систем репарации и в различных клеточных процессах: репликации, мейозе, апоптозе и др. Исследование функционирования белков этой системы репарации в разных организмах является ключом к детальному пониманию того, как работает MMR, и какие клеточные процессы связаны с этой системой. Эти данные позволят разобраться в природе заболеваний, связанных с накоплением мутаций в ДНК, что может быть использовано в биомедицине.

III. Материалы и методы

III.1. Реактивы и растворы

Реактивы: 4,6-диоксогептановая кислота, N^α-2,4-динитробензилсульфонил-L-аргинин (N^α-Dns-L-аргинин), ДМСО, N-[3-(диметиламино)пропил]-N'-этилкарбодимид (EDC), АДФ, АТФ, ампициллин, рифампицин («Sigma-Aldrich», США); трео-2,3-дигидрокси-1,4-димеркаптобутан (дитиотреит, ДТТ), N^α-трет-бутоксикарбонил-L-аргинин (N^α-Boc-L-аргинин) («Fluka», Швейцария); додецилсульфат натрия (ДСН), Трис (трис-(гидроксиметил)аминометан), N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота (HEPES), ЭДТА, красители-маркеры бромфеноловый синий (БФС), ксиленцианол (КЦ) («Reanal», Венгрия), глицин («Хеликон», Россия); 3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), 2-пиридилтиол-тетраоксотетрадекан-N-гидроксисукцинимид (PEG₄-SPDP), 2-пиридилтиол-тетраоксооктатриаконтан-N-гидроксисукцинимид (PEG₁₂-SPDP), бромфеноловый синий («Reanal», Венгрия); Ni-NTA-агароза («Novagen», Германия). Мини-колонки и микро-колонки для гель-фильтрации: NAP-5, NAP-10, Ultra MicroSpin G-50 («GE HealthCare», США).

Ферменты и белки: сайт-специфическая никующая эндонуклеаза Bvu10I (5 единиц активности в мкл (ед. акт./мкл)), эндонуклеаза рестрикции BamHI (10 ед. акт./мкл), ДНК-экзонуклеаза I (EcoI) (20 ед. акт./мкл), ДНК-экзонуклеаза III (EcoIII) (200 ед. акт./мкл), T4 полинуклеотидкиназа (10 ед. акт./мкл), T4 ДНК-полимераза (5 ед. акт./мкл), T4 ДНК-лигаза (5 ед. акт./мкл), протеиназа К (~600–1000 ед. акт./мкл), наборы белков-маркеров молекулярной массы PageRuler™ (10–200 кДа), бычий сывороточный альбумин (БСА) («Thermo Fisher Scientific», США).

Плазмиды. Используемые в работе плазмидные конструкции представлены в табл. 2.

Таблица 2. Генетические конструкции, использованные в работе.

Название	Назначение
pTX412	Экспрессия белка дикого типа His-MutS и его мутантных форм
pTX418 (pET-15b)	Экспрессия белка His-MutL и его мутантных форм
pMQ402 (pBAD18)	Экспрессия белка His-MutH
pUC-MMR	Конструирование кольцевого ДНК-субстрата
pET-15b_rsMutL	Экспрессия белка дикого типа His-MutL из <i>R. sphaeroides</i>
pET-15b_ngMutL	Экспрессия белка дикого типа His-MutL из <i>N. gonorrhoeae</i>

Плазмида pUC-MMR, а также плазмиды, несущие гены белков esMutS, esMutL и esMutH и их мутантных форм, были любезно предоставлены проф. П. Фридрихом (Университет имени Ю. Либиха, Германия).

Плазмиды, содержащие ген белка ngMutL были любезно предоставлены проф. Д. Рао (Индийский институт науки, Индия).

Остальные плазмидные конструкции получены в ходе работы.

Клетки *E. coli*, штаммы HMS174 (DE3), B121(DE3)pLysS, XL1 Blue – коммерческие препараты фирмы «Novagen» (Германия).

Олигодезоксирибонуклеотиды синтезированы ЗАО «Евроген» и ООО «Синтол» (Россия).

59-звенный олигонуклеотид, содержащий модифицированный остаток 2'-дезоксинуридина с аминогруппой на гексаметиленовом линкере при С5-атоме, был синтезирован компанией «Eurogenes» (Германия).

Буферные растворы:

ТАЕ: 40 мМ Трис-CH₃COOH (pH 7,5), 1 мМ ЭДТА;

ТВЕ: 50 мМ Трис-Н₃ВО₃ (pH 8,3), 1 мМ ЭДТА;

ТГ: 25 мМ Трис-НСl, 250 мМ глицина (pH 8,3), 0,1% (m/V) ДСН;

ЛАР: 50 мМ Трис-НСl (pH 6,8), 2,5% (m/V) ДСН, 10% (m/V) глицерин, 0,5% (V/V) β-меркаптоэтанол, 0,01% (m/V) БФС;

А: 10 мМ НЕРЕС-КОН (pH 7,9), 10% (m/V) глицерин, 1 мМ ЭДТА;

Б: 25 мМ НЕРЕС-КОН, (pH 7,5), 125 мМ КСl, 5 мМ MgCl₂;

В: 0,01 М калий-фосфатный буфер (pH 6,9), 0,1 М NaCl;

Г: 0,1 М Na₂CO₃/NaHCO₃ (pH 9,2), 0,1 М NaCl;

Д: 20 мМ НЕРЕС-КОН (pH 8,0), 125 мМ КСl, 5 мМ MgCl₂, 0,05% (m/V) глицерин, 0,01% Tween 20, меньше чем 0,5 мкМ SYBR Green I (разведение 1:10,000 V/V);

Е: 50 мМ Трис-НСl (pH 7,6), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ ДТТ, 100 мкМ спермидин;

Ж: 0,1 М Na₂CO₃/NaHCO₃ (pH 9,2);

Ж1: 0,5 М Na₂CO₃/NaHCO₃ (pH 8,8);

Ж2: 0,1 М калий-фосфатный буфер (pH 9,0);

Ж3: 0,1 М Трис-Н₃ВО₃ (pH 8,2);

З: 0,1 М натрий-боратный буфер (pH 8,5);

И: 10 мМ НЕРЕС-КОН (pH 7,9), 200 мМ КСl, 1 мМ ЭДТА, 10% (m/V) глицерин;

К: 20 мМ НЕРЕС-КОН (pH 8,0), 120 мМ КСl, 1 мМ АТФ, 5 мМ MgCl₂, 0,5 мг/мл БСА;

Л: 40 мМ Трис-НСl (pH 7,8), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ ДТТ, 5 мМ АТФ;

М: 20 мМ Трис-НСl (pH 7,9), 1 М NaCl, 1 мМ ДТТ, 5% (m/V) глицерин, 0,05% (V/V) Tween 20, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид (PMSF);

Н: 10 мМ НЕРЕС-КОН (pH 8,0), 300 мМ КСl, 1 мМ ДТТ, 10% (m/V) глицерин, 0,05% (V/V) Tween 20;

О: 10 мМ НЕРЕС-КОН (pH 8,0);

П: 10 мМ Трис-НСl (pH 8,0), 5 мМ MgCl₂, 100 мМ КСl, 0,02% Тритон X-100, 0,1 мг/мл БСА;

Р: 10 мМ Трис-НСl (pH 8,5), 10 мМ MgCl₂, 100 мМ КСl, 0,1 мг/мл БСА;

С: 20 мМ НЕРЕС-КОН (рН 8,0), 125 мМ КСl, 1 мМ АДФ, 5 мМ MgCl₂, 1 мг/мл БСА, 1 мМ ДТТ;

Т: 10 мМ НЕРЕС-КОН (рН 7,9), 100 мМ КСl, 5 мМ MgCl₂;

У: 40,5 мМ КН₂РО₄, 9,5 мМ К₂НРО₄ (рН 7,4), 50 мМ КСl, 0,1 мМ ЭДТА.

Для выращивания культур бактерий использовали среду **LB** (Лурия-Бертани). Один литр среды содержал 10 г бакто-триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl (рН 7,2). Для приготовления агаризованных сред непосредственно перед автоклавированием добавляли бакто-агар в количестве 15 г на 1 л среды.

III.2. Приборы и методы

Спектры поглощения водных растворов олигонуклеотидов в УФ-области записывали на спектрофотометре Hitachi Model 150-20 (Япония) и NanoDrop ND-1000 («PecLab», США). Концентрацию нуклеотидного материала определяли спектрофотометрически по формуле Бугера-Ламберта-Бера: $C_{\text{ДНК}} = A_{260}/\epsilon_{260} \cdot l$, где C – концентрация нуклеотидного материала (М), A_{260} – оптическая плотность раствора при 260 нм, ϵ_{260} – молярный коэффициент экстинкции при 260 нм ($\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), l – длина оптического пути (см). Молярные коэффициенты экстинкции (ϵ_{260}) олигонуклеотидов вычисляли, используя интернет-ресурс <http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/Default.aspx>.

Концентрацию ПЦР-фрагментов и плазмидных ДНК определяли по формуле: $C = A_{260} \cdot 50$ (мкг/мл). Молекулярную массу ПЦР-фрагмента рассчитывали по формуле: $M_w = 2 \cdot 333 \cdot n$, где 333 – усредненная масса каждого нуклеотидного звена, n – число нуклеотидных звеньев в ПЦР-фрагменте.

Растворы ДНК-дуплексов готовили смешиванием эквимольных количеств соответствующих олигонуклеотидов. Затем образцы нагревали до 70-90°C и медленно охлаждали до комнатной температуры («отжиг»).

Концентрацию белков MutL, MutS, MutH и их мутантных форм определяли спектрофотометрически по закону Бугера-Ламберта-Бера: $C_{\text{белка}} = A_{280}/\epsilon_{280} \cdot l$, где c – концентрация белка, М; A_{280} – оптическая плотность раствора при 280 нм; ϵ_{280} – молярный коэффициент экстинкции при 280 нм, $\text{см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$; l – длина оптического пути, см. Для определения концентрации использовали теоретически рассчитанный молярный коэффициент экстинкции одной субъединицы, используя интернет ресурс <https://web.expasy.org/protparam/>.

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

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Анализ реакционных смесей, полученных при синтезе олигонуклеотидов, контроль чистоты и анализ продуктов их взаимодействия с низкомолекулярными соединениями проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте на хроматографе фирмы «Waters» (США). Использовали колонку 4,6×250 мм с сорбентом Luna C-18(2) (размер частиц 5 мкм). Условия аналитического разделения: температура колонки 45°C; элюент 48 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,0), содержащий 2 мМ дигидрофосфат тетрабутиламмония, специально рассчитанный градиент ацетонитрила: 5-19,6% за 1 мин, 19,6-22,2% за 4 мин, 22,2-23,4% за 5 мин, 23,4-24,5% за 10 мин, 24,5-25,7% за 20 мин (шаг элюции 1 звено в мин) и 5-21,2% за 1 мин, 21,2-23,8% за 4 мин, 23,8-25,0% за 5 мин, 25,0-26,1% за 10 мин, 26,1-27,3% за 20 мин (шаг элюции 2 звена в мин); скорость потока 1 мл/мин.

Хроматографическое выделение конъюгатов есMutS(N497C) и есMutS(A336C) с ДНК, содержащими пиридилдисульфидную группу проводили с использованием системы LaChrom Elite («Hitachi», Япония) с программным обеспечением EZChrom Elite. Использовали колонку объемом 1 мл (размеры слоя 7 мм × 25 мм) HiTrap Q HP либо HiTrap Capto Q («GE Healthcare», США). Ионообменные колонки уравнивали 500 мМ KCl в буфере А при скорости потока 0,5 мл/мин. Реакционную смесь центрифугировали в течение 5 мин при 13000 об./мин. Образцы наносили на колонку в буфере Б. Объем пробы составлял 600 мкл для смеси с ДНК, не содержащей флуоресцентных меток, и 300 мкл для смеси с двумя флуорофорами в ДНК. Хроматографическое разделение проводили при комнатной температуре со скоростью потока 0,5 мл/мин. После нанесения образца колонку промывали в течение 20 мин 500 мМ KCl в буфере А для удаления АТФ и избытка белка. Конъюгат ДНК-белок и свободную ДНК элюировали с использованием ступенчатого солевого градиента от 500 до 850 мМ KCl в буфере А (20–35 мин: 650 мМ KCl, 35–40 мин: линейное увеличение от 650 до 750 мМ KCl, 40–50 мин: 750 мМ KCl, 50–55 мин: линейное увеличение от 750 до 850 мМ KCl, 55–65 мин: 850 мМ KCl). Оптическую плотность элюата регистрировали на четырех различных длинах волн, а именно 260, 280, 490 и 590 нм (для ДНК, белка, флуорофоров Atto -488 и Alexa-594 соответственно). Фракции, содержащие ковалентно связанный ДНК-белковый комплекс, смешивали, разделяли на аликвоты, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C. После элюирования свободной ДНК колонку промывали 1000 мМ KCl в буфере А в течение 25 мин, чтобы гарантировать полное удаление любых отрицательно заряженных веществ. Выход конъюгата ДНК-есMutS оценивали путем интегрирования пиков, соответствующих конъюгату и свободной ДНК.

Зависимость устойчивости ДНК-дуплексов VI-VIII от температуры изучали на спектрофотометре Hitachi U-2900 (Япония) (строение дуплексов представлено в разделе

IV.3.1). Использовали термостатируемые кварцевые кюветы Hellma (Германия) с длиной оптического пути 10 мм. УФ-поглощение фиксировали при длине волны 260 нм, соблюдая следующий температурный режим: термостатирование при 25°C – 16 мин, нагрев от 20 до 80°C – 120 мин. Измерение проводили в двух буферных растворах **В** и **Г**. Концентрация дуплексов составляла 1 мкМ.

Температуру «плавления» ($T_{пл}$) ДНК-дуплексов **XIII-XX** (см. раздел IV.7.1) определяли на приборе для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени АНК-16/32 (RT-PCR АНК-16/32) в буфере Д. Объем раствора составлял 40 мкл, концентрация каждого дуплекса – 2 мкМ. Измерения проводили при длине волны 520 нм, в котором наблюдается флуоресценция красителя SYBR Green I. SYBR Green I — чувствительный флуоресцентный индикатор двуцепочечной ДНК. Длина волны возбуждения SYBR Green I в комплексе с ДНК составляет 488 нм (синий свет), а испускания 522 нм (зеленый свет). Кривые плавления отражают снижение флуоресценции SYBR Green I при переходе ДНК в одноцепочечное состояние при нагревании. Температурный режим, при котором проводили измерения, был следующим: инкубация при 30°C в течение 15 мин, нагрев от 30 до 95°C 130 мин. Денатурацию дуплекса считали законченной, если значение флуоресценции при дальнейшем повышении температуры существенно не менялось (выходило на плато). Полученные кривые «плавления» в интегральной форме обрабатывали с помощью программы Origin 8,1. «Сглаживание» кривых проводили сигмоидной функцией Больцмана. Затем «сглаженные» кривые дифференцировали для более точного определения $T_{пл}$.

Электрофорез олигонуклеотидов в денатурирующих условиях проводили в плоском 20x20x1,0 (или 10x10x1,0) см ПААГ, содержащем 19% (*m/V*) акриламида, 1% (*m/V*) N,N'-метиленабисакриламида, 7 М мочевины в **ТВЕ**-буфере при напряженности поля 50 В/см.

Горизонтальный электрофорез в 1%-ном агарозном геле использовался для разделения различных форм плазмидных ДНК. Гели содержали 0,5 мкг/мл бромида этидия. Электрофорез проводили в камере («Хеликон», Россия) в электродном буфере **ТАЕ** в защищённых от света условиях. Анализируемые образцы наносили на гель в специальном буфере (6X DNA Loading Dye, «Thermo Fisher Scientific», США).

Электрофорез ДНК-белковых комплексов в неденатурирующих условиях (метод «торможения» в геле) проводили в 6%-ном ПААГ (18x22x0,15 см), содержащем 5,81% (*m/V*) акриламида и 0,19% (*m/V*) N,N'-метиленабисакриламида, в **ТАЕ**-буфере. Префорез и электрофорез проводили в течение 3 ч при температуре 4°C при силе тока 15 мА и напряжении 100 В (напряженность 4,5 В/см).

Электрофорез белков и ДНК-белковых конъюгатов (гель-электрофорез по Лэммли) проводили в ПААГ (10x10x0,1 см), содержащем 0,1% (*m/V*) ДСН, в буфере **ТГ** при

напряжении 200 В, силе тока 80 мА, напряженности поля 20 В/см. Разделяющий гель (8%): 7,73% (m/V) акриламида, 0,27% (m/V) N,N'-метиленбисакриламида, 0,1% (m/V) ДСН, 375 мМ Трис-НСl (рН 8,8). Концентрирующий гель (4%): 3,87% (m/V) акриламида, 0,13% (m/V) N,N'-метиленбисакриламида, 0,1% (m/V) ДСН, 125 мМ Трис-НСl (рН 6,8). Пробы наносили на гель в 20 мкл буфера **LAP**. Перед нанесением на гель пробы прогревали в течение 3–5 мин при 90°C, охлаждали 3–5 мин в бане со льдом и центрифугировали 5 мин при 13400 об./мин.

Для визуализации зон белка гель окрашивали раствором PageBlue™ («Thermo Fisher Scientific», США) на основе Кумасси бриллиантового синего G-250 или раствором нитрата серебра, входящего в состав набора PageSilver Silver Staining Kit («ThermoFisher Scientific», США) по протоколу фирмы-производителя.

Введение ³²P-метки в олигонуклеотиды. Для введения 5'-³²P-метки 30–40 пмоль ДНК-фрагмента инкубировали в 10 мкл буфера E содержащем 0,3 мкМ [γ -³²P]-АТФ, с T4-полинуклеотидкиназой (1 ед. акт.) в течение 1 ч при 37°C. После проведения реакции смесь очищали с помощью гель-фильтрации на колонке Ultra MicroSpin G-50. ³²P-Меченные и немеченные ДНК-дуплексы формировали путем последовательной денатурации-ренатурации комплементарных цепей в соотношении 1:1.

III.3. Общие методики

III.3.1. Синтез модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов

Получение модифицированных олигонуклеотидов (7-12), содержащих остаток 2'-дезоксидезокси-2'-(4,6-диоксогептиламида)уридина. Строение олигонуклеотидов см. в разделах IV.3.1-IV.3.2. К раствору 4,6-диоксогептановой кислоты (1 мг, 6,3 мкмоль) и циклогексилкарбодиимида (1 мг, 6,0 мкмоль) в 50 мкл ДМСО добавляли 4 нмоль олигонуклеотида, содержащего 2'-дезоксидезокси-2'-аминоуридин, в 100 мкл буфера **Ж**, выдерживали в течение 16–18 ч. Затем проводили гель-фильтрацию раствора на колонке NAP-5. Реакционную смесь анализировали методом ВЭЖХ, строение подтверждали методом MALDI-TOF.

Изучение возможности образования ковалентной связи между тяжами ДНК-дуплекса, содержащего β -дикетогруппу. Смешивали 1,6 нмоль олигонуклеотида (7) и 2,2 нмоль комплементарного олигонуклеотида 5'-TTGAGGGGACTTTCCGAAT, 5 мкл 2 М раствора NaCl и добавляли воду до объема 150 мкл. Смесь нагревали до 80°C и оставляли охлаждаться до 20°C. Затем добавляли 100 мкл натрий-карбонатного буфера **Ж** инкубировали 2 суток, проводили гель-фильтрацию на колонке NAP-5. Продукты реакции анализировали методом ВЭЖХ.

Реакция олигонуклеотидов, содержащих β -дикетогруппу, с гуанидином и производными аминокислот. К 4 нмоль олигонуклеотида (**7**, **8**) добавляли раствор 1 мг гидрохлорида гуанидина (N^α -Woc-L-аргинина, N^α -Dns-L-аргинина) в 30 мкл буфера. При проведении реакции с гуанидином использовали буферные растворы **Ж** и **Ж1**, с Dns-аргинином только буфер **Ж**, с Woc-аргинином использовали буферы **Ж-Ж3**. Реакционные смеси инкубировали 16–18 ч, проводили гель-фильтрацию на колонке NAP-5 и анализировали ВЭЖХ. Времена удерживания продукта присоединения Woc-аргинина и Dns-аргинина к олигонуклеотиду (**7**) составляют 17,8 и 18,9 мин, соответственно, исходного олигонуклеотида (**7**) – 15,9 мин. Наличие продукта реакции подтверждали методом спектрометрии MALDI TOF. Для продукта присоединения к олигонуклеотиду (**7**) гуанидина $m/z [M]^+$ найдено: 4669,6, рассчитано: 4669,0; N-Woc-L-аргинина - $m/z [M]^+$ найдено: 4884,9, рассчитано: 4684,4. Продукт присоединения Dns-аргинина к ДНК выделить не удалось.

Олигонуклеотиды, содержащие акриламидную группу на линкерах различной длины были синтезированы доцентом Сколковского института науки и технологий (Сколтех) Зацепиным Т.С. На первом этапе получали олигонуклеотиды-предшественники стандартным амидофосфитным методом. Использовали модифицированный амидофосфит dU, содержащий терминальную алкильную группу на линкерах различной длины при C5-атоме dU. Последующее введение акриламидной группы в полученные олигонуклеотиды осуществлялось по реакции [3+2]-диполярного присоединения с бифункциональным реагентом N-(3-азидопропил)акриламидом по методике, описанной ранее [219]. Массы 17-звенных фрагментов ДНК с акриламидной группировкой на линкерах различной длины, определенные методом масс-спектрометрии MALDI TOF, совпадали с рассчитанными: 5'-ACTGGTGCTTGGCdU_s^{ethynyl}GCT-3' ($m/z [M]^+$ рассчитано: 5218,4; найдено: 5223,2), 5'-ACTGGTGCTTGGCdU_m^{ethynyl}GCT-3' ($m/z [M]^+$ рассчитано: 5299,5; найдено: 5304,1), 5'-ACTGGTGCTTGGCdU_s^{ethynyl}GCT-3' ($m/z [M]^+$ рассчитано: 5456,7; найдено: 5463,0), 5'-ACTGGTGCTTGGCdU_s^{acryl}GCT-3' ($m/z [M]^+$ рассчитано: 5372,6; найдено: 5375,4), 5'-ACTGGTGCTTGGCdU_m^{acryl}GCT-3' ($m/z [M]^+$ рассчитано: 5453,7; найдено: 5457,0) и 5'-ACTGGTGCT-TGGCdU_s^{acryl}GCT-3' ($m/z [M]^+$ рассчитано: 5610,9; найдено: 5613,2).

Длины линкеров от C5-го положения урацила до CH_2 атома акриламидной группы оценивали с помощью программы ChemSketch. Они составили 12,6, 22,3, 32,6 Å, соответственно. Полученные олигонуклеотиды использовались для формирования ДНК-дуплексов, содержащих и не содержащих G/T-пару.

Получение олигонуклеотидов, содержащих пиридилдисульфидную группу на линкерах различной длины. Для получения олигонуклеотида, содержащего в заданном положении пиридилдисульфидную группу, использовался 59-звенный одноцепочечный

фрагмент ДНК с остатком dU, в котором при С5-атоме находилась алифатическая аминогруппа. ДНК (4 нмоль) растворяли в 45 мкл буфера **З**, добавляли 5 мкл 500 мМ раствора кросслинкера (SPDP, PEG₄-SPDP или PEG₁₂-SPDP) в ДМСО. Смесь выдерживали 16-18 ч при комнатной температуре. Выделение ДНК после реакции проводили на колонках Zeba 7 К или 40 К объемом 0,5 мл согласно протоколу, рекомендованному производителем («ThermoFisher Scientific», США). В качестве элюента использована вода. Для контроля эффективности очистки была проведена реакция между олигонуклеотидом и 2-меркаптоэтанолом. Для этого 4 мкл 1 мМ раствора 2-меркаптоэтанола добавляли к 1 мкл реакционной смеси или очищенному олигонуклеотиду и выдерживали 15 мин при комнатной температуре. Затем записывали спектры поглощения раствора. По максимуму поглощения при 343 нм оценивали количество пиридин-2-тиона и сравнивали с поглощением олигонуклеотида при 260 нм. Если количество образовавшегося пиридин-2-тиона превосходило количество ДНК, то олигонуклеотид вновь подвергали очистке на колонках. Эффективность реакции оценивали по подвижности полученных олигонуклеотидов в 20%-ном ПААГ в ТВЕ-буфере с последующим окрашиванием бромистым этидием.

III.3.2. Выделение белков MutS и MutL из *E. coli*, их мутантных форм и оценка их активности

Выделение белков *esMutS* и *esMutL*. Рекомбинантные белки *esMutS* и *esMutL* и их мутантные формы выделены из культуры клеток *E. coli* (штамм HMS174(λDE3)) методом аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе по стандартной методике [220] с дальнейшей очисткой препаратов белков эксклюзионной хроматографией. Хроматографию проводили на приборе Äkta explorer с использованием колонки Superdex200 10/300 GL («ThermoFisher Scientific», США). Колонку уравнивали буфером **И**, который затем служил элюентом. Объем наносимой пробы – 0,5 мл. Расход элюента 0,35 мл/мин. За ходом разделения следили по поглощению при 280 нм. Собирали фракции по 0,5 мл, концентрацию белка во фракциях определяли на приборе NanoDrop ND-1000 («PecLab», США).

Анализ активности белка *esMutL* и его мутантных форм. Активность каждой мутантной формы *esMutL* была проверена по способности активировать дальнейшие стадии MMR. Эксперимент проводился согласно методике, описанной ранее [221]. Эффективность активации репарации «мисматчей» оценивали по интенсивности гидролиза «дочерней» цепи ДНК в присутствии белков *esMutS*, *esMutL* или его мутантных форм и *esMutH*. Плазмиду pUC-MMR (10 нМ), содержащую G/T-пару и метилированный участок узнавания белка *esMutH* (получение такой плазмиды подробно описано в работе ранее [222]), инкубировали с белками *esMutS* (400 нМ), *esMutL* или одной из его мутантных форм (400 нМ) и *esMutH* (100 нМ) в 15 мкл буфера **К** в течение 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением

20 мМ ЭДТА и 0,025% ДСН, затем в реакционную смесь добавляли протеиназу К (0,5 мкл) и дополнительно инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Продукты реакции анализировали методом гель-электрофореза в 1%-ом агарозном геле с добавлением бромида этидия. Фотографии гелей, полученные при облучении УФ-светом, обрабатывали с помощью программы ImageLab («Bio-Rad», США).

III.3.3. Клонирование, выделение и оценка активности белков MutL из *R. sphaeroides* и MutL из *N. gonorrhoeae*

Конструирование плазмидных ДНК, содержащих ген белка rsMutL. Плазмидную конструкцию с природным геном, кодирующим белок rsMutL с дополнительной 36-звенной последовательностью на N-конце, включающей блок из шести остатков His, получен в этой работе впервые. Ген белка rsMutL амплифицировали с помощью ПЦР с геномной ДНК бактерии *R. sphaeroides* (штамм 2.4.1.), которую выделяли из клеток посредством щелочного лизиса клеток [223]. Праймеры 5'-AAGGGGCCATATGGGAAGCCGGTGGCGGAG-3' и 5'-AAGGGGAAGACGAGATCTTCATCGCCGGCCGAAGAGCC-3' имели на 5'-конце дополнительные нуклеотидные последовательности с участками узнавания эндонуклеаз рестрикции (ЭР) BglII и NdeI на концах ПЦР-продукта (подчеркнуты). Полученный с помощью описанных выше праймеров ПЦР-фрагмент обрабатывали ЭР BglII и NdeI (10 ед. акт., 37°C, 4 ч), далее очищали с помощью набора для выделения ПЦР-продуктов («Promega», США) и смешивали с плазмидным вектором pET15b, который также был заранее обработан ЭР BglII и NdeI и пересажен спиртом (соотношение вектор : вставка составляло 1 : 3). К полученной смеси добавляли буфер Л и ДНК-лигазу (1 ед. акт.) и выдерживали 18 ч при 4°C. Часть лигазной смеси (5 мкл) добавляли к аликвоте клеток *E. coli* XL1 Blue (200 мкл), затем проводили трансформацию «тепловым шоком» по стандартной методике. Из полученных после трансформации колоний клеток выделяли плазмидную ДНК с помощью коммерческого набора («Promega», США). Правильность полученной конструкции подтверждали секвенированием по Сэнгеру, которое было выполнено в ЗАО «Евроген».

Выделение белка rsMutL. Клетки BL21(DE3) трансформировали плазмидой, содержащей ген белка rsMutL, методом «теплового шока», помещали в 3 л среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и инкубировали при интенсивной аэрации и 37°C до $A_{600} = 0,5$ О.Е. Затем добавляли водный раствор ИПТГ до концентрации 0,1 мМ и инкубировали клетки при 18°C в течение 16–18 ч. Клеточную массу центрифугировали, осадок замораживали и хранили при –20°C. Для контроля уровня экспрессии белка отбирали пробы до и после проведения индукции и анализировали методом электрофореза в 8%-ном денатурирующем ПААГ по Лэммли. Для визуализации зон белка гель окрашивали раствором

PageBlue™ («Thermo Fisher Scientific», США) на основе кумасси бриллиантового синего G-250.

Полученную после индукции клеточную массу размораживали во льду и затем ресуспензировали в буфере **M** с добавлением 5 мМ имидазола. Клетки разрушали ультразвуком. Клеточный лизат, содержащий белок rsMutL, отделяли от неразрушенных компонентов клеток центрифугированием (30 мин, 18 000 об./мин, 4°C), добавляли к 1 мл Ni-NTA-агарозы («ThermoFisher Scientific», США) и медленно перемешивали 1 ч при 4°C. Белок rsMutL элюировали с сорбента 500 мкл буфера **M** с добавлением имидазола до конечной концентрации 500 мМ. Собранный раствор снова наносили на колонку и повторяли процедуру 2–3 раза. Элюцию проводили еще раз, используя 500 мкл свежего буфера. К полученному раствору белка добавляли водный раствор ДТТ до концентрации 10 мМ. Дальнейшую очистку белка проводили эксклюзионной хроматографией на колонке размером 10/300 мм с сорбентом ENrich SEC 650 («Bio-Rad», США). Колонку уравнивали буфером **H**, который и служил элюентом. Объем наносимого на колонку препарата составил 1 мл, расход элюента – 1 мл/мин. За ходом разделения следили по поглощению при 280 нм. Концентрацию белка во фракциях определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop ND 1000 («PecLab», США). Для концентрирования нужных фракций использовали центрифужные пробирки Amicon Ultra («Merck», Германия) с мембраной, задерживающей соединения с молекулярной массой >10 кДа. Затем отбирали аликвоты по 5–10 мкл в отдельные пробирки и замораживали их в жидком азоте. Пробирки с аликвотами раствора белка хранили при –70°C и размораживали в бане со льдом непосредственно перед использованием.

Выделение белка ngMutL. Белок ngMutL выделяли методом аффинной хроматографии на носителе Ni-NTA-агароза и дополнительно очищали эксклюзионной хроматографией согласно методике [75].

Гидролиз плазмидной ДНК белками ngMutL и rsMutL. Плазмиду pUC-MMR (концентрация 10 нМ) инкубировали ngMutL или rsMutL (500 нМ) в буфере **O**, содержащем 100 мМ KCl, 5 мМ хлоридов двухвалентных металлов в зависимости от эксперимента, при 37°C в течение 1 ч. При проведении гидролиза в присутствии ZnCl₂ его концентрация варьировалась от 10 до 100 мкМ, а при добавлении АТФ – от 0,5 до 5 мМ. Реакцию останавливали добавлением к инкубационной смеси 50 мМ ЭДТА. Для деградации белков в реакционную смесь добавляли протеиназу К (10 ед. акт.), инкубировали 30 мин при 37°C. Реакционные смеси анализировали методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле, содержащем бромид этидия. Фотографии гелей, полученные при облучении УФ-светом, обрабатывали с помощью программы ImageLab («Bio-Rad», США). В контрольных экспериментах плазмиду pUC-MMR (10 нМ) инкубировали 60 мин при 37°C с ЭР BamHI или

с никующей эндонуклеазой (НЭ) Bpu10I (5 ед. акт.) в 10 мкл буфера **II** (в случае ЭР) или **P** (в случае НЭ).

Оценка АТФазной активности белков *ngMutL* и *rsMutL*. За основу были взяты методики [14,75]. Смеси объемом 60 мкл в буфере **O**, содержащие 50 нМ 76-звенного ДНК-дуплекса **V** (см. раздел IV.2.3), 5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, различные концентрации АТФ (100, 150, 250, 300, 400, 500, 750, 1000 мкМ), инкубировали с белком MutL (0,7 мкМ) при 25°C в течение 150 мин. Каждые 15 мин из реакционной смеси отбирали пробы по 30 мкл и останавливали реакцию добавлением 50 мМ ЭДТА. Затем 20 мкл реакционной смеси добавляли к 80 мкл реагента для идентификации фосфат-иона (0,0815% малахитового зеленого, 2,32% поливинилового спирта, 5,75% молибдата аммония в 6 Н HCl в соотношении с водой 2:1:1:2), предварительно помещенного в ячейки 96-луночного планшета, и тщательно перемешивали. Затем добавляли 20 мкл 34%-ного раствора цитрата натрия, перемешивали до стабилизации окраски и выдерживали примерно 15 мин. Поглощение полученных сине-зеленых растворов измеряли на плащечном ридере Victor X5 («Perkin Elmer», США) при длине волны 590 нм. Измеряли оптическую плотность растворов с известным количеством фосфат-иона и строили калибровочный график. С его помощью определяли количество фосфат-иона в исследуемых растворах. Кинетические параметры рассчитывали методом нелинейной регрессии с применением схемы Михаэлиса-Ментен.

III.3.4. Комплексообразование MutS и MutL с ДНК-лигандами

Комплексообразование белка *esMutS* с ДНК-дуплексом, содержащим β -дикетогруппу. Смеси ³²P-меченного ДНК-дуплекса **IX** (5 пмоль) с белком *esMutS* (5-100 пмоль) инкубировали в буфере **C** при 37°C в течение 20 мин. Затем пробы анализировали методом электрофореза в 6% ПААГ по методике, описанной выше (см. раздел III.2). Гели высушивали и закладывали в кассету с чувствительным к β -излучению экраном BAS Cassette2 2340. Электрофореграммы получали с помощью прибора FLA-3000 («FujiFilm», Япония), обрабатывали с помощью программы TotalLab TL120 («GE Healthcare», США). Измеряли интенсивность зон, соответствующих свободной ДНК и комплексу MutS с ДНК. Степень комплексообразования рассчитывали как отношение интенсивности зоны, соответствующей ДНК-белковому комплексу, к суммарной интенсивности зон, умноженное на 100%. Расчет проводили как минимум из трех независимых экспериментов.

Комплексообразование мутантной формы *esMutS(A469C)* с ДНК-дуплексами, содержащими терминальную этинильную группу. Для проверки ДНК-связывающей активности *esMutS(A469C)* использовали 5'-³²P-меченые ДНК-дуплексы различного строения (**XIV-XX**) (раздел IV.7., табл. 12). Смеси объемом 10 мкл буфера **B**, содержащие 0,5 мкМ ДНК-дуплекса, 1 мг/мл БСА, 1 мМ АДФ, 1 мМ ТСЕР инкубировали с 2,5 мкМ *esMutS(A469C)* в

течение 20 мин при 37°C. Анализ проводили методом гель-электрофореза в 6%-ом ПААГ в ТВЕ буфере при 4°C по методике, описанной выше (см. раздел III.2).

Комплексообразование белков *esMutS* и *esMutL* с 59-звенными немодифицированным и пиридилдисульфидсодержащими дуплексами. Смеси объемом 20 мкл в буфере Т, содержащие 10 нМ ДНК-дуплекса, 0,5 мг/мл БСА инкубировали с белком *esWTMutL* различной концентрации (80-250 нМ) в течение 10 мин в бане со льдом. Связывание белков *MutS* (варианты *esWTMutS* или *esCFMutS*) проводилось в 20 мкл в буфера Т, содержащем 10 нМ ДНК-дуплекса, 0,5 мг/мл БСА и 1 мМ АДФ. Концентрация *esMutS* варьировалась от 40 до 200 нМ. Комплексообразование проводилось при 37°C в течение 20 мин. Затем пробы анализировали методом электрофореза в 6%-ом ПААГ по методике, описанной выше (см. раздел III.2).

Комплексообразование *ngMutL* с немодифицированными ДНК различной длины. Для проверки ДНК-связывающей активности белка *ngMutL* использовали ДНК-дуплексы различной длины (16, 20, 30, 41, 76 п.н.), содержащие в одной из цепей флуоресцентную метку TAMRA (5-карбокситетраметилпродамин) и 16-, 20-, 30-, 41- и 76-звенные олигонуклеотиды с TAMRA, входящие в их состав. Связывание проводили по методике, описанной в [75]. Смеси объемом 20 мкл в буфере О, содержащие 20 нМ ДНК-дуплекса, 1 мМ ДТТ, 100 мМ КСl, 0,5 мг/мл БСА, инкубировали с белками *MutL* различной концентрации (0,25-4 мкМ) в течение 10 мин в бане со льдом. Анализ проводили методом гель-электрофореза в 6%-ом ПААГ в ТВЕ буфере при 4°C (метод «торможения в геле»).

III.3.5. Ковалентное связывание *MutS* и *MutL* с модифицированными ДНК

Аффинная модификация *esMutS* и *esMutL* реакционноспособными ДНК-дуплексами, содержащими β -дикетогруппу. Белок *esMutS* или *esMutL* (количество варьировали от 10 до 100 пмоль) инкубировали в 10 мкл буфера С или в буфере С без добавления КСl (*esMutS* и *esMutL* соответственно) с меченым ДНК-дуплексом (количество варьировали от 5 до 50 пмоль) при 37°C в течение 0,5 - 5 ч. Продукты реакции анализировали в денатурирующем ПААГ по Лэммли. Особенностью являлось то, что разделяющий гель содержал дополнительный нижний слой – 0,375 М Трис-НСl (рН 8,8), 20% акриламида, 1% *N,N'*-метиленабисакриламида, 0,1% ДСН. ПААГ затем окрашивали раствором солей серебра (см. раздел 2).

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

«Кросслинкинг» *esMutL* и его мутантных форм с ДНК, содержащими пиридилдисульфидную группу на линкерах различной длины. Реакцию «кросслинкинга» различных форм белка *esMutL* (4 мкМ) с ДНК (1 мкМ) проводили в 10 мкл буфера Т при 0°C в течение 30 мин. При проведении реакции в присутствии *esMutS* (2 мкМ) использовали его безцистеиновый вариант (*esCFMutS*). Реакцию останавливали добавлением буфера LAR и дальнейшим прогреванием проб при 95°C. Продукты реакции анализировали в денатурирующем ПААГ по Лэммли (см. раздел III.2). Для визуализации зон белка гель окрашивали раствором PageBlue™ («Thermo Fisher Scientific», США) на основе кумасси бриллиантового синего G-250.

Для количественной оценки выхода конъюгатов *esMutL* и его мутантных форм с ДНК предварительно была построена калибровочная зависимость интенсивности окраски зоны *esMutL* в геле раствором кумасси бриллиантового синего G-250 от количества белка (0-100 пмоль на мономер белка). Окрашенные гели анализировали на приборе ChemiDoc™ Imaging System и количественно обчитывались с помощью программы ImageLab («Bio-Rad», США). Построенная зависимость интенсивности зон от количества белка оказалась линейной в интервале 0-100 пмоль (рис. 18). В экспериментах использовали 30 пмоль белка, таким образом вводить поправочные коэффициенты не было необходимости.

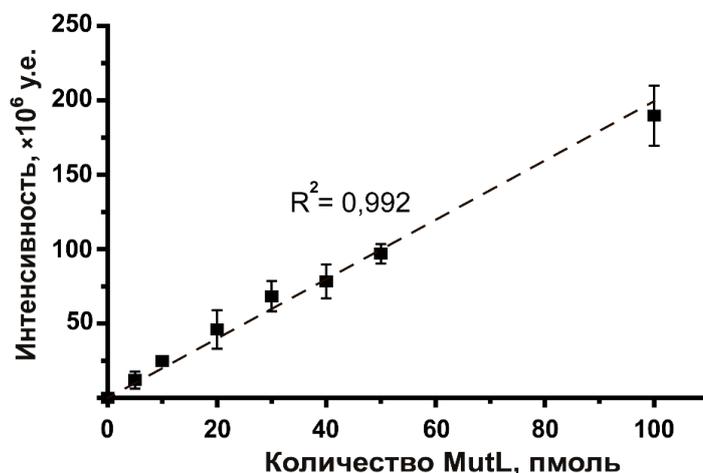


Рис. 18. Интенсивности зон, соответствующие мономеру MutL, в 8%-ном ПААГ, содержащем ДСН, после окраски раствором PageBlue™ основе кумасси бриллиантового синего G-250. У.е.: условные единицы.

Выход конъюгата рассчитывали по формуле: $y = 2I_c / (I_c + I_m + I_d)$, где I_c - интенсивность зоны, соответствующей конъюгату, I_m - интенсивность зоны мономера *esMutL*, I_d - интенсивность зоны димера *esMutL*.

Для получения зависимостей выхода образования ДНК-белкового конъюгата от времени реакцию проводили аналогичным образом. Общий объем смеси составлял 80 мкл. Из которой через определенные промежутки времени с начала реакции (0,5, 1, 2, 5, 10, 15 и

30 мин) отбирали пробы объемом 10 мкл и анализировали их методом гель-электрофореза как описано выше.

Аффинная модификация белка ngMutL ДНК, содержащими пиридилдитиогруппу. Смеси объемом 10 мкл в буфере **Б** без KCl, содержащие 1 мкМ ДНК-дуплекса и 4 мкМ белка ngMutL, инкубировали 15 мин в бане со льдом. При проведении «кросслинкинга» в присутствии АТФ, АДФ, АТФ γ S или ZnCl₂ их концентрация в реакционной смеси составляла 1 мМ. Реакцию останавливали, добавляя в смесь буфер **LAP** без β -меркаптоэтанола. Анализ реакционных смесей проводили в 8%-ном ПААГ, содержащем 0,1% ДСН. После электрофореза гель сначала окрашивали водным раствором бромида этидия (0,5 мкг/мл) в течение 15 мин для визуализации ДНК и фотографировали в ультрафиолетовом свете. При этом в некоторой степени наблюдалось и окрашивание зон, соответствующих белкам, что было описано в литературе [224]. Затем для визуализации белковых зон тот же гель окрашивали раствором нитрата серебра.

Аффинная модификация мутантных форм белка esMutS с реакционноспособными ДНК-лигандами, содержащими акриламидную группу. «Кросслинкинг» мутантных форм esMutS(A469C) и esMutS(N497C) с различными ДНК-дуплексами (**XXI-XXXII**), содержащими акриламидную группу (см. раздел IV.7.1), проводили в буфере **Б**, содержащем 1 мМ АДФ и 1 мМ ТСЕР. Концентрация мутантных форм esMutS в расчете на мономер составляла 5 мкМ, концентрация ДНК-дуплекса – 0,5 мкМ. Реакцию проводили в течение 2 ч при 37°C. Продукты реакции разделяли в 8%-ном денатурирующем ДСН-ПААГ с 4%-ным концентрирующим слоем. При проведении реакций с ³²P-мечеными фрагментами ДНК гель после электрофореза высушивали и закладывали в кассету с чувствительным к β -излучению экраном BAS Cassette2 2340. Электрофореграммы получали с помощью прибора FLA-3000 («FujiFilm», Япония). Затем гель помещали в воду и окрашивали раствором кумасси G250 для визуализации белка.

Ковалентное связывание мутантных форм esMutS ДНК, содержащими пиридилдисульфидную группу. Реакцию «кросслинкинга» различных форм белка MutS (4 мкМ) с ДНК (1 мкМ) проводили в буфере **Б** с различными количествами АТФ (0, 10, 100 или 1000 мМ в разных экспериментах), АДФ (1 мМ) или АТФ γ S (1 мМ). Смесь выдерживали 30 мин в бане со льдом или при 37°C. «Кросслинкинг» проводили в объеме 10 мкл (для аналитических целей), 300 или 600 мкл (для последующей хроматографической очистки). Анализ проводили аналогично «кросслинкингу» белка esMutL (см. выше).

III.3.5. Флуоресцентные методы

Флуоресцентные исследования конъюгатов белков esMutS(N497C) и esMutS(A336C) с модифицированными ДНК, содержащими в своем составе два флуорофора. Перед

регистрацией спектров флуоресценции конъюгатов проводили смену буфера на буфер **У** с использованием колонок Zeba Spin Desalting Columns 40K MWCO («Thermo Fisher Scientific», США) согласно протоколу производителя. Спектры записывали на спектрофлуорометре FluoroMax-4 («Horiba Jobin Yvon», Япония) при комнатной температуре. Использовали кварцевую кювету («Hellma», Германия) объемом 100 мкл с оптическим путем 10 мм. Спектры испускания флуоресценции регистрировали в диапазоне от 500 до 800 нм при длине волны возбуждения 470 нм. Затем добавляли АТФ до 1 мМ с последующим добавлением ДТТ до 10 мМ. Для полного разрушения белка добавляли протеиназу К. Регистрировали эмиссионные спектры после добавления каждого компонента. Каждый эксперимент повторяли трижды; стандартное отклонение полученных значений не превышало 5%.

Быструю кинетику «разгибания» ДНК в ковалентно связанных комплексах *ecMutS*-ДНК методом «остановленного потока» измеряли на приборе SF-61SX2 («TgK Scientific», Великобритания) при длине волны возбуждения 436 нм с использованием фильтра ET525/50M («Chroma Technology», Германия) для регистрации флуоресценции донора и фильтра OG590 («Schott», Германия) для регистрации сигнала FRET. Первый шприц содержал 8 нМ раствор «сшитого» комплекса (конъюгат **4** или **8**, см. раздел IV.6, схема 7) в буфере **У**, второй шприц содержал различные концентрации АТФ (2, 20 200 и 2000 мМ) в буфере **У**. Таким образом, конечные концентрации в ячейке-реакторе были вдвое ниже, чем в исходных шприцах. Зависимость изменения сигнала от времени записывали 2-3 раза. Данные обрабатывали с помощью программы Origin 9.0.

Флуоресцентную метку в *ecMutL(H297C)* вводили с использованием реагента малеимид-Alexa-594 («Thermo Fisher Scientific», США). К 100 мкл 22 мкМ *ecMutL(H297C)* в буфере **О**, содержащем 200 мМ КСl и 1 мМ ЭДТА, добавляли 4-кратный избыток реагента по отношению к белку. Реакционную смесь выдерживали 1 ч в бане со льдом. Избыток реагента удаляли на колонках Zeba Spin Desalting Columns 40K MWCO («Thermo Fisher Scientific», США), уравновешенных буфером, в котором проходила модификация. Препарат *MutL(H297C)*-Alexa-594 был разделен на фракции по 5 мкл и заморожен в жидком азоте. Эффективность введения метки (DOL) рассчитывали из спектров поглощения по следующей формуле:

$$DOL = \frac{A_{Fl}^{Max} * \epsilon_{Pr}}{((A^{280} - A_{Fl}^{Max} * CF) * \epsilon_{Fl})} * 100\%$$

где A_{Fl}^{Max} – поглощение флуорофора в максимуме, A^{280} – поглощение флуорофора при 280 нм, ϵ_{Pr} — коэффициент молярной экстинкции белка, CF – поправочный коэффициент флуорофора, а ϵ_{Fl} – коэффициент молярной экстинкции флуорофора.

Для исследования эффективности «привлечения» *ecMutL* конъюгат *ecMutS*-ДНК разбавляли до конечной концентрации 50 нМ в 200 мкл буфера У при комнатной температуре в 96-луночных планшетах с неадсорбирующей поверхностью («Corning», США), затем последовательно добавляли Sytox Blue (конечная концентрация 6 мкМ), *ecMutL*(H297C)-Alexa-594 (конечная концентрация 100 нМ на мономер), АТФ в различных концентрациях и регистрировали сигналы флуоресценции на микропланшетном ридере TECAN infinite F200 («Tescan Group Ltd», Швейцария). В кинетических исследованиях АТФ (20 мкл) добавлялась с помощью инжектора, встроенного в прибор, до нужной концентрации. Интенсивности флуоресценции измеряли в трех каналах (донор, акцептор и FRET) с помощью следующих комбинаций фильтров (Ex/Em): 405/485 нм с шириной щели 4/20 нм для донора; 590/670 нм с шириной щели 20/10 нм для акцептора; 450/620 нм с шириной щели 10/10 нм для FRET. Поправочные коэффициенты на перекрытие спектров флуорофоров были получены из экспериментов, в которых присутствовал только один компонент, меченный флуорофором.

III.3.5. Биоинформатические методы

Моделирование комплексов *ecMutS*-ДНК. Модели комплекса *ecMutS*-ДНК были получены на основе структуры 3ZLJ комплекса *ecMutS*-ДНК [133]. В структуре 3ZLJ в 5-ом положении в 3'-направлении от Т в G/T-паре находится остаток А. В нашей модели он заменен на Т в соответствии со структурой дуплекса XVII (см. раздел IV.7.1), используемого в экспериментальной работе. Рассчитывали расстояние от Cys белка до этого нуклеотида. Для оценки расстояний от модификации в 8-й и 11-й позициях от «мисматча», построены две другие модели. В этих моделях в исходной 3ZLJ структуре G/T-пара сдвигали в 3'-направлении, заменяя остаток А на G в «верхней» цепи дуплекса для получения «мисматча». В случае модификации в 8-й или 11-й позиции несколько случайных нуклеотидов добавлены в 3'-направлении от пары G/T, чтобы сохранить все контакты в комплексе *ecMutS*-ДНК для правильного построения модели. Исходная пара G/T заменялась на G/C. Все процедуры проводились с использованием веб-сервера WEB 3DNA 2.0. После получения модели ДНК-белкового комплекса остатки A469 и N497 заменяли на Cys в программе Chimera 1.13.1 с последующей оптимизацией расположения боковой группы аминокислоты по энергии.

Биоинформатический анализ последовательности *rsMutL* выполнен совместно с ведущим научным сотрудником Алексеевским А.В. (НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ). Последовательность белка MutL штамма 2.4.1. бактерии *R. sphaeroides* была получена из базы данных Uniprot (код доступа Q3IYV3). Для поиска гомологичных белков использовалась также последовательность *ecMutL*, штамм K12 (*ecMutL*, код доступа P06722 в Uniprot). Гомологи белков *rsMutL* и *ecMutL* искали в 4379 репрезентативных геномах бактерий и архей. Использовали программу TBLASTN, порог достоверности (e-value) был принят равным

0,001, длина «слова-зародыша» – равной 3. «Выравнивание» аминокислотных последовательностей гомологов rsMutL и esMutL проводили с помощью программы Muscle с параметрами по умолчанию. Последовательности всех гомологов белков rsMutL и esMutL были разделены на три группы на основании наличия эндонуклеазного мотива XII. Для выделения групп из объединенного «выравнивания» всех полноразмерных последовательностей гомологов MutL был выбран участок «выравнивания» с координатами в rsMutL от 449 до 462 а.о. (14 а.о.), включающий мотив XII (см. раздел IV.1.4.1). Все полученные участки последовательностей были кластеризованы по проценту функционально сходных а.о. между парами с помощью программы Protdist пакета PHYLIP. Самый большой кластер включал последовательности участков, включающий мотив XII, из белков с доказанной эндонуклеазной активностью. Белки из этого кластера отнесены в группу 1 с вероятной эндонуклеазной активностью. Белки из кластеров последовательностей, в которых отсутствовало достоверное сходство с мотивом XII, включены в группу 2 белков MutL, для которых нет оснований предполагать эндонуклеазную активность. В группу 3 вошли белки, изучаемый участок последовательности которых имеет невысокое, но достоверное сходство с мотивом XII. В большинстве из них хотя бы один из функционально важных остатков этого мотива заменен на функционально отличные остатки.

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

(Обсуждение результатов)

Сиквенс-специфические ДНК-белковые взаимодействия являются определяющими во многих биологических процессах, таких как транскрипция и её регуляция, репарация, метилирование ДНК, гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции и т.д. Белки узнают специфические последовательности ДНК в основном за счёт контактов с большой бороздкой и частично за счёт образования водородных связей с малой бороздкой. Неспецифические белково-нуклеиновые контакты реализуются в ходе электростатических взаимодействий между положительно заряженными аминокислотами белка и отрицательно заряженным углеводофосфатным остовом ДНК. Для исследования комплексов белков с нуклеиновыми кислотами сегодня применяют ряд методов, которые можно разделить на инструментальные, молекулярно-биологические и химические. Особое место среди химических методов занимает метод аффинной модификации белков реакционноспособными аналогами ДНК («кросслинкинг»), который позволяет получить дополнительную информацию о структуре специфического комплекса и фиксировать короткоживущие макромолекулярные ассоциаты, образующиеся на разных стадиях ДНК-белкового узнавания. Существует множество способов ковалентного присоединения молекул ДНК к белку. Реакционноспособная группировка может вводиться в ДНК как в гетероциклическое основание, так и в углеводный фрагмент, межнуклеотидную или концевую фосфатную группу. Наиболее распространены методы «кросслинкинга», основанные на использовании ДНК-реагентов, нацеленных на специфическое взаимодействие с остатками цистеина и лизина белка [19,20]. Хорошо изучено ковалентное связывание каталитического остатка Cys C5-цитозиновых ДНК-метилтрансфераз с 5-фторцитидином в участке узнавания ДНК [225–228], взаимодействие ДНК-гликозилаз с апуриновыми/апиримидиновыми участками в ДНК [21,229,230], «кросслинкинг» N4-сульфанилэтилцитозина с белками систем репарации, таких как BER и прямая репарация алкильных повреждений ДНК [231–234], аффинная модификация эндонуклеаз рестрикции и фактора транскрипции NF-κB ДНК-дуплексами с замещенной пирофосфатной межнуклеотидной группой [235–237].

В состав центров связывания белков, взаимодействующих с ДНК, часто входят положительно заряженные остатки Arg [18]. В совместной работе с группой исследователей лаборатории химии нуклеиновых кислот кафедры химии природных соединений МГУ для селективной модификации гуанидиновой группы остатков Arg нами впервые предложено

использовать фрагменты ДНК, содержащие β -дикетогруппу при С2'-атоме углеводного фрагмента (рис. 19а) [238].

Для получения белково-нуклеиновых конъюгатов хорошо себя зарекомендовал метод сайт-направленного ковалентного связывания белка, содержащего единственный остаток Cys, с ДНК, имеющей в области контакта с белком тиол-специфичную реакционноспособную группировку [21,23–26,240,240]. Предполагается, что введение или удаление одного или нескольких остатков Cys незначительно сказывается на структуре и функции белка [241,242]. Тиольные группы Cys являются весьма реакционноспособными в экспериментах *in vitro*. Химическая модификация SH-групп белков происходит специфично и в мягких условиях, обеспечивающих сохранение функциональной активности белков. В данной работе для модификации белков предложено использовать ДНК, содержащие пиридилдисульфидную и акриламидную группы при С5-атоме 2'-дезоксинуридина (рис. 19б, в). Эти реакционноспособные группы локализованы в большой бороздке ДНК, где осуществляются большинство контактов нуклеиновой кислоты с белком.

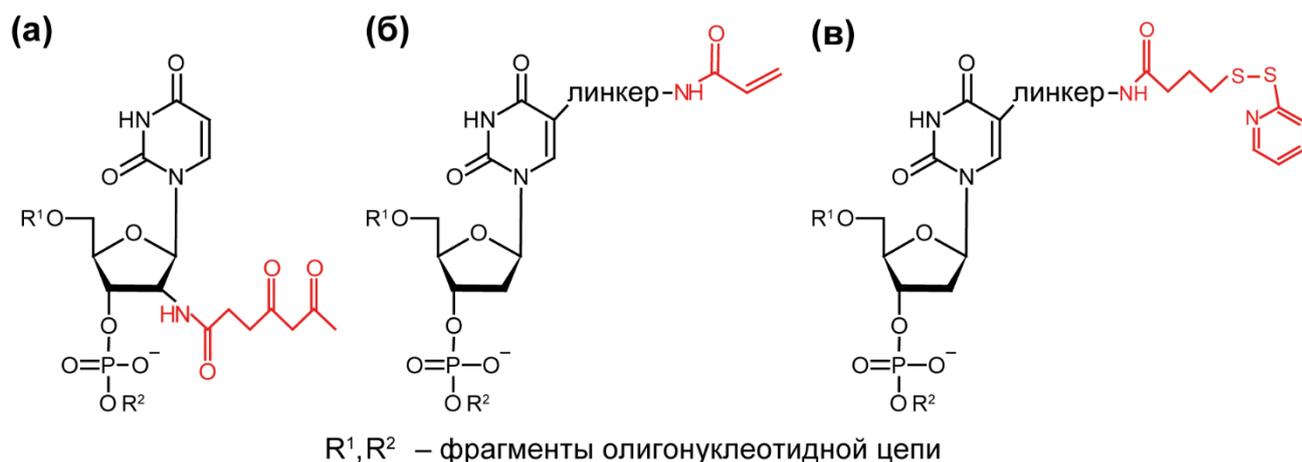


Рис. 19. Используемые в работе модифицированные ДНК, содержащие (а) β -дикетогруппу при 2'-атоме; (б) 2-пиридилдисульфидную и (в) акриламидную группу при С5-атоме dU.

Объектами исследования с помощью реакционноспособных ДНК (рис. 19) были выбраны гомодимерные белки есMutS и есMutL, а также белки MutL из *Neisseria gonorrhoeae* и *Rhodobacter sphaeroides* (ngMutL и rsMutL). Выбор в качестве моделей бактериальных белков был обусловлен тем, что биохимические исследования эукариотических белков MutSa и MutLa сложны. Прежде всего это связано с их гетеродимерной структурой, что затрудняет получение различных субъединиц в эквимольном соотношении [163]. Для выделения MutSa и MutLa в гомогенном состоянии требуется многоэтапная очистка, так как другие ДНК-связывающие белки могут совыделяться с субъединицами этих белков MMR [243]. С помощью биоинформатических подходов, мы показали, что MutSa и MutLa человека демонстрируют сходную трехмерную структуру с бактериальными белками, используемыми

в наших исследованиях [244]. Хотя бактериальные MutS и MutL являются гомодимерами, функциональные субъединицы ведут себя по-разному (см. разделы II.3 и II.4).

Белок MutS представляет собой сенсор, сканирующий ДНК в поисках «мисматча». Для комплексов есMutS с ДНК имеются данные PCA [8,55,128,160], поэтому есMutS является удобной моделью для тестирования новых реагентов для аффинной модификации. Кроме того, остается не выясненным покидает ли MutS некоплементарную пару или нет для активации следующих стадий процесса MMR.

Наименее изученным является взаимодействие с ДНК следующего участника MMR – белка MutL. Показано, что гомологи белка MutL способны связывать ДНК вне зависимости от наличия «мисматча» [79,80,245]. Согласно современным представлениям, ДНК-связывающий центр MutL находится в N-концевом домене белка [16]. Считается, что основные аминокислотные остатки двух субдоменов MutL – АТФазного и α - β -«сэндвичевого», образуют положительно заряженную полость, в которой происходит связывание ДНК (см. раздел II.4.2). Однако точная область взаимодействия MutL с ДНК до сих пор не установлена.

Бактериальные системы репарации «мисматчей», в которых белок MutL обладает эндонуклеазной функцией, изучены существенно хуже, чем система репарации «мисматчей» *E. coli* и человека. Это связано прежде всего с тем, что домены этих белков соединены подвижным линкером и их сложно закристаллизовать. Белки MutL, содержащие эндонуклеазный домен, на данный момент выделены только из пяти бактерий: *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae*, *T. thermophilus*, *A. aeolicus*, *B. subtilis*, и данные о механизме их действия и свойствах весьма ограничены. Характеристика MutL из новых видов бактерий важна для реконструкции основных этапов функционирования системы MMR в клетке на молекулярном уровне.

В работе исследовались свойства rsMutL и ngMutL, обладающих эндонуклеазной активностью. *Neisseria gonorrhoeae* – это грамотрицательный диплококк, облигатный патоген человека, факультативный внутриклеточный организм. *N. gonorrhoeae* вызывает гонорею – изнурительную болезнь, которая поражает в первую очередь органы репродуктивной системы человека. Для адаптации в новой среде и для того, чтобы избежать иммунного ответа организма-хозяина, *N. gonorrhoeae* использует широкомасштабную вариацию фаз [246]. Стандартные способы лечения гонореи быстро устаревают из-за постоянного появления новых штаммов. Устойчивость *N. gonorrhoeae* к действию вакцин и лекарственных препаратов может быть связана не только с феноменом вариации фаз, но с эффективной работой основных систем репарации, присутствующих в этой бактерии, в том числе системы MMR.

Интерес к *Rhodobacter sphaeroides* – палочковидной, грамотрицательной, пурпурной несерной фотогетеротрофной α -протеобактерии – вызван ее изменчивостью в процессе

метаболизма и жизненного цикла, способностью к фотосинтезу и выживаемости в различных условиях, что может быть связано с особенностями в функционировании систем репарации ДНК [247,248].

Таким образом, результаты, полученные для бактериальных белков MutS и MutL, не только могут быть экстраполированы на эукариотические аналоги в силу структурной и функциональной схожести, но и важны сами по себе с точки зрения понимания влияния отдельных белков MMR на жизнедеятельность микроорганизмов.

IV.1. Общая характеристика объектов исследования

IV.1.1. MutS из *E. coli*

Мономер есMutS содержит 853 а.о. и имеет молекулярную массу (M_w) 95,3 кДа. Расчетная изоэлектрическая точка (pI) составляет 5,39. В работе были использованы одноцистеиновые мутантные формы (SC, от англ. single cysteine) есSCMutS(A336C), есSCMutS(N497C), есSCMutS(A469C), полученные ранее [12,27]. Белки выделяли как описано в разделе III.3.2. Остатки Asn и Ala в позициях 497 и 469 находятся в домене «зажим» и образуют контакты с углеводофосфатным остовом ДНК, но не вовлечены в узнавание «мисматча» [55]. Ala336 находится в коровом домене есMutS и не контактирует с ДНК при формировании начального узнающего комплекса. Однако, предполагается, что при переходе белка в активную конформацию, положение ДНК в комплексе с MutS изменяется, и аминокислота в позиции 336 сближается с ДНК (см. раздел II.3.2.3). Отметим, что для создания вариантов есMutS, содержащих единственный остаток Cys, использовали мутантную форму белка есMutS – есCFMutS(Δ 801–853), который не имеет остатков Cys (Cys Free), а также не содержит 53 С-концевые аминокислоты, практически неважные для репарации «мисматчей» [249], но участвующие в тетрамеризации белка есMutS [55]. В реакциях ковалентного связывания есMutS с модифицированными ДНК, требующих высокой концентрации биомолекул, олигомеризация белка нежелательна. Ранее было доказано, что есCFMutS(Δ 801–853) имеет то же сродство к ДНК с G/T-парой, что и белок дикого типа (есWTMutS) [137]. Далее для белка есCFMutS и мутантных форм, полученных на его основе, обозначение (Δ 801–853), также как и «SC» в названиях моноцистеиновых форм опущено. Функциональная активность мутантных форм есCFMutS, есMutS(A336C), есMutS(N497C) и есMutS(A469C) была продемонстрирована ранее в нашей научной группе [27,241].

IV.1.2. MutL из *E. coli*

есMutL состоит из 615 а.о., M_w – 67,9 кДа, pI составляет 6,31. Для идентификации позиций в есMutL, которые могут быть сближены с ДНК и, следовательно, могут участвовать в реакции «кросслинкинга», нами была проанализирована недавно созданная модель

«сшитого» комплекса есMutS и N-концевого домена есMutL (NTD-есMutL) с ДНК [12]. Согласно этой модели остатки Thr218, Ala251, Ala282 и His297 сближены с ДНК, но не участвуют в электростатических взаимодействиях между есMutL и дуплексом. Таким образом, замена этих а.о. на Cys не должна повлиять на образование мутантными формами есMutL комплекса с ДНК. В качестве отрицательных контролей в реакции «кросслинкинга» решили использовать формы есMutL с заменами Q118C и N131C. Согласно модели указанные позиции не сближены с ДНК (рис. 20).

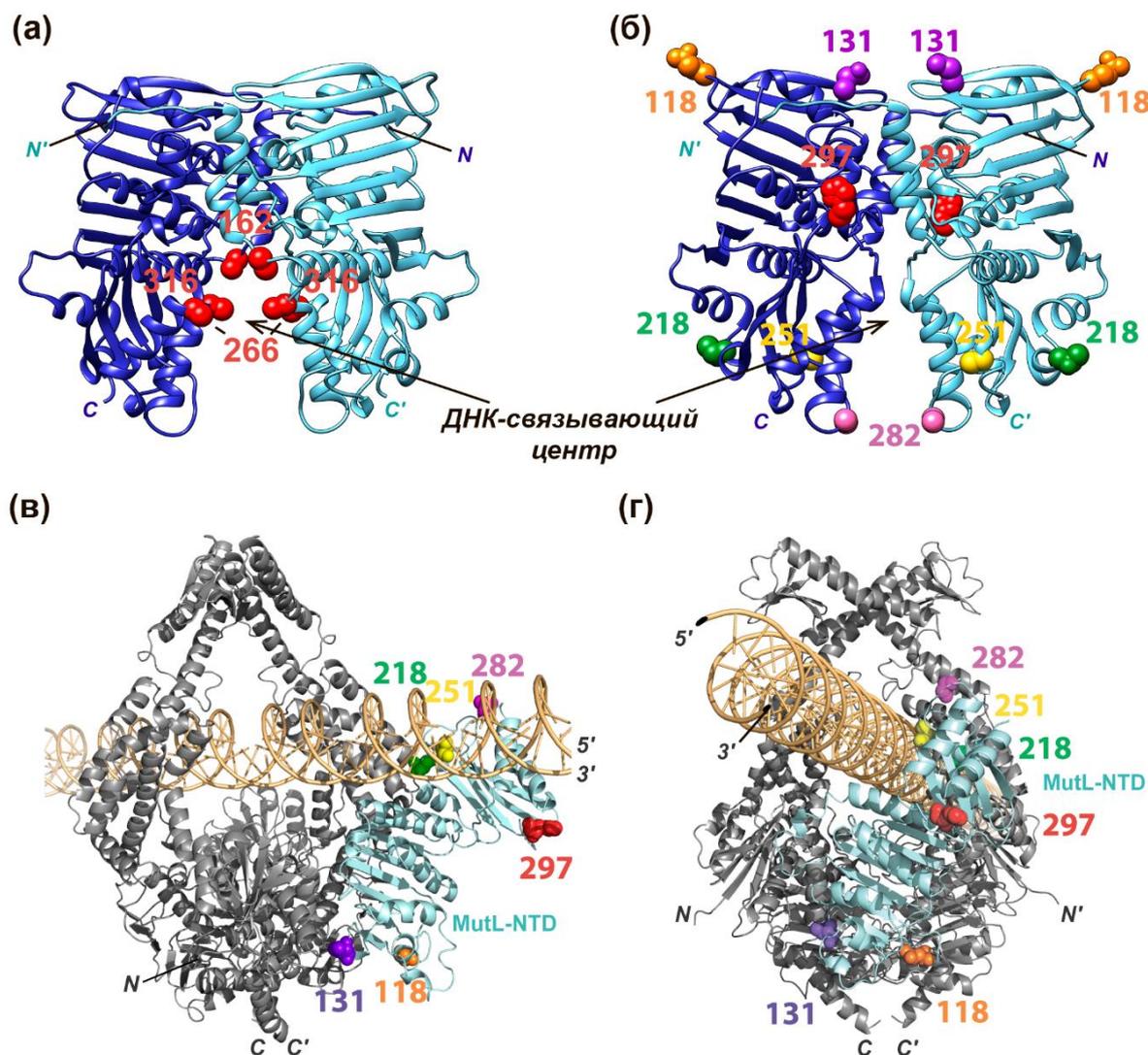


Рис. 20. Локализация выбранных аминокислотных остатков в кристаллической структуре есMutL-NTD (PDB: 1B63). (а) – Положение остатков Arg (выделены красным) дикого типа есMutL, которые необходимы для эффективного взаимодействия с ДНК. (б) – Позиции а.о. в N-концевом домене димера есMutL, выбранных для замены на Cys, обозначены различными цветами. Получено 6 мутантных форм есMutL, содержащих единственный остаток Cys в заданной позиции. (в) и (г) – Модель тройного комплекса, включающего в себя есMutS (выделен серым), есMutL-NTD (выделен голубым) и ДНК (выделена светло-коричневым) (PDB: 5AKB), изображена в двух ориентациях. есMutS представлен в димерной форме, есMutL-NTD - в виде мономера.

Плазмидные ДНК, кодирующие указанные выше одноцистеиновые мутантные формы есMutL, были получены ранее [250]. Белки выделяли аффинной хроматографией на Ni-NTA-

агарозе с последующей дочиной эксклюзионной хроматографией. В экспериментах использовали *ecCFMutL*, в котором все 7 остатков Cys мономерного белка дикого типа белка были заменены на Ser (4 остатка расположены в N-концевой области белка). Плазмидная ДНК, кодирующая *ecCFMutL*, явилась основой для создания одноцистеиновых мутантных форм *MutL* [250]. Каждый из них содержал единственный остаток Cys в заданной позиции: *ecSCMutL(Q118C)*, *ecSCMutL(N131C)*, *ecSCMutL(T218C)*, *ecSCMutL(A251C)*, *ecSCMutL(A282C)* и *ecSCMutL(H297C)* (рис. 20). Далее в тексте по аналогии с белками *ecMutS* сокращение «SC» опущено.

Удобным способом проверки активности полученных мутантных форм является способность *ecMutL* активировать сайт-специфичную эндонуклеазу *ecMutH*. Для этой цели была использована полученная ранее плазмидная конструкция *pUC-MMR* [241], содержащая G/T-пару (узнается белком *MutS*) и монометилированную последовательность 5'-Gm⁶ATC-3'/3'-CTAG↑-5' (участок узнавания *ecMutH*, место гидролиза указано стрелкой). Если *ecMutL* активен, он образует комплекс с *ecMutS* и ДНК, который способствует гидролизу *ecMutH* только неметилированной цепи участка узнавания. При этом происходит переход плазмиды из суперскрученной формы в релаксированную (никованную) форму. Эти формы отличаются по подвижности в условиях гель-электрофореза в агарозном геле, что позволяет оценить степень гидролиза субстрата. Нами показано, что все полученные мутантные формы *ecMutL* активны на 55-76% по сравнению с диким типом белка (рис. 21).

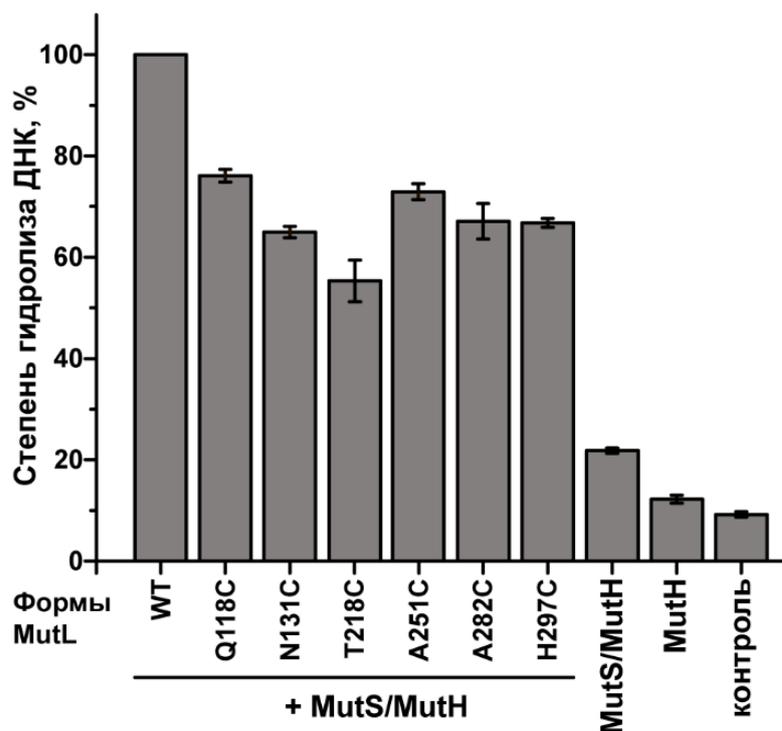


Рис. 21. Гидролиз плазмидной ДНК эндонуклеазой *ecMutH* индивидуально (столбец *ecMutH*), в присутствии белка *ecMutS* (столбец *MutS/MutH*), в присутствии совместно белков *ecMutS*, *ecMutH* и *ecMutL* дикого типа (WT) или одного из вариантов *ecMutL* (*ecMutL(Q118C)*, *ecMutL(N131C)*, *ecMutL(T218C)*, *ecMutL(A251C)*, *ecMutL(A282C)*, или *ecMutL(H297C)*). В дорожке «контроль» указана степень расщепления исходной плазмиды.

IV.1.3. MutL из *N. gonorrhoeae*

Белок ngMutL выделен и охарактеризован в 2009 г. проф. Рао и сотр. (Индийский институт науки, г. Бангалор) [75]. Предоставленная нам плазмидная конструкция с геном белка ngMutL была получена с помощью ПЦР с геномной ДНК *N. gonorrhoeae* штамма FA 1090 [75]. Анализ плазмидной конструкции методом секвенирования показал, что нуклеотидная последовательность гена *ngmutL* имеет большее сходство с последовательностью ngMutL из штамма 34769 (BLAST, NCBI). Выделенный нами ngMutL состоит из 658 а.о., M_w - 71,1 кДа и pI - 6,04.

IV.1.4. MutL из *R. sphaeroides*³

rsMutL впервые клонирован, выделен и охарактеризован в данном исследовании. Фрагмент ДНК, содержащий ген rsMutL, получали методом ПЦР с геномной ДНК *R. sphaeroides* штамма 2.4.1., который впоследствии встраивали в вектор pET15b. Исходя из нуклеотидной последовательности гена *rsmutL* определяли первичную структуру белка. Он состоит из 616 а.о., имеет M_w 65,8 кДа, его pI равна 6,51.

Поскольку rsMutL имеет дополнительную последовательность, в которой содержится блок из 6 остатков His, то белок выделяли методом аффинной хроматографии. Традиционно считается, что влияние на структуру белков такой дополнительной последовательности невелико. Это подтверждается анализом закристаллизованных белков [251]. Для выделения rsMutL первоначально использовали ту же методику, что и для MutL из *N. gonorrhoeae* [75]. Она включала в себя разрушение клеток с помощью ультразвука, центрифугирование лизата и хроматографию надосадочной жидкости на Ni-NTA-агарозе. Однако применение ранее разработанной методики не позволило получить достаточные для исследований количества гомогенного белка. Основными проблемами являлись низкая эффективность связывания rsMutL с сорбентом, недостаточная очистка целевого белка от ДНК и его плохая растворимость. Для того, чтобы достичь лучшего связывания белка из клеточного лизата с Ni-NTA-агарозой, в дополнение к имеющейся плазмидной конструкции были созданы две другие системы, несущие оптимизированный ген белка rsMutL. Одна из них позволяла получать белок с шестью остатками His непосредственно на N-конце молекулы, а другая – на C-конце. Однако изменение положения гистидиновой вставки в rsMutL и замена некоторых кодонов в гене *mutL* на оптимальные для *E. coli* не оказали заметного влияния на выход белка (данные не приведены). Поэтому была поставлена задача модификации имеющейся методики получения rsMutL. Для улучшения сворачивания белка концентрация изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) была уменьшена до 0,1 мМ. Индукцию белка проводили в

³ При подготовке данного раздела диссертации использована публикация [78].

течение 16–18 ч при пониженной температуре (18°C). В буферных растворах для выделения rsMutL использовали 0,05%-ный Tween 20 для повышения растворимости белка и 1 М NaCl для предотвращения связывания белка с ДНК. Белок rsMutL, выделенный металло-хелатной хроматографией, отделяли от продуктов его протеолиза и других белков с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке ENrich SEC 650 10×300 мм («Bio-Rad», США). Фракции, соответствующие белку, с объемом удерживания 9–12 мл (первый пик), собирали и анализировали методом гель-электрофореза по Лэммли (рис. 22). После концентрирования собранных фракций выделено 0,2 мг белка (концентрация 8 мкМ).

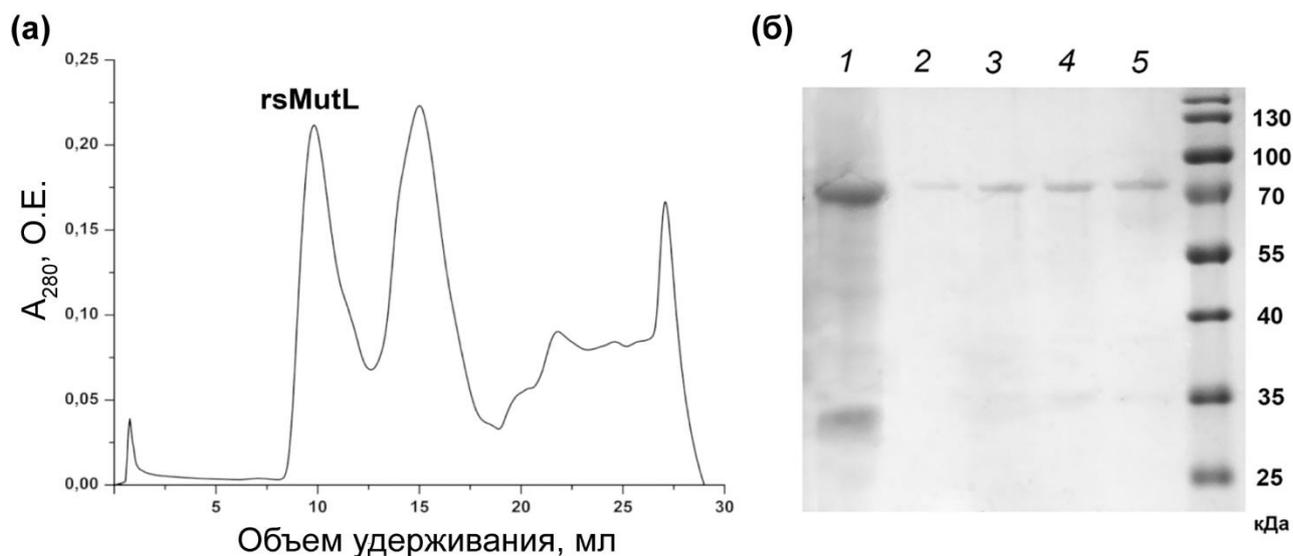


Рис. 22. Выделение белка rsMutL методом эксклюзионной хроматографии. **(а)** – Хроматограмма разделения rsMutL и белков с более низкой молекулярной массой. **(б)** – Анализ фракций: дорожка 1 – rsMutL до проведения эксклюзионной хроматографии; дорожки 2–5 – фракции с объемом удерживания 9–10 мл. Дорожка справа – белки-маркеры молекулярной массы 10–180 кДа.

IV.1.4.1. Характеристика первичной и вторичной структур белка MutL из *R. sphaeroides*

Белки семейства MutL состоят из двух доменов, N- и C-концевого, соединенных переменным линкером (см. раздел II.4). Согласно базе данных Pfam N- и C-концевые домены rsMutL включают в себя 1–343 и 427–616 а.о. соответственно. Ранее в последовательностях белков MutL были охарактеризованы 16 консервативных мотивов [182]. Для поиска этих мотивов в белке rsMutL мы сравнили аминокислотные последовательности rsMutL с последовательностями 9 представителей семейства MutL, в некоторых из которых положение мотивов было определено ранее (рис. 23). При анализе аминокислотной последовательности белка rsMutL нами были обнаружены все 16 мотивов (рис. 23). За исключением мотива VI все последовательности мотивов из rsMutL демонстрируют хорошее совпадение с консенсусными последовательностями [182]. Семь консервативных мотивов I, II, III, V, VII, IX и X, по-

видимому, образуют участок связывания АТФ в rsMutL. Также в белке rsMutL присутствуют последовательности, имеющие хорошее сходство с мотивами VIII (N-домен) и XIII (C-домен), которые предположительно обеспечивают взаимодействие с β -«зажимом». Мотив VI локализован в N-концевом домене MutL и необходим для взаимодействия с белком MutS. Он недостаточно консервативен для того, чтобы можно было предсказать аминокислоты rsMutL, отвечающие за взаимодействие с rsMutS. Экспериментально доказано, что эндонуклеазной функцией обладают белки MutL из пяти относящихся к различным классам (указаны в скобках) бактерий: *N. gonorrhoeae* (β -proteobacteria), *B. subtilis* (Bacilli), *P. aeruginosa* (γ -proteobacteria), *T. thermophilus* (Deinococci) и *A. aeolicus* (Aquificae). Последовательности этих белков включены в «выравнивание», представленное на рис. 23. В этих последовательностях присутствуют пять мотивов XI, XII, XIV–XVI, формирующих каталитический центр, обеспечивающий гидролиз ДНК. Эти мотивы отсутствуют в последовательностях белков MutL, не обладающих эндонуклеазной активностью. В «выравнивании» они представлены двумя последовательностями: esMutL и белком человека MLH1.

Вторичная структура rsMutL была предсказана на основании выравнивания его последовательности с последовательностями MutL с известной пространственной структурой. Для предсказания вторичной структуры N-домена rsMutL использовали данные PCA для esMutL (PDB: 1B63, 1NHI, 1BKN), PMS1 *S. cerevisiae* (PDB: 3H4L), PMS2 человека (PDB: 1H7S), MLH1 человека (PDB: 4P7A). Для предсказания вторичной структуры C-домена rsMutL применяли данные для MutL *B. subtilis* (PDB: 3GAB, 3KDG, 3KDK), MutL *A. aeolicus* (PDB: 5B42), MutL *N. gonorrhoeae* (PDB: 3NCV) и гетеродимера MLH1/PMS1 *S. cerevisiae* (PDB: 4E4W). После сравнения последовательностей гомологов и rsMutL в программе Muscle на соответствующих участках последовательностей были отмечены α -спирали и β -тяжи в соответствии с информацией, представленной в PDB. Границы элементов вторичных структур, указанные в разных PDB-файлах, в подавляющем большинстве случаев совпадали. Элементы вторичной структуры, α -спирали и β -тяжи, отмечены на рис. 23 под аминокислотной последовательностью rsMutL. Из полученных данных следует, что белок MutL из *R. sphaeroides* с эволюционной точки зрения наиболее близок к гомологам из протеобактерий *N. gonorrhoeae* (40% идентичных а.о.) и *P. aeruginosa* (44% идентичных а.о.). MutL из *N. gonorrhoeae* (β -протеобактерия) – это гомодимерный белок, обладающий АТФазной и эндонуклеазной активностями [206]. MutL из *P. aeruginosa* проявляет схожие свойства. *P. aeruginosa* относится к классу γ -протеобактерий, но гомологов MutH эта бактерия не имеет [252]. Очевидно, что ранее не изученный белок MutL из системы репарации *R. sphaeroides* должен обладать способностью гидролизовать ДНК.

Рис. 23. Сравнение аминокислотных последовательностей белков MutL и их гомологов из различных организмов. Рамкой выделены аминокислотные последовательности MutL *E. coli* и MLN1 человека, лишенные эндонуклеазной функции. Цифры слева последовательностей указывают номера первого а.о. в строке. В скобках указаны номера опущенных а.о., входящих в состав неконсервативных участков. Консервативные а.о. для выбранных последовательностей отмечены жирным шрифтом в серой заливке. Под последовательностью rsMutL обозначены элементы вторичной структуры – α -спирали и β -тяжи, определенные для этого белка по пространственной структуре N-концевого домена esMutL (PDB: 1B63) и C-концевого домена белка ngMutL (PDB: 3NCV). Ниже указаны консервативные мотивы в аминокислотных последовательностях, согласно данным [182]. Далее отмечены консервативные а.о., обнаруженные в последовательностях 390 прокариотических белков MutL группы 2, для которых предсказано отсутствие эндонуклеазной активности: конс. а.о. (гр. 2), и в последовательностях 1483 прокариотических MutL группы 1 с предсказываемой эндонуклеазной активностью: конс. а.о. (гр. 1). «X» обозначает позиции, в которых один а.о. находится в 99% последовательностей, «+» – $\geq 95\%$, «:» – $\geq 90\%$. Функционально консервативные позиции, обозначены буквой консенсусного а.о., буква H представляет группу гидрофобных остатков MILVFY. Заглавная буква означает, что а.о. встречается в $\geq 95\%$ последовательностей, строчная – в $\geq 90\%$.

IV.2. Сравнительный анализ биохимических свойств белков MutL из *R. sphaeroides* и *N. gonorrhoeae*⁴

IV.2.1. Анализ эндонуклеазной активности rsMutL и ngMutL в присутствии различных ионов металлов

Из данных литературы известно, что белки MutL способны вносить одноцепочечный разрыв в ДНК в присутствии ионов двухвалентных металлов [43]. Показано, что белки MutL из бактерий *B. subtilis*, *N. gonorrhoeae*, *A. aeolicus*, *T. thermophilus* и *P. aeruginosa* гидролизуют каноническую ДНК даже в отсутствие других белков системы MMR [13,74–77]. Для сравнения эндонуклеазной функции белков rsMutL и ngMutL в качестве субстрата использовали плазмиду pUC-MMR.

Реакцию гидролиза ДНК белками MutL проводили в присутствии солей $MnCl_2$. В ходе гидролиза rsMutL и ngMutL плазмиды pUC-MMR ее суперскрученная форма переходит в форму, содержащую одноцепочечный разрыв. За ходом реакции гидролиза ДНК белками rsMutL и ngMutL следили методом электрофореза в агарозном геле и оценивали увеличение интенсивности зоны, соответствующей «никованной» форме плазмиды, имеющую меньшую подвижность в геле. Для контроля за подвижностью продуктов расщепления pUC-MMR белками MutL плазмиду гидролизовали ЭР BamHI и НЭ Bpu10I. В качестве примера на рис. 24 представлены результаты разделения реакционной смеси после гидролиза белком rsMutL плазмидной ДНК. Для ngMutL получены аналогичные результаты. Оба белка гидролизуют

⁴ При подготовке данного раздела диссертации использованы публикации [78,286]

плазмиду в присутствии ионов Mn^{2+} . Также наблюдается зона низкой интенсивности, отвечающая линейному продукту расщепления ДНК белками MutL (рис. 24, дорожка 4).

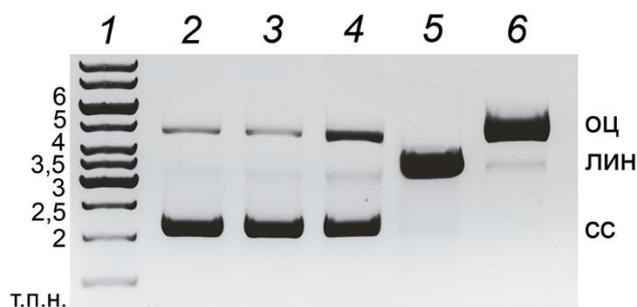


Рис. 24. Гидролиз плазмиды pUC-MMR (10 нМ) белком rsMutL (500 нМ) при 37°C в течение 60 мин. Представлена фотография (в инвертированном варианте) 1%-ного агарозного геля, окрашенного бромидом этидия, после электрофореза. Дорожки: 1 – маркер длины ДНК в тысячах пар нуклеотидов (т.п.н.); 2 – исходная плазида pUC-MMR; 3 – pUC-MMR и rsMutL в отсутствие ионов двухвалентных металлов; 4 – гидролиз pUC-MMR белком rsMutL в присутствии $MnCl_2$ (5 мМ); 5 – гидролиз pUC-MMR ЭР VamH1; 6 – гидролиз pUC-MMR НЭ Vru10I. Справа указаны формы кольцевой ДНК: суперскрученная (сс), с разрывом в одной цепи (оц), линейная ДНК (лин).

Имеющиеся в настоящий момент данные о влиянии катионов двухвалентных металлов на функционирование MutL из различных организмов отличаются (табл. 3) [13,74–77]. Мы исследовали эффективность гидролиза плазмиды pUC-MMR белком rsMutL в присутствии хлоридов Me^{2+} , которые могли бы модулировать активность эндонуклеазы: Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} . Результаты влияния всех выбранных ионов на расщепление субстрата rsMutL приведены на рис. 25. Степень расщепления ДНК уменьшается в ряду $Mn^{2+} > Co^{2+} \gg Mg^{2+} > Cd^{2+}$. Ионы Ni^{2+} , Ca^{2+} и Zn^{2+} не стимулируют эндонуклеазную функцию rsMutL.

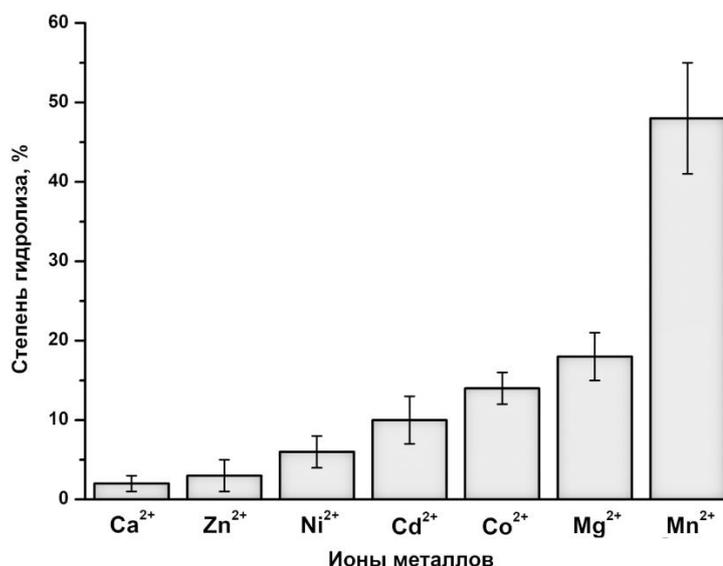


Рис. 25. Эффективность гидролиза плазмиды pUC-MMR (10 нМ) белком rsMutL (500 нМ) в присутствии ионов различных двухвалентных металлов (5 мМ) при 37°C в течение 60 мин.

В случае ngMutL было продемонстрировано, что только Mn^{2+} и Mg^{2+} (в значительно меньшей степени) способны стимулировать эндонуклеазную функцию, при использовании других Me^{2+} продуктов гидролиза зафиксировано не было. Полученные нами результаты опровергают ранее опубликованные данные, где авторы продемонстрировали активацию гидролиза ngMutL в присутствии Ca^{2+} [75]. Обобщенные данные о влиянии различных ионов металлов на эндонуклеазную функцию бактериальных белков MutL, известные из литературы и полученные в данной работе, приведены в табл. 3.

Таблица 3. Сравнительная характеристика влияния ионов металлов на эндонуклеазную активность MutL из различных организмов.

Организм	Mn^{2+}	Mg^{2+}	Co^{2+}	Cd^{2+}	Ni^{2+}	Ca^{2+}
<i>R. sphaeroides</i>	+	+	+	+	-	-
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	+	-	-	-	-*
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
<i>B. subtilis</i>	+	-	н.д.	-	н.д.	н.д.
<i>T. thermophilus</i>	+	н.д.	+	н.д.	+	н.д.
<i>A. aeolicus</i>	+	-	+	н.д.	+	-

«+» – стимулирует эндонуклеазную функцию MutL, «-» – не стимулирует гидролиз ДНК, «н.д.» – нет данных.

* Получено в данной работе, опровергает ранее полученные данные [75].

Кристаллические структуры С-концевых доменов, содержащих эндонуклеазный мотив, решены для бактериальных MutL из нескольких организмов: *A. aeolicus* (PDB: 5B42), *B. subtilis* (PDB: 3KDK), *N. gonorrhoeae* (PDB: 3NCV) [13,206,208]; для MutL из *R. sphaeroides* структурных данных в литературе нет. В расшифрованных структурах aaMutL-CTD и bsMutL-CTD были обнаружены ионы цинка, которые предположительно играют важную роль в организации структуры каталитических центров этих белков [13,208]. Показано, что bsMutL-CTD координирует ионы Zn^{2+} в специальном Zn^{2+} -связывающем участке, что приводит к сближению а.о. мотивов XII, XIV и XV, которые формируют активный центр белка (рис. 26) [13]. Авторы [206] полагают, что в каталитический центр ngMutL входят мотивы XI, XII, XIV и XV, которые обеспечивают катализ гидролиза ДНК путем связывания их а.о. ДНК-субстратом и ионами металлов. Из рис. 26 видно, что локализация ключевых а.о. этих мотивов, в том числе остатков Cys, в bsMutL-CTD и ngMutL-CTD очень похожи. Несмотря на то, что ионы Zn^{2+} в кристалле ngMutL-CTD отсутствуют, можно полагать, что а.о. ngMutL координируют их сходным образом с bsMutL.

Сами по себе ионы Zn^{2+} не обеспечивают эндонуклеазную активность белков rsMutL, ngMutL и bsMutL [13,206]. Однако в случае bsMutL совместное присутствие ионов Mn^{2+} и Zn^{2+} вызывает увеличение линейной формы плазмидной ДНК, то есть внесению белком

двухцепочечного разрыва [13] (табл. 4). Это происходит предположительно из-за влияния Zn^{2+} на структуру эндонуклеазного домена, что приводит к сближению двух каталитических центров гомодимерной молекулы белка с ДНК. С другой стороны при добавлении Zn^{2+} в реакцию смесь, содержащую ионы Mn^{2+} , наблюдалось ингибирование эндонуклеазной MutL из *P. aeruginosa* [74]. Интересно, что в случае MutL из *A. aeolicus* наличие ионов Zn^{2+} в реакционной смеси стимулировало эндонуклеазную активность белка [76] (табл. 4). Влияние ионов Zn^{2+} на гидролиз ДНК полноразмерными белками ngMutL и rsMutL, в том числе в присутствии ионов Mn^{2+} , ранее не изучалось.

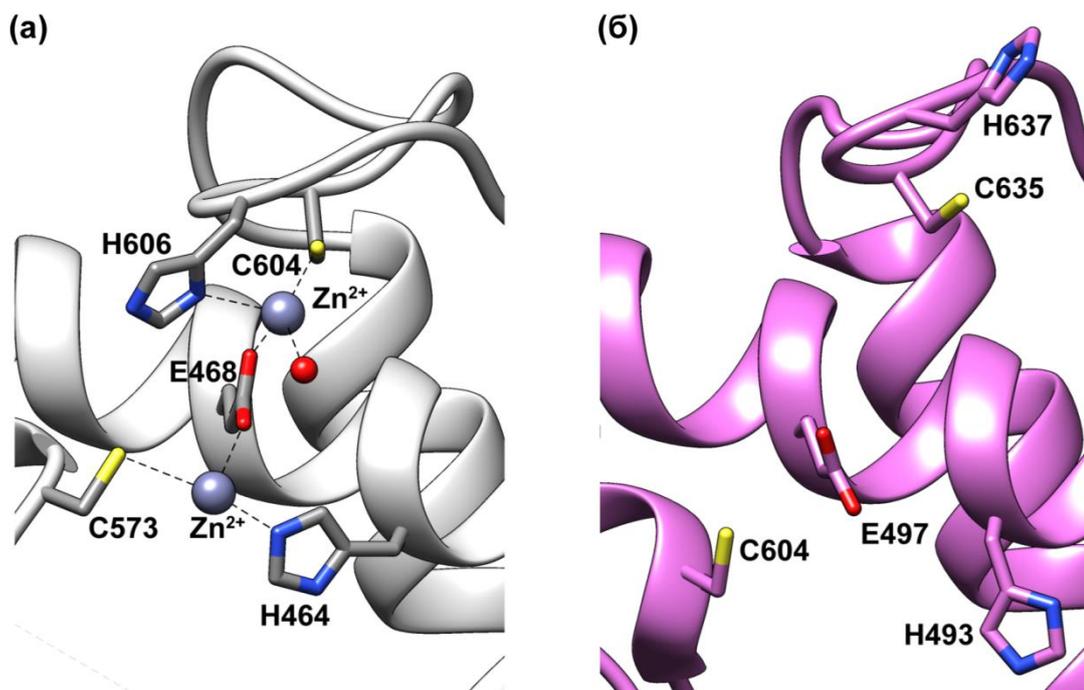


Рис. 26. Структурная организация эндонуклеазного центра белков bsMutL-CTD (PDB: 3KDK; панель (а)) и ngMutL-CTD (PDB: 3NCV; панель (б)). Номерами выделены а.о., участвующие в случае bsMutL-CTD (или предположительно участвующие в случае ngMutL-CTD) во взаимодействии с ионами двухвалентных металлов. Предложено согласно [13,206].

Как и большинство охарактеризованных ранее бактериальных белков MutL, ngMutL и rsMutL не гидролизуют плазмиду pUC-MMR в присутствии 5 мМ раствора $ZnCl_2$ (табл. 4). Мы проверили влияние Zn^{2+} на эндонуклеазную функцию ngMutL и rsMutL в присутствии 5 мМ $MnCl_2$. С увеличением концентрации Zn^{2+} (10 – 100 мкМ) эффективность образования «никованной» формы ДНК белками ngMutL и rsMutL значительно уменьшается. В присутствии 100 мкМ раствора $ZnCl_2$ в реакционной смеси наблюдается практически полное ингибирование эндонуклеазной активности белков. Аналогичное действие ионы Zn^{2+} оказывают на внесение двухцепочечного разрыва в плазмидную ДНК белками ngMutL и rsMutL: в присутствии Mn^{2+} наблюдается небольшое (до 10%) увеличение линейной формы ДНК. Однако при повышении концентрации Zn^{2+} линейный продукт полностью исчезает (данные не приведены). Очевидно, что сродство ионов цинка к ngMutL и rsMutL гораздо выше,

чем ионов марганца, и ионы Zn^{2+} эффективно вытесняют ионы Mn^{2+} из металлсвязывающих участков белка.

Таблица 4. Влияние ионов Zn^{2+} на эндонуклеазную активность белков MutL.

Организм	Zn^{2+} (5 мМ)	Zn^{2+} и Mn^{2+} (5 мМ)
<i>N. gonorrhoeae</i> *	Гидролиз отсутствует	Ингибирование (10-100 мкМ Zn^{2+})
<i>R. sphaeroides</i> *	Гидролиз отсутствует	Ингибирование (10-100 мкМ Zn^{2+})
<i>P. aeruginosa</i>	Гидролиз отсутствует [74]	Не определяли
<i>B. subtilis</i>	Гидролиз отсутствует [13]	Увеличение линейного продукта гидролиза плазмиды (1 мМ Zn^{2+}) [13]
<i>T. thermophilus</i>	Гидролиз отсутствует [77]	Не определяли
<i>A. aeolicus</i>	Гидролиз отсутствует [76]	Увеличение «никванной» формы плазмиды (0,5 мМ Zn^{2+}) [207]

Примечание: * - результаты получены в данной работе.

IV.2.2. Влияние АТФ на гидролиз ДНК белками ngMutL и rsMutL

Мы изучили влияние АТФ на гидролиз плазмиды pUC-MMR белками ngMutL и rsMutL в диапазоне концентраций от 0,5 до 5 мМ АТФ. С увеличением концентрации АТФ степень образования «никванной» формы плазмидной ДНК в присутствии ngMutL и rsMutL значительно уменьшается, что согласуется с данными, полученными ранее [75]. Повышения эндонуклеазной активности ngMutL и rsMutL не наблюдалось ни при одной из концентраций АТФ (рис. 27).

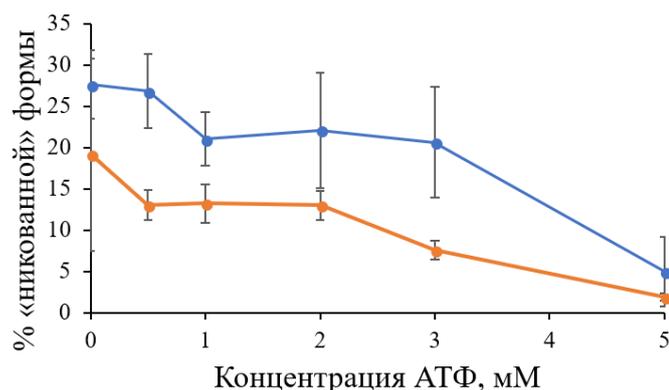


Рис. 27. Зависимость количества «никванной» формы плазмиды pUC-MMR от концентрации АТФ. Гидролиз pUC-MMR в течение 1 ч при 37°C белками ngMutL (синяя кривая) и rsMutL (оранжевая кривая).

Таким образом, если учесть тот факт, что концентрация АТФ в клетке составляет примерно 3-5 мМ, можно сделать вывод, что белки ngMutL и rsMutL, обладающие изначально низкой эндонуклеазной активностью, в клеточных условиях вероятно еще менее активны из-

за высокой концентрации АТФ. Это обстоятельство, возможно, предотвращает неспецифическое внесение одноцепочечного разрыва в ДНК белками MutL. Скорее всего, их способность гидролизовать ДНК стимулируется их партнерами по MMR, такими как белки β -«зажим» и MutS, что обеспечивает селективное расщепление «дочерней» цепи.

IV.2.3. Анализ ДНК-связывающей активности ngMutL и rsMutL

Показано, что гомологи белка MutL способны связывать как одноцепочечную, так и двухцепочечную ДНК произвольной последовательности вне зависимости от наличия «мисматча» [79,80,85]. ДНК-связывающая активность белков MutL может зависеть от множества факторов, таких как длина ДНК, наличие кофакторов (АДФ, АТФ, негидролизруемые аналоги АТФ) и ионная сила раствора [43].

В ранних исследованиях указывалось, что esMutL не связывает 72-звенный ДНК-фрагмент, малоэффективно взаимодействует с 118-звенным ДНК-дуплексом и полностью связывает ДНК длиной 187 п.н. [79]. Однако затем методом измерения поляризации флуоресценции показано комплексообразование esMutL с 41-звенными ДНК [12]. Позднее в работе [15] было исследовано связывание MutL из *A. aeolicus*, обладающего эндонуклеазной функцией, с короткими ДНК длиной от 15 до 60 п.н. Этот белок образовывал комплекс уже с 15-звенным ДНК-дуплексом. По мере увеличения длины ДНК эффективность связывания повышалась и достигала максимального значения при длине дуплекса, равной 30 п.н. Дальнейшее увеличение длины дуплекса не оказывало эффекта на связывание ДНК белком aaMutL. Таким образом, «место посадки» белка aaMutL на ДНК составляет около 30 п.н. [15]. Однако MutL из *A. aeolicus* характеризуется очень коротким для белков MutL линкером между N- и C-доменами (5 а.о.). MutL из *T. thermophiles*, длина линкера которого составляет 29 а.о., эффективно взаимодействовал с 80-звенным ДНК-дуплексом ($K_d = 420$ нМ) [77]. Отметим, что оба этих белка MutL относятся к подсемействам III и II (см. Обзор литературы, раздел II.4.4.2), соответственно. Эффективность гидролиза ими ДНК не зависит от присутствия β -«зажима». Белки ngMutL и rsMutL, напротив, относятся к подсемейству I белков MutL, то есть содержат характерный мотив QHLLIP, взаимодействующий с β -«зажимом», и имеют достаточно длинный линкерный участок (84 а.о. для rsMutL и 144 а.о. для ngMutL) [208]. Возможно, их способность связывать короткие ДНК отличается от aaMutL и ttMutL.

Ранее методом «торможения в геле» было показано, что ngMutL в присутствии 300 мМ KCl эффективно связывает двухцепочечную ДНК (дцДНК) длиной 440 п.н. и 45-звенную одноцепочечную ДНК (оцДНК) [75]. Однако известно, что уменьшение ионной силы буферного раствора повышает степень связывания белков MutL с ДНК [17]. Таким образом, для исследования ДНК-связывающей способности ngMutL и rsMutL с короткими ДНК методом «торможения в геле» было решено снизить концентрацию KCl в буферном растворе

до 100 мМ. Эта же ионная сила раствора использовалась при исследовании связывания с ДНК белков ttMutL и aaMutL [15,77]. При выборе длины фрагментов ДНК для проведения исследования мы опирались также на данные, полученные методом поверхностного плазмонного резонанса, согласно которым ngMutL достаточно эффективно взаимодействовал с 35-звенной оцДНК, иммобилизованной на носителе [75].

Для анализа ДНК-связывающей активности белков ngMutL и rsMutL нами были выбраны ДНК-дуплексы (дцДНК) длиной 16, 20, 30, 41, 76 п.н. (рис. 28). В условиях комплексообразования белок ngMutL взаимодействует с ДНК-дуплексами начиная с 30 п.н., то есть в отличие от aaMutL, дуплексы длиной 16 и 20 п.н. не связываются белком. В выбранных условиях нам не удалось зафиксировать комплексообразование rsMutL с ДНК (данные не приведены). Таким образом мы сосредоточились на характеристике ДНК-связывающей активности белка ngMutL.

- I** 5' -TCGAGTCTTCTCAAGG-**TAMRA**-3' (1) 16-мер
3' -AGCTCAGAAGAGTTCC-5'
- II** 5' -TGCCAAGAGTCTCTAGCTT-**TAMRA**-3' (2) 20-мер
3' -ACGGTCTCTCAGGAGATCGAA-5'
- III** 5' -GATGCTGCCAAGAGTCTCTAGCTTCATAC-**TAMRA**-3' (3) 30-мер
3' -CTACGACGGTCTCTCAGGAGATCGAAGTATG-5'
- IV** 5' -ATAGGACGCTGACACTGGTGCTTGGCAGCTTCTAATTCGAT-**TAMRA**-3' (4) 41-мер
3' -TATCCTGCGACTGTGACCACGAACCGTCTCGAAGATTAAGCTA-5'
- V** 5' -ATAGGACGCTGACACTGGTGCTTGGCAGCTGAGCCATATGCTCGAGTAACGCTCATAGGATCCAAGCGGAAAGGA-**TAMRA**-3' (5) 76-мер
3' -TATCCTGCGACTGTGACCACGAACCGTCTGACTCGGTATACGAGCTCATTGCGAGTATCCTAGGTTCCGGCTTTCCT-5'

Рис. 28. Используемые в работе ДНК-дуплексы и олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие флуоресцентную метку TAMRA.

По мере увеличения длины ДНК эффективность её связывания с ngMutL возрастает, что согласуется с данными, полученными для aaMutL [15]. В случае 30-звенного ДНК-дуплекса **III** не удалось рассчитать константу диссоциации комплекса ngMutL-ДНК, т.к. в выбранных нами условиях степень связывания не достигла 50% (рис. 29). Комплексообразование ngMutL с 41- и 76-звенными дцДНК охарактеризовано кажущимися константами диссоциации (табл. 5): при увеличении длины дуплекса от 41 до 76 п.н. K_d^{app} уменьшилась почти вдвое. Следовательно, «место посадки» полноразмерного белка ngMutL на ДНК превышает 41 п.н. Таким образом, это первый пример бактериального MutL с эндонуклеазной функцией из подсемейства I, который несмотря на достаточно протяженный линкер между N- и C-доменами способен эффективно связывать относительно короткие ДНК.

Кроме того, в качестве лигандов ngMutL были использованы оцДНК **I-5** такой же длины. оцДНК связываются с белком менее эффективно по сравнению с ДНК-дуплексами (табл. 5). K_d^{app} их комплексов с ngMutL примерно в 1,3-1,5 раза выше по сравнению с K_d^{app} дцДНК аналогичной длины. ngMutL взаимодействует с оцДНК длиной от 40 нуклеотидных остатков, и чем протяженнее ДНК, тем выше эффективность связывания. Отметим, что esMutL

напротив связывает оцДНК более эффективно, чем ДНК-дуплекс той же длины [180]. С другой стороны, ttMutL и эукариотический гомолог MutL - белок PMS2 эффективнее взаимодействует с дцДНК [179].

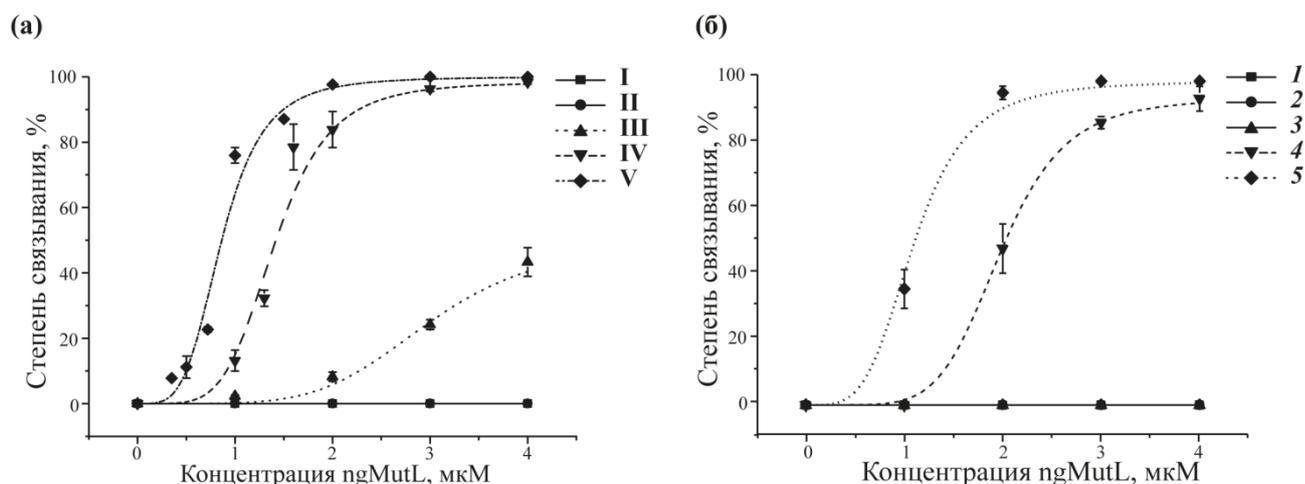


Рис. 29. Зависимость степени комплексообразования ngMutL с ДНК разной длины (20 нм) от концентрации белка. Последовательности двуцепочечных ДНК (а) и одноцепочечных ДНК (б) указаны на рис. 28.

Таблица 5. 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.

IV.2.4. Анализ АТФазной активности ngMutL и rsMutL

АТФазная активность MutL является необходимой для функционирования системы репарации ДНК. При взаимодействии с АТФ белок MutL меняет свою конформацию и таким образом становится способным взаимодействовать с другими участниками системы репарации, что влияет на его эндонуклеазную активность [10,14,180,183]. Количественно охарактеризована АТФазная активность в N-концевых доменов гомологов белка MutL из четырех организмов: esMutL, aaMutL, bsMutL и PMS2 человека [253]. Только в работе [13] присутствуют данные для полноразмерного белка bsMutL (табл. 6).

АТФазную активность белков удобно измерять колориметрическим методом по скорости образования фосфат-иона с использованием красителя малахитового зеленого,

меняющего свой цвет при взаимодействии с фосфомолибдатным комплексом при низком значении pH [254]. Для количественной характеристики АТФазной активности ngMutL были использованы методики, предложенные ранее [14,75]. В работе [75] показано, что АТФазная активность ngMutL увеличивается в присутствии двухцепочечной ДНК. Исходя из этого, наша реакционная смесь содержала 50 нМ 76-звенного дуплекса V. Количество образовавшегося фосфат-иона определяли, измеряя поглощение полученного раствора при длине волны 590 нм [255]. Полученные зависимости начальной скорости (v_0) гидролиза АТФ белками ngMutL и rsMutL от концентрации АТФ представлены на рис. 30. Из полученных зависимостей с помощью нелинейной регрессии были рассчитаны кинетические параметры реакции гидролиза АТФ для обоих белков (табл. 6).

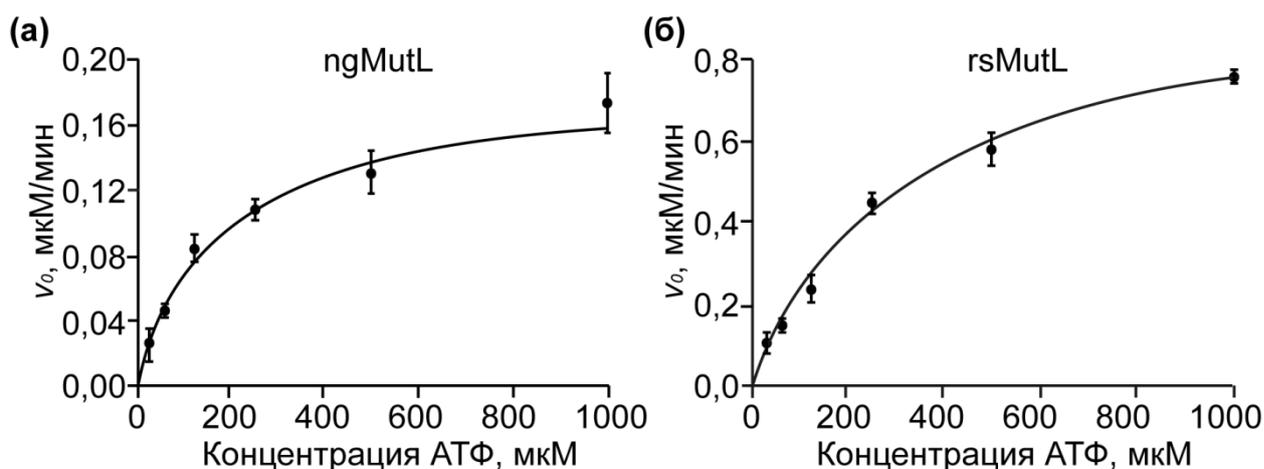


Рис. 30. Зависимости начальной скорости гидролиза АТФ белками ngMutL (а) и rsMutL (б). Представлены средние значения трех независимых экспериментов.

Из полученных данных видно, что значения K_M реакции гидролиза АТФ белком ngMutL почти в два раза ниже, чем для rsMutL, что свидетельствует о более высоком сродстве ngMutL к субстрату (табл. 6). Такое различие является интересным фактом, так как из всех на сегодняшний момент выделенных и охарактеризованных белков MutL белки ngMutL и rsMutL имеют наибольшее сходство первичной структуры. Однако, согласно имеющимся данным (табл. 6), значения K_M могут лежать в интервале 49-400 мкМ, и полученные нами значения вполне согласуются с этим. Практически для всех белков MutL, исследованных ранее, а также ngMutL, значения k_{cat} сравнимы, только aaMutL-NTD имеет константу скорости гидролиза АТФ на порядок ниже.

Важно заметить, что rsMutL значительно быстрее гидролизует АТФ по сравнению с другими белками (табл. 6). Таким образом, нами впервые были охарактеризованы АТФазные активности полноразмерных белков ngMutL и rsMutL и показано, что способность связывать и гидролизовать АТФ у этих белков заметно различаются, несмотря на схожесть их первичных структур.

Таким образом, нами впервые клонирован и выделен белок MutL из *Rhodobacter sphaeroides*. Получены данные о влиянии ионов металлов и АТФ на эндонуклеазную функцию белков rsMutL и ngMutL, а также изучена АТФазная активность полноразмерных белков. Детально проанализирована ДНК-связывающая активность ngMutL. Полученные результаты дополняют известные из литературы немногочисленные данные о функционировании бактериальных белков MutL с эндонуклеазной функцией.

Таблица 6. Параметры гидролиза АТФ белками MutL, представленные в литературе.

Объект	К _м , мкМ	k _{cat} , с ⁻¹
ngMutL	196±48	3,2×10 ⁻³
rsMutL	350±38	1,7×10 ⁻²
bsMutL [13]	400	5,0×10 ⁻³
PMS2-NTD человека [179]	~ 100	3,3×10 ⁻³
ecMutL-NTD [14]	~ 90	6,6×10 ⁻³
aaMutL-NTD [256]	~ 49	2,9×10 ⁻⁴

IV.3. Аффинная модификация белков фрагментами ДНК, содержащими β-дикетогруппу при С2'-атоме углеводного фрагмента⁵

IV.3.1. Синтез и свойства ДНК с единичной β-дикетогруппой

Как уже отмечалось ранее, Arg является важной аминокислотой в формировании ДНК-белковых контактов. Разработка селективного ДНК-реагента, взаимодействующего с этими остатками, является актуальной задачей. Так, в недавно опубликованной работе авторы встроили 2,4-пентадионовую группу в 5-ое положение тимидина [257]. Такие олигонуклеотиды показали свою эффективность в реакции с модельными пептидами и некоторыми ДНК-связывающими белками. Однако, использование олигонуклеотидов, содержащих β-дикетогруппу, в качестве реагента для модификации остатков Arg белков было предложено нами ранее [238], и авторы работы [257] ссылаются на наши исследования.

Фрагменты ДНК с β-дикетогруппой при С2'-атоме углеводного фрагмента были получены впервые в лаборатории нуклеиновых кислот кафедры ХПС химического факультета МГУ путем постсинтетической модификации олигонуклеотидов с включением 2'-амино-2'-дезоксинуридина [238]. Ранее 2'-аминосодержащие олигонуклеотиды хорошо зарекомендовали себя, продемонстрировав высокую эффективность в реакциях ацилирования [258,259].

⁵ При подготовке данного раздела диссертации использована публикация [238].

Первоначально для синтеза олигонуклеотидов с β -дикетогруппой использовали методику [260], однако ацилирование 2'-аминосодержащего олигонуклеотида лактоном в смеси ДМСО-вода при pH 8,5 не позволяло достичь степени превращения выше 60%. Ацилирование 2'-аминосодержащего олигонуклеотида 4,6-диоксогептановой кислотой в смеси ДМСО-вода в присутствии EDC при pH 9,0 (схема 1) дало возможность увеличить выход продукта реакции до 75-95%.

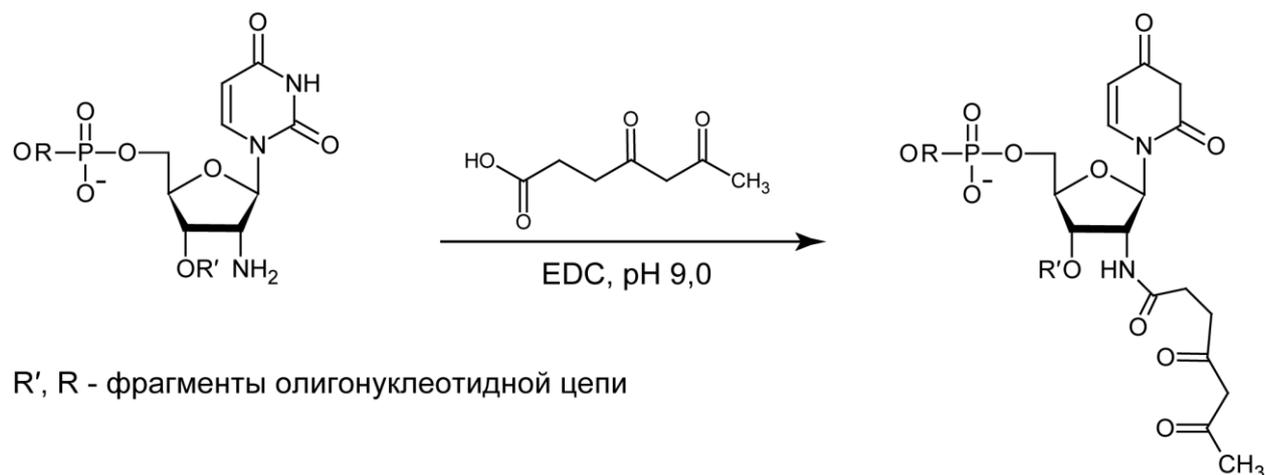


Схема 1

В качестве примера на рис. 31 приведена хроматограмма разделения реакционной смеси, содержащей олигонуклеотид 5'-TCGGAAAGUⁿCCCCTC (6), где Uⁿ – остаток 2'-амино-2'-дезоксуридина, и продукт его модификации (7) (табл. 7).

Таблица 7. Термическая устойчивость модифицированных ДНК-дуплексов.

ДНК-дуплекс	Структура дуплекса (5'→3')	pH 6,9		pH 9,2	
		T _{пл} , °C (±1)	Гипохромный эффект, % (±1)	T _{пл} , °C (±1)	Гипохромный эффект, % (±1)
VI	TCGGAAAGU ^{diox} CCCCTC (7) TAAGCCTTTCAGGGGAGTT	52	23	46	13
VII	TCGGAAAGU ⁿ CCCCTC (6) TAAGCCTTTCAGGGGAGTT	59	27	53	24
VIII	TCGGAAAGTCCCCTC TAAGCCTTTCAGGGGAGTT	63	26	57	20

Их строение подтверждено методом времяпролетной масс-спектрометрии. Так, рассчитанная масса олигонуклеотида 5'-TCGGAAAGU^{diox}CCCCTC (7), где U^{diox} – остаток 2'-дезокси-2'-(4,6-диоксогептиламино)уридина (4655,0) совпадает с величиной, определенной масс-спектрометрически (4655,7). В контрольных экспериментах было показано отсутствие в условиях реакции продуктов ацилирования 4,6-диоксогептановой кислотой и ее лактоном экзоциклических аминогрупп гетероциклических оснований природных олигонуклеотидов.

Для проверки способности синтезированных олигонуклеотидов с β -дикетогруппой взаимодействовать с остатками Arg использованы олигонуклеотиды (7) и 5'-TCGGAU^{diox}AGTCCCCTC (8) (табл. 7). Реакцию олигонуклеотида (7) с гуанидином проводили в Na-карбонатном буфере с концентрацией 0,5 М при рН 8,8 и 0,1 М при рН 9,2, однако ВЭЖХ и гель-электрофорез в ПААГ не позволили отделить продукт от исходного производного олигонуклеотида. Реакционная смесь была проанализирована методом MALDI-TOF, и был зафиксирован продукт присоединения гуанидина к олигонуклеотиду (7). Для упрощения анализа реакционной смеси были использованы гидрофобные производные Arg. При проведении реакции β -дикетосодержащего олигонуклеотида (7) с N^α-Boc- и N^α-Dns-производными L-аргинина наилучшие результаты по данным обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте (степень превращения 18 и 15% соответственно) были получены в 0,1 М Na-карбонатном буфере (рН 9,2).

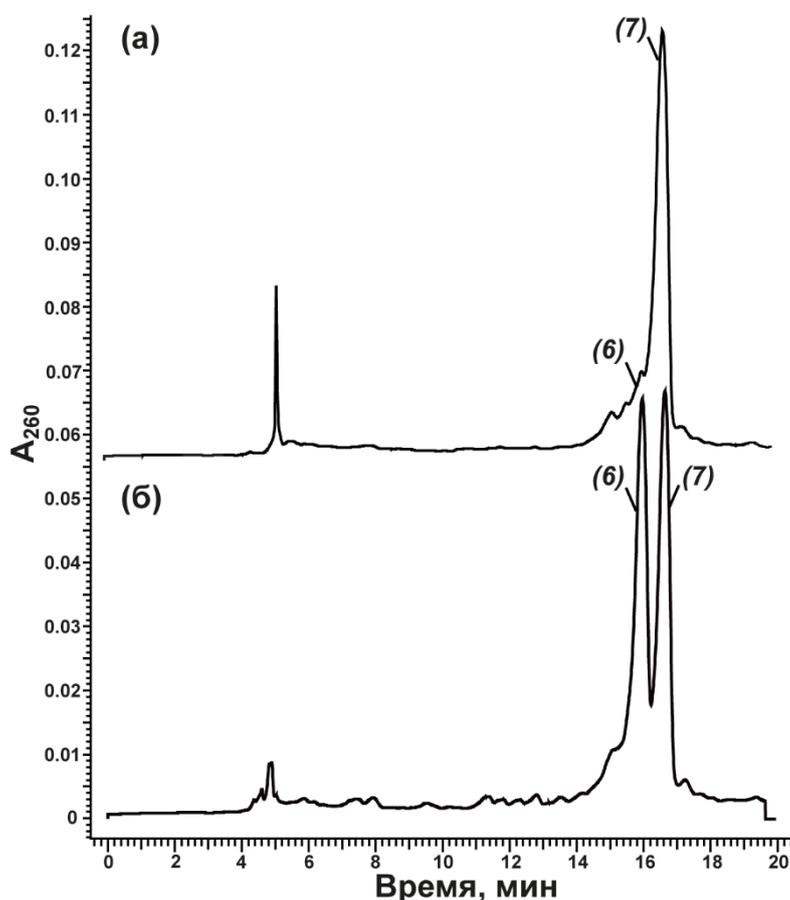


Рис. 31. Хроматограммы разделения методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте: (а) реакционной смеси, содержащей олигонуклеотид 5'-TCGGAAAGUⁿCCCCTC (6) и продукт его модификации (7); (б) реакционной смеси с добавлением исходного 2'-аминосодержащего олигонуклеотида (6).

Далее были сформированы ДНК-дуплексы, содержащие G «напротив» модифицированного нуклеозида в противоположной цепи. С их помощью мы показали, что дикетогруппа не взаимодействует с гуанином в составе дуплекса (данные не приведены). Это

позволяет использовать предложенные ДНК-реагенты для аффинной модификации белков, не опасаясь их побочной реакции с самой ДНК.

Методом УФ-спектроскопии исследовано влияние остатка 4,6-диоксогептановой кислоты, введенного по 2'-аминогруппе dU одной из цепей, на термическую стабильность образованного ею и комплементарным олигодезоксирибонуклеотидом ДНК-дуплекса (табл. 7). Температура плавления дуплексов **VI-VIII** понижается на 6°C при повышении pH раствора от 6,9 до 9,2. Введение остатка 2'-амино-2'-дезоксинуридина в одну из цепей дуплекса **VI** приводит к его дестабилизации ($\Delta T_{пл}$ 4°C) по сравнению с немодифицированным дуплексом **VIII**, что согласуется с данными работ [261,262]. 2'-Дезокси-2'-(4,6-диоксогептиламидо)уридин понижает $T_{пл}$ на 11°C. При модификации 2'-положения углеводного фрагмента наблюдается изменение гипохромного эффекта, что свидетельствует о локальном нарушении межплоскостных взаимодействий гетероциклических оснований.

IV.3.2. Взаимодействие ДНК-лигандов, содержащих β -дикетогруппу при C2'-атоме углеводного фрагмента, с MutS и MutL из *E. coli*

Большинство контактов MutS с ДНК являются гидрофильными (аминокислотные остатки взаимодействуют с углеводофосфатным остовом ДНК) и не зависят от нуклеотидной последовательности. Общая площадь поверхности ДНК-белковых контактов составляет ~1850 Å² [160]. Благодаря этому есMutS способен функционировать в различных нуклеотидных контекстах [155]. Для аффинной модификации белка есMutS были сконструированы 17-звенные ДНК-дуплексы (табл. 8).

Таблица 8. ДНК-дуплексы для аффинной модификации есMutS.

№	ДНК-дуплекс 5'→3' 3'←5'	Расстояние от положения модификации до Arg500, Å
IX	AGCA---GCCAGGCACCAGT TCG U^{diox} CGGTTCGTGGTCA (9)	7
X	AGC U^{diox} GCCAGGCACCAGT (10) TCGA---CGGTTCGTGGTCA	10
XI	AGCTGCCAGGCACA---AGT TCGACGGTTCGTG U^{diox} TCA (11)	10
XII	GGCA---CCCTGGGTGCTGA CCG U^{diox} GGGACCCACGACT (12)	7

Одна из цепей ДНК-дуплексов представляет собой олигонуклеотид с единичным включением β -дикетогруппы: 5'-ACTGGTGCTTGGCU^{diox}GCT (**9**), 5'-AGCU^{diox}GCCAGGCACCAGT (**10**), 5'-ACTU^{diox}GTGCTTGGCAGCT (**11**), 5'-TCAGCACCCAGGGU^{diox}GCC (**12**). Нуклеотидная последовательность дуплекса **IX** соответствует последовательности дуплекса, использовавшегося при кристаллизации

комплекса есMutS с ДНК [55]. Дуплекс **IX** состоит из олигонуклеотида (**9**) с β-дикетогруппой в модифицированном звене U^{diox} и комплементарного ему, и содержит G/T-пару (нуклеотид T в модифицированной цепи), которую узнает есMutS. Согласно анализу структуры комплекса есMutS с G/T-содержащей ДНК (PDB: 1E3M), 2'-дезоксидеокси-2'-(4,6-диоксогептиламидо)уридиновое звено в дуплексе **IX** удалено от остатка Arg500 не более чем на 7 Å, что достаточно для взаимодействия β-дикетогруппы с остатком Arg согласно схеме 2. Для контроля за ходом реакции на 5'-конец ДНК-дуплекса **IX** вводилась радиоактивная ^{32}P -метка или флуорофор – производное флуоресцеина (FAM).

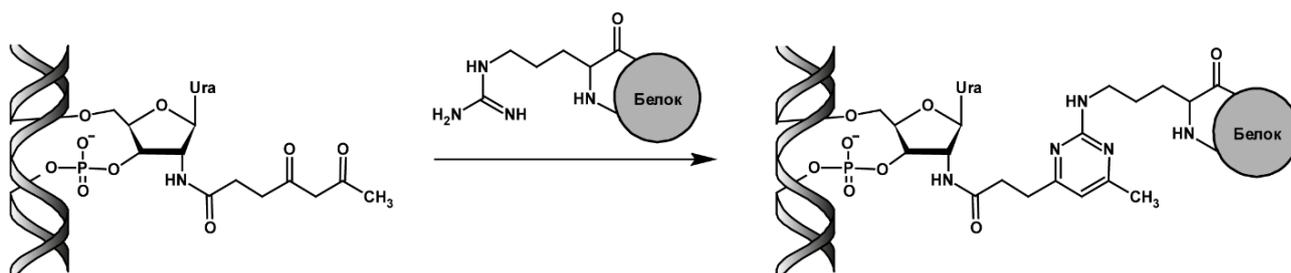


Схема 2

На первом этапе проводился подбор условий для аффинной модификации есMutS реакционноспособной ДНК. Варьировали соотношение концентраций ДНК-реагента **IX** и белка. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 30 мин, затем ее анализировали методом гель-электрофореза в неденатурирующих условиях. Наибольшая степень комплексообразования зафиксирована при 5-20-кратном избытке есMutS по отношению к лиганду. Для дальнейших исследований использовали соотношение ДНК - белок 1 : 10.

На следующем этапе была изучена кинетика образования конъюгата белка есMutS с ^{32}P -меченным лигандом **IX**. Время реакции составляло от 0,5 до 5 ч. Пробы из реакционной смеси, отобранные через определенные промежутки времени, анализировали методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях (рис. 32). Образование ковалентно связанного ДНК-белкового комплекса детектировали по появлению в геле дополнительной зоны белка с меньшей подвижностью. Исходя из полученных данных было решено проводить аффинную модификацию белка есMutS ДНК-лигандами с β-дикетогруппой в течение 3 ч. Инкубирование реакционной смеси более длительное время не увеличило значительно выход ДНК-белкового конъюгата.

Для исследования специфичности предложенных нами ДНК-реагентов использовали 5'-FAM-меченные лиганды **X-XI**, различающиеся между собой положением реакционноспособной группы относительно «мисматча», что приводит к изменению расстояния между модифицированным нуклеотидом в составе ДНК-дуплекса и Arg500 белка

есMutS (табл. 8). Дуплексы **X** и **XI** содержат некоплементарную пару G/T, но в дуплексе **X**, в отличие от **IX**, модифицированный нуклеотид с β -дикетогруппой располагается в противоположной цепи, содержащей остаток **G** «мисматча» на расстоянии 4 нуклеотидов от 3'-конца. ДНК-лиганд **XI** аналогичен **IX**, но модифицированный нуклеотид располагается с другой стороны от «мисматча». Учитывая индифферентность есMutS к первичной структуре ДНК вокруг «мисматча» [263,264] в качестве отрицательного контроля в реакции «кросслинкинга» использовали ДНК-дуплекс **XII** произвольной последовательности без пары G/T. Вместе с тем, он содержит нуклеотид с β -дикетогруппой в 4-ом положении с 3'-конца «нижней» цепи, как и в случае ДНК-лиганда **IX**.

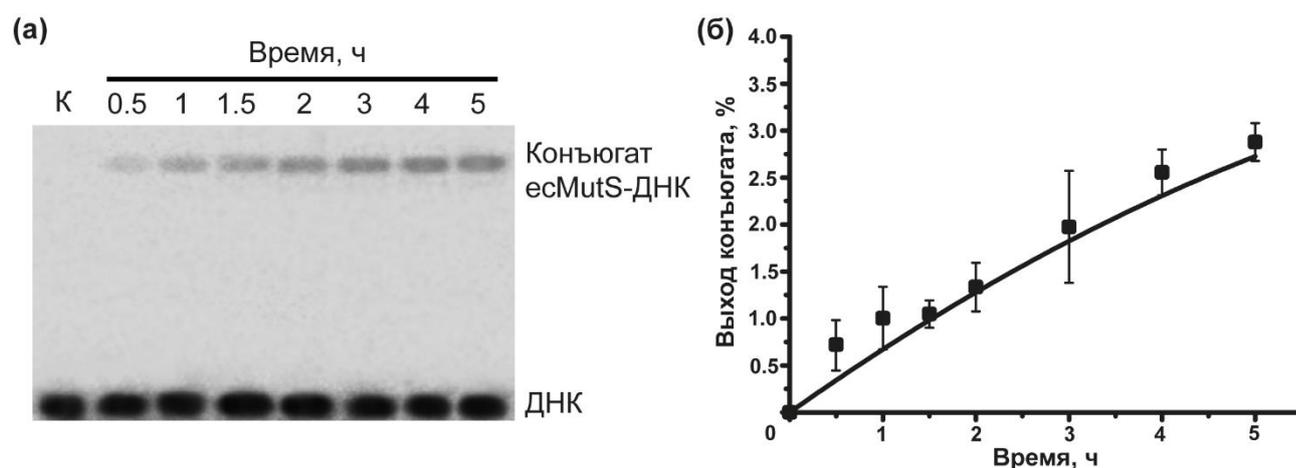


Рис. 32. Зависимость выхода конъюгата белка есMutS (10 мкМ) с ДНК-лигандом **IX** (1 мкМ), содержащим 5'-³²P-метку, от времени при 37°C: **(а)** анализ продуктов реакции в 8%-ном ПААГ, содержащим ДСН (электрофореграмма); дорожка К – исходная ДНК; над дорожками геля указано время реакции; положение ДНК-белкового конъюгата указано стрелкой; **(б)** график зависимости выхода продукта от времени протекания реакции; на графике приведено стандартное отклонение от среднего значения.

Установлено, что выход ДНК-белкового конъюгата зависит от положения модифицированного нуклеотида в составе дуплекса (рис. 33). Наибольший выход конъюгата наблюдался при взаимодействии есMutS с ДНК-лигандом **IX**, в комплексе с которым расстояние от β -дикетогруппы до остатка Arg минимально. С увеличением расстояния от β -дикетогруппы в составе ДНК-лигандов **X** и **XI** до остатка Arg500 в есMutS до 10 Å выход ДНК-белкового конъюгата уменьшался. На основании полученных данных можно предположить, что реакция между белком и лигандом в данном случае протекает селективно. Появление на геле в ряде случаев нескольких зон, соответствующих ДНК-белковым конъюгатам, может быть обусловлено взаимодействием двух молекул 5'-FAM-меченного ДНК-фрагмента с белком. Известно, что есMutS предпочтительнее образует комплексы с двуцепочечными ДНК-фрагментами, содержащими «мисматч», чем с каноническими дуплексами. Меньшая эффективность образования продуктов реакции ковалентного связывания есMutS с дуплексом

XII произвольной последовательности без пары G/T по сравнению с дуплексом **IX** подтвердила эти данные.

В работе [265] показано, что соединения, содержащие β-дикетогруппу, способны, помимо остатка Arg, модифицировать в белках остаток Lys. Особенность реакции с аминогруппой Lys состоит в том, что ее продукт может быть разрушен при воздействии гидроксилamina (схема 3).

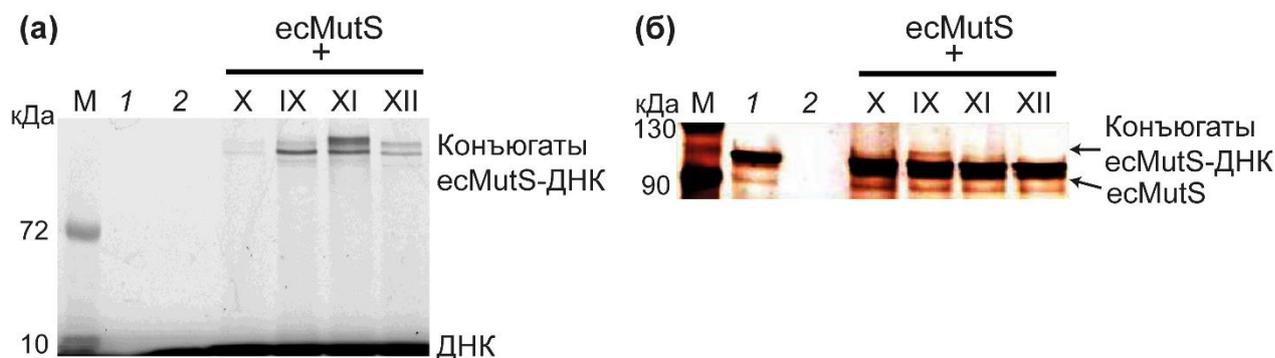


Рис. 33. Анализ в 8%-ном ПААГ, содержащем ДСН, продуктов ковалентного связывания белка ecMutS (1 мкМ) с 5'-FAM-мечеными ДНК-дуплексами **IX-XII** (5 мкМ). Условия реакции: 3 ч, 37°C. Электрофореграммы: (а) детектирование зон по флуоресценции ДНК; (б) окрашивание геля раствором солей серебра. Дорожка М – маркер молекулярной массы белков, дорожки 1 и 2 – белок ecMutS и ДНК-фрагмент X соответственно. Остальные дорожки – реакционные смеси, содержащие ecMutS и ДНК-дуплексы **IX-XII** (указаны над дорожками геля). Положение ДНК-белковых конъюгатов указано стрелками.

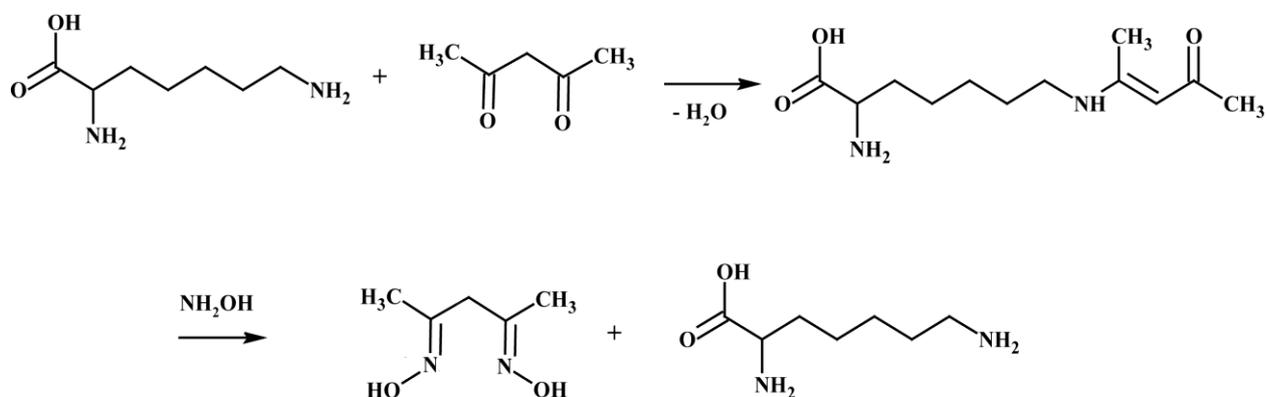


Схема 3

Для проверки селективности реакции по отношению к остаткам Arg ³²P-меченный дуплекс **IX** инкубировали 3 ч с ecMutS, затем в реакционную смесь добавляли раствор гидроксилamina и выдерживали 15 мин при 37°C. Анализ в ПААГ в денатурирующих условиях показал наличие белково-нуклеинового конъюгата (рис. 34а). Следовательно, предложенный нами ДНК-лиганд с β-дикетогруппой действительно взаимодействует с остатком Arg. Вероятно, модифицированный ДНК-лиганд **IV** также способен взаимодействовать с одним из остатков лизина ecMutS, так как выход конъюгата несколько

снизился (рис. 34а). Например, остаток Lys496 сближен с тем же участком углеводофосфатного остова ДНК, что и Arg500 [55].

Гомологи белка MutL способны связывать как одноцепочечную, так и двуцепочечную ДНК (см. раздел II.4.2). Эффективность комплексообразования MutL, как и других ДНК-связывающих белков, определяется длиной ДНК: чем протяженнее ДНК, тем стабильнее ДНК-белковый комплекс [15,190]. Используя стандартный метод «торможения» в геле в неденатурирующих условиях, нам не удалось, в отличие от есMutS, зафиксировать комплекс есMutL с 17-звенными ДНК-дуплексами.

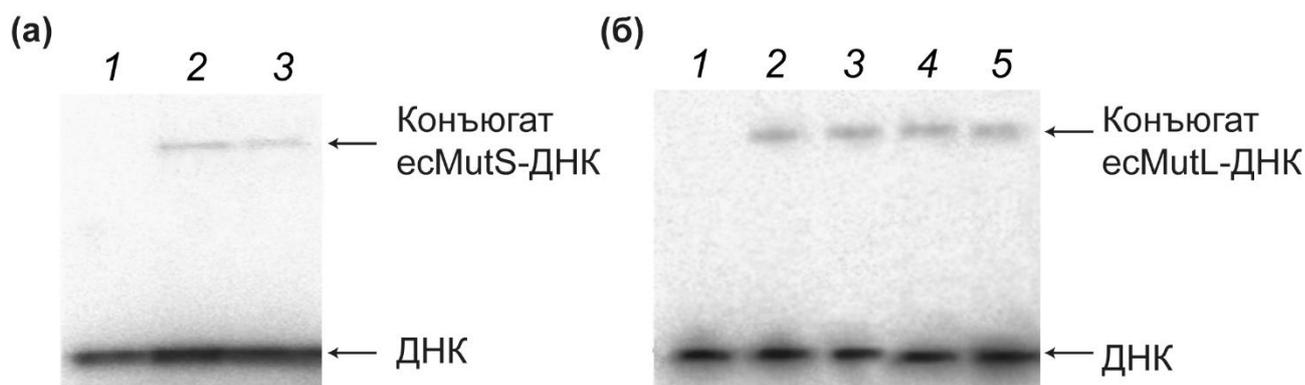


Рис. 34. Анализ в 8%-ном ПААГ, содержащем ДСН, продуктов ковалентного связывания есMutS (панель (а)) и есMutL (панель (б)) с 5'-³²Р-мечеными ДНК-дуплексами. Условия реакции: 3 ч, 37°С. Концентрация белков составляла 10 мкМ, ДНК-дуплексов – 1 мкМ. (а) Взаимодействие есMutS с ДНК-дуплексом IX. Дорожка 1 – исходная ДНК, дорожка 2 – реакционная смесь, содержащая есMutS и ДНК-дуплекс IX, дорожка 3 – реакционная смесь, содержащая есMutS и ДНК-дуплекс IX, после добавления раствора гидроксилamina. (б) Взаимодействие есMutL с ДНК-дуплексами: X (дорожка 2), IX (дорожка 3), XI (дорожка 4) и XII (дорожка 5). Дорожка 1 – исходный ДНК-дуплекс X.

Ранее по изменению сигнала поляризации флуоресценции было показано взаимодействие есMutL только с 41-звенным дуплексом [12]. Мы предприняли попытку ковалентной фиксации есMutL с помощью 5'-³²Р-меченных дуплексов IX-XI в условиях, подобранных для есMutS: 10-кратный избыток ДНК-реагента по отношению к есMutL, 37°С, 3 ч. Буфер, согласно рекомендациям [180], не содержал в своем составе KCl. В ходе аффинной модификации белка ДНК-реагентами с β-дикетогруппой нам удалось получить конъюгаты есMutL с ДНК, то есть впервые показать взаимодействие есMutL с короткими 17-звенными ДНК-дуплексами и продемонстрировать взаимодействие ДНК с остатками Arg в ДНК-связывающем центре этого белка. Несмотря на низкую эффективность процесса, образование продуктов аффинной модификации есMutL наблюдалось для всех ДНК-дуплексов, независимо от местоположения химически активной группы по отношению к G/T-паре, а также для дуплекса XII без «мисматча» (рис. 34б). Таким образом, в отсутствие есMutS взаимодействие есMutL с ДНК носит неспецифический характер, что согласуется с данными работ [79,80,245].

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

Таким образом, несмотря на невысокий выход конъюгатов ДНК с белками, дуплексы с β -дикетогруппой - первый пример ДНК-реагентов, которые могут взаимодействовать с остатками Arg. Для повышения селективности реакции аффинной модификации белка можно использовать обработку реакционной смеси гидроксилaminом, что позволит исключить побочную реакцию ДНК-лигандов, содержащих β -дикетогруппу, с аминокислотным остатком Lys.

IV.4. Использование ДНК-дуплексов, содержащих пиридилдисульфидную группу, для исследования ДНК-белковых и белок-белковых взаимодействий в системе MMR

IV.4.1. Зондирование ДНК-связывающего центра в N-концевом домене MutL из *E. coli*⁶

Эффективность применения дуплексов с пиридилдисульфидной группировкой для аффинной модификации белков ранее уже продемонстрирована на примере фиксации есMutS на ДНК [25]. Реакционная группа вводилась в состав ДНК по 2'-положению рибозы или присоединялась к 3'-концевой фосфатной группе с помощью линкера. Для получения конъюгатов с есMutS были сконструированы ДНК-дуплексы, содержащие один или несколько разрывов в олигонуклеотидной цепи [263,266]. Основываясь на предшествующих результатах, мы решили вводить пиридилдисульфидную группу в гетероциклическое основание. Стратегия эксперимента в целом состоит из нескольких этапов: конструирование ДНК-системы, содержащей активную группировку, способную взаимодействовать с белком; выбор аминокислотных остатков есMutL, потенциально вовлеченных в связывание с ДНК; получение мутантных форм есMutL с единственным остатком Cys на мономер белка в заданном положении, проверка их активности и способности связываться с ДНК; «кросслинкинг» мутантных форм есMutL с реакционноспособными ДНК, анализ продуктов реакции.

VI.4.1.1. Дизайн и синтез ДНК с единичной пиридилдисульфидной группой в гетероциклическом основании

Известно, что эффективность связывания MutL с ДНК сильно зависит от длины ДНК (см. раздел II.4.2). Также для формирования комплекса белков MutS и MutL на ДНК длина последней должна быть не менее 37-42 п.н., а оптимальная длина составляет 46-60 п.н.

⁶ При подготовке данного раздела диссертации использована публикация [192].

гексаметиленовом линкере. Олигонуклеотид с модификацией представлял собой «верхнюю» цепь дуплекса, содержащего Т из некомплементарной пары G/Т. Для этого проводили реакцию с одним из бифункциональных реагентов («кросслинкеров»): 3-(2-пиридилдитио)пропионатом, 2-пиридилтиол-тетраоксотетрадекан-N-гидроксисукцинимидом, 2-пиридилтиол-тетраоксооктатриаконтан-N-гидроксисукцинимидом (SPDP, PEG₄-SPDP, PEG₁₂-SPDP). Реакция между первичными аминами и N-гидроксисукцинимидной (NHS) группой, входящей в состав этих бифункциональных реагентов (SPDP), была ранее описана и давала высокие выходы продукта [269]. Оказалось, что модифицированные такими реагентами олигонуклеотиды имеют чуть более низкую подвижность в условиях гелевого электрофореза в неденатурирующих условиях и могут быть отделены от исходной ДНК. Как видно из рис. 35, полученные нами реакционноспособные 59-звенные ДНК (pyrSS-*Ls*-ДНК, pyrSS-*Lm*-ДНК и pyrSS-*Ll*-ДНК) не содержат примеси исходной ДНК, что может свидетельствовать о количественном прохождении реакции для всех трех реагентов.

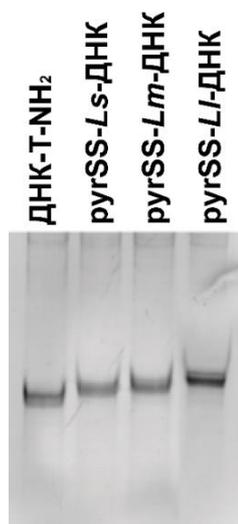


Рис. 35. Разделение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих пиридилдисульфидную группу на линкерах различной длины, в 20%-ном ПААГ в неденатурирующих условиях. Исходный олигонуклеотид с алифатической аминогруппой, который ацилировали коммерческими реагентами (SPDP, PEG₄-SPDP или PEG₁₂-SPDP), обозначен как ДНК-Т-NH₂. Для детекции ДНК гель окрашивали раствором бромид этидия.

Известно, что NHS имеет максимум поглощения при 260 нм ($\epsilon_{260} = 9700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), что совпадает с максимумом поглощения молекулы ДНК, поэтому для корректного определения концентрации, полученного реакционноспособного олигонуклеотида необходимо было очистить продукт реакции от непрореагировавшего «кросслинкера». Для этих целей были использованы колонки для гелевой фильтрации «Zeba» 40K MWCO, которые предназначены для разделения молекул больше 40 кДа и молекул меньшего размера (< 2 кДа). Несмотря на то, что модифицированный олигонуклеотид имеет молекулярную массу только около 19 кДа, благодаря его вытянутой форме указанные колонки идеально подходят для его отделения от низкомолекулярных веществ. Для подтверждения гомогенности препаратов ДНК,

модифицированных «кросслинкерами», использовали их способность взаимодействовать с 2-меркаптоэтанолом (схема 5). В результате этой реакции образуется пиридин-2-тион, который имеет характерный максимум поглощения при 343 нм ($\epsilon_{343} = 8080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). В отсутствие примесей непрореагировавшего «кросслинкера» соотношение количества ДНК и пиридин-2-тиона должно составлять 1 : 1. Для достижения такого результата гель-фильтрацию ДНК проводили несколько раз, причем, чем длиннее был линкер в составе реакционноспособной группировки, тем большее раундов хроматографии требовалось для получения ДНК нужной степени чистоты (обычно 2 повтора для *pyrSS-Ls*-ДНК, три повтора для *pyrSS-Lm*-ДНК и пять - для *pyrSS-Ll*-ДНК).

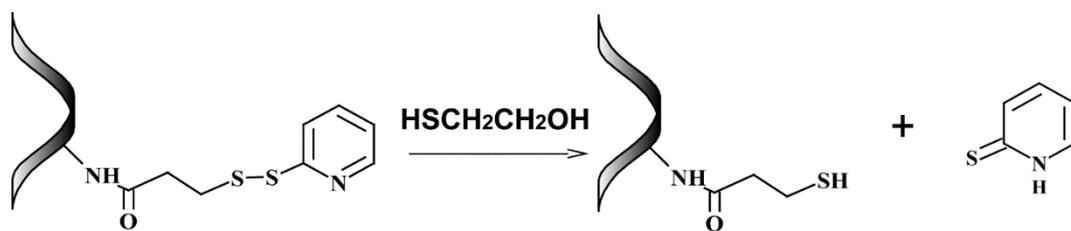


Схема 5

Олигонуклеотиды *pyrSS-Ls*-ДНК, *pyrSS-Lm*-ДНК и *pyrSS-Ll*-ДНК гибридизовали с 59-звенным олигонуклеотидом-матрицей, что приводило к образованию модифицированного дуплекса с G/T-парой (схема 4). Нами было продемонстрировано, что введенные модификации не влияют на способность дикого типа *esMutL* (*esWTMutL*) образовывать комплекс с ДНК. На рис. 36 приведены результаты связывания белка с *pyrSS-Ll*-ДНК.

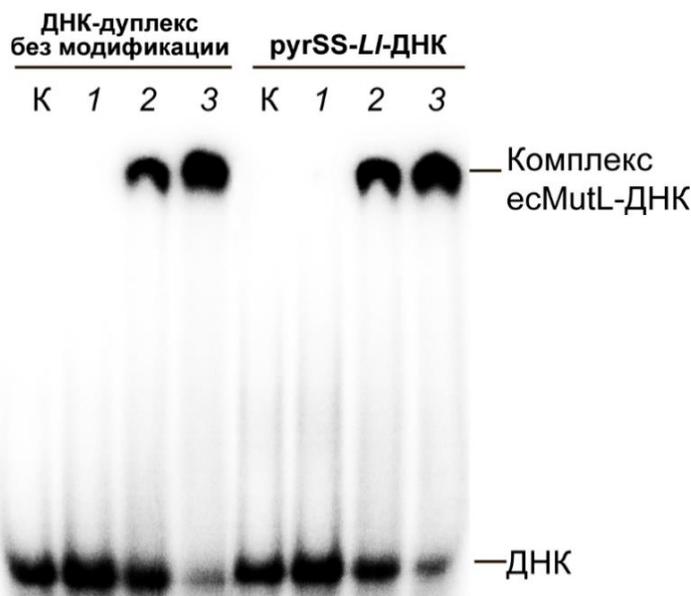


Рис. 36. Комплексообразование *esWTMutL* с немодифицированной ДНК и *pyrSS-Ll*-ДНК (10 нМ). Дорожка К – исходная ДНК. Дорожки 1-3 соответствуют реакционным смесям, содержащим 10 нМ ДНК и 80, 150 и 250 нМ *esWTMutL* соответственно. Условия комплексообразования: 10 мин, 0°C.

IV.4.1.2. «Кросслинкинг» между различными мутантными формами *esMutL* и модифицированными ДНК, содержащими пиридилдисульфидную группу

К выделенным мутантным формам *esMutL* добавляли модифицированные ДНК-дуплексы, несущие активную пиридилдисульфидную группу на линкерах различной длины. Реакцию вели в течение 30 мин. Для повышения выхода продукта реакции, *esMutL* (в расчете на димер) брали в двухкратном избытке по отношению к ДНК. Реакционные смеси анализировали методом гель-электрофореза по Лэммли без добавления каких-либо восстановителей (β -меркаптоэтанола или ДТТ) для предотвращения разрушения дисульфидной связи в образовавшемся конъюгате. Несмотря на то, что конъюгаты различных моноцистеиновых форм *esMutL* с ДНК имеют одинаковую молекулярную массу, их электрофоретическая подвижность различна и зависит от положения остатка Cys в белке. Такое различие типично для ковалентно «сшитых» комплексов и было отмечено в предыдущих исследованиях (например, [270]). а электрофореграммах можно наблюдать также дополнительную зону около 75 кДа (рис. 37), что соответствует хеликазе UvrD, которая совыделяется с *esMutL* [271].

Необходимо отметить, что активная форма *esMutL*, способная связывать ДНК, представляет собой димер. При анализе в денатурирующих условиях димер диссоциирует на две субъединицы: одна ковалентно «сшита» с ДНК и может быть идентифицирована как новая зона в геле, в то время как вторая имеет ту же подвижность в геле, что и не прореагировавший белок. Таким образом, для корректного расчёта выхода конъюгата, интенсивность соответствующей ему зоны умножалась на два.

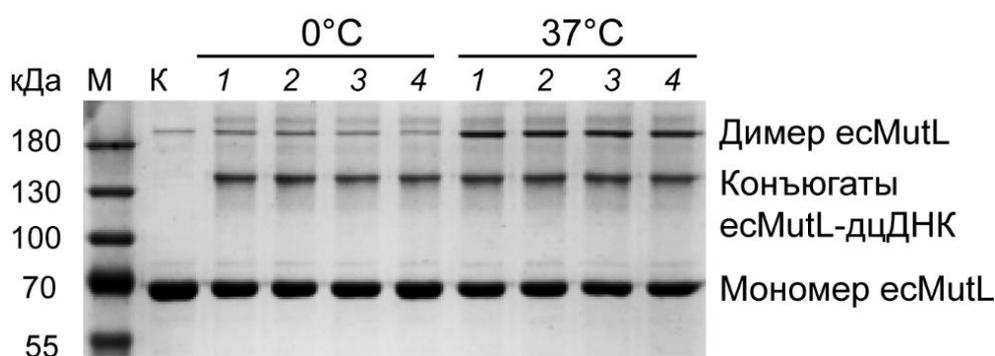


Рис. 37. Анализ в 8%-ном ПААГ, содержащем ДСН, продуктов ковалентного связывания *esMutL*(A251C) с *rnrSS-Ls*-ДНК при 0°C и 37°C. Дорожка 1 – «кросслинкинг» в отсутствие АТФ, дорожки 2–4 соответствуют реакциям «кросслинкинга» в присутствии 10 мкМ, 100 мкМ и 1 мМ АТФ, соответственно. К – *esMutL*(A251C) в отсутствие ДНК; М – маркер молекулярной массы белков. Здесь и далее в этом разделе для детекции белка гель окрашивали раствором PageBlue™ на основе кумасси бриллиантового синего G-250.

Мутантные формы *esMutL*(A251C) и *esMutL*(T218C) содержат остаток Cys на входе в предполагаемый ДНК-связывающий центр и должны эффективно формировать конъюгаты с модифицированными ДНК. Подобраны оптимальные условия «кросслинкинга».

Варьировалась температура инкубации, ионная сила раствора и концентрация АТФ в реакционной смеси. Тестировали «кросслинкинг» для двух комбинаций ДНК и белков: *ecMutL(A251C)* с *pyrSS-Ls*-ДНК и *ecMutL(T218C)* с *pyrSS-Ll*-ДНК. Показано, что обе мутантные формы эффективно взаимодействуют с ДНК с образованием конъюгата. В качестве примера на рис. 37 представлен электрофоретический анализ взаимодействия *ecMutL(A251C)* и *pyrSS-Ls*-ДНК при 0°C и 37°C, а также при различных концентрациях АТФ.

Ранее было показано, что при проведении реакции *ecMutS* с модифицированными ДНК при 37°C выход ДНК-белкового конъюгата был меньше по сравнению с инкубацией при 0°C, что, возможно, связано с инактивацией белка [238]. Нами показано отсутствие различия в выходе конъюгата в случае использования двух разных температур при «кроссликинге» *ecMutL*. Однако инкубирование при 37°C приводит к формированию большего количества ковалентно связанного димера *ecMutL* массой выше 180 кДа, который не разрушается в отсутствие восстановителей в реакционной смеси. Подвижность в геле таких димеров зависит от мутантной формы белка. Образование ковалентных связанных димеров предотвращает взаимодействие белка с модифицированными ДНК, поэтому для дальнейших экспериментов была выбрана температура 0°C.

В состав буфера для «кроссликинга» входит 100 мМ КСl. Известно, что *ecMutS* проявляет наибольшую специфичность к ДНК с «мисматчем» при 125 мМ КСl [116]. Мы немного снизили концентрацию соли для улучшения связывания ДНК белком *ecMutL*, однако оставили достаточно высокой – 100 мМ КСl - для корректной интерпретации результатов влияния *ecMutS* на выход «кроссликинга». В целом продемонстрировано значительное снижение выхода конъюгата *ecMutL*-ДНК при повышении концентрации КСl в реакционной смеси (рис. 38).

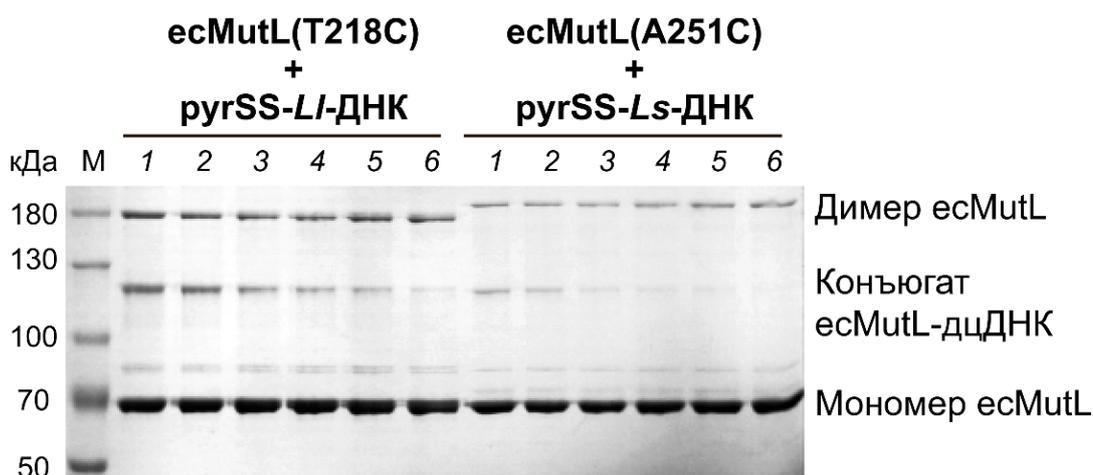


Рис. 38. Анализ в 8%-ном ПААГ, содержащем ДСН, продуктов ковалентного связывания мутантных форм *ecMutL(T218C)* и *ecMutL(A251C)* с дуплексами *pyrSS-Ll*-ДНК и *pyrSS-Ls*-ДНК при различных концентрациях КСl: 100, 150, 200, 250, 300 и 400 мМ (дорожки 1–6, соответственно). Дорожки 5 и 6 соответствуют «кроссликингу» в присутствии 1 мМ АДФ и 1 мМ АМРРNP. М – маркер молекулярной массы белков.

Наличие АТФ не является необходимым для реализации ДНК-связывающей функции MutL. Однако связывание и гидролиз молекулы АТФ вызывает существенные конформационные перестройки в белке и способствует его «скольжению» по ДНК [10,272]. Ожидалось, что наличие АТФ в смеси будет способствовать повышению выхода конъюгата в реакции «кросслинкинга». Тем не менее, на примере мутантных форм *ecMutL(T218C)* и *ecMutL(A251C)* нами показано, что количество конъюгата не зависит от концентрации АТФ в реакционной смеси (рис. 39). Кроме того, нами было проверено влияние наличия других нуклеотидных кофакторов в смеси: АДФ или АМРРНР (5'-аденилимино-дифосфат – негидролизуемый аналог АТФ), на выход конъюгата *ecMutL*-ДНК. АДФ не влиял на выход продукта «кросслинкинга», а АМРРНР в незначительной степени ингибировал реакцию (рис. 39).

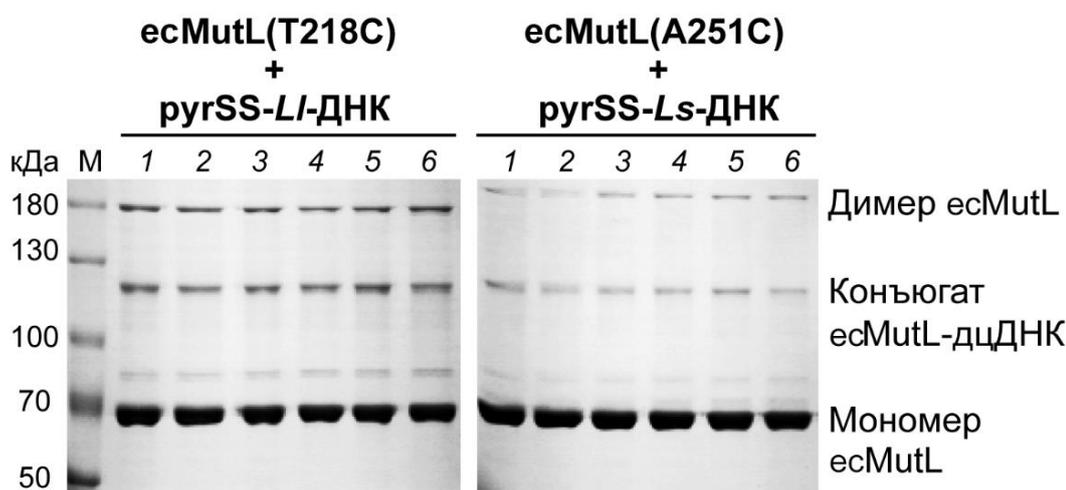


Рис. 39. Анализ в 8%-ном ПААГ, содержащем ДСН, продуктов ковалентного связывания мутантных форм *ecMutL(T218C)* и *ecMutL(A251C)* с дуплексами *pyrSS-Ll*-ДНК и *pyrSS-Ls*-ДНК. Дорожка 1 соответствует реакционной смеси в отсутствие нуклеотидного кофактора, дорожки 2–4 соответствуют «кросслинкингу» в присутствии 10 мкМ, 100 мкМ и 1 мМ АТФ, дорожки 5–6 – «кросслинкингу» в присутствии 1 мМ АДФ и 1 мМ АМРРНР. М – маркер молекулярной массы белков.

В подобранных оптимальных условиях (0°C, буфер Т, 100 мкМ АТФ) ДНК-дуплексы *pyrSS-Ls*-ДНК, *pyrSS-Lm*-ДНК или *pyrSS-Ll*-ДНК были использованы в реакции «кросслинкинга» с каждой из мутантных форм *ecMutL*. Результаты представлены на рис. 40. Показано, что пять из шести выбранных мутантных форм образуют конъюгаты с ДНК. Исключение составляет форма *ecMutL(N131C)*. Выход конъюгата существенно зависит от положения остатка Cys в молекуле белка и длины линкера между реакционноспособной группой и ДНК. Важно отметить, что *ecWTMutL* не образовывал продукта ковалентного связывания ни с одним из модифицированных ДНК-дуплексов, несмотря на то, что в мономере белка содержится 7 остатков Cys (4 в N-концевом домене и 3 в С-концевом домене). Это

показывает, что в ecWTMutL остатки Cys находятся внутри глобулы белка и не доступны для модификации в отличие от используемых нами мутантных форм (рис. 40).

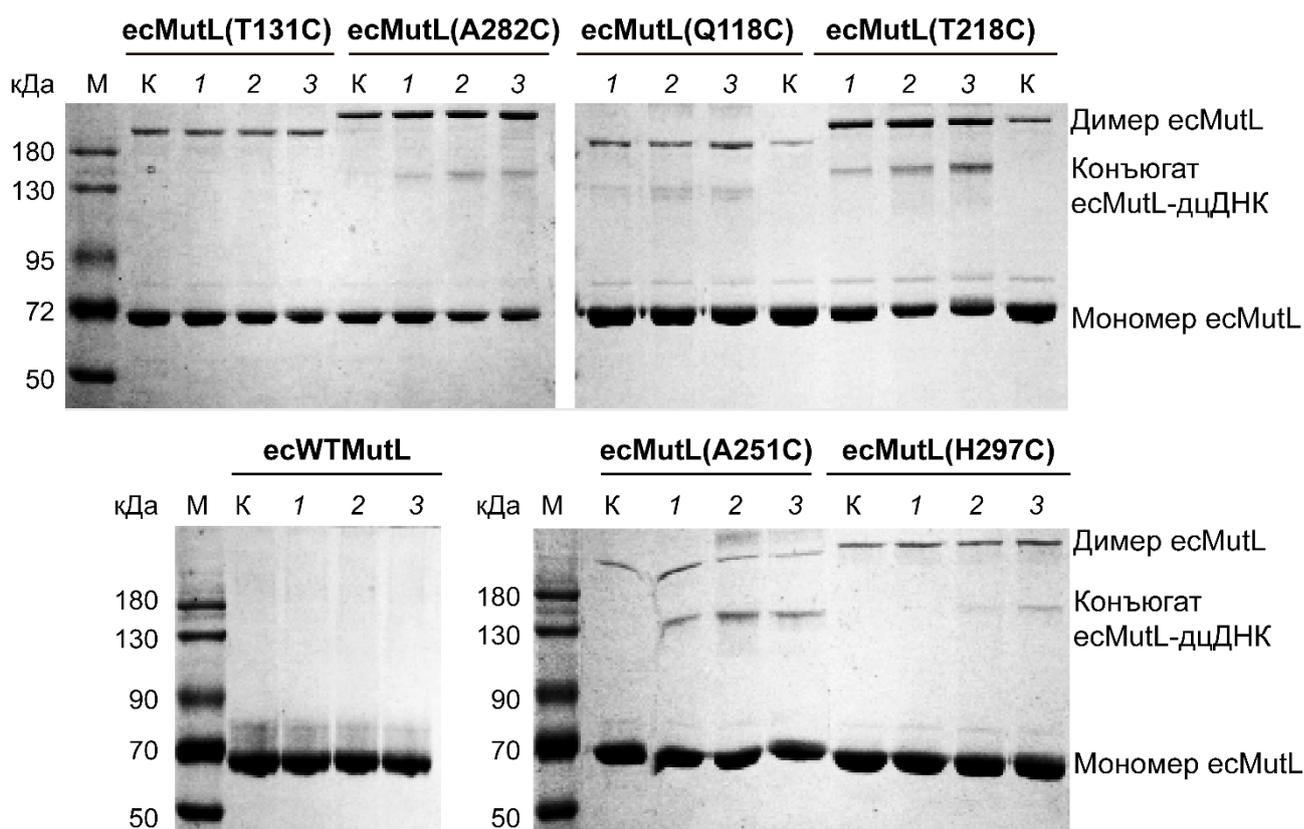


Рис. 40. Анализ в 8%-ном ПААГ, содержащем ДСН, продуктов ковалентного связывания мутантных форм белка ecMutL (ecMutL(Q118C), ecMutL(T218C), ecMutL(A251C), ecMutL(A282C) и ecMutL(H297C)) с 59-звенными ДНК-дуплексами, содержащими пиридилдитиогруппу в составе гетероциклического основания на линкерах различной длины (*Ls*, *Lm*, *Ll*). Дорожки 1, 2 и 3 соответствуют реакционным смесям, содержащим ДНК-дуплексы (дцДНК) с пиридилдисульфидной группой на линкерах *Ls*, *Lm* и *Ll* соответственно; К – ecMutL в отсутствие ДНК; М – маркер молекулярной массы белков.

Известно, что MutL эффективно взаимодействует с одноцепочечной ДНК [180]. Нами проведено ковалентное связывание мутантных форм ecMutL (ecMutL(T218C), ecMutL(A282C) и ecMutL(A251C)) с 59-звенными оцДНК, содержащими пиридилдитиогруппу на линкерах различной длины («верхняя» цепь ДНК-дуплексов, использованных ранее): pyrSS-*Ls*-ДНК, pyrSS-*Lm*-ДНК и pyrSS-*Ll*-ДНК. Как и ожидалось, полученные конъюгаты мутантных форм ecMutL с оцДНК обладают большей подвижностью в геле, чем с конъюгаты с дуплексами (рис. 41). Таким образом, нами было показано эффективное формирование конъюгатов белка ecMutL с оцДНК, а также продемонстрировано, что в конъюгате с белком ДНК сохраняет дуплексную структуру (рис. 41).

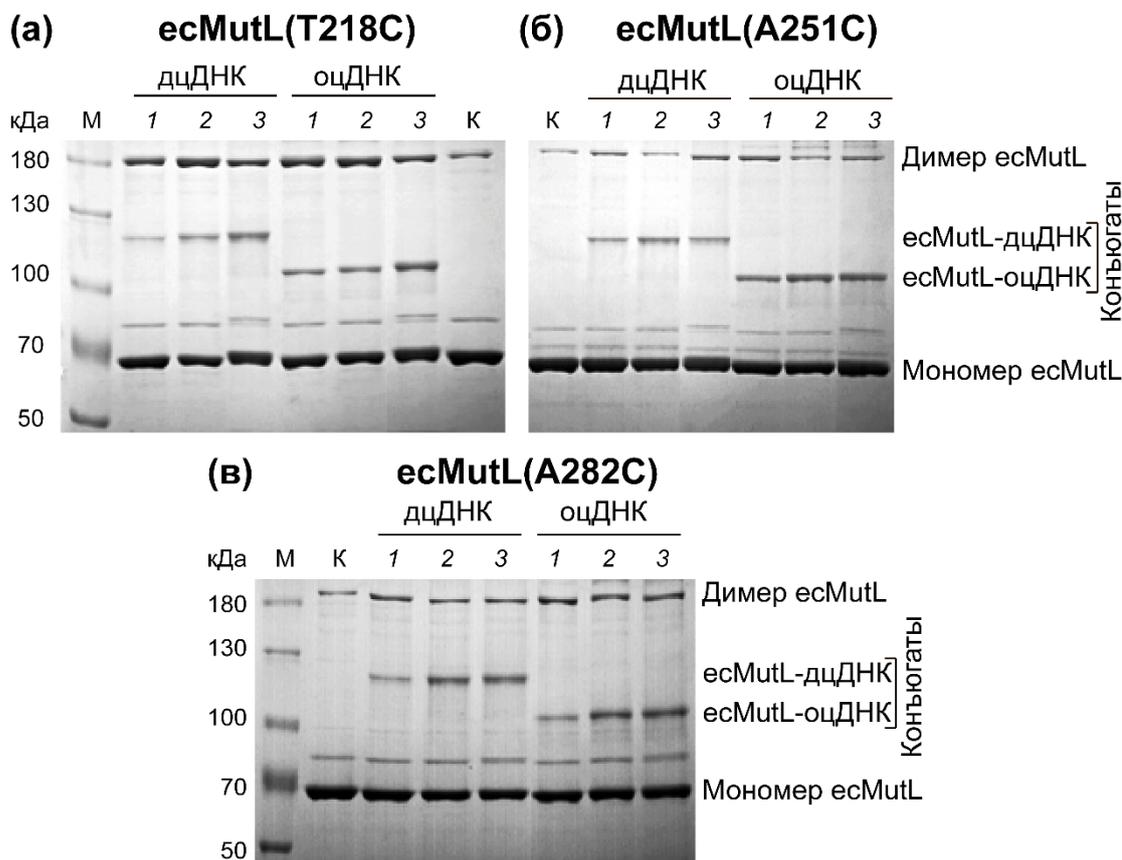


Рис. 41. Анализ в 8%-ном ПААГ, содержащем ДСН, продуктов ковалентного связывания мутантных форм: *ecMutL*(T218C) (а), *ecMutL*(A282C) (б) и *ecMutL*(A251C) (в), с модифицированными ДНК-дуплексами (дцДНК) и одноцепочечной ДНК (оцДНК). дцДНК представляют собой 59-звенные ДНК-дуплексы, содержащие пиридилдитиогруппу на линкерах различной длины (*Ls*, *Lm*, *Ll*). оцДНК – «верхняя» цепь ДНК-дуплексов, содержащая модификацию. Дорожки 1, 2 и 3 соответствуют различным длинам линкера *Ls*, *Lm*, и *Ll*. К – *ecMutL* без добавления ДНК; М – маркер молекулярной массы белков.

Совместно с доктором П. Фридрихом и аспирантом В. Кунецким (Университет имени Ю. Либиха, Германия) нами рассчитано расстояние от β -углеродного атома *Cys* мутантных форм *ecMutL* до ДНК (рис. 42). Для этого с использованием уже имеющихся данных PCA (PDB: 5AKV) построена модель тройного комплекса *ecMutS*–*ecMutL*–ДНК. Фрагмент двуцепочечной ДНК конструировали в программе Life Explorer [273]. Рассчитанные расстояния и результаты ковалентного связывания мутантных форм *ecMutL* с модифицированными ДНК представлены в табл. 9.

Все мутантные формы *ecMutL*, за исключением *ecMutL*(N131C), взаимодействуют с *purSS-Ll*-ДНК достаточно эффективно (выход конъюгата 30–50%). Расчётная длина линкера *Ll* составляет 50,4 Å, что больше расстояния между *Cys* любой из мутантных форм до ДНК кроме *ecMutL*(N131C). Таким образом, ДНК-дуплекс с пиридилдисульфидной группой на длинном подвижном линкере является эффективным «кросслинкером». При использовании ДНК с более короткими линкерами (*Ls* длиной 18,6 Å и *Lm* длиной 31,7 Å) выходы конъюгатов

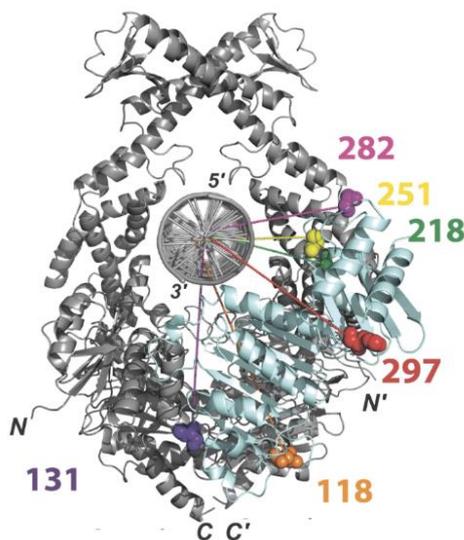


Рис. 42. Модель комплекса есMutS-есMutL-ДНК. Цветными линиями отмечено наименьшее расстояние от β -углеродного атома аминокислотного остатка до центра молекулы ДНК.

Таблица 9. Рассчитанные расстояния между ДНК и Cys мутантных форм есMutL и выход конъюгата есMutL-ДНК.

Положение Cys в мутантной форме есMutL	Расстояние от Cys до ДНК, Å	Выход конъюгата есMutL-ДНК, % (длина линкера L , Å) за 30 мин		
		pyrSS- <i>Ls</i> -ДНК (L_s 18,6 Å)	pyrSS- <i>Lm</i> -ДНК (L_m 31,7 Å)	pyrSS- <i>Ll</i> -ДНК (L_l 50,4 Å)
118	52,0	0	11±1	13±1
131	44,0	0	0	0
218	27,0	15±6	26±4	29±2
251	23,3	27±7	30±6	31±5
282	27,6	12±3	21±4	37±4
297	36,2	0	7±1	9±2

снижаются по стерическим причинам. есMutL(T218C), есMutL(A251C) и есMutL(A282C), где Cys располагается в предполагаемой ДНК-связывающей области или очень близко к ней (расстояния до ДНК 23,3–27,6 Å), способны формировать конъюгат вне зависимости от длины используемого линкера. В случае есMutL(H297C) (расстояние от положения 297 в белке до ДНК составляет 36,2 Å), в отличие от трёх указанных выше мутантных форм есMutL, формирование конъюгата наблюдается только при использовании линкеров *Lm* или *Ll* (pyrSS-*Lm*-ДНК или pyrSS-*Ll*-ДНК). Несмотря на близость позиции 297 к ДНК-связывающему центру, по стерическим причинам Cys297 становится недоступным для модификации. есMutL(N131C), как и ожидалось, не образовывал конъюгаты ни с одной из реакционноспособных ДНК, так как позиция 131 в белке находится на значительном

расстоянии от ДНК-связывающей области (~44 Å). Интересно, что несмотря на удалённость позиции 118 от ДНК, *ecMutL(Q118C)* всё же формировал конъюгаты с дуплексами, содержащими реакционную группу на линкерах *Lm* и *Ll*. Возможно, это связано с тем, что *Cys118* находится в мобильной петле (рис. 43), которая может стать доступной для модификации даже располагаясь на достаточно большом расстоянии от ДНК (~52 Å), в случае использования дуплекса с пиридилдитиогруппой на достаточно протяжённом линкере.

IV.4.1.3. Кинетика образования конъюгатов ecMutL-ДНК в отсутствие ecMutS

Три мутантные формы белка (*ecMutL(T218C)*, *ecMutL(A251C)* и *ecMutL(A282C)*), взаимодействующие с реакционноспособными ДНК с наибольшим выходом конъюгата были выбраны для исследования кинетики реакции ковалентного связывания с дуплексами *rugSS-Ls*-ДНК и *rugSS-Lm*-ДНК. Для дуплекса *rugSS-Ll*-ДНК кинетических исследований не проводили в связи с его низкой региоселективностью.

Во всех рассмотренных случаях реакция между белком и ДНК протекает достаточно быстро: кинетическая кривая и выходит на плато уже за 30 мин (рис. 43). Наиболее эффективно образует конъюгат *ecMutL(T218C)*: уже за 2 мин инкубации достигается максимальный выход продукта. Согласно данным РСА N-концевого домена *MutL* (рис. 20, раздел IV.1.2), позиция 218 находится на поверхности белка и стерически доступна для модификации, однако остаток *Cys* располагается вне предполагаемого ДНК-связывающего центра, хотя и в непосредственной близости от него (~26 Å, табл. 9). Таким образом, формирование конъюгата ДНК с *ecMutL(T218C)* является вероятностным событием и не обязательно приводит к формированию «правильного» комплекса.

Отметим, что в случае *rugSS-Ls*-ДНК для *ecMutL(T218C)* и *ecMutL(A251C)* начальная скорость образования конъюгата примерно одинакова, однако, выход продукта реакции с участием *ecMutL(A251C)* достигает максимального значения гораздо медленнее, а итоговый выход продукта в случае этого белка почти в 2 раза выше по сравнению с *ecMutL(T218C)* (рис. 43). Согласно данным РСА (рис. 20, раздел IV.1.2) позиция 251 находится в короткой α -спирали, расположенной на «входе» в предполагаемый ДНК-связывающий центр. Это положение частично защищено от взаимодействия с растворителем соседними а.о. *Pro248*, *Glu252*, *Gln254* и *Gln285*. Однако конформационные перестройки в белке делают это положение более доступным для формирования конъюгата по сравнению с положением 218.

Начальная скорость «кросслинкинга» *ecMutL(A282C)* с *rugSS-Ls*-ДНК существенно ниже по сравнению с *ecMutL(T218C)* и *ecMutL(A251C)*. По-видимому, несмотря на то, что позиция 282 находится на «входе» в ДНК-связывающий центр *MutL*, она удалена от непосредственного места взаимодействия белка с ДНК.

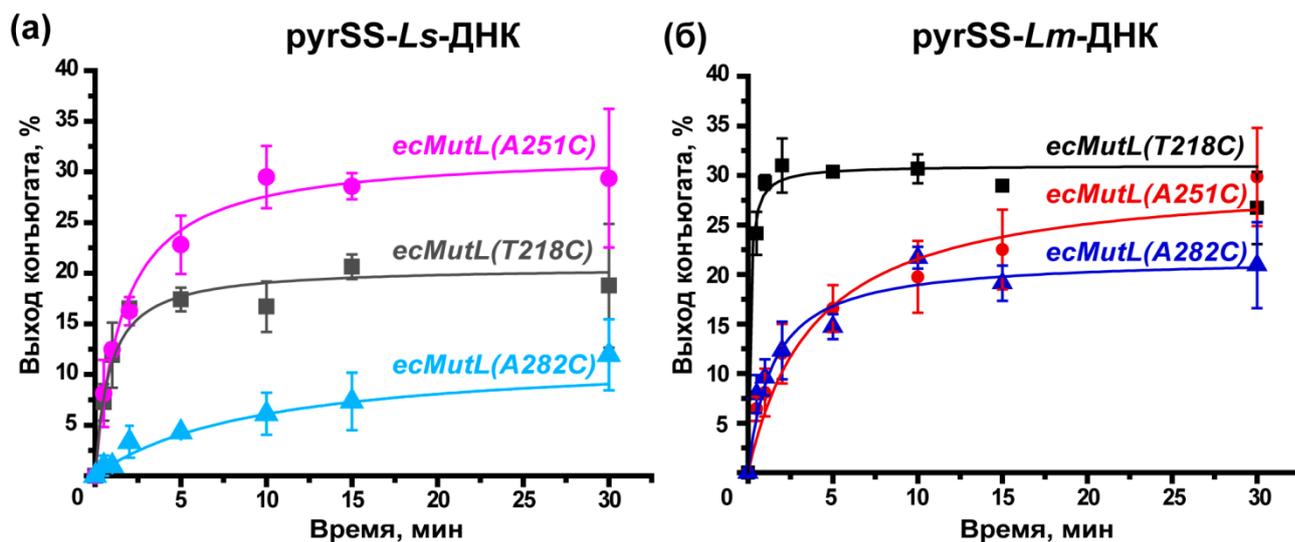


Рис. 43. Кинетические кривые образования конъюгатов между *ecMutL*(T218C), *ecMutL*(A251C) и *ecMutL*(A282C) и модифицированными ДНК, содержащими пиридилдисульфидную группу: *pyrSS-Ls*-ДНК (а) и *pyrSS-Lm*-ДНК (б) в отсутствие *ecMutS*.

Увеличение длины линкера, соединяющего реакционно способную группу с ДНК существенно меняет картину «кросслинкинга». Использование *pyrSS-Lm*-ДНК вместо *pyrSS-Ls*-ДНК привело к падению начальной скорости образования конъюгата этого дуплекса с *ecMutL*(A251C) более чем в 2 раза (рис. 43). Тем не менее общий выход продукта реакции за 30 мин практически не изменился. Очевидно, что *pyrSS-Ls*-ДНК (18,6 Å) является оптимальной для аффинной модификации Cys251 (расстояние между а.о. и ДНК 23,3 Å). С увеличением длины линкера и его подвижности скорость формирования ковалентной связи между *ecMutL*(A251C) и ДНК уменьшается. При формировании конъюгата *ecMutL*(A282C) с *pyrSS-Lm*-ДНК наблюдается увеличение начальной скорости «кросслинкинга» примерно в 6 раз и общего выхода продукта реакции за 30 мин в 3 раза по сравнению с использованием *pyrSS-Ls*-ДНК (рис. 43). Эти данные подтверждают наше предположение о том, что *pyrSS-Ls*-ДНК в отличие от *pyrSS-Lm*-ДНК содержит реакционноспособную группу на слишком коротком линкере, недостаточном для эффективного взаимодействия с Cys282.

Из рассматриваемых трех мутантных форм *ecMutL* наиболее высокие скорости образования конъюгата, а также максимальные выходы итогового продукта наблюдались при взаимодействии *ecMutL*(T218C) с *pyrSS-Lm*-ДНК (рис. 43), что свидетельствует о доступности Cys218 для аффинной модификации.

4.1.4. Влияние белка *ecMutS* на образование конъюгатов *ecMutL*-ДНК

Как упоминалось выше, используемые для «кросслинкинга» *ecMutL* 59-звенные ДНК-дуплексы содержат G/T-«мисматч», который узнаётся белком *ecMutS*, что позволило нам исследовать влияние этого белка на эффективность образования конъюгатов *ecMutL*-ДНК. Чтобы избежать взаимодействия *ecMutS* с ДНК, использовалась мутантная форма *ecMutS*, не

содержащая остатков Cys (ecCFMutS). Эта мутантная форма получена ранее; продемонстрирована ее способность эффективно взаимодействовать с ДНК [137]. В данной работе было показано эффективное комплексообразование как ecWTMutS, так и ecCFMutS со всеми тремя модифицированными 59-звенными ДНК-дуплексами независимо от длины линкера (рис. 44).

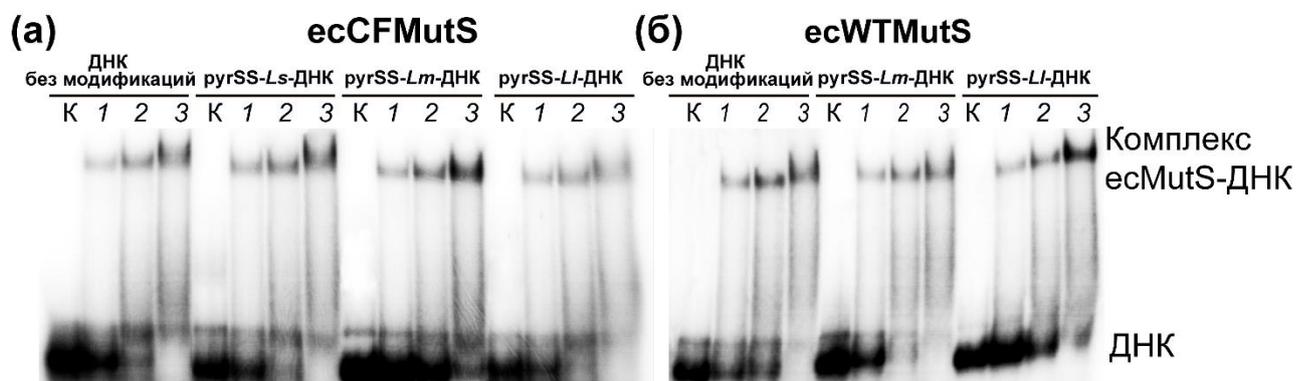


Рис. 44. Анализ в 6%-ном ПААГ продуктов связывания белков ecCFMutS (панель **(а)**) и ecWTMutS (панель **(б)**) с 5'-³²P-мечеными ДНК-дуплексами (10 нМ). Дорожка К – исходная ДНК. Дорожки 1-3 соответствуют реакционным смесям, содержащим 10 нМ ДНК и 40, 80 и 200 нМ ecMutS соответственно. Комплексообразование проводилось в присутствии 1 мМ АДФ в буфере С без ДТТ в течение 20 мин при 37°C.

В предварительных экспериментах показано, что оптимальное соотношение количества белков ecMutS : ecMutL для эффективного формирования комплекса составляет 1:2, что было также использовано ранее [274]. «Кросслинкинг» мутантных форм ecMutL с реакционноспособными ДНК в присутствии ecMutS проводился в тех же условиях, что и без ecMutS (0°C, 30 мин, 100 мМ KCl).

Присутствие в реакционной смеси ecCFMutS привело к значительному изменению выходов конъюгатов для некоторых мутантных форм ecMutL (рис. 45). При использовании в реакции «кросслинкинга» pyrSS-Lm-ДНК для всех мутантных форм наблюдалось увеличение выхода продукта. Особенно сильно этот эффект заметен в случае ecMutL(T218C), ecMutL(A251C) и ecMutL(A282C). Присутствие ecMutS не влияет или даже снижает выход конъюгатов ecMutL с ДНК, содержащей пиридилдисульфидную группу на самом длинном линкере (pyrSS-Ll-ДНК). Интересно, что мутантная форма ecMutL(N131C), которая в отсутствие ecCFMutS не взаимодействовала ни с одним из модифицированных ДНК-дуплексов, в присутствии ecMutS образует конъюгаты с pyrSS-Lm-ДНК и с pyrSS-Ll-ДНК с эффективностью 5-10%, сравнимой с ecMutL(H297C). Известно, что после узнавания «мисматча» белок ecMutS способствует «посадке» ecMutL на ДНК и формированию стабильного комплекса между ними [274]. Можно предположить, что в тройном комплексе ecMutS-ecMutL-ДНК N-концевые домены ecMutL находятся в основном в мономерной форме, что, возможно, делает позицию 131 доступной для модификации.

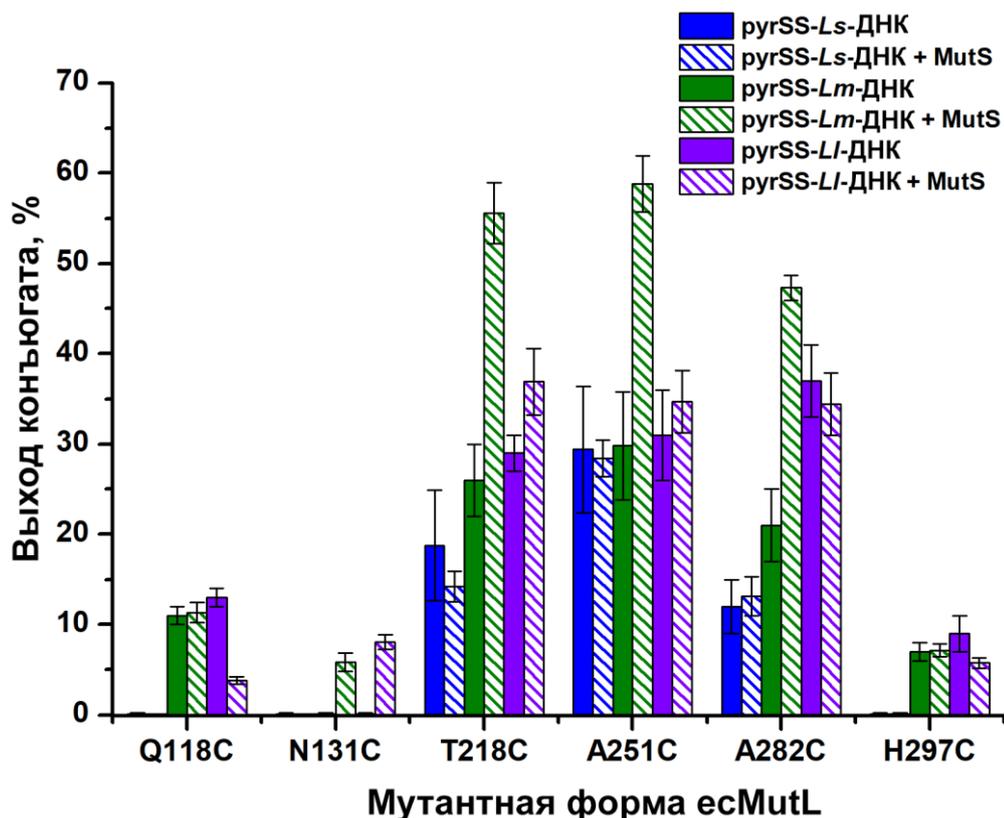


Рис. 45. Выходы ДНК-белковых конъюгатов в реакции «кросслинкинга» мутантных форм eсMutL с реакционноспособными ДНК в присутствии eсCFMutS (колонки со штриховкой) и в отсутствие eсCFMutS (колонки без штриховки).

Наибольшие выходы конъюгатов в присутствии eсMutS наблюдались при взаимодействии eсMutL(T218C), eсMutL(A251C) и eсMutL(A282C) с pyrSS-Lm-ДНК и pyrSS-Ll-ДНК. Возможно, подвижность длинных линкеров позволяет правильно сформироваться комплексу eсMutS-eсMutL на ДНК, что и увеличивает выход конъюгатов. Отметим, что это те же мутантные формы eсMutL, которые наиболее эффективно подвергались аффинной модификации реакционноспособными ДНК. Для этих мутантных форм было изучено влияние eсCFMutS на кинетику образования конъюгатов.

Присутствие eсCFMutS в реакционной смеси оказало незначительное влияние на скорость образования конъюгата eсMutL(T218C)-ДНК. Полученные данные согласуются с положением остатка 218, который находится вне ДНК-связывающего центра. Тем не менее, в присутствии MutS выход конъюгата увеличился почти в 2 раза при использовании pyrSS-Lm-ДНК (рис. 46а).

Присутствие eсCFMutS привело к увеличению скорости образования конъюгата eсMutL(A251C) с pyrSS-Lm-ДНК в 4 раза. Аналогичный результат был получен для eсMutL(A282C). В присутствии eсCFMutS eсMutL(A282C) в 3 раза быстрее формировал конъюгат с pyrSS-Lm-ДНК, итоговый выход продукта за 30 мин увеличился в 2 раза. Такие существенные эффекты могут быть связаны с конформационными изменениями в eсMutL в результате его связывания с eсMutS, что делает Cys251 и Cys282 еще более доступными для

аффинной модификации (рис. 46б, в). Отсутствие влияния *ecCFMutS* на выход конъюгатов в случае *pyrSS-Ls*-ДНК свидетельствует о важности длины линкера, на котором находится пиридилтитиогруппа для этой реакции (рис. 45, рис.46б, в).

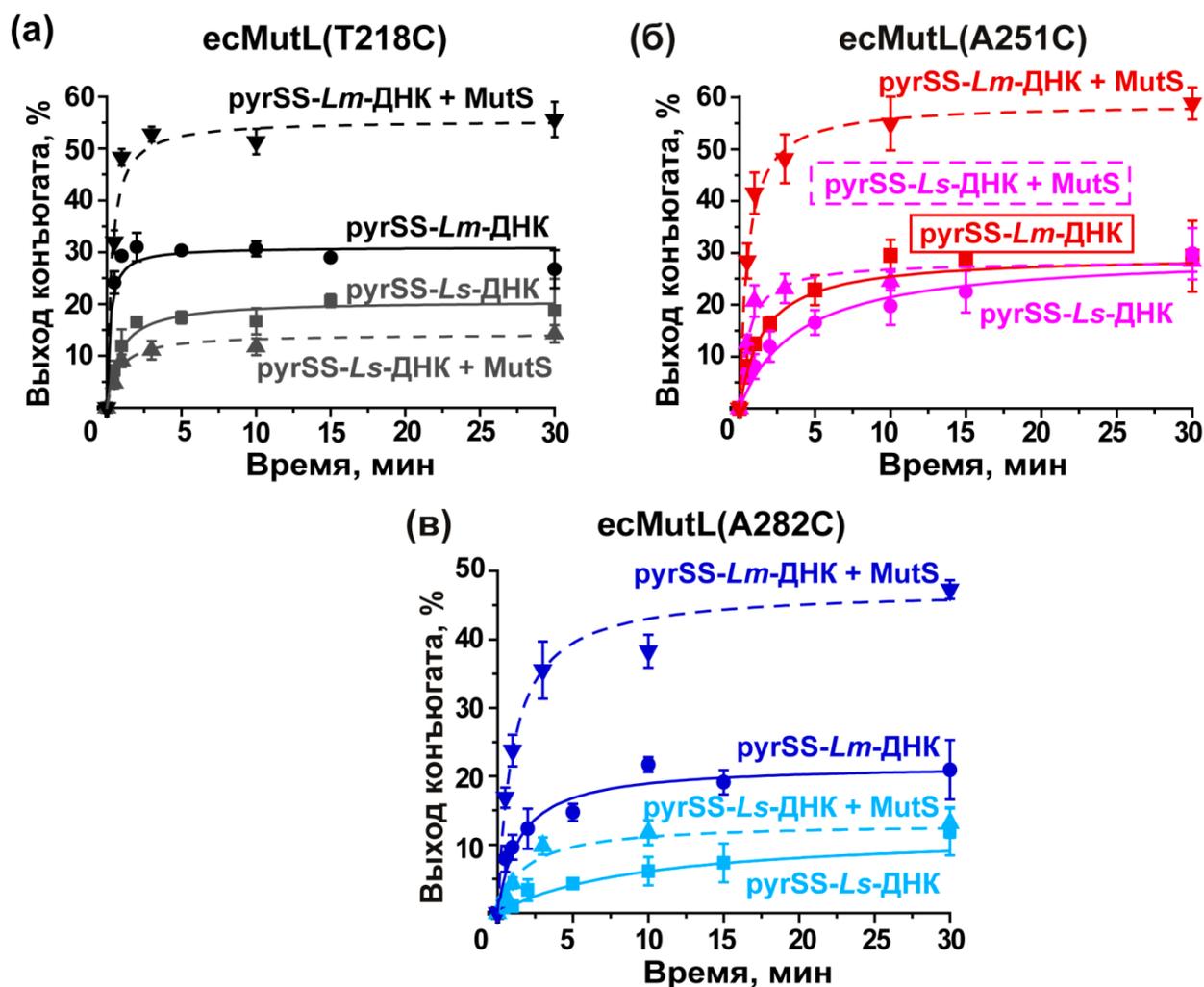


Рис. 46. Кинетические кривые образования конъюгатов между *ecMutL*(T218C) (а), *ecMutL*(A251C) (б) или *ecMutL*(A282C) (в) и модифицированными ДНК, содержащими пиридилдисульфидную группу: *pyrSS-Ls*-ДНК (серый соответствует *ecMutL*(T218C), розовый - *ecMutL*(A251C), голубой - *ecMutL*(A282C)) и *pyrSS-Lm*-ДНК (черный соответствует *ecMutL*(T218C), красный - *ecMutL*(A251C), синий - *ecMutL*(A282C)) в отсутствие *ecCFMutS* (сплошная линия) и в присутствии *ecCFMutS* (пунктирная линия).

Таким образом, впервые получены конъюгаты мутантных форм белка *ecMutL* с ДНК, содержащими пиридилдисульфидную группу при С5-атоме dU. Присутствие белка *ecCFMutS* увеличивает выход и скорость образования конъюгатов мутантных форм *ecMutL* с модифицированной ДНК, содержащей реакционноспособную группу на линкере средней длины. Выход ряда конъюгатов составил 30-60%, что позволяет в перспективе их выделить и использовать для дальнейших исследований системы репарации «мисматчей». Убедительно доказано, что позиции 218 и 251 белка *ecMutL* наиболее сближены с ДНК-лигандом.

IV.4.2. Аффинная модификация MutL из *N. gonorrhoeae* модифицированными ДНК, содержащими пиридисульфидную группу

ecMutL отличается от большинства своих бактериальных и эукариотических гомологов отсутствием эндонуклеазных мотивов и является скорее исключением. Подавляющая часть белков MutL обладает способностью вносить одноцепочечный разрыв в дочернюю цепь ДНК, что является ключевым событием для инициации работы системы репарации. Как упоминалось выше, сравнение аминокислотных последовательностей белков MutL, способных гидролизовать ДНК, выявило у них наличие 5 консервативных мотивов, образующих каталитический центр, ответственный за эндонуклеазную функцию [78,182]. В состав двух из этих мотивов (мотивы XIV и XV [78,182]) входят остатки цистеина. Мы поставили задачу методом «кросслинкинга» определить, сближены ли остатки Cys эндонуклеазного домена бактериальных белков MutL с ДНК. В связи с тем, что rsMutL не связывается даже с 76-звенными ДНК-дуплексами (раздел IV.2.3), для решения поставленной задачи мы использовали ngMutL.

ngMutL содержит остатки Cys в положениях 171, 251, 528, 604, 635. Три последних остатка Cys расположены в С-концевом домене ngMutL и два из них (Cys604 и Cys635) входят в состав консервативных мотивов, составляющих каталитический центр белка (мотивы [A/S]CK и C[P/N]HGRP). Ранее продемонстрировано, что эти остатки Cys являются необходимыми для функционирования системы MMR. Так, в случае MutL α , ngMutL-CTD и ttMutL показано, что замена даже одного из двух консервативных Cys на Ser или Ala, соответственно, приводит к «выключению» MMR *in vivo* [77,202].

Для проведения ковалентного связывания ngMutL с ДНК были использованы дуплексы pyrSS-*Ls*-ДНК, pyrSS-*Lm*-ДНК и pyrSS-*Ll*-ДНК (схема 4). «Кросслинкинг» ngMutL с модифицированными ДНК, содержащими пиридилдисульфидную группу, проводили аналогично с ecMutL [192]. Гидролиз 59-звенных ДНК-дуплексов в данных условиях не наблюдали (данные не приведены). Анализ продуктов «кросслинкинга» проводили в 8%-ном ПААГ, содержащем ДСН (рис. 47).

В качестве положительного контроля, показывающего функциональную активность ДНК-реактива, использовали мутантную форму ecMutL(A251C). В случае ngMutL зафиксировано появление конъюгатов белка с pyrSS-*Ls*-ДНК, pyrSS-*Lm*-ДНК и pyrSS-*Ll*-ДНК с молекулярной массой около 130 кДа. Обнаружено, что выход ДНК-белкового конъюгата повышается с увеличением длины линкера между реакционной группой и ДНК. Наибольший выход продукта реакции ковалентного связывания ngMutL был достигнут при использовании ДНК с линкером *Ll*. Таким образом, показано, что остатки Cys белка ngMutL могут находиться на расстоянии примерно 18-50 Å от ДНК.

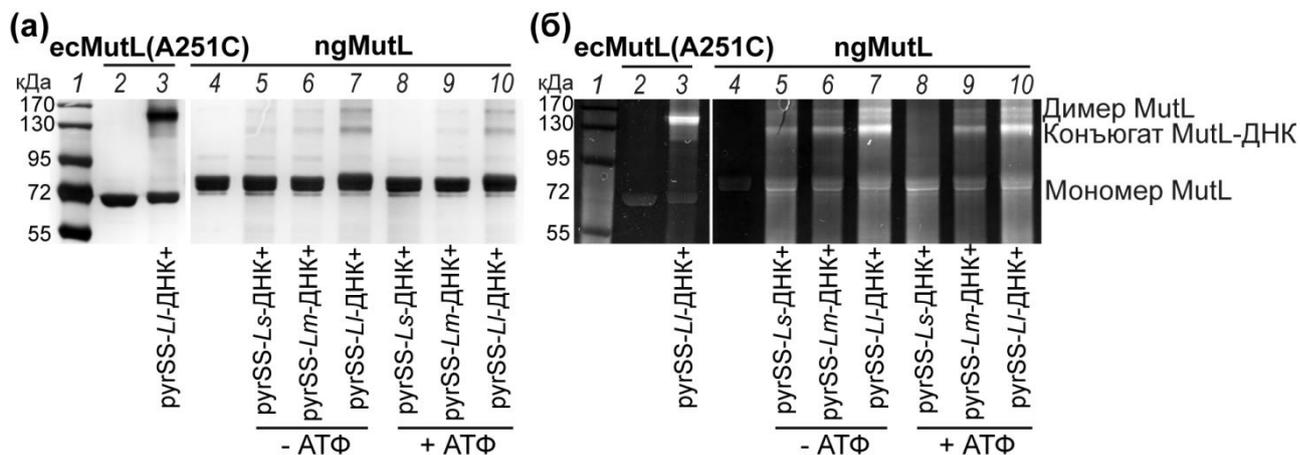


Рис. 47. Анализ продуктов ковалентного связывания ecMutL(A251C) (4 мкМ) с pyrSS-Ll-ДНК (1 мкМ, дорожка 3) и ngMutL (4 мкМ) с pyrSS-Ls-ДНК, pyrSS-Lm-ДНК, pyrSS-Ll-ДНК (1 мкМ, дорожки 5-10, дуплексы указаны под дорожками геля). Дорожки 5-7 – «кросслинкинг» ngMutL с pyrSS-Ls-ДНК, pyrSS-Lm-ДНК или pyrSS-Ll-ДНК, соответственно, проводили в отсутствие нуклеотидных кофакторов, дорожки 8-10 – в присутствии 1 мМ АТФ. Условия реакции: 15 мин, 0°C. Приведены фотографии электрофоретического разделения реакционных смесей в 8%-ном ПААГ, содержащем ДСН. Один и тот же гель окрашивали бромидом этидия (б) и затем раствором солей серебра (а). Дорожки 2 и 4 – исходные белки ecMutL(A251C) и ngMutL, соответственно. Дорожки 1 – маркер молекулярной массы белков, кДа.

IV.4.2.1. Влияние АТФ на «кросслинкинг» ngMutL с модифицированными ДНК

Следующим этапом работы стала оценка влияния АТФ на образование конъюгатов ngMutL-ДНК. Ранее показано, что наличие АТФ в реакционной смеси ингибирует эндонуклеазную активность ngMutL (см. раздел IV.2.1). Мы сравнили результаты «кросслинкинга» ngMutL с пиридилдисульфидсодержащими ДНК в отсутствие и в присутствии 1 мМ АТФ. Для этого белок инкубировали при 0°C с АТФ или без него в течение 10 мин и затем добавляли модифицированные ДНК. Как видно из рис. 48, АТФ влияет на взаимодействие белка с ДНК: выходы конъюгатов ngMutL с pyrSS-Lm-ДНК и pyrSS-Ll-ДНК незначительно снижаются, а в случае pyrSS-Ls-ДНК образование конъюгата не наблюдается. В контрольном эксперименте наличие в реакционной смеси АДФ, не вызывающего конформационных перестроек ecMutL [180], не оказало значимого влияния на образование белково-нуклеинового конъюгата (рис. 48). Ранее нами было показано, что эффективность «кросслинкинга» остатков Cys, введенных в локализованный в N-концевом домене ДНК-связывающий центр ecMutL, не зависела от концентрации АТФ в реакционной смеси [192]. Напомним, что ecMutL не обладает эндонуклеазной функцией. Исходя из этого, можно предположить, что понижение выходов продуктов реакции «кросслинкинга» между ngMutL и пиридилдисульфидсодержащими ДНК в присутствии АТФ связано с изменением локализации относительно ДНК остатков Cys именно эндонуклеазного домена (увеличением расстояния между ними) в процессе конформационной перестройки белка. Действительно, присутствие

АТФ (в отличие от АДФ) в реакционной смеси снижало эффективность модификации остатков Cys С-концевого эндонуклеазного домена ttMutL гидрохлоридом гуанидина. По мнению Фукуи и соавт. [77], это свидетельствует о существенных конформационных изменениях белка, вызванных взаимодействием с АТФ. Интересно, что в присутствии негидролизуемого аналога АТФ – АТФ γ S образование конъюгата ngMutL-ДНК не наблюдалось. Вероятно, гидролиз АТФ является необходимым условием взаимодействия остатков Cys эндонуклеазного домена с ДНК. С другой стороны, показано, что АТФ и особенно его аналог АМРРNP снижают эффективность связывания ttMutL с двуцепочечной ДНК, что также может быть причиной уменьшения выхода ДНК-белковых конъюгатов [77].

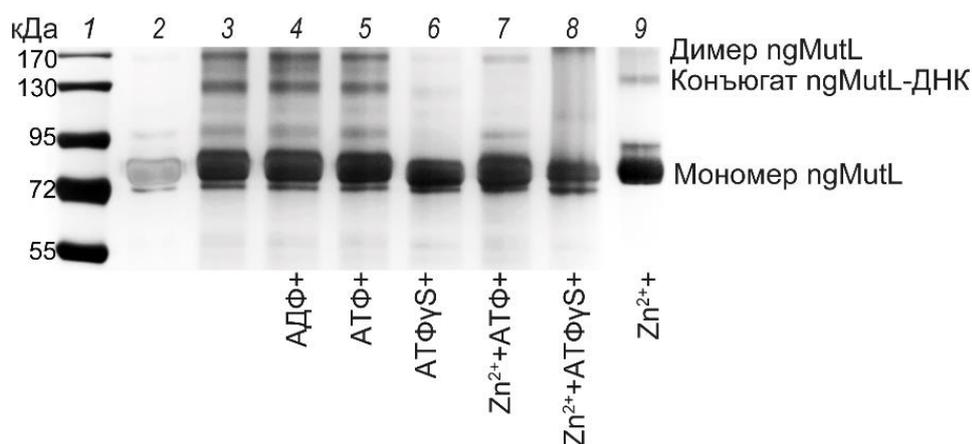


Рис. 48. Анализ продуктов ковалентного связывания ngMutL (4 мкМ) с purSS-L1-ДНК (1 мкМ) методом электрофореза в 8%-ном ПААГ, содержащем ДСН (дорожка 3). Гель окрашен солями серебра. Дорожка 1 – маркер молекулярной массы белков, кДа; дорожка 2 – исходный белок. Дорожки 4-6 соответствуют реакционным смесям, содержащим кроме ngMutL и purSS-L1-ДНК один из нуклеотидных кофакторов (1 мМ): АДФ, АТФ, АТФ γ S соответственно. Дорожка 9 - анализ продуктов ковалентного связывания ngMutL с purSS-L1-ДНК в присутствии 1 мМ ZnCl₂; дорожка 7 – в присутствии 1 мМ ZnCl₂ и 1 мМ АТФ; дорожка 8 – в присутствии 1 мМ ZnCl₂ и 1 мМ АТФ γ S. Условия реакции: 15 мин, 0°C.

IV.4.2.2. Влияние ионов цинка на «кросслинкинг» ngMutL с модифицированными ДНК

Полагают, что замена консервативного Cys635 из мотива XV на Ser в ngMutL и связанная с этим инактивация системы MMR в бактерии *N. gonorrhoeae* обусловлена потерей способности ngMutL координировать ионы Zn²⁺, что подтверждается также в случае эукариотических аналогов MutL [202]. Очевидно, что если остатки Cys С-концевого домена ngMutL взаимодействуют с ионами Zn²⁺, то они должны быть недоступны или менее доступны для модификации ДНК-реагентами в присутствии хлорида цинка. Исходя из этого, важным экспериментом являлось проведение «кросслинкинга» с ДНК в присутствии 1 мМ Zn²⁺. Перед проведением реакции белок инкубировали с ZnCl₂ (5 мин, 4°C), чтобы добиться максимального связывания ионов металла с белком. Показано, что в присутствии 1 мМ ZnCl₂ конъюгат ngMutL с purSS-L1-ДНК образуется с меньшей эффективностью по сравнению с выходом продукта реакции в отсутствие ионов Zn²⁺. При одновременном добавлении в реакционную смесь АТФ и ZnCl₂ в концентрации 1 мМ «кросслинкинг» между

реакционноспособной ДНК и белком практически отсутствует (рис. 49). Таким образом, ионы цинка не только ингибируют эндонуклеазную функцию ngMutL (см. раздел IV.2.1), но и уменьшают выход продукта «кросслинкинга». Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что в модификации ngMutL пиридилдисульфидсодержащими ДНК участвуют остатки Cys604 и/или Cys635 консервативных мотивов [A/S]C \underline{C} K и C[P/N]HGRP ngMutL.

IV.5. Положение ДНК в комплексе с MutS из *E. coli* на начальных стадиях репарации «мисматчей»

Несмотря на накопленные данные, касающиеся структуры и функций белков MutS, многие детали его функционирования до сих пор уточняются. Из-за высокой конформационной подвижности MutS при его взаимодействии с АТФ, не удается закристаллизовать активированный комплекс MutS-ДНК. Были предприняты попытки получить данную структуру с помощью пропитывания раствором АТФ кристаллов комплекса есMutS-ДНК [124], однако в результате были зафиксированы только небольшие перестройки в белке по сравнению со структурой комплекса в присутствии АДФ. Не так давно получена структура комплекса есMutS, ковалентно связанного с N-концевым доменом есMutL [12]. В этой структуре видны кардинальные изменения в есMutS при его взаимодействии с АТФ, при этом детектировать ДНК в таком комплексе не удалось [12]. В этой работе также предполагается, что ДНК, взаимодействующая первоначально с доменом «зажим» есMutS, опускается в полость, формирующуюся при переходе белка в активную конформацию в присутствии АТФ (рис. 49), размеры которой составляют ~35 Å (диаметр двойной спирали ДНК 20 Å).

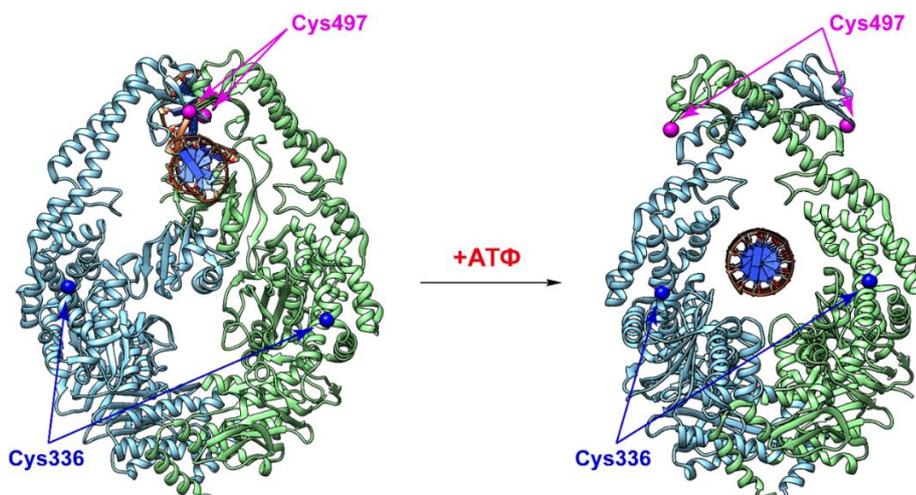


Рис. 49. Схема конформационных перестроек в комплексе есMutS-ДНК при связывании АТФ. Предложено на основе кристаллических структур комплексов есMutS-ДНК и есMutS-есMutL (PDB: 1E3M и 5AKB).

Для проверки этой гипотезы нами использован метод «кросслинкинга» с участием 59-звенных pyrSS-*Ls*-ДНК, pyrSS-*Lm*-ДНК и pyrSS-*Ll*-ДНК, содержащих модифицированный dU

в 8-ом положении от пары G/T (схема 4, раздел IV.4.1), и двух моноцистеиновых форм *esMutS(N497C)* и *esMutS(A336C)* (см. раздел IV.1.1). Согласно данным PCA Asn497 белка *esMutS* контактирует с фосфатной группой между 7 и 8 нуклеотидом от «мисматча» [55]. Из модели комплекса *esMutS* с ДНК, предложенной в работе [12], следует, что нуклеиновая кислота сближается с Ala336 в результате конформационных перестроек в белке при его переходе в активную конформацию.

Исследовано ковалентное связывание *esMutS(N497C)* и *esMutS(A336C)* с ДНК-дуплексами, содержащими *pyrSS* группу на линкерах различной длины (схема 4). Реакционные смеси, содержащие мутантные формы *esMutS* и модифицированную ДНК, анализировали с помощью электрофореза в геле, содержащем ДСН. Пример анализа результатов «кросслинкинга» варианта *esMutS(N497C)* с различными ДНК-дуплексами представлен на рис. 50. Белок *esMutS*, также как и *esMutL*, функционирует как гомодимер, однако в реакцию с ДНК может вступить только одна из субъединиц. При анализе в денатурирующих условиях димер белка в получившемся конъюгате разрушается, образуя одну свободную субъединицу и вторую, «сшитую» с ДНК (рис. 49). В контрольном эксперименте гомодимер *esWTMutS*, имеющий в своем составе 12 остатков Cys, не формировал конъюгатов с дуплексами, содержащими пиридилдисульфидную группу (данные не приведены).

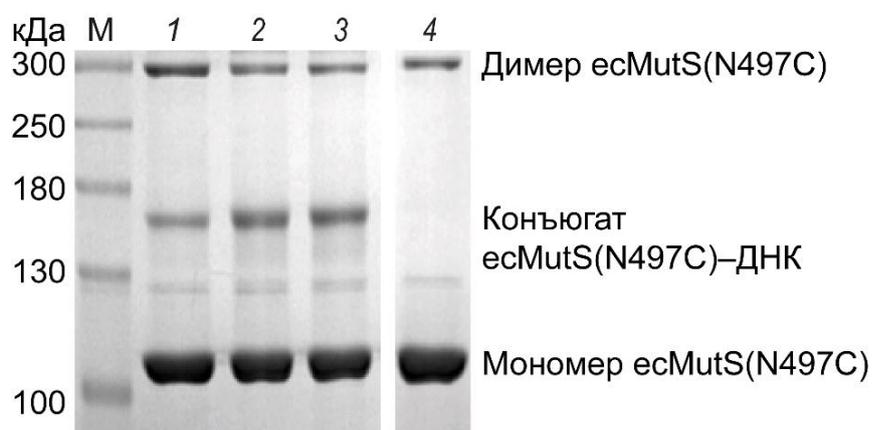


Рис. 50. Анализ в 6%-ном ПААГ, содержащем ДСН, продуктов ковалентного связывания *esMutS(N497C)* с модифицированными дуплексами (1 мкМ). Концентрация белка составляла 4 мкМ на мономер. Дорожки 1-3 – «кросслинкинг» *esMutS(N497C)* с *pyrSS-Ls*-ДНК, *pyrSS-Lm*-ДНК и *pyrSS-Ll*-ДНК соответственно. Все реакции проводились в присутствии 1 мМ АТФ при 37°C. Дорожка 4 – исходный белок *esMutS(N497C)*. Дорожка М – маркер молекулярной массы белков, кДа.

Соотношение функционально активного димера *esMutS* к ДНК было выбрано 2 : 1, что позволяет всей ДНК вступить в реакцию с белком и повысить выход ковалентно связанного дуплекса до количественного. При дальнейшем увеличении количества белка выход продукта не изменялся. Также исследовано влияние температуры на протекание реакции (0°C и 37°C).

Показано, что при 0°C выход продукта несколько выше, чем при 37°C, по-видимому, из-за постепенной потери активности *esMutS*.

Как видно из результатов, представленных на рис. 50, длина линкера между реакционноспособной группой и гетероциклическим основанием в ДНК оказывает влияние на выход конъюгатов с *esMutS(N497C)*: *purSS-Ls*-ДНК образует конъюгаты менее эффективно, чем *purSS-Lm*-ДНК и *purSS-Ll*-ДНК (~ 60 % по сравнению с < 90%). Возможно, что такое различие в эффективности реакции связано с тем, что модификация локализована в гетероциклическом основании, а контакты аминокислоты в положении 497 белка осуществляются с углеводофосфатным остовом, и длина линкера *Ls* оказывается недостаточной для эффективного протекания реакции.

В геле также наблюдалась зона, соответствующая димеру *esMutS* (рис. 50). Эта зона исчезает при добавлении различных восстановителей (меркаптоэтанол, ДТТ и т.д.). Учитывая, что белок взят в небольшом избытке по отношению к ДНК, формирование ковалентного димера белка никак не сказывается на выходе реакции.

Также проверено влияние АТФ (0, 10, 100 и 1000 мкМ) и АДФ (1000 мкМ) на выход продукта «кросслинкинга». Установлено, что *esMutS(N497C)* образует конъюгаты с реакционноспособными ДНК независимо от наличия нуклеотидного кофактора, его природы или концентрации (рис. 51).

Для *esMutS(A336C)* наблюдается принципиально другая картина зависимости образования конъюгата от наличия нуклеотидных кофакторов. Так, в отсутствие нуклеотидных кофакторов и при добавлении 1 мМ АДФ белок *esMutS(A336C)* не образует ковалентно связанный комплекс (рис. 51). Формирование конъюгата в этом случае зависит от концентрации АТФ в реакционной смеси. В присутствии 10 мкМ АТФ выход продукта в реакции «кросслинкинга» достаточно низкий (~30 %); при повышении концентрации АТФ до 100 и 1000 мкМ он значительно увеличивается (~90 %, соответственно). Такой результат однозначно свидетельствует о том, что ДНК действительно меняет свое положение в комплексе с *esMutS* после связывания последним АТФ. Позиция 336, недоступная для модификации реакционноспособной ДНК в отсутствие АТФ, становится сближенной с ДНК после конформационных перестроек, связанных с переходом белка в активное состояние. Длина линкера в реакционноспособной ДНК оказывает влияние на выход конъюгатов с *esMutS(A336C)* аналогично *esMutS(N497C)*: ДНК с коротким линкером взаимодействует с белком хуже, чем ДНК с более протяженным линкером. В этом случае это связано с тем, что позиция 336 находится не в ДНК-связывающей области белка и, возможно, *purSS-Ls*-ДНК имеет неоптимальную длину линкера для эффективного взаимодействия с белком.

Таким образом, полученные нами данные подтверждают гипотезу, выдвинутую авторами [12]: ДНК, после узнавания *ecMutS* «мисматча» меняет свое положение и размещается внутри белковой глобулы в обширной полости, которая образуется при взаимодействии белка с АТФ.

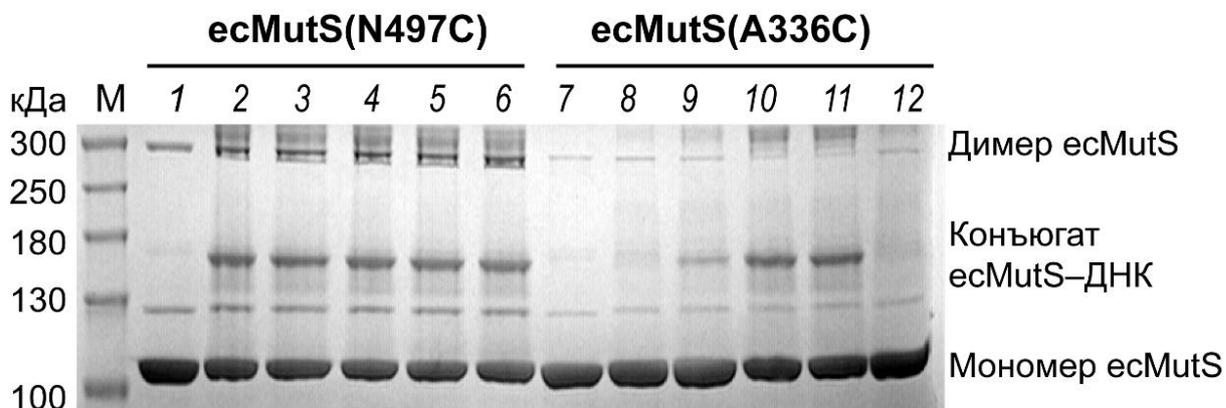


Рис. 51. Анализ продуктов ковалентного связывания *ecMutS(N497C)* и *ecMutS(A336C)* с дуплексом *rutSS-Lm*-ДНК. Дорожки 3-6 и 9-12 – «кросслинкинг» *ecMutS(N497C)* и *ecMutS(A336C)* в присутствии 10 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ АТФ и 1 мМ АДФ, соответственно. Дорожки 1 и 7 – исходные белки *ecMutS(N497C)* и *ecMutS(A336C)*, соответственно. Дорожки 2 и 8 – «кросслинкинг» *ecMutS(N497C)* и *ecMutS(A336C)*, соответственно, в отсутствие нуклеотидных кофакторов. Дорожка М – маркер молекулярной массы белков, кДа.

IV.6. Применение метода «кросслинкинга» для изучения особенностей взаимодействия белков *MutS* и *MutL* из *E. coli*

Наиболее спорным вопросом в механизме MMR является то, каким образом сигнал о наличии «мисматча» передается к месту гидролиза ДНК, которое может находиться достаточно далеко от «ошибки» в ДНК (до 2000 п.н.) [9]. В результате многолетних попыток ответить на этот вопрос, было сформулировано несколько моделей, каждая из которых имеет свое экспериментальное подтверждение (см. Обзор литературы, раздел II.2). Исследования данного процесса затруднены из-за динамической структуры белковых комплексов, вовлеченных в процесс репарации. В данном исследовании был зафиксирован белок *ecMutS* на ДНК и изучена способность подобных конъюгатов взаимодействовать с *ecMutL*. Фактически мы использовали сочетание метода «кросслинкинга» и FRET для ответа на вопрос, насколько необходимо движение *ecMutS* по ДНК для «привлечения» белка *ecMutL* к комплексу *ecMutS*-ДНК.

Стратегия эксперимента, предложенного в данной работе, представлена на схеме 6. К конъюгату *ecMutS*-ДНК добавляется Sytox Blue – интеркалирующий краситель, флуоресценция которого при взаимодействии с ДНК увеличивается. Далее добавляется белок *ecMutL*, модифицированный флуорофором Alexa-594, который составляет FRET-пару с Sytox

Blue. В отсутствие АТФ есMutS не может принимать активную конформацию. При добавлении АТФ в структуре есMutS происходят конформационные перестройки, вследствие которых в белке формируется поверхность, необходимая для связывания есMutL и эффективного образования комплекса есMutS-ДНК-есMutL [12]. В результате происходит сближение флуорофора в есMutL с флуоресцентно меченной ДНК, что приводит к увеличению сигнала FRET. Таким образом, если описанный эффект будет наблюдаться экспериментально, он будет свидетельствовать о том, что есMutS в закреплённом на ДНК состоянии способствует образованию тройного комплекса есMutS-ДНК-есMutL.

Для реализации предложенного эксперимента необходимо выполнение следующих этапов: получение в препаративных количествах и выделение ковалентно связанного комплекса есMutS-ДНК, в котором белок остается в димерной форме; проверка активности белка в полученном конъюгате по способности связывать и гидролизовать АТФ; получение флуоресцентно меченного Alexa-594 функционально активного варианта есMutL, оценка возможности взаимодействия конъюгата есMutS-ДНК с есMutL.

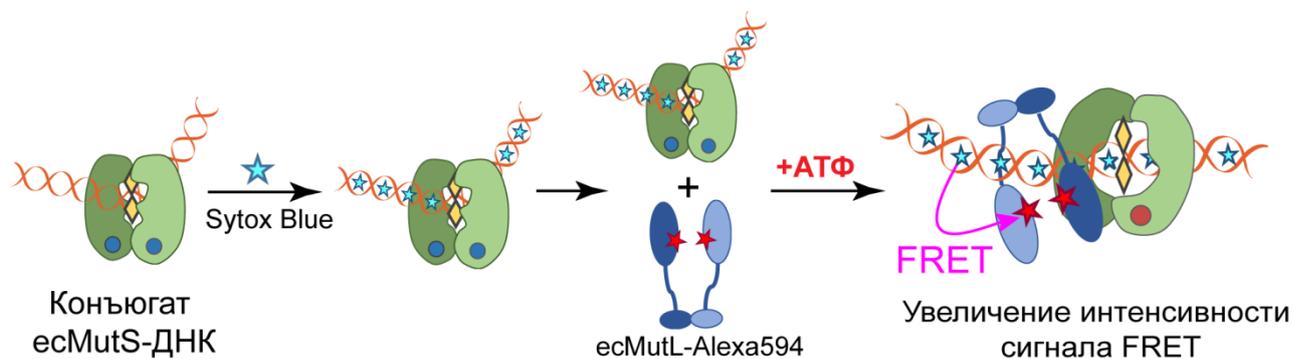


Схема 6

IV.6.1. Получение в препаративных количествах и выделение конъюгатов есMutS-ДНК⁷

Для выполнения описанного эксперимента требовалась очистка конъюгата есMutS-ДНК от непрореагировавших белка и нуклеиновой кислоты. В связи с этим объем реакционной смеси был увеличен до 600 мкл, при этом концентрации реагентов использовались те же, что были описаны выше (1 мкМ ДНК, 4 мкМ есMutS в расчете на мономер). Реакционные смеси инкубировали 30 мин при 0°C. Получено 6 вариантов конъюгатов ДНК, содержащих пиридилдисульфидную группу на линкерах различной длины, с есMutS(N497C) и есMutS(A336C), которые далее использовали для проверки способности закрепленного есMutS формировать комплекс с белком есMutL (схема 7, конъюгаты 1-3, 5-7). Два конъюгата (4 и 8) содержали флуоресцентные метки Atto-488 и Alexa-594 в ДНК. Благодаря наличию двух меток в данных конъюгатах удобно наблюдать за конформационными изменениями в

⁷ При подготовке данного раздела диссертации использована публикация [239].

ДНК, что дает дополнительную возможность оценить активность есMutS в полученных ковалентно связанных комплексах.

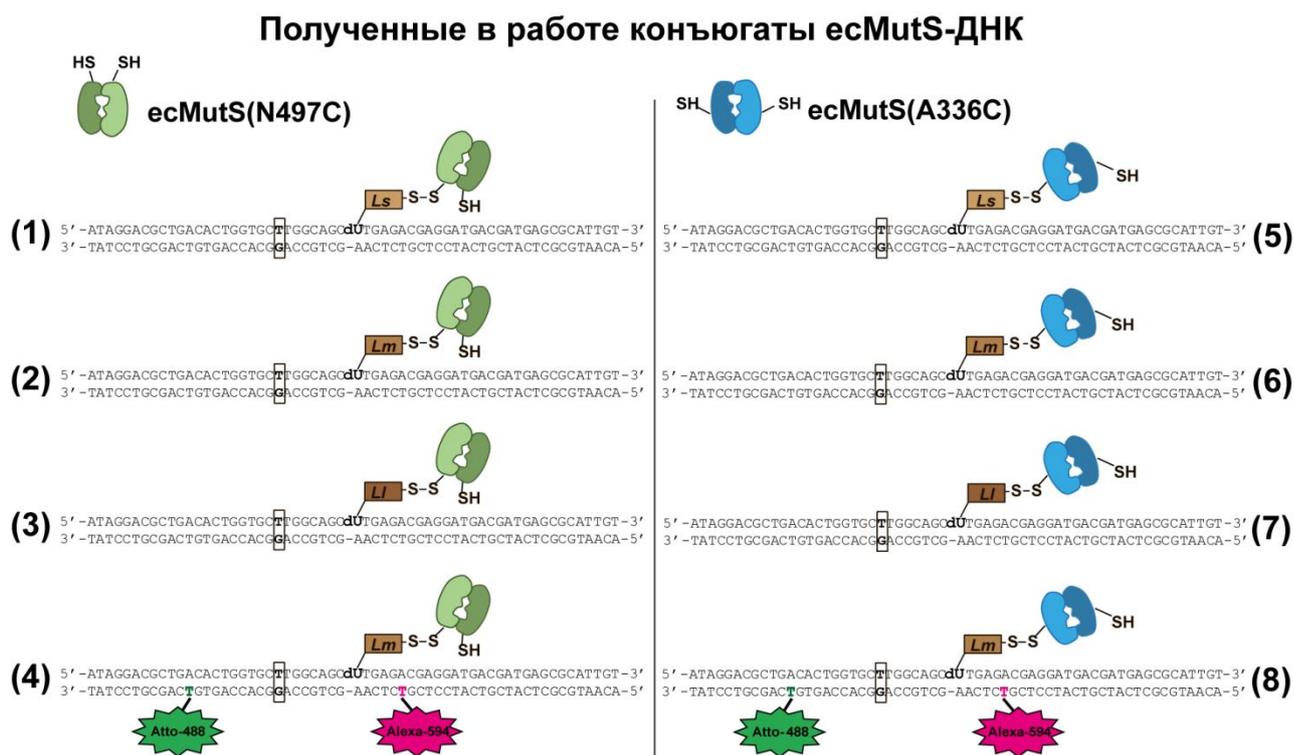


Схема 7

Для получения функционально активного «сшитого» комплекса есMutS-ДНК необходимо было подобрать условия очистки, при которых сохранялись свойства компонентов: гомодимерная структура есMutS; ДНК-связывающая и АТФазная активности есMutS; двуспиральная структура ДНК.

Ранее в нашей лаборатории уже были предприняты попытки выделения конъюгатов белков есMutS(N497C) и есMutS(A469C) с ДНК методами эксклюзионной и аффинной хроматографии [25]. Однако при выделении конъюгата первым методом не удалось полностью отделиться от непрореагировавшей ДНК; вторым – от непрореагировавшего белка. Присутствие примесей может привести к неправильной интерпретации результатов. Таким образом, перед нами стояла задача оптимизации метода выделения конъюгатов есMutS с ДНК. Мы предложили использовать для этой цели метод анионообменной хроматографии. Так как ДНК - полианион, то предполагалось, что при увеличении концентрации хлорида калия продукты реакции будут элюироваться с сорбента в следующем порядке: непрореагировавший белок, конъюгат есMutS-ДНК, непрореагировавшая ДНК. Разработанная нами методика очистки конъюгата есMutS(N497C)-ДНК представлена в публикации [239].

Были протестированы две колонки серии HiTrap с сорбентами Capto Q и Q HP («GE Healthcare», США). Оба сорбента являются сильными анионообменниками с четвертичными аминами, привитыми на поверхности агарозы разной степени «сшивки». Мы не обнаружили разницы в свойствах этих сорбентов для решения нашей задачи и далее использовали колонку Q HP (1 мл). Предварительно было проведено хроматографическое разделение отдельно белка MutS, немодифицированного ДНК-дуплекса, одноцепочечной ДНК, а также реакционной смеси, содержащей ДНК-белковый конъюгат. Использовали линейный градиент KCl (100-1000 мМ за 10 мин) (данные не приведены). Учитывая полученные значения времен удерживания (t_R), далее для разделения использовали ступенчатый градиент.

Все буферные растворы, используемые при выделении конъюгатов, содержали 10%-ный глицерин, который необходим для сохранения активности есMutS в процессе замораживания в жидком азоте при хранении образцов белка. В контрольном эксперименте проводили хроматографию реакционной смеси, содержащей ДНК-белковый конъюгат, с использованием буфера без глицерина. Показано отсутствие влияния 10%-ного глицерина в элюенте на эффективность хроматографического разделения.

Перед нанесением образца колонка уравнивалась буфером, содержащим 500 мМ KCl. После нанесения образца колонку промывали 20 мин при скорости потока 0,5 мл/мин буфером того же состава для того, чтобы убедиться, что неудерживаемые на колонке компоненты полностью удалились с поверхности сорбента. На этой стадии на хроматограмме (рис. 52) наблюдается большой пик (время удерживания 3-5 мин), который соответствует непрореагировавшему есMutS, нереакционноспособному димеру белка, а также АТФ и АДФ. Сорбент промывали в течение 15 мин буфером, содержащим 650 мМ KCl для выделения целевого ДНК-белкового конъюгата. Далее концентрацию KCl увеличивали до 750 мМ и сохраняли постоянной в течение 10 мин. При этом на хроматограмме наблюдался пик, соответствующий ДНК. Фракции, соответствующие каждому пику, анализировали в 6%-ном ПААГ, содержащем ДСН.

Метод разделения первоначально был отработан для конъюгатов **1-3** и **5-7**, представляющих немеченые ДНК, «сшитые» с есMutS. Процесс разделения в этом случае контролировали по оптической плотности раствора при двух длинах волн (260 нм для ДНК и 280 нм для белка; рис. 52). После подбора условий мы приступили к выделению конъюгатов **4** и **8**, в которых ДНК-дуплексы содержали две флуоресцентные метки (Atto-488 и Alexa-594). За процессом разделения в этом случае наблюдали при четырех длинах волн (260 нм, 280 нм, 490 нм для Atto-488 и 590 нм для Alexa-594; рис. 53). Анализ полученных фракций методом гель-электрофореза, представлен на рис. 53в.

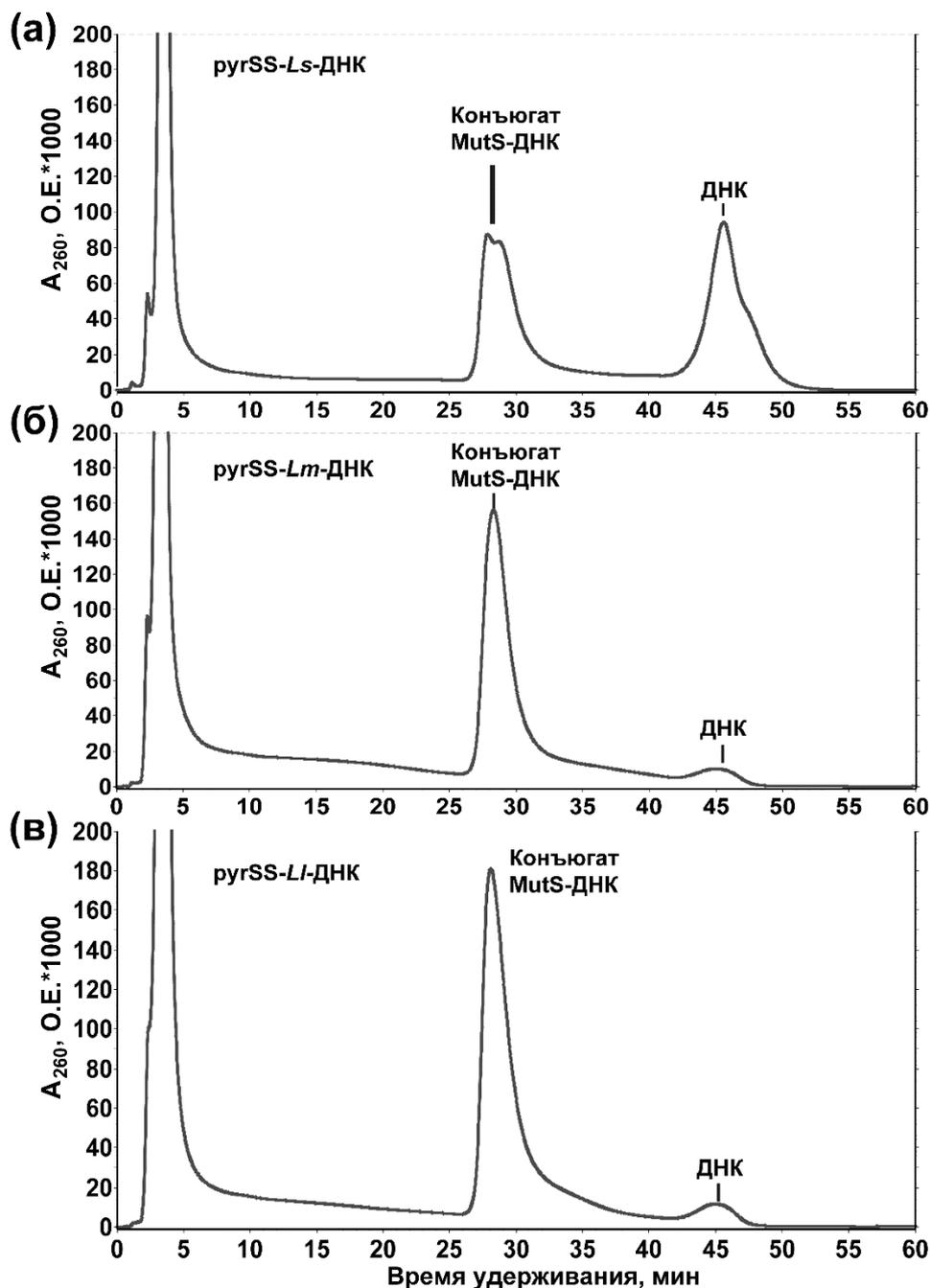


Рис. 52. Разделение реакционных смесей, содержащих конъюгаты есMutS(N497C) с различными немечеными ДНК-дуплексами, методом ионообменной хроматографии с детекцией при 260 нм. **(а)** Конъюгат № 1. Время удерживания составляет $28,2 \pm 0,4$ мин для конъюгата и $46,0 \pm 0,6$ мин для свободной ДНК. Выход конъюгата $51 \pm 6\%$. **(б)** Конъюгат № 2. Время удерживания составляет $28,3 \pm 0,4$ мин для конъюгата и $45,0 \pm 0,3$ мин для свободной ДНК. Выход конъюгата $94 \pm 1\%$. **(в)** Конъюгат № 3. Время удерживания составляет $28,6 \pm 0,4$ мин для конъюгата и $44,9 \pm 0,2$ мин для свободной ДНК. Выход конъюгата $95 \pm 2\%$.

Выделение конъюгатов **1-3** и **5-7** есMutS(N497C) и есMutS(A336C) с каждым типом модифицированной ДНК повторяли трижды. Эффективность образования ковалентно связанного комплекса оценивали как соотношение площадей пиков на хроматограмме, соответствующих «сшитой» с белком и «свободной» ДНК. Она составляла 20-50% в случае pyrSS-Ls-ДНК, в то время как для других дуплексов - более 90% (табл. 10).

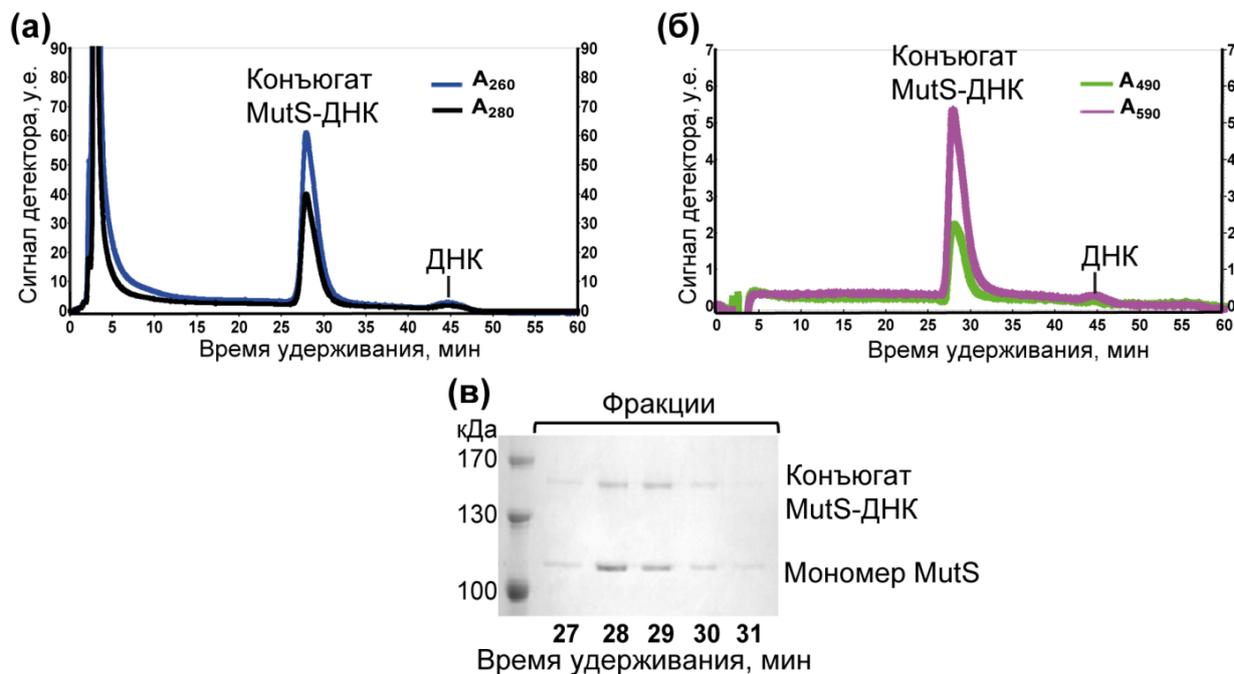


Рис. 53. Разделение реакционной смеси, содержащей конъюгат MutS(N497C) с pyrSS-*Lm*-ДНК (конъюгат **4**) с двумя флуоресцентными метками, методом ионообменной хроматографии с детектированием при четырех длинах волн (260 и 280 нм на панели **(а)**, 490 и 590 нм на панели **(б)**). Время удерживания составляет $28,3 \pm 0,4$ мин для конъюгата и $45,0 \pm 0,3$ мин для свободной ДНК. Выход конъюгата $94 \pm 1\%$. **(в)** Анализ элюированных фракций с помощью 6%-ного ПААГ, содержащего ДСН.

Таким образом, нами впервые в гомогенном состоянии были получены конъюгаты двух мутантных форм есMutS(N497C) и есMutS(A336C) с различными ДНК-дуплексами (pyrSS-*Ls*-ДНК, pyrSS-*Lm*-ДНК и pyrSS-*Ll*-ДНК). Для оценки концентрации немеченных ДНК-белковых конъюгатов (**1-3** и **5-7**) записывали спектры поглощения при 260 нм. Их сравнивали со спектром исходного ДНК-дуплекса в фиксированной концентрации. Такой подход позволил только примерно определить концентрации конъюгата, поскольку белковый компонент комплекса вносил дополнительное поглощение при 260 нм. Для флуоресцентно меченных конъюгатов измеряли флуоресценцию флуорофора Alexa-594 после его прямого возбуждения при длине волны 590 нм. Его сравнивали с сигналом, полученным от исходного ДНК-дуплекса, содержащего два флуорофора, в фиксированной концентрации. Все фракции конъюгатов замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C .

Важно отметить, что ни варьирование длины линкера, содержащего пиридилдисульфидную группировку, ни использование флуоресцентно меченной ДНК не оказало значительного влияния на время удерживания конъюгата есMutS-ДНК в ходе хроматографического разделения (отличия в t_R для конъюгатов **1-8** не превышало 2%), что согласуется с принципом анионообменной хроматографии, в данном случае основанном на взаимодействии сорбента с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК. Таким образом, мы считаем разработанный протокол универсальным для очистки конъюгатов разных мутантных форм есMutS с ДНК-дуплексами одинаковой длины, несущими

рассматриваемые модификации в гетероциклических основаниях. Однако следует помнить, что время удерживания зависит от количества фосфатных групп в ДНК, поэтому для конъюгата есMutS с ДНК другой длины предложенный нами протокол потребует изменений в ступенчатом градиенте KCl. Общая схема протокола может быть полезна также для получения ковалентно связанных комплексов ДНК с различными белками. Недостатком этого протокола является использование высоких концентраций KCl в элюенте. Однако, как будет показано далее, используемые нами мутантные формы есMutS сохраняют свою активность в таких условиях.

Таблица 10. Выходы конъюгатов есMutS-ДНК.

Номер конъюгата	Выходы, %
1	48,2±2,5
2	93,7±1,0
3	94,9±1,9
5	21,9±3,0
6	93,3±1,6
7	96,3±0,9

IV.6.2. Проверка способности белка в конъюгатах есMutS-ДНК изменять конформацию ДНК

Следующим этапом работы стала проверка функциональной активности мутантных форм есMutS(N497C) и есMutS(A336C) в выделенных конъюгатах **4** и **8**. Как было описано выше, в присутствии АДФ есMutS узнает и связывает «мисматч»-содержащую ДНК, образуя с ней стабильный «начальный узнающий комплекс». Связывание есMutS приводит к изгибу линейного дуплекса на 60° в случае пары G/T [275]. В присутствии АТФ происходит формирование «окончательного узнающего комплекса», в котором есMutS переходит в конформацию «скользящий зажим», что сопровождается уходом белка от некомплементарной пары и распрямлением ДНК [10,151,276]. Описанные конформационные переходы ДНК-дуплекса в комплексе с есMutS можно наблюдать по изменению сигнала FRET [59,240,277].

ДНК в конъюгатах **4** и **8** содержит в своем составе FRET-пару, состоящую из флуорофоров Atto-488 (донор, максимумы $\lambda_{\text{погл}}/\lambda_{\text{исп}}$: 500/520 нм) и Alexa-594 (акцептор, максимумы $\lambda_{\text{погл}}/\lambda_{\text{исп}}$: 590/617 нм). Эти флуорофоры присоединены к C5-атому остатка тимидина через гексаметиленовые линкеры на расстоянии 10 и 12 п.н. от «мисматча» (схема 7). В работе [275] 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, образованная флуорофорами, находящимися в разных цепях в составе дуплекса позволяет следить за изменением его пространственной структуры [27,277]. В «начальном узнающем комплексе» есMutS с ДНК расстояние между флуорофорами сокращается и происходит перенос энергии. После добавления АТФ происходит разгибание ДНК, увеличение расстояния между флуорофорами и снижение сигнала FRET.

В этом исследовании FRET-пара находится в цепи дуплекса, противоположной той, в которой находится белок, «сшитый» с ДНК. Для зафиксированной на ДНК формы есMutS(N497C) (конъюгат **4**) были записаны спектры флуоресценции (рис. 54). Для количественной интерпретации изменений, наблюдающихся в спектрах конъюгата при добавлении АТФ, удобно использовать отношение $\Delta(F_{max}/D)$, где F_{max} – максимум интенсивности флуоресценции акцептора при возбуждении донора флуоресценции, D – максимум флуоресценции донора в условиях его возбуждения.

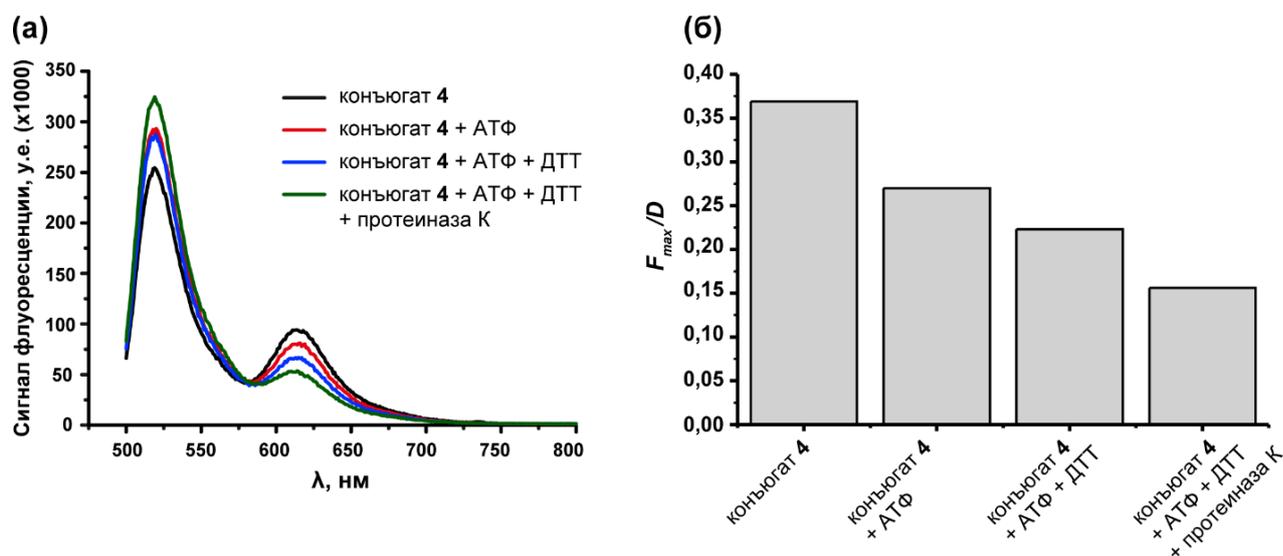


Рис. 54. Анализ функциональной активности есMutS(N497C) в составе ковалентно связанного комплекса с ругSS-Lm-ДНК (конъюгат **4**). Спектры флуоресценции (а) и изменение значений F_{max}/D (б) при добавлении 1 мМ АТФ, 10 мМ ДТТ и протеиназы К.

Как видно из полученных спектров, конъюгат **4** показывает высокий сигнал FRET (F_{max}/D составляет 0,36). При добавлении АТФ ДНК в комплексе разгибается и эффективность переноса энергии от донора к акцептору уменьшается ($\Delta(F_{max}/D) = 0,1$). Последующее добавление ДТТ разрушает дисульфидную связь в конъюгате, позволяя белку свободно «соскальзывать» с ДНК, что еще больше уменьшает сигнал FRET. $\Delta(F_{max}/D)$ по сравнению с исходным конъюгатом составляет 0,13. Протеиназа К гидролизует белковую молекулу. Таким образом, сигнал FRET, полученный после ее добавления к раствору, можно считать сигналом ДНК в отсутствие белка ($F_{max}/D = 0,16$). Полученные данные наглядно демонстрируют, что

мутантная форма *esMutS(N497C)*, зафиксированная на ДНК, сохраняет способность связывать АТФ и менять конформацию дуплекса, то есть сохраняет свою функциональную активность.

Аналогичные исследования, проведенные для ковалентно связанного комплекса *esMutS(A336C)*-ДНК, показали отсутствие изменения сигнала флуоресценции (рис. 55), то есть ДНК в конъюгате **8** не изогнута. Этот конъюгат имеет низкий сигнал FRET: значение F_{max}/D практически в 2 раза ниже, чем для конъюгата *esMutS(N497C)* с той же ДНК (0,17 по сравнению с 0,36). Сигналы FRET ковалентно связанного комплекса без АТФ и с АТФ практически не отличаются друг от друга ($\Delta(F_{max}/D) = 0,01$). В данном случае ДНК зафиксирована в коровом домене белка, что препятствует формированию контактов между «мисматчем» и *esMutS* и, соответственно, изгибу ДНК.

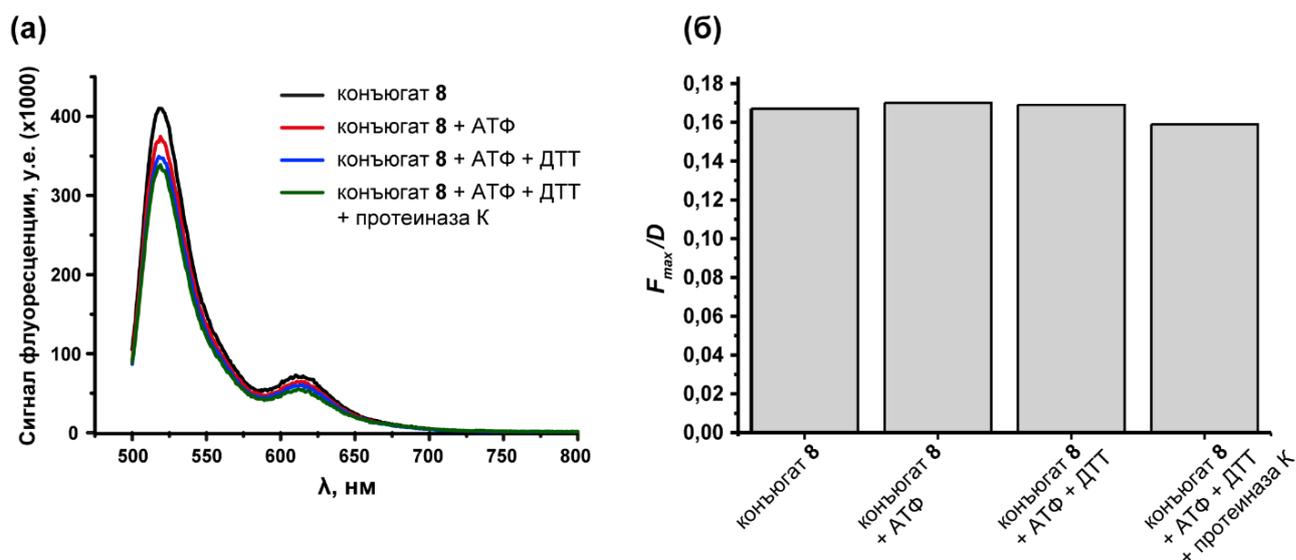


Рис. 55. Анализ функциональной активности *esMutS(A336C)* в составе ковалентно связанного комплекса с *rugSS-Lm*-ДНК (конъюгат **8**). Спектры флуоресценции при добавлении 1 мМ АТФ или 10 мМ ДТТ и в отсутствие этих реагентов.

IV.6.3. Кинетика разгибания ДНК в ковалентно связанном комплексе *esMutS*-ДНК

Изучение быстрой кинетики конформационных переходов в ковалентно связанных ДНК-белковых комплексах очень информативно в случае таких конформационно подвижных белков как *MutS*. Фиксация *esMutS* на ДНК позволяет охарактеризовать индивидуально процесс сгибания-разгибания ДНК. В «несшитом» комплексе *esMutS*-ДНК параллельно с конформационными изменениями в ДНК могут происходить движение *esMutS* по ДНК, диссоциация-ассоциация комплекса, что усложняет понимание кинетического механизма (см. Обзор литературы, раздел II.3.2).

Нами исследована быстрая кинетика разгибания ДНК в конъюгате **4** в присутствии различных концентраций АТФ (рис. 56) методом «остановленного потока» (для конъюгата **8** быстрая кинетика не исследовалась, так как в нем ДНК изначально не изогнута). Измерения проводились при 23°C. Концентрация конъюгата составляла 4 нМ, концентрация АТФ

варьировалась от 1 мкМ до 1 мМ. Показано, что скорость процесса разгибания ДНК зависит от концентрации АТФ: чем выше концентрация, тем быстрее происходит выпрямление ДНК. Эти данные согласуются с опубликованными ранее работами, где показано, что скорость образования белком «скользящего зажима» и скорость «соскальзывания» MutS с «мисматча» повышаются с увеличением концентрации АТФ [133,278].

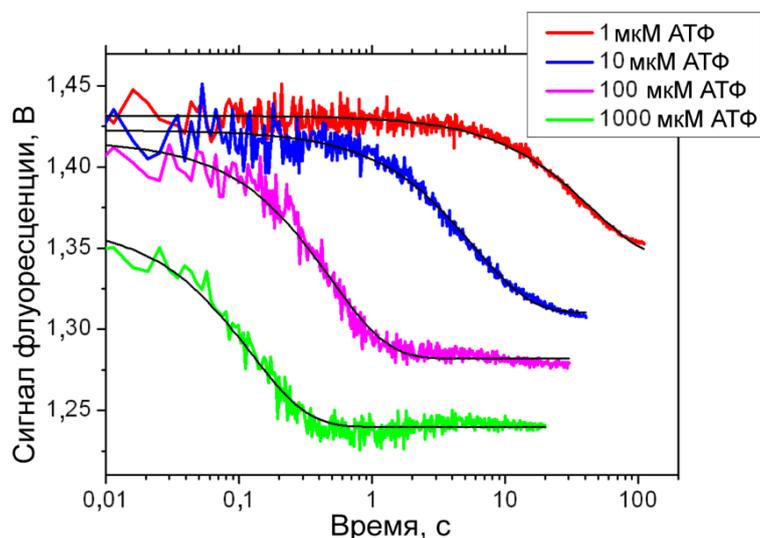


Рис. 56. Графики зависимости изменения сигнала FRET от времени для конъюгата **4** (4 нМ) в присутствии различных концентраций АТФ (1, 10, 100 и 1000 мкМ). Изменение сигнала детектировали по изменению напряжения, В – вольты.

Рассчитаны константы скорости разгибания ДНК (k_{unbend}) в конъюгате **4** при 1, 10, 100 и 1000 мкМ концентраций АТФ. Они составляют $0,023 \pm 0,001$, $0,17 \pm 0,01$, $2,1 \pm 0,1$ и $8,2 \pm 0,2$ с⁻¹ соответственно. Отметим, что при исследовании комплексов MutS из *T. aquaticus* с ДНК, содержащими 2-аминопурин или флуорофор TAMRA, авторами [155] получены константы скорости разгибания ДНК, которые составляют $1,4 - 2,8$ с⁻¹ в зависимости от выбранной ДНК. Таким образом, рассчитанные нами k_{unbend} для конъюгата есMutS(N497C)-ДНК сравнимы с k_{unbend} для «несшитого» ДНК-белкового комплекса. Этот факт подтверждает сделанный нами выше вывод о том, что ковалентно закрепленная ДНК не препятствует связыванию есMutS с АТФ и, вероятно, конформационным перестройкам белка.

IV.6.4. Проверка способности ковалентно связанного есMutS с ДНК формировать комплекс с есMutL

Согласно схеме проведения эксперимента по проверке способности ковалентно связанного с ДНК есMutS формировать комплекс с есMutL методом FRET (раздел IV.6.1.) есMutL должен содержать флуорофор – акцептор флуоресценции Alexa-594. Для этого предстояло выбрать моноцистеиновый вариант есMutL, способный реагировать с малеимидным производным флуорофора. Мы остановились на варианте есMutL(H297C), так как при связывании этого белка, модифицированного акцептором флуоресценции, с ДНК в

присутствии Sytox Blue наблюдался достаточно низкий сигнал FRET (данные не приведены). Этот результат должен позволить детектировать изменение сигнала FRET при формировании комплекса ecMutS-ecMutL-ДНК, пренебрегая увеличением флуоресценции при взаимодействии только ecMutL с ДНК.

Флуоресцентную метку в ecMutL(H297C) вводили с использованием малеимидного производного Alexa-594 («Thermo Fisher Scientific», США), взятого в 4-кратном избытке по отношению к белку. Несмотря на то, что производителем рекомендуется использовать 10-20-кратный избыток реагента, мы показали, что 4-кратного избытка вполне достаточно для количественного протекания флуоресцентного мечения (данные не приведены). Реакционную смесь выдерживали 1 ч во льду. Избыток реагента удаляли методом гель-фильтрации на колонках Zeba Spin Desalting Columns 40K MWCO («Thermo Fisher Scientific», США). За прохождением реакции и эффективностью очистки следили методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях (рис. 57). Эффективность введения метки (DOL) составляла около 80%. Препарат ecMutL(H297C)-Alexa-594 был разделен на фракции по 5 мкл и заморожен в жидком азоте.

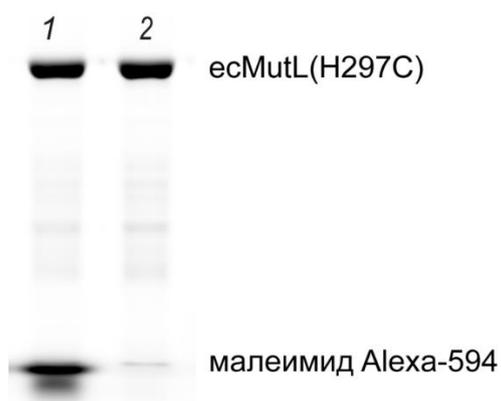


Рис. 57. Анализ реакционной смеси, содержащей ecMutL(H297C) и малеимидное производное Alexa-594. Дорожки 1 и 2 соответствуют реакционным смесям до и после гель-фильтрации.

Далее проверяли способность флуоресцентно меченного ecMutL взаимодействовать с ковалентно связанными комплексами ecMutS-ДНК (конъюгаты **1-3**, **5-7**). Для этого к конъюгату (20 нМ) последовательно добавляли Sytox Blue (6 мкМ), ecMutL(H297C)-Alexa-594 (50 нМ), АТФ (1 мМ) и ДТТ (10 мМ). На каждом этапе измеряли сигнал флуоресценции при нескольких длинах волн для донора, акцептора и FRET. Все измерения проводили при температуре 20°C, после инкубации проб 20 мин в буфере У. Ранее показано, что в этом буфере белок MutL, склонный к олигомеризации и агрегации, находится преимущественно в димерной форме (97% от всего белка) [17].

При добавлении ecMutL(H297C)-Alexa-594 в реакционную смесь, содержащую ковалентно связанные комплексы ecMutS(N497C) с ДНК (конъюгаты **1-3**) в присутствии Sytox Blue (рис. 58) сигнал FRET незначительно возрастает (F_{max}/D 0,02-0,03). После добавления

АТФ наблюдается существенный рост флуоресценции (F_{max}/D до 0,10). Этот эффект связан с формированием комплекса *ecMutS-ecMutL-ДНК*, что сближает Alexa-594 в белке с Sytox Blue в ДНК и повышает сигнал FRET (схема 6). Конъюгаты **1-3** показывали примерно одинаковую эффективность «привлечения» белка *ecMutL* за 20 мин независимо от длины линкера, на котором находилась реакционноспособная группировка. Таким образом, несмотря на то, что ДНК меняет свою локализацию в комплексе *ecMutS-ДНК* в присутствии АТФ [12], «пришивка» ДНК к Cys497 *ecMutS*, локализованному в ДНК-связывающем домене «зажим», не препятствует формированию тройного комплекса *ecMutS-ecMutL-ДНК*.

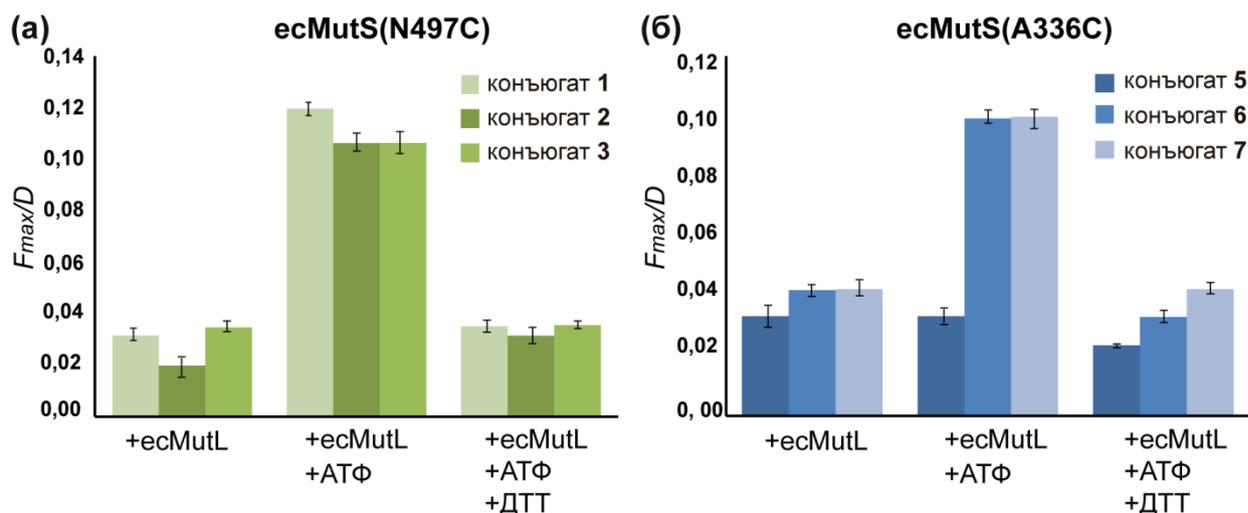


Рис. 58. Изменение относительного сигнала FRET (отношения F_{max}/D) при добавлении *ecMutL(H297C)*, АТФ и ДТТ, в реакцию смесь, содержащую Sytox Blue и конъюгаты мутантных форм *ecMutS(N497C)* (панель (а)) и *ecMutS(A336C)* (панель (б)) с *purSS-Ls-ДНК*, *purSS-Lm-ДНК* и *purSS-Ll-ДНК* (конъюгаты **1-3** и **5-7** соответственно).

В случае конъюгатов **5-7** *ecMutS(A336C)* и ДНК, содержащими пиридилдисульфидную группу, были получены другие результаты (рис. 58). При добавлении АТФ к конъюгатам **6** и **7** в присутствии Sytox Blue и *ecMutL(H297C)*-Alexa-594 наблюдался достаточно высокий сигнал FRET (F_{max}/D до 0,10), а в случае конъюгата **5** сигнал флуоресценции не увеличивается. Таким образом, несмотря на то, что после связывания АТФ белком *ecMutS* и переходом последнего в активное состояние, ДНК становится сближенной с позицией 336 (см. раздел IV.5), структура конъюгата не является оптимальной для последующего формирования комплекса *ecMutS-ecMutL*. Однако при увеличении длины линкера с 18,6 до 31,7 Å и более между ДНК и *ecMutS(A336C)* в конъюгатах **6** и **7** формирование комплекса с *ecMutL* происходит с такой же эффективностью как в случае конъюгатов **1-3** (*ecMutS(N497C)*-ДНК) при инкубации в течение 20 мин.

В контрольных экспериментах использовали незафиксированные на ДНК белки *ecMutS(N497C)* и *ecMutS(N336C)* (200 нМ). В этом случае увеличения сигнала флуоресценции практически не наблюдалось. Это связано с конформационной подвижностью белков MutS и

MutL и их «соскальзыванием» с ДНК, что снижает сигнал от сближенных флуорофоров образующегося комплекса MutS-MutL-ДНК. Такой же эффект наблюдается при добавлении восстановителя (в нашем случае ДТТ) к конъюгатам в присутствии есMutL(H297C)-Alexa-594 и АТФ (рис. 58): происходит разрушение ковалентной связи белок-ДНК и сигнал флуоресценции падает, что также свидетельствует о «соскальзывании» белков с ДНК. Если предотвратить «соскальзывание», например, «заперев» есMutL и есMutS на ДНК с помощью антител на концах молекулы (рис. 59), то наблюдается эффективный перенос энергии и увеличение сигнала (F_{max}/D около 0,11):

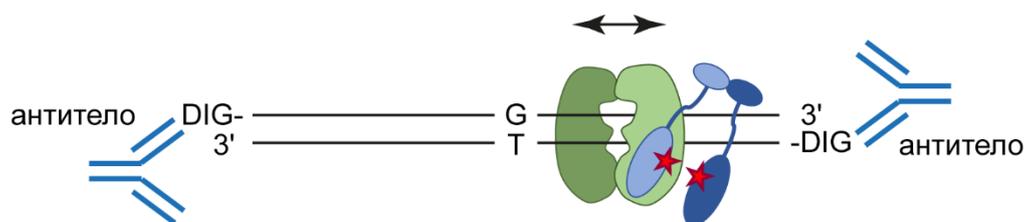


Рис. 59. Схема взаимодействия есMutS-есMutL на ДНК-дуплексе с антителами. На рисунке DIG обозначает диоксигенин. Синим схематически изображены антитела, специфически взаимодействующие с диоксигенином.

Полученные нами данные позволяют заключить, что ДНК меняет свою конформацию после взаимодействия есMutS с АТФ и располагается ближе к ДНК-связывающей области белка (домен «зажим»), что обеспечивает эффективное взаимодействие комплекса есMutS-ДНК с есMutL.

Была исследована кинетика эффективности «привлечения» есMutL(H297C)-Alexa-594 к конъюгату есMutS-ДНК. Подобрана оптимальная концентрация флуоресцентно меченного белка есMutL, равная 100 нМ (данные не приведены). Нам показалось интересным провести кинетические исследования не только при использованной выше 1 мМ концентрации АТФ, но и при концентрации 10 мкМ. Как MutS, так и MutL являются АТФазами, однако эти белки обладают разной способностью связывать и гидролизовать АТФ. Например, показано, что две субъединицы MutS из *T. aquaticus* связывают АТФ γ S с разной эффективностью ($K_{d1} \sim 1$ мкМ и $K_{d2} \sim 30$ мкМ) [140], однако константа диссоциации комплекса есMutL с негидролизуемым аналогом АТФ в несколько раз выше (90 мкМ) [58]. Считается, что при наличии уже 10 мкМ АТФ в реакционной смеси MutS способен связывать эту молекулу и переходить в активную конформацию «скользящий зажим». Дальнейшее увеличение концентрации АТФ по крайней мере до 1 мМ не оказывает влияния на этот процесс [10]. Более того, как мы показали ранее, эффективность «кросслинкинга» есMutL с реакционноспособными ДНК также не зависит от концентрации АТФ [192] и, согласно данным [58], связывание АТФ белком есMutL не требуется для формирования тройного комплекса есMutL-есMutS-ДНК. Полагают, что по-видимому, есMutL в «открытой» конформации взаимодействует со «скользящим зажимом»

esMutS и только потом связывает АТФ, чтобы перейти в «закрытую конформацию» и образовать второй скользящий зажим на ДНК [10]. Вместе с тем, согласно данным атомно-силовой микроскопии 70% эукариотического MutL α при концентрации 1 мМ АТФ находится в «закрытой» конформации в отсутствие MutS и ДНК [185]. Исходя из этого, мы предположили, что при более высокой концентрации АТФ (1 мМ) может наблюдаться более сложная кинетика взаимодействия конъюгатов esMutS-ДНК с esMutL, связанная с конформационными переходами последнего.

Данные, характеризующие взаимодействие esMutL(H297C)-Alexa-594 с конъюгатами 1-3, образованными между esMutS(N497C) и ДНК, представлены на рис. 60 и в табл. 11.

Таблица 11. Константы скорости образования комплекса с белком esMutL конъюгатов esMutS(N497C)-ДНК и esMutS(A336C)-ДНК.

Конъюгат	10 мкМ АТФ		1 мМ АТФ		
	$\Delta(F_{max}/D)$	k, c^{-1}	$\Delta(F_{max}/D)$	k_1, c^{-1}	k_2, c^{-1}
1	0,30	0,075 \pm 0,001	0,16	0,878 \pm 0,047	0,030 \pm 0,005
2	0,16	0,093 \pm 0,003	0,13	0,223 \pm 0,078	Не определена
3	0,19	0,157 \pm 0,005	0,13	1,035 \pm 0,043	0,129 \pm 0,023
5	-	-	-	-	-
6	0,18	0,027 \pm 0,001	0,15	0,044 \pm 0,004	-
7	0,21	0,034 \pm 0,001	0,12	0,095 \pm 0,007	-

В присутствии как 10 мкМ, так и 1 мМ АТФ наблюдается увеличение сигнала FRET в случае всех конъюгатов, однако эффективность формирования комплекса esMutS-esMutL-ДНК отличается в зависимости от длины линкера, на котором находится реакционноспособная группа в нуклеиновой кислоте. Так, при 10 мкМ АТФ (рис. 60) начальные скорости процесса «привлечения» esMutL отличаются и наибольшая скорость наблюдается для конъюгата 3. В тоже время, уже через 25 с после начала реакции в случае конъюгата 1 сигнал флуоресценции почти в два раза выше, чем в случае конъюгатов 2 и 3. Таким образом, фиксация ДНК в домене «зажим» белка esMutS не препятствует формированию комплекса esMutS-ДНК с esMutL. Наибольшая эффективность образования тройного комплекса наблюдается при использовании ДНК с реакционноспособной группировкой на «коротком» линкере длиной 18,6 Å.

Формирование комплекса esMutL(H297C)-Alexa-594 с конъюгатами esMutS(N497C) и ДНК в присутствии 10 мкМ АТФ характеризуется одностадийной кинетикой с выходом на плато после 20 с измерения. Константа скорости образования комплекса esMutS-esMutL-ДНК в случае конъюгата 2 ($k = 0,093\pm 0,003$) и константа скорости разгибания ДНК ($k_{unbend} = 0,17\pm 0,01$) в конъюгате 4, который отличается от конъюгата 2 только наличием флуорофоров,

сравнимы друг с другом. Это может свидетельствовать о том, что лимитирующей стадией образования тройного комплекса в нашем случае является взаимодействие *esMutS* с АТФ в конъюгате, после чего *esMutS* приобретает активную конформацию. Последующее «привлечение» *esMutL* происходит практически мгновенно.

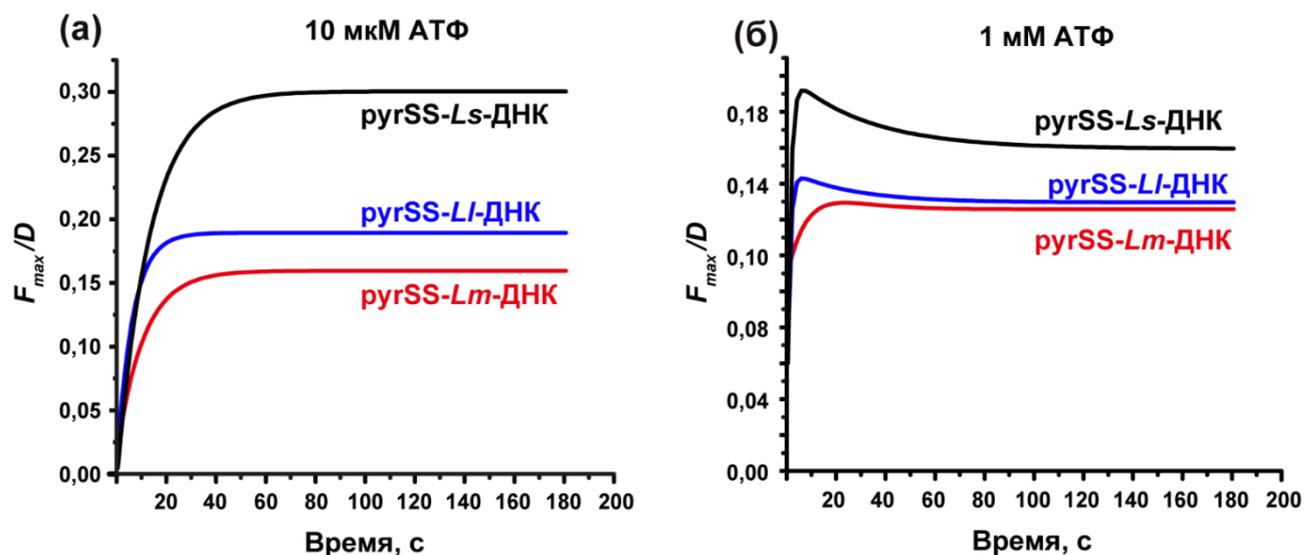


Рис. 60. Зависимость от времени изменения относительного сигнала FRET в реакционной смеси, содержащей конъюгаты *esMutS*(N497C) с ДНК, Sytox Blue и *esMutL*(H297C)-Alexa-594 при добавлении 10 мкМ АТФ (а) или 1 мМ АТФ (б).

Формирование комплекса *esMutL*(H297C)-Alexa-594 с конъюгатами *esMutS*(N497C) и ДНК в присутствии 1 мкМ АТФ происходит в две стадии. Первая стадия, связанная с образованием тройного комплекса, является очень быстрой, что не позволяет оценить точные значения констант скорости этого процесса. Однако для конъюгатов **1** и **3** они в среднем на порядок превышают величины k , рассчитанные при использовании 10 мМ АТФ. Вместе с тем, как видно из рис. 60, как и в присутствии 10 мкМ АТФ, через 25 с после начала инкубации в случае конъюгата **1** сигнал флуоресценции почти в два раза выше, чем в случае конъюгатов **2** и **3**, что подтверждает оптимальную локализацию реакционноспособных групп при использовании *esMutS*(N497C) и *pyrSS-Ls*-ДНК. Отметим, что при времени инкубации 20 мин эта разница практически нивелируется (рис. 58). Наличие второй стадии в наблюдаемой нами кинетической картине, возможно, связано с конформационными переходами в *esMutL*. Также это объясняет менее эффективное образование комплекса *esMutS*-*esMutS* при 1 мМ АТФ по сравнению с 10 мкМ АТФ.

Взаимодействие конъюгатов **5-7** между мутантной формы *esMutS*(A336C) и реакционноспособными ДНК с *esMutL*(H297C)-Alexa-594 принципиально отличается от описанного выше для конъюгатов *esMutS*(N497C)-ДНК и при малых временах инкубации (рис. 61, табл. 11). Как и следовало ожидать, конъюгат **5** между *esMutS*(A336C) и *pyrSS-Ls*-ДНК (наименее короткий линкер между белком и ДНК), не образует комплекс с *esMutL* в

присутствии АТФ независимо от ее концентрации. При наличии 10 мкМ АТФ в реакционной смеси нами зафиксировано «привлечение» есMutL(H297C)-Alexa-594 конъюгатами **6** и **7**, но скорость процесса была в 2-6 раз ниже, чем для конъюгатов **2** и **3**. Повышение концентрации АТФ до 1 мМ ингибировало образование тройного комплекса конъюгатами **6** и **7** (табл. 11), в отличие от конъюгатов **2** и **3**, где наблюдалась активация этого процесса. Как установлено, выше при длительной инкубации (20 мин) эффективность формирования комплекса есMutS-есMutL-ДНК сопоставима для конъюгатов **2**, **3**, **6** и **7**. Важно отметить отсутствие двухстадийной кинетики при взаимодействии конъюгатов есMutS(A336C)-ДНК с есMutL(H297C)-Alexa-594. Очевидно, ДНК для эффективного формирования тройного комплекса с есMutS и есMutL ДНК должна быть локализована ближе к домену «зажим» (позиция 497), а не коровому домену есMutS (позиция 336).

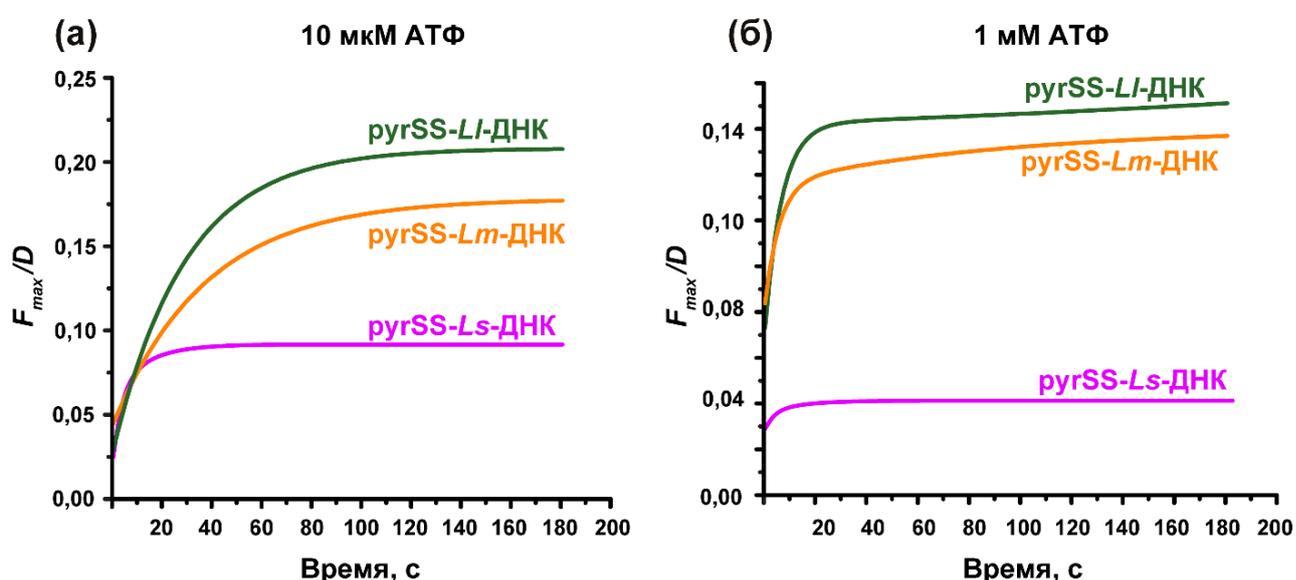


Рис. 61. Зависимость от времени изменения относительного сигнала FRET в реакционной смеси, содержащей конъюгаты есMutS(A336C) с ДНК, Sytox Blue и есMutL(H297C)-Alexa-594 при добавлении 10 мкМ АТФ (а) или 1 мМ АТФ (б).

Таким образом, с помощью комбинации методов «кросслинкинга» и FRET мы подтвердили, что ДНК в комплексе есMutS-ДНК меняет свое положение при взаимодействии белка с АТФ (как и предполагали авторы [12]) и сближена как с ДНК-связывающим (домен «зажим»), так и с коровым доменом есMutS. Более того, мы впервые продемонстрировали, что при реализации следующего этапа MMR – «привлечении» есMutL к комплексу есMutS-ДНК локализация ДНК снова изменяется, и для эффективного образования тройного комплекса ДНК должна быть сближена с доменом «зажим» и удалена от корового домена MutS.

Следует отметить, что, согласно нашим данным, зафиксированный в 8-ом положении от «мисматча» есMutS способен взаимодействовать с есMutL, что может свидетельствовать в пользу стационарной модели образования репарационных комплексов, при которых отсутствует «скольжение» белков по ДНК. Эти данные согласуются с недавней работой

Ортега и соавт. [279], в которой было показано на белках из системы репарации «мисматчей» человека, что «скольжение» белков не является необходимым для инициации системы репарации «мисматчей» и для внесения одноцепочечного разрыва в дочернюю цепь ДНК. Однако такое движение белков требуется для функционирования ExoI и последующей эксцизии. Разработанный нами метод анализа является универсальным и может применяться для исследования любых конформационно подвижных белковых комплексов.

IV.7. Аффинная модификация мутантных форм MutS из *E. coli* фрагментами ДНК, содержащими акриламидную группу при C5-атоме dU на линкерах различной длины⁸

IV.7.1. Синтез и свойства ДНК с акриламидной группой

Один из наиболее удобных подходов к получению конъюгатов белков с нуклеиновыми кислотами или низкомолекулярными соединениями заключается во взаимодействии остатков Cys белка с α,β -ненасыщенными карбонильными соединениями по реакции Михаэля. Ранее для этой цели было предложено использовать акриламидную группировку или винилсульфоамидную группировку, присоединенную к 5-ому положению C [28]. Были получены модифицированные 2'-дезоксцитидин-5'-трифосфаты, которые встраивали в олигонуклеотид в ходе реакции удлинения праймера с помощью KOD XL ДНК-полимеразы. Выход конъюгата полученного таким образом модифицированного олигонуклеотида, содержащего акриламидную группу, с модельным пептидом авторы сочли недостаточным для тестирования этого соединения в реакциях «кросслинкинга» с белками и в дальнейшем сосредоточились на винилсульфоамидном производном. В качестве реагентов на остатки Cys белков нами предложены фрагменты ДНК, содержащие акриламидную группировку другого строения (схема 8).

Первым этапом стал выбор места введения модификации в ДНК. Анализ кристаллических структур *ecMutS* в комплексе с дуплексом, содержащим «мисматч», а также данных литературы [160,161] показал, что A469 и N497 (домен «зажим»), сближены с фосфатной группой в ДНК в 5-ом и 8-ом положениях в 3'-направлении от остатка T «мисматча» [25,27,277]. Поэтому для взаимодействия с модифицированными ДНК были выбраны моноцистеиновые формы *ecMutS*(A469C) и *ecMutS*(N497C), которые ранее продемонстрировали высокую эффективность в реакции «кросслинкинга» [25,27].

⁸ При подготовке данного раздела диссертации использована публикация [287].

В работе использовались ДНК такой же последовательности, как и в работе [27], в которой изучалась эффективность 2-пиридилдисульфидной группы в ДНК для модификации есMutS с целью удобства сравнения двух групп друг с другом:

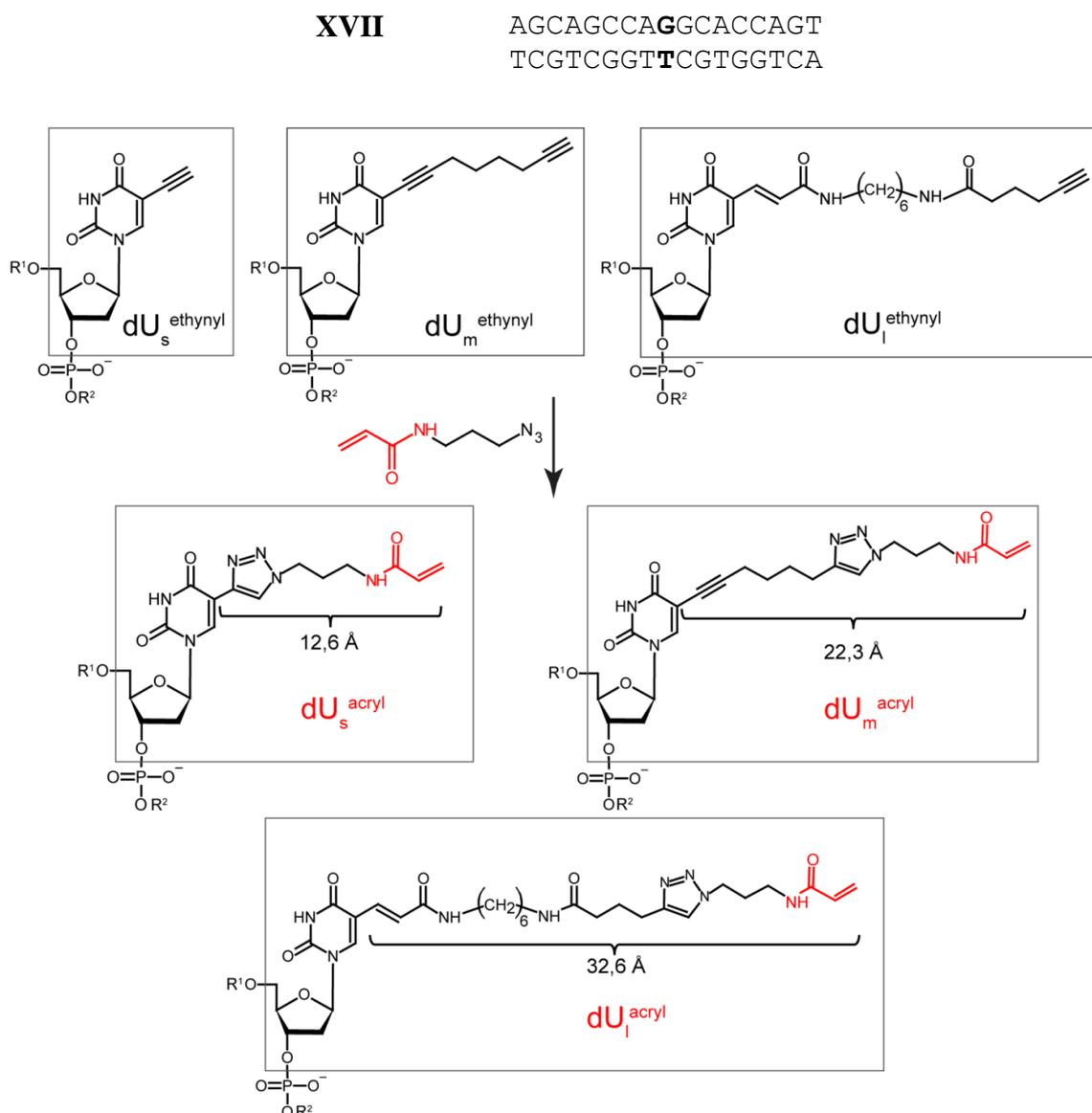


Схема 8

Нами были рассчитаны расстояния от атома серы (SG) остатков Cys мутантных форм есMutS(A469C) и есMutS(N497C) до C5-атома тимидина, находящимся в 5-ом и 8-ом положениях в 3'-направлении от Т «мисматча» в комплексе MutS-ДНК. За основу была взята структура 3ZLJ [133], так как она содержит необходимый для эффективного связывания MutS нуклеотидный кофактор АДФ и ДНК с G/T-«мисматчем», близкую по нуклеотидной последовательности к **XVII**, но все же отличающуюся от нее. С помощью программы 3DNA [280] нами получена модель ДНК-дуплекса, идентичного **XVII**, который затем был использован для получения модели комплекса есMutS-ДНК. Показано, что С469 из субъединицы А расположен наиболее близко к C5-атому Т в 5-ом положении от «мисматча»

(10 Å) (рис. 62б). Структура комплекса MutS, связанного с «мисматчем» в ДНК, полученная методом крио-электронной микроскопией также подтверждает этот вывод [57].

Аналогичный анализ кристаллической структуры 3ZLJ и данных крио-ЭМ показал, что только C497 (субъединица А) сближен с C5-атомом Т в 8-ом положении в 3'-направлении от «мисматча» в ДНК (9 Å) (рис. 62, табл. 12).

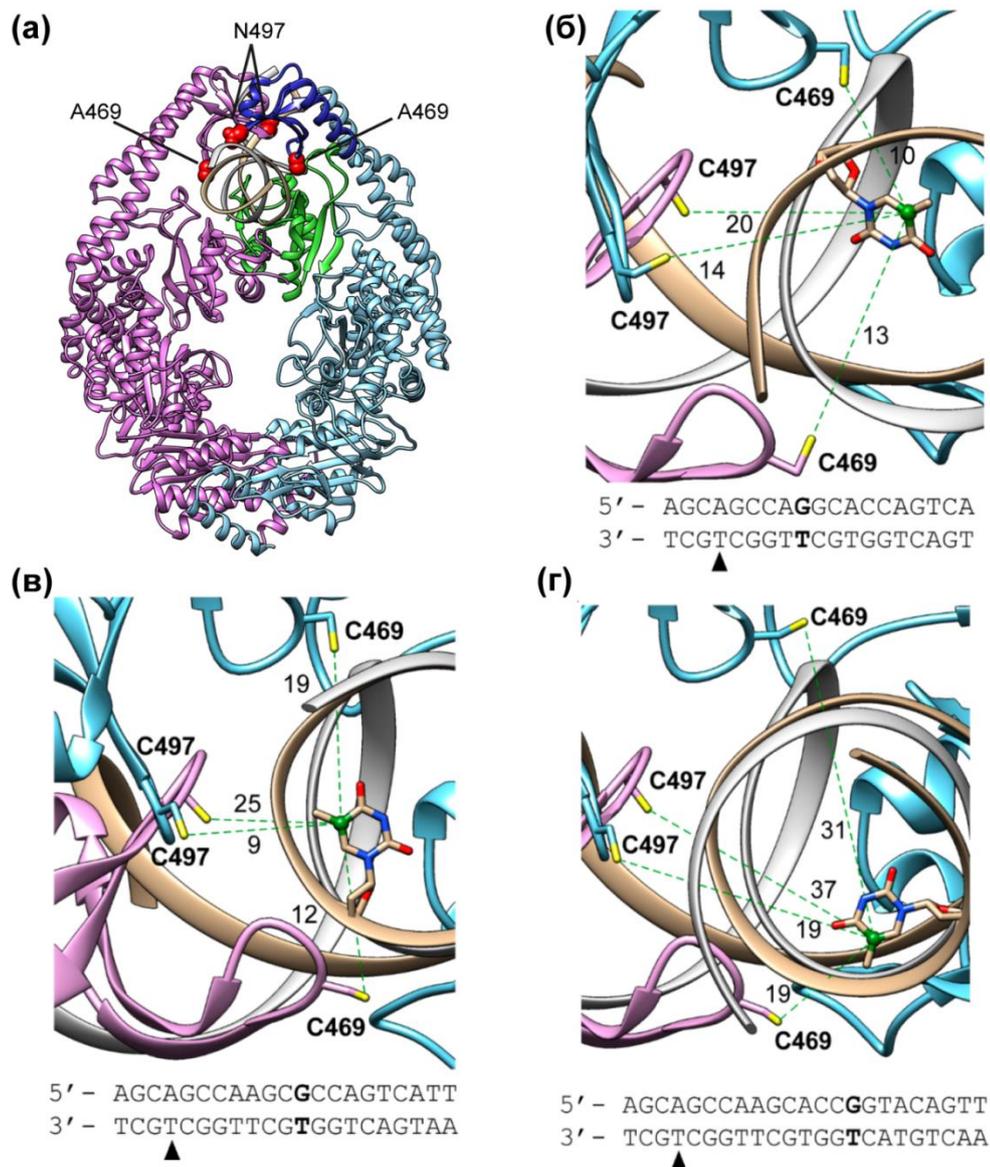


Рис. 62. Модель комплекса еMutS-ДНК, построенная на основе кристаллической структуры комплекса (PDB: 3ZLJ). Общий вид комплекса еMutS-ДНК изображен на панели (а). Аминокислотные остатки N497 и A469 выделены красным, домен «зажим» выделен синим, «мисматч»-связывающий домен – зеленым. Указаны расстояния от SG атома C469 и C497 до C5-атома в тимине, находящимся в 5-ом, 8-ом и 11-ом положениях от «мисматча» в Å (панели (б), (в) и (г), соответственно). Две субъединицы белка обозначены розовым и голубым цветами, ДНК – коричневым. Черным треугольником указано Т, до которого рассчитывалось расстояние.

Интересно, что в кристаллических структурах для комплексов еMutS с «мисматч»-содержащей ДНК некоплементарная пара фланкирована 8 п.н. (см. табл. 1 в [27]). В крио-ЭМ-структуре разрешены только 25 п.н. 61-звенного ДНК-дуплекса [57]. Согласно выполненному нами моделированию комплекса еMutS-ДНК, а также данным крио-ЭМ,

остатки в положениях С469 и С497 расположены на расстоянии ~17 и ~22 Å от нуклеотида в 11-ом положении в 3'-направлении от «мисматча» (рис. 62в). Нам предстояло ответить на вопрос, может ли ДНК с модификацией в этом положении быть использована для эффективной «сшивки» с белками есMutS(A469C) и есMutS(N497C).

Таким образом, было решено получить 17-звенные ДНК-дуплексы, содержащие модификацию в трех разных положениях от «мисматча»:

5-ое положение	8-ое положение	11-ое положение
5' -AGC-A-GCCAGGCACCAGT	5' -AGC-A-GCCAAGCCGCAGT	5' -AGC-A-GCCAAGCACCCGGT
3' -TCGdU _R CGGTTCGTGGTCA	3' -TCGdU _R CGGTTCGTGGTCA	3' -TCGdU _R CGGTTCGTGGTCA

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

Следующим этапом стало получение модифицированных олигонуклеотидов выбранной последовательности. Синтез осуществлялся доцентом Сколковского института науки и технологий Зацепиным Т.С. и проходил в два этапа: 1) получение олигонуклеотидов-предшественников с модифицированным dU, содержащим в С5-положении этинильную группу на линкерах различной длины; 2) введение акриламидной группировки в олигонуклеотид постсинтетически. На схеме 8 (верхняя часть) приведены структуры олигонуклеотидов-предшественников с этинильными фрагментами, содержащие модифицированные звенья: 5-этинил-2'-дезоксуридин, 5-(октан-1,7-диинил)-2'-дезоксуридин, 5-{2-[N-6-(5-гексинамидо)гексил]-3-акрилоиламидо}-2'-дезоксуридин. Таким образом, введенная в ДНК группа находится на линкерах различной длины, что позволяет более точно оценить сближенность остатков цистеина MutS к выбранным положениям модификации. Длины линкеров *s*, *m*, *l* от С5-го положения урацила до СН₂ атома акриламидной группы оценивали с помощью программы ChemSketch. Они составили 12,6, 22,3 и 32,6 Å, соответственно.

В первую очередь мы проверили, как введенная модификация влияет на стабильность ДНК-дуплексов. Для этого использовали неспособные вступать в реакцию с белком ДНК-дуплексы с этинильной группой, которые содержали и не содержали «мисматч». В качестве контроля использовались 17-звенный ДНК-дуплекс канонического строения и содержащий G/T-пару (табл. 12).

Термическую стабильность дуплексов изучали по изменению флуоресценции интеркалирующего красителя SYBR Green I в зависимости от температуры. Термическая стабильность комплементарных ДНК-дуплексов XIII-XVI, содержащие одну из трех этинильных модификаций, изменялись незначительно, что соответствовало данным литературы [31,32]. Внесение «мисматча» в модифицированные дуплексы (XVII-XX) приводило к уменьшению температуры плавления на 4–5°C по сравнению с дуплексами XIII-

XVI. Результирующая $T_{пл}$ также незначительно отличалась от немодифицированного дуплекса. Следовательно, введение модификаций по С5-атому урацила не приводит к дестабилизации двойной спирали ДНК.

Таблица 12. ДНК-дуплексы, содержащие этинильную группу.

№	Структура дуплекса (5' - 3')	$T_{пл}, ^\circ\text{C}$
XIII	AGCAGCCAAGCACCAGT TCGTCGGTTCGTGGTCA	$81,6 \pm 0,3$
XIV	AGC-A-----GCCAAGCACCAGT TCG <u>dU_s</u> ^{ethyny1} CGGTTCGTGGTCA	$80,7 \pm 0,3$
XV	AGC-A-----GCCAAGCACCAGT TCG <u>dU_m</u> ^{ethyny1} CGGTTCGTGGTCA	$81,3 \pm 0,3$
XVI	AGC-A-----GCCAAGCACCAGT TCG <u>dU₁</u> ^{ethyny1} CGGTTCGTGGTCA	$80,6 \pm 0,5$
XVII	AGCAGCCAGGCACCAGT TCGTCGGTTCGTGGTCA	$77,1 \pm 0,3$
XVIII	AGC-A-----GCCAGGCACCAGT TCG <u>dU_s</u> ^{ethyny1} CGGTTCGTGGTCA	$77,5 \pm 0,1$
XIX	AGC-A-----GCCAGGCACCAGT TCG <u>dU_m</u> ^{ethyny1} CGGTTCGTGGTCA	$76,9 \pm 0,3$
XX	AGC-A-----GCCAGGCACCAGT TCG <u>dU₁</u> ^{ethyny1} CGGTTCGTGGTCA	$76,6 \pm 0,1$

Как упоминалось ранее, помимо «мисматчей» есMutS способен узнавать некоторые окислительные повреждения и объемные аддукты в ДНК [32,34,281–284]. Ранее было показано отсутствие влияние модификации 5-ого положения гетероциклического основания dU на стабильность ДНК-дуплекса [285]. Тем не менее, важным подготовительным этапом для проведения «кросслинкинга» между реакционноспособными ДНК и мутантными формами белка есMutS являлось выяснение вопроса о том, узнается ли введенная модификация как повреждение ДНК или нет. Для ответа на этот вопрос мы использовали 17-звенные ДНК-дуплексы **XIV-XVI** и **XVIII-XX**, содержащие С5-этинильную группу. Модификация находилась на расстоянии 5 нуклеотидных звеньев в 3'-направлении от остатка Т пары G/Т (табл. 12). G/Т является наиболее часто встречаемым «мисматчем», и белок есMutS связывается с ним в несколько раз эффективнее по сравнению с канонической ДНК той же длины [263]. Таким образом, оценив эффективность комплексообразования можно сказать, распознает ли есMutS введенную модификацию в качестве «мисматча» или нет. В контрольных экспериментах были использованы модифицированные дуплексы без «мисматча» и без модификации.

Для изучения комплексообразования была выбрана одна из мутантных форм белка (есMutS(A469C)). Сравнительный анализ комплексообразования есMutS(A469C) с

дуплексами **XIII-XX** проводили в условиях 5-кратного избытка белка по отношению к ДНК. Результаты экспериментов, полученные методом «торможения в геле», приведены на рис. 63. Нами продемонстрировано, что эффективность связывания белка с модифицированными ДНК-дуплексами **XIV-XVI**, не содержащими G/T-пару, сопоставима с комплексообразованием есMutS(A469C) с каноническим дуплексом **XIII**. То есть, ДНК, содержащие модифицированный остаток dU, не распознаются белком в качестве повреждения и не образуют с ним специфический комплекс.

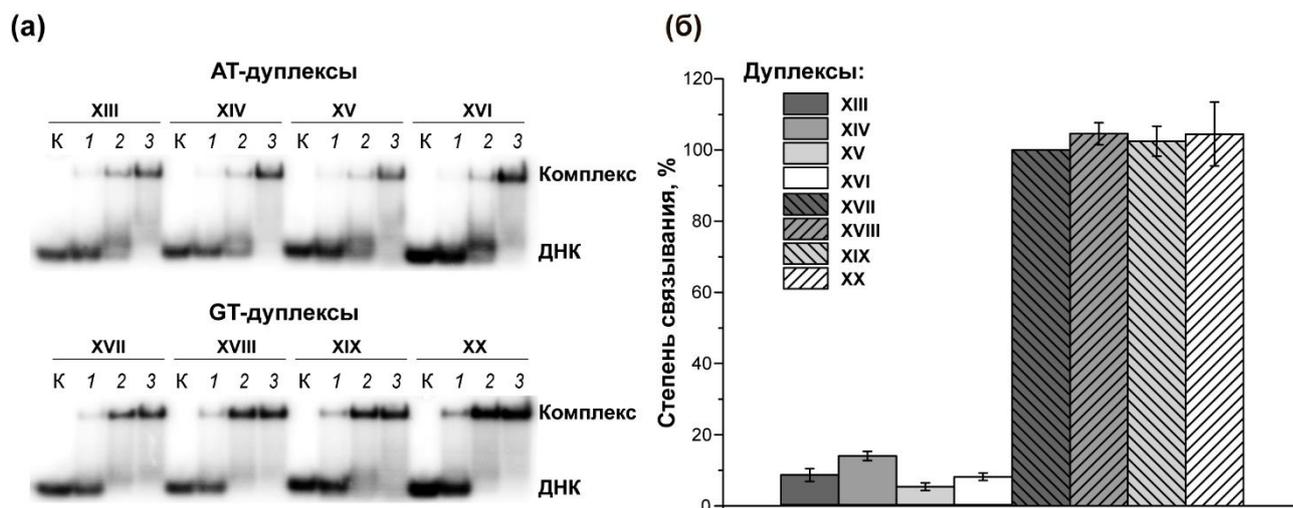


Рис. 63. Комплексообразование ДНК-дуплексов **XIII-XX** (0,5 мкМ) с белком есMutS(A469C). **(а)** Радиоавтограф 6%-ного ПААГ (неденатурирующие условия). Дорожки 1, 2, 3 соответствуют концентрациям есMutS(A469C) 1, 2,5 и 5 мкМ соответственно. К – ДНК без добавления белка. **(б)** Диаграмма относительной степени связывания есMutS(A469C) с ДНК. Связывание с немодифицированным G/T-содержащим дуплексом **XVII** принято за 100%. Концентрация белка составляла 5 мкМ в расчёте на мономер.

Показано, что белок формирует комплекс с дуплексами **XVIII-XX** с одинаковой эффективностью в пределах погрешности измерения по сравнению с немодифицированной «мисматч»-содержащей ДНК. Это, возможно, связано с тем, что предложенная нами модификация располагается в большой бороздке ДНК, а есMutS контактирует с «мисматчем» со стороны малой бороздки [8,55]. Очевидно, что введение любой из трех модификаций в состав ДНК-дуплексов, содержащих неканоническую пару, не сказывается на эффективности связывания белка с ДНК, т.е. полученные дуплексы после введения акриламидного фрагмента могут быть использованы для аффинной модификации мутантных форм белка есMutS.

Следующим этапом работы стало введение акриламидной группы в ДНК. Так как акриламидная группа является неустойчивой в процессе автоматического олигонуклеотидного синтеза, ее вводили постсинтетически в ранее полученные олигонуклеотиды-предшественники с терминальным алкином. Использовали реакцию [3+2]-диполярного присоединения с бифункциональным реагентом N-(3-азидопропил)акриламидом (схема 8). Массы 17-звенных фрагментов ДНК с акриламидной группировкой на линкерах

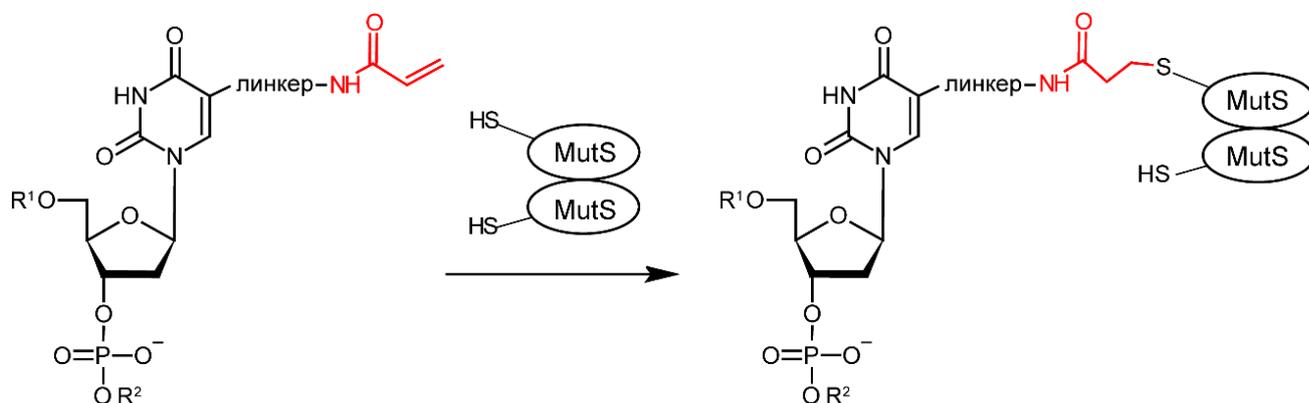
различной длины, определенные методом масс-спектрометрии MALDI TOF, совпадали с рассчитанными (см. Материалы и методы, раздел III.3.1).

Таким образом, получена серия 17-звенных ДНК-дуплексов, содержащих акриламидную группировку в различных положениях в ДНК:

XXI	AGC-A-----GCCAAGCACCAGT TCG <u>dU_s</u> ^{acryl} CGGTTTCGTGGTCA	XXVII	AGC-A-----GCCAAGC <u>GCC</u> AGT TCG <u>dU_s</u> ^{acryl} CGGTTTCGTGGTCA
XXII	AGC-A-----GCCAAGCACCAGT TCG <u>dU_m</u> ^{acryl} CGGTTTCGTGGTCA	XXVIII	AGC-A-----GCCAAGC <u>GCC</u> AGT TCG <u>dU_m</u> ^{acryl} CGGTTTCGTGGTCA
XXIII	AGC-A-----GCCAAGCACCAGT TCG <u>dU₁</u> ^{acryl} CGGTTTCGTGGTCA	XXIX	AGC-A-----GCCAAGC <u>GCC</u> AGT TCG <u>dU₁</u> ^{acryl} CGGTTTCGTGGTCA
XXIV	AGC-A-----GCCA <u>GGC</u> ACCAGT TCG <u>dU_s</u> ^{acryl} CGGTTTCGTGGTCA	XXX	AGC-A-----GCCA <u>GGC</u> ACC <u>GGT</u> TCG <u>dU_s</u> ^{acryl} CGGTTTCGTGGTCA
XXV	AGC-A-----GCCA <u>GGC</u> ACCAGT TCG <u>dU_m</u> ^{acryl} CGGTTTCGTGGTCA	XXXI	AGC-A-----GCCA <u>GGC</u> ACC <u>GGT</u> TCG <u>dU_m</u> ^{acryl} CGGTTTCGTGGTCA
XXVI	AGC-A-----GCCA <u>GGC</u> ACCAGT TCG <u>dU₁</u> ^{acryl} CGGTTTCGTGGTCA	XXXII	AGC-A-----GCCA <u>GGC</u> ACC <u>GGT</u> TCG <u>dU₁</u> ^{acryl} CGGTTTCGTGGTCA

IV.7.2 Взаимодействие мутантных форм MutS из *E. coli* с 17-звенными ДНК-дуплексами с акриламидной группировкой на линкерах различной длины

Акриламидная группа, подобно малеимидной, способна присоединять тиольные группы белка по активированной двойной связи (схема 9).



R¹, R² – фрагменты олигонуклеотидной цепи

Схема 9

Ковалентное связывание мутантных форм *ecMutS*(A469C) и *ecMutS*(N497C) с 5'-³²P-меченым ДНК-дуплексами **XXI-XXVI** проводили в буфере, содержащем 1 мМ АДФ при 37°C. Для достижения максимального выхода конъюгата использовали 10-кратный избыток ДНК по отношению к белку. Реакционную смесь инкубировали 2 ч согласно рекомендациям [28]. После окончания реакции пробы анализировали методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях.

Как видно из изображений геля, окрашенного раствором кумасси G250, и его радиоавтографа (рис. 64а, б), кроме зоны, соответствующей белку (молекулярная масса около 95 кДа), наблюдались две дополнительные зоны с большей молекулярной массой. В этих зонах обнаруживалась радиоактивность, что подтверждало наличие в них ДНК и позволяло считать эти зоны продуктами «кросслинкинга». По-видимому, 17-звенный дуплекс в составе конъюгата не полностью денатурирует в условиях гель-электрофореза. Наблюдаемые продукты, вероятно, соответствуют конъюгатам *ecMutS* с одной цепью и ДНК-дуплексом.

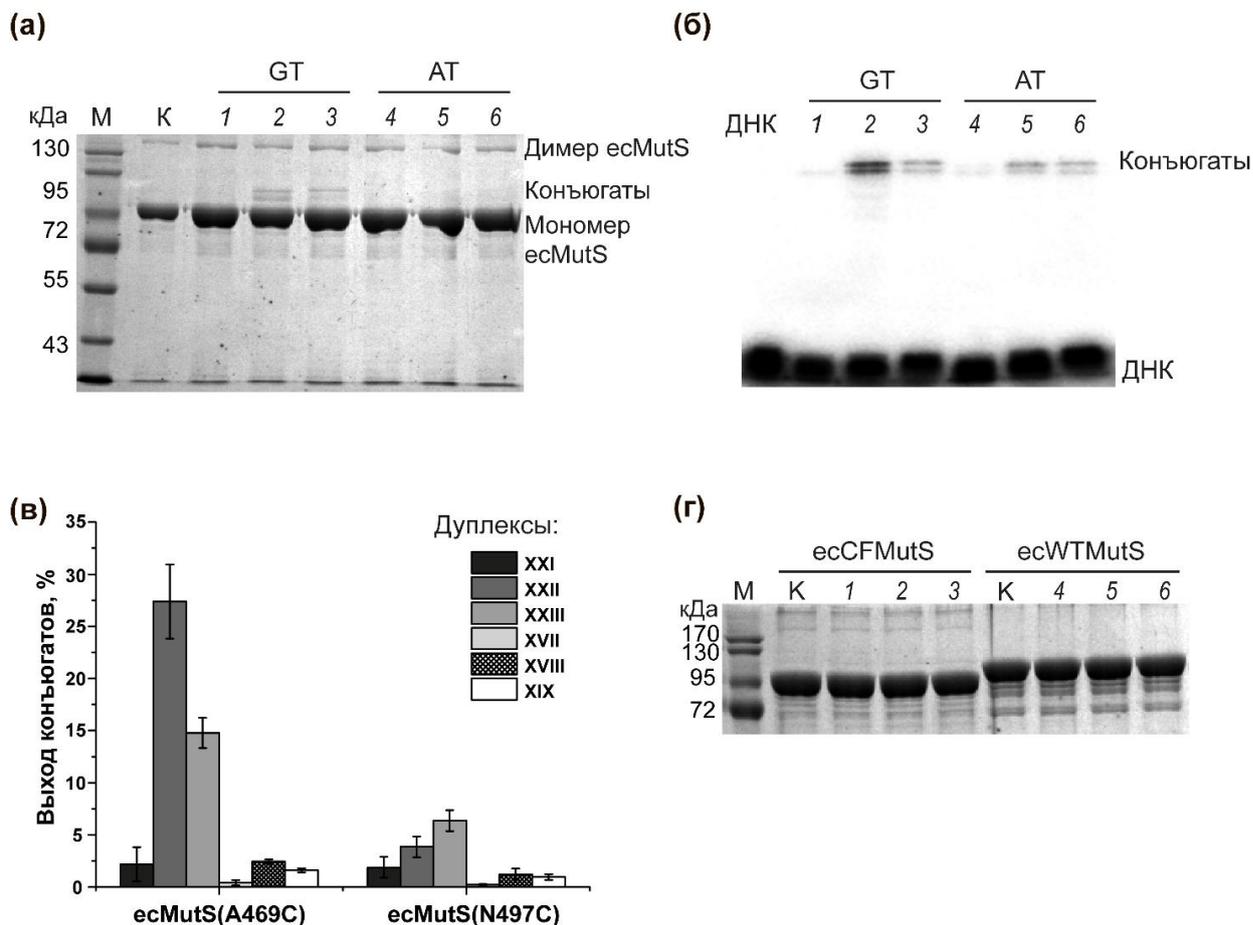


Рис. 64. Взаимодействие белков *ecMutS*(A469C), *ecMutS*(N497C), *ecCFMutS* и *ecWTMutS* (5 мкМ) с ^{32}P -мечеными ДНК-дуплексами XXI-XXVI (0,5 мкМ). Радиоавтограф (б) и фотографии (а, г) 8%-ного ДСН-ПААГ, окрашенного раствором кумасси G250. (а, б) Дорожки 1-6 – продукты ковалентного связывания *ecMutS*(A469C) с дуплексами XXIV-XXVI и XXI-XXIII соответственно. (в) Выход конъюгатов *MutS*(A469C), *ecMutS*(N497C) с ДНК-фрагментами. (г) Взаимодействие *ecCFMutS* (дорожки 1, 2, 3) и *ecWTMutS* (дорожки 4, 5, 6) с дуплексами XXI-XXVI. Дорожки К соответствуют препаратам белка без добавления ДНК; дорожка ДНК – ДНК-дуплекс XXI без добавления белка.

Кроме зоны, соответствующей конъюгату *ecMutS*(A469C) с ДНК, наблюдалась зона с очень низкой подвижностью в 8%-ном ДСН-ПААГ (более 170 кДа), соответствующая димеру *ecMutS*. Образованию белок-белковой сшивки через дисульфидный мостик в данном случае способствует сближение остатков Cys в гомодимере мутантной формы *ecMutS*(A469C). Для уменьшения эффективности этого процесса в реакционную смесь добавляли 1 мМ трис(2-

карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР). Выходы конъюгатов рассчитывали по количеству прореагировавшей ДНК, так как она была взята в недостатке (табл. 13).

Продемонстрировано, что наиболее эффективно *ecMutS*(A469C) взаимодействует с ДНК-дуплексом **XXV**, содержащим акриламидную группу на линкере *m* длиной 22,3 Å. Выход конъюгата в этом случае составлял более 25% (рис. 64, дорожка 2). Очевидно, что ДНК-реагент с линкером *m* оптимален для контакта с Cys496, находящимся согласно нашим расчётам на расстоянии 11-14 Å от ДНК (табл. 13).

Таблица 13. Рассчитанные расстояния между ДНК и A469/N497 в *ecMutS* и выход конъюгатов *ecMutS*-ДНК

Положение остатка Cys в <i>ecMutS</i>		Расстояние между позициями 469/497 в <i>ecMutS</i> и ДНК, Å	Выход конъюгата <i>ecMutS</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 образования ковалентно связанного комплекса *ecMutS*(A469C) ДНК-дуплексом **XXII** без «мисматча» практически не наблюдалось (рис. 64а). Таким образом, *ecMutS*(A469C) специфично взаимодействует с «мисматч»-содержащими ДНК-реагентами с акриламидной группировкой, что является ее преимуществом по сравнению с другими модификациями. Например, в случае 17-звенного ДНК-дуплекса без «мисматча», но с 2'-пиримидилдисульфидной группой, конъюгат *ecMutS*-ДНК образовывался с высоким выходом (до 60%). Из литературы известно, что *MutS* обладает

высоким сродством к неспецифической ДНК [55,137,249]. Возможно, остатки Cys есMutS(A469C) в процессе поиска «мисматча» сближаются с 2'-пугSS, локализованной в малой бороздке ДНК, и успевают образовать с ней ковалентную связь. Как мы установили, эффективность взаимодействия есMutS(A469C) с акриламидсодержащей ДНК существенно ниже, чем с пиридилдисульфидной (максимальный выход конъюгатов 27% за 2 ч, против количественного выхода за 30 мин в случае 2'-пугSS), что, по-видимому, обеспечивает большую специфичность первой группировки.

Для оценки селективности предложенных ДНК-реагентов именно к сближенным с ДНК остаткам Cys было изучено взаимодействие дуплексов **XXIV-XXVI** с белками есCFMutS, есMutS(N497) и есWTMutS. есCFMutS, не содержащий остатков Cys, как и ожидалось, не образовывал ковалентно связанный комплекс ни с одним из ДНК-дуплексов (рис. 64г). Такой же результат был получен для гомодимера есWTMutS, имеющего в своем составе 12 остатков Cys. Вариант белка есMutS(N497C) также практически не формировал конъюгаты с рассматриваемыми ДНК (рис. 64, табл. 13). Таким образом, использование акриламидсодержащих ДНК-лигандов позволило продемонстрировать, что именно положение 469 сближено с 5-ым нуклеотидом в 3'-направлении от остатка Т «мисматча», что согласуется с нашими расчетами.

Следующим шагом, подтверждающим селективность обсуждаемой реакции, явилось исследование ковалентного связывания есMutS(N497C) и есMutS(A469C) с ДНК-дуплексами **XXVII-XXIX**. В них звено dU с акриламидной группировкой находилось в положении 8 в 3' направлении от Т «мисматча». Согласно данным РСА углеводофосфатный остов нуклеотида в данном положении сближен только с остатком цистеина есMutS(N497C). Мы показали, что эта мутантная форма есMutS действительно эффективно формирует конъюгаты с **XXVII-XXIX**. Причем выход продукта реакции в случае ДНК с акриламидной группой на линкере *m* длиной 22,3 Å (дуплекс **XXVIII**) очень высок - он достигает 76%, что сопоставимо с выходом конъюгата при взаимодействии есMutS(N497C) с ДНК, содержащей в этом положении dU с 2'-пиридилдисульфидной группой [27]. есMutS(A469C) практически не образовывал ковалентно связанный комплекс с дуплексами **XXVII-XXIX**, по-видимому, из-за не оптимального расположения Cys относительно модификации в ДНК (табл. 13).

Так как удалось получить высокий выход конъюгата в реакции есMutS(N497C) с **XXVIII**, нами было решено изучить кинетику этого процесса. Продемонстрировано, что формирование конъюгата протекает достаточно медленно; наибольшее количество продукта реакции есMutS(N497C) с **XXVIII** накапливается за 2 ч (рис. 65). Инкубировать реакционную смесь большее количество времени нецелесообразно из-за инактивации есMutS и его мутантных форм.

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. Из-за близости «мисматча» к концам ДНК при взаимодействии белка с такой ДНК будут осуществляться два конкурирующих между собой процесса: связывание есMutS с некомплементарной парой и неспецифическое взаимодействие белка с концом ДНК. Для исследования взаимодействия есMutS с модифицированными ДНК, содержащими dU с акриламидной группой в 11-ом положении на линкере различной длины, получены дуплексы **XXX-XXXII**. Мы ожидали, что наиболее эффективно эти дуплексы будут взаимодействовать с есMutS(N497C).

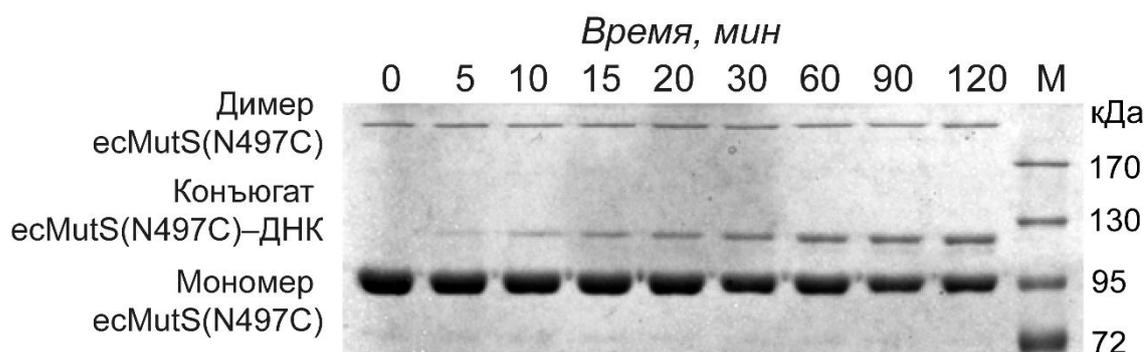


Рис. 65. Анализ продуктов ковалентного связывания есMutS(N497C) (4 мкМ) с ДНК-дуплексом **XXVIII** (1 мкМ) в 8%-ном ДСН-ПААГ. Условия реакции: 0-120 мин, 37°C. Гель окрашен раствором кумасси G250. М - маркер молекулярной массы белков, кДа.

Оказалось, однако, что только есMutS(A469C) реагировал с дуплексами **XXX-XXXII**, причем в случае модифицированных ДНК с линкерами длиной ~ 22-32 Å (линкеры *m* и *l*) наблюдался выход ~20-40% (табл. 13). В случае ДНК с акриламидной группой на «коротком» линкере *s* продукт реакции практически отсутствовал. Следовательно, длина этого линкера (12,6 Å) недостаточна для образования ковалентной связи между белком и ДНК.

Мы проанализировали структуру есMutS в комплексе с ДНК канонического строения («сканирующий комплекс»), полученную методом крио-ЭМ. Эта структура была совмещена со структурой комплекса есMutS с G/T-содержащей ДНК, что позволило определить локализацию модифицированного dU. В таком неспецифическом комплексе позиция 469 в есMutS расположена на расстоянии ~ 15 Å от модифицированного нуклеотида, а позиция 497 слишком удалена для модификации (рис. 66). То есть образование неспецифического комплекса могло бы объяснить полученные результаты. Однако при взаимодействии есMutS(A469C) с дуплексами **XXI-XXIII**, которые не содержали «мисматч», наблюдались низкие выходы продуктов «кросслинкинга» (рис. 64а).

Таким образом, эффективное ковалентное связывание есMutS(A469C) с дуплексами **XXXI** и **XXXII** не может быть результатом только неспецифического ДНК-белкового

взаимодействия. Более того, выход конъюгата в случае дуплекса **XXXI** был даже выше, чем выход конъюгата есMutS(A469C) с дуплексом **XXV**, где «мисматч» достаточно удален от концов ДНК (42% и 27% соответственно). Следовательно, должен образоваться специфический комплекс есMutS-ДНК. Это было подтверждено эффективным комплексообразованием есMutS(A469C) с ДНК-дуплексом, содержащим этинильную группу в 11-ом положении от «мисматча» (данные не приведены). Возможно, при локализации некомплементарной пары на конце ДНК специфический комплекс есMutS с «мисматчем» не может полностью сформироваться есMutS взаимодействует с такой ДНК особым, не установленным ранее образом.

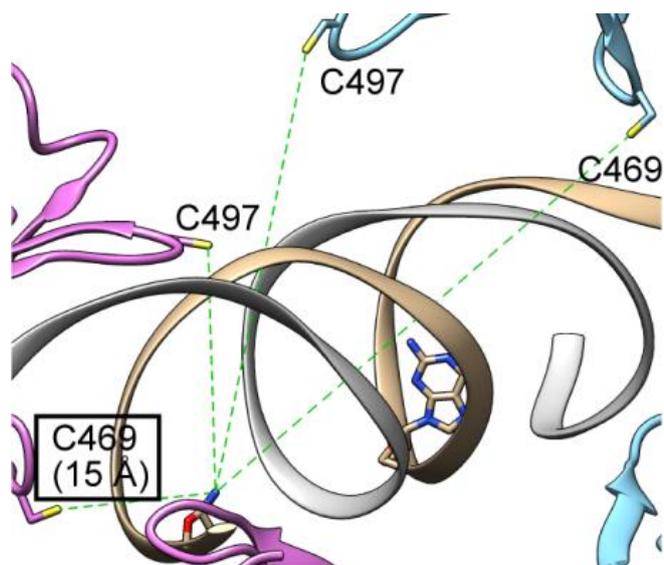


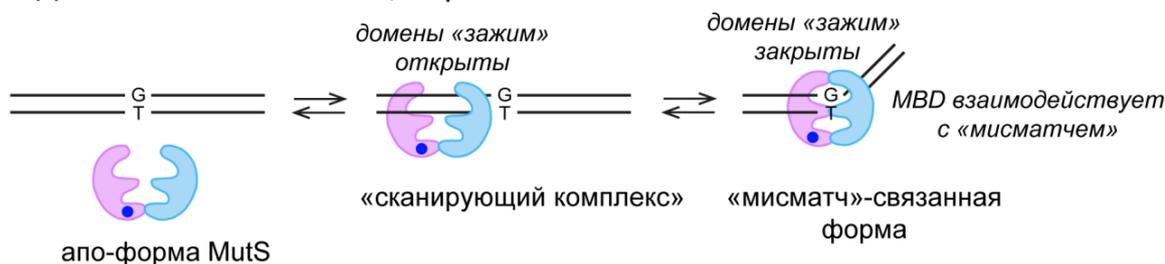
Рис. 66. Структура «сканирующего комплекса» (PDB: 7AI5). Указаны расстояния от SG атома C469 и C497 до N1-атома нуклеотида, находящегося в 11-ом положении от предполагаемого места «мисматча» в Å. Две субъединицы белка обозначены розовым и голубым цветами, ДНК – коричневым.

Комплексы есMutS с ДНК, содержащими различные «мисматчи» в центре дуплекса, хорошо описаны. В таких комплексах домены «зажим» двух субъединиц белка находятся в «закрытом» состоянии и «мисматч»-связывающий домен одной из субъединиц взаимодействует с «мисматчем» [27,55,57,124,133,160,161]. Структура «сканирующего комплекса» есMutS на ДНК получена недавно [57]. Домены «зажим» в такой конформации «открыты», позволяя ДНК попасть в ДНК-связывающий центр белка: «мисматч»-связывающий домен не образует специфического контакта. Мы полагаем, что в случае, когда G/T-пара находится на конце ДНК есMutS формирует специфические взаимодействия с «мисматчем», однако, домены «зажим» остаются в «открытом» состоянии из-за невозможности изгиба ДНК (рис. 67). Подвижность доменов «зажим» была показана ранее, что подтверждает наше предположение [8,57,133,149,151].

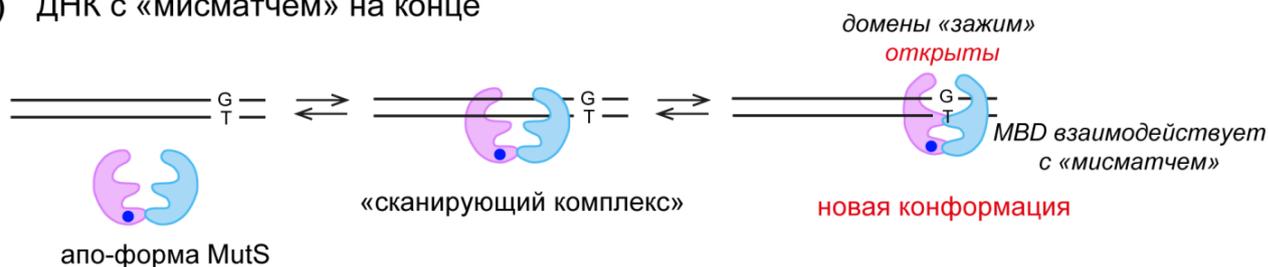
Итак, нами впервые показана применимость ДНК-дуплексов, содержащих остаток dU с акриламидной группой на линкерах различной длины в заданном положении

олигонуклеотидной цепи для аффинной модификации остатков Cys мутантных форм белка есMutS. Продемонстрирована региоселективность этих ДНК-реагентов по отношению к остаткам Cys469 и Cys497. Установлена корреляция результатов рассматриваемой реакции с данными РСА и возможность использования данных «кросслинкинга» для уточнения структурных данных. Наиболее перспективным реагентом для ковалентного связывания есMutS через остатки Cys является ДНК-дуплекс с акриламидной группировкой на линкере *m* длиной ~ 22,3 Å. Выход ДНК-белкового конъюгата с есMutS(N497C) в этом случае превышает 70%. Также с помощью предложенных нами реагентов предложено новое, ранее не описанное конформационное состояние есMutS.

(а) ДНК с «мисматчем» в центре



(б) ДНК с «мисматчем» на конце



• АДФ

MBD: «мисматч»-связывающий домен

Рис. 67. Взаимодействие MutS с «мисматчем», находящимся в центре и на конце ДНК-дуплекса (панели (а) и (б) соответственно).

V. 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.

VI. 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.

Благодарности

Автор выражает огромную благодарность руководителю д.х.н., проф. Кубаревой Елене Александровне (НИИ ФХБ имени Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова) за научное консультирование, помощь в планировании и написании работы, а также за поддержку, заботу, невероятное терпение и доброе отношение к диссертантке. Также автор благодарит д.х.н., проф. Орецкую Татьяну Семеновну (НИИ ФХБ имени Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова) за консультации по химической модификации ДНК, а также за теплое отношение и благоприятную атмосферу в лаборатории. Автор признателен и благодарен к.х.н. Рязановой А.Ю. и к.х.н. Перевозчиковой С.А. за обучение различным экспериментальным методам. Хотелось бы выразить слова благодарности международным коллегам, без которых выполнение некоторых частей работы было бы невозможно: проф. П. Фридриху (Университет имени Ю. Либиха, Германия) и проф. Д.Н. Рао (Индийский институт науки, Индия).

Список литературы

1. Errol C.F., Graham C.W., Wolfram S., Richard D.W., Roger A.S., Tom E. DNA repair and mutagenesis, second edition // DNA Repair and Mutagenesis, Second Edition. American Society of Microbiology, 2006. 684 p.
2. Hoeijmakers J.H.J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer // Nature. 2001. Vol. 411. № 6835. P. 366–374.
3. Modrich P., Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology // Annu. Rev. Biochem. 1996. Vol. 65. № 1. P. 101–133.
4. Modrich P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair // Annu. Rev. Genet. 1991. Vol. 25. № 1. P. 229–253.
5. Guarné A. The functions of MutL in mismatch repair // Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 2012. Vol. 110. P. 41–70.
6. Michailidi C., G. Papavassiliou A., Troungos C. DNA repair mechanisms in colorectal carcinogenesis // Curr. Mol. Med. 2012. Vol. 12. № 3. P. 237–246.
7. Fukui K. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria // J. Nucleic Acids. 2010. Vol. 2010. P. 1–16.
8. Obmolova G., Ban C., Hsieh P., Yang W. Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA // Nature. 2000. Vol. 407. № 6805. P. 703–710.
9. Kolodner R.D., Mendillo M.L., Putnam C.D. Coupling distant sites in DNA during DNA mismatch repair // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007. Vol. 104. № 32. P. 12953–12954.
10. Liu J., Hanne J., Britton B.M., Bennett J., Kim D., Lee J.-B., Fishel R. Cascading MutS and MutL sliding clamps control DNA diffusion to activate mismatch repair // Nature. 2016. Vol. 539. № 7630. P. 583–587.
11. Gorman J., Wang F., Redding S., Plys A.J., Fazio T., Wind S., Alani E.E., Greene E.C. Single-molecule imaging reveals target-search mechanisms during DNA mismatch repair // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012. Vol. 109. № 45. P. E3074-E3083.
12. 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. MutS/MutL crystal structure reveals that the MutS sliding clamp loads MutL onto DNA // Elife. 2015. Vol. 4. P. e06744.
13. Pillon M.C., Lorenowicz J.J., Uckelmann M., Klocko A.D., Mitchell R.R., Chung Y.S., Modrich P., Walker G.C., Simmons L.A., Friedhoff P., Guarné A. Structure of the endonuclease domain of MutL: unlicensed to cut // Mol. Cell. 2010. Vol. 39. № 1. P. 145–151.
14. Ban C., Yang W. Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis // Cell. 1998. Vol. 95. P. 541–552.

15. Fukui K., Iino H., Baba S., Kumasaka T., Kuramitsu S., Yano T. Crystal structure and DNA-binding property of the ATPase domain of bacterial mismatch repair endonuclease MutL from *Aquifex aeolicus* // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 2017. Vol. 1865. № 9. P. 1178–1187.
16. Guarné A., Ramon-Maiques S., Wolff E.M., Ghirlando R., Hu X., Miller J.H., Yang W. Structure of the MutL C-terminal domain: a model of intact MutL and its roles in mismatch repair // *EMBO J*. 2004. Vol. 23. № 21. P. 4134–4145.
17. Niedziela-Majka A., Maluf N.K., Antony E., Lohman T.M. Self-assembly of *Escherichia coli* MutL and its complexes with DNA // *Biochemistry*. 2011. Vol. 50. № 37. P. 7868–7880.
18. Luscombe N.M., Austin S.E., Berman H.M., Thornton J.M. An overview of the structures of protein-DNA complexes // *Genome Biol*. 2000. Vol. 1. № 1. P. 001.1-001.37.
19. Dolinnaya N., Zubin E., Kubareva E., Zatsëpin T., Oretskaya T. Design and synthesis of 2-functionalised oligonucleotides. Their application for covalent trapping the protein–DNA complexes // *Curr. Org. Chem*. 2009. Vol. 13. № 11. P. 1029–1049.
20. Verdine G.L., Norman D.P.G. Covalent trapping of protein-DNA complexes // *Annu. Rev. Biochem*. 2003. Vol. 72. № 1. P. 337–366.
21. Ходырева С.Н. Лаврик О.И. Аффинная модификация в протеомном исследовании ансамблей репарации ДНК // *Биоорганическая химия*. 2011. Т. 37. № 1. С. 91–107.
22. Романенков А.С., Кисиль О.В., Зацепин Т.С., Ямскова О.В., Карягина А.С., Метелев В.Г., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. ДНК-метилтрансфераза SsoII как бифункциональный белок: особенности взаимодействия с промоторной областью генов системы рестрикции-модификации SsoII. *Биохимия* // 2006. Т. 71. № 12. С. 1648– 1658.
23. Воробьева О.В., Романенков А.С., Метелев В.Г., Карягина А.С., Лаврова Н.В., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. Ковалентное связывание Cys142 метилтрансферазы SsoII с ДНК-дуплексами, содержащими фосфорилдисульфидную межнуклеотидную группу // *Молекуляр. биология*. 2003. Т. 37. № 5. С. 906–915.
24. Metelev V.G., Kubareva E.A., Vorob'eva O. V., Romanenkov A.S., Oretskaya T.S. Specific conjugation of DNA binding proteins to DNA templates through thiol-disulfide exchange // *FEBS Lett*. 2003. Vol. 538. № 1–3. P. 48–52.
25. Heinze R.J., Sekerina S., Winkler I., Biertümpfel C., Oretskaya T.S., Kubareva E., Friedhoff P. Covalently trapping MutS on DNA to study DNA mismatch recognition and signaling // *Mol. Biosyst*. 2012. Vol. 8. № 7. P. 1861.
26. Романенков А.С., Устюгов А.А., Зацепин Т.С., Никулова А.А., Колесников И.В., Метелев В.Г., Орецкая Т.С. К.Е.А. Анализ белково-нуклеиновых контактов в комплексах фактора транскрипции NF-κB с ДНК // *Биохимия*. 2005. Т. 70. № 11. P. 1474–1487.

27. Перри С.А., Кубарева Е., Монахова М.В., Трикин Р.М., Косарецкий Е.М., Романова Е.А., Метелев В.Г., Фридрих П., Орецкая Т.С. ДНК с 2-пиридилдитиогруппой при С2'-атоме — перспективные инструменты для фиксации белка MutS с сохранением его функциональной активности // *Биоорган. химия*. 2021. Т. 47. № 2. С. 235-249.
28. Dadová J., Orság P., Pohl R., Brázdová M., Fojta M., Hocek M. Vinylsulfonamide and acrylamide modification of DNA for cross-linking with proteins // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2013. Vol. 52. № 40. P. 10515–10518.
29. Iyer R.R., Pluciennik A., Burdett V., Modrich P.L. DNA mismatch repair: functions and mechanisms // *Chem. Rev.* 2006. Vol. 106. № 2. P. 302–323.
30. Ijsselsteijn R., Jansen J.G., de Wind N. DNA mismatch repair-dependent DNA damage responses and cancer // *DNA Repair (Amst)*. 2020. Vol. 93. № 102923.
31. Fu D., Calvo J.A., Samson L.D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents // *Nature Reviews Cancer*. 2012. Vol. 12. № 2. P. 104-120.
32. Li G.M., Wang H., Romano L.J. Human MutS α specifically binds to DNA containing aminofluorene and acetylaminofluorene adducts // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. № 39. P. P24084-24088.
33. Mello J.A., Acharya S., Fishel R., Essigmann J.M. The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin // *Chem. Biol.* 1996. Vol. 3. № 7. P. 579–589.
34. Mazurek A., Berardini M., Fishel R. Activation of human MutS homologs by 8-oxo-guanine DNA damage // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. № 10. P. 8260–8266.
35. Smith-Roe S.L., Hegan D.C., Glazer P.M., Buermeier A.B. Mlh1-dependent suppression of specific mutations induced in vivo by the food-borne carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2006. Vol. 594. № 1–2. P. 101-112.
36. Glaab W.E., Skopek T.R. Cytotoxic and mutagenic response of mismatch repair-defective human cancer cells exposed to a food-associated heterocyclic amine // *Carcinogenesis*. 1999. Vol. 20. № 3. P. 391–394.
37. Møller P., Seppälä T.T., Bernstein I., Holinski-Feder E., Sala P., Evans D.G., Lindblom A., Macrae F., Blanco I., Sijmons R.H., Jeffries J., Vasen H.F.A., Burn J., Nakken S., Hovig E., Rødland E.A., Tharmaratnam K., De Vos Tot Nederveen Cappel W.H., Hill J., Wijnen J.T., Jenkins M.A., Green K., Lalloo F., Sunde L., Mints M., Bertario L., Pineda M., Navarro M., Morak M., Renkonen-Sinisalo L., Valentin M.D., Frayling I.M., Plazzer J.P., Pylvanainen K., Genuardi M., Mecklin J.P., Moeslein G., Sampson J.R., Capella G. Cancer risk and survival in

- path-MMR carriers by gene and gender up to 75 years of age: a report from the prospective Lynch syndrome database // *Gut*. 2018. Vol. 67. № 7. P. 1306-1316.
38. Møller P., Seppälä T., Bernstein I., Holinski-Feder E., Sala P., Evans D.G., Lindblom A., Macrae F., Blanco I., Sijmons R., Jeffries J., Vasen H., Burn J., Nakken S., Hovig E., Rødland E.A., Tharmaratnam K., de Vos tot Nederveen Cappel W.H., Hill J., Wijnen J., Green K., Lalloo F., Sunde L., Mints M., Bertario L., Pineda M., Navarro M., Morak M., Renkonen-Sinisalo L., Frayling I.M., Plazzer J.-P., Pylvanainen K., Sampson J.R., Capella G., Mecklin J.-P., Möslein G. Cancer incidence and survival in Lynch syndrome patients receiving colonoscopic and gynaecological surveillance: first report from the prospective Lynch syndrome database // *Gut*. 2017. Vol. 66. № 3. P. 464–472.
 39. Nagy R., Sweet K., Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes // *Oncogene*. 2004. Vol. 23. № 38. P. 6445–6470.
 40. Abedalthagafi M. Constitutional mismatch repair-deficiency: current problems and emerging therapeutic strategies // *Oncotarget*. 2018. Vol. 9. № 83. P. 35458–35469.
 41. Peltomäki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer // *J. Clin. Oncol*. 2003. Vol. 21. № 6. P. 1174–1179.
 42. Wang H., Lawrence C.W., Li G.-M., Hays J.B. Specific binding of human MSH2-MSH6 mismatch-repair protein heterodimers to DNA incorporating thymine- or uracil-containing UV light photoproducts opposite mismatched bases // *J. Biol. Chem*. 1999. Vol. 274. № 24. P. 16894–16900.
 43. Guarné A. The functions of MutL in mismatch repair // *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2012. Vol. 110. P. 41–70.
 44. Wildenberg J., Meselson M. Mismatch repair in heteroduplex DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1975. Vol. 72. № 6. P. 2202–2206.
 45. Wagner R., Meselson M. Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1976. Vol. 73. № 11. P. 4135–4139.
 46. Grilley M., Griffith J., Modrich P. Bidirectional excision in methyl-directed mismatch repair // *J. Biol. Chem*. 1993. Vol. 268. № 16. P. 11830–11837.
 47. Putnam C.D. Evolution of the methyl directed mismatch repair system in *Escherichia coli* // *DNA Repair (Amst)*. 2016. Vol. 38. P. 32–41.
 48. Hattman S., Brooks J.E., Masurekar M. Sequence specificity of the P1 modification methylase (M·Eco P1) and the DNA methylase (M·Eco dam) controlled by the *Escherichia coli dam* gene // *J. Mol. Biol*. 1978. Vol. 126. № 3. P. 367–380.

49. Pukkila P.J., Peterson J., Herman G., Modrich P., Meselson M. Effects of high levels of DNA adenine methylation on methyl-directed mismatch repair in *Escherichia coli* // *Genetics*. 1983. Vol. 104. № 4. P. 571–582.
50. Marinus M.G., Morris N.R. Biological function for 6-methyladenine residues in the DNA of *Escherichia coli* K-12 // *J. Mol. Biol.* 1974. Vol. 85. № 2. P. 309–322.
51. Herman G.E., Modrich P. *Escherichia coli* K-12 clones that overproduce dam methylase are hypermutable // *J. Bacteriol.* 1981. Vol. 145. № 1. P. 644–646.
52. Campbell J.L., Kleckner N. The rate of Dam-mediated DNA adenine methylation in *Escherichia coli* // *Gene*. 1988. Vol. 74. № 1. P. 189–190.
53. Stancheva I., Koller T., Sogo J.M. Asymmetry of Dam remethylation on the leading and lagging arms of plasmid replicative intermediates // *EMBO J.* 1999. Vol. 18. № 22. P. 6542–6551.
54. Ogden G.B., Pratt M.J., Schaechter M. The replicative origin of the *E. coli* chromosome binds to cell membranes only when hemimethylated // *Cell*. 1988. Vol. 54. № 1. P. 127–135.
55. Lamers M.H., Perrakis A., Enzlin J.H., Winterwerp H.H.K., de Wind N., Sixma T.K. The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G·T mismatch // *Nature*. 2000. Vol. 407. № 6805. P. 711–717.
56. Cho W.-K., Jeong C., Kim D., Chang M., Song K.-M., Hanne J., Ban C., Fishel R., Lee J.-B. ATP alters the diffusion mechanics of MutS on mismatched DNA // *Structure*. 2012. Vol. 20. № 7. P. 1264–1274.
57. Fernandez-Leiro R., Bhairosing-Kok D., Kunetsky V., Laffeber C., Winterwerp H.H., Groothuizen F., Fish A., Lebbink J.H.G., Friedhoff P., Sixma T.K., Lamers M.H. The selection process of licensing a DNA mismatch for repair // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2021. Vol. 28. № 4. P. 373–381.
58. Acharya S., Foster P.L., Brooks P., Fishel R. The coordinated functions of the *E. coli* MutS and MutL proteins in mismatch repair // *Mol. Cell*. 2003. Vol. 12. № 1. P. 233–246.
59. 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. DNA conformations in mismatch repair probed in solution by X-ray scattering from gold nanocrystals // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. Vol. 110. № 43. P. 17308–17313.
60. Dutta R., Inouye M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily // *Trends Biochem. Sci.* 2000. Vol. 25. P. 24–28.
61. Sancar A., Hearst J. Molecular matchmakers // *Science*. 1993. Vol. 259. № 5100. P. 1415–1420.
62. Mardenborough Y.S.N., Nitsenko K., Laffeber C., Duboc C., Sahin E., Quessada-Vial A., Winterwerp H.H.K., Sixma T.K., Kanaar R., Friedhoff P., Strick T.R., Lebbink J.H.G. The

- unstructured linker arms of MutL enable GATC site incision beyond roadblocks during initiation of DNA mismatch repair // *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47. № 22. P. 11667–11680.
63. Au K.G., Welsh K., Modrich P. Initiation of methyl-directed mismatch repair // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. P. 12142–12148.
 64. Ban C. Structural basis for MutH activation in *E. coli* mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases // *EMBO J.* 1998. Vol. 17. № 5. P. 1526–1534.
 65. Lee J.Y., Chang J., Joseph N., Ghirlando R., Rao D.N., Yang W. MutH complexed with hemi- and unmethylated DNAs: coupling base recognition and DNA cleavage // *Mol. Cell.* 2005. Vol. 20. № 1. P. 155–166.
 66. Friedhoff P., Thomas E., Pingoud A. Tyr212: a key residue involved in strand discrimination by the DNA mismatch repair endonuclease MutH // *J. Mol. Biol.* 2003. Vol. 325. № 2. P. 285–297.
 67. Ahrends R. Identifying an interaction site between MutH and the C-terminal domain of MutL by crosslinking, affinity purification, chemical coding and mass spectrometry // *Nucleic Acids Res.* 2006. Vol. 34. № 10. P. 3169–3180.
 68. Hall M.C., Matson S.W. The *Escherichia coli* MutL protein physically interacts with MutH and stimulates the MutH-associated endonuclease activity // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. № 3. P. 1306–1312.
 69. Welsh K.M., Lu A.L., Clark S., Modrich P. Isolation and characterization of the *Escherichia coli mutH* gene product. // *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262. № 32. P. 15624–15629.
 70. Robertson A.B., Pattishall S.R., Gibbons E.A., Matson S.W. MutL-catalyzed ATP hydrolysis is required at a post-UvrD loading step in methyl-directed mismatch repair // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. № 29. P. 19949–19959.
 71. Hall M.C. Evidence for a physical interaction between the *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair proteins MutL and UvrD // *EMBO J.* 1998. Vol. 17. № 5. P. 1535–1541.
 72. Yamaguchi M., Dao V., Modrich P. MutS and MutL activate DNA helicase II in a mismatch-dependent manner // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. № 15. P. 9197–9201.
 73. Lopez de Saro F.J., O'Donnell M. Interaction of the sliding clamp with MutS, ligase, and DNA polymerase I // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001. Vol. 98. № 15. P. 8376–8380.
 74. Correa E.M.E., Martina M.A., De Tullio L., Argaraña C.E., Barra J.L. Some amino acids of the *Pseudomonas aeruginosa* MutL D(Q/M)HA(X)2E(X)4E conserved motif are essential for the in vivo function of the protein but not for the in vitro endonuclease activity // *DNA Repair (Amst).* 2011. Vol. 10. № 11. P. 1106–1113.

75. Duppatta V., Bodda C., Urbanke C., Friedhoff P., Rao D.N. The C-terminal domain is sufficient for endonuclease activity of *Neisseria gonorrhoeae* MutL // *Biochem. J.* 2009. Vol. 423. № 2. P. 265–277.
76. Iino H., Kim K., Shimada A., Masui R., Kuramitsu S., Fukui K. Characterization of C- and N-terminal domains of *Aquifex aeolicus* MutL endonuclease: N-terminal domain stimulates the endonuclease activity of C-terminal domain in a zinc-dependent manner // *Biosci. Rep.* 2011. Vol. 31. № 5. P. 309–322.
77. Fukui K., Nishida M., Nakagawa N., Masui R., Kuramitsu S. Bound nucleotide controls the endonuclease activity of mismatch repair enzyme MutL // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. № 18. P. 12136–12145.
78. 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. P. 281–293.
79. Bende S.M., Grafström R.H. The DNA binding properties of the MutL protein isolated from *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Res.* 1991. Vol. 19. P. 1549–1555.
80. Drotschmann K., Hall M.C., Shcherbakova P. V., Wang H., Erie D.A., Brownnewell F.R., Kool E.T., Kunkel T.A. DNA binding properties of the yeast MSH2-MSH6 and MLH1-PMS1 heterodimers // *Biol. Chem.* 2002. Vol. 383. P. 969–975.
81. Drummond J., Li G., Longley M., Modrich P. Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells // *Science.* 1995. Vol. 268. № 5219. P. 1909–1912.
82. Li G.M., Modrich P. Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995. Vol. 92. № 6. P. 1950–1954.
83. Strand M., Prolla T.A., Liskay R.M., Petes T.D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair // *Nature.* 1993. Vol. 365. № 6443. P. 274–276.
84. Harfe B.D., Jinks-Robertson S. DNA mismatch repair and genetic instability // *Annu. Rev. Genet.* 2000. Vol. 34. № 1. P. 359–399.
85. McCulloch S.D., Gu L., Li G.-M. Bi-directional processing of DNA loops by mismatch repair-dependent and -independent pathways in human cells // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. № 6. P. 3891–3896.
86. Fishel R. Mismatch repair // *J. Biol. Chem.* 2015. Vol. 290. № 44. P. 26395–26403.
87. Molloy S. MutS2: key to diversity? // *Nat. Rev. Microbiol.* 2005. Vol. 3. № 3. P. 191–191.

88. Bowen N., Smith C.E., Srivatsan A., Willcox S., Griffith J.D., Kolodner R.D. Reconstitution of long and short patch mismatch repair reactions using *Saccharomyces cerevisiae* proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2013. Vol. 110. № 46. P. 18472–18477.
89. Szankasi P., Smith G. A role for exonuclease I from *S. pombe* in mutation avoidance and mismatch correction // Science. 1995. Vol. 267. № 5201. P. 1166–1169.
90. Tishkoff D.X., Boerger A.L., Bertrand P., Filosi N., Gaida G.M., Kane M.F., Kolodner R.D. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* EXO1, a gene encoding an exonuclease that interacts with MSH2 // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1997. Vol. 94. № 14. P. 7487–7492.
91. Genschel J., Bazemore L.R., Modrich P. Human exonuclease I is required for 5' and 3' mismatch repair // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. № 15. P. 13302–13311.
92. Umar A., Buermeier A.B., Simon J.A., Thomas D.C., Clark A.B., Liskay R.M., Kunkel T.A. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis // Cell. 1996. Vol. 87. № 1. P. 65–73.
93. Johnson R.E., Kovvali G.K., Guzder S.N., Amin N.S., Holm C., Habraken Y., Sung P., Prakash L., Prakash S. Evidence for involvement of yeast proliferating cell nuclear antigen in DNA mismatch repair // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271. № 45. P. 27987–27990.
94. Amin N.S., Nguyen M.-N., Oh S., Kolodner R.D. *exo1*-dependent mutator mutations: model system for studying functional interactions in mismatch repair // Mol. Cell. Biol. 2001. Vol. 21. № 15. P. 5142–5155.
95. Genschel J., Modrich P. Mechanism of 5'-directed excision in human mismatch repair // Mol. Cell. 2003. Vol. 12. № 5. P. 1077–1086.
96. Dzantiev L., Constantin N., Genschel J., Iyer R.R., Burgers P.M., Modrich P. A defined human system that supports bidirectional mismatch-provoked excision // Mol. Cell. 2004. Vol. 15. P. 31–41.
97. Lin Y.-L., Shivji M.K.K., Chen C., Kolodner R., Wood R.D., Dutta A. The evolutionarily conserved zinc finger motif in the largest subunit of human replication protein A is required for DNA replication and mismatch repair but not for nucleotide excision repair // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. № 3. P. 1453–1461.
98. Ramilo C., Gu L., Guo S., Zhang X., Patrick S.M., Turchi J.J., Li G.-M. Partial reconstitution of human DNA mismatch repair *in vitro*: characterization of the role of human replication protein A // Mol. Cell. Biol. 2002. Vol. 22. № 7. P. 2037–2046.
99. Zhang Y., Yuan F., Presnell S.R., Tian K., Gao Y., Tomkinson A.E., Gu L., Li G.-M. Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system // Cell. 2005. Vol. 122. № 5. P. 693–705.

100. Longley M.J., Pierce A.J., Modrich P. DNA polymerase δ is required for human mismatch repair *in vitro* // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. № 16. P. 10917–10921.
101. Constantin N., Dzantiev L., Kadyrov F.A., Modrich P. Human mismatch repair // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280. № 48. P. 39752–39761.
102. Kadyrov F.A., Genschel J., Fang Y., Penland E., Edelmann W., Modrich P. A possible mechanism for exonuclease 1-independent eukaryotic mismatch repair // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009. Vol. 106. № 21. P. 8495–8500.
103. Flores-Rozas H., Kolodner R.D. The *Saccharomyces cerevisiae* MLH3 gene functions in MSH3-dependent suppression of frameshift mutations // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1998. Vol. 95. № 21. P. 12404–12409.
104. Nishant K.T., Plys A.J., Alani E. A mutation in the putative MLH3 endonuclease domain confers a defect in both mismatch repair and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 2008. Vol. 179. № 2. P. 747–755.
105. Cannavo E., Marra G., Sabates-Bellver J., Menigatti M., Lipkin S.M., Fischer F., Cejka P., Jiricny J. Expression of the MutL homologue hMLH3 in human cells and its role in DNA mismatch repair // Cancer Res. 2005. Vol. 65. № 23. P. 10759–10766.
106. Ghodgaonkar M.M., Lazzaro F., Olivera-Pimentel M., Artola-Borán M., Cejka P., Reijns M.A., Jackson A.P., Plevani P., Muzi-Falconi M., Jiricny J. Ribonucleotides misincorporated into DNA act as strand-discrimination signals in eukaryotic mismatch repair // Mol. Cell. 2013. Vol. 50. № 3. P. 323–332.
107. Lujan S.A., Williams J.S., Clausen A.R., Clark A.B., Kunkel T.A. Ribonucleotides are signals for mismatch repair of leading-strand replication errors // Mol. Cell. 2013. Vol. 50. № 3. P. 437–443.
108. Liu Y., Kadyrov F.A., Modrich P. PARP-1 enhances the mismatch-dependence of 5'-directed excision in human mismatch repair *in vitro* // DNA Repair (Amst). 2011. Vol. 10. № 11. P. 1145–1153.
109. Kadyrova L.Y., Blanko E.R., Kadyrov F.A. CAF-I-dependent control of degradation of the discontinuous strands during mismatch repair // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2011. Vol. 108. № 7. P. 2753–2758.
110. Schöpf B., Bregenhorn S., Quivy J.-P., Kadyrov F.A., Almouzni G., Jiricny J. Interplay between mismatch repair and chromatin assembly // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012. Vol. 109. № 6. P. 1895–1900.
111. Li F., Mao G., Tong D., Huang J., Gu L., Yang W., Li G.-M. The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutS α // Cell. 2013. Vol. 153. № 3. P. 590–600.

112. Kadyrov F.A., Dzantiev L., Constantin N., Modrich P. Endonucleolytic function of MutL α in human mismatch repair // *Cell*. 2006. Vol. 126. № 2. P. 297–308.
113. Kadyrova L.Y., Kadyrov F.A. Endonuclease activities of MutL α and its homologs in DNA mismatch repair // *DNA Repair (Amst)*. 2016. Vol. 38. P. 42–49.
114. Liu D., Keijzers G., Rasmussen L.J. DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells // *Mutat. Res. Mutat. Res.* 2017. Vol. 773. P. 174–187.
115. Allen D.J., Makhov A., Grilley M., Taylor J., Thresher R., Modrich P., Griffith J.D. MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism // *EMBO J.* 1997. Vol. 16. № 14. P. 4467–4476.
116. Blackwell L.J., Bjornson K.P., Modrich P. DNA-dependent activation of the hMutS α ATPase // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. № 48. P. 32049–32054.
117. Gradia S., Acharya S., Fishel R. The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch // *Cell*. 1997. Vol. 91. № 7. P. 995–1005.
118. Gradia S., Subramanian D., Wilson T., Acharya S., Makhov A., Griffith J., Fishel R. hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA // *Mol. Cell*. 1999. Vol. 3. № 2. P. 255–261.
119. Fishel R., Acharya S., Berardini M., Bocker T., Charbonneau N., Cranston A., Gradia S., Guerrette S., Heinen C.D., Mazurek A., Snowden T., Schmutte C., Shim K.-S., Tomblin G., Wilson T. Signaling mismatch repair: the mechanics of an adenosine-nucleotide molecular switch // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2000. Vol. 65. P. 217–224.
120. Pluciennik A., Modrich P. Protein roadblocks and helix discontinuities are barriers to the initiation of mismatch repair // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Vol. 104. № 31. P. 12709–12713.
121. Перевозчикова С.А. Характеристика начальных этапов функционирования системы репарации ДНК-«мисматчей» *Escherichia coli* с использованием модифицированных ДНК // Дисс. ...канд. хим. наук: 02.00.10. Москва. 2013. 170 с.
122. Qiu R., DeRocco V.C., Harris C., Sharma A., Hingorani M.M., Erie D.A., Weninger K.R. Large conformational changes in MutS during DNA scanning, mismatch recognition and repair signalling // *EMBO J.* 2012. Vol. 31. № 11. P. 2528–2540.
123. Hopfner K. Rad50/SMC proteins and ABC transporters: unifying concepts from high-resolution structures // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2003. Vol. 13. № 2. P. 249–255.
124. Lamers M.H., Georgijevic D., Lebbink J.H., Winterwerp H.H.K., Agianian B., de Wind N., Sixma T.K. ATP increases the affinity between MutS ATPase domains // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. № 42. P. 43879–43885.

125. Kunkel T.A., Erie D.A. DNA mismatch repair // *Annu. Rev. Biochem.* 2005. Vol. 74. № 1. P. 681–710.
126. Modrich P. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. № 41. P. 30305–30309.
127. Li G.-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair // *Cell Res.* 2008. Vol. 18. № 1. P. 85–98.
128. Warren J.J., Pohlhaus T.J., Changela A., Iyer R.R., Modrich P.L., Beese L.S. Structure of the human MutS α DNA lesion recognition complex // *Mol. Cell.* 2007. Vol. 26. № 4. P. 579–592.
129. Gupta S., Gellert M., Yang W. Mechanism of mismatch recognition revealed by human MutS β bound to unpaired DNA loops // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012. Vol. 19. № 1. P. 72–78.
130. Mendillo M.L., Hargreaves V. V., Jamison J.W., Mo A.O., Li S., Putnam C.D., Woods V.L., Kolodner R.D. A conserved MutS homolog connector domain interface interacts with MutL homologs // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. Vol. 106. № 52. P. 22223–22228.
131. Lenhart J.S., Pillon M.C., Guarné A., Simmons L.A. Trapping and visualizing intermediate steps in the mismatch repair pathway in vivo // *Mol. Microbiol.* 2013. Vol. 90. № 4. P. 680–698.
132. Biswas I., Obmolova G., Takahashi M., Herr A., Newman M.A., Yang W., Hsieh P. Disruption of the helix-u-turn-helix motif of MutS protein: loss of subunit dimerization, mismatch binding and ATP hydrolysis // *J. Mol. Biol.* 2001. Vol. 305. № 4. P. 805–816.
133. 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. Using stable MutS dimers and tetramers to quantitatively analyze DNA mismatch recognition and sliding clamp formation // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41. № 17. P. 8166–8181.
134. Bjornson K.P., Blackwell L.J., Sage H., Baitinger C., Allen D., Modrich P. Assembly and molecular activities of the MutS tetramer // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. № 36. P. 34667–34673.
135. Calmann M.A. Separation of mutation avoidance and antirecombination functions in an *Escherichia coli* MutS mutant // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33. № 4. P. 1193–1200.
136. Mendillo M.L., Putnam C.D., Kolodner R.D. *Escherichia coli* MutS tetramerization domain structure reveals that stable dimers but not tetramers are essential for DNA mismatch repair *in vivo* // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282. № 22. P. 16345–16354.
137. Manelyte L., Urbanke C., Giron-Monzon L., Friedhoff P. Structural and functional analysis of the MutS C-terminal tetramerization domain // *Nucleic Acids Res.* 2006. Vol. 34. № 18. P. 5270–5279.

138. Lamers M.H. The alternating ATPase domains of MutS control DNA mismatch repair // *EMBO J.* 2003. Vol. 22. № 3. P. 746–756.
139. Antony E., Hingorani M.M. Mismatch recognition-coupled stabilization of MSH2-MSH6 in an ATP-bound state at the initiation of DNA repair // *Biochemistry.* 2003. Vol. 42. № 25. P. 7682–7693.
140. Antony E., Hingorani M.M. Asymmetric ATP binding and hydrolysis activity of the *Thermus aquaticus* MutS dimer is key to modulation of its interactions with mismatched DNA // *Biochemistry.* 2004. Vol. 43. P. 13115–13128.
141. Hingorani M.M. Mismatch binding, ADP–ATP exchange and intramolecular signaling during mismatch repair // *DNA Repair (Amst).* 2016. Vol. 38. P. 24–31.
142. Hao P., LeBlanc S.J., Case B.C., Elston T.C., Hingorani M.M., Erie D.A., Weninger K.R. Recurrent mismatch binding by MutS mobile clamps on DNA localizes repair complexes nearby // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020. Vol. 117. № 30. P. 17775–17784.
143. LeBlanc S.J., Gauer J.W., Hao P., Case B.C., Hingorani M.M., Weninger K.R., Erie D.A. Coordinated protein and DNA conformational changes govern mismatch repair initiation by MutS // *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46. № 20. P. 10782–10795.
144. Jacobs-Palmer E., Hingorani M.M. The effects of nucleotides on MutS-DNA binding kinetics clarify the role of MutS ATPase activity in mismatch repair // *J. Mol. Biol.* 2007. Vol. 366. № 4. P. 1087–1098.
145. Heinen C.D., Cyr J.L., Cook C., Punja N., Sakato M., Forties R.A., Lopez J.M., Hingorani M.M., Fishel R. Human MSH2 (hMSH2) protein controls ATP processing by hMSH2-hMSH6 // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286. № 46. P. 40287–40295.
146. Monti M.C., Cohen S.X., Fish A., Winterwerp H.H.K., Barendregt A., Friedhoff P., Perrakis A., Heck A.J.R., Sixma T.K., van den Heuvel R.H.H., Lebbink J.H.G. Native mass spectrometry provides direct evidence for DNA mismatch-induced regulation of asymmetric nucleotide binding in mismatch repair protein MutS // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol. 39. № 18. P. 8052–8064.
147. Antony E., Khubchandani S., Chen S., Hingorani M.M. Contribution of MSH2 and MSH6 subunits to the asymmetric ATPase and DNA mismatch binding activities of *Saccharomyces cerevisiae* MSH2–MSH6 mismatch repair protein // *DNA Repair (Amst).* 2006. Vol. 5. № 2. P. 153–162.
148. Mazur D.J., Mendillo M.L., Kolodner R.D. Inhibition of MSH6 ATPase activity by mispaired DNA induces a MSH2(ATP)-MSH6(ATP) state capable of hydrolysis-independent movement along DNA // *Mol. Cell.* 2006. Vol. 22. № 1. P. 39–49.

149. Borsellini A., Kunetsky V., Friedhoff P., Lamers M.H. Cryogenic electron microscopy structures reveal how ATP and DNA binding in MutS coordinates sequential steps of DNA mismatch repair // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2022. Vol. 29. № 1. P. 59–66.
150. Nirwal S., Kulkarni D.S., Sharma A., Rao D.N., Nair D.T. Mechanism of formation of a toroid around DNA by the mismatch sensor protein // *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46. № 1. P. 256–266.
151. Bhairosing-Kok D., Groothuizen F.S., Fish A., Dharadhar S., Winterwerp H.H.K., Sixma T.K. Sharp kinking of a coiled-coil in MutS allows DNA binding and release // *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47. № 16. P. 8888–8898.
152. Jeong C., Cho W.-K., Song K.-M., Cook C., Yoon T.-Y., Ban C., Fishel R., Lee J.-B. MutS switches between two fundamentally distinct clamps during mismatch repair // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011. Vol. 18. № 3. P. 379–385.
153. Kato R., Kataoka M., Kamikubo H., Kuramitsu S. Direct observation of three conformations of MutS protein regulated by adenine nucleotides // *J. Mol. Biol.* 2001. Vol. 309. № 1. P. 227–238.
154. Hura G.L., Budworth H., Dyer K.N., Rambo R.P., Hammel M., McMurray C.T., Tainer J.A. Comprehensive macromolecular conformations mapped by quantitative SAXS analyses // *Nat. Methods.* 2013. Vol. 10. № 6. P. 453–454.
155. Sharma A., Doucette C., Biro F.N., Hingorani M.M. Slow conformational changes in MutS and DNA direct ordered transitions between mismatch search, recognition and signaling of DNA repair // *J. Mol. Biol.* 2013. Vol. 425. № 22. P. 4192–4205.
156. Hol W.G.J. The role of the α -helix dipole in protein function and structure // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1985. Vol. 45. № 3. P. 149–195.
157. Acharya S. Mutations in the signature motif in MutS affect ATP-induced clamp formation and mismatch repair // *Mol. Microbiol.* 2008. Vol. 69. № 6. P. 1544–1559.
158. Hopfner K.P., Karcher A., Shin D.S., Craig L., Arthur L.M., Carney J.P., Tainer J.A. Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily // *Cell.* 2000. Vol. 101. № 7. P. 789–800
159. Zhou Y., Ojeda-May P., Pu J. H-loop histidine catalyzes ATP hydrolysis in the *E. coli* ABC-transporter HlyB // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2013. Vol. 15. № 38. P. 15811.
160. Natrajan G. Structures of *Escherichia coli* DNA mismatch repair enzyme MutS in complex with different mismatches: a common recognition mode for diverse substrates // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31. № 16. P. 4814–4821.

161. Lebbink J.H.G., Georgijevic D., Natrajan G., Fish A., Winterwerp H.H.K., Sixma T.K., de Wind N. Dual role of MutS glutamate 38 in DNA mismatch discrimination and in the authorization of repair // *EMBO J.* 2006. Vol. 25. № 2. P. 409–419.
162. Yamamoto A. Requirement for Phe36 for DNA binding and mismatch repair by *Escherichia coli* MutS protein // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28. № 18. P. 3564–3569.
163. Junop M. *In vitro* and *in vivo* studies of MutS, MutL and MutH mutants: correlation of mismatch repair and DNA recombination // *DNA Repair (Amst).* 2003. Vol. 2. № 4. P. 387–405.
164. Schofield M.J., Nayak S., Scott T.H., Du C., Hsieh P. Interaction of *Escherichia coli* MutS and MutL at a DNA mismatch // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. № 30. P. 28291–28299
165. Manhart C.M., Alani E. Roles for mismatch repair family proteins in promoting meiotic crossing over // *DNA Repair (Amst).* 2016. Vol. 38. P. 84–93.
166. Zakharyevich K., Tang S., Ma Y., Hunter N. Delineation of joint molecule resolution pathways in meiosis identifies a crossover-specific resolvase // *Cell.* 2012. Vol. 149. № 2. P. 334–347.
167. Ranjha L., Anand R., Cejka P. The *Saccharomyces cerevisiae* MLH1-MLH3 heterodimer is an endonuclease that preferentially binds to Holliday junctions // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289. № 9. P. 5674–5686.
168. Duroc Y., Kumar R., Ranjha L., Adam C., Guérois R., Md Muntaz K., Marsolier-Kergoat M.-C., Dingli F., Laureau R., Loew D., Llorente B., Charbonnier J.-B., Cejka P., Borde V. Concerted action of the MutL β heterodimer and Mer3 helicase regulates the global extent of meiotic gene conversion // *Elife.* 2017. Vol. 6. P. e21900.
169. Gomes-Pereira M. PMS2 is a genetic enhancer of trinucleotide CAG•CTG repeat somatic mosaicism: implications for the mechanism of triplet repeat expansion // *Hum. Mol. Genet.* 2004. Vol. 13. № 16. P. 1815–1825.
170. Pluciennik A., Burdett V., Baitinger C., Iyer R.R., Shi K., Modrich P. Extrahelical (CAG)/(CTG) triplet repeat elements support proliferating cell nuclear antigen loading and MutL endonuclease activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. Vol. 110. № 30. P. 12277–12282.
171. Pinto R.M., Dragileva E., Kirby A., Lloret A., Lopez E., St. Claire J., Panigrahi G.B., Hou C., Holloway K., Gillis T., Guide J.R., Cohen P.E., Li G.-M., Pearson C.E., Daly M.J., Wheeler V.C. Mismatch repair genes MLH1 and MLH3 modify CAG instability in Huntington's disease mice: genome-wide and candidate approaches // *PLoS Genet.* 2013. Vol. 9. № 10. P. e1003930.

172. Halabi A., Fuselier K.T.B., Grabczyk E. GAA•TTC repeat expansion in human cells is mediated by mismatch repair complex MutL γ and depends upon the endonuclease domain in MLH3 isoform one // *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46. № 8. P. 4022–4032.
173. Zhao X., Zhang Y., Wilkins K., Edelmann W., Usdin K. MutL γ promotes repeat expansion in a Fragile X mouse model while EXO1 is protective // *PLOS Genet.* 2018. Vol. 14. № 10. P. e1007719.
174. Lee J.-M., Correia K., Loupe J., Kim K.-H., Barker D., Hong E.P., Chao M.J., Long J.D., Lucente D., Vonsattel J.P.G., Pinto R.M., Abu Elneel K., Ramos E.M., Mysore J.S., Gillis T., Wheeler V.C., MacDonald M.E., Gusella J.F., McAllister B., Massey T., Medway C., Stone T.C., Hall L., Jones L., Holmans P., Kwak S., Ehrhardt A.G., Sampaio C., Ciosi M., Maxwell A., Chatzi A., Monckton D.G., Orth M., Landwehrmeyer G.B., Paulsen J.S., Dorsey E.R., Shoulson I., Myers R.H. CAG repeat not polyglutamine length determines timing of Huntington's disease onset // *Cell.* 2019. Vol. 178. № 4. P. 887-900.e14.
175. Ciosi M., Maxwell A., Cumming S.A., Hensman Moss D.J., Alshammari A.M., Flower M.D., Durr A., Leavitt B.R., Roos R.A.C., Holmans P., Jones L., Langbehn D.R., Kwak S., Tabrizi S.J., Monckton D.G. A genetic association study of glutamine-encoding DNA sequence structures, somatic CAG expansion, and DNA repair gene variants, with Huntington disease clinical outcomes // *EBioMedicine.* 2019. Vol. 48. P. 568–580.
176. Kadyrova L.Y., Gujar V., Burdett V., Modrich P.L., Kadyrov F.A. Human MutL γ , the MLH1–MLH3 heterodimer, is an endonuclease that promotes DNA expansion // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020. Vol. 117. № 7. P. 3535–3542.
177. Guarné A., Charbonnier J.-B. Insights from a decade of biophysical studies on MutL: roles in strand discrimination and mismatch removal // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2015. Vol. 117. № 2–3. P. 149–156.
178. Groothuizen F.S., Sixma T.K. The conserved molecular machinery in DNA mismatch repair enzyme structures // *DNA Repair.* 2016. Vol. 38. P. 14–23.
179. Guarne A. Structure and function of the N-terminal 40 kDa fragment of human PMS2: a monomeric GHL ATPase // *EMBO J.* 2001. Vol. 20. № 19. P. 5521–5531.
180. Ban C., Junop M., Yang W. Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis // *Cell.* 1999. Vol. 97. № 1. P. 85–97.
181. Arana M.E., Holmes S.F., Fortune J.M., Moon A.F., Pedersen L.C., Kunkel T.A. Functional residues on the surface of the N-terminal domain of yeast PMS1 // *DNA Repair (Amst).* 2010. Vol. 9. № 4. P. 448–457.
182. Banasik M., Sachadyn P. Conserved motifs of MutL proteins // *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 2014. Vol. 769. P. 69–79.

183. Räschle M., Dufner P., Marra G., Jiricny J. Mutations within the hMLH1 and hPMS2 subunits of the human MutL α mismatch repair factor affect its ATPase activity, but not its ability to interact with hMutS α // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. № 24. P. 21810–21820.
184. Yang W. Structure and function of mismatch repair proteins // *Mutat. Res. Repair.* 2000. Vol. 460. № 3–4. P. 245–256.
185. Sacho E.J., Kadyrov F.A., Modrich P., Kunkel T.A., Erie D.A. Direct visualization of asymmetric adenine nucleotide-induced conformational changes in MutL α // *Mol. Cell.* 2008. Vol. 29. № 1. P. 112–121.
186. Schopf F.H., Biebl M.M., Buchner J. The HSP90 chaperone machinery // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. Vol. 18. № 6. P. 345–360.
187. Polosina Y.Y., Cupples C.G. MutL: conducting the cell's response to mismatched and misaligned DNA // *BioEssays.* 2010. Vol. 32. № 1. P. 51–59.
188. Mauris J., Evans T.C. Adenosine triphosphate stimulates *Aquifex aeolicus* MutL endonuclease activity // *PLoS One.* 2009. Vol. 4. № 9. P. e7175.
189. Schorzman A.N., Perera L., Cutalo-Patterson J.M., Pedersen L.C., Pedersen L.G., Kunkel T.A., Tomer K.B. Modeling of the DNA-binding site of yeast PMS1 by mass spectrometry // *DNA Repair (Amst).* 2011. Vol. 10. № 5. P. 454–465.
190. Hall M.C., Wang H., Erie D.A., Kunkel T.A. High affinity cooperative DNA binding by the yeast MLH1-PMS1 heterodimer // *J. Mol. Biol.* 2001. Vol. 312. № 4. P. 637–647.
191. Robertson A., Pattishall S.R., Matson S.W. The DNA binding activity of MutL is required for methyl-directed mismatch repair in *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. № 13. P. 8399–8408.
192. 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. Vol. 171–172. P. 43–54.
193. Bjornson K.P., Allen D.J., Modrich P. Modulation of MutS ATP hydrolysis by DNA cofactors // *Biochemistry.* 2000. Vol. 39. № 11. P. 3176–3183.
194. Argueso J.L., Kijas A.W., Sarin S., Heck J., Waase M., Alani E. Systematic mutagenesis of the *Saccharomyces cerevisiae* MLH1 gene reveals distinct roles for MLH1p in meiotic crossing over and in vegetative and meiotic mismatch repair // *Mol. Cell. Biol.* 2003. Vol. 23. № 3. P. 873–886.
195. London J., Martín-López J., Yang I., Liu J., Lee J.-B., Fishel R. Linker domain function predicts pathogenic MLH1 missense variants // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2021. Vol. 118. № 9.

196. Kim Y., Furman C.M., Manhart C.M., Alani E., Finkelstein I.J. Intrinsically disordered regions regulate both catalytic and non-catalytic activities of the MutL α mismatch repair complex // *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 47. № 4. P. e2019215118.
197. Brieger A., Plotz G., Raedle J., Weber N., Baum W., Caspary W.F., Zeuzem S., Trojan J. Characterization of the nuclear import of human MutL? // *Mol. Carcinog.* 2005. Vol. 43. № 1. P. 51–58.
198. Leong V., Lorenowicz J., Kozij N., Guarné A. Nuclear import of human MLH1, PMS2, and MutL α : redundancy is the key // *Mol. Carcinog.* 2009. Vol. 48. № 8. P. 742–750.
199. Wu X., Platt J.L., Cascalho M. Dimerization of MLH1 and PMS2 limits nuclear localization of MutL α // *Mol. Cell. Biol.* 2003. Vol. 23. № 9. P. 3320–3328.
200. Gueneau E., Dherin C., Legrand P., Tellier-Lebegue C., Gilquin B., Bonnesoeur P., Londino F., Quemener C., Le Du M.-H., Márquez J.A., Moutiez M., Gondry M., Boiteux S., Charbonnier J.-B. Structure of the MutL α C-terminal domain reveals how MLH1 contributes to PMS1 endonuclease site // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. Vol. 20. № 4. P. 461–468.
201. Kadyrov F.A., Holmes S.F., Arana M.E., Lukianova O.A., O'Donnell M., Kunkel T.A., Modrich P. *Saccharomyces cerevisiae* MutL α is a mismatch repair endonuclease // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282. № 51. P. 37181–37190.
202. Kosinski J., Plotz G., Guarné A., Bujnicki J.M., Friedhoff P. The PMS2 subunit of human MutL α contains a metal ion binding domain of the iron-dependent repressor protein family // *J. Mol. Biol.* 2008. Vol. 382. № 3. P. 610–627.
203. Erdeniz N., Nguyen M., Deschênes S.M., Liskay R.M. Mutations affecting a putative MutL α endonuclease motif impact multiple mismatch repair functions // *DNA Repair (Amst).* 2007. Vol. 6. № 10. P. 1463–1470.
204. Yang W. An equivalent metal ion in one- and two-metal-ion catalysis // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008. Vol. 15. № 11. P. 1228–1231.
205. Stapleton B., Walker L.R., Logan T.M. Zn(II) stimulation of Fe(II)-activated repression in the iron-dependent repressor from *Mycobacterium tuberculosis* // *Biochemistry.* 2013. Vol. 52. № 11. P. 1927–1938.
206. Namadurai S., Jain D., Kulkarni D.S., Tabib C.R., Friedhoff P., Rao D.N., Nair D.T. The C-terminal domain of the MutL homolog from *Neisseria gonorrhoeae* forms an inverted homodimer // *PLoS One.* 2010. Vol. 5. № 10. P. e13726.
207. Fukui K., Baba S., Kumasaka T., Yano T. Multiple zinc ions maintain the open conformation of the catalytic site in the DNA mismatch repair endonuclease MutL from *Aquifex aeolicus* // *FEBS Lett.* 2018. Vol. 592. № 9. P. 1611–1619.

208. Fukui K., Baba S., Kumasaka T., Yano T. Structural features and functional dependency on β -clamp define distinct subfamilies of bacterial mismatch repair endonuclease MutL // *J. Biol. Chem.* 2016. Vol. 291. № 33. P. 16990–17000.
209. Pluciennik A., Dzantiev L., Iyer R.R., Constantin N., Kadyrov F.A., Modrich P. PCNA function in the activation and strand direction of MutL α endonuclease in mismatch repair // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010. Vol. 107. № 37. P. 16066–16071.
210. Moldovan G.-L., Pfander B., Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork // *Cell.* 2007. Vol. 129. № 4. P. 665–679.
211. Mossi R., Jónsson Z.O., Allen B.L., Hardin S.H., Hübscher U. Replication factor C interacts with the C-terminal side of proliferating cell nuclear antigen // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. № 3. P. 1769–1776.
212. Clark A.B., Valle F., Drotschmann K., Gary R.K., Kunkel T.A. Functional interaction of proliferating cell nuclear antigen with MSH2-MSH6 and MSH2-MSH3 complexes // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. № 47. P. 36498–36501.
213. Genschel J., Kadyrova L.Y., Iyer R.R., Dahal B.K., Kadyrov F.A., Modrich P. Interaction of proliferating cell nuclear antigen with PMS2 is required for MutL α activation and function in mismatch repair // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2017. Vol. 114. № 19. P. 4930–4935.
214. Friedhoff P., Li P., Gotthardt J. Protein-protein interactions in DNA mismatch repair // *DNA Repair (Amst).* 2016. Vol. 38. P. 50–57.
215. Pillon M.C., Babu V.M.P., Randall J.R., Cai J., Simmons L.A., Sutton M.D., Guarné A. The sliding clamp tethers the endonuclease domain of MutL to DNA // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43. № 22. P. 10746–10759.
216. Pillon M.C., Miller J.H., Guarné A. The endonuclease domain of MutL interacts with the β sliding clamp // *DNA Repair (Amst).* 2011. Vol. 10. № 1. P. 87–93.
217. Liu L., Ortiz Castro M.C., Rodríguez González J., Pillon M.C., Guarné A. The endonuclease domain of *Bacillus subtilis* MutL is functionally asymmetric // *DNA Repair (Amst).* 2019. Vol. 73. P. 1–6.
218. Shimada A., Kawasoe Y., Hata Y., Takahashi T.S., Masui R., Kuramitsu S., Fukui K. MutS stimulates the endonuclease activity of MutL in an ATP-hydrolysis-dependent manner // *FEBS J.* 2013. Vol. 280. № 14. P. 3467–3479.
219. Farzan V.M., Ulashchik E.A., Martynenko-Makaev Y. V., Kvach M. V., Aparin I.O., Brylev V.A., Prikazchikova T.A., Maklakova S.Y., Majouga A.G., Ustinov A. V., Shipulin G.A., Shmanai V. V., Korshun V.A., Zatsepin T.S. Automated solid-phase click synthesis of oligonucleotide conjugates: from small molecules to diverse N-acetylgalactosamine clusters // *Bioconjug. Chem.* 2017. Vol. 28. № 10. P. 2599–2607.

220. Feng G., Winkler M.E. Single-step purifications of His6-MutH, His6-MutL and His6-MutS repair proteins of *Escherichia coli* K-12 // *Biotechniques*. 1995. Vol. 19. № 6. P. 956–965.
221. Lahue R., Au K., Modrich P. DNA mismatch correction in a defined system // *Science*. 1989. Vol. 245. № 4914. P. 160–164.
222. Heinze R.J., Giron-Monzon L., Solovyova A., Elliot S.L., Geisler S., Cupples C.G., Connolly B.A., Friedhoff P. Physical and functional interactions between *Escherichia coli* MutL and the Vsr repair endonuclease // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37. № 13. P. 4453–4463.
223. Malke H. A manual for genetic engineering, advanced bacterial genetics // *Z. Allg. Mikrobiol.* 2007. Vol. 21. № 10. P. 767–767.
224. Vincent A., Scherrer K. A rapid and sensitive method for detection of proteins in polyacrylamide SDS gels: staining with ethidium bromide // *Mol. Biol. Rep.* 1979. Vol. 5. № 4. P. 209-214.
225. Wyszynski M.W., Gabbara S., Kubareva E.A., Romanova E.A., Oretskaya T.S., Gromova E.S., Shabarova Z.A., Bhagwat A.S. The cysteine conserved among DNA cytosine methylases required for methyl transfer, but not for specific DNA binding // *Nucleic Acids Res.* 1993. Vol. 21. № 2. P. 295–301.
226. Reinisch K.M., Chen L., Verdine G.L., Lipscomb W.N. The crystal structure of HaeIII methyltransferase covalently complexed to DNA: an extrahelical cytosine and rearranged base pairing // *Cell*. 1995. Vol. 82. № 1. P. 143–153.
227. Klimasauskas S., Kumar S., Roberts R.J., Cheng X. HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix // *Cell*. 1994. Vol. 76. № 2. P. 357–369.
228. Reinisch K.M., Chen L., Verdine G.L., Lipscomb W.N. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a DNA (cytosine-5)-methyltransferase from *Haemophilus aegyptius* bound covalently to DNA // *J. Mol. Biol.* 1994. Vol. 238. № 4. P. 626–629.
229. Nash H.M., Lu R., Lane W.S., Verdine G.L. The critical active-site amine of the human 8-oxoguanine DNA glycosylase, hOgg1: direct identification, ablation and chemical reconstitution // *Chem. Biol.* 1997. Vol. 4. № 9. P. 693–702.
230. Kosova A.A., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) interacts with apurinic/apyrimidinic sites in DNA // *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 2015. Vol. 779. P. 46–57.
231. Mishina Y., He C. Probing the structure and function of the *Escherichia coli* DNA alkylation repair AlkB protein through chemical cross-linking // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. Vol. 125. № 29. P. 8730–8731.

232. Duguid E.M., Mishina Y., He C. How do DNA repair proteins locate potential base lesions? A chemical crosslinking method to investigate O6-alkylguanine-DNA alkyltransferases // *Chem. Biol.* 2003. Vol. 10. № 9. P. 827–835.
233. Yang C.-G., Yi C., Duguid E.M., Sullivan C.T., Jian X., Rice P.A., He C. Crystal structures of DNA/RNA repair enzymes AlkB and ABH2 bound to dsDNA // *Nature*. 2008. Vol. 452. № 7190. P. 961–965.
234. Banerjee A., Yang W., Karplus M., Verdine G.L. Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damaged DNA // *Nature*. 2005. Vol. 434. № 7033. P. 612–618.
235. Шабарова З.А., Шефлян Г.Я., Кузнецова С.А., Кубарева Е.А., Сысоев О.Н., Ивановская М.Г., Громова Е.С. Аффинная модификация эндонуклеазы рестрикции EcoRII ДНК-дуплексом, содержащим монозамещенную пирофосфатную межнуклеотидную связь // *Биоорган. химия*. 1994 Т. 20. № 4. P. 413–419.
236. Sheflyan G.Y., Kubareva E.A., Volkov E.M., Oretskaya T.S., Gromova E.S., Shabarova Z.A. Chemical cross-linking of MvaI and EcoRII enzymes to DNA duplexes containing monosubstituted pyrophosphate internucleotide bond // *Gene*. 1995. Vol. 157. № 1–2. P. 187–190.
237. Kozlov I.A., Kubareva E.A., Ivanovskaya M.G., Shabarova Z.A. Design of new reagents on the base of DNA duplexes for irreversible inhibition of transcription factor NF- κ B // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1997. Vol. 7. № 4. P. 279–289.
238. Монахова М.В., Кубарева Е.А., Романова Е.А., Семкина А.С., Набережнов Д.С., Рао Д.Н., Зацепин Т.С., Орецкая Т.С. Синтез фрагментов ДНК, содержащих β -дикетогруппу для аффинной модификации белков // *Биоорган. химия*. 2019. Т. 45. № 3. P. 303–314.
239. 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 // *J. Chromatogr. A*. 2015. Vol. 1389. P. 19–27.
240. Metelev V., Romanenkov A., Kubareva E., Zubin E., Polouchine N., Zatsepin T., Molochkov N., Oretskaya T. Structure-based cross-linking of NF- κ B p50 homodimer and decoy bearing a novel 2'-disulfide trapping site // *IUBMB Life*. 2006. Vol. 58. № 11. P. 654–658.
241. Winkler I., Marx A.D., Lariviere D., Heinze R.J., Cristovao M., Reumer A., Curth U., Sixma T.K., Friedhoff P. Chemical trapping of the dynamic MutS-MutL complex formed in DNA mismatch repair in *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286. № 19. P. 17326-17337.
242. Lundblad R.L. Chemical reagents for protein modification, Third edition // USA. CRC Press. 2010. 352 p.

243. Macpherson P., Humbert O., Karran P. Frameshift mismatch recognition by the human MutSa complex // *Mutat. Res. Repair*. 1998. Vol. 408. № 1. P. 55–66.
244. Pavlova A.V., Savitskaya V.Y., Dolinnaya N.G., Monakhova M.V., Litvinova A.V., Kubareva E.A., Zvereva M.I. G-quadruplex formed by the promoter region of the *hTERT* gene: structure-driven effects on DNA mismatch repair functions // *Biomedicines*. 2022. Vol. 10. № 8. P. 1871.
245. Mechanic L.E., Frankel B.A., Matson S.W. *Escherichia coli* MutL loads DNA helicase II onto DNA // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. № 49. P. 38337–38346.
246. Jordan P.W., Snyder L.A.S., Saunders N.J. Strain-specific differences in *Neisseria gonorrhoeae* associated with the phase variable gene repertoire // *BMC Microbiol.* 2005. Vol. 5. № 21.
247. Bijlsma J.J.E., Groisman E.A. Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems // *Trends Microbiol.* 2003. Vol. 11. № 8. P. 359–366.
248. Capra E.J., Laub M.T. Evolution of two-component signal transduction systems // *Annu. Rev. Microbiol.* 2012. Vol. 66. № 1. P. 325–347.
249. Bjornson K.P., Modrich P. Differential and simultaneous adenosine di- and triphosphate binding by MutS // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. P. 18557–18562.
250. Giron-Monzon L., Manelyte L., Ahrends R., Kirsch D., Spengler B., Friedhoff P. Mapping protein-protein interactions between MutL and MutH by cross-linking // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. № 47. P. 49338–49345.
251. Carson M., Johnson D.H., McDonald H., Brouillette C., DeLucas L.J. His-tag impact on structure // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2007. Vol. 63. № 3. P. 295–301.
252. Jacquelín D.K., Filiberti A., Argaraña C.E., Barra J.L. *Pseudomonas aeruginosa* MutL protein functions in *Escherichia coli* // *Biochem. J.* 2005. Vol. 388. № 3. P. 879–887.
253. 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 // *Биоорган. химия*. Т. 46. № 6. С. 563-579.
254. Cogan E.B., Birrell G.B., Griffith O.H. A robotics-based automated assay for inorganic and organic phosphates // *Anal. Biochem.* 1999. Vol. 271. № 1. P. 29–35.
255. Rowlands M.G., Newbatt Y.M., Prodromou C., Pearl L.H., Workman P., Aherne W. High-throughput screening assay for inhibitors of heat-shock protein 90 ATPase activity // *Anal. Biochem.* 2004. Vol. 327. № 2. P. 176–183.
256. Iino H., Hikima T., Nishida Y., Yamamoto M., Kuramitsu S., Fukui K. Small-angle X-ray scattering analysis reveals the ATP-bound monomeric state of the ATPase domain from the homodimeric MutL endonuclease, a GHKL phosphotransferase superfamily protein // *Extremophiles*. 2015. Vol. 19. № 3. P. 643–656.

257. Leone D.L., Hubálek M., Pohl R., Sýkorová V., Hocek M. 1,3-diketone-modified nucleotides and DNA for cross-linking with arginine-containing peptides and proteins // *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2021. Vol. 60. № 32. P. 17523-17527.
258. Зацепин Т.С., Долинная Н.Г., Кубарева Е.А., Ивановская М.Г., Метелев В.Г., Орецкая Т.С. Ковалентное связывание модифицированных нуклеиновых кислот с белками как метод изучения специфических белково-нуклеиновых взаимодействий // *Успехи химии.* 2005. Т. 74, № 1, С. 84-103.
259. Кузнецова Л.Г., Волков Е.М., Романова Е.А., Ташлицкий В.Н., Орецкая Т.С. Шабарова З.А. Синтез олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих 2'-амино-2'-дезоксиуридиновые звенья // *Биорган. химия.* 1991. Т. 17. № 9. P. 1289-1291.
260. Kinzel O., Budzikiewicz H. Synthesis and biological evaluation of a pyoverdinin- β -lactam conjugate: A new type of arginine-specific cross-linking in aqueous solution // *J. Pept. Res.* 1999. Vol. 53. № 6. P. 618-625.
261. Кузнецова Л.Г., Волков Е.М., Романова Е.А., Ташлицкий В.Н., Орецкая Т.С. Шабарова З.А. Олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие 2'-амино-2'-дезоксиуридиновые нуклеозиды // *Биорган. химия.* 1993. Т. 19. № 4. P. 455-466.
262. Зубин Е.М., Анцыпович С.И., Орецкая Т.С., Романова Е.А., Волков Е.М., Ташлицкий В.Н., Шабарова З.А. Синтез модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих 9-(2'-амино-2'-дезокси- β -D-арабинофуранозил)аденин // *Биоорган. химия.* 1997. Т. 23. № 10. P. 809-816.
263. Yang Y., Sass L.E., Du C., Hsieh P., Erie D.A. Determination of protein-DNA binding constants and specificities from statistical analyses of single molecules: MutS-DNA interactions // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33. № 13. P. 4322-4334.
264. Tessmer I., Yang Y., Zhai J., Du C., Hsieh P., Hingorani M.M., Erie D.A. Mechanism of MutS searching for DNA mismatches and signaling repair // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. № 52. P. 36646-36654.
265. Gilbert H.F., O'Leary M.H. Modification of arginine and lysine in proteins with 2,4-pentanedione // *Biochemistry.* 1975. Vol. 14. № 23. P. 5194-5199.
266. Wang H., Yang Y., Schofield M.J., Du C., Fridman Y., Lee S.D., Larson E.D., Drummond J.T., Alani E., Hsieh P., Erie D.A. DNA bending and unbending by MutS govern mismatch recognition and specificity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. Vol. 100. № 25. P. 14822-14827.
267. Sedletska Y., Culard F., Midoux P., Malinge J.M. Interaction studies of MutS and MutL with DNA containing the major cisplatin lesion and its mismatched counterpart under equilibrium and nonequilibrium conditions // *Biopolymers.* 2013. Vol. 99. № 9. P. 636-647.

268. Kramer B., Kramer W., Fritz H.-J. Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli* // *Cell*. 1984. Vol. 38. № 3. P. 879–887.
269. Miron T., Wilchek M. A spectrophotometric assay for soluble and immobilized N-hydroxysuccinimide esters // *Anal. Biochem.* 1982. Vol. 126. № 2. P. 433–435.
270. Ryazanova A.Y., Winkler I., Friedhoff P., Viryasov M.B., Oretskaya T.S., Kubareva E.A. Crosslinking of (cytosine-5)-DNA methyltransferase SsoII and its complexes with specific DNA duplexes provides an insight into their structures // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2011. Vol. 30. № 7–8. P. 632–650.
271. Spampinato C., Modrich P. The MutL ATPase is required for mismatch repair // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. № 13. P. 9863–9869.
272. Claeys Bouuaert C., Keeney S. Distinct DNA-binding surfaces in the ATPase and linker domains of MutL γ determine its substrate specificities and exert separable functions in meiotic recombination and mismatch repair // *PLoS Genet.* 2017. Vol. 13. № 5. P. e1006722.
273. Hornus S., Lévy B., Larivière D., Fourmentin E. Easy DNA modeling and more with GraphiteLifeExplorer // *PLoS One*. 2013. Vol. 8. № 1. P. e53609.
274. Junop M.S., Obmolova G., Rausch K., Hsieh P., Yang W. Composite active site of an ABC ATPase // *Mol. Cell*. 2001. Vol. 7. № 1. P. 1–12.
275. Cristóvão M., Sisamakís E., Hingorani M.M., Marx A.D., Jung C.P., Rothwell P.J., Seidel C.A.M., Friedhoff P. Single-molecule multiparameter fluorescence spectroscopy reveals directional MutS binding to mismatched bases in DNA // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40. № 12. P. 5448–5464.
276. Putnam C.D. MutS sliding clamps on an uncertain track to DNA mismatch repair // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020. Vol. 117. № 34. P. 20351–20353.
277. Perevozchikova S.A., Trikin R.M., Heinze R.J., Romanova E.A., Oretskaya T.S., Friedhoff P., Kubareva E.A. Is thymidine glycol containing DNA a substrate of *E. coli* DNA mismatch repair system? // *PLoS One*. 2014. Vol. 9. № 8. P. e104963.
278. Lebbink J.H.G., Fish A., Reumer A., Natrajan G., Winterwerp H.H.K., Sixma T.K. Magnesium coordination controls the molecular switch function of DNA mismatch repair protein MutS // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285. № 17. P. 13131–13141.
279. Ortega J., Lee G.S., Gu L., Yang W., Li G.-M. Mismatch-bound human MutS–MutL complex triggers DNA incisions and activates mismatch repair // *Cell Res.* 2021. Vol. 31. № 5. P. 542–553.
280. Lu X.-J. 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31. № 17. P. 5108–5121.

281. Branch P., Aquilina G., Bignami M., Karran P. Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage // *Nature*. 1993. Vol. 362. № 6421. P. 652–654.
282. Ni T.T., Marsischky G.T., Kolodner R.D. MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxo-guanine in *S. cerevisiae* // *Mol. Cell*. 1999. Vol. 4. № 3. P. 439–444.
283. Feng W.Y., Lee E.H., Hays J.B. Recombinagenic processing of UV-light photoproducts in nonreplicating phage DNA by the *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair system. // *Genetics*. 1991. Vol. 129. № 4. P. 1007–1020.
284. Mu D., Tursun M., Duckett D.R., Drummond J.T., Modrich P., Sancar A. Recognition and repair of compound DNA lesions (base damage and mismatch) by human mismatch repair and excision repair systems // *Mol. Cell. Biol*. 1997. Vol. 17. № 2. P. 760–769.
285. Gierlich J., Burley G.A., Gramlich P.M.E., Hammond D.M., Carell T. Click chemistry as a reliable method for the high-density postsynthetic functionalization of alkyne-modified DNA // *Org. Lett*. 2006. Vol. 8. № 17. P. 3639–3642.
286. Монахова М.В., Милакина М.А., Савицкая В.Ю., Романова Е.А., Rao D.N., Кубарева Е.А. Белок MutL из системы репарации «мисматчей» бактерии *Neisseria gonorrhoeae*: взаимодействие с АТФ и ДНК // *Молекулярная биология*. 2021. Vol. 55. № 2. P. 289–304.
287. Monakhova M.V., Kubareva E.A., Kolesnikov K.K., Anashkin V.A., Kosaretskiy E.M., Zvereva M.I., Romanova E.A., Friedhoff P., Oretskaya T.S., Zatsepin T.S. 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. Vol. 27. № 8. P. 2438.