

МАЛАЯ СУБЪЕДИНИЦА ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ R.BspD6I АКТИВНА ТОЛЬКО В ПРИСУТСТВИИ КАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНОЙ БОЛЬШОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ

А.К. Юнусова¹, Р.И. Артюх¹, Т.А. Перевязова¹, Л.А. Абросимова³,

Г.С. Качалова², Л.А. Железная¹

¹*Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Россия, 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, 3. +7(4967)739421, e-mail: a_junusova@rambler.ru*

²*Институт Биохимии имени А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва*

³*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, факультет биоинженерии и биоинформатики, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского. 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1.*

Резюме

Большая субъединица гетеродимерной эндонуклеазы рестрикции R.BspD6I в отсутствие малой субъединицы ведет себя как самостоятельный фермент, никующая эндонуклеаза, и вносит разрыв в верхнюю цепь ДНК узнаваемой последовательности. Малая субъединица проявляет активность только в присутствии большой субъединицы и вносит разрыв в нижнюю цепь ДНК. Для того чтобы выяснить, какие свойства большой субъединицы важны для проявления активности малой субъединицы, в работе были получены две мутантные формы большой субъединицы (D456A и E418A), утратившие активность. Результаты показали, что малая субъединица в присутствии мутантных форм не проявляет активности. Высказано предположение, что активная большая субъединица, взаимодействуя с ДНК, приобретает такую ориентацию, что малая субъединица становится способной к гидролизу ДНК.

Ключевые слова: гетеродимерная эндонуклеаза рестрикции, рестриктаза, никующая эндонуклеаза, никаза, мутагенез

SMALL SUBUNIT OF RESTRICTION ENDONUCLEASE BspD6I IS INACTIVE IN THE PRESENCE OF CATALYTIC-DEFICIENT LARGE SUBUNIT

A.K. Yunusova¹, R.I Artyukh¹, T.A Perevyazova¹, L.A. Abrosimova³,
G.S. Kachalova², L.A. Zheleznaya¹

¹*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy of Science,
Institutskaya str. 3, 142290, Puschino, Moscow region, Russia*

²*Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of
Sciences, Leninsky prospect, 33, build. 2, 119071 Moscow, Russia*

³*Chemistry Department and A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M.V.
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1, 119991 Moscow, Russia*

Abstract

The large subunit of heterodimeric restriction endonuclease BspD6I on its own binds to DNA and specifically nicks the top strand of its recognition sequence. The small subunit of BspD6I is inactive on its own but in the presence of the large subunit cleaves the top strand of the recognition sequence. To elucidate what the large subunit properties are important for displaying small subunit activity two catalytic-deficient large subunits (D456A и E418A) we received. The results show that small subunit is active only in the presence of catalytic active large subunit. It is proposed that catalytic active large subunit binding DNA takes on special orientation and the small becomes able to hydrolyze the bottom strand of DNA.

Key words: heterodimeric restriction endonuclease, nicking endonuclease, nickase, mutagenesis

Введение

Ранее нами в штамме *Bacillus species* D6 была найдена сайт-специфическая нуклеоно-специфическая эндонуклеаза Nt.BspD6I [1]. Нуклеоно-специфические эндонуклеазы (далее, нуклеазы) – сравнительно недавно открытые ферменты. Они, подобно эндонуклеазам рестрикции (далее, рестриктазы), узнают в двухцепочечной ДНК короткую специфическую последовательность нуклеотидов, но в отличие от рестриктаз вносят разрыв (англ. nick) только в одну, предопределенную цепь ДНК в фиксированном положении относительно узнаваемой последовательности [2, 3]. Нуклеаза Nt.BspD6I узнает в двухцепочечной ДНК последовательность 5'-GAGTC-3' и вносит разрыв только в верхнюю цепь ДНК на расстоянии четырех нуклеотидов от узнаваемой последовательности в сторону 3'-конца. Довольно длительное время нуклеазы рассматривались как мутантная форма рестриктазы, утратившая способность к димеризации [4, 5]. Однако нами было показано, что нуклеаза Nt.BspD6I является одной из субъединиц (большой, 70.8 кДа) гетеродимерной рестриктазы R.BspD6I [6]. Второй субъединицей (малая, 21.6 кДа) является белок,

кодируемый открытой рамкой считывания, прилегающей в геномной ДНК *Bacillus species* D6 к гену *никазы*. Малая субъединица в отсутствие *никазы* не связывается или образует очень нестабильный комплекс с ДНК и не гидролизует субстрат. В присутствии *никазы* малая субъединица становится способной к гидролизу ДНК. В отличие от *никазы* малая субъединица вносит разрыв на расстоянии как пяти (~10%), так и на расстоянии шести (~90%) нуклеотидов с 5'-конца от участка узнавания (в цепи ДНК, противоположной той, которую гидролизует *никаза*). До сих пор комплекс малой субъединицы с *никазой* не зафиксирован ни в присутствии, ни в отсутствие ДНК. Вместе с тем, решение вопроса о характере координированного действия двух субъединиц рестриктазы R.BspD6I представляет несомненный научный интерес и может иметь практическое значение. Направленное и обратимое выключение и включение каталитической функции малой субъединицы «заставит» гетеродимерный фермент совершать один или два разрыва в ДНК в зависимости от целей исследования.

Цель

Таким образом, *никаза* Nt.BspD6I - большая субъединица гетеродимерной рестриктазы R.BspD6I - расщепляет ДНК по верхней цепи, а малая субъединица расщепляет ДНК по нижней цепи, но только в присутствии большой субъединицы. Целью работы было выяснение вопроса, способна ли малая субъединица расщеплять нижнюю цепь ДНК, если в большой субъединице будет инактивирован каталитический центр.

Результаты

Для инактивации каталитического центра *никазы* были выбраны два аминокислотных остатка - глутаминовая кислота 418 в одной мутантной форме и аспарагиновая кислота 456 – в другой. Выбор этих аминокислотных остатков основывался на данных приведенных в работе [5]. Авторы этой работы показали, что замена этих аминокислотных остатков на аланин в *никующей* эндонуклеазе Nt.BspNBI не нарушает связывания *никазы* с ДНК, но инактивирует фермент. Следует отметить, что нуклеотидные последовательности *никаза* Nt.BspD6I и Nt.BspNBI полностью совпадают [7].

Получение мутантных форм *никазы*

Для замены глутаминовой кислоты 418 на аланин (E418A) был использован метод перекрывающихся фрагментов. Для этого с плазмиды pET28c/Nick, содержащей ген *никазы*, были наработаны два ПЦР-продукта. ПЦР-продукт 580 н.п. был получен с использованием олигонуклеотидов Nick1 и mut2E. ПЦР-продукт 1260 н.п. был получен с использованием олигонуклеотидов mut1E и Nick2. Полученные ПЦР-продукты

комплементарны по 3'-концам в области перекрывания олигонуклеотидов mut1E и mut2E. ПЦР-продукты объединяли в следующей ПЦР с добавлением праймеров Nick1 и Nick2, фланкирующих ген никазы. В процессе ПЦР после денатурации ПЦР-продуктов происходит отжиг их комплементарных участков и после отжига только цепи, перекрывающиеся 3'-концами, достраиваются ДНК-полимеразой до полноразмерного гена. ПЦР-продукт и плаزمида pET28c были расщеплены эндонуклеазами рестрикции SalI и NcoI, сайты для которых были заложены в олигонуклеотиды Nick1 и Nick2, и лигированы. Лигазной смесью трансформировали клетки *E.coli* NovaBlue(DE3)/pRARE/MSsc. Из трансформированных клеток была выделена рекомбинантная плазмида и секвенированием подтверждено наличие заданной замены нуклеотидов и отсутствие ошибок в остальной части гена.

Для замены аспарагиновой кислоты 456 на аланин (D456A) использовали тот факт, что триплет, кодирующий аспарагиновую кислоту 456, расположен между двумя уникальными сайтами рестрикции (Bli736I и BstEI), которые находятся на расстоянии 460 н.п. друг от друга, а сам триплет находится на расстоянии 7 н.п. от одного из концов фрагмента. Такое расположение триплета позволило, во-первых, заменить D456 на аланин в этом фрагменте и тем самым избежать секвенирования протяженного гена после введения мутации, и, во-вторых, провести мутагенез с использованием только двух олигонуклеотидов. Фрагмент 460 н.п. был наработан с помощью ПЦР с использованием праймеров mutD и Nick2. В качестве матрицы использовали плазмиду pET28c/Nick. ПЦР-продукт и плазмида pET28c/Nick были расщеплены рестриктазами Bli736I и BstEI и лигированы. Лигазной смесью трансформировали клетки *E.coli* NovaBlue(DE3)/pRARE/MSsc. Из трансформированных клеток была выделена рекомбинантная плазмида, и секвенированием подтверждено наличие заданных замен нуклеотидов и отсутствие ошибок в остальной части гена.

Анализ активности малой субъединицы в присутствии мутантных форм никазы

Первоначально было проверено, действительно ли замены D456A в одной мутантной форме никазы и E418A – в другой, привели к потере этими формами каталитической активности. Для анализа активности никазы мы использовали ДНК фага T7, в которой 115 раз встречается последовательность GAGTC, узнаваемая никазой. Следует отметить, что никазы расщепляют ДНК на фрагменты только в том случае, когда два противоположно ориентированных сайта узнавания расположены на небольшом расстоянии (~7-15 н.п.) друг от друга. В ДНК фага T7 близко расположенные инвертированные последовательности GAGTC встречаются 4 раза, что приводит к образованию 5 фрагментов, длиной от ~13000 н.п. до ~4000 н.п. (Рис.1, дорожка 2).

Добавление малой субъединицы к комплексу дикой никазы с ДНК фага Т7 приводит к образованию большого количества фрагментов с максимальной длиной ~2000 н.п. (Рис.1, дорожка 3).

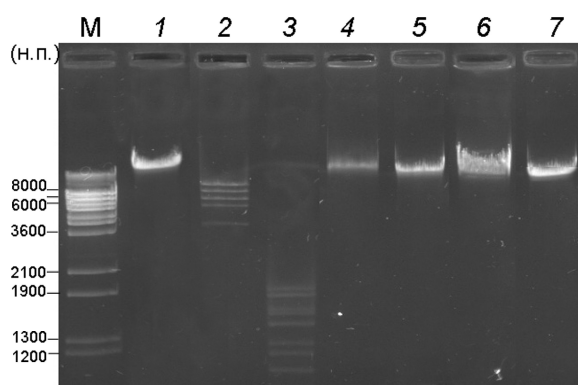


Рис. 1. Электрофорез в 0.8%-ном агарозном геле. 1 – ДНК фага Т7 без обработки ферментами; 2 – ДНК фага Т7 + дикая никаза; 3 – ДНК фага Т7 + никаза + малая субъединица; 4 – ДНК фага Т7 + никаза E418A; 5 – ДНК фага Т7 + никаза D456A 6 – ДНК фага Т7 + никаза E418A + малая субъединица; 7 – ДНК фага Т7 + никаза D456A + малая субъединица. М – маркер длин фрагментов ДНК (числа справа – длина фрагментов в н.п.).

Из рисунка 1 видно, что замены E418A в одной мутантной форме никазы и D456A – в другой, привели к полной потере способности мутантных форм никазы расщеплять ДНК (дорожки 4 и 5), т.е. к потере никующей активности мутантными формами никаз. При добавлении малой субъединицы к комплексу мутантной никазы с ДНК расщепления ДНК малой субъединицей не наблюдается (дорожки 6 и 7). Таким образом, малая субъединица гетеродимерной эндонуклеазы рестрикции R.BspD6I активна только в присутствии каталитически активной большой субъединицы.

Обсуждение

Ранее авторами публикации [8] было показано, что Nt.BspD6I способна образовывать комплекс с продуктом гидролиза, и что малая субъединица эффективно гидролизует нижнюю цепь ДНК, когда верхняя цепь расщеплена никазой. Полученные в настоящей работе результаты являются дополнительным подтверждением такой последовательности гидролиза ДНК по двум цепям гетеродимерной рестриктазой R.BspD6I. Действительно, малая субъединица не расщепляет нижнюю цепь, если не расщеплена верхняя. Строгая последовательность расщепления верхней и нижней цепей присуща рестриктазе Mva1269I [9]. Эта рестриктаза содержит два каталитических сайта на одной полипептидной цепи – канонический и неканонический. Канонический сайт

расщепляет верхнюю цепь ДНК, а неканонический – нижнюю, но только тогда, когда расщеплена верхняя цепь, но не наоборот. Обращает на себя внимание, тот факт, что первую стадию гидролиза осуществляет канонический сайт. Каталитические сайты большой и малой субъединиц рестриктазы R.BspD6I также имеют разную организацию. Каталитический сайт большой субъединицы близок к каноническому, но не полностью совпадает с ним. Каталитический сайт малой субъединицы – неканонический. Известны еще только две гетеродимерные рестриктазы (BsrDI and BtsI), одна из субъединиц которых (большая), обладает никующей активностью [10]. Интересно, что каталитические сайты больших субъединиц этих рестриктаз канонические, тогда как каталитические сайты малых субъединиц неканонические. Не исключено, что большие субъединицы, подобно структуре нуклеазы Nt.BspD6I, имеют доменную структуру, которая включает в себя узнающий и каталитический домены [11]. И именно большие субъединицы обеспечивают узнавание и первыми вносят разрыв в одну из цепей ДНК. Количество консервативных аминокислотных остатков, формирующих неканонические сайты, как правило, больше, чем в канонических сайтах. Не исключено, что «избыточные» аминокислотные остатки в неканонических сайтах малых субъединиц предназначены для взаимодействия с большими субъединицами.

Нуклеазы стали важным инструментом молекулярной биологии. Благодаря уникальной способности вносить одноцепочечный разрыв в ДНК нуклеазы представляют собой перспективные ферменты для целей генной терапии, так как возникающий в ДНК одноцепочечный разрыв репарируется по механизму гомологичной рекомбинации с большей вероятностью, чем двухцепочечный разрыв. Ограниченное количество природных ферментов стимулировало искусственное конструирование нуклеаз на основе рестриктаз путем инактивации, либо одного из каталитических сайтов рестриктаз, содержащих два каталитических сайта в мономерной молекуле [9], либо путем инактивации каталитического сайта одной из субъединиц гетеродимерных рестриктаз [10, 12]. Современные возможности рационального дизайна белков открывают широкие перспективы конструирования на основе рестриктаз нуклеаз с заданными свойствами, направленного изменения специфичности и модулирования их активности с помощью внешнего сигнала. Для этого необходимо детальное знание особенностей их функционирования.

Материалы и методы

Олигонуклеотиды были синтезированы фирмой Синтол (Россия).

Nick1: 5'-GCGCCATGGCTAAAAAGTTAATTG-3' (выделен сайт NcoI)

Nick2: 5'-GCGGTCGACAAAACCTTACCTCCTTG-3' (выделен сайт SalI)

mutD: 5'-GGTAACCAGCCTGCCATGGAAATTATATATG-3' (выделен сайт BstEII)

mut1E: 5'-CTGTATTTGCATGGCTTACG-3'

mut2E: 5'-CGTAAGCCATGCAAATACAG-3'

Подчеркнуты замененные нуклеотиды.

В работе использовали ДНК бактериофага T7, pET28c/Nick - плаزمида pET28c со встроенным геном никазы; pRARE/MSSc - плазмида pRARE со встроенным геном ДНК-метилтрансферазы SscLI, которая метилирует аденин в сайте узнавания никазы и защищает ДНК от гидролиза никазой; эндонуклеазы рестрикции SalI, NcoI, BstEII и Bli736I (изошизомер BsaI). Для выделения никазы использовали хроматографические носители гепарин-сефарозу и Ni-NTA-агарозу.

Определение активности никазы

Анализ ферментативной активности препаратов никазы проводили на основе результатов расщепления ДНК фага T7 никазой в различных разведениях. Реакционную смесь (40 мкл), которая содержала буфер для никазы (10 мМ трис-HCl, pH 7.8, 150 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 1мМ ДТТ, 100 мкг/мл БСА), 1 мкг ДНК фага T7 и аликвоты никазы, инкубировали при 55°C в течение 1 часа. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 0.8%-ном геле агарозы. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое давало полный гидролиз 1 мкг субстратной ДНК за один час.

Выделение плазмидной ДНК и последующее секвенирование

Выделение плазмидной ДНК проводили, как описано [13]. Секвенирование проводили с использованием набора реагентов представленных фирмой Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems, США).

Выделение никующей эндонуклеазы N.BspD6I

Осадок клеток после индукции суспендировали в буфере для лизиса (10 мМ Трис-HCl pH 7.5, 0,1 М NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанол, 10% глицерин), содержащем 2 мМ ФМСФ. Все операции по очистке белка проводили при температуре +4° С. Клеточную биомассу разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1А. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием 13000 об/мин 20 мин при 4°C. Осветленный лизат клеток наносили на колонку с гепарин-сефарозой, уравновешенную

буфером, содержащим 10 мМ Трис-НСl (рН 7.5) 0.1 М NaCl, 0.1 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанол, 10% глицерин. Элюцию проводили, ступенчато тем же буфером, содержащим 0.35 М, 0.55 М, 0.75 М и 1.1 М NaCl. Фракции, содержащие никазу, объединяли и наносили на колонку с Ni-NTA-агарозой, уравновешенную буфером (20 мМ Трис-НСl рН 8.0, 0.3 М NaCl, 7 мМ β-меркаптоэтанол) с 10 мМ имидазолом. Элюцию проводили ступенчато этим же буфером, содержащим 30, 50, 100 и 150 мМ имидазола. Чистоту фракций анализировали электрофорезом в 8% SDS-ПААГ. Фракции, содержащие никазу, освобождали от имидазола путем двукратного диализа против буфера 10 мМ Трис-НСl рН 7.5, 50 мМ KCl, 1 мМ DTT и 10% глицерин. Для хранения никазы диализ проводили против этого же буфера с 50% глицерином.

Литература

1. Железная Л.А., Перевязова Т.А., Альжанова Д.И., Матвиенко Н.И. // Биохимия. 2001. Т. 66. № 9. С. 1215 -1220.
2. Железная Л.А., Качалова Г.С. Артюх Р.И. и др. // Успехи биологической химии. 2009. Т. 94. С. 107–128.
3. Chan S.H., Stoddard B.L., Xu S.Y. // Nucleic Acids Res. 2011. V. 39. P. 1-18.
4. Абдурашитов М.А., Белитченко О.А., Шевченко А.В. и др.// Молекулярная биология. 1996. Т. 30. № 6. С. 1261-1267.
5. Higgins L.S., Besnier C., and Kong H. // Nucleic Acids Res. 2001. V. 29. P. 2492-2501.
6. Юнусова А.К., Рогулин Е.А., Железная Л.А. и др. // Биохимия. 2006. Т. 71. № 7. Р. 815-820.
7. Перевязова Т.А., Рогулин Е.А., Железная Л.А., Матвиенко Н.И. // Биохимия. 2003. Т. 68. С. 1203-1207.
8. Abrosimova L.A., Kubareva E.A., Migur A.Yu, et al. // 2016. Biochim. Biophys. Acta. V. 1864. 1072-1082.
9. Armalyte E., Bujnicki J., Gledriene J. et al. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 41584–41594.
10. Xu S.Y., Zhu Z., Zhang P., et al. // Nucleic Acids Res. 2007. V. 35. P 4608–4618.
11. Kachalova G.S., Rogulin E.A., Yunusova A.K., Artyukh R.I., et al., // J. Mol. Biol. 2008. V. 348. P. 489-502.
12. Heiter D.F., Lunnen K.D., Wilson G.G. // J. Mol. Biol. 2005. 348. P 631–640.

13. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* // Молекулярное клонирование. 1984. Москва. Мир.

Благодарности. Работа частично проводилась при поддержке гранта РФФИ (16-34-00360).