

## Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

### Химическая фиксация белка MutS на ДНК для структурно-функциональных исследований начальных этапов процесса репарации мисматчей

Секерина С.А.<sup>1</sup>, Хайнце Р.<sup>2</sup>

1 - Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет  
биоинженерии и биоинформатики, 2 - Университет им. Юстуса Либиха,  
институт биохимии, институт биохимии, Москва, Россия

E-mail: sveta-0685@rambler.ru

MutS является ключевым белком системы репарации мисматчей. MutS из *E. coli* представляет собой гомодимерный белок, имеющий ДНК-связывающий, два АТФазных домена, а также домены, отвечающие за связывание с MutL и тетрамеризацию. Было показано, что, сканируя ДНК, MutS обнаруживает неканонические для ДНК пары нуклеотидов (мисматчи), образовавшиеся в результате ошибок репликации. После обнаружения мисматча, MutS взаимодействует с ДНК, изгибая её примерно на 60°. Затем происходит обмен молекул АДФ, связанных белком, на АТФ. Предполагают, что этот процесс сопровождается «выпрямлением» ДНК и значительными перестройками в структуре MutS, приводящими к образованию так называемого «зажима». Именно этой конформации MutS приписывают способность активировать MutL и инициировать последующие события в репарации повреждений ДНК.

На сегодняшний день четкие доказательства структурного перехода MutS в конформацию «зажим» отсутствуют. Для исследования этого процесса в данной работе предложено использовать химическую фиксацию одноцистеиновых вариантов MutS на ДНК. Реакционноспособный ДНК-дуплекс содержал 3'-концевую дитиогруппу в одной из цепей, а также систему из двух флуорофоров для измерения Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET). Получены мутантные формы MutS с единственным остатком цистеина в ДНК-связывающем домене: MutS(N468C), MutS(A469C), MutS(N497C). Охарактеризована их способность активировать процесс репарации *in vitro*. Наиболее эффективная репарация наблюдалась в случае MutS(A469C) и MutS(N497C). Эти мутантные формы MutS были использованы для ковалентного связывания с ДНК-дуплексами, содержащими и не содержащими мисматч. Выходы ДНК-белковых конъюгатов были близки к количественным. Конъюгаты выделяли методом ВЭЖХ на носителе Superdex-200.

Изучена эффективность обмена нуклеотидов мутантными формами MutS, фиксированными на ДНК. Установлено, что только белок MutS(A469C) в составе конъюгата с ДНК сохранял способность к нуклеотидному обмену. Для ковалентно связанного комплекса MutS(A469C) с ДНК-дуплексом, содержащим G/T-мисматч, в буфере, не содержащем нуклеотидов, наблюдался эффективный резонансный перенос энергии, что указывало на наличие изгиба ДНК. Добавление АТФ приводило к снижению эффективности FRET, что указывает на изменение конформации ДНК с изогнутой на линейную при сохранении ковалентной связи между MutS и ДНК. Этот эксперимент подтверждает формирование конформации «зажим» для MutS.

Полученные результаты позволяют использовать конъюгат MutS(A469C) с ДНК для кристаллизации с целью расшифровки структуры MutS в конформации «зажим»

*Конференция «Ломоносов 2011»*

в комплексе с душлексом.