



Влияние замен Cys на эндонуклеазную активность белка *MutL Neisseria gonorrhoeae*

Литвинова Анастасия, студентка 2 курса ФББ МГУ

Научные руководители:

Савицкая Виктория Юрьевна, аспирантка 1 года, химический факультет МГУ

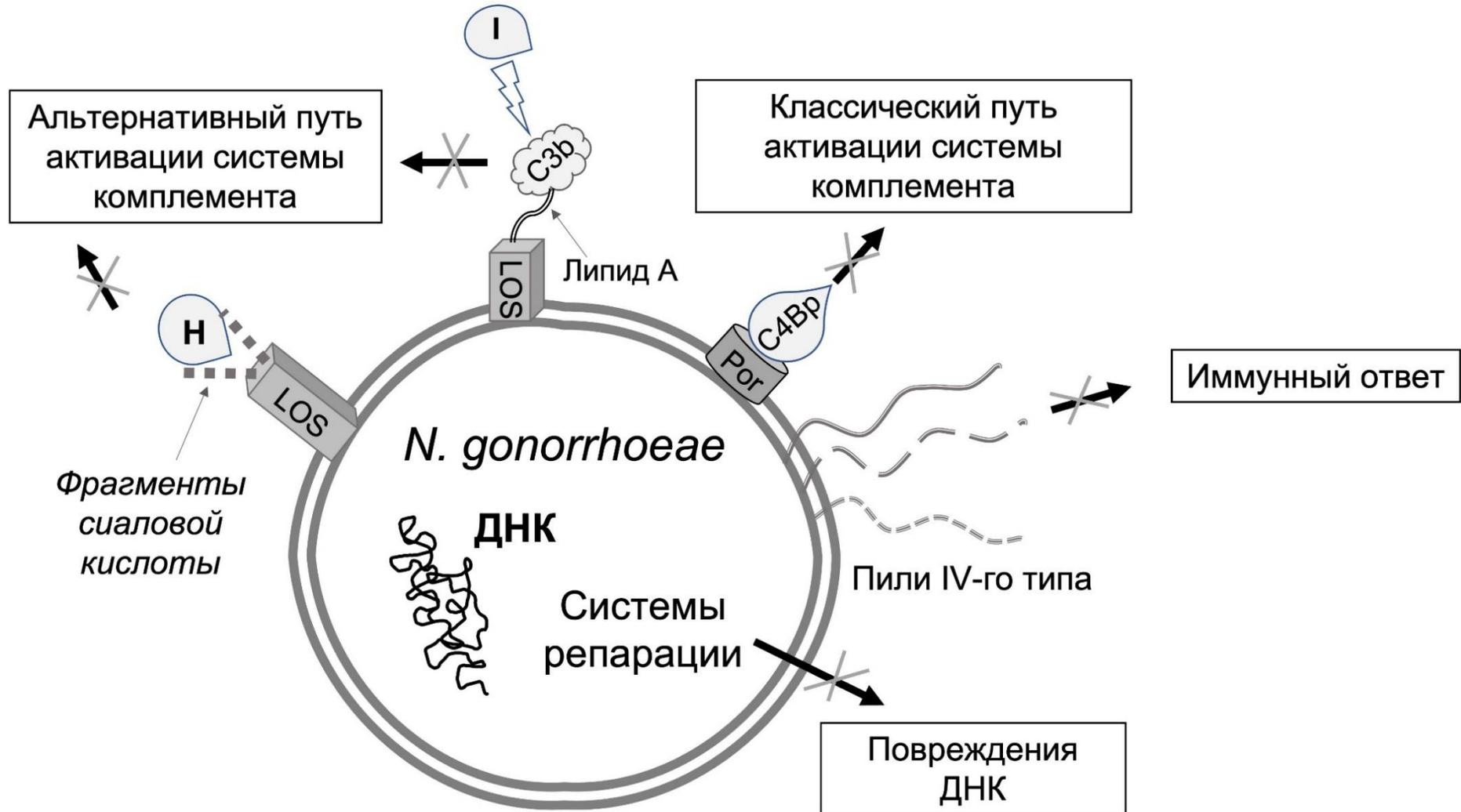
Кубарева Елена Александровна, д.х.н., проф. НИИ ФХБ им. Белозерского

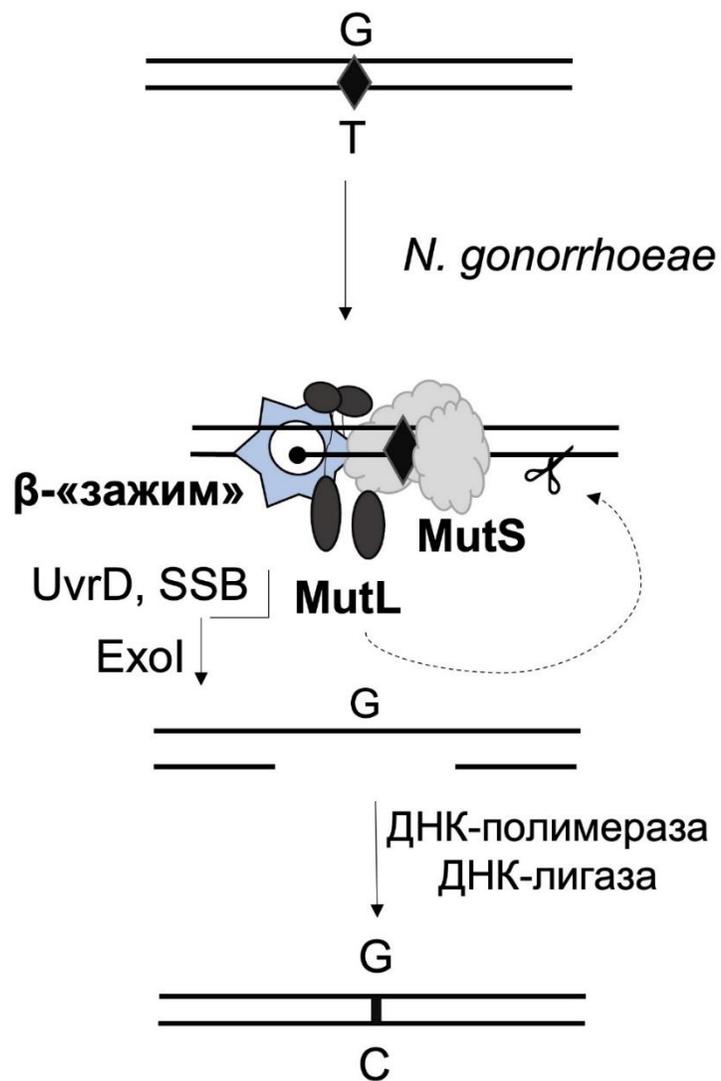


Факторы вирулентности *Nisseria gonorrhoeae*



Исследования ВОЗ выявили клинические штаммы *N. gonorrhoeae*, устойчивые к большинству известных антибиотиков





Mismatch repair system (MMR) – репарация повреждений, возникающих в процессе репликации результате ошибок ДНК-полимеразы

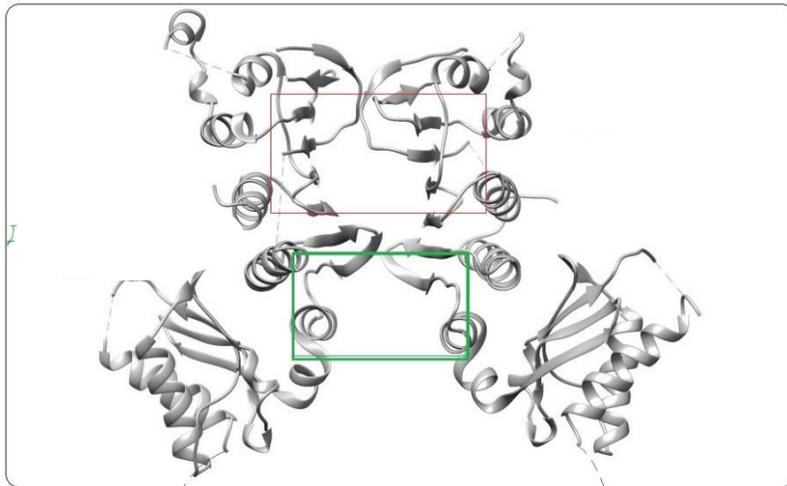
- **ngMutS** узнает неканоническую пару нуклеотидов и привлекает ngMutL
- **ngMutL** вносит одноцепочечный разрыв в дочернюю цепь
- **ng β** (бета-субъединица ДНК-полимеразы III) – фактор процессивности



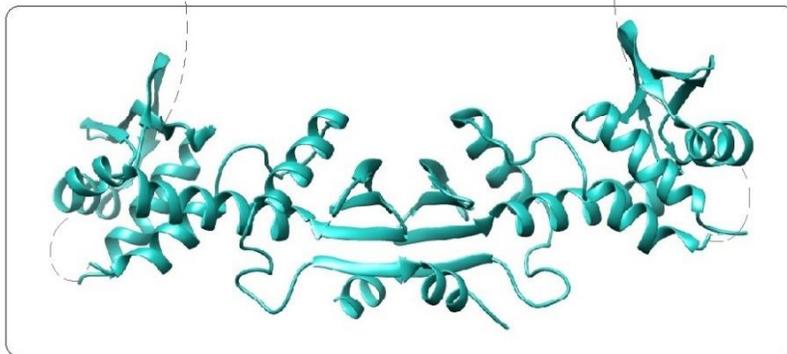
Объект исследования – MutL *Neisseria gonorrhoeae*



N-концевой домен

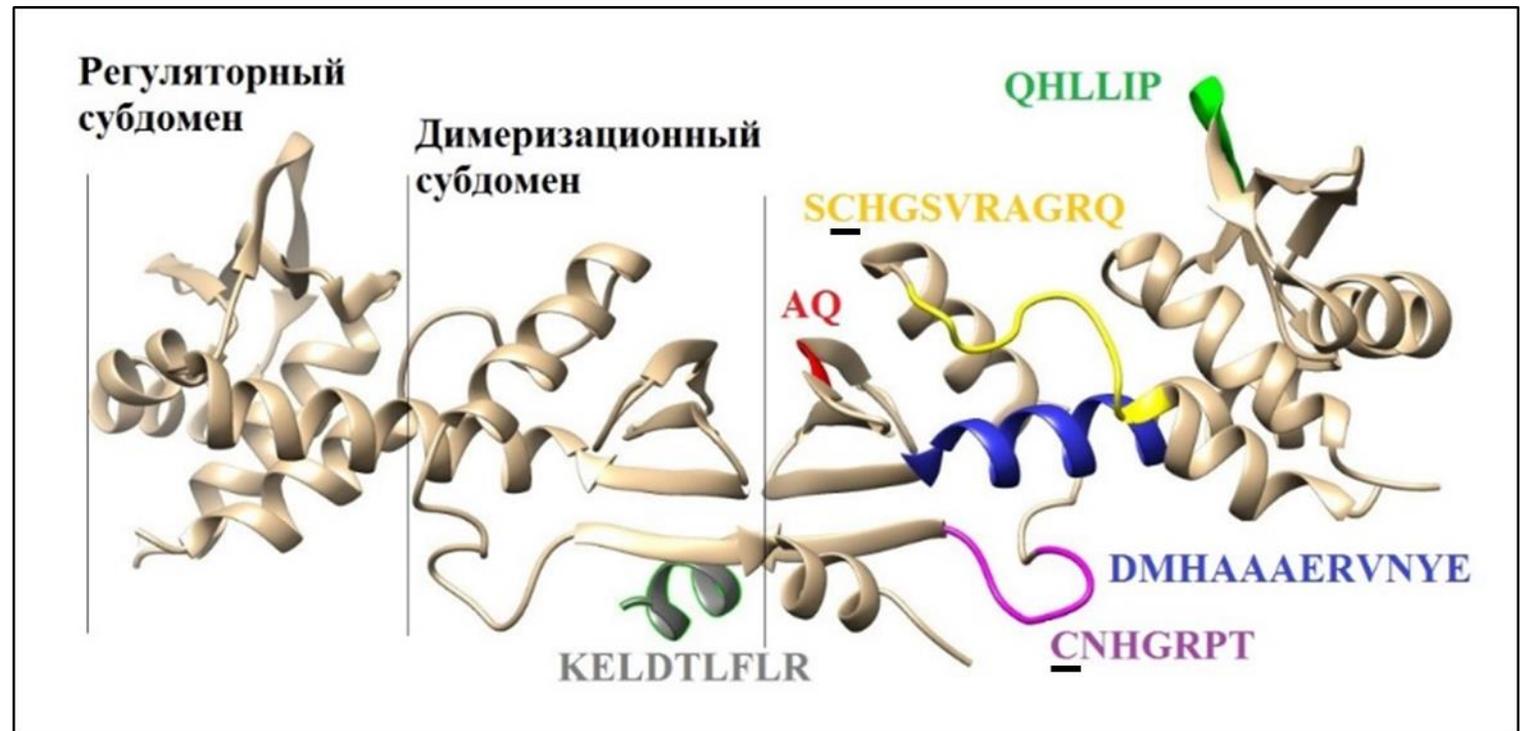


Линкерный участок



C-концевой домен

Активный центр белка, ответственный за эндонуклеазную функцию, локализован в C-концевом домене (CTD)





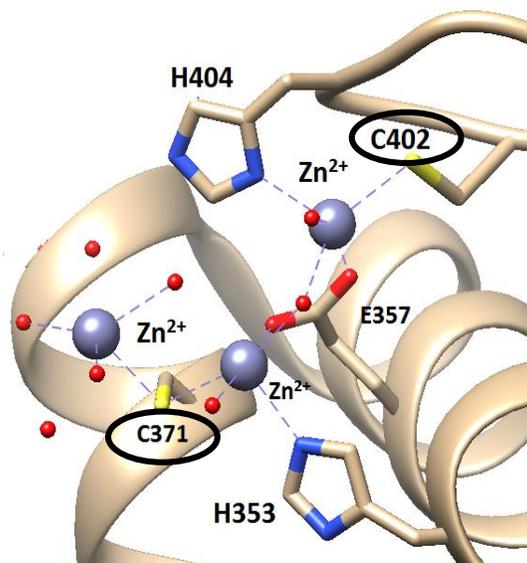
Кофакторы MutL *Neisseria gonorrhoeae*



- Mg^{2+} , Mn^{2+} активируют эндонуклеазную активность MutL
- Zn^{2+} имеет различное влияние на активность MutL

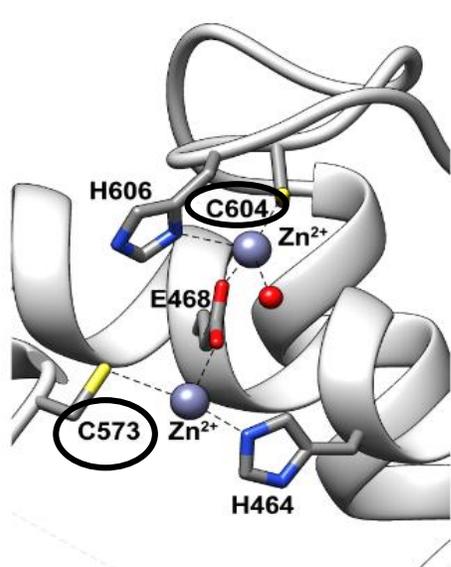
<i>Aquifex aeolicus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Активация	Стимулирование	Ингибирование

aqMutL-CTD



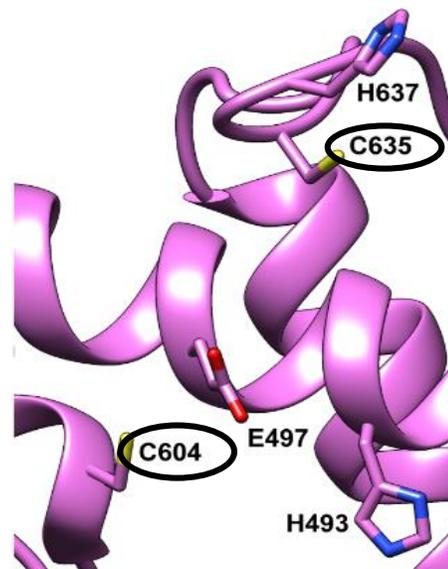
PDB 5Z42

bsMutL-CTD



PDB 3KDK

ngMutL-CTD



PDB 3NCV

Мутации Cys в металл-связывающих мотивах приводят к:
1) Снижению цинк-связывающей активности *in vitro*
2) Инактивации MMR *in vivo*



Потеря цинк-зависимой регуляции процесса MMR

Cys вовлечены в координационную сферу Zn^{2+}

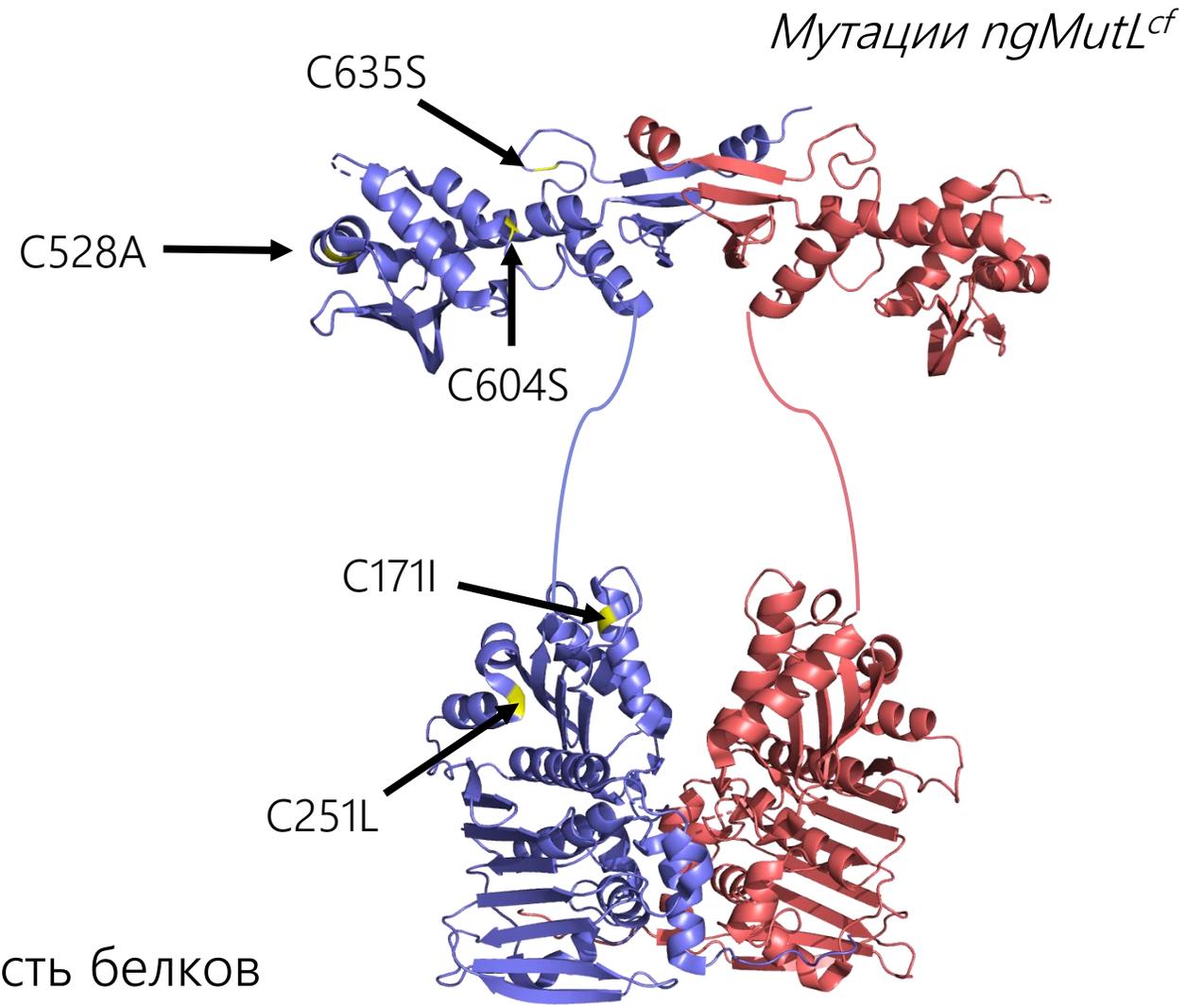


Цель

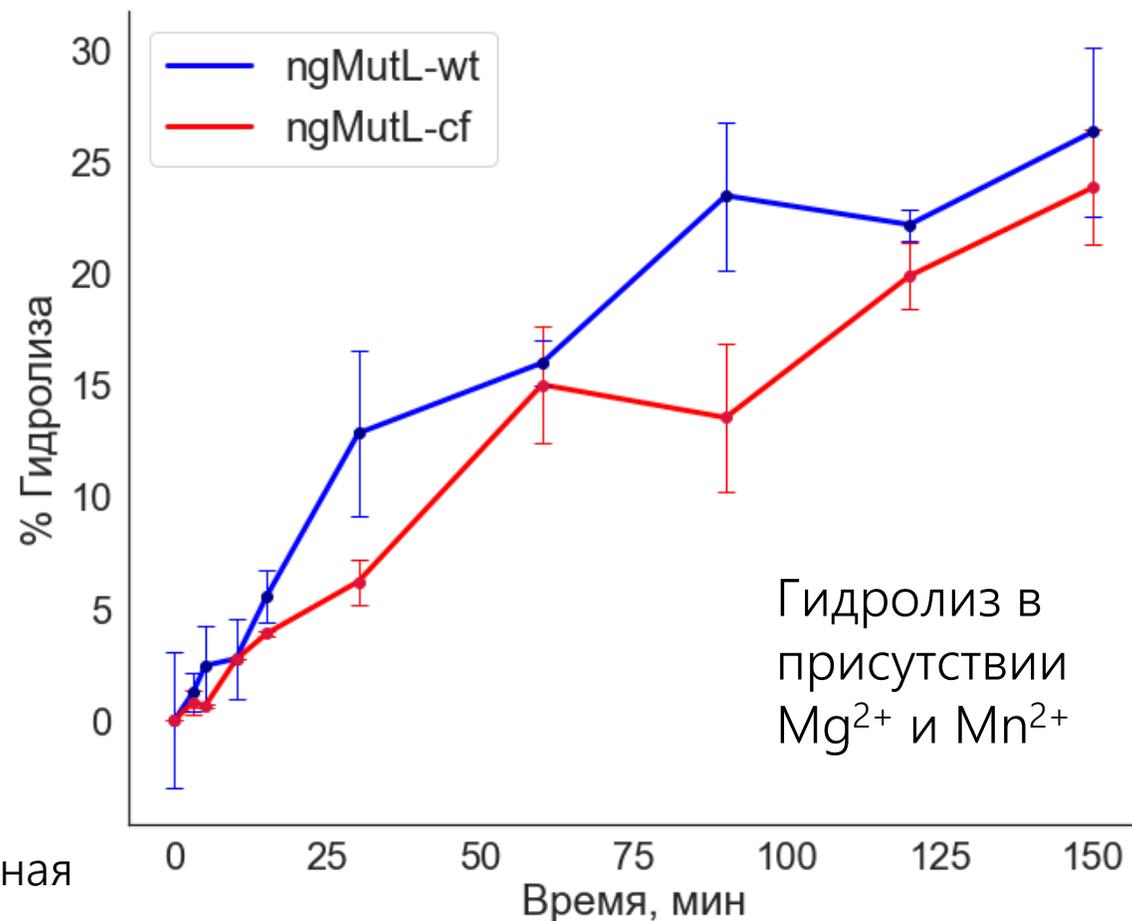
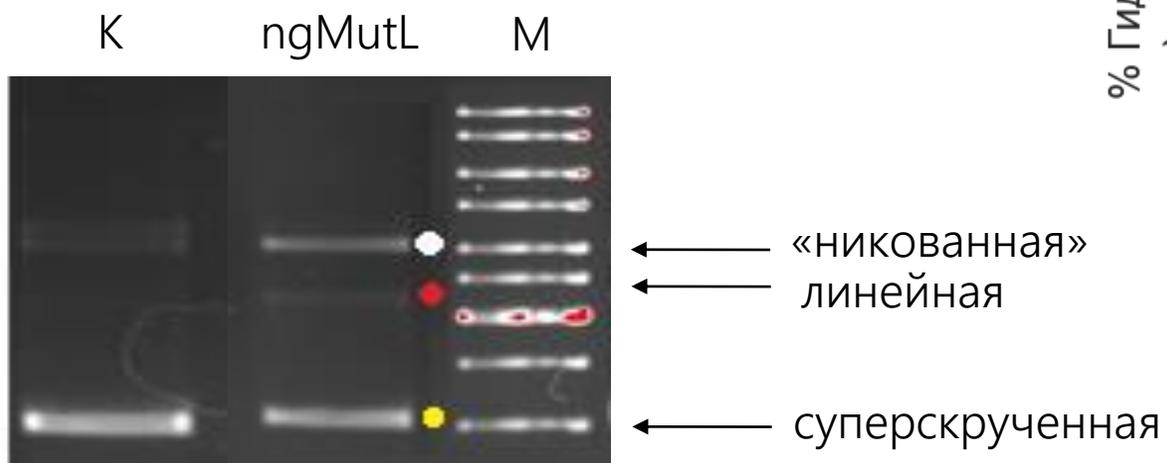
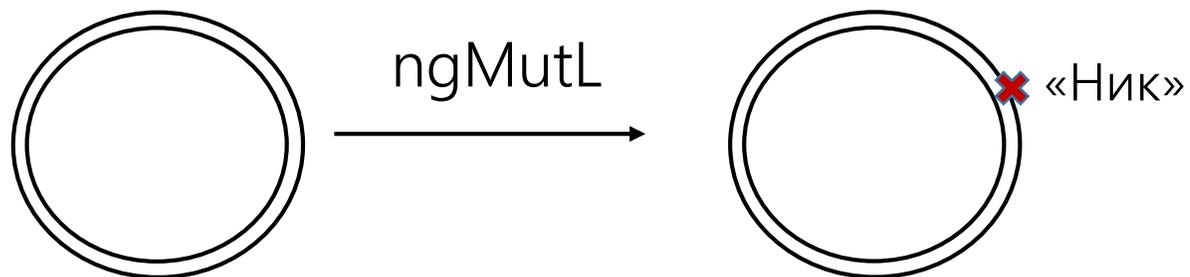
Изучить эндонуклеазную активность бесцистеиновой формы $ngMutL^{cf}$ в различных условиях и сравнить с активностью $ngMutL^{wt}$ дикого типа

Задачи

1. Изучить кинетику реакции гидролиза плазмидной ДНК белками
2. Изучить влияние ионов цинка на эндонуклеазную функцию белков
3. Исследовать эндонуклеазную активность белков на линейном субстрате в различных условиях



Реакция гидролиза плазмидной ДНК

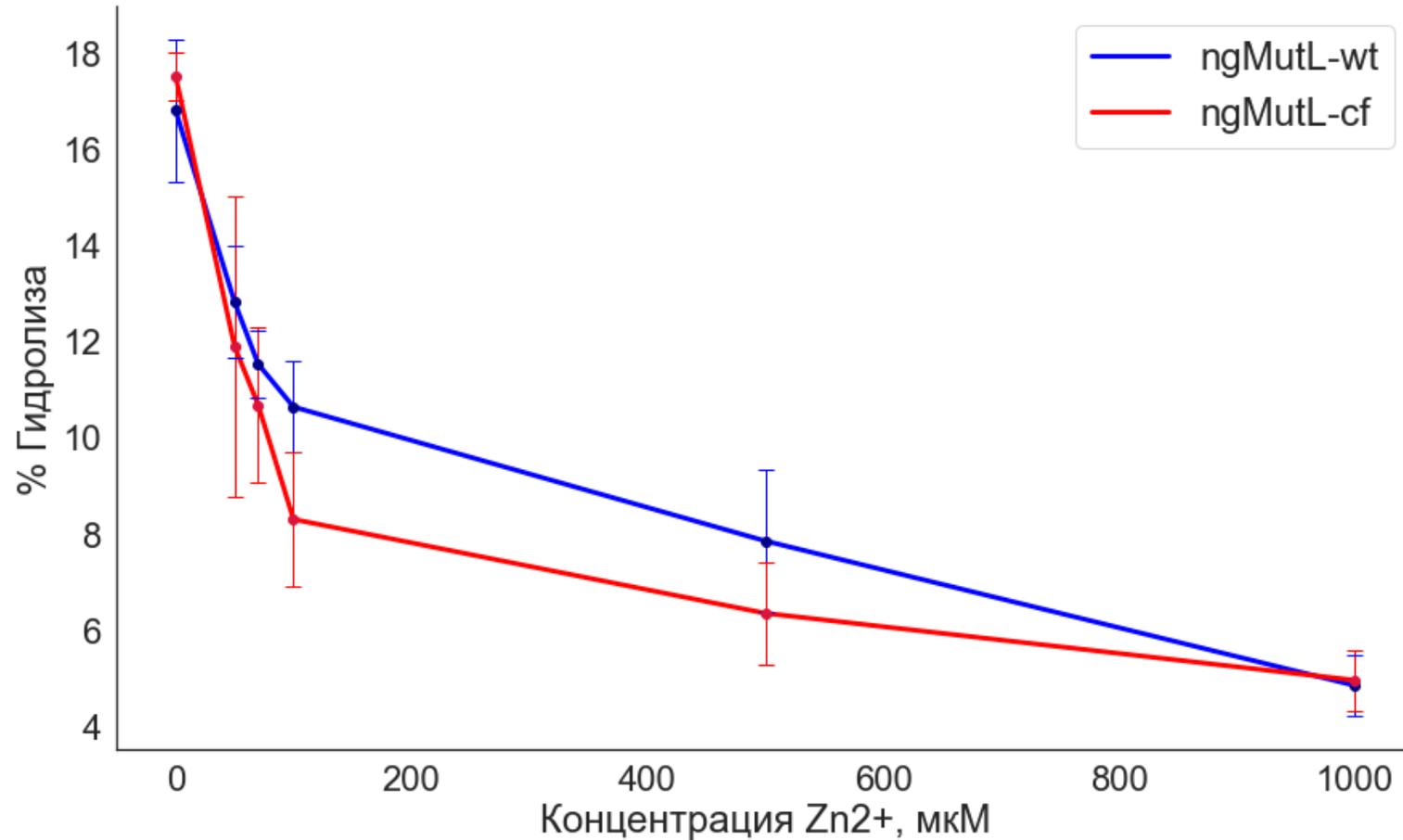


Замены Cys не приводят к потере эндонуклеазной активности $ngMutL^{cf}$

Замены Cys не приводят к снижению способности $ngMutL^{cf}$ связывать ионы Mg^{2+} и Mn^{2+}



Влияние Zn^{2+} на эндонуклеазную активность ngMutL^{cf} и ngMutL^{wt}



Гидролиз уменьшается в обоих случаях, следовательно:
1) ngMutL^{cf} способен координировать Zn^{2+}
2) Cys не играют ключевой роли



Сервис по предсказанию метал-связывающих сайтов (MIB)



Аминокислоты, вовлеченные в координацию Zn^{2+}



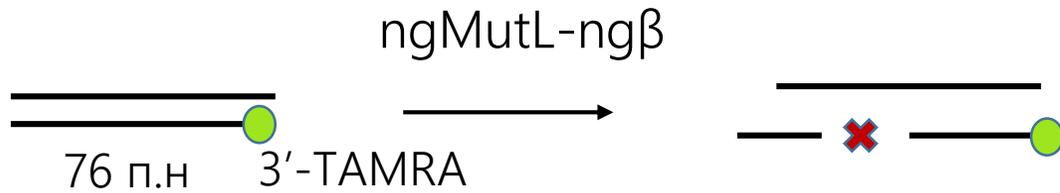
Таблицы значений степени вовлеченности аминокислот в координацию Zn^{2+} для двух белков.
Выделены аминокислоты металл-связывающих мотивов

ngMutL ^{wt}		
493	HIS	3.279
497	GLU	3.279
505	LYS	3.787
508	ARG	3.787
529	HIS	4.019
530	GLU	4.019
594	HIS	2.558
595	GLU	2.558
604	 CYS	3.193
635	 CYS	3.138
637	HIS	3.138

ngMutL ^{cf}		
491	ASP	2.264
492	MET	4.309
493	HIS	4.309
497	GLU	2.925
503	LYS	3.289
506	ARG	3.289
518	HIS	2.480
529	HIS	2.831
530	GLU	2.831
548	GLU	2.480
577	ASP	2.751
581	GLU	2.751
594	HIS	2.534
595	GLU	2.534
605	HIS	2.925
637	HIS	2.264

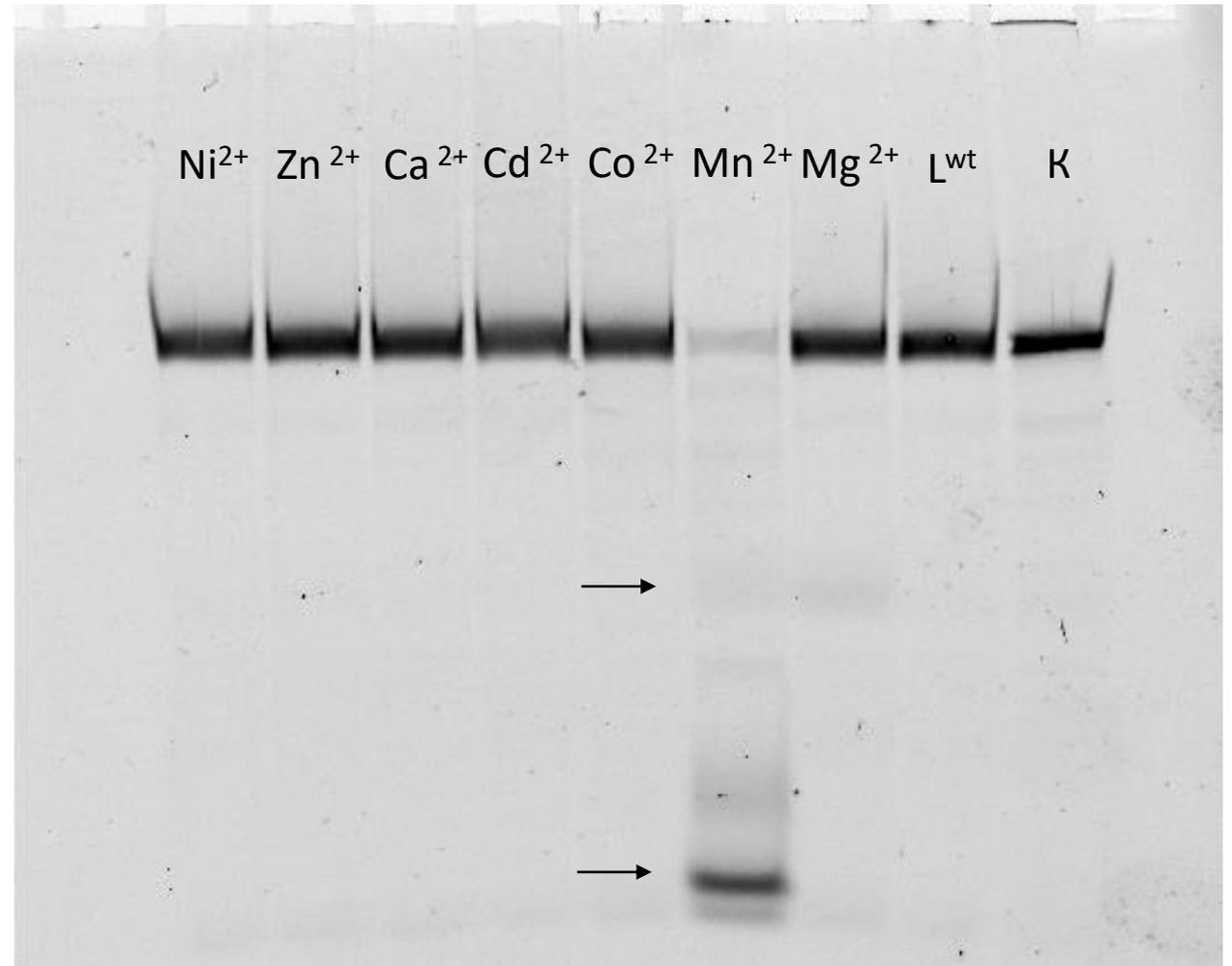


Влияние катионов металлов на активность ngMutL^{wt}



Результат гидролиза MutL^{wt} линейной ДНК в присутствии катионов различных металлов.

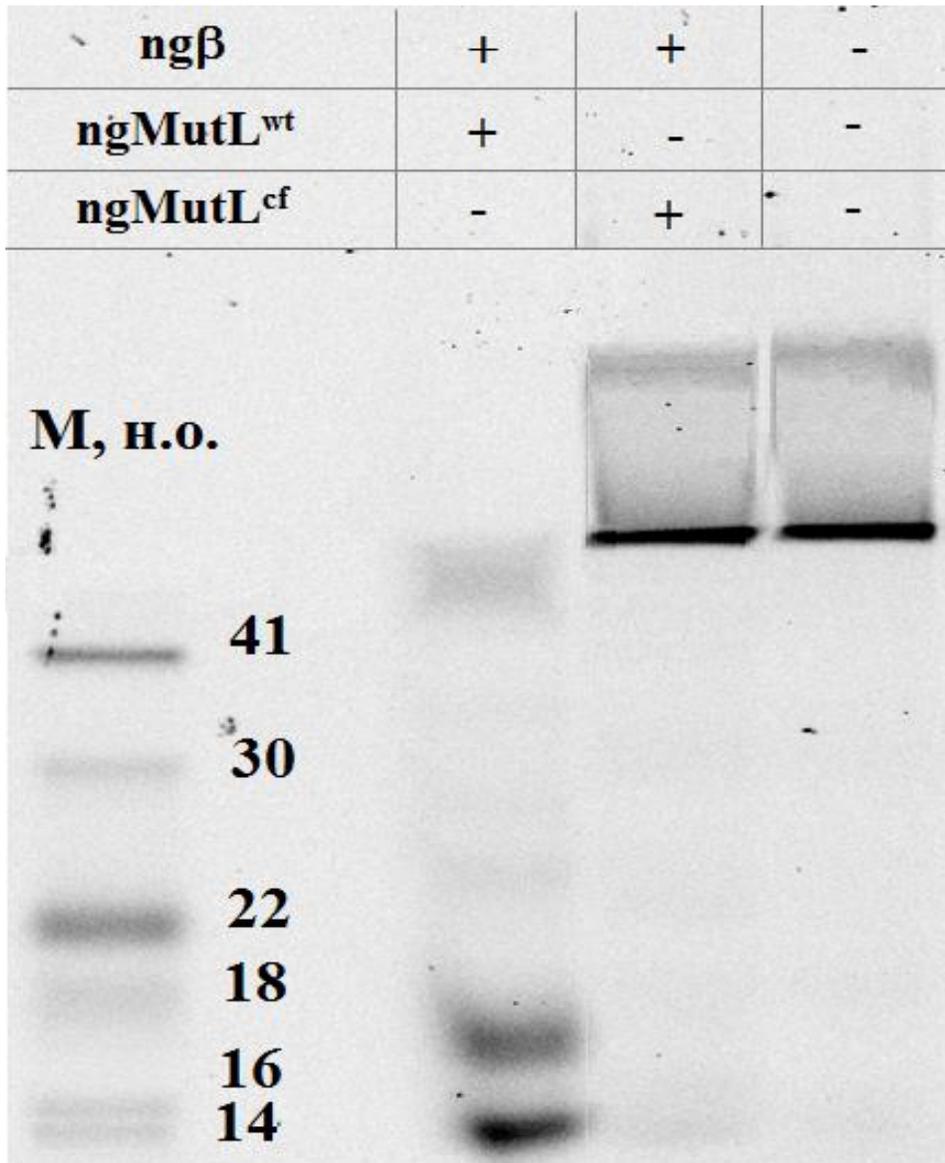
Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях.



Mn²⁺ и Mg²⁺ активируют гидролиз ДНК белком ngMutL^{wt}



Сравнение активностей двух форм в оптимальных условиях



Сравнение гидролиза ДНК длиной 76 п.н.
при 37°C за 90 мин белками
ngMutL^{wt} или ngMutL^{cf}

Мутации влияют на взаимодействие ngMutL^{cf} с ngβ

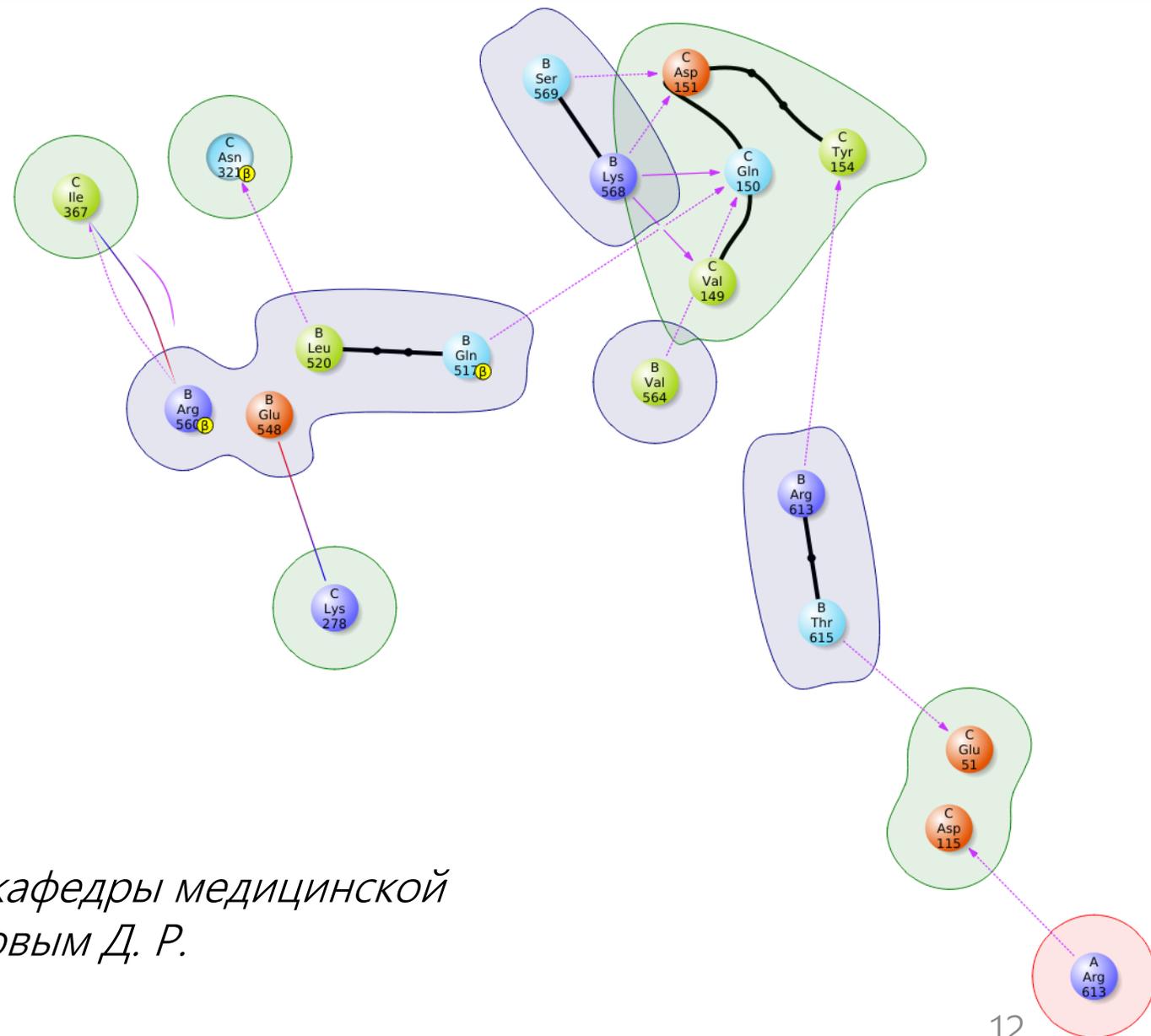


Карта взаимодействий ngMutL^{wt} с ngβ

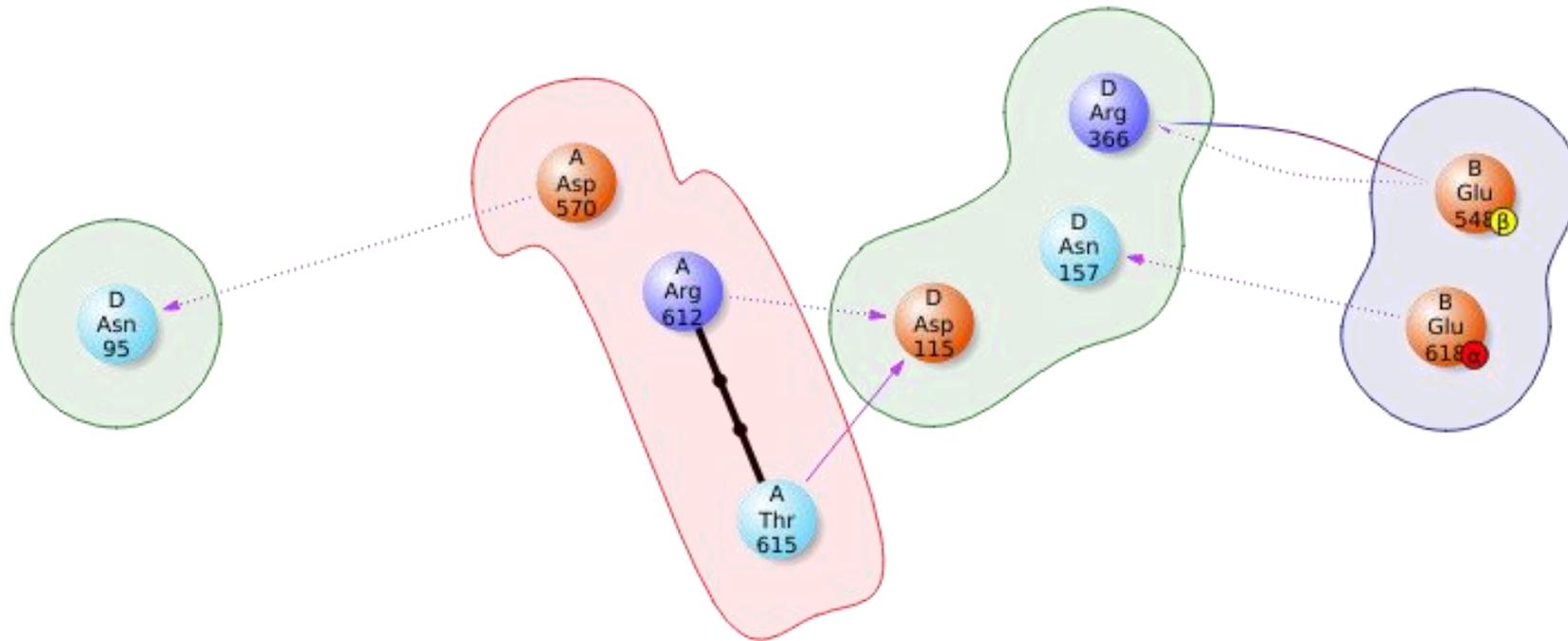


С одной цепью ngβ (цепь C, имеет зеленое поле) взаимодействуют две цепи ngMutL^{wt} (A и B, синие и красное поле).

При их обширном взаимодействии образуются водородные связи, «соляные мостики».



Моделирование выполнено сотрудником кафедры медицинской химии химического факультета МГУ Базановым Д. Р.



Связи формируются между двумя цепями ngMutL^{cf} (цепи А и В, обозначены красным и синим) с одной цепью ngβ (D, зеленый), которая не взаимодействовала с ngMutL^{wt}.

Общее количество взаимодействий меньше, чем в случае с ngMutL^{wt}

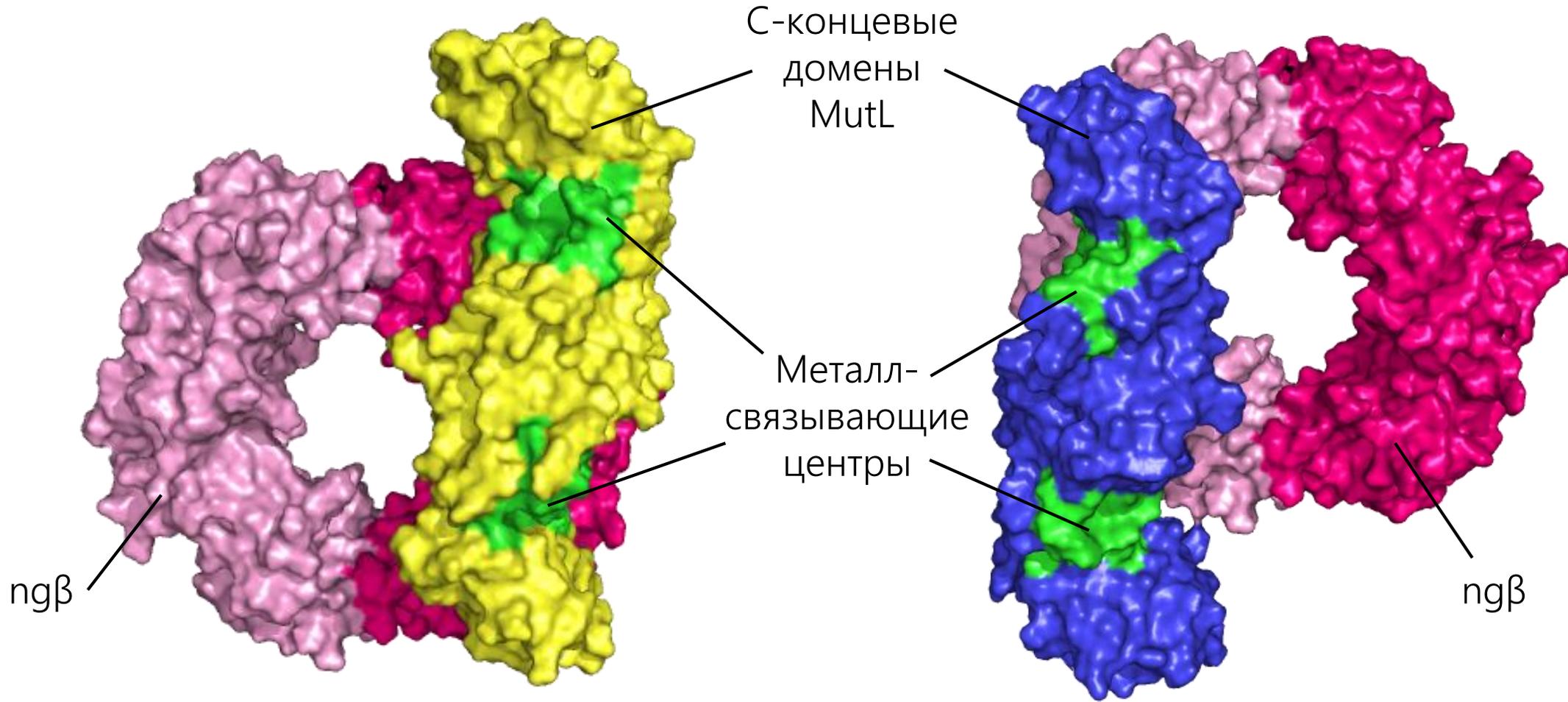


Сравнение комплексов ngMutL^{wt}-ngβ и ngMutL^{cf}-ngβ



ngMutL^{wt}-ngβ

ngMutL^{cf}-ngβ





1. Замены Cys в белке ngMutL не влияют на эффективность гидролиза плазмидной ДНК;
2. Бесцистеиновая форма ngMutL способна координировать Zn^{2+} , сохраняя цинк-зависимую регуляцию MMR;
3. Замены всех Cys в белке ngMutL влияют на характер его взаимодействия с $ng\beta$, что приводит к отсутствию гидролиза линейного фрагмента ДНК.



Спасибо за внимание

Выражаю особую благодарность



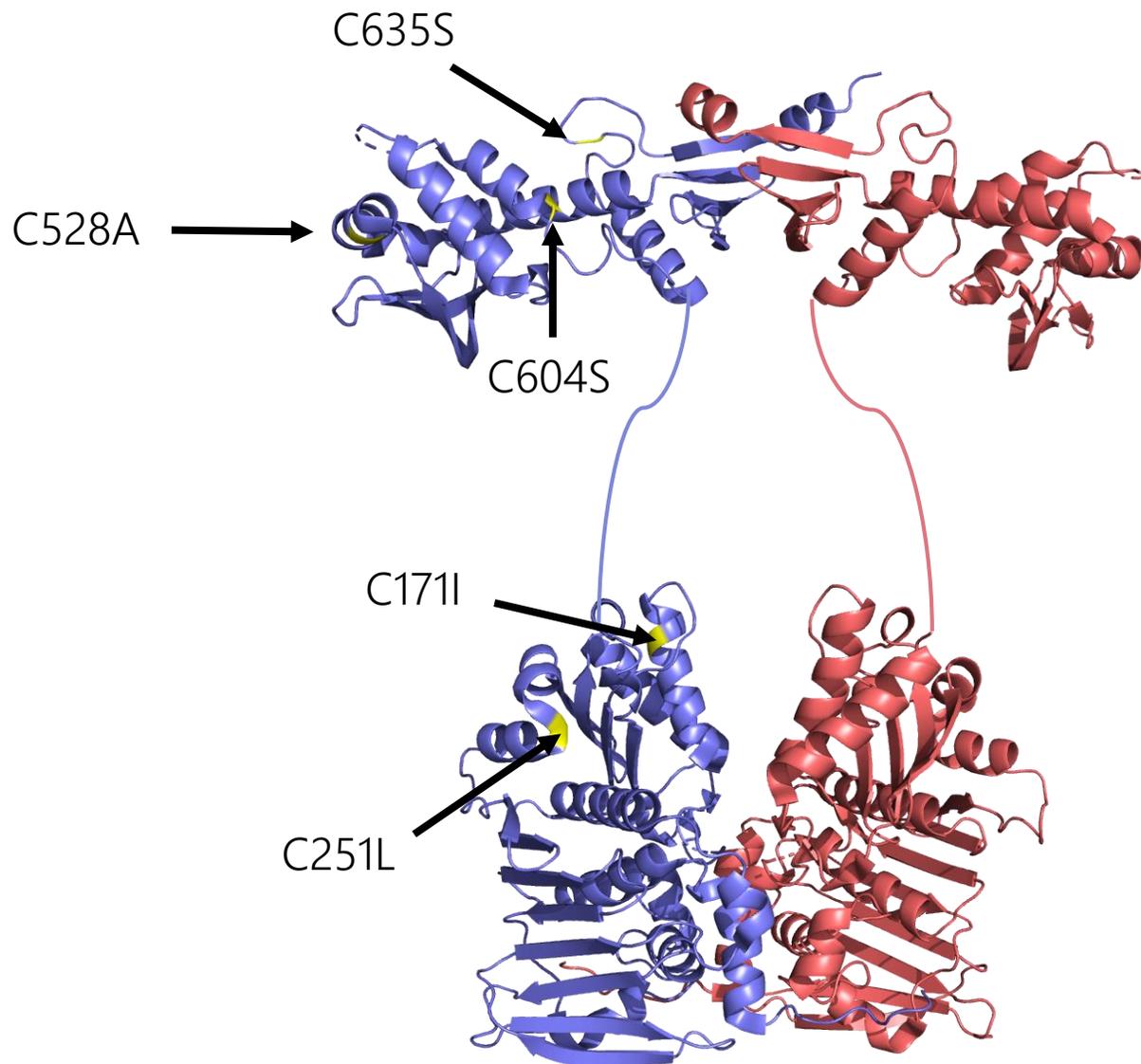
Монаховой Майе Викторовне
за ценные указания и советы
при проведении
экспериментов и помощь в
подготовке презентации
результатов работы



Базанову Даниилу
Романовичу
За предоставленные
данные по
моделированию белок-
белковых
взаимодействий и
комплексов



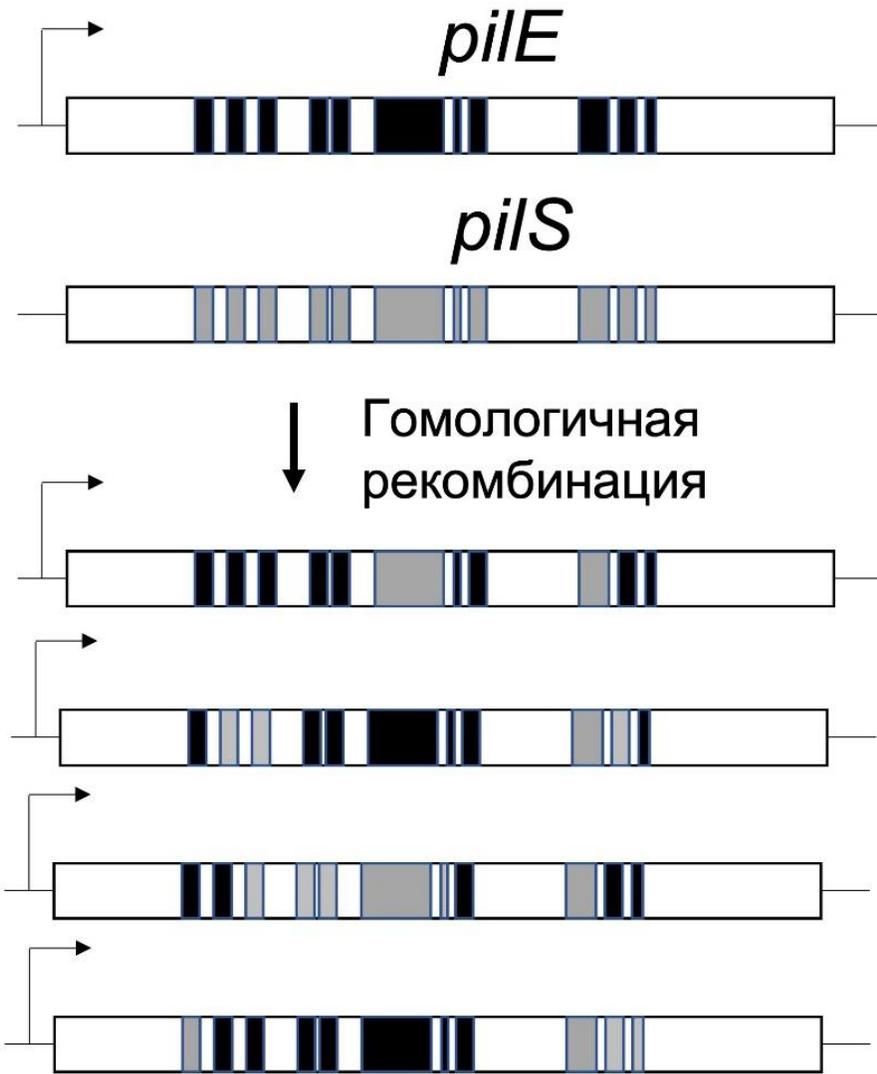
Мутации в ngMutL^{cf}



Мутантный ngMutL содержит следующие замены: **C171I**, **C251L**, **C528A**, **C604S** и **C635S**



Структура MutL *Neisseria gonorrhoeae*

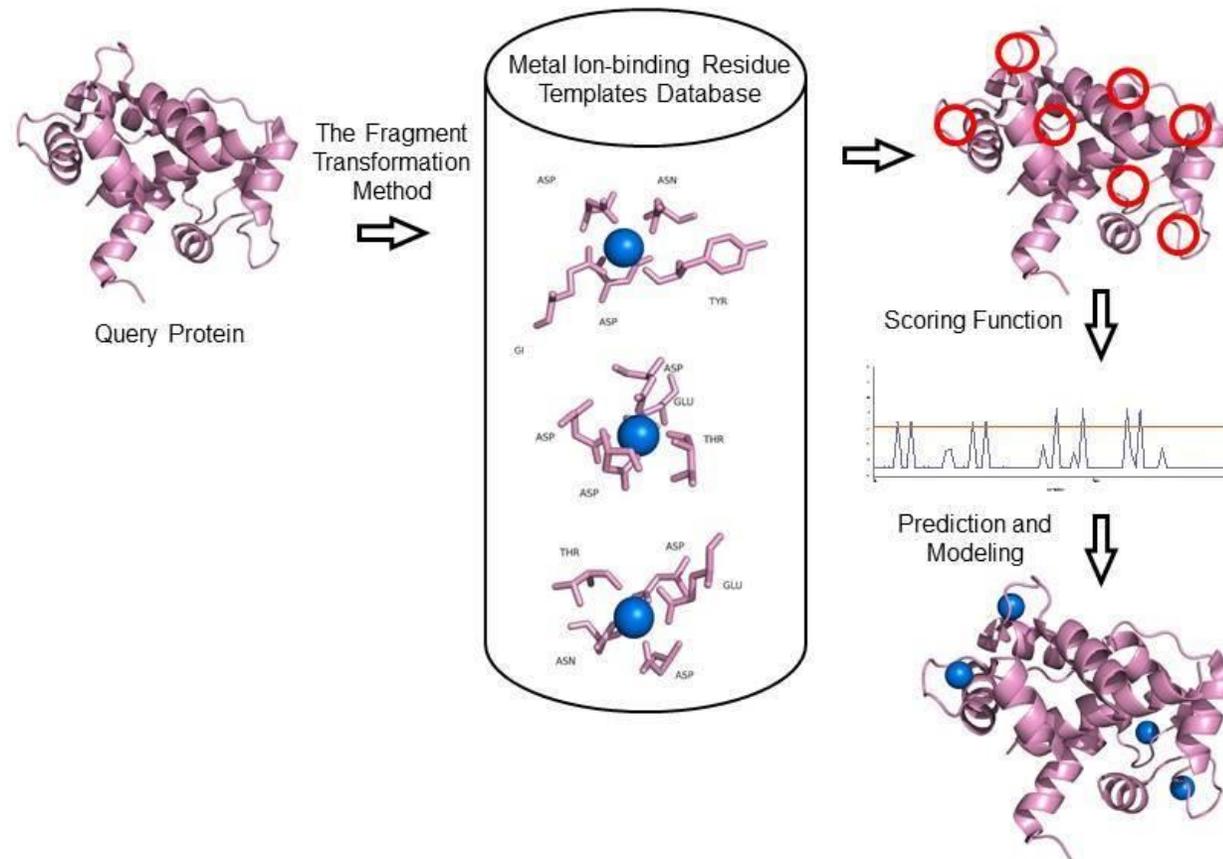


Антигенная вариация основана на гомологичной рекомбинации и обеспечивает уход от иммунного ответа хозяина.

Штаммы с делециями генов *mutS* и *mutL* спонтанно развивали устойчивость к антибиотикам и чаще претерпевали антигенную вариацию



Metal Ion-Binding site prediction and docking serve



На основании существующих 3D-структур, координирующих ионы металлов, предсказываются позиции, которые могут участвовать в координации