



АКУЛЕНКО НАТАЛЬЯ ВИКТОРОВНА

**ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО СЕМЕЙСТВА
САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ЭНДОНУКЛЕАЗ, КОДИРУЕМЫХ
T5-ПОДОБНЫМИ БАКТЕРИОФАГАМИ**

Специальность 03.00.03 – Молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ПУЩИНО – 2006

Работа выполнена в лаборатории структурно-функционального анализа генетических систем микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина РАН

Научный руководитель: кандидат биологических наук
В.Н. Ксензенко

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Я.И. Бурьянов

доктор биологических наук
Л.А. Железная

Ведущая организация: Институт физико-химической
биологии им. А.Н. Белозерского МГУ
им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится “ 5 ” октября 2006 г. в 15 час. 30 мин. на заседании диссертационного совета Д 002.038.01 при Институте биофизики клетки РАН по адресу: 142290, Московская обл., г. Пущино.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биофизики клетки РАН

Автореферат разослан “ 5 ” сентября 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

 Смолихина Т.И.

Актуальность проблемы. В составе интронов типов I и II часто присутствуют открытые рамки считывания (ОРС), кодирующие сайт-специфические эндонуклеазы, инициирующие перенос интрона с фланкирующими его участками ДНК в лишенный данного интрона аллель гена. Этот процесс получил название “хоуминг”, а инициирующие его нуклеазы – “хоуминг-эндонуклеазами”. На основании наличия в аминокислотных последовательностях указанных нуклеаз специфических мотивов их подразделяют на 4 семейства: “LAGLIDADG”, “GIY-YIG”, “His-Cys box” и “H-N-H”. Последнее из них отличается особым разнообразием. Помимо хоуминг-нуклеаз, кодируемых интронами, нуклеазный H-N-H-домен присутствует в последовательностях эндонуклеаз рестрикции, обратных транскриптаз, резолваз, белков, участвующих в упаковке ДНК, а также бактериоцинов (колицинов, пиоцинов, клебсиелинов). Каталитический домен H-N-H-нуклеаз, по-видимому, отличается структурной обособленностью, что и привело к возникновению в ходе эволюции различных комбинаций этого домена с другими функциональными доменами. Необычная его комбинация была недавно выявлена в структуре эндонуклеазы *I-HmuI* - единственной сайт-специфической H-N-H-нуклеазы с известной пространственной структурой. Этот фермент, как и, по-видимому, ряд других ферментов этого типа, отличается от большинства ранее изученных сайт-специфических нуклеаз удивительно вытянутой структурой с четко отделенными друг от друга доменами, причем узнающие домены с обеих сторон фланкируют каталитический домен. Очевидно, что изучение подобных эндонуклеаз позволяет значительно расширить наше представление о механизмах белок-нуклеиновых взаимодействий.

Представляет также интерес изучение генетической роли эндонуклеазы *I-HmuI* и ряда гомологичных ей H-N-H-нуклеаз (*I-HmuII*, *I-BasI* и *I-TwoI*), вносящих одноцепочечные разрывы в ДНК. Известно, что эндонуклеазы *I-HmuI* и *I-HmuII* инициируют процесс хоуминга. Механизм инициации этого процесса на молекулярном уровне еще предстоит раскрыть, поскольку до сих пор полагали, что перенос интронов инициируется внесением только

двухцепочечных разрывов в ДНК, репарация которых и лежит в основе хоуминга. Интересно, что эндонуклеазы I-*Hmi*I и I-*Hmi*II, помимо чужеродной ДНК, разрезают и ДНК “своего” организма, что позволяет предположить участие этих ферментов в других рекомбинационных событиях.

Цели работы. Основной целью данной работы являлось разностороннее изучение четырех гомологичных H-N-H-нуклеаз, кодируемых T5-подобными фагами.

Научная новизна. В результате данной работы были впервые охарактеризованы четыре гомологичные сайт-специфические H-N-H-эндонуклеазы, гены которых расположены вне интронов. Впервые проведено картирование сайта узнавания подобных эндонуклеаз на примере эндонуклеазы F-*Tu*III, что позволило предложить возможный механизм узнавания ДНК этими ферментами. В результате анализа аминокислотных последовательностей исследуемых эндонуклеаз, а также их предполагаемых сайтов узнавания, было выдвинуто предположение о причинах разной субстратной специфичности этих ферментов. Кроме того, эти результаты также послужили основанием для выдвижения гипотезы о возможном эволюционном происхождении подобных эндонуклеаз.

Практическая значимость работы. Полученные в данной работе результаты имеют в основном фундаментальное значение, однако некоторые из них могут найти и практическое применение. Изученные в данном исследовании ферменты могут быть использованы для создания нуклеаз с заданной специфичностью. Эндонуклеазы, вносящие одноцепочечные разрывы в ДНК, также могут быть использованы в ходе проведения олигонуклеотид-направленного мутагенеза на этапе удаления нити “дикого” типа. Кроме того, для эффективного клонирования ПЦР-фрагментов, получаемых с помощью ДНК-полимераз, у которых отсутствует корректирующая активность, могут быть сконструированы специализированные вектора, содержащие инвертированные сайты эндонуклеазы F-*Tu*IV.

Публикации и апробация работы. Материалы диссертации изложены в 6 публикациях. Результаты работы представлены на конференциях “Биология –

наука XXI века" (г. Пушкино, 2001 г.); "Phage Around the World" (г. Олимпия, США, 2001 г.); "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (г. Москва, 2002 г.); на ежегодных научных конференциях Института белка РАН (г. Пушкино, 2001 г. и 2004 г.) и Института микробиологии и физиологии микроорганизмов (г. Пушкино, 2001 г.).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, изложения результатов и их обсуждение, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на _____ страницах машинописного текста, содержит _____ рисунков. Список литературы включает _____ источника.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. В области генов тРНК бактериофагов T5 и BF23 *Escherichia coli*, а также фага 5 *Salmonella enterica* sv. Heidelberg обнаружены OPC, кодирующие предполагаемые Н-Н-Н-эндонуклеазы.

Ранее в лаборатории генной инженерии Института белка РАН были определены нуклеотидные последовательности областей генов тРНК трех близкородственных бактериофагов: фагов T5 и BF23 *E. coli*, а также фага 5 (φ5) *S. enterica* sv. Heidelberg (номера в базах данных EMBL/GenBank/DDBJ соответственно AJ85756, AJ604530 и AJ604531). Аминокислотные последовательности трех OPC из указанного участка генома фага T5 оказались гомологичными известным хоуминг-эндонуклеазам из семейства Н-Н-Н (I-*HmuI*, I-*HmuII*, I-*BasI* и I-*TwoI*). Две OPC (обозначены как гены *hegC* и *hegD*) отсутствуют в соответствующих участках геномов фагов BF23 и φ5, тогда как третья OPC (*hegA*), помимо фага T5, присутствует также у фага BF23. В то же время, у фага φ5 была обнаружена еще одна OPC (*hegB*), также кодирующая предполагаемую Н-Н-Н-эндонуклеазу. Аминокислотные последовательности всех четырех OPC являются гомологичными, причем гомология между *HegB*, *HegC* и *HegD* выявляется по всей длине последовательности, тогда как в случае *HegA* – только в центральной части и в С-концевом участке (рис. 1а). Анализ

(a)

HeqA (F-TfIIIV)	1	MKIDILDRKEEIAQNIAGGSKSAEIARMSSCSNTLPAYLGLKILVPIPTNROYDNNKYKS
HeqC (F-TfIII)	1	MGLVPPKDAEGVNEADG.....FTVIVSRVIV
HeqD (F-TfIIII)	1	MKLENKPPPEYVGLSPYSYKGLKTHHLG
HeqB (F-TfIIIII)	1	MEGKPPPEYVYVSEKREIYVLSIVYKPTIN
HeqA (F-TfIIIV)	61	ATEFLYNGSPISPYLKNKI.....NEGLKPHKCESGLESWLDKPIPE.....SHYVNEW
HeqC (F-TfIII)	35	D.....PAVKLQING.....QTSVLV.....LISHFGDYV.....LFDPP.....DRSLK
HeqD (F-TfIIII)	38	SA.....PFVTEYEQG.....NWSIV.....LHARFKDP.....SLES.....KESFL
HeqB (F-TfIIIII)	36	GK.....YHFAVREDTNYKWLQ.....VIRRYGNN.....SLDSM.....NKKILFSLP

$$\text{H}-\text{N}-\text{H}$$

HegA (F-TfIIIV) 121 KALLCPNGLALTPHA...KNRYRTERTVNTAIYHCDSSRATHKSTTNGI...TIN
 HegC (F-TfII) 88 LQVLSIQMORIKNDKNWSSDR....VPLGLSMLQRSVTNWKSTPTGRLK...
 HegD (F-TfIIII) 91 NVVMTYQDRIQRTVREHTGK.....NKPYNKKNSSKTKFDK...SLS
 HegB (F-TfIIIII) 90 EVVATEKQNDYDRLERKTKG.....TRIVNKRHGREYINISVQK...TKS

$$\text{H}-\text{N}-\text{H}$$

HegA (F-TfIIIV) 178 RDV...SK...IR...G...T...K...D...S...NR....
HegC (F-TfII) 142 ELSLDLFEKLLMGVKA...EVVEST...R...TK...LS...VLTEQRKSK.
HegD (F-TfIIII) 140 D...A...I...N...V...K...G...E...N...P...K...D...S...K...V...S...Q...V...G...
HegB (F-TfIIIII) 142 E...A...I...N...V...K...G...E...N...P...K...D...S...K...V...S...Q...V...G...

(6)

I-HmuII	13	Q	SDND	D	FSLKSNRVLTKMKNKK	N	YIYIHLTKDG	K	KKAFTT	I	LVAL
I-HmuI	13	Q	SNTE	E	YSYSGKGLKHQIPKD	N	HRIGLEFGK	K	GKTFQV	L	LVAL
HeGc (F-TfII)	12	L	NEAD	D	FSTSTKNVLSRYIV	D	PAVKLOING	K	QTSVLI	I	IKD
HeGd (F-TfII)	12	L	SPY	E	YSTSKNRLTLHLGL	S	PFVTFVEYQ	K	KNVSIVL	L	HLAR
HeGb (F-TfII)	13	L	SEKE	E	YSTSKNLYKPLTINGK	N	YFVAVREDNK	K	MLQLV	I	VIRR

NUMOD4A

NUMOD4B

NUMOD4C

(6)

HegA (F-TfIIIV)	151	T A I H C E I S S R A T H K S T P K G
HegC (F-TfII)	113	P P L G S L M L Q R S V T T N K P K P
HegD (F-TfIIII)	116	K Q P Y N K Q I N S S S K T F D K P K S
HegB (F-TfIIIII)	115	R I V N K N R I H S G A Y I N S P V K K
I-TevI	150	E K - G V R I O T S A Y T K S R N R S

(r)

HegA (F-TfIIv)	5	ILIKKEIAQHIH	SKAK	RM	SCSS	LEAYLKGKIGVIVPT	QYDNKIKSATEYL
GerE	12	TKKIFVFLVLL	CTTK	SE	FKRK	RKISN	GLGVKG
Trar	174	DPKATY	IVME	EV	GVGVKNS	RVKNS	RFDVRSKAHLTALAIRK
NarL	156	TPKRD	KILK	PLPKM	RR	DIAT	KVIVHML
RcsB	151	SPKSV	FLV	FLVT	KKR	NI	LSQKSK
SdiA	180	FSK	KV	TE	SA	MI	SK
CsaR	181	SAK	Q	SSG	LI	SV	FLV

Рис. 1. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей HegA, HegB, HegC и HegD (а), этих белков с эндонуклеазами I-HmuI и I-HmuII (б), с I-TevI (в), а также HegA с транскрипционными регуляторами семейств LuxR и FixJ/UhpA (г). В а и г выделены аминокислотные остатки, совпадающие более чем в 50% случаях; в б – остатки, консервативные для домена NUMOD4; в в – консервативные остатки цистеинов в структуре “цинкового пальца”.

аминокислотных последовательностей указанных белков с целью поиска известных белковых мотивов или доменов выявил наличие в них H-N-H-мотива (IPR003615 в базе данных InterPro), аминокислотные остатки которого принимают участие в формировании каталитического центра H-N-H-эндонуклеаз (рис. 1а). Помимо этого, в N-концевых участках HegB, HegC и HegD обнаружен составной ДНК-связывающий домен NUMOD4 (IPR010902), найденный ранее в составе эндонуклеаз I-HmuI и I-HmuII (рис. 1б). N-концевой участок HegA гомологичен узнающему НТН-домену транскрипционных регуляторов, относящихся к семействам LuxR и FixJ/UhpA (IPR000792 и IPR009059; рис. 1з).

2. Гены *hegA*, *hegB*, *hegC* и *hegD* кодируют сайт-специфические эндонуклеазы.

Для доказательства функциональной активности предполагаемых эндонуклеаз были синтезированы транскрипты, содержащие соответствующие ОРС, и транслированы в бесклеточной системе синтеза белка из зародышей пшеницы (реакция трансляции была проведена Л.А. Шалойко, ФИБХ РАН). В результате были получены в основном полноразмерные продукты, молекулярная масса которых соответствовала расчетному значению: HegA (25,8 кДа), HegB (22,1 кДа), HegC (22,2 кДа) и HegD (22,2 кДа) (рис. 2).

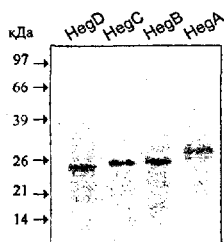


Рис. 2. Анализ продуктов экспрессии генов *hegA*, *hegB*, *hegC* и *hegD* в бесклеточной системе трансляции. Продукты трансляции анализировали 15% SDS гель-электрофорезом с последующей радиоавтографией гелей.

Тестирование активности предполагаемых эндонуклеаз проводили с использованием ПЦР-фрагментов, синтезированных с ДНК близкородственных фагов, у которых исследуемая ОРС отсутствует. Субстраты включали последовательности ДНК, фланкирующие место расположения

соответствующей ОРС у фага Т5 или фага $\phi 5$. Структуры субстратов, использованных для тестирования HegA и HegB, представлены на рисунке 3. ^{32}P -меченые по обоим цепям субстраты инкубировали с аликвотами реакционных смесей, полученных в результате трансляции *in vitro* соответствующих мРНК. Анализ продуктов гель-электрофорезом в неденатурирующих условиях показал, что только в случае HegA наблюдается гидролиз ДНК-субстрата (рис 3а). Продукты гидролиза ДНК-субстратов белками HegB, HegC и HegD были выявлены электрофорезом в денатурирующих условиях (рис. 3б, показано на примере белка HegB). Таким образом, на основании результатов, полученных в этих экспериментах, был сделан вывод о том, что продукты генов *hegA*, *hegB*, *hegC* и *hegD* действительно являются сайт-специфическими эндонуклеазами, которые были обозначены соответственно как F-T ϕ IV, F-T ϕ III, F-T ϕ I и F-T ϕ II (T five - like bacteriophages) согласно принятой номенклатуре (Belfort and Roberts, 1997). Кроме того, из этих результатов следует, что эндонуклеаза F-T ϕ IV вносит двуцепочечный разрыв в ДНК, тогда как эндонуклеазы F-T ϕ I, F-T ϕ II и F-T ϕ III –

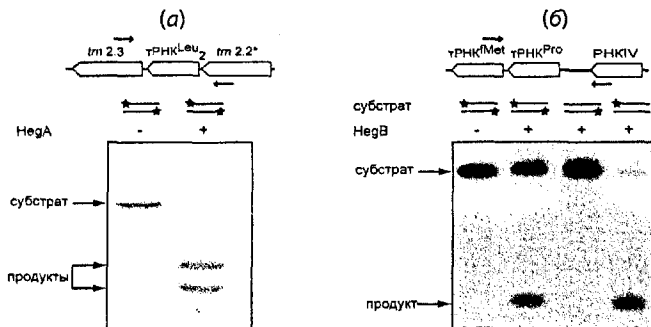


Рис 3. Характеристика эндонуклеазной активности продуктов генов *hegA* (а) и *hegB* (б). ^{32}P -меченые по одной или по обоим цепям (указано звездочкой) субстраты инкубировали с HegA (а) или HegB (б), синтезированными в бесклеточной системе трансляции. Продукты гидролиза анализировали гель-электрофорезом в 6% ПААГ (а) или 6% ПААГ, содержащем 8 М мочевины (б), с последующей радиоавтографией. Схема синтеза субстратов с ДНК фага $\phi 5$ (а) или фага BF23 (б) с использованием праймеров (обозначены стрелками) приведена над каждым из радиоавтографов.

одноцепочечные разрывы. Использование в качестве субстратов ^{32}P -меченых по одной из цепей фрагментов ДНК позволило установить, в какую из цепей соответствующие эндонуклеазы вносят разрывы. Так, например, было показано, что эндонуклеаза F-TuIII расщепляет верхнюю цепь ДНК (рис. 3б). С целью точной локализации мест разрывов полученные в этих экспериментах продукты гидролиза разделяли в денатурирующем полиакриламидном геле параллельно с продуктами секвенирующих реакций соответствующих ДНК-субстратов (рис. 4; показано на примере эндонуклеаз F-TuIV и F-TuIII). В результате было показано, что эндонуклеаза F-TuIV вносит двуцепочечный разрыв в ген $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_2$ фага $\phi 5$ (рис. 5а). При гидролизе образуются 3'-выступающие концы из 1 н.о., что не характерно для хоуминг-нуклеаз, которые, как правило, образуют выступающие концы из 2-4 н.о. Картирование положения разрывов, вносимых в ДНК эндонуклеазами F-TuI, F-TuII и F-TuIII, показало, что эндонуклеаза F-TuI разрезает кодирующую цепь гена $\text{tRNA}^{\text{Ser}}_2$ фага BF23 (рис. 5а), тогда как эндонуклеазы F-TuII и F-TuIII разрезают

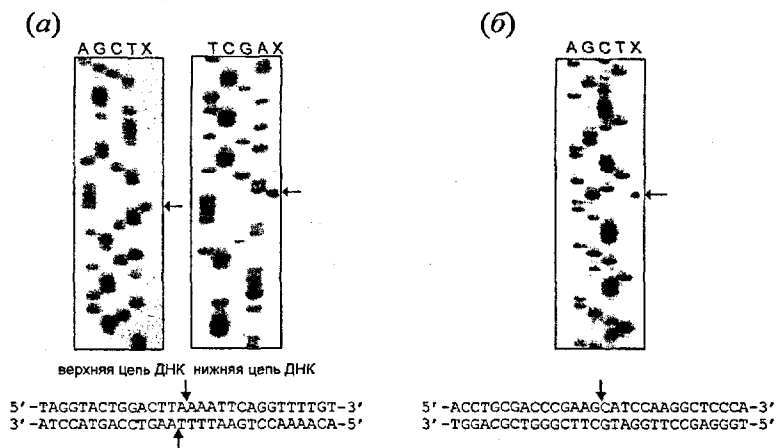


Рис. 4. Локализация разрывов, вносимых в ДНК эндонуклеазами F-TuIV (а) и F-TuIII (б). Продукты гидролиза (X) и секвенирующих реакций (A, G, C, T) ДНК-субстратов анализировали в 6% ПААГ, содержащем 8 М мочевины, с последующей радиоавтографией гелей. Последовательность сайта узнавания приведена под каждым из радиоавтографов. Места внесения разрывов указаны стрелками.

матричные цепи соответственно генов tRNK^{Cln} и tRNK^{Pro} фага BF23 (рис. 5б и в). Позднее были локализованы дополнительные разрывы, вносимые в ДНК эндонуклеазами F-*TuII*, F-*TuIII* и F-*TuIII* (рис. 5). Обращает на себя внимание тот факт, что все эти разрывы локализованы в пределах генов tRNK . Кроме того, эндонуклеазы F-*TuII* и F-*TuIII* разрезают как ДНК близкородственного, так и “своего” фага, что было показано также в случае эндонуклеаз I-*HmuI* и I-*HmuII* (Goodrich-Blair and Shub, 1996).

3. Эндонуклеазы F-*TuII* и F-*TuIII* – первые неоизошизомеры среди хоуминг-нуклеаз.

Высокая гомология аминокислотных последовательностей эндонуклеаз F-*TuII*, F-*TuIII* и F-*TuIII* позволяет выдвинуть предположение о том, что эти нуклеазы способны узнавать сайты друг друга. Действительно, нами было показано, что эндонуклеаза F-*TuIII* способна узнавать оба сайта эндонуклеазы F-*TuIII* (рис. 5в). Однако характер расщепления этих сайтов различается. В отличие от эндонуклеазы F-*TuIII*, эндонуклеаза F-*TuII* вносит разрывы в сайт, локализованный в гене tRNK^{Pro} фага BF23, в двух соседних положениях, при этом одно из этих положений совпадает в случае обеих нуклеаз, а другое смещено на 1 н.о. (сравните рис. 5б, сайт 6 и рис. 5в, сайт 1). При гидролизе эндонуклеазой F-*TuIII* сайта, расположенном в гене tRNK^{Pro} фага T5, преимущественная точка разрыва также смещена на 1 н.о. (сравните рис. 5б, сайт 7 и рис. 5в, сайт 2). Таким образом, эндонуклеазы F-*TuII* и F-*TuIII*, по-видимому, ведут себя, как неоизошизомеры эндонуклеаз рестрикции. По нашим сведениям, наличие неоизошизомеров среди хоуминг-нуклеаз до настоящего времени показано не было.

В то же время, эндонуклеаза F-*TuIII* не способна узнавать по крайней мере большинство сайтов, обнаруженных ранее для эндонуклеазы F-*TuIII* (рис. 5б; проанализированы сайты 1, 3–5). Ранее также было показано, что эндонуклеазы F-*TuII* и F-*TuIII* не узнают сайты друг друга (данные получены Н.М. Шестаковой, ИБ РАН).

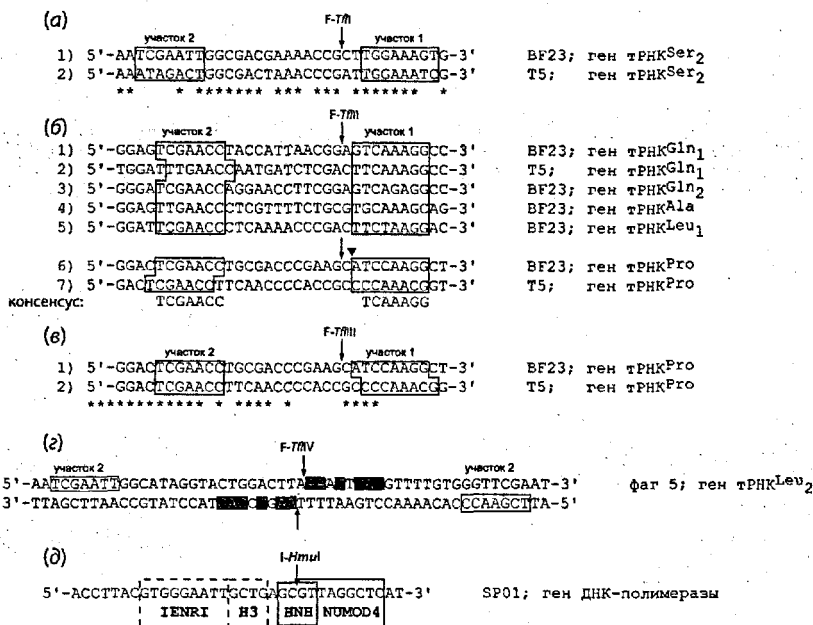


Рис. 5. Нуклеотидные последовательности, фланкирующие место внесения разрыва эндонуклеазами F-TII (а), F-TIII (б), F-TIII (в), F-TIV (г) и I-HmiI (д). Приведена цепь ДНК, в которую соответствующая нуклеаза вносит разрыв (одна цепь — в случае эндонуклеаз F-TII, F-TIII, F-TIII, F-TIII, I-HmiI и обе цепи — для эндонуклеазы F-TIV). Последовательности выравнены относительно мест внесения разрывов (обозначены стрелками). Дополнительные разрывы в сайтах эндонуклеазы F-TIII указаны треугольником. Нуклеотидные остатки, совпадающие во всех последовательностях, узнаваемых эндонуклеазами F-TII и F-TIII, указаны звездочками. Консенсусные последовательности в сайтах узнавания эндонуклеаз F-TII, F-TIII, F-TIII и F-TIV обведены сплошной линией. Симметричные нуклеотиды в сайте F-TIV расположены на черном фоне. Нуклеотидные последовательности, контактирующие с мотивами NUMOD4 и H-N-H в сайте узнавания эндонуклеазы I-HmiI, обведены сплошной линией, а с мотивом IENRI и спиралью H3 — пунктирной линией.

4. Разработана схема выделения и очистки эндонуклеаз F-*TfII* и F-*TfIII*.

В дальнейших экспериментах более подробно были охарактеризованы эндонуклеазы F-*TfII* и F-*TfIII*. С этой целью А.В. Калиманом (ИБ РАН) гены *hegC* и *hegD*, кодирующие эти эндонуклеазы, были клонированы соответственно в экспрессионные вектора трансляции pBADex1 и pBADex2. Условия экспрессии клонированных генов были оптимизированы нами таким образом, чтобы понизить уровень базового синтеза изучаемых нуклеаз в отсутствии индуктора (арабинозы) и увеличить выход синтезируемых продуктов при его добавлении (рис. 6а; показано на примере гена *hegC*).

Схема очистки была первоначально разработана для эндонуклеазы F-*TfII*, а затем использована и в случае выделения эндонуклеазы F-*TfIII*. Она включала следующие этапы: удаление нуклеиновых кислот, дробное высаливание белков сульфатом аммония, хроматографию на гепарин-сефарозе, очистку на

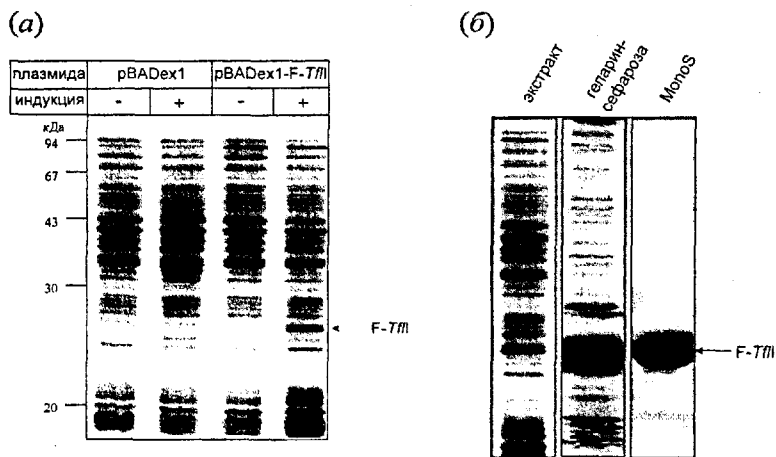


Рис. 6. Экспрессия и очистка эндонуклеазы F-*TfII*. (а) Экспрессия гена *hegC*, кодирующего эндонуклеазу F-*TfII*. Белки, синтезированные в клетках *E. coli*, содержащих плазмиду pBADex1 или pBADex1-F-*TfII*, до (-) или после (+) индукции анализировали 15% SDS-гель-электрофорезом. (б) Очистка эндонуклеазы F-*TfII*. Стадии очистки указаны над электрофореграммой.

последовательно соединенных колонках с ионообменными носителями Моно Q и Моно S. В результате были получены препараты ферментов со степенью очистки более 90% (рис. 6б; показано на примере эндонуклеазы F-*Tu*II).

5. Эндонуклеазы F-*Tu*II и F-*Tu*III наиболее активны при экстремальных значениях pH и температуры.

При определении оптимальных условий гидролиза ДНК эндонуклеазами F-*Tu*II и F-*Tu*III было исследовано влияние pH, температуры и ионов одновалентных металлов на активность этих ферментов (рис. 7). Оба фермента наиболее активны при необычайно высоких для ферментов, функционирующих в клетках мезофильных бактерий (*E. coli*), значениях pH и температуры. Максимальная эффективность гидролиза ДНК эндонуклеазой F-*Tu*II наблюдается в интервале значений pH 9 – 11 и температуры 50°C – 60°C. Эндонуклеаза F-*Tu*III, по-видимому, менее устойчива к воздействию этих факторов, так как ее активность резко уменьшается при увеличении pH выше 10, а температурный оптимум этой нуклеазы смещен в область значений 45°C – 55°C. В отличие от большинства хоуминг-нуклеаз, активность F-*Tu*II и F-*Tu*III существенно не изменяется при увеличении концентрации ионов Na⁺ до 300 мМ. В то же время активность эндонуклеаз F-*Tu*III и F-*Tu*II значительно уменьшается при увеличении концентрации ионов K⁺ соответственно выше 100 мМ и 200 мМ.

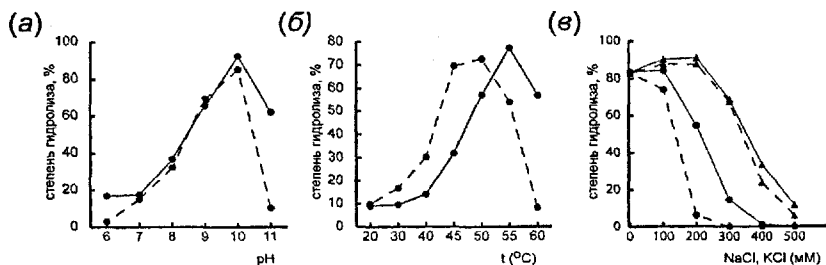


Рис. 7. Зависимость активности эндонуклеаз F-*Tu*II (сплошная линия) и F-*Tu*III (пунктир) от pH (а), температуры (б) и ионов одновалентных металлов Na⁺ (▲) и K⁺ (●) (с).

6. Активность эндонуклеаз F-T μ II и F-T μ III стимулируется широким спектром ионов двухвалентных металлов.

Изучение влияния ионов двухвалентных металлов (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} и Ca^{2+}) на активность эндонуклеазы F-T μ II показало, что все они, за исключением Ca^{2+} , стимулируют активность этой нуклеазы (рис. 8). В зависимости от минимальной концентрации, при которой наблюдается стимуляция гидролиза, эти металлы могут быть расположены в следующий ряд $Mn^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+}$, $Co^{2+} > Mg^{2+}$. Следует также отметить, что в присутствии всех этих металлов, за исключением Zn^{2+} и Cu^{2+} , уровень гидролиза остается практически неизменным в широком диапазоне концентраций (1 мкМ - 10 мМ). Эндонуклеаза F-T μ II, в отличие от F-T μ III, расщепляет ДНК-субстрат в присутствии ионов Ca^{2+} , но ее активность не стимулируют ионы Cu^{2+} (данные не представлены). Следует отметить, что стимуляция гидролиза таким широким спектром металлов показана только для некоторых представителей хоуминг-нуклеаз, например, таких как I-P ρ ol и I-D μ ol.

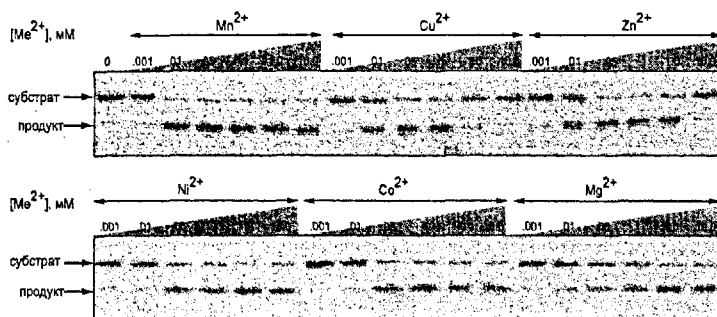


Рис. 8. Влияние ионов двухвалентных металлов на активность эндонуклеазы F-T μ II.

7. Ион Zn^{2+} , по-видимому, связывается с “цинковым пальцем” изучаемых эндонуклеаз и в результате стабилизирует их структуру.

При разработке схемы очистки эндонуклеазы F-T μ II было замечено, что присутствие в буферных растворах хелатирующих веществ, таких как ЭДТА,

приводит к быстрой потере активности фермента. На основании этого наблюдения нами было сделано предположение о том, что в состав эндонуклеаз F-T μ II и F-T μ III входит ион(ы) переходных металлов. В связи с этим из буферных растворов исключили хелатирующие вещества и очистку ферментов проводили в присутствии ионов Zn $^{2+}$. При изучении влияния ионов двухвалентных металлов на ферментативную активность эндонуклеаз были использованы препараты ферментов, предварительно тщательно диализованные против буферных растворов, не содержащих ионов двухвалентных металлов. Как видно из рисунка 8, эндонуклеаза F-T μ III не обладает ферментативной активностью в отсутствии последних. Аналогичные свойства характерны также для эндонуклеазы F-T μ II (данные не представлены). Между тем, анализ полученных препаратов обеих эндонуклеаз с помощью атомно-адсорбционной спектроскопии выявил наличие в их составе одного иона Zn $^{2+}$ из расчета на одну молекулу белка (анализ был проведен Е.В. Кашпаровой, ИБФМ РАН). На основании этих данных, а также того факта, что ионы Zn $^{2+}$ стимулирует активность указанных нуклеаз, можно выдвинуть предположение о том, что они, помимо активного центра, связываются также с каким-то другим участком в молекулах изучаемых белков. Анализ аминокислотных последовательностей обнаруженных в данной работе эндонуклеаз выявил в них наличие участков, содержащих четыре остатка цистеина, расположение которых друг относительно друга сходно с таковым в структуре эндонуклеазы I-TevI (рис. 16). Эти остатки цистеина эндонуклеазы I-TevI связывают ион Zn $^{2+}$ и участвуют в формировании “цинкового пальца”, который определяет расстояние между последовательностями, узнаваемыми каталитическим и узнающим доменами (Van Roey et al., 2001). Можно предположить, что аналогичную роль указанные домены выполняют и в случае изучаемых эндонуклеаз. “Цинковый палец” в этих эндонуклеазах может также участвовать в стабилизации их структуры. Такое предположение может быть сделано на основе наших наблюдений о функциональной и протеолитической нестабильности эндонуклеазы F-T μ II в присутствии хелатирующих агентов.

8. Эндонуклеаза F-TuIII специфично связывается с двумя участками ДНК, расположенными на противоположных концах сайта узнавания.

При характеристике сайта узнавания эндонуклеазы F-TuIII было использовано два подхода. В первом случае комплекс эндонуклеазы с фрагментом ДНК обрабатывали ДНКазой I или модифицирующими агентами (гидроксильными радикалами или диметилсульфатом). Во втором случае комплекс формировали с предварительно модифицированным ДНК-субстратом (метилованным, этилированным или субстратом с удаленным нуклеозидом). Затем образовавшийся комплекс F-TuIII-субстрат и несвязавшийся субстрат разделяли электрофорезом в неденатурирующих условиях с последующим анализом каждого из них. Как в первом, так и во втором случаях продукты реакций непосредственно или после гидролиза ДНК в местах модификации (метилованная или этилированная ДНК) разделяли электрофорезом в денатурирующих условиях и анализировали. Эксперименты по “защите” ДНК эндонуклеазой F-TuIII от действия ДНКазы I и модифицирующих агентов позволили установить границы сайта узнавания изучаемого фермента, а также выявили его контакты с отдельными основаниями и сахаро-фосфатным остовом ДНК. Напротив, существенные для узнавания основания были выявлены в экспериментах, в которых комплексообразование проводили с модифицированными субстратами. В качестве примера приведены результаты анализа комплексообразования с метилированными ДНК-субстратами (рис. 9). Результаты всех экспериментов обобщены на рисунке 10.

Как было показано при картировании границ сайта узнавания эндонуклеазы F-TuIII с помощью ДНКазы I, изучаемая нуклеаза контактирует с протяженным участком ДНК-субстрата длиной 36 н.п. (положения -24 - +12). При картировании с использованием низкомолекулярных гидроксильных радикалов был выявлен менее протяженный участок длиной 29 н.п. (положения -21 - +8). В пределах этой последовательности были локализованы два участка контактов фермента с основаниями ДНК-субстрата, расположенных несимметрично относительно места гидролиза: участок 1 (положения +2 - +9)

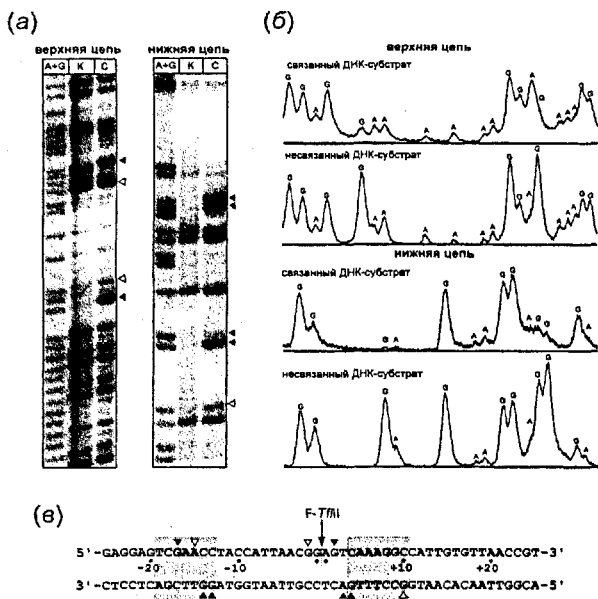


Рис. 9. Локализация пуриновых оснований ДНК-субстрата, метилирование которых препятствует образованию комплекса F-ТuII-ДНК. (а) ^{32}P -меченый по одной из цепей ДНК-субстрат обрабатывали диметилсульфатом и инкубировали с эндонуклеазой F-ТuII. Связанный (К) и несвязанный (С) с нуклеазой субстрат разделяли электрофорезом в 6% ПААГ и гидролизовали щелочью. Полученные фрагменты ДНК и продукты секвенирования ДНК-субстрата (А+G) разделяли в 8% ПААГ, содержащем 8 М мочевины, с последующей радиоавтографией гелей. (б) Денситометрическое сканирование радиоавтографов. (в) Остатки пуринов, метилирование которых существенно или незначительно препятствует образованию комплекса F-ТuII-ДНК, обозначены соответственно черными или белыми треугольниками; нумерация нуклеотидов дана относительно сайта гидролиза ДНК эндонуклеазой F-ТuII.

прилегает к месту гидролиза, тогда как участок 2 (-13 - -19) - удален от него. В этих участках изучаемая эндонуклеаза связывается с ДНК в основном со стороны большого желобка, и только вблизи точки гидролиза она контактирует с малым желобком ДНК-субстрата, что было показано в экспериментах по "защите" ДНК эндонуклеазой F-ТuII от метилирования, а также при образовании комплекса изучаемой нуклеазы с метилированными ДНК-субстратами. Следует отметить, что результаты этих двух экспериментов

практически совпадают, что указывает на важность всех выявленных контактов для процесса узнавания. В двух локализованных участках эндонуклеазы F-*Tu*III связывается как с основаниями, так и с остовом ДНК-субстрата, тогда как в центральной части сайта узнавания эндонуклеазы F-*Tu*III контактирует только с сахаро-фосфатным остовом ДНК. Следует отметить, что при связывании эндонуклеазы F-*Tu*III с ДНК-субстратом контакты с остовом ДНК не играют такой существенной роли, как контакты с основаниями, так как этилирование ни одного из фосфатов ДНК-субстрата существенно не препятствует комплексообразованию. При образовании комплекса F-*Tu*III-субстрат происходит, по-видимому, изгиб ДНК-субстрата в центральной части узнаваемой эндонуклеазой последовательности. Это предположение основано на том, что в этой области наблюдается усиление гидролиза ДНКазой I по сравнению с прилегающими участками. Кроме того, образование комплекса приводит к усилению метилирования некоторых пуринов, расположенных в центральной части сайта узнавания.

Как было сказано выше, эндонуклеазы F-*Tu*I, F-*Tu*II и F-*Tu*III гомологичны по всей длине аминокислотной последовательности (рис. 1а). Анализ всех сайтов узнавания эндонуклеазы F-*Tu*III с учетом данных о локализации двух участков, нуклеотидные остатки которых существенны для узнавания, позволил выделить следующие консенсусные последовательности: 5'-TCAAAGG-3' (участок 1) и 5'-TCGAACC-3' (участок 2) (рис. 5б). Обе эти последовательности были обнаружены в структуре сайтов эндонуклеаз F-*Tu*I и F-*Tu*III (рис. 5а и в). Следует отметить, что эндонуклеазы F-*Tu*I, F-*Tu*II и F-*Tu*III гомологичны с I-*Hmu*I только в области расположения NUMOD4- и H-N-H-мотивов. Из рисунка 5д видно, что участок ДНК, с которым контактирует ДНК-связывающий домен NUMOD4 эндонуклеазы I-*Hmu*I, имеет приблизительно тот же размер и такое же расположение относительно места разрыва, что и участок 1 сайта узнавания эндонуклеазы F-*Tu*III. Таким образом, можно предположить, что домен NUMOD4 эндонуклеаз F-*Tu*I, F-*Tu*II и F-*Tu*III контактирует именно с участком 1.

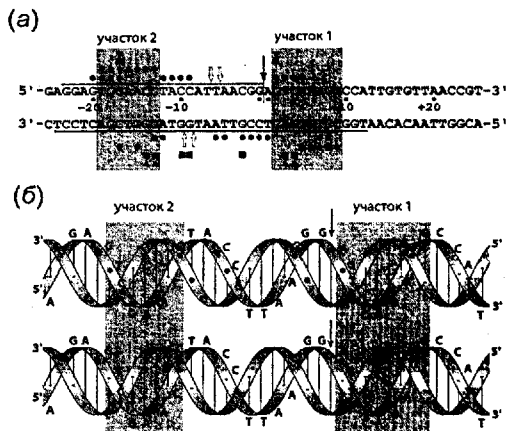


Рис. 10. Характеристика сайта узнавания эндонуклеазы F-TuIII. (а) Линейное представление результатов картирования. (б) Контакты эндонуклеазы F-TuIII с ДНК-субстратом, отмеченные на модели В-формы двойной спирали ДНК (10,5 н.п. на виток спирали). Нумерация нуклеотидных остатков дана относительно сайта гидролиза эндонуклеазы F-TuIII. Место разрыва указано стрелкой; черной линией выделен защищаемый от ДНКазы I участок ДНК; ◊ - слабо защищаемые от ДНКазы I основания; • - защищаемые от действия гидроксильных радикалов остатки дезоксирибозы; ♦ - нуклеозиды, удаление которых препятствует образованию комплекса F-TuIII-ДНК; ▼ - пурины, метилирование которых препятствует образованию комплекса F-TuIII-ДНК; ▣ - защищаемые от метилирования пурины; ▢ - пурины, метилирование которых незначительно усиливается в присутствии эндонуклеазы F-TuIII. Необходимые для образования комплекса F-TuIII-ДНК основания, выявленные в экспериментах с ДНК-субстратами с удаленным нуклеозидом и метилированными ДНК-субстратами, расположены на фоне серого прямоугольника.

Остается неясным вопрос, какой участок в структуре изучаемых эндонуклеаз связывается со второй консенсусной последовательностью. Выяснению этого вопроса могут способствовать следующие наблюдения. Аминокислотные последовательности эндонуклеазы F-TuIV и эндонуклеаз F-TuII, F-TuIII и F-TuIII гомологичны исключительно в области Н-Н-Н-мотива и С-конца (рис. 1а). В то же время, в структуре единственного сайта узнавания этой эндонуклеазы выделены два консенсуса, соответствующих участку 2 (рис. 5з). Таким образом, можно предположить, что в С-концевом участке всех

идентифицированных в данной работе нуклеаз присутствует какой-то неизвестный на сегодняшний день ДНК-связывающий домен, и именно он узнает участок 2 в сайтах этих нуклеаз.

Перечисленные выше факты и наблюдения позволяют сделать вывод, что эндонуклеазы F-*TuII*, F-*TuIII*, F-*TuIII* и F-*TuIV* имеют общую структурную организацию. У всех этих ферментов присутствует по крайней мере два узнающих домена, которые фланкируют каталитический H-N-H-домен. Интересно отметить, что несмотря на отмеченное сходство, первые три эндонуклеазы вносят одноцепочечные разрывы в ДНК, а четвертая – двуцепочечный. Это различие, видимо, связано с тем, что эндонуклеаза F-*TuIV*, в отличие от остальных, является димером. В пользу этого предположения говорит симметричная организация сайта узнавания этой эндонуклеазы (рис. 5₂), а также наличие в ее структуре только одного мотива (H-N-H-мотив), способного формировать каталитический центр.

9. Тонкие механизмы узнавания ДНК эндонуклеазами F-*TuII*, F-*TuIII* и F-*TuIII*, по-видимому, различаются.

Из рентгеноструктурных данных комплекса эндонуклеазы I-*HmuI* с ДНК известно, что ее ДНК-связывающий домен NUMOD4, в отличие от эндонуклеазы F-*TuII*, образует незначительное количество специфических контактов с сайтом узнавания, что говорит о разном узнающем потенциале домена NUMOD4 у этих нуклеаз (Shen et al., 2004). В то же время, эндонуклеаза I-*HmuI*, в отличие от эндонуклеазы F-*TuII*, образует специфические контакты в центральной части сайта узнавания, причем в формировании этих контактов принимает участие α -спираль H3. Интересно, что эта спираль не выявляется стандартными программами предсказания вторичных структур. Таким образом, можно предположить, что этот неструктурированный участок структурируется только при связывании с ДНК. Учитывая то, что неструктурированные участки белков могут принимать участие в узнавании ДНК (Kalodimos et al., 2004), был проведен поиск этих участков в аминокислотных последовательностях эндонуклеаз I-*HmuI*, F-*TuII*, F-*TuIII*, F-*TuIII* и F-*TuIV* (анализ проведен О.В.

Галзитской и С.О. Гарбузинским, ИБ РАН). В последовательности эндонуклеазы I-HmiI в месте расположения H3-спирали (аминокислотные остатки 111-119) был выявлен неструктурированный участок, обогащенный заряженными аминокислотными остатками. Интересно, что приблизительно в той же области эндонуклеаз F-TfII (а.о. 97-109) и F-TfIII (а.о. 92-102), в отличие от эндонуклеазы F-TfIII и F-TfIV, также обнаружены неструктурированные участки. В то же время, можно отметить высокую гомологию центральных участков в сайтах узнавания эндонуклеаз F-TfII и F-TfIII, которая отсутствует в сайтах F-TfIII (рис. 5). Таким образом, можно предположить, что у эндонуклеаз F-TfII и F-TfIII, также как у эндонуклеазы I-HmiI, при связывании с ДНК-субстратом происходит формирование дополнительного узнающего участка, аминокислотные остатки которого способны образовывать специфичные контакты в центральной части сайта узнавания. Если это предположение справедливо, то, учитывая отсутствие гомологии между центральными участками сайтов узнавания эндонуклеаз F-TfII, F-TfIII и F-TfIII, становится понятной неспособность эндонуклеаз F-TfII и F-TfIII узнавать сайты эндонуклеазы F-TfIII.

Сравнивая участки 2 сайтов эндонуклеазы F-TfII, можно отметить их низкую гомологию по сравнению с соответствующими участками эндонуклеаз F-TfII, F-TfIII и F-TfIV. Это обстоятельство, по-видимому, указывает на низкий узнающий потенциал С-концевого домена эндонуклеазы F-TfII и высокий – у эндонуклеаз F-TfII, F-TfIII и F-TfIV. Разница в узнающих потенциалах этих доменов, возможно, объясняется отсутствием одного из неструктурированных участков в С-конце эндонуклеазы F-TfII по сравнению с эндонуклеазами F-TfII (а.о. 176-192), F-TfIII (а.о. 178-191) и F-TfIV (а.о. 214-227).

Таким образом, эндонуклеазы F-TfIII и F-TfIV, по-видимому, специфически связываются с ДНК-субстратом двумя узнающими доменами, тогда как эндонуклеазы I-HmiI, F-TfII и F-TfIII – тремя доменами. На основании сказанного выше можно предположить, что наличие двух доменов (N- и С-концевого) с высоким узнающим потенциалом достаточно для

правильного узнавания и ориентации каталитического центра этих ферментов. В то же время, в ходе эволюции, по-видимому, ослабление узнающего потенциала одного из них компенсировалось возникновением нового узнающего домена или усилением узнающего потенциала другого домена, или наоборот. В результате такого перераспределения плотности специфических контактов между ферментом и ДНК, по-видимому, и происходило возникновение новой субстратной специфичности подобных ферментов. Другой способ создания белков с новой специфичностью – обмен доменами между разными группами белков можно проследить на примере эндонуклеазы F-*TuIV*. Как уже было сказано выше, вместо домена NUMOD4, присутствующего в эндонуклеазах F-*TuI*, F-*TuII* и F-*TuIII*, на N-конце этого фермента расположен домен НТН, который обнаруживается также в структуре транскрипционных регуляторов семейства LuxR.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружены четыре новые сайт-специфические Н-Н-Н-эндонуклеазы (обозначены как F-*TuI*, F-*TuII*, F-*TuIII* и F-*TuIV*), кодируемые T5-подобными бактериофагами. Показано, что эндонуклеаза F-*TuIV* вносит двуцепочечный разрыв в ДНК, образуя 3'-выступающие концы из 1 н.о, тогда как гомологичные ей эндонуклеазы F-*TuI*, F-*TuII* и F-*TuIII* вносят одноцепочечные разрывы.
2. Показано, что эндонуклеазы F-*TuII* и F-*TuIII* являются неизоизомерами: они способны узнавать одни и те же сайты в ДНК, однако, отличаются по характеру их гидролиза.
3. Подобраны оптимальные условия экспрессии генов, кодирующих эндонуклеазы F-*TuI* и F-*TuII*, а также разработана схема их выделения, позволяющая получить препараты этих белков со степенью очистки более 90%. Показано, что в состав эндонуклеаз F-*TuI* и F-*TuII* входит один ион Zn^{2+} из расчета на одну молекулу белка.

4. Исследована зависимость активности эндонуклеаз F-*Tu*I и F-*Tu*II от ионной силы, pH и температуры. Показано, что максимальная активность этих нуклеаз проявляется при экстремальных значениях pH (pH 10) и температуры (50°C - 55°C).
5. Изучена зависимость активности эндонуклеаз F-*Tu*I и F-*Tu*II от широкого ряда ионов двухвалентных металлов (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} и Ca^{2+}). Показано, что все эти металлы, за исключением Cu^{2+} (в случае эндонуклеазы F-*Tu*I) и Ca^{2+} (в случае эндонуклеазы F-*Tu*II), стимулируют активность этих ферментов.
6. Картирован сайт узнавания эндонуклеазы F-*Tu*III. Показано, что фермент связывается с протяженным участком ДНК (29 н.п.). В пределах этой последовательности локализованы два участка контактов фермента с основаниями ДНК-субстрата длиной 8 н.п. (участок 1) и 7 н.п. (участок 2). Эти участки расположены несимметрично относительно места разрыва и удалены друг от друга на расстояние 13 н.п. В данных участках фермент связывается не только с основаниями, но и с остовом ДНК-субстрата, тогда как в центральной части сайта узнавания эндонуклеазы F-*Tu*III контактирует только с сахаро-фосфатным остовом ДНК. Показано, что эндонуклеаза F-*Tu*III взаимодействует с сайтом узнавания в основном со стороны большого желобка ДНК.
7. Выдвинута гипотеза о возможных путях возникновения различной субстратной специфичности гомологичных H-N-H-эндонуклеаз.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Акуленко Н.В., Ивашина Т.В., Шалойко Л.А., Шляпников М.Г., Ксензенко В.Н. (2004). Новые сайт-специфические эндонуклеазы F-*Tu*I, F-*Tu*II и F-*Tu*IV, кодируемые бактериофагом T5. Молекуляр. биол. Т. 38, с. 632-641.
2. Kulakova A.N., Kulakov L.A., Akulenko N.V., Ksenzenko V.N., Hamilton J.T., Quinn J.P. (2001). Structural and functional analysis of the phosphonoacetate

- hydrolase (*phnA*) gene region in *Pseudomonas fluorescens* 23F. J. Bacteriol. V. 183, p. 3268-3275.
3. Artukh R., Akulenko N., Ksenzenko V., Bourenkov G., Kachalova G., Bartunik H. (2002). Identification of zinc in phage T5 site-specific endonuclease F-TyII. HASYLAB Annual Report 2002, Part II, Preface MPG-ASMB. [http://www-hasyllab.desy.de/science/annual reports/ 2002 report/index2.html](http://www-hasyllab.desy.de/science/annual%20reports/2002%20report/index2.html).
 4. Акуленко Н.В., Шестакова Н.М., Калиман А.В., Ксензенко В.Н. (2001). Клонирование и экспрессия гена *shnB* бактериофага T5, кодирующего сайт-специфическую эндонуклеазу. Сборник тезисов 5-ой конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века", Пушкино, с. 353.
 5. Ksenzenko V.N., Akulenko N.V., Kaliman A.V., Shestakova N.M., Krutilina A.I., Ustanina S.V., Mayorov S.G., Kanapin A.A., Shlyapnikov M.G. (2001). Phage T5 encoded site-specific endonucleases: identification, gene cloning, biochemical properties. Abstracts of 2001 Evergreen International Phage Biology Conference "Phage Around the World", Olympia, WA, p. 37.
 6. Акуленко Н.В., Шестакова Н.М., Калиман А.В., Ксензенко В.Н. (2002). Сайт-специфические нуклеазы бактериофага T5: идентификация, клонирование, сравнительная биохимическая характеристика. Сборник тезисов 14-ой международной зимней молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, с. 45.

Принято к исполнению 05/09/2006
Исполнено 05/09/2006

Заказ № 583
Тираж: 100 экз.

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Варшавское ш., 36
(495) 975-78-56

www.autoreferat.ru

