

УДК 03.4.1.1.

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ЭНДОНУКЛЕАЗЫ I БАКТЕРИОФАГА T7

© 2011 О.И. Машков, О.В. Чубукова

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 27.05.2011

В настоящей статье сообщается о клонировании гена эндонуклеазы I бактериофага T7 в экспрессирующей векторной конструкции, а также о создании бактериального штамма-производителя данного фермента.

Ключевые слова: рекомбинация, структура Холлидея, резолваза, T7 эндонуклеаза I.

Генетическая рекомбинация является одним из фундаментальных генетических процессов. Она необходима при внедрении вирусной ДНК в геном клетки-хозяина [16], поддержании общей стабильности генома [4] посредством рекомбинант-зависимой репарации ДНК [14], при повторном запуске или расщеплении остановленных репликационных вилок [3]. Рекомбинационный процесс является основой непостоянства генома, это источник новых комбинаций существующих единиц наследственности [8, 9]. В ходе рекомбинации образуется промежуточный субстрат – структура Холлидея – четырёхнитевой перекрест [7], который впоследствии подвергается ферментативному разрешению [6, 9, 12, 17]. Многие перекрест-расщепляющие ферменты можно отнести к одному из двух суперсемейств белков – интеграз или нуклеаз. В суперсемейство интеграз входят такие резолвазы как RuvC, CseI, Ydc2, а также РНКазы H и фермент вируса коровьей оспы A22. К суперсемейству нуклеаз относятся T7 эндонуклеаза I, резолвазы архей, λ -экзонуклеаза, а также ферменты рестрикции [10, 19]. Большинство нуклеаз – сравнительно небольшие основные белки (обычно $pI_{calc} > 8.5$), связывающиеся со структурой Холлидея в строго определённых местах. При этом образуются комплексы димерного белка и ДНК-перекреста, сохраняющие стабильность в присутствии 1000-кратного избытка двухцепочечной ДНК [20, 21]. На данный момент механизмы разрешения структуры Холлидея изучены не полностью. Это обусловлено тем, что до настоящего времени не получены данные о кристаллической структуре комплекса ДНК-перекреста с присоединённой к нему эндонуклеазой.

К хорошо изученным резолвазам относится эндонуклеаза I бактериофага T7 (T7EI). Этот фермент принадлежит к суперсемейству нуклеаз [10]. Благодаря широкой субстратной специфичности, данный фермент взаимодействует со множеством разветвлённых форм ДНК, включая линейные гетеродуплексные молекулы с неспаренными нуклеотидами [11]. Можно предположить, что перекрест-расщепляющие ферменты гидролизуют фосфодиэфирные связи, используя молекулу воды,

активированную ионами металлов. В пользу этого утверждения свидетельствует тот факт, что среди структур предполагаемых активных центров многих изученных ферментов встречаются кластеры кислых аминокислотных цепей, вероятно, отвечающих за связывание и координацию ионов металлов [20, 22, 23, 24, 25]. Кроме того, в активном сайте T4 эндонуклеазы VII обнаружен ион кальция [26]. Позднее в активном сайте T7 эндонуклеазы I, также были найдены два иона кальция [27].

Эндонуклеаза T7EI кроме структуры Холлидея взаимодействует также и с другими ДНК-структурами, вплоть до гетеродуплексов с однонуклеотидными ошибочными спариваниями – мисмэтчами [11]. Несмотря на это, механизм специфического узнавания субстрата до сих пор в деталях не изучен. В случае с ферментами, расщепляющими перекресты, определение молекулярных основ узнавания осложнено изменением конформации ДНК при прикреплении нуклеаз [5, 7, 18].

Для образования комплекса «фермент-субстрат» с T7 эндонуклеазой I молекула ДНК должна войти в высокоэнергетическое конформационное состояние. Следовательно, из-за высокой энергии активации реакция протекает медленно, но для определённых последовательностей ДНК (например, для дуплексов с несовершенной комплементарной структурой) энергия активации может быть ниже, чем для других. По этой причине ДНК с ошибочно спаренными основаниями или с фосфодиэфирным разрывом в одной из цепей являются для T7EI наиболее предпочтительными субстратами. Такие участки с неполной комплементацией оснований по своей природе более гибкие – они являются своего рода горячими точками неспецифической нуклеазной активности генома.

Цель исследования состояла в клонировании гена эндонуклеазы I бактериофага T7 в экспрессирующей векторной конструкции, с последующим созданием штамма-производителя данного фермента на основе штамма *E. coli*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования – фермент T7EI, кодируемый третьим геном кольцевой молекулы ДНК бактериофага T7 [1, 13, 15]. Данный фермент представляет собой небольшой симметричный гомоди-

Машков Олег Игоревич, e-mail: mg_mashkov@mail.ru;
Чубукова Ольга Вячеславовна, канд. биол. наук, e-mail: chubukova@bk.ru.

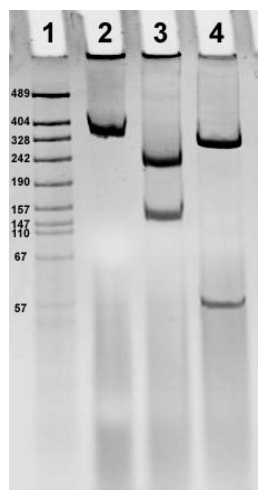


Рис. 1. Рестрикционный анализ фрагмента плазмиды рKRXT7-E1, гомологичного гену T7E1. 1 – маркер; 2 – амплифицированный фрагмент плазмиды рKRXT7-E1; 3 – результат рестрикции амплификата *Csp61*; 4 – результат рестрикции амплификата *HaeIII*.

После индукции с различными условиями среди отобранных клонов был выделен один (рЕТ-22bT7c12), который по результатам электрофоретического анализа клеточного лизата нарабатывал белковый продукт сходный по размерам с эндонуклеазой I бактериофага T7. Далее белковый препарат клона рЕТ-22bT7c12 был очищен методом аффинной хроматографии и сконцентрирован при помощи диализа (рис. 2).

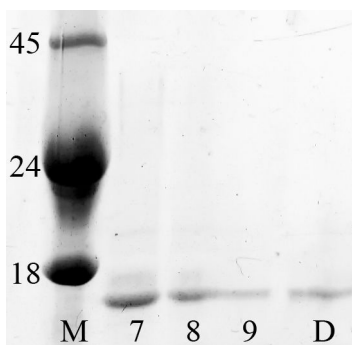


Рис. 2. Электрофоретическая картина очищенного методом аффинной хроматографии белкового препарата рЕТ-22bT7c12. М - белковый маркер (цифровые обозначения слева - молекулярный вес фрагмента в кДа); 7, 8, 9 - фракции белкового препарата, выделенные после аффинной хроматографии рЕТ-22bT7c12; D - фракция белкового препарата рЕТ-22bT7c12 после процедуры диализа.

Необходимо отметить, что на стадии индукции бактериальной культуры и последующей очистки фермента мы столкнулись с трудностью наработки достаточного для идентификации количества T7 эндонуклеазы I.

Было опробовано несколько вариантов культивирования штаммов *E. coli*, которые по предварительным данным могли синтезировать целевой фермент.

Из всех условий наиболее удовлетворительной для наработки T7E1 оказалась индукция 0,5 мМ

ИПТГ при 32° С в течение 6 ч с последующей УЗ-деинтеграцией клеток на снегу клона рЕТ-22bT7c12. Наиболее вероятным объяснением наработки фермента при данных условиях может являться тот факт, что помимо основной своей функции (которая заключается в разрезании структур Холлидея, образующихся при рекомбинации во время литического цикла бактериофага T7) T7E1 при высокой концентрации в клетке расщепляет ДНК самой бактерии [15]. При пониженной температуре культивирования в отдельно взятой клетке *E. coli* фермента T7E1 нарабатывается меньше, его растворимость повышается. Однако изначально высокая численность клеток непосредственно перед индукцией позволяет выделить достаточное количество T7E1.

В рамках данного исследования нами был создан ряд клонов, содержащих вставку гена эндонуклеазы I бактериофага T7 в экспрессирующие векторные системы рЕТ и PinPoint. Данный факт подтверждается наработкой в результате ПЦР с праймерами к гену T7E1 фрагмента ДНК одинаковой длины с амплифицированным ранее геном T7E1 из ДНК фага T7, рестрикционным анализом и автоматическим секвенированием плазмидной ДНК трансформированных клеток *E. coli*. Однако только в одном штамме (рЕТ-22bT7c12) была отмечена возможность стабильной наработки целевого фермента. Поскольку экспрессия вставки в используемой векторной системе рЕТ-22b приводит к образованию белкового продукта с гистидиновым «хвостом» на С-конце, фермент T7E1 был специфично очищен из клеточного лизата методом аффинной хроматографии. Выделенная и очищенная фракция клеточного лизата рЕТ-22bT7c12 по своей электрофоретической подвижности аналогична T7E1. Опираясь на эти результаты, мы можем предположить, что созданный штамм *E. coli* BL21(DE3)pLysS, содержащий плазмиду рЕТ-22bT7c12, является штаммом-продуцентом эндонуклеазы I бактериофага T7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Center M.S., Richardson C.C. An endonuclease induced after infection of *Escherichia coli* with bacteriophage T7. I. Purification and properties of the enzyme // *J. Biol. Chem.* 1970. V. 245. P. 6285-6291.
2. Clewell D.B., Helinski D.R. Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular DNA form // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1969. V. 62. N 4. P. 1159-1166.
3. Cox M.M., Goodman M.F., Kreuzer K.N. et al. The importance of repairing stalled replication forks // *Nature.* 2000. V. 404. P. 37-41.
4. Flores-Rozas, H., Kolodner R.D. Links between replication, recombination and genome instability in eukaryotes // *Trends Biochem. Sci.* 2000. V. 292. P. 196-200.
5. Fogg J.M., Kvaratskhelia M., White M.F., Lilley D.M.J. Distortion of DNA junctions imposed by the binding of resolving enzymes: a fluorescence study // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 313. P. 751-764.

6. Giraud-Panis M.-J.E., Lilley D.M.J. Structural recognition and distortion by the DNA junction-resolving enzyme RusA // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 278. P. 117-133.
7. Holliday R. A mechanism for gene conversion in fungi // *Genet. Res.* 1964. V. 5. P. 282-304.
8. Holliday R. Molecular aspects of genetic exchange and gene conversion // *Genetics.* 1974. V. 78. P. 273-287.
9. Kerr C., Sadowski P. D. The involvement of genes 3, 4, 5 and 6 in genetic recombination in bacteriophage T7 // *Virology.* 1975. V. 65. P. 281-285.
10. Lilley D.M.J., White M.F. Resolving the relationships of resolving enzymes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 9351-9353.
11. Mashal R.D., Koontz J., Sklar J. Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvases // *Nat. Genet.* 1995. V. 9. P. 177-183.
12. Powling A., Knippers R. Recombination of bacteriophage T7 *in vivo* // *Mol. Gen. Genet.* 1976. V. 149. P. 63-71.
13. Sadowski P. D. Bacteriophage T7 endonuclease. I. Properties of the enzyme purified from T7 phage-infected *Escherichia coli* B // *J. Biol. Chem.* 1971. V. 246. P. 209-216.
14. Smith K.C. Recombinational DNA repair: the ignored repair systems // *Bioessays.* 2004. V. 26 (12). P. 1322-1326.
15. Studier F.W. The genetics and physiology of bacteriophage T7 // *J. Virol.* 1969. V. 39. P. 562-574.
16. Subramaniam S., Tewari A.K., Nunes-Duby S.E., Foster M.P. Dynamics and DNA substrate recognition by the catalytic domain of lambda integrase // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 329. N 3. P. 423-439.
17. Tsujimoto Y., Ogawa H. Intermediates in genetic recombination of bacteriophage T7 DNA. Biological activity and the roles of gene 3 and gene 5 // *J. Mol. Biol.* 1978. V. 125. P. 255-273.
18. White M.F., Lilley D.M.J. The resolving enzyme CCE1 of yeast opens the structure of the four-way DNA junction // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 266. P. 122-134.
19. Makarova K.S., Aravind L., Koonin E.V. Holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 3417-3432.
20. Duckett D.R., Panis M.E.G., Lilley D.M.J. Binding of the junction-resolving enzyme bacteriophage T7 endonuclease I to DNA: separation of binding and catalysis by mutation // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 246. P. 95-107.
21. White M.F., Lilley D.M.J. The structure-selectivity and sequence-preference of the junction-resolving enzyme CCE1 of *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 257. P. 330-341.
22. Saito A., Iwasaki H., Ariyoshi M. *et al.* Identification of four acidic amino acids that constitute the catalytic centre of the RuvC Holliday junction resolvase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 7470-7474.
23. Giraud-Panis M.-J.E., Lilley D.M.J. Structural recognition and distortion by the DNA junction-resolving enzyme RusA. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 278. P. 117-133.
24. Parkinson M.J., Pöhler J.R.G., Lilley D.M.J. Catalytic and binding mutants of the junction-resolving enzyme endonuclease I of bacteriophage T7: role of acidic residues // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. P. 682-689.
25. Wardleworth B.N., Kvaratskhelia M., White M.F. Sitedirected mutagenesis of the yeast resolving enzyme Cce1 reveals catalytic residues and relationship with the intron-splicing factor Mrs1. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 23725-23728.
26. Raaijmakers H., Vix O., Toro I. *et al.* X-ray structure of T4 endonuclease VII: a DNA junction resolvase with a novel fold and unusual domain-swapped dimer architecture // *EMBO J.* 1999. V. 18. P. 1447-1458.
27. Hadden J.M., Déclais A.C., Carr S.B. *et al.* The structural basis of Holliday junction resolution by T7 endonuclease I. // *Nature.* 2007. V. 449. N 4. P. 621-625.

CLONING AND EXPRESSION OF ENDONUCLEASE I BACTERIOPHAGE T7 GENE

© 2011 O.I. Mashkov, O.V. Chubukova

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

In this article it is informed on cloning of endonuclease I gene from bacteriophage T7 in expression a vector construction, and also about creation of a bacterial strain-producer of the given enzyme.

Key words: recombination, Holliday structure, resolvase, T7 endonuclease I.