



УДК 577.151.62+577.325.4+577.322.23

## АФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ В ПРОТЕОМНОМ ИССЛЕДОВАНИИ АНСАМБЛЕЙ РЕПАРАЦИИ ДНК

© 2011 г. С. Н. Ходырева, О. И. Лаврик<sup>#</sup>*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
630090, Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8*

Поступила в редакцию 13.08.2010 г. Принята к печати 27.08.2010 г.

Обзор посвящен применению метода аффинной модификации как составной части современного протеомного подхода в поиске и идентификации белков ансамблей репарации ДНК. Аффинная модификация базируется на формировании специфического нековалентного комплекса между мишенью-биополимером и реагентом (реакционноспособным аналогом биополимера или лиганда) с последующим образованием ковалентной связи между реагентом и связывающим ее центром мишени, что обеспечивает специфичность метода. Этот подход наиболее широко и эффективно применяется в исследовании структурно-функциональных аспектов взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами. При создании реакционноспособных ДНК-зондов, помимо химически активных групп и элементов, обеспечивающих специфическое узнавание ДНК белками, в структуру реагента можно вводить группы, облегчающие последующее аффинное выделение продуктов сшивки ДНК–белок. В обзоре рассмотрены недавние примеры использования аффинных реакционноспособных ДНК-зондов в сочетании с масс-спектрометрическими и иммунологическими методами для поиска и идентификации в клеточных экстрактах белков, взаимодействующих с апуринowymi/апирииминовиными сайтами, а также белков, узнающих различные типы сшивок в ДНК, образованных цисплатином.

*Ключевые слова:* ДНК, аффинная модификация; ДНК, содержащие апуриновые/апирииминовиные сайты; фотоактивируемые ДНК, содержащие производные цисплатина; белково-нуклеиновые взаимодействия; масс-спектрометрия.

### ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных задач протеомики является предсказание функциональной роли отдельных белков путем экспериментального сопоставления их

качественного и количественного состава в клетках в разных физиологических состояниях. Такие исследования, как правило, выполняются с помощью методов, основанных на сравнительном анализе “протеомов” клеток с использованием 2D-электрофореза и масс-спектрометрии [1, 2]. Однако в отношении определенных белков может применяться и другой подход – селективное выделение пула белков, обладающих каким-то общим функциональным параметром с последующим анализом этих белков. Для выделения белков часто применяется аффинная хроматография.

Примерами такого подхода могут служить исследования по идентификации клеточных белков, узнающих специфичные последовательности ДНК [3]. В указанной работе проводилось аффинное выделение белков на сорбенте с иммобилизованными ДНК-дуплексами, содержащими промоторные последовательности. Авторы отмечают высокий уровень связывания неспецифических белков. Предварительная “сшивка” ДНК со связывающими ее клеточными белками формальдегидом [4] или бифункциональными агентами [5, 6] позволяет использовать более жесткие по сравнению с аффинной хроматографией условия удаления неспецифически связанных белков, взаимодействие которых с ДНК опосредовано белок-белковыми контактами.

Сокращения: AP-сайты – апуриновые/апирииминовиные сайты; APE1 – апуриновая/апирииминовиная эндонуклеаза 1; BER – эксцизионная репарация оснований (base excision repair); DDB1 – белок 1, связывающийся с повреждением; DNA-PK – ДНК-зависимая протеинкиназа; DNA-PKcs – каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы; FEN1 – флэпэндонуклеаза 1; HMGB1, HMGB2, HMGB3 – белки семейства HMGB (High Mobility Group Box); Ku70/Ku80 – субъединицы Ku-антигена; MMR – репарация ошибочно спаренных оснований (mismatch repair); NER – эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair); NHEJ – негомологичное соединение концов (nonhomologous end joining); PARP1 – поли(ADP-рибозо)полимераза 1; RPA – репликативный белок А; PNK – полинуклеотидкиназа; RFC – репликативный фактор С; hMSH2, hMSH3 – белки системы ошибочно спаренных оснований, узнающие повреждение в ДНК; Pol – ДНК-полимераза; XPE-BF – белок системы NER, участвующий в узнавании повреждений в ДНК; XRCC1 – белок, входящий в группу комплементации, которая обуславливает чувствительность клеток к рентгеновскому излучению; YB-1 – фактор транскрипции, содержащий домен “холодового шока”; THF – остаток 3-гидрокси-2-гидроксиметилтетрагидрофурана; МЭФ – эмбриональные фибробласты мыши.

<sup>#</sup> Автор для связи (тел.: (383) 363-51-95; эл. почта: lavrik@ni-boch.nsc.ru).

Можно значительно повысить селективность подхода, базирующегося на образовании сшивок ДНК–белок, привлекая метод аффинной модификации белков, особенно в сочетании с последующим аффинным выделением сшитых с ДНК белков.

Метод аффинной модификации, широко используемый для изучения взаимодействий между биополимерами или биополимерами и низкомолекулярными лигандами, базируется на формировании специфического нековалентного комплекса между биополимером-мишенью и реагентом (реакционноспособным аналогом второго биополимера или лиганда) с последующим образованием ковалентной связи между реагентом и связывающим его центром биополимера-мишени. Специфичность связывания белка-мишени с реагентом обуславливается тем, что реагенты представляют собой реакционноспособные аналоги субстратов (или лигандов). Этот метод наиболее широко и эффективно применяется в исследовании структурно-функциональных аспектов взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами (см. обзоры [7–11]).

Одним из перспективных направлений в развитии аффинной модификации белков представляется использование химически активных аналогов ДНК-интермедиатов процессов репарации ДНК в сочетании с другими подходами для определения “протеома” этих процессов, включая поиск и идентификацию ранее неизвестных белков-участников.

Считается, что в клетках эукариот существуют пять основных путей восстановления целостности структуры ДНК: прямая репарация; репарация двухцепочечных разрывов ДНК, представленная гомологичной рекомбинационной репарацией и негомологичным соединением двухцепочечных концов; эксцизионная репарация нуклеотидов; эксцизионная репарация оснований и репарация ошибочно спаренных оснований [12]. Каждый путь репарации ДНК направлен на исправление определенных типов повреждений, однако функции отдельных путей могут перекрываться.

В сложных смесях, например клеточных экстрактах, образование сшивок химически активных ДНК с белками однозначно “маркирует” те из белков, которые способны связываться с данным типом ДНК. Радиоизотопная (или другая) метка в ДНК облегчает анализ ковалентных аддуктов ДНК–белок и обеспечивает высокую чувствительность при их детекции. Кроме того, в состав ДНК можно вводить дополнительные группировки, например остатки биотина, которые далее могут облегчить выделение и анализ образовавшихся ковалентных аддуктов. Меняя структуру ДНК-зондов, можно регулировать избирательность ДНК в отношении конкретных белков в анализируемых белковых смесях. В применении к исследованию систем репарации ДНК в качестве таких модифицирующих ДНК-элементов могут использоваться миметики повреждений ДНК

и структурные мотивы, характерные для определенных путей или стадий репарации.

В зависимости от целей исследования для идентификации белка в составе специфически сформированного ковалентного аддукта с ДНК могут использоваться различные подходы, например, основанные на использовании специфических антител. При поиске ранее неизвестных белков-участников процесса наиболее перспективным и практически безальтернативным подходом к идентификации белка являются развитие в последнее десятилетие масс-спектрометрические методы. В обзоре будут рассмотрены конкретные примеры использования аффинной модификации фотоактивируемыми и AP-сайтсодержащими ДНК для идентификации белков-участников процессов репарации. Особое внимание будет уделено собственным работам и исследованиям других авторов, выполненным за последние 5 лет.

Обобщенная схема применения аффинной модификации в изучении структурно-функциональной организации белковых ансамблей репарации включает несколько последовательных этапов: 1) создание реакционноспособных ДНК-зондов, представляющих собой интермедиаты репарации и содержащих структурные элементы, которые могут специфически узнаваться белками исследуемой системы, 2) поиск в клеточных экстрактах белков, образующих сшивки с химически активными ДНК-интермедиатами, 3) идентификация белков в составе ковалентных аддуктов с ДНК-интермедиатами, 4) подтверждение обнаруженных в экстрактах взаимодействий ДНК–белок с использованием индивидуальных белков, 5) изучение функций идентифицированных белков при взаимодействии с ДНК-интермедиатами репарации в клетках, экстрактах клеток и системах, реконструированных из очищенных белков.

Среди химически активных аффинных аналогов ДНК для исследования белково-нуклеиновых взаимодействий значительное место принадлежит производным ДНК, содержащим арилизидные группы, генерирующие при активации УФ-светом высоко-реакционноспособные частицы, которые могут атаковать ближайшие атомы с образованием ковалентной связи между контактирующими частями биополимеров [7–11]. Несомненные преимущества арилизидных фотореагентов – химическая нейтральность в условиях рутинных биохимических процедур и способность к активации в заданное время. Это позволяет, в частности, использовать ферментативные подходы при создании ДНК-интермедиатов, в том числе *in situ*, за счет ферментативной активности исследуемых систем.

ФОТОАКТИВИРУЕМЫЕ ДНК  
В ИССЛЕДОВАНИИ БЕЛКОВОГО  
АНСАМБЛЯ ЭКСЦИЗИОННОЙ  
РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ

Для изучения систем репарации с помощью фотоактивируемых ДНК-зондов наиболее удобно введение в ДНК соответственным образом модифицированных dNMP с использованием ДНК-полимераз, поэтому основные усилия многих исследователей были направлены на синтез и характеристику dNTP с арилизидными группами. При создании фотоактивируемых аналогов dNTP учитывали и оптимизировали несколько параметров: (а) для минимизации неспецифической фотоинактивации биополимеров под действием УФ-света актуально получение аналогов dNTP, активируемых длинноволновым УФ-светом ( $\lambda > 300$  нм); (б) важной характеристикой аффинного ДНК-реагента является эффективность модификации белка-мишени, т.е. выход продуктов сшивки ДНК–белок.

При введении фотоактивируемых нуклеотидов в состав ДНК непосредственно ДНК-полимеразами клеточных экстрактов, субстратные свойства используемых аналогов dNTP могут оказаться критическим параметром, определяющим впоследствии выход сшивок ДНК–белок, поскольку концентрации эндогенных ДНК-полимераз в экстрактах невелики.

Для создания фотоактивируемых аналогов dNTP, обладающих оптимальными параметрами, с учетом перечисленных выше критериев, были проведены синтез и характеристика широкого ряда производных пиримидиновых dNTP [13–18]. Структурные формулы исследованных аналогов dCTP представлены на рис. 1.

В результате синтеза новых аналогов dNTP и планомерного исследования их свойств удалось создать соединения, которые сочетают хорошие субстратные и фотохимические характеристики. ДНК, получаемые на их основе, обеспечивают увеличение выхода продуктов сшивки с модельным белком – ДНК-полимеразой  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) – не менее чем на порядок для производных dCTP по сравнению с использованным ранее FAB-dCTP (рис. 2а). FAP-содержащее производное dUTP с фотоактивируемой группой, присоединенной к положению 5 урацила, обеспечивало повышение уровня модификации Pol  $\beta$  в 2–3 раза по сравнению с аналогичными производными, содержащими NAB- и FAB-группы [18].

Сравнительный анализ эффективности включения разных аналогов dCTP в ДНК-дуплекс с выступающей матричной цепью (рис. 2б) и последующая количественная оценка выхода продуктов пришивки ДНК к белкам экстракта клеток HeLa (рис. 2в) в сравнении с аналогичными исследованиями, проведенными с использованием модельного белка – Pol  $\beta$  (рис. 2а), подтвердил значимость субстратных харак-

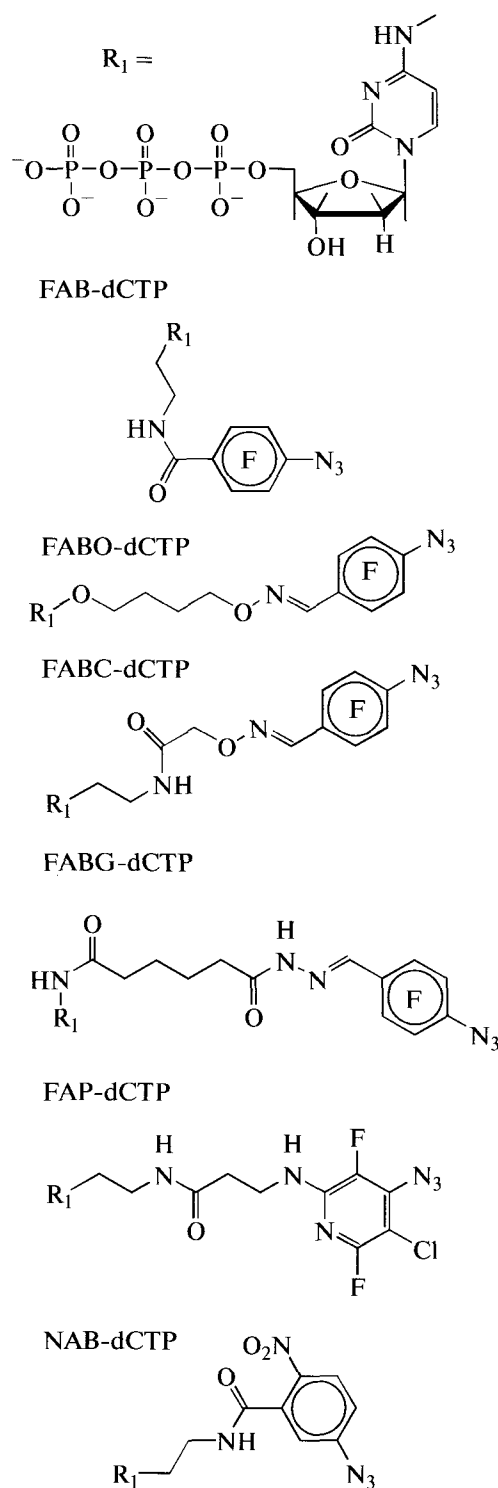
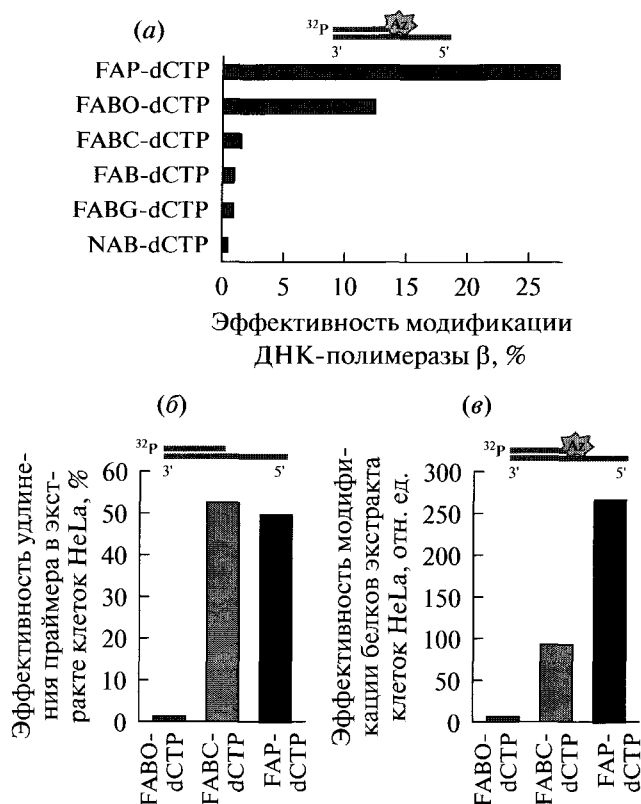


Рис. 1. Структурные формулы, краткие обозначения и названия фотоактивируемых аналогов dCTP. По данным работ [14, 15].

теристик аналогов dNTP в обеспечении высокого уровня выхода сшивок белков экстракта (рис. 2в). Действительно, FABO-dCTP, обеспечивавший, несмотря на неудовлетворительные субстратные свой-



**Рис. 2.** Сравнение уровней ковалентного присоединения фотоактивируемых ДНК, созданных на основе аналогов dCTP к ДНК-полимеразе  $\beta$  (а), эффективности включения фотоактивируемых аналогов dCMP в ДНК ДНК-полимеразами экстракта из клеток HeLa (б) и уровень модификации белков экстракта фотоактивируемыми ДНК, синтезированными *in situ* (в). По данным работы [14]. Под столбиками диаграмм указаны производные dNTP, использованные при синтезе фотоактивируемых ДНК.

ства (рис. 2б), максимальный уровень сшивок ДНК с Pol  $\beta$  в реконструированной системе (рис. 2а), в которой благодаря условиям проведения эксперимента (4-кратный избыток фермента по отношению к ДНК) происходило эффективное включение аналога в ДНК, оказался абсолютно неэффективным в отношении белков экстракта. Напротив, FABC-dCTP, обладающий худшими, чем у FAVO-dCTP, фотохимическими характеристиками (более низкий выход сшивок Pol  $\beta$  с FABC-dCMP-содержащей ДНК, рис. 2а), но лучшими субстратными характеристиками для ДНК-полимераз клеточного экстракта обеспечивал значительно более высокий уровень сшивок с белками (рис. 2б).

Максимальную эффективность модификации белков экстрактов продемонстрировал аналог FAP-dCTP, сочетающий хорошие фотохимические характеристики и хорошие субстратные свойства в реакции Pol  $\beta$ -зависимого синтеза ДНК.

Исследования по идентификации компонентов ансамбля эксцизионной репарации оснований

(BER) впервые были проведены нами в клеточном экстракте эмбриональных фибробластов мыши с использованием фотоактивируемых ДНК-интермедиатов системы BER, синтезированных *in situ* [19].

Система эксцизионной репарации оснований исправляет повреждения, вызванные ионизирующей радиацией и экзогенными окисляющими, алкилирующими реагентами, механизм действия которых сходен с механизмом воздействия эндогенных факторов [20]. Этой же системой репарируются и апуриновые/апириmidiновые сайты [20, 21]. Ферменты системы BER также участвуют в родственном процессе — репарации одноцепочечных разрывов [22]. Эксцизионная репарация оснований у высших эукариот осуществляется двумя путями, короткозаплаточным (КЗ) и длиннозаплаточным (ДЗ), которые отличаются используемыми субстратами, размером ресинтезируемого участка ДНК и вовлеченными в процесс белками [12, 20, 21]. В классическом КЗ-пути поврежденные основания выщепляются специфическими ДНК-гликозилазами с образованием AP-сайтов, которые затем гидролизуются апуриновой/апириmidiновой эндонуклеазой 1. В КЗ-пути Pol  $\beta$  после встраивания одного нуклеотида удаляет 5'-дезоксирибозофосфатные (5'-dRP) остатки за счет присущей ей лиазной активности, затем разрывы лигируются. Если 5'-dRP-остатки модифицированы, то репарация осуществляется через ДЗ-путь, в котором 5'-dRP-остатки после синтеза ДНК с вытеснением цепи удаляются FEN1 (КФ. 3.1.—) вместе с несколькими нуклеотидами, а разрывы лигируются.

В качестве основной исходной ДНК для синтеза фотоактивируемого аналога ДНК-интермедиата использовали ДНК, содержащую остаток TНГ, который широко используется в исследовании системы BER как миметик AP-сайтов, являющийся субстратом для AP-эндонуклеазы 1 [23, 24]. Образующийся в процессе расщепления AP-сайта фуранофосфатный остаток устойчив к действию лиазной активности Pol  $\beta$ , что приводит к переключению репарации на длиннозаплаточный путь. ДНК с разрывом, фланкированным на 5'-конце фуранофосфатным остатком, может рассматриваться как переходный интермедиат КЗ- и ДЗ-путей BER или как ранний интермедиат длиннозаплаточного пути.

Остаток фотоактивируемого dCMP встраивался в ДНК эндогенными ДНК-полимеразами экстракта при использовании FAV-dCTP (экзо-*N*-[2-(4-азидотетрафторбензоиламино)этил]-2'-дезокситидин-5'-трифосфата) в качестве субстрата. Анализ продуктов фотоиндуцированного присоединения показал, что из тысяч белков, содержащихся в экстракте из клеток мыши, такие ДНК эффективно присоединялись только к шести белкам, что свидетельствует о высокой селективности используемого ДНК-зонда (рис. 3а).

Сравнительный анализ эффективности пришивки белков к фотоактивным ДНК, содержащим на 3'-конце разрыва остаток FАВ-dСMP, а на 5'-конце — фуранофосфатную или фосфатную группы (ДНК-интермедиаты ДЗ- и КЗ-путей соответственно) (рис. 3б), подтвердил высокую зависимость уровня ковалентной модификации белка от структуры ДНК-зонда. Среди белков, образовавшихся сшивки с ДНК, были идентифицированы Pol β, АРЕ1, FEN1, участие которых в этом пути репарации хорошо известно. Природу еще одного белка, поли(АDР-рибозо)полимеразы 1 (PARP1), удалось установить методом иммунопреципитации с использованием специфических антител и некоторых других подходов. PARP1 (КФ 2.4.2.30) — высококопийный полифункциональный ядерный белок высших эукариот с молекулярной массой 113 кДа. Связываясь с одно- и двухцепочечными разрывами ДНК, PARP1 активируется и катализирует синтез из NAD<sup>+</sup>-полимера АDР-рибозы, ковалентно присоединенного к ряду белков, участвующих в метаболизме ДНК, в том числе к самой себе [25]. Считают, что поли(АDР-рибоза) — разветвленный отрицательно заряженный полимер — вызывает диссоциацию комплекса белок–ДНК, обеспечивая доступ ферментов репарации к месту повреждения ДНК [25]. Согласно альтернативной точке зрения, PAR служит сигналом для привлечения ферментов репарации к месту повреждения ДНК [25]. Действительно, некоторые белки-участники процесса репарации содержат специфические мотивы для связывания PAR [25].

Так, например, было установлено, что PARP1, ковалентно присоединенная к фотоактивируемой ДНК, способна подвергаться поли(АDР-рибозил)ированию, что приводит к уменьшению электрофоретической подвижности продуктов сшивки ДНК–PARP1 [20]. Это позволяет идентифицировать продукты, относящиеся к PARP1, среди других сшивков белок–ДНК.

Еще один белок, эффективно образующий сшивки с фотоактивными ДНК, был позже идентифицирован как High Mobility Group Box 1 (HMGB1) [26]. Роль HMGB1 как участника процесса BER будет рассмотрена ниже. Дальнейшие исследования с использованием аффинной модификации и функциональных тестов в системах, реконструированных из очищенных белков, и в экстрактах позволили установить, что АРЕ1 и PARP1 эффективно взаимодействуют с ДНК-интермедиатом BER, содержащим разрыв, фланкированный фуранофосфатной группой на 5'-конце, конкурируя за ДНК [27].

Дальнейшее исследование влияния PARP1 и ее автополи(АDР-рибозил)ирования на ДЗ- и КЗ-пути эксцизионной репарации оснований, выполненное с использованием функциональных тестов в реконструированных из очищенных белков системах и клеточных экстрактах, позволило продемонстриро-

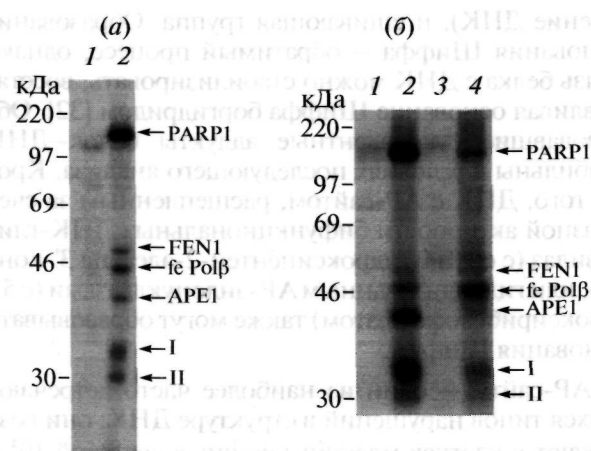


Рис. 3. Аффинная модификация белков экстракта эмбриональных фибробластов мыши фотоактивируемой ДНК, синтезированной *in situ*. По данным работы [20]. (а) Для синтеза фотоактивируемой ДНК ферментами экстракта был использован ДНК-дуплекс, содержащий остаток ТНФ в середине радиоизотопно-меченой цепи и фотоактивируемый аналог — FАВ-dСТР. 1 — контроль без облучения. (б) — Сравнительный анализ эффективности модификации белков фотоактивируемой ДНК-интермедиатами короткозаплаточного пути (фосфатная группа на 5'-конце олигонуклеотида, обращенном в сторону разрыва) и длиннозаплаточного пути (фуранофосфатная группа на 5'-конце олигонуклеотида в таком же положении) BER. При синтезе ДНК в экстракте использовали FАВ-dСТР и соответствующие ДНК-дуплексы с однонуклеотидной брешью. Нечетные дорожки — контроль без облучения.

вать регуляторную роль этого белка в BER. В целом, как регулятор BER, PARP1 умеренно снижает эффективность КЗ-пути и значительно влияет на ДЗ-путь, ингибируя синтез с вытеснением цепи, стимулирующее влияние АРЕ1, 3' → 5'-экзонуклеазу активную АРЕ1 и активность флэпэндонуклеазы 1. Автомоодификация PARP1 ослабляет ее ингибирующее действие и, по-видимому, является необходимым условием для реализации Pol β-зависимого варианта ДЗ-пути с участием АРЕ1 в качестве корректирующей экзонуклеазы [28–31].

### ПОИСК И ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С АПУРИНОВЫМИ/АПИРИМИДИНОВЫМИ САЙТАМИ

В качестве химически активных ДНК в поиске и идентификации белков могут применяться ДНК, содержащие АР-сайты, которые способны образовывать основания Шиффа с первичными аминогруппами белков. Следует отметить, что в таких исследованиях АР-сайты в ДНК одновременно выполняют две функции: это и элемент, обеспечивающий узнавание ДНК белками (повре-

ждение ДНК), и сшивающая группа. Образование основания Шиффа — обратимый процесс, однако связь белка с ДНК можно стабилизировать, восстанавливая основание Шиффа боргидридом [32]. Образовавшиеся ковалентные аддукты белок–ДНК стабильны в условиях последующего анализа. Кроме того, ДНК с AP-сайтом, расщепленным за счет лиазной активности бифункциональных ДНК-гликозилаз (с  $\alpha$ ,  $\beta$ -4-гидроксипентен-2-алем на 3'-конце), или гидролизированным AP-эндонуклеазами (с 5'-дезоксирибозофосфатом) также могут образовывать основания Шиффа.

AP-сайты — один из наиболее часто встречающихся типов нарушений в структуре ДНК; они возникают в клетках млекопитающих с частотой  $10^4$  в сутки за счет спонтанного или катализируемого в процессе BER ДНК-гликозилазами гидролиза N-гликозидной связи между дезоксирибозой и основанием [33].

Нерепарированные AP-сайты цитотоксичны и мутагенны [34], поэтому представляет интерес идентификация белков, взаимодействующих с ними и, возможно, участвующих в регуляции их репарации. AP-ДНК (в том числе с расщепленными AP-сайтами) более селективны как химически активные ДНК-реагенты по сравнению с фотоактивируемыми ДНК, поэтому AP-ДНК более перспективны при поиске белков, специфически взаимодействующих с такими ДНК-структурами.

Большинство белков, которые способны формировать основания Шиффа с дезоксирибозой AP-сайта (в том числе и с его расщепленными формами), связано с процессом BER. Образование основания Шиффа характерно для расщепления AP-сайтов по механизму  $\beta$ -элиминирования ДНК-гликозилазами [35], хотя некоторые гликозилазы (например, MutY *E. coli*) способны формировать основание Шиффа без последующего  $\beta$ -элиминирования [36]. Однако взаимодействие с AP-сайтами обнаружено для ряда белков, участвующих в других клеточных процессах. Топоизомераза I млекопитающих необратимо связывается с ДНК, если ДНК содержит AP-сайт в положении +1 по отношению к точке расщепления [37]. Присутствие AP-сайтов в ДНК неблагоприятным образом влияет на репликацию ДНК, приводя к ее задержке или введению мутаций [38, 39]. Эти повреждения в ДНК оказывают негативное действие на процесс транскрипции, вызывая паузы [40].

Связывание с AP-сайтами с образованием основания Шиффа установлено для ряда белков, включая ДНК-полимеразы  $\beta$ ,  $\lambda$ ,  $\gamma$ ,  $\iota$ ,  $\theta$ ,  $\kappa$  [41–46], HIV-1-интегразу [47], несколько ДНК-лигаз различного происхождения [48], S3 рибосомный белок человека и *Drosophila* [49, 50] и нуклеозиддифосфаткиназу NM23-H2/NDP человека [51]. Таким образом, связывание клеточных белков с AP-сайтами может иметь большое значение для их репарации, временной защиты, а также формирования клеточного сиг-

нала. Кроме того, в некоторых случаях такое взаимодействие может влиять на нормальные физиологические функции белков. Несмотря на достаточно большой объем информации по взаимодействию клеточных белков с AP-сайтами, нет оснований считать, что идентифицированы все белки, обладающие такой функцией, поэтому представляет интерес целенаправленный поиск таких белков. Это было реализовано двумя независимыми группами исследователей с использованием одной и той же схемы для прокариотических (*Escherichia coli*) и эукариотических клеток (*Saccharomyces cerevisiae*, *Bos taurus*, *Homo sapiens*) [52–55].

В общем виде схема включает: 1) обнаружение белков в клеточных экстрактах, формирующих ковалентные аддукты с AP-сайтами в ДНК; 2) создание AP-ДНК, содержащих функциональную группу, обеспечивающую селективное выделение продуктов сшивки ДНК–белок; 3) препаративную сшивку белков исследуемого экстракта с такой ДНК; 4) аффинную очистку целевых продуктов; 5) идентификацию белка в составе ковалентного аддукта с ДНК по данным масс-спектрометрии; 6) подтверждение результатов с использованием очищенных индивидуальных белков и/или специфических антител, а также информации об известных функциях/взаимодействиях идентифицированного белка; 7) исследование функциональной роли обнаруженных взаимодействий белков с AP-ДНК.

#### *Идентификация Ki80-субъединицы Ki-антигена как белка, взаимодействующего с AP-сайтами*

В качестве примера более детально рассмотрена идентификация Ki80-субъединицы Ki-антигена как белка экстрактов клеток человека, эффективно взаимодействующего с AP-сайтами [52, 53].

Для идентификации белка необходимо выделить продукт сшивки ДНК–белок. Аффинная очистка целевых продуктов была основана на взаимодействии биотин–стрептавидина. Для обеспечения селективного выделения целевых продуктов сшивки ДНК–белок в 3'-конец исходного урацилсодержащего олигонуклеотида был введен остаток биотинилированного dUMP за счет активности ДНК-полимеразы. Однако могут использоваться и синтетические методы введения биотина в состав олигонуклеотида, которые хорошо разработаны [56] и применялись для аналогичных целей в ряде работ [3–6, 55]. Кроме того, коммерчески доступно большое число аффинных сорбентов, основанных на связывании биотина. После адсорбции неспецифически связанные белки удаляют путем серии отмывок.

Комплексы биотин–стрептавидин разрушаются в условиях денатурации стрептавидина, и для этих целей можно использовать различные способы и агенты (гуанидингидрохлорид, мочевины, доде-

цилсульфат натрия) [5, 55]. Наиболее простым подходом является термическая обработка сорбента с адсорбированным продуктом в SDS-содержащем буфере для приготовления образцов для электрофореза в ПААГ по методу Леммли.

В ряде работ применяли и другие способы отделения анализируемых белков от сорбента. Например, гидролиз ДНК нуклеазой [55] или использование олигонуклеотидов, в которых остаток биотина присоединен к олигонуклеотиду связью, разрываемой под действием УФ-света [57]. Выбор способа может определяться требованиями последующего метода анализа. После электрофоретического разделения по методу Леммли и окрашивания белков, целевой продукт идентифицируют по совпадению положения в геле метки в ДНК и окрашенного белка. Такой способ идентификации целевого продукта в геле является дополнительным подтверждением, что дальнейшему анализу будет подвергаться белок, непосредственно связывающий ДНК. Хотя нельзя исключить присутствие примесных белков, которые обладают той же электрофоретической подвижностью, что и целевой продукт. Эти белки могут связываться с сорбентом неспецифически или посредством прочных белок-белковых взаимодействий с полипептидной цепью, содержащей ковалентно присоединенную ДНК. Белки непосредственно в геле подвергаются протеолитическому расщеплению и экстрагированные пептиды анализируются масс-спектрометрическими методами. Детали проведения анализа и идентификации описаны в соответствующих экспериментальных работах [26, 51–55].

Для поиска белков клеток человека, способных к формированию ковалентных аддуктов с AP-сайтами, был использован радиоизотопно-меченый ДНК-дуплекс (32 п.о.), содержащий AP-сайт в середине одной из цепей. AP-сайты в ДНК генерировали за счет удаления остатка урацила в составе олигонуклеотида урацил-ДНК-гликозилазой *E. coli* непосредственно перед экспериментом [51–54]. При последующем анализе в цельноклеточных экстрактах HeLa, легочных фибробластах человека, K-562 и MCF-7 обнаружены главным образом продукты сшивки AP-ДНК с белками, которые обладают одинаковой электрофоретической подвижностью. Кажущаяся молекулярная масса такого продукта, оцененная по электрофоретической подвижности, составляет приблизительно 95 кДа. Следует отметить, что кажущаяся молекулярная масса продуктов сшивки приблизительно соответствует сумме масс белка и ДНК. При замене в структуре ДНК AP-сайта на его аналог (остаток ТНФ) или без обработки  $\text{NaBH}_4$  продукты сшивки ДНК-белок не регистрируются (рис. 4а).

Анализ литературных данных показал, что ни один из белков, для которых к тому времени было достоверно установлено взаимодействие с AP-сайтами через образование основания Шиффа, не об-

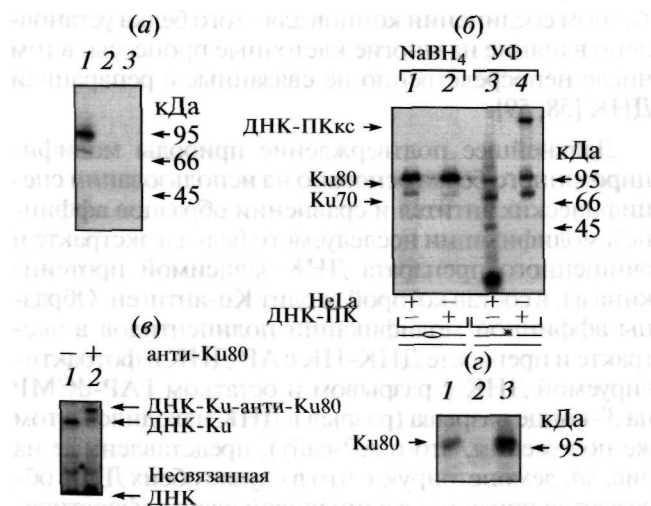


Рис. 4. Идентификация Ку-антигена как белка, взаимодействующего с AP-сайтами. По данным работ [52, 53]. (а) Модификация белков экстракта клеток HeLa: 1 – продукты сшивки AP-ДНК с белками экстракта клеток HeLa, 2 – контроль – замена AP-сайта в ДНК на его аналог – остаток ТНФ, 3 – контроль без обработки  $\text{NaBH}_4$ . (б) Сравнение продуктов сшивки полипептидов в экстракте клеток HeLa и препарате ДНК-ПК с AP-ДНК (1 и 2) и фотоактивируемой ДНК (3 и 4). (в) Идентификация белка по “супердвигу” комплексов Ку-антигена с AP-ДНК в присутствии моноклональных антител против Ку80 в условиях нативного электрофореза в ПААГ. (г) Идентификация белка методом иммунопреципитации с использованием моноклональных антител против Ку80. 1 – алиquota реакционной смеси, 2 и 3 – продукты, не связавшиеся и связавшиеся с Protein-A-сефарозой соответственно.

ладает подходящей молекулярной массой, чтобы формировать продукты с наблюдаемой электрофоретической подвижностью. В результате проведенного анализа с использованием описанного выше подхода Ku80-полипептид идентифицирован как наиболее достоверный кандидат (Mowse score 115, coverage 15%).

Ku-антиген – эукариотический гетеродимерный ДНК-связывающий комплекс, состоящий из субъединиц с молекулярными массами около 70 (Ku70) и 83 кДа (Ku80). Его основная функция состоит в участии в репарации двухцепочечных разрывов ДНК путем негомологичного соединения концов. Ку-антиген, наряду с каталитической субъединицей, входит в состав ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК). Каталитическая субъединица (ДНК-ПКкс) способна связываться с концами ДНК, но Ку-антиген примерно в 100 раз увеличивает сродство ДНК-ПКкс к ДНК [58]. Ку-антиген взаимодействует с рядом белков, участвующих в негомологичном соединении концов, и рассматривается как белок, обеспечивающий сборку комплекса репарации и удерживание вместе двух молекул ДНК во время репарации [58]. Помимо участия в негомоло-

гичном соединении концов для этого белка установлено влияние на многие клеточные процессы, в том числе непосредственно не связанные с репарацией ДНК [58, 59].

Дальнейшее подтверждение природы модифицированного белка основано на использовании специфических антител и сравнении образцов аффинной модификации исследуемого белка в экстракте и очищенного препарата ДНК-зависимой протеинкиназы, в состав которой входит Ku-антиген. Образцы аффинной модификации полипептидов в экстракте и препарате ДНК-ПК с AP-ДНК и фотоактивируемой ДНК с разрывом и остатком FAP-dCMP на 3'-конце разрыва (разрыв в ДНК находился в том же положении, что и AP-сайт), представленные на рис. 4б, демонстрируют, что в случае обеих ДНК образуются продукты с одинаковой электрофоретической подвижностью.

Кроме того, было показано [52], что в условиях нативного электрофореза в ПААГ в присутствии моноклональных анти-Ku80-иммуноглобулинов наблюдается уменьшение электрофоретической подвижности комплекса белок-AP-ДНК, образованного в экстракте из клеток HeLa (рис. 4в). Данные анализа продуктов аффинного осаждения продуктов сшивки AP-ДНК с белками в экстракте клеток HeLa, проведенного с использованием Protein A-сфаразы, моноклональных анти-Ku80-иммуноглобулинов и преиммунной сыворотки (рис. 4з), подтвердили природу белка.

Взаимодействие Ku-антигена – регуляторного белка системы негомологичного соединения концов – с AP-сайтами, представляющими собой интермедиат процесса эксцизионной репарации оснований, абсолютно неожиданно и ставит вопрос о биологической роли таких взаимодействий. Как отмечалось выше, формирование основания Шиффа является стадией каталитического расщепления AP-сайтов по механизму  $\beta$ -элиминирования ДНК-гликозилазы [35], поэтому, если обнаруживается такой тип взаимодействия белка с AP-сайтом, проверка белка на наличие AP-лиазной активности является своего рода “золотым” стандартом.

С использованием коммерчески доступного препарата ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК), в состав которой входит Ku-антиген, была оценена способность ДНК-ПК расщеплять AP-сайты, расположенные в середине одной из цепей 32-мерного линейного ДНК-дуплекса [52], но такая активность не была выявлена. Однако в недавно опубликованной работе [60] было установлено, что Ku-антиген проявляет AP-лиазную активность, когда AP-сайт расположен в непосредственной близости к двухцепочечным концам ДНК (AP-сайт находился во втором положении с 5'-конца в одноцепочечной части ДНК-дуплекса). Более того, Ku-антиген обладает 5'-дезоксирибозофосфатлиазной активностью, удаляя 5'-дезоксирибозофосфатный остаток, распо-

ложенный непосредственно на 5'-конце олигонуклеотида в составе тупых концов ДНК-дуплекса. Обе эти активности необходимы для удаления блокирующих репарацию групп при подготовке концов в процессе негомологичного соединения двухцепочечных разрывов. Рассмотренный пример, с одной стороны, подтверждает универсальность используемых клетками механизмов и, с другой стороны, – способность белков выполнять несколько различных функций, причем некоторые из них могут быть узкоспециализированными.

Поскольку пришивка AP-ДНК к Ku80 (см. рис. 4а) в экстрактах происходит с высокой селективностью и эффективностью, этот подход потенциально может быть использован для оценки содержания активных в связывании ДНК форм Ku-антигена в экстрактах клеток в присутствии других клеточных белков. Сравнительный анализ содержания Ku80 в экстрактах клеток нескольких культивируемых линий меланом и HeLa, проведенный с использованием дот-ELISA и AP-ДНК, показал, что количество ковалентных аддуктов Ku80 с AP-ДНК варьирует в значительных пределах и в целом положительно коррелирует с содержанием этого белка, оцененным иммуноферментным окрашиванием [61].

В некоторых образцах обнаружено значительное количество продукта сшивки с меньшей кажущейся молекулярной массой. Дальнейший анализ с использованием антител, специфичных к C- и N-концам Ku80, позволил отнести указанные продукты к укороченному с C-конца полипептиду Ku80. Согласно литературным данным, в некоторых культивируемых клетках человека представлена укороченная с C-конца форма Ku80 (Ku80v), возникающая под действием трипсиноподобной протеиназы, существующей в этих клетках и активирующейся в определенных условиях [59]. Ku80v образует гетеродимеры с Ku70, сохраняющие активность в связывании ДНК, но не взаимодействующие с каталитической субъединицей ДНК-ПК, что уменьшает способность клеток к негомологичному соединению концов [59]. Таким образом, с использованием AP-ДНК в экстрактах клеток, возможна детекция активных в связывании с ДНК форм Ku-антигена, в том числе укороченных.

#### *Идентификация PARP1 как белка, взаимодействующего с AP-сайтами*

Учитывая конкуренцию Ku-антигена с белками при связывании с линейной AP-ДНК, при дальнейшем поиске в клеточных экстрактах белков, взаимодействующих с AP-сайтами, были использованы кольцевые ДНК, синтезированные на основе одноцепочечной ДНК фага M13, которые содержат случайно распределенные AP-сайты в одной цепи [54]. Для M13-AP-ДНК во всех экстрактах основные продукты сшивки с одной и той же электрофорети-



ческой подвижностью соответствуют белку с кажущейся молекулярной массой около 120 кДа (рис. 5а).

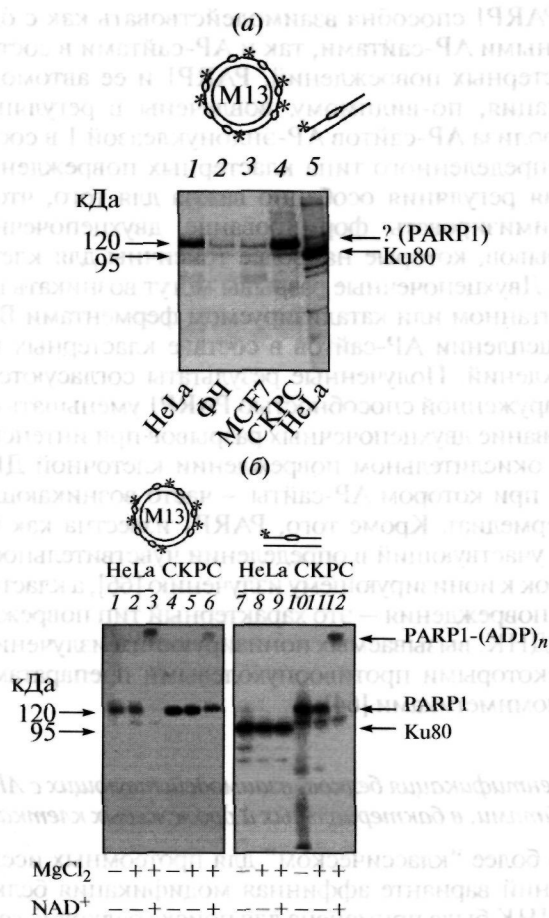
С учетом известного взаимодействия PARP1 с ДНК-интермедамиатами и белками BER и кажущейся молекулярной массы продуктов было выдвинуто предположение, что эти продукты относятся к PARP1. В экспериментах с индивидуальной рекомбинантной PARP1 была установлена способность белка образовывать сшивки с линейной и кольцевой AP-ДНК, опосредованные образованием основания Шиффа.

Как отмечено выше, PARP1, ковалентно присоединенная к фотоактивируемой ДНК, способна подвергаться поли-ADP-рибозилированию, что позволяет идентифицировать продукты, относящиеся к PARP1, среди других сшивок белок-ДНК. С использованием кольцевой и линейной AP-ДНК и очищенной рекомбинантной PARP1 была установлена способность белка повергаться поли-ADP-рибозилированию в составе ковалентного аддукта с ДНК. Обнаруженное при использовании экстрактов изменение электрофоретической подвижности продуктов сшивки AP-ДНК-белок в присутствии  $\text{NAD}^+$  дает основания для отнесения продукта сшивки к PARP1 (рис. 5б).

Идентичность белка в составе ковалентного аддукта с AP-ДНК была подтверждена методом пептидного картирования, проведенного в соответствии с процедурой, описанной выше. Для идентификации был использован экстракт из семенников крупного рогатого скота, поскольку в нем не образуются продукты, соответствующие Ku80, а продукты, относимые к PARP1, преобладают (рис. 5б, дорожка 10). PARP1 идентифицирована как наиболее достоверный кандидат на образование продуктов сшивки AP-ДНК-белок (Mowse score 248, coverage 38%).

Представляет интерес оценка способности PARP1 к каталитическому расщеплению AP-сайтов. PARP1 не проявляет значимой AP-лиазной активности на 32-мерном ДНК-дуплексе с AP-сайтом в середине одной из цепей [54], но не исключено, что такая активность может быть обнаружена при процессинге AP-сайтов в составе каких-то специфичных структур, как это было установлено для Ku-антигена [60].

Это взаимодействие может быть связано с регуляцией процессинга AP-сайтов, которая особенно важна при репарации кластерных повреждений, поскольку установлено образование двухцепочечных разрывов при репарации таких AP-сайтов [62]. APE1 — основная AP-эндонуклеаза клеток млекопитающих [63], поэтому было исследовано влияние PARP1 на гидролиз этим ферментом AP-сайтов в составе ДНК-дуплексов, содержащих напротив AP-сайта либо dAMP (AP-ДНК-А), либо остаток THF — синтетический аналог AP-сайта (AP-ДНК-ТНФ). В использованных условиях для



**Рис. 5.** Идентификация PARP1 как белка, взаимодействующего с AP-сайтами. По данным работы [54]. (а) Анализ продуктов сшивки AP-ДНК с белками различных экстрактов. 1–4 – продукты пришивки кольцевой AP-ДНК к белкам цельноклеточных экстрактов HeLa, фибробластов человека (ФЧ), MCF-7 и ядерного экстракта из семенников крупного рогатого скота (СКРС) соответственно. 5 – Контрольный образец сшивки белков экстракта клеток HeLa с 32-мерной линейной AP-ДНК (без обработки нуклеазой). (б) Автополи(ADP-рибозил)ирование PARP1 экстрактов клеток HeLa и СКРС, ковалентно присоединенной к AP-ДНК. 1–6 – сшивка белков экстрактов с кольцевой AP-ДНК, 7–12 – с линейной AP-ДНК. Положение продуктов поли(ADP-рибозил)ирования PARP1, ковалентно присоединенной к AP-ДНК (3, 6, 12), обозначено символом PARP1-(ADP)<sub>n</sub>.

AP-ДНК-А и AP-ДНК-ТНФ глубина гидролиза AP-сайтов составляла  $94 \pm 5\%$  и  $93 \pm 8\%$  соответственно, а в присутствии PARP1 соответствующие параметры для AP-ДНК-А –  $93 \pm 5\%$ , и AP-ДНК-ТНФ –  $62 \pm 10\%$ . Следовательно, PARP1 ингибирует гидролиз AP-сайта AP-эндонуклеазой 1, если напротив него в комплементарной цепи находится аналог AP-сайта, то есть, если AP-сайт находится в составе кластерного повреждения.

PARP1 способна взаимодействовать как с оди-  
ночными AP-сайтами, так и AP-сайтами в составе  
кластерных повреждений. PARP1 и ее автомода-  
фикация, по-видимому, вовлечены в регуляцию  
гидролиза AP-сайтов AP-эндонуклеазой I в соста-  
ве определенного типа кластерных повреждений.  
Такая регуляция особенно важна для того, чтобы  
минимизировать формирование двухцепочечных  
разрывов, которые наиболее токсичны для клеток  
[64]. Двухцепочечные разрывы могут возникать при  
спонтанном или катализируемом ферментами BER  
расщеплении AP-сайтов в составе кластерных по-  
вреждений. Полученные результаты согласуются с  
обнаруженной способностью PARP1 уменьшать об-  
разование двухцепочечных разрывов при интен-  
сивном окислительном повреждении клеточной ДНК  
[65], при котором AP-сайты — часто возникающий  
интермедиат. Кроме того, PARP1 известна как бе-  
лок, участвующий в определении чувствительности  
клеток к ионизирующему излучению [66], а кластер-  
ные повреждения — это характерный тип поврежде-  
ний ДНК, вызываемых ионизирующим излучением  
и некоторыми противоопухолевыми препаратами-  
радиомиметиками [64].

*Идентификация белков, взаимодействующих с AP-  
сайтами, в бактериальных и дрожжевых клетках*

В более “классическом” для протеомных иссле-  
дований варианте аффинная модификация белков  
AP-ДНК была применена для поиска белков *E. coli* и  
*Saccharomyces cerevisiae*, образующих основание  
Шиффа с AP-сайтами [55]. В этом случае иденти-  
фикацию проводили для ряда белков, образующих  
сшивки с AP-сайтами в экстрактах клеток *E. coli* в  
логарифмической и стационарной фазе роста куль-  
туры. Следует отметить, что в этой работе был ис-  
пользован разработанный ранее неферментативный  
способ создания AP-сайтов в ДНК, который, по  
мнению авторов, имеет ряд преимуществ перед бо-  
лее широко используемым способом, основанным  
на удалении остатков урацила урацил-ДНК-глико-  
зилазой. Он основан на периодатном окислении  
2,3,5,6-тетрагидроксигексилфосфатного предше-  
ственника в составе олигонуклеотида, введенного  
при стандартном фосфорамидитном синтезе олиго-  
нуклеотидов [67]. Периодатное окисление позволяет  
получать AP-сайты практически со 100% выходом.

Среди прокариотических белков были иденти-  
фицированы AroF, DnaK, MutM, PolA, TnaA, TufA,  
UvrA *E. coli*, эукариотических — ARC1 и Ygl245wp —  
дрожжевые. Для Ygl245wp — белка с неизвестной  
функцией, важного для жизнеспособности клеток,  
была клонирована кодирующая последовательность  
и, с использованием рекомбинантной плазмиды,  
белок был наработан в клетках *E. coli* и выделен в ин-  
дивидуальном состоянии. Для полученного белка  
была подтверждена способность связываться с  
AP-ДНК с образованием основания Шиффа, одна-

ко биологическая значимость этого взаимодействия  
не установлена.

ДНК-полимераза I, как и другие ДНК-полиме-  
разы A-семейства, обладает слабой ДНК-лиазной и  
dRP-лиазной активностью [68], но значимость этих  
активностей *in vivo* не установлена. Способность  
UvrA — ключевого компонента эксцизионной репа-  
рации нуклеотидов бактерий, взаимодействовать с  
AP-сайтами в составе UvrABC-комплекса указывает  
на возможную роль эксцизионной репарации нук-  
леотидов как запасного пути репарации AP-сайтов у  
бактерий [69]. Интересно отметить, что у дрожжей  
*S. cerevisiae* эксцизионная репарация нуклеотидов  
также является альтернативным путем репарации  
AP-сайтов [22] и только AP-сайты в транскрибируе-  
мой цепи являются эффективными субстратами  
этого процесса [70].

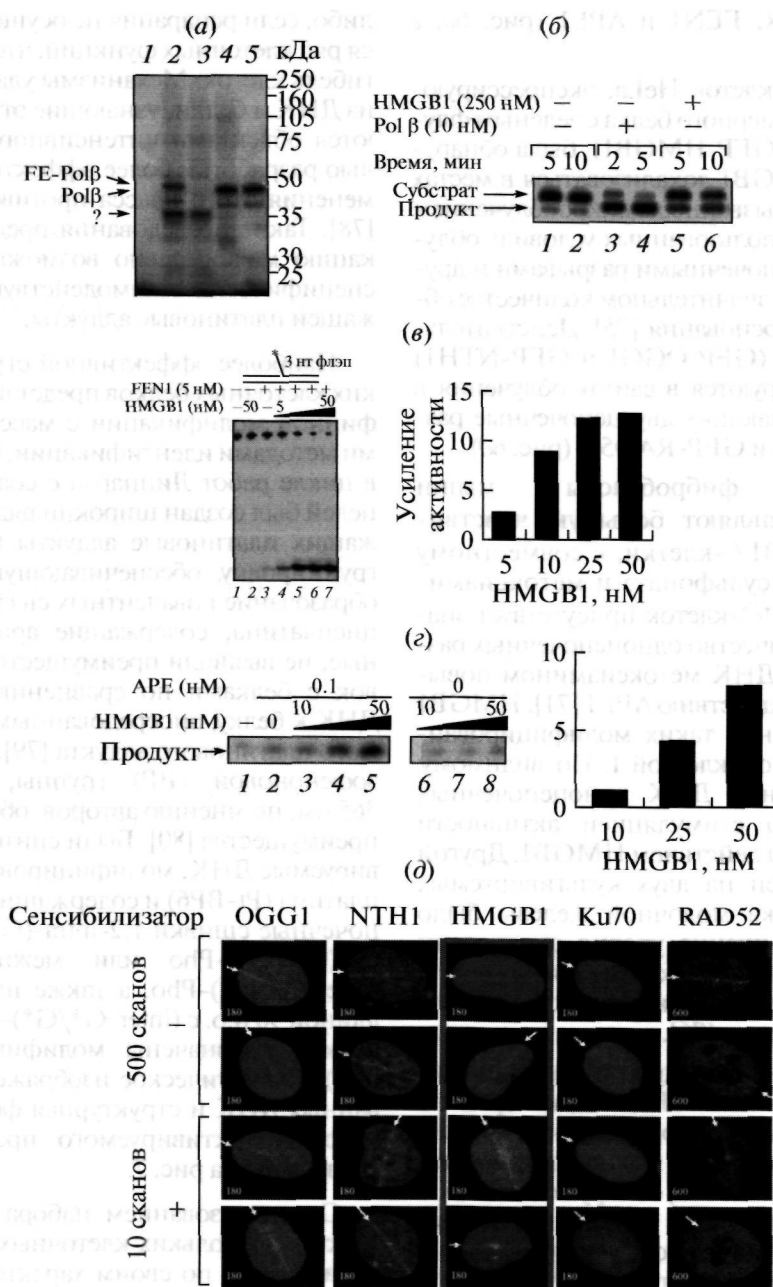
**ПОИСК НОВЫХ УЧАСТНИКОВ ПРОЦЕССА  
BER. ИДЕНТИФИКАЦИЯ НМGB1  
КАК КОФАКТОРА ЭТОГО ПРОЦЕССА**

Согласно современным представлениям, выбор  
пути BER — короткозаплаточный или длиннозаплат-  
очный — зависит от эффективности удаления 5'-  
dRP-остатка за счет лиазной активности Pol  $\beta$ , кото-  
рая является основным известным белком высших  
эукариот, осуществляющим эту функцию [71, 72].

Для поиска других белков с 5'-dRP-лиазной ак-  
тивностью был использован ДНК-интермедиат  
BER, содержащий остаток 5'-dRP, и экстракт эмбри-  
ональных фибробластов мыши (МЭФ), нокаутных  
по гену Pol  $\beta$  и экспрессирующим Pol  $\beta$  с флаг-эпито-  
пом (FE) [26]. В МЭФ-экстрактах был обнаружен  
белок, формирующий ковалентные аддукты с ДНК-  
дуплексом с разрывом, фланкированным 5'-dRP-  
остатком (рис. 6a).

С использованием описанной выше процедуры  
проведена идентификация белка в составе кова-  
лентного аддукта, образованного белком в экстракте  
клеток HeLa с ДНК, содержащей остатки 5'-dRP и  
биотина. В качестве наиболее достоверного канди-  
дата идентифицирован НМGB1 (Mowse score 102,  
sequence coverage 32%).

НМGB1 — высококопийный негистоновый архи-  
тектурный белок хроматина — обладает способно-  
стью изгибать ДНК и влиять на процессы эксцизи-  
онной репарации нуклеотидов и репарации ошибоч-  
но спаренных оснований [73, 74]. Обнаруженная  
способность НМGB1 взаимодействовать с ДНК-  
интермедиатом BER ставит вопрос о его роли в этом  
процессе. Для выделенного из клеток HeLa  
НМGB1 в экспериментах *in vitro* установлена спо-  
собность непосредственно взаимодействовать с  
несколькими белками BER: APE1, Pol  $\beta$  и FEN1, а  
также обнаружено, что он проявляет слабую 5'-dRP-  
лиазную активность (рис. 6b) и стимулирует актив-



**Рис. 6.** Идентификация HMGB1 как кофактора BER. По данным работы [26]. (а) Поиск белков экстрактов, взаимодействующих с 5'-dRP-остатком в ДНК-дуплексе: 1 и 2 – продукты пришивки 5'-dRP-ДНК к белкам в экстрактах МЭФ, экспрессирующих Pol β с флаг-эпитопом (FE) и нокаутных по этому белку соответственно, 3 – то же для индивидуальной Pol β; (б) Сравнение 5'-дезоксирибозофосфатлиазной активности HMGB1 и Pol β; (в) Влияние HMGB1 на активность FEN1. Электрофоретический анализ продуктов расщепления олигонуклеотидов FEN1 и количественное представление данных. На оси ординат приведена кратность усиления активности по сравнению с контролем в отсутствие HMGB1; (г) Влияние на активность APE1. Электрофоретический анализ продуктов расщепления AP-сайтов APE1 в присутствии различных концентраций HMGB1 (1–5), контроль без APE1 (6–8) и количественное представление данных. На оси ординат приведена кратность усиления активности по сравнению с контролем в отсутствие HMGB1; (д) Взаимодействие GFP-HMGB1 с сайтами повреждений ДНК в клетках HeLa, вызванных микроболучением сканирующим лазером (λ 405 нм) без сенсibilизатора и в присутствии 8-метоксиспсоралена (100 мкМ). Над столбиками обозначен белок, который экспрессировался в данном типе клеток HeLa в виде химерного белка с зеленым флуоресцентным белком. OGG1 – 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза, NTH1 – ДНК-гликозилаза, удаляющая из ДНК окисленные пиримидины, RAD52 – белок, участвующий в репарации двухцепочечных разрывов в ДНК путем гомологичной рекомбинации, Ku70 – субъединица Ku-антигена, участвующего в репарации двухцепочечных разрывов в ДНК путем негомологичного соединения концов. Стрелками обозначено направление сканирования. Время сканирования 3 мин (10 мин для RAD52) соответствует максимальной аккумуляции каждого из белков в сайтах повреждения ДНК.

ность ферментов BER: FEN1 и APE1 (рис. 6в, г соответственно).

С использованием клеток HeLa, экспрессирующих HMGB1 в виде химерного белка с зеленым флуоресцентным белком (GFP-HMGB1), была обнаружена способность HMGB1 локализоваться в местах повреждений ДНК, вызванных микрооблучением лазером (рис. 6д). В использованных условиях облучения наряду с одноцепочечными разрывами и другими повреждениями в значительном количестве образуются окисленные основания [75]. Действительно, ДНК-гликозилазы (GFP-OGG1 и GFP-NTH1) эффективно аккумулируются в сайтах облучения в отличие от белков, узнающих двухцепочечные разрывы ДНК (GFP-Ku70 и GFP-RAD52) (рис. 6д).

Эмбриональные фибробласты мыши HMGB1<sup>+/+</sup>-типа проявляют большую чувствительность, чем HMGB1<sup>-/-</sup>-клетки, к совместному действию метилметансульфоната и метоксиамиона, и в ДНК HMGB1<sup>+/+</sup>-клеток присутствует значительно большее количество одноцепочечных разрывов. Обработка AP-ДНК метоксиамином повышает ее устойчивость к действию APE1 [71]. HMGB1 стимулирует расщепление таких модифицированных AP-сайтов AP-эндонуклеазой 1. По-видимому, накопление в клеточной ДНК одноцепочечных разрывов обусловлено стимуляцией активности AP-эндонуклеазы 1 под действием HMGB1. Другой группой исследователей на двух культивируемых клеточных линиях рака молочной железы было установлено, что повышение уровня экспрессии HMGB1 меняет фенотип клеток, замедляя их рост и увеличивая чувствительность клеток к действию ионизирующего излучения [76].

Интересно отметить, что у другой группы негистоновых белков хроматина — HMGA, которые не транслируются в нормальных соматических клетках человека, но обнаруживаются в большинстве неопластических клеток человека, обнаружены dRP- и AP-лиазные активности [77]. С использованием функциональных тестов было показано, что эти лиазные активности усиливают устойчивость клеток к действию реагентов, которые вызывают повреждения в ДНК, репарируемые системой BER, и что уровень защиты напрямую коррелирует с эффективностью экспрессии HMGA2. Авторы рассматривают этот белок как участник процесса BER, модулирующий “пропускную способность” этой системы.

#### ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ, УЗНАЮЩИХ ЦИСПЛАТИНОВЫЕ АДДУКТЫ В ДНК

Активность противоракового препарата цисплатина обусловлена его способностью связываться с ДНК. Платиновые аддукты вызывают локальное раскручивание и изгибание ДНК [78], что создает места узнавания для белков и запускает ряд сигнальных путей. Затем повреждения либо репарируются,

либо, если репарация не осуществляется, нарушается ряд клеточных функций, что может индуцировать гибель клеток. Механизмы удаления таких аддуктов из ДНК и белки, узнающие эти повреждения, являются объектами интенсивного исследования с целью разработки более эффективной стратегии применения этого класса противораковых препаратов [78]. Такие исследования предполагают идентификацию максимально возможного спектра белков, специфически взаимодействующих с ДНК, содержащей платиновые аддукты.

Наиболее эффективной стратегией в поиске таких клеточных белков представляется сочетание аффинной модификации с масс-спектрометрическими методами идентификации, что было реализовано в цикле работ Липпарда с соавт. [79–81]. Для этих целей был создан широкий ряд ДНК-зондов, содержащих платиновые аддукты и фотоактивируемую группировку, обеспечивающую при ее активации образование ковалентных связей с белком. Аналоги цисплатина, содержащие арилизидные производные, не выявили преимуществ в образовании сшивок с белками по сравнению с присоединением ДНК к белку, опосредованным фотоактивацией самого платинового аддукта [79]. Использование бензофеноновой (BP) группы, активируемой при 365 нм, по мнению авторов, обеспечивает огромные преимущества [80]. Были синтезированы фотоактивируемые ДНК, модифицированные аналогом цисплатина (Pt-BP6) и содержащие биотин и внутрицепочечные сшивки 1,2-intra-(G\*G\*)-Pho или 1,3-intra-(G\*TG\*)-Pho или межцепочечные сшивки (inter-G\*/G\*)-Pho, а также шпилечные структуры длиной 90 п.о. с (inter-G\*/G\*)-Pho-сшивками (звездочкой обозначены модифицированные основания). Схематическое изображение части использованных ДНК и структурная формула использованного фотоактивируемого производного платины приведены на рис. 7.

С использованием набора ДНК-зондов в экстрактах нескольких клеточных линий человека, отличающихся по своим характеристикам, а также в экстрактах, полученных из клеток, находившихся на разных фазах клеточного цикла, проведен детальный анализ спектра белков, узнающих такие повреждения [80]. Идентификацию белков в составе предварительно выделенных продуктов сшивки ДНК–белок осуществляли масс-спектрометрическими методами.

Выявлен широкий спектр белков, узнающих такие повреждения и участвующих в разных клеточных процессах: ремоделировании хроматина, транскрипции и некоторых путях репарации ДНК. Часть белков эффективно связывается со всеми типами ДНК-зондов, но некоторые из белков проявляют достаточно высокую селективность в узнавании повреждений. Так, например, белки репарации Ku70, Ku80, Msh2, ДНК-лигаза III, PARP-1, ДНК-ПКкс и

структурные негистоновые белки хроматина – HMGB1, HMGB2, HMGB3 – взаимодействуют с ДНК, содержащими любой из двух типов внутрицепочечных сшивок и межцепочечные сшивки [80, 81]. Часть из идентифицированных белков проявляла специфичность в узнавании платиновых аддуктов. Белки HMGB1, HMGB2, HMGB3 со значительно большей эффективностью присоединялись к ДНК с 1,2-intra-(G\*G\*) /CC-аддуктами, чем к аналогичной ДНК с неканонической парой 1,2-(G\*G\*)/CT [81]. Белок UBF1 (фактор транскрипции) эффективно взаимодействует с 1,2-intra-(G\*G\*)-аддуктом в отличие от 1,3-intra-(G\*TG\*)-аддукта [81]. Репликационный белок А (RPA), участвующий в эксцизионной репарации нуклеотидов, присоединялся только к ДНК, содержащей 1,3-intra-(G\*TG\*)-внутрицепочечную сшивку [81]; сшивки с ДНК образовывала р70-субъединица этого гетеротримерного белка, состоящего из полипептидов с молекулярными массами 70, 32 и 14 кДа (р70, р32 и р14). Часть белков, узнающих 1,2-intra-(G\*G\*)-аддукты, удалось идентифицировать только при использовании шпилечной ДНК (90 п.о.) с этим типом повреждений: YB-1, RFC1, RFC2, Msh6, PB-1, DDB, ДНК-топоизомераза I, и несколько белков, участвующих в ремоделировании хроматина [80]. Среди идентифицированных полипептидов к белкам, специфически узнающим межцепочечные сшивки, относятся полинуклеотидкиназа, XRCC1, XPE-BF [81].

Тот факт, что PARP1 и ее партнеры в процессе BER (ДНК-лигаза III и XRCC1) вовлечены в узнавание межцепочечных сшивок, по мнению авторов, свидетельствует о возможности репарации межцепочечных сшивок ДНК, образованных производными платины, системой BER [81].

Исследования, проведенные в экстрактах клеток HeLa, полученных из клеток на разных фазах клеточного цикла, выявили только количественные различия в степени модификации некоторых белков [81]. При сравнительном анализе модификации белков ядерных экстрактов из культивируемых клеток карцином: HeLa (шейки матки), VxPC3 (поджелудочной железы), NTera 2 (семенников), U2OS (кости), проведенном с использованием ДНК с межцепочечными сшивками, обнаружены только изменения интенсивностей продуктов модификации (в частности, PARP1) без изменения набора модифицированных белков, в отличие от экстракта культивируемых клеток яичников китайского хомячка [81]. В клетках хомячка набор белков, взаимодействующих с ДНК (inter-G\*/G\*)-Pho, содержащей межцепочечные сшивки, значительно отличался от соответствующего спектра белков клеток человека, и соответственно такая ДНК может использоваться как эффективный инструмент для характеристики ядерных белков, взаимодействующих с межцепочечными сшивками в клетках разного происхождения.

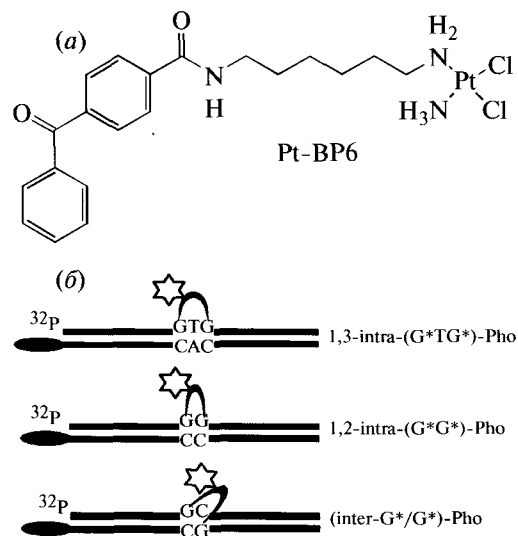


Рис. 7. Структурная формула фотоактивируемого аналога цисплатина, использованного для получения модифицированных ДНК (а), и схематическое изображение основных ДНК-зондов, содержащих этот аналог (б). Незаполненной звездочкой обозначена фотоактивируемая группа. При подготовке проб для масс-спектрометрического анализа модифицированных белков ДНК-зонды содержали остатки биотина (обозначено черным овалом). По данным работ [80, 81].

Считается, что устойчивость клеток к действию цисплатина ассоциирована с дефектами системы репарации ошибочно спаренных оснований [82]. С использованием ДНК (inter-G\*/G\*)-Pho, удалось показать, что степень модификации этих белков ДНК-платиновыми аддуктами значительно различается в клетках, чувствительных и устойчивых к цисплатину [82]. В экстрактах устойчивых клеток она выше, чем для чувствительных, что указывает на возможную роль этих белков в обеспечении устойчивости клеток к повреждению ДНК, связанному с образованием межцепочечных сшивок цисплатином.

В недавно опубликованной работе этой же группы исследователей [83] проведен детальный анализ узнавания PARP1 различных повреждений ДНК, вызванных несколькими производными платины: цисплатином, оксалиплатином и пириплатином (монофункциональным платиновым соединением). PARP1 узнает все типы повреждений, хотя и с различающейся эффективностью. Это указывает на возможное участие ансамбля белков BER в устранении таких повреждений и на потенциальную роль данного белка как регулятора этого процесса, хотя согласно существующим в настоящее время представлениям, основными системами репарации сшивок в ДНК, вызванных соединениями платины, являются эксцизионная репарация нуклеотидов и репарация неправильно спаренных оснований [84].

Соотношение модификации белков систем репарации ДНК различными платиновыми производными ДНК\*

Система репарации	Модифицируемый белок (белки)	Тип фотоактивируемой ДНК, содержащей производные платины		
		внутрицепочечные сшивки 1,2-intra-(G*G*)-Pho, % <sup>#</sup>	внутрицепочечные сшивки 1,3-intra-(G*TG*)-Pho, % <sup>#</sup>	межцепочечные сшивки (inter-G*/G*-Pho), % <sup>#</sup>
NER	RPA1		20.85	
MMR	hMSH3			9.42
	hMSH2	1.31	11.58	37.27
BER	PARP1/ДНК-лигаза III	14.68	27.58	10.65
	XRCC1			6.37
	PNK			4.42
NHEJ	ДНК-ПКкс	2.57	0.99	2.53
	Ku80	2.2	7.28	24.47
	Ku70	2.16	12.06	6.09
	HMGB1/2/3	73.21	19.65	6.08

\* По данным работ [80, 81].

<sup>#</sup> Количество модифицированного белка определено как доля (%) от общего количества всех белков, образующих УФ-индуцированные сшивки с данным типом ДНК.

Количественный анализ продуктов присоединения фотоактивируемых производных платины с внутри- и межцепочечными сшивками в ДНК (см. таблицу) показал, что в зависимости от типа ДНК, модификации подвергаются белки, относящиеся к нескольким путям репарации, причем для ДНК 1,3-intra-(G\*TG\*)-Pho белки BER – основная мишень. Однако следует отметить, что отдельно выделены белки HMGB-семейства, относящиеся к структурным белкам хроматина, для которых показано участие в различных путях репарации ДНК: NER, MMR, BER [26, 74, 85–89]. Кроме того, PARP1, ДНК-лигаза III, XRCC1, отнесенные здесь к системе BER, участвуют в альтернативном пути NHEJ [90].

Обнаруженные взаимодействия белков репарации с ДНК, модифицированной платиновыми производными, безусловно, требуют дальнейших исследований для определения роли идентифицированных белков в процессинге таких повреждений ДНК и их влияния на устойчивость клеток к действию ДНК-модифицирующих платиновых соединений.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные в обзоре работы по применению аффинной модификации как составной части подходов к идентификации белков в современном протеомном анализе доказывают высокую эффектив-

ность использованной методологии. Химически активные ДНК-зонды, как правило, узнаются многими клеточными белками и образуют с ними ковалентные аддукты. Однако в ряде случаев при применении таких ДНК для аффинной модификации белков в клеточных экстрактах обнаруживается высокая селективность ДНК-зондов, что выражается в модификации небольшого числа либо единичных белков. Примеры высокой селективности ДНК-зондов при модификации белков встречаются и в рассмотренных в обзоре работах. Например, модификация Ku80-субъединицы Ku-антигена в экстрактах клеток человека коротким ДНК-дуплексом с AP-сайтом и PARP1 кольцевой AP-ДНК происходила очень избирательно [52–54]. Фотоактивированная ДНК, имитирующая интермедиат BER, эффективно модифицировала ограниченное число белков экстракта МЭФ, причем из шести наиболее эффективно модифицируемых белков пять были идентифицированы как участники BER [20, 26]. Среди ДНК, содержащих производные платины, высокий уровень селективности характерен для ДНК 1,2-intra-(G\*G\*)-Pho в отношении белков HMGB-семейства [80, 81]. Химически активные ДНК-зонды, проявляющие высокую селективность в отношении определенных белков, представляются эффективным инструментом для сравнительного анализа содержания этих белков в экстрактах клеток

различного происхождения. Эффективность такого применения химически активных ДНК была продемонстрирована на примере Ku-антигена [61]. В этом случае была установлена положительная корреляция между количеством продуктов модификации этого белка в экстрактах клеток нескольких меланомных линий и его количеством, оцененным с помощью иммуноферментного анализа.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 08-04-00704, 09-04-93106 и 10-04-01083), программы РАН “Молекулярная и клеточная биология” и СО РАН (Интеграционный проект № 104).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shakib K., Norman J.T., Fine L.G., Brown L.R., Godovac-Zimmermann J. // *Proteomics*. 2005. V. 5. P. 2819–2838.
2. Melchers A., Stöckl L., Radszewski J., Anders M., Krenzlin H., Kalischke C., Scholz R., Jordan A., Nebrich G., Klose J., Sperling K., Digweed M., Demuth I. // *PLoS One*. 2009. V. 4. e5423.
3. Yaneva M., Tempst P. // *Anal. Chem*. 2003. V. 75. P. 6437–6448.
4. Qiu H., Wang Y. // *J. Proteome Res*. 2009. V. 8. P. 1983–1991.
5. Loeber R.L., Michaelson-Richie E.D., Codreanu S.G., Liebler D.C., Campbell C.R., Tretyakova N.Y. // *Chem. Res. Toxicol.* 2009. V. 22. P. 1151–1162.
6. Michaelson E., Loeber R.L., Codreanu S.G., Ming X., Liebler D.C., Campbell C., Tretyakova N.Y. // *J. Proteome Res.*, DOI: 10.1021/pr1000835
7. Khodyreva S.N., Lavrik O.I. // *Curr. Med. Chem*. 2005. V. 12. P. 641–655.
8. Lavrik O.I., Pestryakov P.E., Nazarkina J.K., Khodyreva S.N. // *Chemical probes in Biology* / Ed. Schneider M. Kluwer Academic Publishers, 2003. P. 181–192.
9. Lavrik O.I., Khodyreva S.N. // *Chemical probes in Biology* / Ed. Schneider M. Kluwer Academic Publishers, 2003. P. 193–205.
10. Rechkunova N.I., Lavrik O.I. // *Subcell. Biochem*. 2010. V. 50. P. 251–277.
11. Zatsepin T.S., Gait M.J., Oretskaya T.S. // *IUBMB Life*. 2004. V. 56. P. 209–214.
12. Schärer O. // *Angew. Chem. Int. Ed*. 2003. V. 42. P. 2946–2974.
13. Wlasoff W.A., Dobrikov M.I., Safronov I.V., Dudko R.Y., Bogachev V.S., Kandaurova V.V., Shishkin G.V., Dymshits G.M., Lavrik O.I. // *Bioconj. Chem*. 1995. V. 6. P. 352–360.
14. Dezhurov S.V., Khodyreva S.N., Plekhanova E.S., Lavrik O.I. // *Bioconj. Chem*. 2005. V. 16. P. 215–222.
15. Сафронов И.В., Шербик Н.В., Ходырева С.Н., Власов В.А., Добриков М.И., Шишкин Г.В., Лаврик О.И. // *Биоорг. химия*. 1997. Т. 7. С. 576–585.
16. Drachkova I.A., Petruseva I.O., Safronov I.V., Zacharenko A.L., Shishkin G.V., Lavrik O.I., Khodyreva S.N. // *Russ. J. Bioorgan. Chem*. 2001. V. 27. P. 173–179 (Драчкова И.А., Петрусева И.О., Сафронов И.В., Захаренко А.Л., Шишкин Г.В., Лаврик О.И., Ходырева С.Н. // *Биоорг. химия*. 2001. Т. 27. С. 197–204).
17. Колпащиков Д.М., Захаренко А.Л., Дежуров С.В., Речкунова Н.И., Ходырева С.Н., Дегтярев С.Х., Лутвак В.В., Лаврик О.И. // *Биоорг. химия*. 1999. Т. 25. С. 129–136.
18. Dezhurov S.V., Khodyreva S.N., Rechkunova N.I., Kolpashchikov D.M., Lavrik O.I. // *Russ. J. Bioorgan. Chem*. 2003. V. 29. P. 66–72 (Дежуров С.В., Ходырева С.Н., Речкунова Н.И., Колпащиков Д.М., Лаврик О.И. // *Биоорг. химия*. 2003. Т. 29. С. 74–81).
19. Lavrik O.I., Prasad R., Sobol R.W., Horton J.K., Ackerman E.J., Wilson S.H. // *J. Biol. Chem*. 2001. V. 276. P. 25541–25548.
20. Lindahl T. // *Mutat. Res*. 2000. V. 462. P. 129–135.
21. Boiteux S., Guillet M. // *DNA Repair*. 2004. V. 3. P. 1–12.
22. Ho E.L., Satoh M.S. // *Nucleic Acids Res*. 2003. V. 31. P. 7032–7040.
23. Takeshita M., Chang C.N., Johnson F., Will S., Grollman A.P. // *J. Biol. Chem*. 1987. V. 262. P. 10171–10179.
24. Erzberger J., Wilson D. III. // *J. Mol. Biol*. 1999. V. 290. P. 447–457.
25. D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G.G. // *Biochem. J*. 1999. V. 342. P. 249–268.
26. Prasad R., Liu Y., Deterding L.J., Poltoratsky V.P., Kedar P.S., Horton J.K., Kanno S., Asagoshi K., Hou E.W., Khodyreva S.N., Lavrik O.I., Tomer K.B., Yasui A., Wilson S.H. // *Mol. Cell*. 2007. V. 27. P. 829–841.
27. Cistulli C., Lavrik O.I., Prasad R., Hou E., Wilson S.H. // *DNA Repair*. 2004. V. 3. P. 581–591.
28. Суханова М.В., Ходырева С.Н., Лаврик О.И. // *Биохимия*. 2004. Т. 69. С. 558–568.
29. Sukhanova M.V., Khodyreva S.N., Lebedeva N.A., Prasad R., Wilson S.H., Lavrik O.I. // *Nucleic Acids Res*. 2005. V. 33. P. 1222–1229.
30. Суханова М.В., Ходырева С.Н., Лаврик О.И. // *Биохимия*. 2006. Т. 71. С. 909–923.
31. Sukhanova M., Khodyreva S., Lavrik O. // *Mutat. Res*. 2010. V. 685. P. 80–89.
32. Левина Е., Бавыкин С., Шук В., Мирзабеков А. // *Биохимия*. 1980. Т. 45. С. 1133–1145.
33. Lindahl T., Nyberg B. // *Biochemistry*. 1972. V. 11. P. 3610–3618.
34. Loeb L.A. // *Cell*. 1985. V. 40. P. 483–484.
35. Sun B., Latham K.A., Dodson M.L., Lloyd R.S. // *J. Biol. Chem*. 1995. V. 270. P. 19501–19508.
36. Zharkov D.O., Grollman A.P. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 12384–12394.
37. Pourquier P., Ueng L.-M., Kohlhagen G., Mazumder A., Gupta M., Kohn K. W., Pommier Y. // *J. Biol. Chem*. 1997. V. 272. P. 7792–7796.
38. Paz-Elizur T., Takeshita M., Goodman M., O'Donnell M., Livneh Z. // *J. Biol. Chem*. 1996. V. 271. P. 24662–24669.

39. Paz-Elizur T., Takeshita M., Livneh Z. // *Biochemistry*. 1997. V. 36. P. 1766–1773.
40. Yu S.-L., Lee S.-K., Johnson R.E., Prakash L., Prakash S. // *Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 23. P. 382–388.
41. Matsumoto Y., Kim K. // *Science*. 1995. V. 269. P. 699–702.
42. Bebenek K., Tissier A., Frank E.G., McDonald J.P., Prasad R., Wilson S.H., Woodgate R., Kunkel T.A. // *Science*. 2001. V. 291. P. 2156–2159.
43. Longley M.J., Prasad R., Srivastava D.K., Wilson S.H., Copeland W.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 12244–12248.
44. Prasad R., Bebenek K., Hou E., Shock D.D., Beard W.A., Woodgate R., Kunkel T.A., Wilson S.H. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 29649–29654.
45. Prasad R., Longley M.J., Sharief F.S., Hou E.W., Copeland W.C., Wilson S.H. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. P. 1868–1877.
46. Haracska L., Prakash L., Prakash S. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. P. 2777–2785.
47. Mazumder A., Neamati N., Pilon A.A., Sunder S., Pommer Y. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 27330–27338.
48. Bogenhagen D.F., Pinz K.G. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 7888–7893.
49. Yacoub A., Augeri L., Kelley M.R., Doetsch P.W., Deutsch W.A. // *EMBO J.* 1996. V. 15. P. 2306–2312.
50. Hegde V., Wang M., Deutsch W.A. // *DNA Repair*. 2004. V. 3. P. 121–126.
51. Postel E.H., Abramczyk B.M., Levit M.N., Kyin S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 14194–14199.
52. Илина Е.С., Лаврик О.И., Ходырева С.Н. // *Biochem. Biophys. Acta*. 2008. V. 1784. P. 1777–1785.
53. Ильина Е.С., Лаврик О.И., Ходырева С.Н. // *Докл. АН*. 2009. Т. 424. С. 31–34.
54. Ходырева С.Н., Ильина Е.С., Суханова М.В., Кутузов М.М., Лаврик О.И. // *Докл. АН*. 2010. Т. 431. С. 132–135.
55. Rieger R.A., Zaika V., Xie W., Johnson F., Grollman A.P., Iden C.R., Zharkov D.O. // *Mol. Cell. Proteomics*. 2006. V. 5. P. 858–867.
56. Cocuzza A.J. // *Tetrahedron Lett.* 1989. V. 30. P. 6287–6290.
57. Hügarat N., Cardoso G.M., Rusconi F., Francois J.C., Praseuth D. // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. e92.
58. Downs J.A., Jackson S.P. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 5. P. 367–378.
59. Gullo C., Au M., Feng G., Teoh G. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. V. 1765. P. 223–234.
60. Roberts S.A., Strande N., Burkhalter M.D., Strom C., Havener J.M., Hasty P., Ramsden D.A. // *Nature*. 2010. V. 464. P. 1214–1217.
61. Илина Е.С., Ходырева С.Н., Бержной А.Е., Ларин С.С., Лаврик О.И. // *Mutat. Res.* 2010. V. 685. P. 90–96.
62. Yang N., Galick H., Wallace S.S. // *DNA Repair*. 2004. V. 10. P. 1323–1334.
63. Wilson D.M. 3<sup>rd</sup>, Barsky D. // *Mutat. Res.* 2001. V. 485. P. 283–307.
64. Sung J.S., Demple B. // *FEBS J.* 2006. V. 273. P. 1620–1629.
65. Woodhouse B.C., Dianova I.I., Parsons J.L., Dianov G.L. // *DNA Repair*. 2008. V. 7. P. 932–940.
66. Jorgensen T.J. // *Cancer Bio. Ther.* 2009. V. 8. P. 665–670.
67. Shishkina I.G., Johnson F. // *Chem. Res. Toxicol.* 2000. V. 13. P. 907–912.
68. Pinz K.G., Bogenhagen D.F. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 12509–12514.
69. Truglio J.J., Croteau D.L., Van Houten B., Kisker C. // *Chem. Rev.* 2006. V. 106. P. 233–252.
70. Kim N., Jinks-Robertson S. // *Mol. Cell Biol.* 2010. V. 30. P. 3206–3215.
71. Horton J.K., Prasad R., Hou E., Wilson S.H. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 2211–2218.
72. Srivastava D.K., Vande Berg B.J., Prasad R., Molina J.T., Beard W.A., Tomkinson A.E., Wilson S.H. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 21203–21209.
73. Yuan F., Gu L., Guo S., Wang C., Li G.M. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 20935–20940.
74. Zhang Y., Yuan F., Presnell S.R., Tian K., Gao Y., Tomkinson A.E., Gu L., Li G.M. // *Cell*. 2005. V. 122. P. 693–705.
75. Lan L., Nakajima S., Komatsu K., Nussenzweig A., Shimamoto A., Oshima J., Yasui A. // *J. Cell Sci.* 2005. V. 118. P. 4153–4162.
76. Jiao Y., Wang H.C., Fan S.J. // *Acta Pharmacol. Sin.* 2007. V. 28. P. 1957–1967.
77. Summer H., Li O., Bao Q., Zhan L., Peter S., Sathiyathan P., Henderson D., Klonisch T., Goodman S.D., Druge P. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. P. 4371–4384.
78. Gabbiani C., Magherini F., Modesti A., Messori L. // *Anti-cancer Agents Med. Chem.* 2010. V. 10. P. 324–337.
79. Kane S.A., Lippard S.J. // *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 2180–2188.
80. Guggenheim E.R., Xu D., Zhang C.X., Chang P.V., Lippard S.J. // *Chembiochem*. 2009. V. 10. P. 141–157.
81. Zhu G., Lippard S.J. // *Biochemistry*. 2009. V. 48. P. 4916–4925.
82. Fink D., Nebel S., Aebi S., Zheng H., Cenni B., Nehmé A., Christen R.D., Howell S.B. // *Cancer Res.* 1996. V. 56. P. 4881–4886.
83. Zhu G., Chang P., Lippard S.J. // *Biochemistry*. 2010. V. 49. P. 6177–6183.
84. Martin L.P., Hamilton T.C., Schilder R.J. // *Clin. Cancer Res.* 2008. V. 14. P. 1291–1295.
85. Yuan F., Gu L., Guo S., Wang C., Li G.M. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 20935–20940.
86. Reddy M.C., Christensen J., Vasquez K.M. // *Biochemistry*. 2005. V. 44. P. 4188–4195.
87. Lange S.S., Reddy M.C., Vasquez K.M. // *DNA Repair*. 2009. V. 8. P. 865–872.
88. Lange S.S., Mitchell D.L., Vasquez K.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 10320–10325.
89. Sirov M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. V. 1799. P. 101–113.
90. Iliakis G. // *Radiother. Oncol.* 2009. V. 92. P. 310–315.



**Affinity Modification in Proteomic Study of DNA Repair Ensembles****S. N. Khodyreva and O. I. Lavrik<sup>#</sup>**<sup>#</sup>Phone: (383) 363-51-95; e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, pros. Lavrentieva, 8, 630090, Novosibirsk, Russia*

The review concerns the use of the affinity modification method as an integral part of the modern proteomic analysis to search for and identification of proteins belonging to protein ensembles of DNA repair. Affinity modification is based on the preliminary formation of specific non-covalent complex between the target biopolymer and a reagent (chemically reactive analog of biopolymer or low molecular weight ligand) followed by formation of covalent bond between the reagent and the site of the target, to which the reagent is bound, that ensures the method specificity. This method is most widely and effectively used in the study of structural and functional aspects of protein-nucleic acids interactions. Upon construction of DNA probes, in addition to chemically reactive groups and structural elements involved in specific recognition of DNA by proteins, additional groups that facilitate the subsequent affinity isolation of DNA-protein cross-links, can be introduced into the reagent. The review covers recent examples affinity DNA-reactive probe in combination with mass spectrometric and immunological methods to search for and identification in cell extracts, proteins interacting with apurinic/aprimidinic sites and the proteins recognizing the cross-links in DNA induced by cisplatin.

*Key words: DNA, affinity modification method, DNA with apurinic/aprimidinic sites, photoactivated DNA with cisplatin derivatives, protein-nucleic acids interactions, mass spectrometry.*