

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова

На правах рукописи

АБРОСИМОВА ЛЮДМИЛА АЛЕКСЕЕВНА

**ГЕТЕРОДИМЕРНАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА РЕСТРИКЦИИ *BspDI* И
КОНЬЮГАТЫ ГОМОДИМЕРНОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ
РЕСТРИКЦИИ *SsoII* С ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДАМИ:
ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ДНК**

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

02.00.10 – биоорганическая химия

Научный руководитель:

доктор химических наук,

профессор Кубарева Е.А.

МОСКВА – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. КОНСТРУИРОВАНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ НИКУЮЩИХ ЭНДОНУКЛЕАЗ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ (<i>Обзор литературы</i>)	11
1.1. Встречающиеся в природе эндонуклеазы рестрикции и никующие эндонуклеазы ..	11
1.2. Конструирование искусственных никующих эндонуклеаз	14
1.2.1. Получение никующих эндонуклеаз путем нарушения димеризационного интерфейса эндонуклеаз рестрикции	14
1.2.2. Получение никующих эндонуклеаз на основе гомодимерных эндонуклеаз рестрикции, содержащих один каталитический центр в каждой субъединице	15
1.2.3. Получение никующих эндонуклеаз путем инактивации одного из каталитических центров эндонуклеаз рестрикции	16
1.2.4. Получение никующих эндонуклеаз в результате случайного мутагенеза генов эндонуклеаз рестрикции	20
1.2.5. Получение никующих эндонуклеаз из «хоуминг»-эндонуклеаз	23
1.3. Стимулирование матрично-независимого синтеза ДНК никующими эндонуклеазами	25
1.4. Практическое использование сайт-специфических никующих эндонуклеаз	26
1.4.1. Изотермическая амплификация ДНК	26
1.4.2. Способы детекции ДНК с использованием никующих эндонуклеаз	28
1.4.3. Перемещение олигодезоксирибонуклеотида	30
1.4.4. Клонирование фрагментов ДНК без использования ДНК-лигаз	31
1.4.5. Детекция РНК с использованием никующих эндонуклеаз	32
1.4.6. Введение модификаций во внутренние участки ДНК с использованием никующих эндонуклеаз	33
1.4.7. Использование никующих эндонуклеаз в секвенировании ДНК	36
1.4.8. Использование никующих эндонуклеаз при анализе профиля метилирования ..	38
1.5. Изменение активности никующих эндонуклеаз с помощью псевдокомплементарных ПНК	39

1.6. Высокоспецифичные эндонуклеазы	41
1.6.1. Мегануклеазы	41
1.6.2. Эндонуклеазы с мотивом «цинковые пальцы»	44
1.6.3. TALE-нуклеазы	46
1.6.4. Нуклеазы, связанные с триплекс-образующим олигонуклеотидом (TFO-нуклеазы).....	48
1.6.5. Эндонуклеазы системы CRISPR/Cas	50
1.6.6. Нуклеазы, узнающие «флэп»-структуру в ДНК.....	53
1.7. Создание эндонуклеаз с регулируемой активностью.....	54
ГЛАВА 2. ГЕТЕРОДИМЕРНАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА РЕСТРИКЦИИ <i>BspD6I</i> И КОНЬЮГАТЫ ГОМОДИМЕРНОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ <i>SsoII</i> С ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДАМИ: ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ДНК (<i>Результаты и их обсуждение</i>)	58
2.1. Характеристика объектов исследования	58
2.2. Изучение свойств эндонуклеазы рестрикции <i>BspD6I</i> и особенностей ее взаимодействия с ДНК	61
2.2.1. Определение угла изгиба ДНК, индуцируемого никующей эндонуклеазой <i>BspD6I</i>	62
2.2.2. Характеристика свойств эндонуклеазы рестрикции <i>BspD6I</i> с помощью немодифицированных ДНК-дуплексов	68
2.2.3. Взаимодействие эндонуклеазы рестрикции <i>BspD6I</i> с метилированными ДНК- дуплексами.....	86
2.2.4. Взаимодействие эндонуклеазы рестрикции <i>BspD6I</i> с азобензолсодержащими ДНК-дуплексами	90
2.3. Разработка подходов к регулированию активности никующей эндонуклеазы <i>BspD6I</i> с использованием модифицированных ДНК-дуплексов	100
2.3.1. Подбор оптимальной структуры негидролизующих аналогов субстрата <i>Nt.BspD6I</i>	102
2.3.2. Изучение активности <i>Nt.BspD6I</i> в присутствии азобензолсодержащих дуплексов при облучении светом.....	107

2.3.3. Использование триэтиленгликольсодержащего дуплекса для регулирования активности Nt.BspD6I в зависимости от температуры.....	110
2.4. Изучение свойств конъюгатов гомодимерной эндонуклеазы рестрикции SsoII с ДНК-фрагментами	115
2.4.1. Выбор положения модификации эндонуклеазы рестрикции SsoII олигонуклеотидом.....	118
2.4.2. Выбор структуры олигонуклеотида для ковалентного присоединения к эндонуклеазе рестрикции SsoII.....	119
2.4.3. Зависимость устойчивости ДНК-дуплексов от температуры.....	122
2.4.4. Модификация мутантной формы R.SsoII(2CS/S171C) олигонуклеотидами, содержащими азобензольную вставку	126
2.4.5. Гидролиз ДНК-субстрата конъюгатами R.SsoII(2CS/S171C) с азобензол-содержащими олигонуклеотидами в зависимости от облучения УФ-светом.....	130
2.4.6. Гидролиз ДНК-субстрата конъюгатами R.SsoII(2CS/S171C) с олигонуклеотидами в зависимости от температуры.....	133
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	137
3.1. Реактивы и материалы.....	137
3.2. Приборы и методы.....	140
3.3. Общие методики	142
3.3.1. Методики, использованные при определении угла изгиба ДНК, индуцированного связыванием Nt.BspD6I	142
3.3.2. Анализ связывания и гидролиза никующей эндонуклеазой BspD6I и эндонуклеазой рестрикции BspD6I синтетических ДНК-дуплексов	145
3.3.3. Анализ связывания никующей эндонуклеазой BspD6I синтетических ДНК-дуплексов методом акустической детекции на пьезоэлектрическом сенсоре	146
3.3.4. Регулирование активности никующей эндонуклеазы BspD6I с помощью облучения светом и изменения температуры реакции.....	147
3.3.5. Выделение препаратов R.SsoII(2CS/S171C) методом аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе	148
3.3.6. Получение конъюгатов эндонуклеазы рестрикции SsoII(2CS/S171C) с олигонуклеотидами.....	149

3.3.7. Изучение активности эндонуклеазы рестрикции SsoII(2CS/S171C) в зависимости от облучения светом и изменения температуры реакции.....	150
ВЫВОДЫ	151
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	152

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Cas	от англ. CRISPR-associated: связанный с CRISPR
CRISPR	от англ. <u>clustered</u> <u>regularly</u> <u>interspaced</u> <u>short</u> <u>palindromic</u> <u>repeats</u> : короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами
crPHK	от англ. CRISPR-RNA: гидовая РНК системы CRISPR
EtBr	этидия бромид
HEPES	<i>N</i> -2-гидроксиэтилпиперазин- <i>N'</i> -2-этансульфоновая кислота
M. (MTаза)	ДНК-метилтрансфераза
N. (НЭ)	никующая эндонуклеаза (никаза)
Nb.	никующая эндонуклеаза (никаза), гидролизующая «нижнюю» цепь двутяжевой ДНК (от англ. <u>bottom</u> : нижний)
Nt.	никующая эндонуклеаза (никаза), гидролизующая «верхнюю» цепь двутяжевой ДНК (от англ. <u>top</u> : верхний)
PDB	Protein Data Bank, банк пространственных структур макромолекул
PMSF	phenylmethanesulfonylfluoride; фенилметансульфонилфторид
R. (ЭР)	эндонуклеаза рестрикции
ss.BspD6I	от англ. <u>s</u> mall <u>s</u> ubunit BspD6I: малая субъединица эндонуклеазы рестрикции BspD6I
TALE	от англ. <u>t</u> ranscription <u>a</u> ctivator- <u>l</u> ike <u>e</u> ffector: ДНК-связывающий домен TAL-эффекторов
TFO	от англ. <u>t</u> riplex <u>f</u> orming <u>o</u> ligonucleotide: олигонуклеотид, образующий тройную спираль с двуцепочечной ДНК
tracr-РНК	от англ. <u>t</u> rans- <u>a</u> ctivating <u>c</u> rRNA: транс-активирующая crPHK
TSM	thickness shear mode; деформация сдвига по толщине
а.о.	аминокислотные остатки
АСМ	атомно-силовая микроскопия
БСА	бычий сывороточный альбумин
БФС	бромфеноловый синий
Да, кДа	дальтон, килодальтон
ДМСО	диметилсульфоксид
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДСН	додецилсульфат натрия
ДТТ	дитиотреит (1,4-димеркапто-2,3-бутандиол)
КЦ	ксиленцианол
НББ	2-нитробензилбромид
ПААГ	полиакриламидный гель
п. н.	пара нуклеотидов

Р–М	рестрикция–модификация
РНК	рибонуклеиновая кислота
РСА	рентгеноструктурный анализ
ТЕМЕД	<i>N,N,N',N'</i> -тетраметилэтилендиамин
Трис	трис(гидроксиметил)аминометан
$T_{пл}$	температура плавления
УФ	ультрафиолетовый свет
ЧСА	сывороточный альбумин человека
ЭДТА	этилендиаминтетраацетат, натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты

Для обозначения аминокислотных остатков, гетероциклических оснований, нуклеозидов, нуклеотидов, олиго- и полинуклеотидов использовали символы, рекомендованные Комиссией по номенклатуре Международного союза чистой и прикладной химии (IUPAC) и Международного союза биохимиков (IUB). Префикс «d» (дезокси) при обозначении нуклеозидов, нуклеотидов, олигодезоксирибонуклеотидов и ДНК-дуплексов опущен.

ВВЕДЕНИЕ

Около 50 лет незаменимыми инструментами генетической инженерии являются эндонуклеазы рестрикции (ЭР), узнающие в двуцепочечной ДНК специфические последовательности и гидролизующие её в строго фиксированном месте относительно участка узнавания. Мономерные ЭР с двумя участками узнавания и гетеродимерные ЭР явились основой для конструирования нового типа ферментов – никующих эндонуклеаз (НЭ). Эти ферменты взаимодействуют с двуцепочечной ДНК подобно ЭР, однако расщепляют только одну из её цепей.

Большинство природных эндонуклеаз, вносящих одноцепочечный разрыв или «ник» в ДНК, вовлечены в клеточные процессы, такие как репликация, репарация ДНК [1], генная конверсия [2]. НЭ часто находятся в комплексе с другими белками клетки, образуя функционально активные ассоциаты. Первая никующая эндонуклеаза, входящая в состав системы рестрикции-модификации (R-M), была обнаружена Абдурашитовым и соавт. в 1996 г. [3]. За два десятилетия изучения эти ферменты нашли широкое применение в различных областях молекулярной биологии. Их используют для изотермической реакции амплификации олигонуклеотидов и геномной ДНК [4], для экономного клонирования ДНК, не требующего ферментативного лигирования [5], для конструирования ДНК-интермедиатов репарационных процессов [6]. С помощью НЭ созданы наномашин и сверхчувствительные ДНК-сенсоры, в том числе для детекции ДНК болезнетворных микроорганизмов [7]. Однако механизм их взаимодействия с ДНК остаётся не до конца изученным, что ограничивает круг методов, основанных на использовании этих ферментов.

ЭР и НЭ представляют собой перспективные ферменты для целей генной терапии: они используются при конструировании высокоспецифичных химерных белков [8]. Такие химерные белки могут стимулировать гомологичную рекомбинацию в месте разрыва двуцепочечной ДНК, что приводит к «исправлению» заранее заданной последовательности ДНК [9]. Однако неконтролируемое проявление активности этими белками может привести к нежелательным последствиям для клетки. Поэтому актуальной проблемой является разработка подходов направленного «включения» и «выключения» их активности.

Целью данной работы являлось получение новой информации о функционировании гетеродимерных ЭР, одна из субъединиц которых является НЭ, а также конструирование и изучение свойств конъюгатов гомодимерных ЭР с ДНК-фрагментами. Полученные данные являются основой для расширения диапазона практического использования этих ферментов и модулирования их свойств.

В качестве объекта исследования была выбрана гетеродимерная ЭР VspD6I, обнаруженная в природном термофильном штамме *Bacillus species* D6 [10]. ЭР VspD6I состоит из двух различающихся по размеру и функциям субъединиц: большой и малой. Большая субъединица гетеродимерной ЭР VspD6I является никующей эндонуклеазой VspD6I; в присутствии второй (малой) субъединицы происходит гидролиз обеих цепей ДНК.

До настоящего времени не было проведено детального изучения биохимических свойств ЭР VspD6I и аналогичных ей ферментов. Поэтому необходимо было исследовать параметры функционирования ЭР VspD6I, установить характер взаимодействия двух субъединиц друг с другом. Одно из направлений работы заключалось в создании подхода к регулированию активности большой субъединицы ЭР VspD6I.

Вторым модельным объектом являлась гомодимерная эндонуклеаза рестрикции SsoII. Ее биохимические свойства были изучены ранее [11]. Известно, что формирование конъюгатов ферментов (в том числе и нуклеаз) с олигонуклеотидами может приводить к значительному изменению свойств белка. Так, в случае ковалентно связанного комплекса рибонуклеазы HI с олигонуклеотидом изменялись кинетические параметры ферментативной реакции [12]. Некоторые конъюгаты ЭР с олигонуклеотидами имеют более протяженный участок узнавания по сравнению с немодифицированным ферментом, что позволяет с их помощью вносить разрыв в строго определенную последовательность в геноме [13].

Детальное знание структуры ЭР SsoII и механизма ее функционирования позволило предположить, что конструирование конъюгатов данного фермента с ДНК также может привести к требуемому изменению каталитических свойств фермента. Поэтому в данной работе предполагалось получить конъюгаты ЭР SsoII с ДНК и изучить особенности их функционирования.

Таким образом, были сформулированы следующие задачи работы.

1. Охарактеризовать свойства ЭР VspD6I и выявить особенности ее взаимодействия с ДНК-фрагментами, как немодифицированными, так и модифицированными.
2. Предложить подход для регулирования активности НЭ VspD6I с использованием синтетических ДНК-дуплексов.
3. Сконструировать конъюгаты ЭР SsoII с олигодезоксирибонуклеотидами и изучить способность таких конъюгатов гидролизовать ДНК в различных условиях.

Основным инструментом для решения поставленных задач являлись синтетические фрагменты ДНК различной длины и структуры. Для изучения особенностей функционирования ЭР нами впервые использованы ДНК-дуплексы, содержащие ненуклеозидные вставки с остатками азобензола, который способен к *транс-цис*-изомеризации.

Работа включает обзор литературы, посвященный характеристике природных и искусственных НЭ, а также способам их использования в генетической инженерии.

ГЛАВА 1. КОНСТРУИРОВАНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ НИКУЮЩИХ ЭНДОНУКЛЕАЗ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

(Обзор литературы)

1.1. Встречающиеся в природе эндонуклеазы рестрикции и никующие эндонуклеазы

Эндонуклеазы рестрикции (ЭР) II-го типа узнают в ДНК короткую, обычно палиндромную последовательность длиной 4–8 п.н. и в присутствии ионов Mg^{2+} вносят двуцепочечный разрыв внутри или в непосредственной близости от участка узнавания с образованием 5'-фосфатной и 3'-гидроксильной групп [14]. С другой стороны ЭР II-го типа представляют собой группу ферментов, значительно различающихся по свойствам. Это нашло отражение в их неоднозначной и сложной классификации: Робертс и соавт. выделили 11 подтипов ЭР II-го типа [15], причем один и тот же фермент в некоторых случаях можно отнести к нескольким подтипам. К подтипу IIA относят ферменты, участок узнавания которых представляет собой асимметричную (англ. «*asymmetric*») последовательность в ДНК, при этом позиция гидролиза может быть как внутри, так и за пределами участка узнавания (R.Bpu10I, R.FokI, R.SapI). Соответствующие системы Р-М могут содержать одну или две ДНК-метилтрансферазы (МТазы), в последнем случае метилирование разных цепей ДНК осуществляют разные МТазы [16]. К подтипу IIS относят ферменты, которые гидролизуют ДНК-субстрат на определенном расстоянии от участка узнавания (R.FokI, R.BbvI, R.MlyI) (англ. «*shifted*»). ЭР подтипа IIS узнают обычно асимметричную последовательность ДНК. В соответствующих системах Р-М, как правило, закодированы две МТазы, каждая из которых модифицирует одну цепь ДНК-субстрата. Однако иногда, как в случае системы Р-М FokI, две МТазы соединены в единую полипептидную цепь [17]. Подтип IIT (англ. «*heterodimers, two*») объединяет ферменты, являющиеся гетеродимерами, или более точно – обладающие двумя различными каталитическими центрами (R.Bpu10I, R.BbvCI, R.BtsI). К этому подтипу относят также ферменты, являющиеся мономерами с двумя разными каталитическими доменами (R.Mva1269I, R.BtsCI, R.BsrI) и гетеротетрамерные ЭР (R.BslI) [16]. Узнавание ДНК может происходить как обеими субъединицами/доменами ЭР, так и только одной субъединицей/доменом (рис. 1.1). Ферменты подтипа IIT узнают в ДНК асимметричные

последовательности. Как правило, ЭР IIТ подтипа сопряжены с двумя отдельными МТазами.

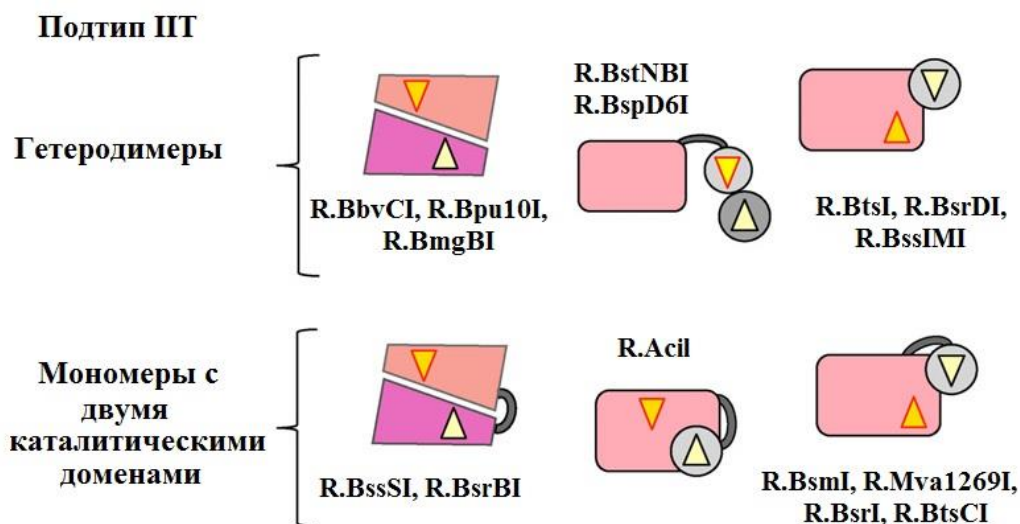


Рис. 1.1. Структурная организация ЭР подтипа IIТ. Треугольниками выделены каталитические центры ферментов. Две схожие по размерам и функциям (узнавание, гидролиз ДНК) субъединицы/домены показаны трапециями. Большая субъединица гетеродимерных ЭР выделена прямоугольником, малая – кругом [16].

Эндонуклеазы нашли широкое применение в молекулярной биологии и генетической инженерии. Они используются для вставки последовательностей ДНК в плазмиды, что необходимо для получения рекомбинантных белков. С их помощью детектируют однонуклеотидные замены (SNP, англ. «single nucleotide polymorphisms»), которые могут происходить в аллельных генах. ЭР позволяют проводить физическое картирование ДНК, то есть определение взаимного расположения и примерных расстояний друг от друга участков расщепления изучаемого фрагмента ДНК. На сегодняшний день менее изученными являются эндонуклеазы, которые гидролизуют только одну цепь двуцепочечной ДНК – нисходящие эндонуклеазы (никазы, НЭ, N.). Одноцепочечный разрыв двуцепочечной ДНК называют «ником» (от англ. «nick» – разрыв), отсюда название этого семейства эндонуклеаз.

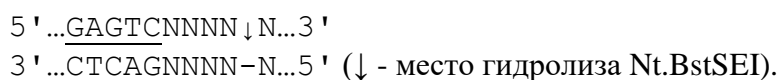
НЭ, гидролизующие «верхнюю» цепь дуплекса, обозначают двубуквенным сокращением Nt. (t – от англ. «top»: верхний), например, Nt.BstSE. НЭ, гидролизующие «нижнюю» цепь, обозначают Nb. (b – от англ. «bottom»: нижний). Встречающиеся в природе НЭ довольно разнообразны и узнают различные по протяженности участки узнавания. ЭР, среди которых встречаются НЭ или из которых в основном конструируют искусственные НЭ, относятся к подтипам IIA, IIS и IIТ. Сайт-специфические НЭ могут

представлять собой одну из субъединиц гетеродимерных ЭР (например, R.BtsI, R.BsrDI, R.BstNBI). Другую группу НЭ образуют релаксазы, присутствующие в конъюгативных плаزمидеах и принимающие участие в инициации репликации и переноса цепи ДНК [18]. В вирусах хлореллы найдены частощепащие НЭ, например Nt.CviPII с участком узнавания 5'-↓CCD-3'/3'-GGH-5' (↓ обозначает место гидролиза, D – остаток А, G либо Т, H – остаток Т, С либо А) [19], Nt.CviQII и Nt.CviQXI с участком узнавания 5'-R↓AG-3'/3'-YTC-5' (R – пуриновый остаток, Y – пиримидиновый остаток) [20]. В бактериофаге f1 также закодирована НЭ – она представляет собой белок, необходимый для репликации ДНК вируса [21]. Существуют и редкощепащие никующие «хоуминг»-эндонуклеазы (эндонуклеазы генной конверсии) с участком узнавания более 20 п.н., они встречаются только среди представителей подсемейства HNH (например I-HnuI, I-BasI) [22] – [24].

В базе данных REBASE (<http://rebase.neb.com/cgi-bin/azlist?nick>) к НЭ относят 36 ферментов как встречающихся в природе, так и искусственно сконструированных. Из них 14 ферментов – коммерчески доступны. Еще для более чем 3400 эндонуклеаз предсказывают никующую активность.

Согласно классификации Робертса и соавт. [15] НЭ разделены на две группы. К одной группе отнесены ферменты, которые узнают в двутяжевой ДНК короткую специфическую последовательность и вносят разрыв в определенную цепь ДНК, например, Nt.BspD6I. Такие НЭ входят в состав гетеродимерных ЭР в качестве больших субъединиц [10]. Ко второй группе относятся НЭ, которые в клетке ассоциированы исключительно с С5-цитозиновыми ДНК-метилтрансферазами и вносят разрыв рядом с неканонической парой G/T [15]. Одним из примеров является эндонуклеаза V.HpaII, которая в клетках ассоциирована с M.HpaII.

Первая НЭ BstSEI была обнаружена в штамме *Bacillus stearothermophilus* SE-589 и выделена Абдурашитовым и соавт. в 1996 г. [3]. Nt.BstSEI узнаёт последовательность 5'-GAGTC-3'/5'-GACTC-3' в двуцепочечной ДНК и гидролизует одну из цепей на расстоянии 4 п.н. от узнаваемой последовательности в направлении 3'-конца [3]:



По данным авторов оперон, включающий в себя ген Nt.BstSEI, кодирует также гены двух ДНК-метилтрансфераз: *bstSEIM1* и *bstSEIM2* [25].

Позднее в разных штаммах бактерий были найдены Nt.BstNBI [26], Nt.BspD6I [10], Nt.Bst9I [27]. Эти три НЭ имеют такую же специфичность, что и Nt.BstSEI, а последовательности генов, кодирующих Nt.BstNBI и Nt.BspD6I, полностью идентичны [10]. Однако эти ферменты все же имеют отличительные черты. Так было замечено, что

Nt.Bst9I продуцируется клетками *B. stearothermophilus* 9 в больших количествах, чем Nt.BstSEI – клетками *B. stearothermophilus* SE-589, разница составляла более 16 раз [27].

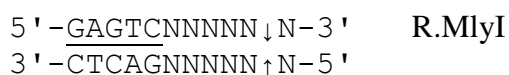
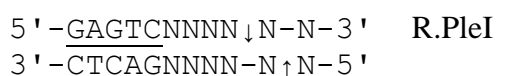
НЭ нашли широкое применение в области биотехнологий, что стимулировало создание искусственных НЭ с новой специфичностью на основе ЭР типов IIS, IIA и IIT, а также на основе «хоуминг»-эндонуклеаз семейства LAGLIDADG.

1.2. Конструирование искусственных никующих эндонуклеаз

1.2.1. Получение никующих эндонуклеаз путем нарушения димеризационного интерфейса эндонуклеаз рестрикции

Первая искусственная НЭ была получена путем нарушения димеризационного интерфейса ЭР. Хиггинс и соавт. обратили внимание на то, что аминокислотная последовательность Nt.BstNBI имеет высокую степень идентичности с двумя ЭР – PleI и MlyI, которые узнают ту же нуклеотидную последовательность, что и Nt.BstNBI (5'-GAGTC-3'/5'-GACTC-3'), и гидролизуют ДНК в стороне от участка узнавания [28].

Участок узнавания (выделен подчеркиванием) и положение фосфодиэфирных связей, которые гидролизуют R.PleI и R.MlyI (показаны стрелками):



ЭР PleI и MlyI содержат единственный каталитический центр и гидролизуют двутяжевую ДНК сначала в одной цепи и только затем расщепляют вторую цепь [28], причем эффективность гидролиза первой цепи намного выше, чем второй. Было выяснено, что в растворе все три фермента существуют в виде мономеров, но R.MlyI (для R.PleI не показано) при связывании с ДНК димеризуется, тогда как Nt.BstNBI остается в мономерной форме. На основании этих данных авторы пришли к заключению, что внесение первого разрыва R.MlyI в ДНК может происходить до образования димера. В результате сайт-направленного мутагенеза была сконструирована мутантная форма R.MlyI(Y491A/K494A), которая утратила способность димеризоваться и гидролизовать обе цепи ДНК, обнаруживая при этом высокую никующую активность. Этот фермент получил название N.MlyI [29]. Специфичность действия N.MlyI не отличалась от специфичности природной Nt.BstNBI.

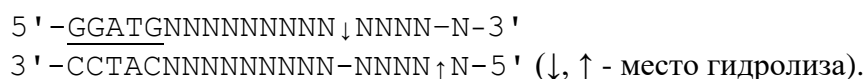
Также с помощью нарушения структуры участка R.AlwI, ответственного за димеризацию, была получена N.AlwI [30]. Близким гомологом этой гомодимерной ЭР

является Nt.BstNBI. Однако R.AlwI узнает в ДНК последовательность 5'-GGATCNNNN↓N-3'/3'-CCTAGNNNNN↑-5', отличную от участка узнавания Nt.BstNBI (5'-GAGTCNNNN↓-3'/3'-CTCAGNNNN-5'). Данные PCA о кристаллической структуре R.AlwI на сегодняшний день не получены. Однако методом PCA решена структура Nt.BspD6I, которая идентична Nt.BstNBI. Учитывая сходные участки узнавания R.AlwI и Nt.BstNBI и позиции их гидролиза, авторы предположили, что эти ферменты могут обладать сходной архитектурой [30]. На основании данного предположения в R.AlwI был заменен участок, ответственный за димеризацию, на гомологичный ему участок Nt.BstNBI. В результате был получен фермент с никующей активностью. Новая НЭ взаимодействовала с участком узнавания R.AlwI, но гидролизовала только одну цепь ДНК на расстоянии 4 нуклеотидов с 3'-конца от узнаваемой последовательности, как и Nt.BstNBI. N.AlwI – первая НЭ, сконструированная из ЭР с помощью замены участка одной белковой молекулы на гомологичный участок из другой молекулы [30].

Полученные результаты показали, что с помощью методов белковой инженерии можно кардинально менять свойства ЭР, расщепляющих ДНК на некотором расстоянии от участка узнавания. Однако для таких манипуляций важно иметь данные о пространственной структуре ферментов.

1.2.2. Получение никующих эндонуклеаз на основе гомодимерных эндонуклеаз рестрикции, содержащих один каталитический центр в каждой субъединице

Детальный механизм действия R.FokI подтипа IIS, описанный в работе [31], позволил создать на ее основе ферменты с никующей активностью в результате замены функционально важных а.о. R.FokI узнаёт последовательность 5'-GGATG-3'/3'-CCTAC-5' в двуцепочечной ДНК и гидролизует «верхнюю» цепь на расстоянии 9 п.н. в направлении 3'-конца, а «нижнюю» цепь – на расстоянии 13 п.н. с 5'-конца от участка узнавания:



R.FokI содержит ДНК-связывающий и неспецифический ДНК-гидролизующий домены. Фермент представляет собой мономер в растворе и в виде мономера связывается с ДНК. После связывания первого мономера с участком узнавания происходит связывание второго мономера R.FokI за счет взаимодействия двух ДНК-гидролизующих доменов. ДНК-связывающий домен второго мономера при этом может находиться либо в растворе, либо быть связанным с другим участком узнавания в ДНК [32]. Координированное действие двух белковых молекул приводит к внесению двуцепочечного разрыва в ДНК [33]. Показано, что мономер, связывающийся первым с участком узнавания, вносит

одноцепочечный разрыв в «нижнюю» цепь ДНК, а второй мономер – в «верхнюю» цепь ДНК [34].

Было установлено, что замены N13Y и D450A в молекуле R.FokI приводят к потере ДНК-связывающей и ДНК-гидролизующей активностей, соответственно. Смешивание мутантной формы R.FokI(N13Y/D450A) с исходным ферментом (wtFokI) в эквимольном количестве приводит к образованию димеров, в котором каталитической активностью обладает только одна молекула R.FokI, вносящая одноцепочечный разрыв в «нижнюю» цепь ДНК-дуплекса (рис. 1.2, Б) [34]. Однако гидролиз «верхней» цепи все же происходит в результате активности димеров, образовавшихся из двух молекул wtFokI (рис. 1.2, А). При добавлении двух мутантных форм R.FokI в реакционную смесь, одна из которых несет мутацию в ДНК-связывающем домене (N13Y), а другая – в ДНК-гидролизующем (D450A), происходит гидролиз только «верхней» цепи ДНК-субстрата (рис. 1.2, В). В этом случае такой димер R.FokI также представляет собой НЭ.

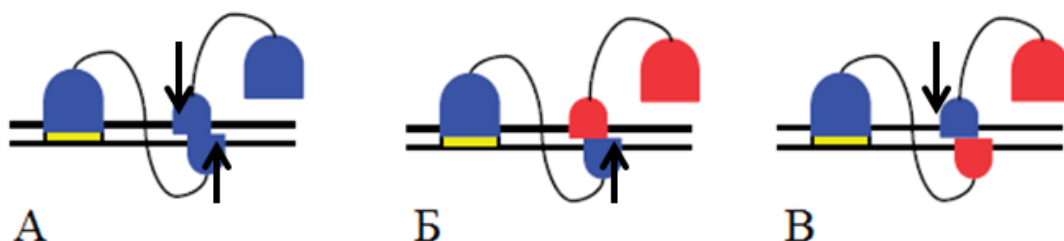


Рис. 1.2. Схематическое изображение димеров R.FokI, состоящих из двух активных молекул wtFokI (изображены синим цветом, А), из активной молекулы wtFokI и мутантной неактивной формы FokI(N13Y/D450A) (изображена красным цветом, Б), из мутантных форм FokI(N13Y) и FokI(D450A) (домены с заменой выделены красным цветом, В). Стрелки указывают на гидролиз ДНК. Адаптировано из [34].

1.2.3. Получение никующих эндонуклеаз путем инактивации одного из каталитических центров эндонуклеаз рестрикции

В гетеродимерных ЭР BspD6I, BstNBI, BtsI, BsrDI, как было сказано выше, большая субъединица в отсутствие малой проявляет никующую активность. Экспрессируя, например, ген большой субъединицы (Nb.BtsI) отдельно от гена малой субъединицы гетеродимерной R.BtsI, можно получить НЭ, которая будет гидролизовать «нижнюю» цепь ДНК-субстрата. Кроме того, была сконструирована Nt.BtsI из R.BtsI. Для этого заменяли остатки каталитического центра большой субъединицы R.BtsI. Комплекс малой субъединицы и инактивированной таким образом большой субъединицы ЭР гидролизовал «верхнюю» цепь ДНК-субстрата [35].

Помимо перечисленных гетеродимерных ЭР существуют другие гетеродимерные ЭР, такие как Bvu10I, BbvCI, каждая из субъединиц которых отдельно не способна гидролизовать ДНК. Смесь двух субъединиц расщепляет обе цепи ДНК [36]. В результате замены отдельных аминокислотных остатков инактивировали каталитический центр одной из субъединиц, получив таким образом ферменты с нулевой активностью [37], [38].

Так, в работе [38] описывается превращение гетеродимерной R.BbvCI, впервые обнаруженной в организме *Bacillus brevis*, в две сайт-специфические НЭ.

R.BbvCI функционирует в виде двух субъединиц (R_1 , R_2), каждая из которых содержит по одному каталитическому центру и кодируется своим геном. Субъединицы R.BbvCI, а также две С5-цитозиновые МТазы, кодируемые двумя предшествующими генами, образуют систему Р-М бактерии *Bacillus brevis* (рис. 1.3). Интересной особенностью R.BbvCI является то, что она «симметрично» катализирует гидролиз внутри асимметричной нуклеотидной последовательности ДНК 5'-CC↓TCAGC-3'/3'-GGAGT↑CG-5'.



Рис. 1.3. Генетическая организация системы Р-М BbvCI.

Были получены мутантные формы гетеродимерной R.BbvCI, содержащие замены аминокислот в каталитическом центре одной из субъединиц, из которых было выбрано два варианта ($R_1(E167G)+R_2(wt)$ и $R_2(E177G)+R_1(wt)$, R_1 и R_2 – две субъединицы R.BbvCI). Полученные ферменты катализировали гидролиз ДНК с образованием в большей степени продукта с одноцепочечным разрывом, чем с двуцепочечным, хотя скорость реакции гидролиза была значительно меньше, чем у природного фермента. Замена остатка глутаминовой кислоты на глицин меняет заряд белка. В результате, как считают авторы [39], замедляется стадия диссоциации комплекса фермента с продуктом гидролиза. Таким образом, поочередным инактивированием каталитического центра каждой субъединицы гетеродимерной R.BbvCI авторам удалось получить НЭ.

НЭ также были сконструированы в результате «выключения» путем аминокислотных замен одного из двух каталитических центров мономерных ЭР, таких как Mva1269I, BsmI, BtsCI [24], [40], [41]. Мутантная форма R.BtsCI(D121A/E128A) вносила одноцепочечный разрыв в «верхнюю» цепь участка узнавания (5'-GGATGNN↓-3'/3'-

ССТАСNN-5'), тогда как мутантные формы R.BtsCI(D388A) и R.BtsCI(E403A/E405A) – в «нижнюю цепь» в последовательности 5'-GGATG-3'/3'-ССТАС↑-5'. Полученные результаты позволили предположить, что каталитический центр в N-концевой области белка отвечает за гидролиз «нижней» цепи двуцепочечной ДНК, а каталитический центр в С-концевой области – за гидролиз «верхней» цепи [41]. Данное предположение распространяется и на ЭР, подобные R.BtsCI (R.MvaI269I, R.BsrI, R.BsmI).

В работе [41] было также предложено интересное применение R.FokI и N.BtsCI. Эти ферменты имеют один и тот же участок узнавания (5'-GGATG-3'/3'-ССТАС-5'), но гидролизуют ДНК в различных позициях относительно него, т.е. являются неоизомерами. Последовательный гидролиз плазмиды этими нуклеазами (сначала R.FokI, затем N.BtsCI) приводит к образованию длинных «липких» концов (11 или 9 нуклеотидов в зависимости от использования Nt.BtsCI или Nb.BtsCI), которые могут быть использованы в дальнейшем для сборки плазмид без ферментативного лигирования и введения флуоресцентной метки в ходе достраивания таких «липких» концов фрагментом Кленова (схема 1.1).

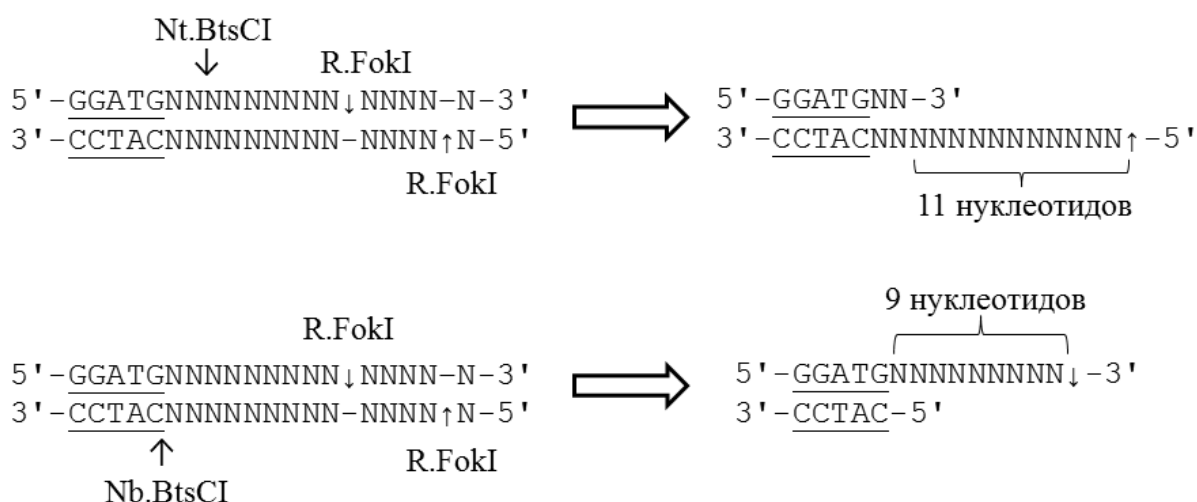


Схема 1.1

Длинные «липкие» концы также могут быть гибридизованы с биотинилированными комплементарными олигонуклеотидами, что позволит детектировать и выделять соответствующие фрагменты ДНК либо их комплексы с белком.

В отличие от большинства классических представителей ЭР типа II, существует небольшая группа ферментов, функционирующих в виде мономеров и имеющих один каталитический центр: R.MspI, R.HinP1I, R.MvaI и R.BcnI [42]. R.MspI и R.HinP1I узнают палиндромные последовательности 5'-C↓CGG-3'/3'-GGC↑C-5' и 5'-G↓CGC-3'/3'-GCG↑C-5',

соответственно. Для этих ЭР был предложен механизм последовательного гидролиза каждой из цепей. R.VcnI и R.MvaI узнают псевдопалиндромные последовательности 5'-CC↓SGG-3' (S = C или G) и 5'-CC↓WGG-3' (W = T или A), соответственно. Следовательно, эти ферменты должны «подстраиваться» под различные основания, находящиеся в середине участков узнавания.

Для R.VcnI на основании двух имеющихся кристаллических структур комплексов фермента с ДНК (PDB-коды: 2ODI и 3IMB) были определены а.о., непосредственно взаимодействующие с центральной парой оснований участка узнавания – His77, His219 и Gly217 (рис. 1.4). Посредством переноса протона между двумя гистидинами реализуются два различных набора водородных связей, осуществляемых ферментом для распознавания альтернативных пар G:C и C:G в центральной позиции участка узнавания (рис. 1.4) [42].

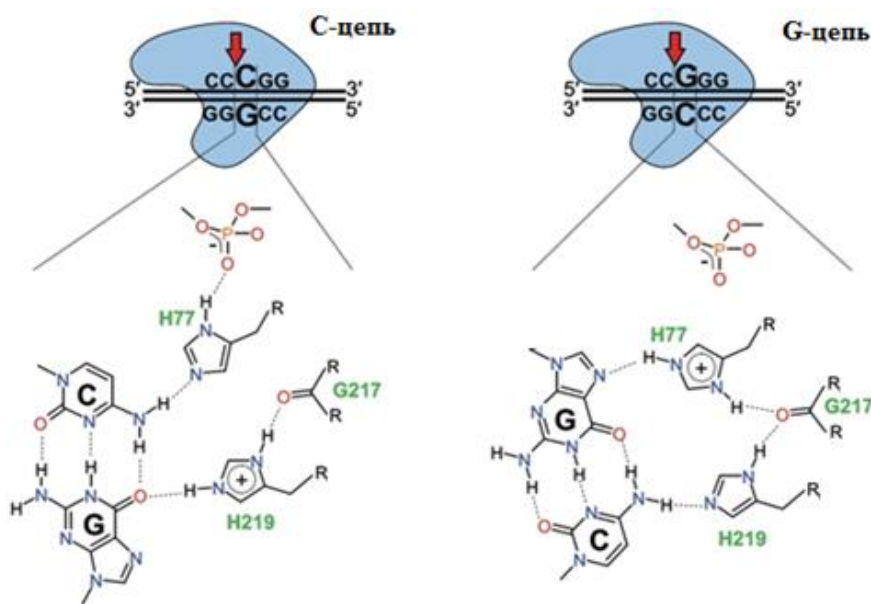


Рис. 1.4. Взаимодействие R.VcnI с центральной парой оснований в участке узнавания [42]. R – фрагменты белковой молекулы.

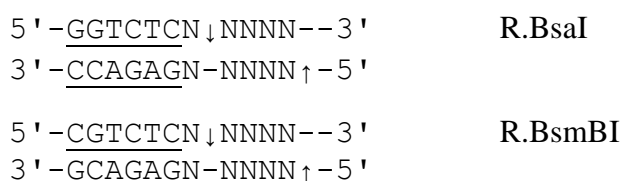
Были получены мутантные формы R.VcnI, в которых His77 или His219 (или оба остатка) были заменены на аланин, аспарагин или глутамин. Согласно данным кинетического анализа гидролиза ДНК полученными ферментами два белка – R.VcnI(H77A) и R.VcnI(H219Q), действительно, являются сайт-специфическими никующими формами R.VcnI, причем вариант H77A проявляет большую специфичность к «С-цепи», а H219Q – к «G-цепи» ДНК [42]. Авторы считают, что такой метод дизайна ферментов, вносящих одноцепочечный разрыв в ДНК, может быть применен и к другим похожим ЭР.

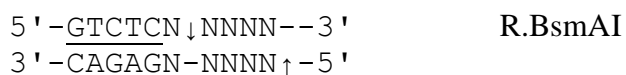
1.2.4. Получение никующих эндонуклеаз в результате случайного мутагенеза генов эндонуклеаз рестрикции

При конструировании НЭ из ЭР часто заряженные аминокислотные остатки заменяют на нейтральные остатки аланина (аланиновое сканирование). Этот метод был применен по отношению к ЭР типа IIS R.BspQI (участок узнавания 5'-GCTCTCN↓NNN-3'/3'-CGAGAAGNNNN↑-5'). На сегодняшний день данных РСА о структуре фермента не получено, однако предсказаны два возможных каталитических центра, каждый из которых осуществляет гидролиз «своей» цепи ДНК. В результате аланинового сканирования были получены мутантные формы, проявляющие никующую активность. Так, мутант R.BspQI(E172A/E248A/E255K) с тремя аминокислотными заменами проявлял преимущественно гидролитическую активность по отношению к «верхней» цепи ДНК-дуплекса и был назван Nt.BspQI. Другой мутант R.BspQI(N235A/K331A/R428A) также оказался НЭ, но по отношению к «нижней» цепи ДНК (Nb.BspQI) [43].

Конструирование искусственных НЭ возможно осуществить и на основе ЭР, для которых не решена кристаллическая структура и нет информации об активных центрах. Одним из таких примеров является создание НЭ на основе ЭР типа IIS BsaI, имеющей участок узнавания 5'-GGTCTCN↓NNNN-3'/3'-CCAGAGN-NNNN↑-5' [44]. В данном случае в ходе ПЦР был осуществлен случайный мутагенез всего гена R.BsaI. В результате была получена библиотека генов неактивной R.BsaI. На следующем этапе исходную и мутированные последовательности гена R.BsaI гидролизовали определенными эндонуклеазами рестрикции, а полученные фрагменты соединяли в различных комбинациях. Затем проводили трансформацию клеток *E. coli* сконструированными плазмидами, выращивали клеточную биомассу и проводили скрининг на присутствие НЭ в клеточных лизатах. После секвенирования клонов с никующей активностью выяснилось, что замена в R.BsaI Arg236 на Gly или Asp приводит к образованию НЭ BsaI, которая гидролизует только «верхнюю» цепь двуцепочечной ДНК (Nt.BsaI). Мутантная форма R.BsaI(N441D/R442G) также является НЭ, которая проявляет активность только по отношению к «нижней» цепи ДНК (Nb.BsaI) [44].

Известно, что ЭР BsaI, BsmBI и BsmAI имеют сходные участки узнавания ДНК и вносят разрывы в одинаковых позициях после своего участка узнавания (выделены подчеркиванием):





Данные ЭР обладают также высоким процентом сходных и идентичных а.о., что позволяет предположить и их похожую пространственную организацию. Было проведено сравнение аминокислотных последовательностей R.BsaI, R.BsmBI и R.BsmAI, на основании которого авторы решили заменить а.о. ЭР BsmBI и BsmAI, соответствующие найденным ранее ключевым а.о. R.BsaI. Так, Arg236 R.BsaI соответствует Arg233 в R.BsmBI, и полученная мутантная форма R.BsmBI(R233D) оказалась НЭ – Nt.BsmBI. Мутантные формы R.BsmBI(R438D) и R.BsmBI(R438G) по своей активности соответствовали R.BsaI(N441D/R442G), то есть являлись НЭ, гидролизующими «нижнюю» цепь ДНК-субстрата [44].

Мутантная форма R.BsmAI(R221D) вносила одноцепочечный разрыв в «верхнюю» цепь ДНК и была названа Nt.BsmAI. Предполагалось, что фермент R.BsmAI(N415D/R416G) также окажется НЭ, как и R.BsaI(N441D/R442G). Однако R.BsmAI(N415D/R416G) был способен гидролизовать ДНК как в одной, так и в обеих цепях. Для создания мутантных форм R.BsmAI, проявляющих активность только по отношению к «нижней» цепи ДНК, был проведен случайный мутагенез гена *bsmAIR*. Однако получить искомую НЭ так и не удалось. Авторы предполагают, что данный факт указывает на сложную организацию второго активного центра в R.BsmAI [44].

Примеры искусственно созданных НЭ, полученных из ЭР, представлены в таблице 1.1.

Таблица 1.1

Примеры природных НЭ и искусственно созданных НЭ, полученных из ЭР

Исходная ЭР (подтип)	Участок узнавания (5'-3'/3'-5', ↓ и ↑ – места гидролиза)	Способ получения	НЭ, ссылка
Гетеродимерные ЭР			
BtsI (IIS)	GCAAGTG-NN↓ CGTCAC↑NN	Большая субъединица – природная НЭ. Смесь инактивированной большой субъединицы и малой субъединицы – НЭ	Nt.BtsI [35]
BsrDI (IIS)	GCAATG-NN↓ CGTTAC↑NN		Nt.BsrDI [35]

BstNBI/ BspD6I (IIS)	GAGTCNNNN ↓ NN CTCAGNNNN-NN ↑	Большая субъединица – природная НЭ	Nt.BstNBI/Nt.BspD6I [10]
BbvCI (IIA)	CC ↓ TCA-GC GG-AGT ↑ CG	Инактивация каталитического центра одной из субъединиц	Nt.BbvCI, Nb.BbvCI [38]
Bpu10I (IIA)	CC ↓ TNA-GC GG-ANT ↑ CG		Nt.Bpu10I, Nb.Bpu10I [37]
Гомодимерные ЭР			
AlwI (IIS)	GGATCNNNN ↓ N CCTAGNNNN-N ↑	Замена фрагмента N- концевой области R.AlwI на гомологичный фрагмент из Nt.BstNBI	Nt.AlwI [30]
FokI (IIS)	GGATGNNNNNNNNNN ↓ NNNN CCTACNNNNNNNNNN-NNNN ↑	Комбинирование субъединиц с введенными мутациями	Nt.FokI, Nb.FokI [34]
MlyI (IIS)	GAGTCNNNN ↓ CTCAGNNNN ↑	Нарушение димеризаци- онного интерфейса	Nt.MlyI [29]
Мономерные ЭР с непалиндромным участком узнавания			
BsmI/ Mva1269I (IIS)	GAATG-CN ↓ CTTAC ↑ GN	Инактивация одного из двух каталитических центров белковой молекулы.	Nb.Mva1269I [40] Nb.BsmI [24]
BtsCI (IIS)	GGATG-NN ↓ CCTAC ↑ NN		Nt.BtsCI, Nb.BtsCI [41]
BsaI (IIS)	GGTCTCN ↓ NNNN CCAGAGN-NNNN ↑	Случайная замена а.о.	Nt.BsaI, Nb.BsaI [44]
BsmBI (IIS)	CGTCTCN ↓ NNNN GCAGAGN-NNNN ↑	Введение аминокислотных замен по аналогии с аминокислотными заменами в R.BsaI	Nt.BsmBI, Nb.BsmBI [44]
BsmAI (IIS)	GTCTCN ↓ NNNN CAGAGN-NNNN ↑		Nt.BsmAI [44]
SapI (IIS)	GCTCTTCN ↓ NNN CGAGAAGN-NNN ↑	Случайная замена а.о.	Nb.SapI, Nt.SapI [45]
BspQI (IIS)	GCTCTTCN ↓ NNN CGAGAAGN-NNN ↑	Получение мутантных форм с тремя заменами а.о. в ходе аланинового	Nt.BspQI, Nb.BspQI [43]

		сканирования	
Мономерные ЭР с палиндромным участком узнавания			
R.BcnI (ИР)	CC↓S-GG GG-S↑CC	Направленная замена аминокислотных остатков	Nt.BcnI, Nb.BcnI [42]

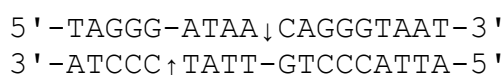
1.2.5. Получение никующих эндонуклеаз из «хоуминг»-эндонуклеаз

«Хоуминг»-эндонуклеазы являются высокоспецифичными нуклеазами и кодируются открытыми рамками считывания, которые располагаются в составе интронов других генов либо в составе интеинов. Они были обнаружены во всех биологических царствах. Эти ферменты узнают протяженные участки ДНК длиной 14-40 п.н. и гидролизуют обе цепи двутяжевой ДНК или одну из них. Вносимый «хоуминг»-эндонуклеазами разрыв в ДНК инициирует рекомбинацию между аллелью, не содержащей интрон или интеин, с гомологичным участком ДНК, который содержит соответствующие элементы [46]. «Хоуминг»-эндонуклеазы обычно разделяют на 4 семейства в зависимости от структурного мотива или последовательности а.о. в каталитическом центре, присутствующих во всех представителях семейства: $\beta\beta\alpha$ -Me²⁺ (это семейство включает в себя HNH-«хоуминг»-эндонуклеазы и гистидин-цистеиновые «хоуминг»-эндонуклеазы), GIY-YIG, LAGLIDADG и PD-(D/E)XK [24].

Большинство «хоуминг»-эндонуклеаз вносят двуцепочечный разрыв в ДНК, однако на их основе также можно конструировать НЭ, например, путем инактивации одного из каталитических центров фермента в результате введения аминокислотных замен.

Семейство эндонуклеаз LAGLIDADG (название состоит из однобуквенных обозначений консервативных а.о.) – самое большое и хорошо изученное среди «хоуминг»-эндонуклеаз. Для целей генной инженерии часто используются «хоуминг»-эндонуклеаза I-SceI, которая была обнаружена в митохондриях дрожжей *S. cerevisiae*, I-CreI, обнаруженная в хлоропластах зеленой водоросли *C. reinhardtii*, и I-DmoI, найденная в архее *D. mobilis* [47]. На основе «хоуминг»-эндонуклеазы I-SceI была получена НЭ.

I-SceI кодируется интроном, входящим в состав гена 21S митохондриальной РНК в *S. cerevisiae*. I-SceI представляет собой мономерную «хоуминг»-эндонуклеазу, которая узнает в ДНК асимметричную последовательность из 18 п.н. и вносит в нее двуцепочечный разрыв (позиции гидролиза отмечены стрелками):



В одной молекуле I-SceI содержатся два симметрично расположенных каталитических центра, а гидролиз двух цепей ДНК является двухстадийным процессом, причем в первую очередь предпочтительно происходит гидролиз «нижней» цепи [48].

Для получения НЭ остаток Lys122 или остаток Lys223, симметрично расположенные на периферии каталитических центров и участвующие в координации молекул воды, были заменены на остатки изолейцина. Это привело к значительному снижению эффективности гидролиза «верхней» или «нижней» цепи участка узнавания, соответственно.

Еще одним подобным примером является создание НЭ из мономерной «хоуминг»-эндонуклеазы I-AniI, также принадлежащей к семейству LAGLIDADG [49]. I-AniI узнает в ДНК асимметричную 19-звенную последовательность. Основными кандидатами для сайт-направленного мутагенеза были остатки Lys94 в N-концевом домене фермента и Gln171 или Lys227 в C-концевом (рис. 1.5). В случае замены K227M фермент (1 мкМ) проявлял никующую активность: 99% плазмиды, использованной в качестве субстрата, превратилось в продукт с разрывом в одной цепи после инкубации в течение 2 ч. При этом линейаризованной формы плазмиды не наблюдалось даже после продолжительной инкубации.

Полученная НЭ была способна стимулировать коррекцию нужного гена в результате гомологичной рекомбинации, что представляет большой интерес для целей генной терапии (см. раздел 1.6.3).

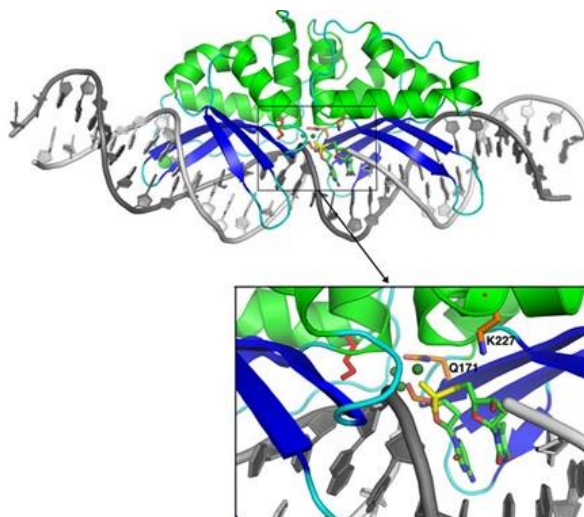


Рис. 1.5. Конструирование НЭ I-AniI за счет введения аминокислотных замен. Пространственная структура wt I-AniI в комплексе с ДНК-субстратом (вверху). Каталитически важные а.о. Gln171 и Lys227, расположенные на периферии активного центра (внизу) [49].

1.3. Стимулирование матрично-независимого синтеза ДНК никующими эндонуклеазами

Некоторыми авторами было замечено, что термофильные ДНК-полимеразы способны синтезировать двуцепочечную ДНК только в присутствии свободных dNTP без добавления какой-либо матрицы (*ab initio* синтез ДНК), причем синтезированная таким образом ДНК состоит из многочисленных повторяющихся элементов [50]. Добавление в реакционную смесь термофильной ЭР или НЭ значительно стимулировало синтез ДНК *ab initio*, а также влияло на нуклеотидную последовательность синтезируемого продукта. Показано, что Nt.AlwI, Nb.BbvCI и Nb.BsmI, имеющие непалиндромный участок узнавания ДНК, стимулировали синтез палиндромных последовательностей. Замечено, что последовательность таких палиндромных повторяющихся элементов зависит от природного участка узнавания добавленной ЭР или НЭ. Например, присутствие в реакционной смеси Nb.BbvCI стимулировало синтез палиндромных ДНК, содержащих повторяющиеся два участка узнавания этой НЭ, разделенные АТ-богатыми повторами [50]. Вероятно, ЭР или НЭ способны координировать в своем ДНК-связывающем центре свободные dNTP в таком же порядке, в каком они «считываются» ферментом в ДНК-субстрате. Присутствующая в растворе ДНК-полимераза при этом способна лигировать нуклеотиды между собой.

Следует отметить, что феномен матрично-независимого синтеза ДНК был также продемонстрирован на примере R.Tsp509I (участок узнавания: 5'-ААТТ-3'/3'-ТТАА-5') и R.TspRI (участок узнавания: 5'-CASTG-3'/3'-GTSAC-5', S – G или C) в присутствии Vent ДНК-полимеразы [51]. Более 10 мкг ДНК может быть синтезировано ДНК-полимеразой (1 ед. акт.) в течение 1 ч. Причем реакция продолжается до тех пор, пока в смеси есть свободные dNTP. В данном случае в каждом повторяющемся мотиве синтезированной ДНК также содержались один либо два участка узнавания использованных ЭР.

Термофильная НЭ VspD6I также способна стимулировать матрично-независимый синтез ДНК в присутствии большого фрагмента Bst ДНК-полимеразы [52]. При инактивации НЭ VspD6I в процессе нагревания реакционной смеси матрично-независимый синтез ДНК ингибировался. Секвенирование синтезированных фрагментов ДНК показало, что они состояли в основном из повторяющейся гексануклеотидной последовательности, включающей в себя участок узнавания НЭ VspD6I. По-видимому, НЭ VspD6I способна каким-то образом координировать свободные dNTP в своем ДНК-связывающем центре и таким образом стимулировать синтез ДНК *ab initio*. Такой побочный процесс матрично-независимого синтеза ДНК может приводить к появлению неспецифических продуктов в реакциях амплификации ДНК, особенно с участием НЭ. В

связи с этим поиск путей ингибирования синтеза ДНК *ab initio* является актуальной задачей. В работе [53] изучено влияние добавления в реакционную смесь белков бактериофага Т4, способных связывать одноцепочечную ДНК. Показано, что в отсутствие НЭ такие белки полностью подавляют матрично-независимый синтез ДНК. В присутствии НЭ белки бактериофага Т4 не ингибируют специфический синтез ДНК, но значительно снижают накопление неспецифических продуктов.

Механизм данного явления до конца не изучен, так как известно, что термофильные ДНК-полимеразы сами по себе способны проводить матрично-независимый синтез ДНК *de novo* [54] – [55]. Однако можно предположить, что связывание НЭ в комплекс с негидролизуемыми аналогами субстрата способно снизить такую активность фермента.

1.4. Практическое использование сайт-специфических никующих эндонуклеаз

1.4.1. Изотермическая амплификация ДНК

Открытие НЭ позволило усовершенствовать или упростить некоторые уже существующие методы молекулярной биологии, такие как изотермическая амплификация ДНК с замещением цепи [4], сайт-специфический мутагенез [6], мечение ДНК [56] и РНК [57].

На основе НЭ предложен метод изотермической амплификации 8–16-звенных олигодезоксирибонуклеотидов [4]. Он схематично изображен на рис. 1.6. Дуплекс имеет в своем составе участок узнавания Nt.BstNBI. После расщепления одной цепи дуплекса НЭ фрагмент олигонуклеотида, не содержащего участок узнавания, диссоциирует, так как его температура плавления ниже температуры, при которой идет реакция (55°C). В то же время присутствующая в реакции ДНК-полимераза, используя появившийся после гидролиза НЭ свободный 3'-конец оставшегося олигонуклеотида на ДНК-матрице, снова начинает синтез короткого олигонуклеотида. Как только ДНК-полимераза достроит недостающий фрагмент, НЭ снова вносит разрыв во вновь синтезированную цепь. Этот процесс многократно повторяется, что обеспечивает синтез большого количества олигонуклеотида нужной длины.

Учитывая чувствительность данного метода (удаётся синтезировать 10^6 копий олигонуклеотида), его предлагают применять для обнаружения малых количеств геномной ДНК, и в тех случаях, где сейчас применяется ПЦР в реальном времени [4].

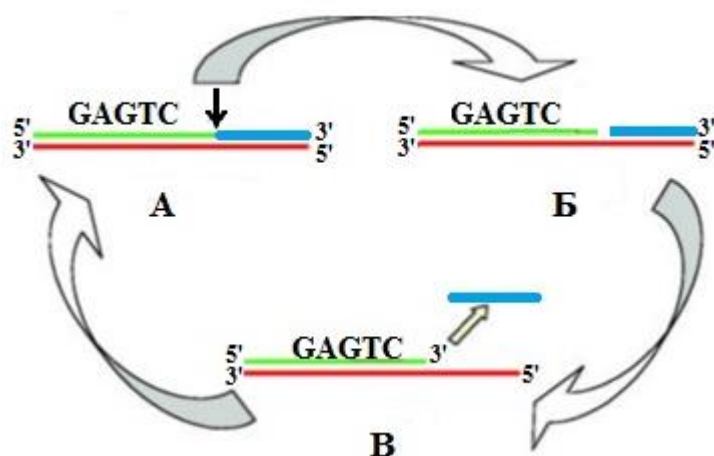


Рис. 1.6. Принцип метода изотермической амплификации 12-звенного олигодезоксирибонуклеотида (выделен голубым цветом). **А** – ДНК-дуплекс содержит участок узнавания Nt.BstNBI, позиция гидролиза указана стрелкой. **Б** – НЭ гидролизует «верхнюю» цепь ДНК-дуплекса. **В** – 12-звенный олигонуклеотид диссоциирует, освобождая 3'-ОН группу, к которой ДНК-полимераза достраивает «верхнюю» цепь ДНК-дуплекса [4].

Для детекции геномной ДНК используется следующий вариант описанного метода (рис. 1.7). В пробу с одноцепочечной геномной ДНК необходимо добавлять комплементарный олигонуклеотид, содержащий одну из цепей участка узнавания НЭ (рис. 1.7, выделен зеленым цветом). После стадии гибридизации в смесь добавляют НЭ, которая вносит одноцепочечный разрыв. Далее цикл проводят по описанной выше схеме. Благодаря накоплению продукта 2 (выделен синим цветом) удастся детектировать исходную ДНК, находящуюся в пробе в следовом количестве.

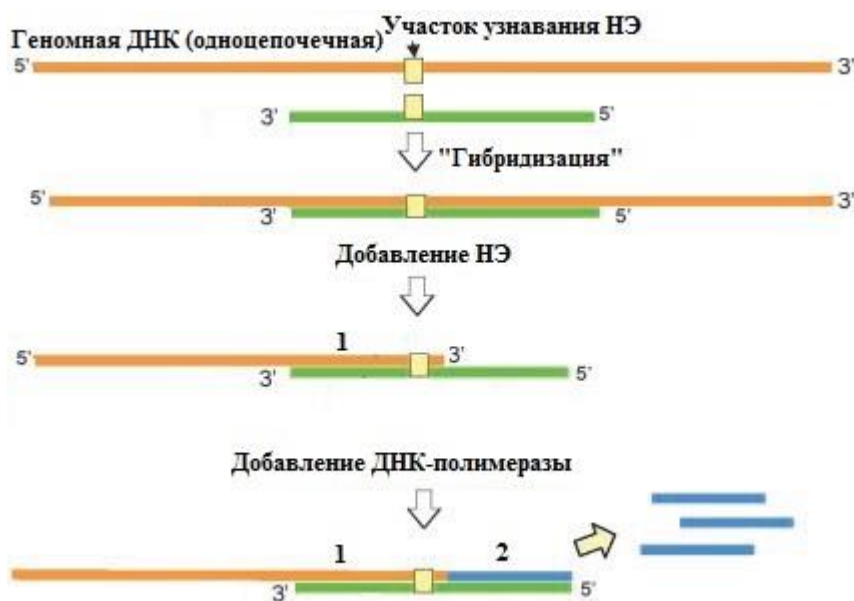


Рис. 1.7. Принцип метода изотермической амплификации, используемый для детекции геномной ДНК [4].

Для получения более протяженной ДНК (до 1000 нуклеотидов) был разработан метод изотермической амплификации ДНК с вытеснением цепи – SDA (англ. «strand displacement amplification»). Принцип этого метода аналогичен описанному выше: НЭ в ходе реакции также вносит одноцепочечный разрыв в ДНК-дуплекс. Однако в случае протяженного участка ДНК при температуре проведения реакции диссоциации ДНК-дуплекса не происходит. Поэтому в данном подходе используют ДНК-полимеразу с цепь-вытесняющей активностью (например, большой фрагмент Bst ДНК-полимеразы, ДНК-полимеразу U29, ДНК-полимеразу Sequenase версии 2.0). Такие ДНК-полимеразы способны вытеснять одну из цепей дуплекса, благодаря чему происходит синтез протяженного фрагмента ДНК [58].

1.4.2. Способы детекции ДНК с использованием никующих эндонуклеаз

В работе [59] был разработан метод детекции ДНК в реакции, протекающей при постоянной температуре (55°C), который получил название NMB-анализ (англ. «nickase-molecular beacon analysis»).

Молекулярные биконы – это ДНК- или РНК-зонды, которые способны флуоресцировать при гибридизации с комплементарной последовательностью. Молекулярный бикон является олигонуклеотидом, который в свободном состоянии представляет собой шпильку с петлей (рис. 1.8). При этом последовательность участка ДНК-мишени комплементарна последовательности петли бикона. Молекулярный бикон содержит на одном конце флуорофор (флуоресцентную метку), а на другом – тушитель флуоресценции. При существовании шпильчатой структуры бикона флуорофор и тушитель флуоресценции находятся в непосредственной близости друг от друга, вследствие чего происходит тушение флуоресценции [59]. При взаимодействии бикона с одноцепочечной ДНК-мишенью образуется двуцепочечный участок, НЭ гидролизует молекулярный бикон, который распадается на два одноцепочечных фрагмента. Образовавшиеся фрагменты отделяются от ДНК-мишени, если температура плавления дуплекса, который они формируют с ДНК, ниже, чем температура протекания реакции (55°C). Таким образом, происходит разобщение флуорофора и тушителя в пространстве, что ведет к появлению сигнала флуоресценции. Мишень, освобожденная от фрагментов, может гибридизоваться со следующим молекулярным биконом. Следовательно, процесс гидролиза бикона может повторяться много раз на одной мишени, обеспечивая усиление сигнала флуоресценции [59].

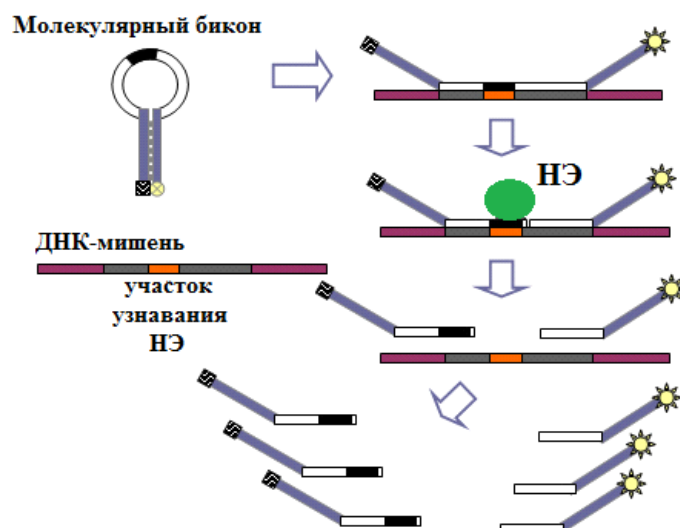


Рис. 1.8. Принцип метода NMB-анализа [59].

Для высокочувствительной детекции специфической последовательности ДНК были разработаны многочисленные подходы [60] – [63]. Особое внимание уделяется электрохимическим методам [64] – [65], т.к. они обладают такими преимуществами, как простота, низкая себестоимость и возможность применения в различных областях. В качестве примера рассмотрим метод детекции ДНК, описываемый Чен и соавт. [66]. Его принцип показан на рис. 1.9.

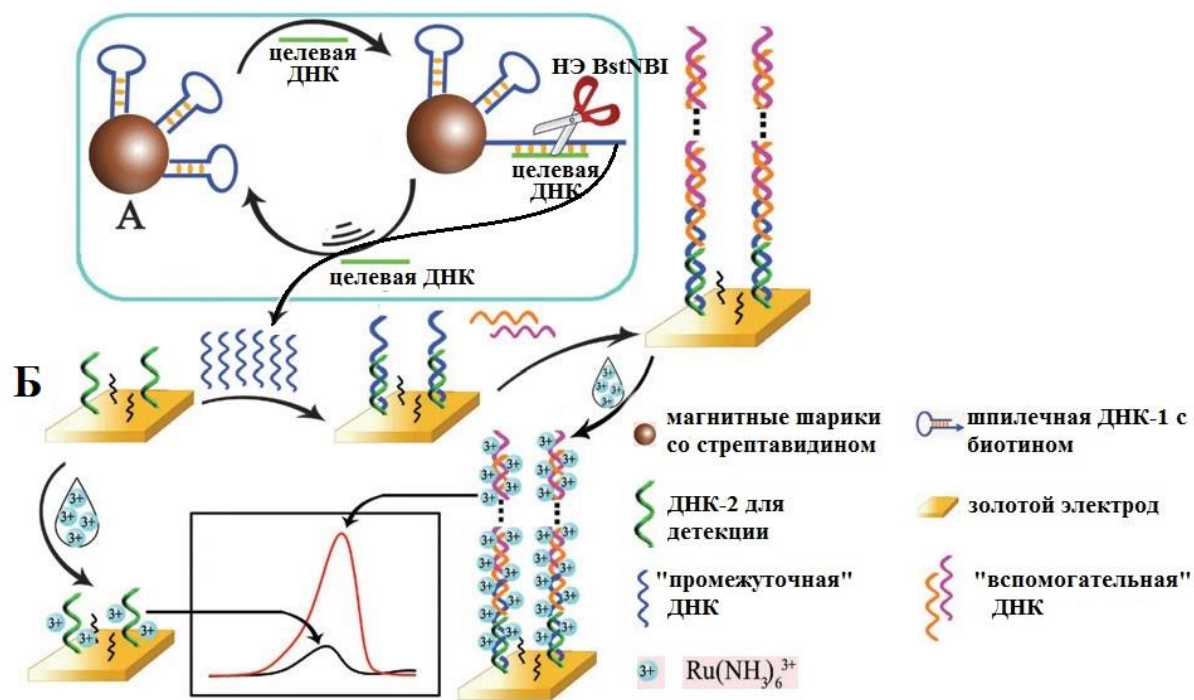


Рис. 1.9. Принцип электрохимического метода детекции ДНК, основанный на использовании НЭ BstNBI [66].

На первом этапе шпилечная ДНК, закрепленная на магнитном шарике, взаимодействует с целевой ДНК и образует ДНК-дуплекс, в котором содержится участок узнавания НЭ BstNBI. Данный фермент вносит разрыв в одну из цепей получившегося дуплекса, высвобождая тем самым одноцепочечную «промежуточную» ДНК (рис. 1.9, А). Целевая же ДНК при этом диссоциирует из комплекса с ферментом в неизменном виде и может дальше участвовать в цикле детекции, что значительно повышает уровень чувствительности метода. Последовательность «промежуточной» ДНК подобрана таким образом, что она способна образовывать ДНК-дуплекс с иммобилизованной на золотом электроде ДНК-2 на следующем этапе детекции (рис. 1.9, Б). В растворе также присутствует «вспомогательная» ДНК, которая частично комплементарна «промежуточной» ДНК. За счет взаимодействия «вспомогательной» и «промежуточной» ДНК происходит дальнейшее удлинение ДНК-дуплекса.

В получившийся протяженный ДНК-дуплекс за счет электростатического взаимодействия встраиваются частицы $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, благодаря которым генерируется электрохимический сигнал. Так как в качестве сигнальной молекулы используются $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, этот метод не требует трудоемкого мечения молекул, участвующих в процессе детекции. Многократное усиление сигнала происходит как в результате действия НЭ BstNBI, так и за счет формирования протяженных ДНК-ассоциатов, благодаря чему минимальное количество детектируемой ДНК составляет 0,36 фМ. Данный метод оказался также высокоспецифичным: при использовании в качестве детектируемой ДНК фрагмента, отличающегося всего одним нуклеотидом от целевой ДНК, получаемый электрохимический сигнал оказывался в несколько раз слабее и по уровню был сопоставим с сигналом от неспецифической ДНК.

1.4.3. Перемещение олигодезоксирибонуклеотида

В работе Баса и соавт. [7] была продемонстрирована возможность с использованием НЭ перемещать олигонуклеотид (рис. 1.10). Перемещаемый олигонуклеотид («груз») содержит в своем составе узнаваемую НЭ последовательность. В основе метода лежит гидролиз ДНК НЭ (N.BbvCIB). Путь, по которому перемещается «груз», состоит из «статоров» – олигонуклеотидов, к которым может гибридизоваться «груз» и которые в свою очередь гибридизованы на ДНК-матрице. В момент гибридизации «груза» со «статором» образуется двутяжевая ДНК, которую узнает N.BbvCIB, и вносится разрыв в последовательность «статора». В результате гидролиза фрагмент «статора» диссоциирует, и стабильность образовавшегося ДНК-дуплекса понижается. Затем «груз» гибридизуется

к следующему «статору», и цикл повторяется. «Груз» может перемещаться только вперед, так как предыдущие «статоры» уже расщеплены НЭ. Данный процесс может быть остановлен в любом месте пути при помощи модификации нужного «статора» в участке узнавания N.BbvC1B. Скорость перемещения олигонуклеотида составила 1 Å в секунду. Авторы предполагают, что такой линейный мотор может быть использован при решении определенных задач нанотехнологий [7].

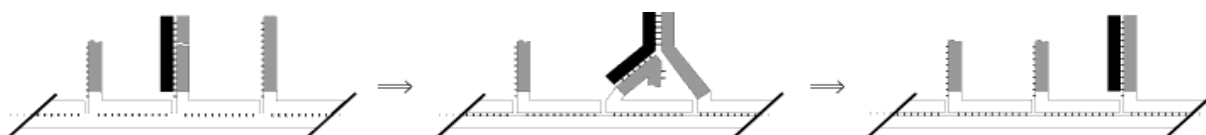


Рис. 1.10. Молекулярный мотор, который передвигает олигонуклеотид (показан черным цветом) вдоль пути из «статоров» (показаны серым) под действием гидролиза N.BbvC1B [7].

1.4.4. Клонирование фрагментов ДНК без использования ДНК-лигаз

Для решения биотехнологических задач необходимо располагать эффективными методами манипуляции с большими фрагментами ДНК. Традиционные методы клонирования основаны на использовании ЭР и ДНК-лигаз. Обычно при клонировании ПЦР-фрагментов в последовательность праймеров закладывают участки узнавания ЭР. После амплификации ПЦР-продукт и вектор гидролизуют соответствующими эндонуклеазами. В результате образуются «липкие» концы от 1 до 4 нуклеотидных звеньев длиной. С помощью ДНК-лигазы соединяют вектор и вставку. Однако такой подход на практике часто оказывается трудоемким и не всегда эффективным. В последнее время было разработано несколько методов, не использующих ферментативную активность ДНК-лигаз. Принцип методов LIC (от англ. «Ligation-Independent Cloning») основан на сборке ДНК-фрагментов с длинными «липкими» одноцепочечными концами. Существует несколько вариаций методов LIC: основанные на использовании активности T4 ДНК-полимеразы [67], рекомбинантное клонирование Gateway [68], клонирование «In-Fusion» [69]. При использовании НЭ такой метод называется NE-LIC (от англ. Nicking Endonucleases) [5]. В последовательность праймеров включают участок узнавания НЭ, которая гидролизует ДНК на некотором расстоянии от него. При гидролизе НЭ образуется ДНК-фрагмент с выступающими протяженными концами. Это позволяет избежать лигирования, достаточно провести гибридизацию «липких» концов вектора и вставки. Соединение концов фрагментов ДНК осуществляет клеточная лигаза после попадания ДНК в клетку.

1.4.5. Детекция РНК с использованием никующих эндонуклеаз

На использовании принципа тушения–разгорания флуоресценции основан метод детекции РНК с использованием НЭ (рис. 1.11) [57]. Для реализации метода синтезируют два вида олигодезоксирибонуклеотидов: Л-ДНК (от англ. “Loop”), имеющую форму шпильки с петлей, и комплементарный ей зонд (11-15 нуклеотидов). Л-ДНК имеет на 5'-конце одноцепочечный участок, комплементарный детектируемой РНК. Кроме того, у Л-ДНК есть комплементарный участок и зонду, но он образует в Л-ДНК двутяжевую структуру шпильки.



1. Гибридизация Л-ДНК



Рис. 1.11. Схема метода детекции РНК с использованием Nb.BbvCI [57].

Одноцепочечный зонд содержит последовательность участка узнавания и участок гидролиза Nb.BbvCI. На 5'- и 3'-концах зонда располагаются флуорофор и тушитель флуоресценции, соответственно, поэтому в начальном состоянии (когда флуорофор и тушитель сближены) зонд не флуоресцирует. При гибридизации Л-ДНК на молекуле РНК двутяжевой участок шпильки диссоциирует, и зонд, в свою очередь, гибридизуется на Л-ДНК. Таким образом, образуется двуцепочечный участок узнавания Nb.BbvCI, который она способна гидролизовать. В итоге ДНК-зонд расщепляется, происходит пространственное разобщение флуорофора и тушителя (рис. 1.11). Таким образом, можно детектировать РНК по флуоресценции гидролизованного ДНК-зонда. Преимущество

этого метода состоит в том, что отсутствует необходимость предварительного выделения РНК из клетки.

1.4.6. Введение модификаций во внутренние участки ДНК с использованием нуклеиновых эндонуклеаз

На сегодняшний день для решения биотехнологических задач, таких как визуализации взаимодействующих молекул и при изучении супрамолекулярных комплексов, необходимо располагать методами, которые позволяют вводить несколько различных модификаций в определенные участки молекул, в том числе и в ДНК. Введение модификаций (флуоресцентных меток, остатков биотина и др.) на концы длинных линейных фрагментов ДНК обычно осуществляется в ходе ПЦР с праймерами, несущими в своем составе нужную модификацию, либо при достраивании «липких концов» фрагментом Кленова [70]. С помощью терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы можно ввести модифицированные нуклеотиды на 3'-конец любых молекул ДНК или РНК [71]. Однако мечение протяженных молекул ДНК, особенно их неконцевых участков, может быть затруднительным.

Одним из способов введения модификации в центральную часть протяженных молекул ДНК является ник-трансляция. На первом этапе используют ДНК-лигазу, которая «сшивает» все существующие одноцепочечные разрывы в ДНК, если таковые имеются (рис. 1.12, стадия 1). Затем НЭ специфически вносит одноцепочечный разрыв в ДНК (стадия 2), который служит стартовой точкой для работы ДНК-полимеразы с экзонуклеазной или цепь-вытесняющей активностью. В процессе синтеза новой цепи (стадия 3) полимеразы включает в состав ДНК меченые нуклеотиды, находящиеся в растворе, а первоначальный «ник» перемещается вдоль цепи ДНК в направлении 5'→3'. Для того чтобы контролировать процесс ник-трансляции, в реакционную смесь добавляются дидезоксирибонуклеозидтрифосфаты, терминирующие синтез ДНК, а их концентрация определяет длину синтезируемой ДНК [72]. В результате ник-трансляции можно получить радиоактивно- и флуоресцентно меченую ДНК, а также конъюгаты ДНК с другими молекулами, например, с биотином [73].

Однако в ходе ник-трансляции достаточно сложно подобрать условия, в которых ДНК-полимеразы будет включать модифицированные нуклеотиды в строго определенную позицию.

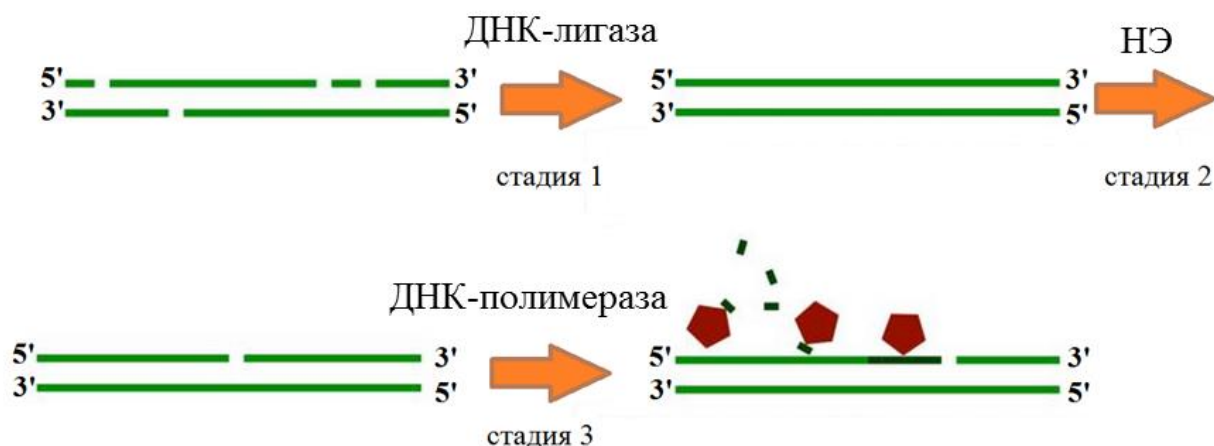


Рис. 1.12. Принцип метода ник-трансляции. Пятиугольники обозначают любой тип модифицированных нуклеотидов, которые ДНК-полимераза способна включить в ДНК в процессе синтеза [72].

В работе [56] был предложен способ специфического введения модификаций с использованием Nt.BbvCI. Основным требованием этого подхода является наличие в целевой ДНК (плазмиде) нескольких участков узнавания НЭ, расположенных в одном направлении и близко друг от друга. В случае отсутствия такого участка необходимо предварительно встроить его в целевую ДНК. Внесение одноцепочечных разрывов в ДНК НЭ приводит к образованию нескольких коротких одноцепочечных фрагментов, которые легко диссоциируют при повышении температуры, образуя протяженный одноцепочечный участок в исходной ДНК (рис. 1.13). На следующем этапе более протяженный олигонуклеотид (63-звенный), находящийся в реакционной смеси и имеющий в своем составе необходимые модификации, при понижении температуры реакции будет «отжигаться» на целевой ДНК. Большая длина вставляемого олигонуклеотида по сравнению с короткими фрагментами обеспечивает его более раннюю ассоциацию с исходной ДНК (благодаря высокой температуре плавления образующегося дуплекса). Наличие 5'-фосфатной группы в модифицированном олигонуклеотиде позволяет провести дальнейшее лигирование этого фрагмента с исходной плазмидой.

Преимуществом данного подхода является возможность специфического введения модификаций в протяженную ДНК, причем модификации могут быть разного типа и вводиться на большом расстоянии друг от друга [56]. Для последнего случая необходимо сконструировать ДНК-субстрат с несколькими областями, содержащими участки узнавания НЭ в одной ориентации. В рамках данного подхода возможно и введение модификаций в обе цепи одного участка ДНК. Для этого необходимо располагать парой НЭ, имеющих один и тот же участок узнавания, но вносящих разрывы в разные цепи ДНК.

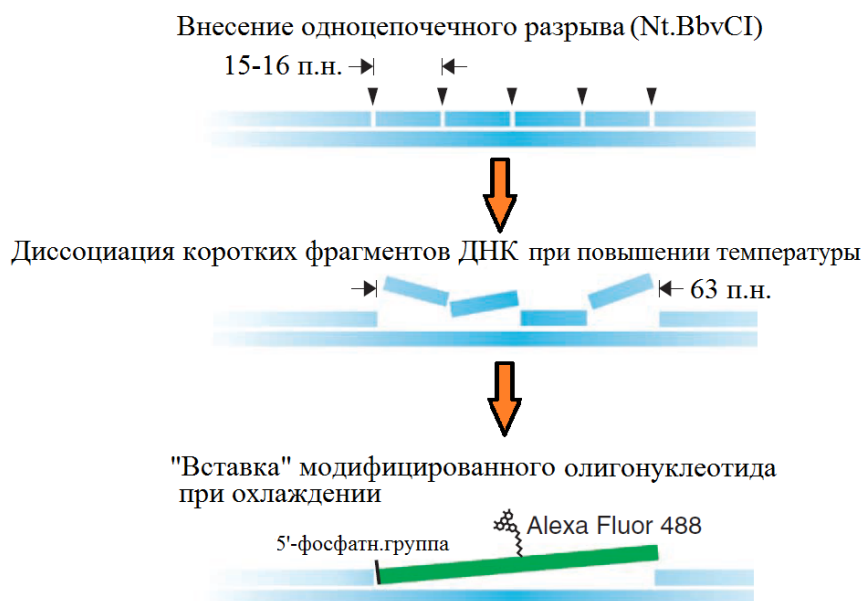


Рис. 1.13. Принцип введения модификаций во внутренние участки ДНК с использованием НЭ [56].

С помощью НЭ был также разработан метод создания модифицированных кольцевых ДНК-субстратов [6]. Этот метод имеет ряд преимуществ перед имеющимися. Среди них – простота выполнения и высокий выход целевого продукта. Все этапы создания ДНК протекают в одних и тех же буферных растворах, в которых используемые ДНК-связывающие ферменты проявляют высокую активность и специфичность действия. Этот метод был использован для изучения функционирования системы репарации ДНК-«мисматчей» (MMR) *E. coli*, в ходе которого были созданы кольцевые ДНК-субстраты, несущие неканоническую пару G/T и монометилированную последовательность 5'-GATC-3'/3'-CTm⁶AG-5' [74] (рис. 1.14).

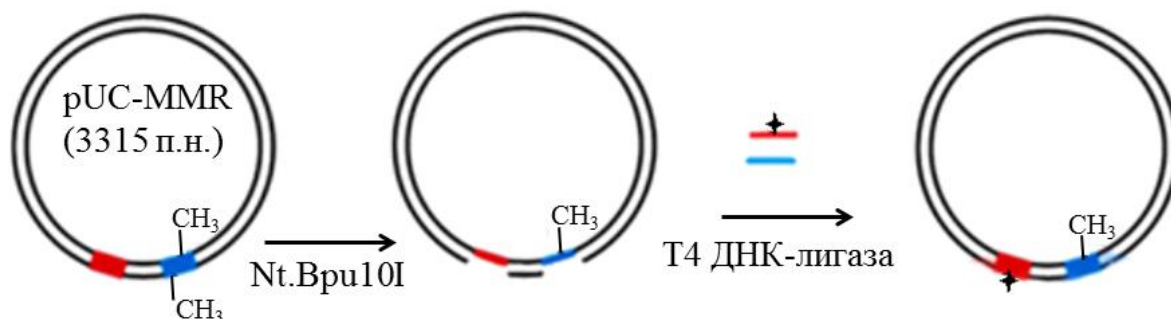


Рис. 1.14. Схема конструирования ковалентно замкнутой двуцепочечной ДНК, содержащей монометилированный участок 5'-GATC-3'/3'-CTm⁶AG-5' (выделен синим) и участок с нуклеотидной парой G/T (фрагмент, окрашенный красным, пара обозначена как +) [74].

При создании ДНК-субстрата для изучения процесса MMR была использована плаزمида pUC-MMR, которая имела 4 участка узнавания Nt.Bpu10I (5'-CC↓TNAGC-3'/3'-GGANTCG-5', стрелкой указано место гидролиза) и диметилированный участок 5'-Gm⁶ATC-3'/3'-CTm⁶AG-5'. После обработки плазмиды этим ферментом образовались 2 участка, в которых одноцепочечные разрывы углеводофосфатного остова находились друг от друга на расстоянии 17 и 21 п. н. Короткие фрагменты диссоциировали при термической денатурации. Природные ДНК-фрагменты «замещали» на синтетические в ходе гибридизации, используя избыток последних. Таким образом формировали плазмиду, содержащую G/T-«мисматч», а также монометилированную последовательность 5'-GATC-3'/3'-CTm⁶AG-5'. Для возможности лигирования с ДНК олигонуклеотиды содержали фосфатную группу на 5'-конце. Целостность гибридных молекул ДНК восстанавливали с помощью рекомбинантной ДНК-лигазы фага T4.

1.4.7. Использование никующих эндонуклеаз в секвенировании ДНК

В последнее десятилетие наблюдается стремительный прогресс в развитии методов секвенирования ДНК: время расшифровки геномов и стоимость всего процесса значительно уменьшились. Однако, несмотря на технологические успехи в этой области, основную трудность представляет собой умение грамотно оперировать с огромными массивами полученных данных. Длина одного секвенируемого за раз участка составляет около 1000 п.н., такие фрагменты по окончании секвенирования необходимо собрать в единую непрерывную последовательность. При недостаточной «глубине» секвенирования, т.е. среднем количестве прочтений каждого нуклеотида в геноме, значительно возрастает вероятность неправильной «сборки» исходной последовательности [75]. Одним из подходов к решению данной проблемы является оптическое картирование ДНК, которое использует возможности современной микроскопии и может предоставить информацию о расположении нескольких тысяч п.н. в геноме. Данный подход имеет большое значение при секвенировании геномов *de novo*, а также позволяет правильно детектировать протяженные структурные перестройки генома (дупликации, инверсии, транслокации, делеции, инсерции).

На первом этапе оптического картирования происходит специфическая модификация ДНК, для этого используют ЭР, НЭ либо ДНК-метилтрансферазы. Изначально в оптическом картировании ДНК использовали ЭР, которые специфически гидролизуют ДНК, иммобилизованную на поверхности. Затем следовало окрашивание ДНК интеркалирующим красителем (например, YOYO-1), получение изображения

частично гидролизованной ДНК в ходе детекции сигнала флуоресценции и его анализ. Оптическая карта дает информацию об относительном положении участков узнавания ЭР, что значительно облегчает «сборку» исходной молекулы ДНК (рис. 1.15).

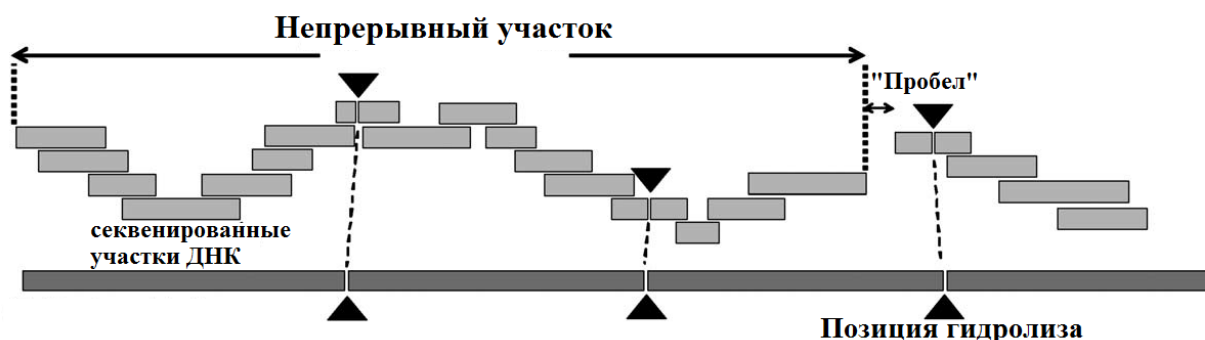


Рис. 1.15. Схематическое изображение оптической карты, предоставляющей дополнительную информацию к данным по секвенированию. Такие карты позволяют определить положение и размер несеквенированных участков («пробелы»), а также правильно ориентировать секвенированные непрерывные участки («контиги»).

Альтернативным подходом при картировании ДНК является использование НЭ. После внесения одноцепочечного разрыва ДНК-полимераза способна синтезировать новую цепь, вставляя флуоресцентно меченные нуклеотиды. В работе Ксиао и соавт. [76] были использованы Nb.BbvCI и ДНК-полимераза I, которая включала в состав ДНК TAMRA-ddUTP (тетраметилродамин-5(6)-[5-(3-карбоксамидоаллил)-2',3'-дидезоксиуридин-5'-трифосфат), при этом дальнейшая работа ДНК-полимеразы I блокировалась в результате встраивания данного дидезоксинуклеотида. Флуоресцентно меченные молекулы ДНК затем иммобилизовали на поверхности из модифицированного стекла и получали изображение с помощью TIRF-микроскопии (от англ.: total internal reflection fluorescence microscopy; регистрация флуоресценции, основанной на полном внутреннем отражении). Полученные данные позволили определить места локализации флуоресцентной метки в молекуле ДНК и, следовательно, участки узнавания Nb.BbvCI. Данный подход был успешно применен при расшифровке геномов аденовируса человека и некоторых штаммов риновирусов [76].

Большим преимуществом использования НЭ по сравнению с использованием ЭР является образование ковалентной связи между ДНК и флуорофором в ходе работы ДНК-полимеразы, а также введение флуоресцентной метки рядом с позицией гидролиза НЭ. Данные особенности значительно облегчают процессы дальнейшей очистки ДНК (отсутствует риск диссоциации флуоресцентной метки из комплекса с ДНК) и повышают точность оптического картирования. Среди недостатков этого метода можно отметить возможное неспецифическое действие НЭ и наличие случайных одноцепочечных

разрывов (ников) в исходной последовательности, что может приводить к неправильной интерпретации полученных данных [77], [78].

Модификация принципа картирования ДНК с использованием НЭ была разработана Дас и соавт. [77]. Обычно при ник-трансляции используется ДНК-полимераза I, которая катализирует реакцию репликации с 3'-конца от каждого разрыва в цепи ДНК и одновременно удаляет нуклеотиды с 5'-конца (благодаря присущей ДНК-полимеразе I 5'-3'-экзонуклеазной активности). Дас и соавт. использовали ДНК-полимеразу Vent_R, у которой отсутствует экзонуклеазная активность. Благодаря этому существующая цепь ДНК вытеснялась из дуплекса (последовательность, выделенная зеленым цветом, рис. 1.16). Вытесненная цепь ДНК способна гибридизоваться с комплементарными мечеными олигонуклеотидами, добавленными в реакционную смесь. Задавая последовательность меченых олигонуклеотидов, в рамках данного подхода возможно определить положение интересующей последовательности, отличной от участка узнавания НЭ [77].

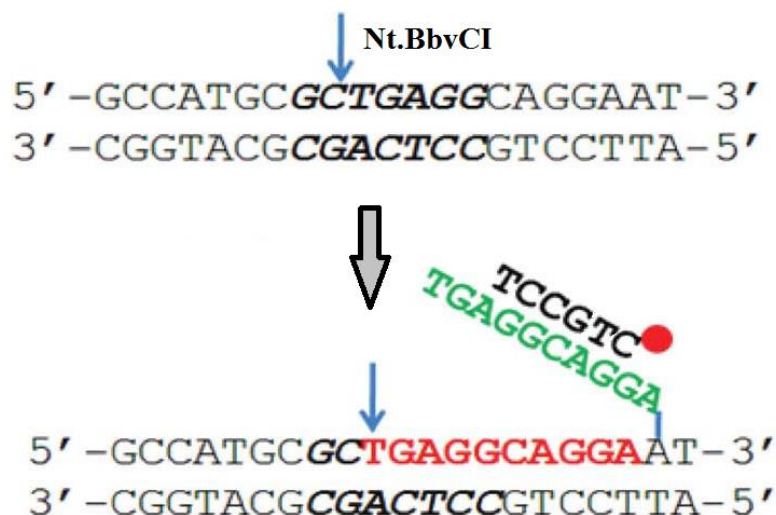


Рис. 1.16. Принцип картирования ДНК с вытеснением цепи. Nt.BbvCI вносит одноцепочечный разрыв в участок узнавания 5'-GC↓TGAGG-3'/ 3'-CGACTCC-5' (выделен жирным шрифтом, место гидролиза обозначено стрелкой). Добавление Vent_R-полимеразы приводит к репликации ДНК (последовательность, выделенная красным цветом) и вытеснению существующей цепи (последовательность, выделенная зеленым цветом). Вытесненная цепь затем может образовывать дуплекс с мечеными олигонуклеотидами [77].

1.4.8. Использование никующих эндонуклеаз при анализе профиля метилирования

Известно, что изменение паттернов метилирования остатков цитозина играет значительную роль при возникновении и развитии раковых клеток [79] – [80]. Анализ профиля метилирования позволяет дифференцировать клетки опухоли и нормальные клетки, что может использоваться в диагностике онкологических заболеваний. Авторами [81] была сконструирована химерная НЭ, способная вносить одноцепочечный разрыв в

плазмиду и геномную ДНК, содержащую динуклеотид m^5CG (m^5C – остаток 5-метил-2'-дезоксцитидина). Наличие одноцепочечного разрыва в ДНК позволяло также вводить флуоресцентную метку в места гидролиза (см. раздел 1.4.6.). Такой химерный белок может использоваться при секвенировании ДНК и оптическом картировании эпигенетических маркеров. Основу химерного белка составляла N.φGamma, закодированная в фаге γ *Bacillus anthracis* и узнающая последовательность 5'-YCG↓GT-3'/3'-RGCCA-5' (Y = C или T, R = G или A). Никующий домен некоторых мутантных форм этого белка (состоящий из 76 а.о.) был соединен с двумя доменами белка MBD2, способного связывать динуклеотиды m^5CG . Показано, что некоторые полученные химерные белки вносят одноцепочечные разрывы преимущественно в метилированную плазмиду [81]. Также в процессе синтеза ДНК с вытеснением цепи в участки с разрывом была введена флуоресцентная метка СуЗ, причем введение этой метки в метилированную плазмиду было в 9 раз более эффективным по сравнению с немодифицированной ДНК. Внесение одноцепочечных разрывов с помощью полученных белков и дальнейшее введение флуоресцентной метки было также продемонстрировано авторами для геномной ДНК мыши [81].

1.5. Изменение активности никующих эндонуклеаз с помощью псевдокомплементарных ПНК

Пептидонуклеиновые кислоты (ПНК, англ. «PNA, Peptide Nucleic Acid») – это линейные полимеры N-(2-аминоэтил)глицина, замещённые по азоту аминоэтильной группы производными гетероциклических оснований. ПНК способна образовывать с одноцепочечными РНК и ДНК комплексы ПНК/РНК и ПНК/ДНК различной структуры, причем гибридный дуплекс ПНК/ДНК является термодинамически более устойчивым по сравнению с таким же ДНК-дуплексом. Связывание ПНК с двуцепочечной ДНК может приводить к вытеснению одной из цепей ДНК и образованию комплексов, содержащих две молекулы ПНК и одну молекулу ДНК [82]. Были также синтезированы псевдокомплементарные ПНК (пкПНК) [83], которые нашли применение в ПЦР [84]. В области ДНК-нанотехнологий пакПНК используются в качестве нового инструмента для обратимого переключения наноструктур ДНК [85]. В пакПНК остаток тимидина (Т) заменен на 2-тиоурidin (S), а аденозин (А) – на 2,6-диаминопурин (D) (рис. 1.17). Наряду с парой G·C, в комплексах пакПНК с ДНК образуются пары S·A и D·T.

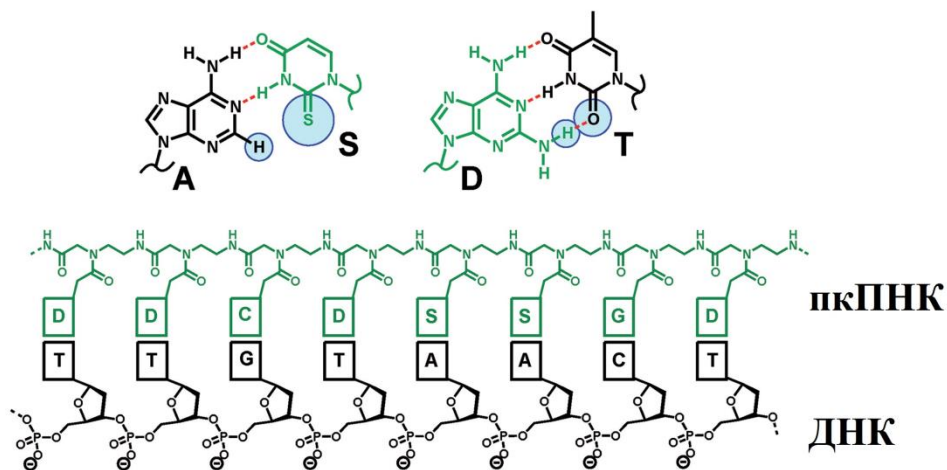


Рис. 1.17. Образование пар между гетероциклическими основаниями пкПНК и ДНК.

Комплексы пкПНК с двуцепочечной ДНК являются стабильными, ограничений по возможным последовательностям ДНК практически не существует [86] – [87]. Проведены исследования влияния связывания пкПНК с участками узнавания различных ферментов: например, связывание пкПНК в области промотора блокировало действие T7 РНК-полимеразы [88]. ПкПНК также блокировали действие ЭР и МТаз в том случае, если пкПНК полностью или частично связывалась с участком узнавания фермента [89].

В работе [90] было оценено влияние пкПНК на действие трех родственных ферментов: R.PleI, R.MlyI и Nt.BstNBI. Все эти ферменты узнают одну и ту же последовательность в ДНК (5'-GAGTC-3'/3'-CTCAG-5') и вносят один или два разрыва на расстоянии 4-5 п.н. после участка узнавания (см. раздел 1.2.1). В случае R.PleI и R.MlyI связывание пкПНК с ДНК после участка узнавания полностью подавляло гидролиз ДНК-субстрата. В отличие от R.PleI и R.MlyI ингибирование Nt.BstNBI наблюдалось при связывании пкПНК с ДНК как перед участком узнавания фермента, так и после него. Nt.BstNBI становится нечувствительной к присутствию пкПНК только в том случае, когда расстояние между участком связывания пкПНК и участком узнавания фермента становится больше 6 п.н. Интересно, что в случае R.PleI связывание пкПНК с ДНК на расстоянии 3-5 п.н. после участка узнавания фермента приводило к появлению никующей активности у ЭР.

Такое индуцированное проявление никующей активности было продемонстрировано и для R.BbsI, которая узнает в двуцепочечной ДНК последовательность 5'-GAAGAC-3'/3'-СТТСТГ-5' и вносит разрыв в «верхнюю» цепь на расстоянии двух нуклеотидов с 3'-конца от участка узнавания, а в «нижнюю» цепь – на расстоянии шести нуклеотидов с 5'-конца

от участка узнавания [90]. Две молекулы пкПНК взаимодействовали с участком гидролиза таким образом, что R.VbsI могла беспрепятственно вносить разрыв только в «верхнюю» цепь, гидролиз же «нижней» цепи был блокирован. Таким образом, пкПНК могут играть роль не только селективных блокаторов ферментов, взаимодействующих с ДНК, но в определенных случаях способны «превращать» ЭР в НЭ.

1.6. Высокоспецифичные эндонуклеазы

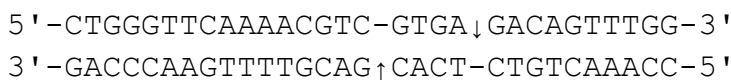
В современной молекулярной биологии ферменты рестрикции используют для вставки различных генетических элементов в выбранный участок генома. Обычно эту задачу выполняют с помощью клеточного механизма гомологичной рекомбинации [91]. Стимулировать рекомбинацию может двуцепочечный разрыв, внесенный эндонуклеазой. В таком случае эндонуклеаза должна узнавать уникальные последовательности и специфически их гидролизовать. Обычно участки узнавания ЭР не превышают 8 п.н. и довольно часто повторяются в геноме. Очевидно, что высокую специфичность действия эндонуклеазы можно обеспечить за счет увеличения участка ее узнавания. Чем длиннее такой участок, тем ниже вероятность наличия второй такой нуклеотидной последовательности в геноме.

Высокоспецифичные эндонуклеазы можно получить несколькими способами. Первый способ – это создание так называемых мегануклеаз с заданной специфичностью (см. раздел 1.6.1). Второй – создание гибридных белков с разделенными ДНК-связывающим и ДНК-гидролизующим модулями. В качестве ДНК-гидролизующего модуля используются ЭР или НЭ, а в качестве ДНК-связывающего модуля – домены ДНК-связывающих белков. Так конструируют нуклеазы с мотивом «цинковые пальцы», TALE-нуклеазы (нуклеазы с повторами TAL-эфффекторов) и др. [8], [92] (см. разделы 1.6.2 и 1.6.3). В качестве ДНК-связывающего модуля может выступать также триплекс-образующий олигонуклеотид (TFO-нуклеазы) [13], [92] (см. раздел 1.6.4), либо молекулы РНК прокариотической системы CRISPR/Cas [93] (см. раздел 1.6.5).

1.6.1. Мегануклеазы

Мегануклеазы в широком смысле – это высокоспецифичные эндонуклеазы, узнающие последовательности более 14 п.н. [94]. В настоящее время почти всегда под термином «мегануклеазы» подразумевают «хоуминг»-эндонуклеазы семейства LAGLIDADG [95].

Гомодимерные представители семейства (например, I-CreI) гидролизуют палиндромный либо псевдопалиндромный участок узнавания [96]. Участок узнавания «хоуминг»-эндонуклеазы I-CreI варьирует от 19 до 30 п.н. и расположен асимметрично относительно позиций гидролиза. В базе данных REBASE участок узнавания I-CreI представлен в следующем виде:



Показано, что I-CreI способна гидролизовать последовательности, отличающиеся одним и даже несколькими нуклеотидами от участка узнавания [97].

Каждая субъединица гомодимера I-CreI содержит α -спираль с консервативной аминокислотной последовательностью LAGLIDADG, находящейся на поверхности области, ответственной за димеризацию фермента. Предпоследний консервативный остаток Asp или Glu этой α -спирали участвует в координации кофактора – иона Mg^{2+} .

Мономерные представители семейства (например, I-SceI) состоят из двух LAGLIDADG-доменов, соединенных линкером, и имеют асимметричный участок узнавания. Как димерные, так и мономерные «хоуминг»-эндонуклеазы семейства LAGLIDADG содержат в своем составе уникальную консервативную структуру с $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ -укладкой. Четыре β -тяжа субъединицы (домена), соединяясь с помощью двух петель в антипараллельный β -лист, образуют основную часть «седловидного» ДНК-связывающего участка мегануклеазы (рис. 1.18) [95].

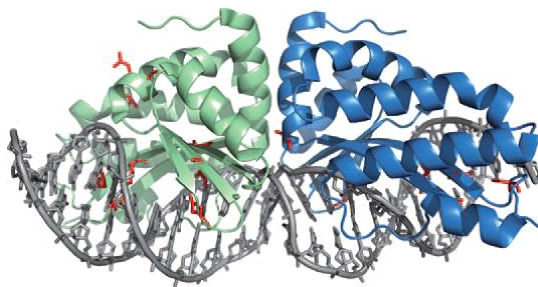


Рис. 1.18. Кристаллическая структура комплекса мутантной формы фермента I-CreI и целевой ДНК (PDB код: 2VBJ). Две субъединицы гетеродимера обозначены зеленым и синим цветами. Участок узнавания (серый) мегануклеазы, сконструированной за счет замены определенных а.о. (выделены красным), отличается от участка узнавания I-CreI дикого типа [98].

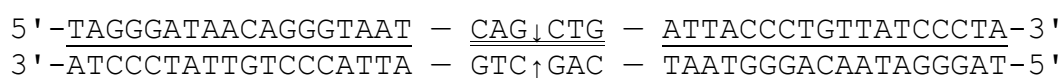
Для конструирования мегануклеаз с заданной специфичностью действия из «хоуминг»-эндонуклеаз используют методы селекции и скрининга *in vivo*. Так, для того, чтобы создать I-CreI с измененной позицией гидролиза в адресной последовательности ДНК, предсказанные биоинформатическими методами а.о. I-CreI, контактирующие с определенной нуклеотидной парой, были по одному заменены на все другие аминокислотные остатки. Все варианты мегануклеазы были экспрессированы, проведен

их скрининг *in vivo* на способность гидролизовать репортерную плазмиду, содержащую измененный участок узнавания I-CreI [99]. Однако клоны с полностью измененной специфичностью не были найдены. Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что замена только а.о., контактирующих с ДНК, не всегда приводит к изменению специфичности «хоуминг»-эндонуклеаз [100].

Также для создания мегануклеаз с заданной специфичностью действия использовали технологию высокопроизводительного скрининга (high-throughput screening technique). На первом этапе в библиотеке мутантных форм I-CreI были найдены варианты фермента со специфичностью к частям заданного участка ДНК. Затем были отобраны ферменты, которые способны гидролизовать полностью измененный участок ДНК. Специфичность отобранных форм I-CreI к этому участку в дальнейшем увеличивали путем случайного мутагенеза генов этих ферментов [101].

Совместной экспрессией в одной клетке двух вариантов I-CreI, различающихся по специфичности действия, можно добиться образования гетеродимерных форм I-CreI, способных гидролизовать непалиндромные адресные последовательности [101]. Таким образом, из «хоуминг»-эндонуклеазы I-CreI были созданы ферменты, способные гидролизовать непалиндромные участки узнавания ДНК, почти полностью отличные от природного (псевдопалиндромного). Эти непалиндромные участки представляют собой последовательности вируса HSV-1 или последовательности мутированных генов человека *hrc* и *rag1*, встречающиеся при пигментной ксеродерме и при тяжелом комбинированном иммунодефиците, соответственно [92], [98].

«Хоуминг»-эндонуклеазы используются также при создании нуклеаз с повышенной специфичностью действия – при этом конструируют химерные белки, состоящие из каталитически неактивной «хоуминг»-эндонуклеазы (в качестве ДНК-связывающего модуля) и ЭР (в качестве ДНК-связывающего и гидролизующего модулей). На основе гомодимерной R.PvuII и «хоуминг»-эндонуклеазы I-SceI получили химерную нуклеазу, узнающую протяженную адресную последовательность в двутиазековой ДНК, которая состоит из двух участков узнавания I-SceI (выделены подчеркиванием) и одного R.PvuII (выделены двойным подчеркиванием):



Такая последовательность гидролизуется полученной химерной нуклеазой в участке узнавания R.PvuII (отмечены стрелками) (рис. 1.19) [91].

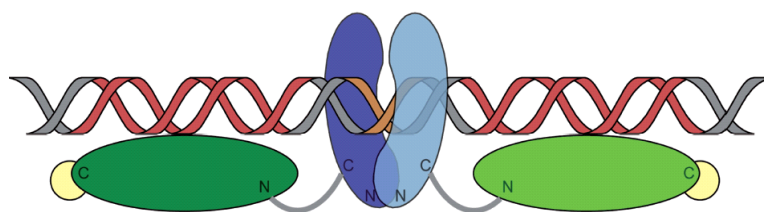


Рис. 1.19. Схема химерного белка, состоящего из гомодимерной ЭР (синим цветом показаны ее субъединицы, оранжевым – ее участок узнавания) и «хоуминг»-эндонуклеазы (зеленые овалы, красным цветом показаны их участки узнавания в ДНК). Домены субъединиц химерного белка соединены аминокислотными линкерами (серые). Также на схеме показаны N- и C-концевые участки эндонуклеаз, желтым цветом отмечен фрагмент, несущий молекулу стрептавидина и используемый для выделения химерного белка [91].

Было показано, что изменить специфичность «хоуминг»-эндонуклеаз легче, чем ЭР [102]. Однако, в отличие от нуклеаз с мотивом «цинковые пальцы» и TALE-нуклеаз (см. разделы 1.6.2 и 1.6.3) ДНК-связывающий и каталитический центры у мегануклеаз взаимосвязаны (нельзя разделить на две отдельные активные молекулы), что делает сложным варьирование их специфичности при сохранении активности [92].

1.6.2. Эндонуклеазы с мотивом «цинковые пальцы»

В середине 1990-х годов был создан химерный белок, состоящий из гидролизующего домена R.FokI и ДНК-связывающего домена с мотивом «цинковые пальцы». Таким образом впервые была получена эндонуклеаза с мотивом «цинковые пальцы» [103].

Конструирование таких эндонуклеаз в отличие от мегануклеаз является значительно более простым процессом благодаря модульному строению ДНК-связывающего домена. ДНК-связывающий домен обычно включает от трех до шести мотивов «цинковые пальцы», каждый из которых узнает определенную тринуклеотидную последовательность ДНК. Таким образом, ДНК-связывающий домен нуклеазы с шестью мотивами «цинковые пальцами» может узнавать последовательность из 18 п.н. [92].

Каждый «цинковый палец» имеет $\beta\alpha$ -укладку и включает приблизительно 30 а.о., из которых два остатка цистеина и два остатка гистидина координируют один ион Zn^{2+} . Четыре аминокислотных остатка, входящих в его α -спираль, взаимодействуют с большой бороздкой в участке узнавания ДНК, состоящем из трех пар нуклеотидов (рис. 1.20, А). Изменив эти а.о., можно изменить специфичность нуклеазы [104].

Особенности строения и функционирования R.FokI были описаны ранее (раздел 1.2.2.). Неспецифический ДНК-гидролизующий домен R.FokI проявляет свою активность только в составе гомодимера. Для создания высокоспецифичных химерных нуклеаз используют ДНК-гидролизующий домен R.FokI и ДНК-связывающий домен другого белка. Для того чтобы высокоспецифичная нуклеаза гидролизовала непалиндромную

последовательность, используют два химерных фермента на основе R.FokI и ДНК-связывающих доменов с различной специфичностью, созданных на основе структурного мотива «цинковые пальцы». Участки узнавания этих доменов должны находиться в противоположных цепях ДНК в инвертированной ориентации на расстоянии 5-7 п.н. друг от друга (рис. 1.20, Б).

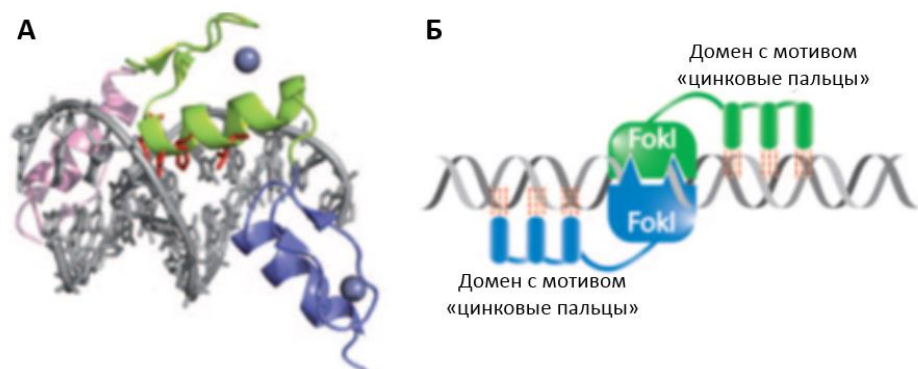


Рис. 1.20. Эндонуклеазы с мотивом «цинковые пальцы». **А.** Кристаллическая структура комплекса ДНК и фрагмента транскрипционного фактора Zif268, содержащего мотив «цинковые пальцы» (PDB код: 1A1L). Каждый «палец» участвует в узнавании трех п.н. Красным выделены аминокислоты в позициях 1, 2, 3, 6 α -спирали, контактирующие с ДНК. **Б.** Схема взаимодействия ДНК с химерной нуклеазой, содержащей мотив «цинковые пальцы» и ДНК-гидролизующий модуль на основе R.FokI [92].

Для специфического гидролиза ДНК химерной нуклеазой необходимо, чтобы ДНК-связывающие домены с мотивом «цинковые пальцы» взаимодействовали с ДНК в первую очередь, после этого должны происходить димеризация ДНК-гидролизующих доменов R.FokI и расщепление ДНК. Таким образом, используя для создания химерной нуклеазы два различных по специфичности ДНК-связывающих домена (каждый с тремя мотивами «цинковые пальцы»), можно гидролизовать последовательности с участком узнавания в 18 п.н. Однако в таком случае появляется возможность нежелательного гидролиза ДНК химерными нуклеазами в составе гомодимеров. Этого можно избежать путем замены а.о. на поверхности димеризации в ДНК-гидролизующем домене R.FokI, добившись того, что образование гетеродимера будет более предпочтительно, чем образование гомодимеров [105].

На сегодняшний день эндонуклеазы с мотивом «цинковые пальцы» уже успешно применяются для геномных модификаций ооцитов лягушки, плодовых мушек, нематод, мышей, крыс, растений и отдельных клеток млекопитающих, включая стволовые клетки человека. Такие химерные нуклеазы прошли, по крайней мере, три стадии клинических испытаний в качестве терапевтического агента при лечении глиобластомы и инфекции ВИЧ [106].

Рамирезу и соавт. удалось сконструировать НЭ с мотивом «цинковые пальцы» [107]. Для этого они использовали в качестве ДНК-гидролизующего модуля искусственную форму R.FokI, образующую гетеродимер. С помощью одной аминокислотной замены (D450A) им удалось инактивировать каталитический центр одного из мономеров, получив таким образом НЭ. На культуре клеток человека авторы показали, что внесение одноцепочечного разрыва этим ферментом повышает уровень репарации ДНК с помощью гомологичной рекомбинации [107]. Вангу и соавт. с помощью НЭ с мотивом «цинковые пальцы» удалось встроить участок ДНК в адресную последовательность генома культивированных человеческих клеток [108].

1.6.3. TALE-нуклеазы

Конструирование мегануклеаз и эндонуклеаз с мотивом «цинковые пальцы» для новых целевых участков ДНК – дорогостоящий и долгий процесс. Более эффективный подход для достижения высокой специфичности действия эндонуклеаз – использование в качестве ДНК-связывающего домена эндонуклеазы tandemных повторов TALE (от англ. «transcription activator-like effector» – ДНК-связывающий домен TAL-эффекторов).

TAL-эффекторы были обнаружены в бактериях рода *Xanthomonas*. Эти бактерии – патогены растений. При инфекции TAL-эффекторы попадают в ядро клетки, где взаимодействуют со специфическими последовательностями ДНК. TAL-эффекторы активируют транскрипцию определенных генов растения, экспрессия которых приводит к снижению уровня защиты растения против этих бактерий, способствуя его колонизации ими [109].

ДНК-связывающий домен TAL-эффекторов состоит из повторов аминокислот. Каждый повтор обычно содержит 33-35 а.о. и отвечает за узнавание только одного из четырех нуклеотидов в ДНК за счет двух гипервариабельных а.о. в позициях 12 и 13 (рис. 1.21, А, Б) [110]. Консервативный повтор состоит из двух α -спиралей, соединенных короткой петлей [111] – [112].

Для целей геной инженерии были созданы TALE-нуклеазы, у которых в качестве ДНК-связывающего домена использовался центральный мотив TALE из tandemных повторов, а в качестве ДНК-гидролизующего домена – неспецифический каталитический домен R.FokI (рис. 1.21, В) [92]. Участок узнавания такой эндонуклеазы обычно состоит из двух участков связывания двух субъединиц химерного белка TALE-FokI. Каждый участок связывания имеет длину 14-16 п.н., эти участки разделены последовательностью в 12-16 п.н. [113].

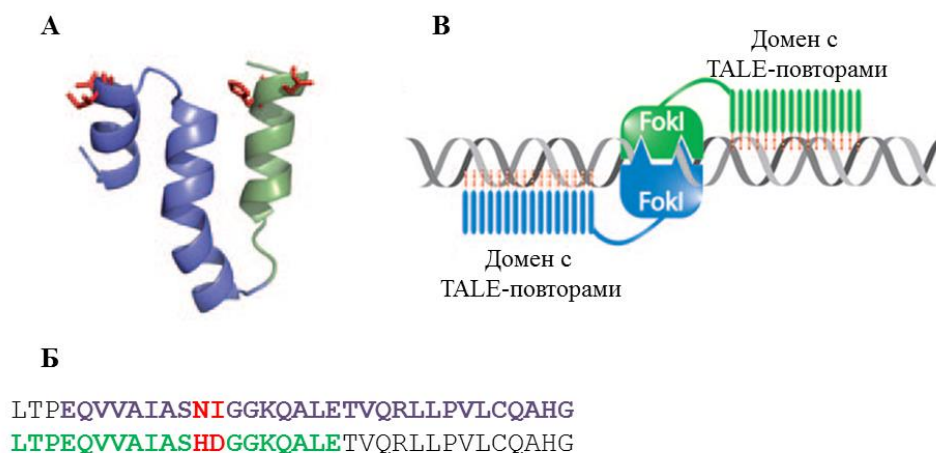


Рис. 1.21. TALE-нуклеаза. **А.** Структурная модель полного TALE-повтора (синий) и половины второго TALE-повтора (зеленый) (PDB код: 2KQ5). Красным обозначены переменные а.о. **Б.** Аминокислотная последовательность двух TALE-повторов. **В.** Схема взаимодействия TALE-нуклеазы с ДНК [92].

Наравне с мегануклеазами TALE-нуклеазы обладают высокой специфичностью. Она выше, чем у эндонуклеаз с мотивом «цинковые пальцы» [47], [103]. Хотя из этих трех типов эндонуклеаз легче доставить в клетки мегануклеазы благодаря их малому размеру, все-таки существует сложность их создания, которая заключается в том, что каталитическую и ДНК-связывающую функции «хоуминг»-эндонуклеаз трудно разграничить. Наоборот, конструировать нуклеазы с мотивом «цинковые пальцы» и TALE-нуклеазы с заданной специфичностью гораздо проще [47].

Веферс и соавт. использовали искусственно сконструированную TALE-нуклеазу *in vivo* для моделирования генетической болезни с помощью внесения точечной мутации в геном мыши [113]. Целевой ДНК стал ген *rab38* мыши, кодирующий ГТФазу Rab38. Мутации в этом гене приводят к появлению фенотипически отличных от дикого типа мышей шоколадного цвета (фенотипа *chocolate*). Мыши с фенотипом *chocolate* являются моделями синдрома Германски-Пудлак человека, к которому могут привести более 50 «миссенс»-, «нонсенс»-мутаций и делеций в гене *rab38* человека. В результате замены глицина на валин в 19-й позиции белка Rab38 были получены мыши с фенотипом *chocolate*. Для этого в одноклеточный зародыш мыши на стадии двух пронуклеусов вводили с помощью микроинъекции мРНК TALE-нуклеазы, специфичную к последовательности гена *rab38* мыши. После трансляции этой мРНК синтезированная в клетке TALE-нуклеаза, несущая сигнал ядерной локализации, гидролизовала две цепи гена *rab38* мыши. Этот разрыв репарировался путем гомологичной рекомбинации с участием инъецированного в клетку олигодезоксирибонуклеотида (одновременно в зародыш доставляли одноцепочечный 144-звенный фрагмент ДНК, соответствующий

участку последовательности гена *rab38* с нуклеотидной заменой G→T во второй позиции кодона 19). Мыши, развившиеся из таких эмбрионов, имели «миссенс»-мутацию в одной из двух копий гена *rab38*. После их скрещивания между собой были получены мыши, гомозиготные по гену *rab38*, несущему мутацию. Эти мыши соответствовали фенотипу *chocolate*. Надо заметить, что преимущественно развивались мыши с делециями в гене *rab38*, которые образовались в ходе репарации двуцепочечного разрыва с помощью лигирования негомологичных концов, поскольку вероятность этого пути репарации намного выше, чем процесса гомологичной рекомбинации.

Эффективно снизить уровень репарации с помощью лигирования негомологичных концов и повысить уровень рекомбинации можно, гидролизуя только одну цепь двуцепочечной ДНК с помощью НЭ [114] – [115]. Поэтому актуальной задачей являлось конструирование химерных белков с НЭ в качестве ДНК-гидролизующего модуля. Эту задачу удалось решить Л. Габсалилов и соавт., которые сконструировали химерные нуклеазы, в которых фермент репарации MutH выполнял функцию ДНК-гидролизующего модуля химерного белка [8]. В качестве ДНК-связывающего модуля были использованы TALE-белок AvrBs4 и «хоуминг»-эндонуклеаза I-SceI. Полученные химерные белки были названы MutH–I-SceI и TALE–MutH. Для тестирования активности химерных нуклеаз использовали три вида субстратов. Специфические субстраты содержали участок узнавания I-SceI или TALE в непосредственной близости от участка узнавания MutH. Также в качестве контроля были сконструированы неспецифические субстраты, содержащие только участок узнавания ДНК-гидролизующего или ДНК-связывающего модуля.

Показано, что нуклеаза MutH–I-SceI способна гидролизовать специфический субстрат в 1000 раз быстрее по сравнению с неспецифическими субстратами. Для химерного фермента TALE–MutH был подобран оптимальный специфический субстрат, в котором участок узнавания TALE белка был отделен 3 п.н. от участка узнавания MutH. В такой субстрат TALE–MutH вносила одноцепочечный разрыв, при этом гидролиз неспецифических субстратов не наблюдался [8].

1.6.4. Нуклеазы, связанные с триплекс-образующим олигонуклеотидом (ТФО-нуклеазы)

ТФО-нуклеазы – это конъюгаты ЭР, выполняющей функцию как ДНК-гидролизующего, так и ДНК-связывающего модуля, и триплекс-формирующего олигонуклеотида (англ. «triplex forming oligonucleotide», TFO), повышающего

специфичность связывания эндонуклеазы с ДНК [116] – [118]. Полипуриновые тракты в двуцепочечной ДНК способны образовывать стабильную тройную спираль с олигодезоксирибонуклеотидами определенной последовательности [119]. Эти олигонуклеотиды, взаимодействуя с большой бороздкой двуцепочечной ДНК, формируют Хугстиновские или обратные Хугстиновские пары оснований при параллельной и антипараллельной ориентации, соответственно (рис. 1.22).

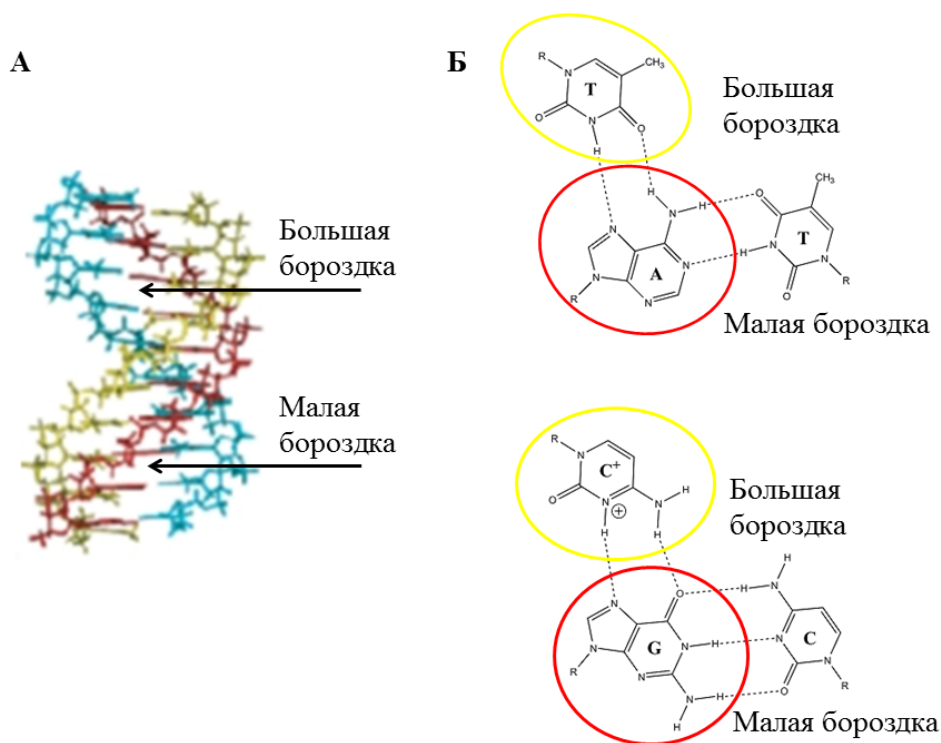
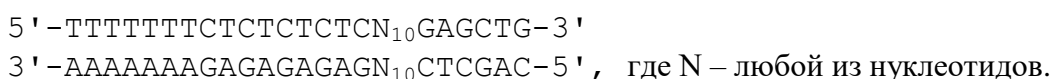


Рис. 1.22. Структура тройной спирали ДНК. А. Расположение в спирали ТФО (обозначен желтым цветом), полипуринового тракта и полипиримидинового тракта ДНК-дуплекса (обозначены красным и синим цветами, соответственно). Б. Каждый отдельный нуклеотид ТФО (желтый) образует с одним нуклеотидом полипуринового тракта (красный) водородные связи (черные точки) [119].

Был сконструирован конъюгат ЭР scPvuII и 13-звенного олигодезоксирибонуклеотида, способного формировать триплекс, с последовательностью 5'-NH₂-[CH₂]₆-MRMRMRMRMRPPPPRPT-3', где М – 5-метил-2'-дезоксцитидин и Р – 5-[1-пропилил]-2'-деоксиуридин (рис. 1.23, Б). ScPvuII (от англ. «single chain»: одна цепь) представляет собой гомодимерную R.PvuII, обе субъединицы которой соединены аминокислотным линкером в одну цепь (рис. 1.23, А). Было показано *in vitro*, что конъюгат ЭР scPvuII и 13-звенного олигонуклеотида гидролизует адресную последовательность, состоящую из 17-звенного участка связывания ТФО и 6-звенного участка узнавания R.PvuII в 1000 раз более эффективно по сравнению с участками без адресной последовательности [13]:



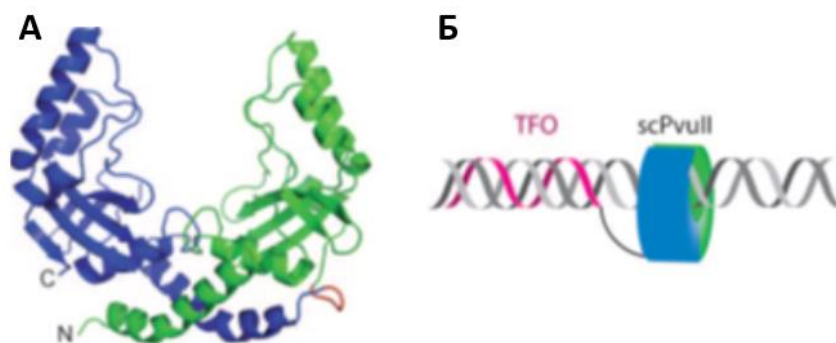


Рис. 1.23. Эндонуклеаза рестрикции scPvuII и ее конъюгат с триплекс-образующим олигонуклеотидом. **А.** Кристаллическая структура ЭР scPvuII (PDB код: 3KSK). Две субъединицы гомодимерной R.PvuII соединены пептидным линкером –GSGG– (красный). **Б.** Схема взаимодействия эндонуклеазы scPvuII, связанной с триплекс-образующим олигонуклеотидом, с адресным участком ДНК. TFO-нуклеаза гидролизует участок узнавания R.PvuII, расположенный приблизительно на расстоянии одного витка спирали ДНК от участка связывания TFO [13].

Тем не менее, в экспериментах *in vivo* с использованием конъюгатов ЭР с олигодезоксирибонуклеотидами существуют проблемы, заключающиеся в трудности доставки ДНК-белкового конъюгата в клетку и в низкой скорости формирования тройной спирали. TFO-нуклеазы не имеют широкого применения из-за того, что образование триплекса происходит намного медленнее, чем связывание и гидролиз ДНК сопряженной ЭР. Использование таких эндонуклеаз *in vitro* возможно только в два этапа: преинкубация TFO-нуклеазы с ДНК в отсутствие ионов магния, что позволяет сначала образоваться триплексу, а затем добавление ионов магния, необходимых для гидролиза ДНК. Такая стратегия неприменима *in vivo*, поскольку в клетке ионы магния присутствуют в достаточном количестве. Эту проблему можно решить, используя конъюгаты фотоактивируемых ЭР с TFO, инициируя реакцию гидролиза после образования комплекса с адресной последовательностью [13] (раздел 1.7).

1.6.5. Эндонуклеазы системы CRISPR/Cas

Система CRISPR/Cas9 – одна из недавно сконструированных сайт-направленных эндонуклеаз. Некоторые бактерии и археи используют систему CRISPR/Cas, чтобы копировать участки попавшей в клетку чужеродной нуклеиновой кислоты, сохранять их в своей ДНК и при новой такой же инфекции эффективно удалять эту чужеродную нуклеиновую кислоту [103]. Таким образом, система CRISPR/Cas обеспечивает «приобретенный иммунитет» прокариот против вирусов и плазмид [120].

CRISPR (от англ. *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*) – короткие палиндромные повторы ДНК у некоторых прокариот, регулярно расположенные группами. Локус CRISPR у прокариот обычно состоит из недлинных прямых повторов,

очень часто частично палиндромных, разделенных особыми последовательностями – «спейсерами». «Спейсеры» в большинстве случаев соответствуют участкам ДНК плазмид и вирусов, попавших в клетку. Размеры повтора и «спейсера» CRISPR варьируют от 23 до 47 п.н. и от 21 до 72 п.н., соответственно. В клетке обычно содержится один локус CRISPR, но их количество может достигать и до 18; располагаются они как в геномной ДНК, так и в плазмиде [120]. К локусу CRISPR часто примыкают гены *cas* (от англ. CRISPR-associated), обычно кодирующие нуклеазы, а также хеликазы, полимеразы и полинуклеотид-связывающие белки. CRISPR и белки Cas формируют систему CRISPR/Cas [120].

Транскрипт CRISPR, пре-crPHK, в ходе процессинга образует короткие crPHK (гидовые РНК), состоящие из одного «спейсера» CRISPR, фланкированного участками повторов [120]. Гидовые РНК образуют с белками Cas белково-нуклеиновый комплекс, который способен гидролизовать как чужеродную ДНК, так и РНК, то есть создает примитивный «иммунный ответ» по механизму, подобному РНК-интерференции [121]. При «иммунизации» участок экзогенной ДНК, полученный в ходе гидролиза этим белково-нуклеиновым комплексом, встраивается в проксимальный конец локуса CRISPR между повторами как новый «спейсер» [93], который в ходе следующей транскрипции локуса CRISPR и последующего процессинга пре-crPHK входит уже в состав новой crPHK, которая, образуя комплекс с белками Cas, узнает последовательность экзогенной ДНК [120].

В некоторых системах CRISPR/Cas9 процессинг пре-crPHK активируется при связывании с ней одноцепочечной *tracr*-РНК (от англ. trans-activating RNA), которая комплементарна повторам в транскрипте локуса CRISPR. Образование дуплекса привлекает в свою очередь рибонуклеазу III, которая осуществляет процессинг пре-crPHK в присутствии Cas9. Было показано, что *tracr*-РНК необходима для специфического связывания с ДНК [93].

Полученные знания о работе CRISPR-системы открыли новые перспективы ее применения. В 2013 г. в журнале «Science» вышли две статьи о возможности с помощью CRISPR-системы с чрезвычайной точностью «редактировать» геномы высших организмов, включая человека [122] – [123]. Были синтезированы гидовые РНК системы CRISPR/Cas9, способные взаимодействовать с целевыми участками генома эукариотических клеток. В результате получили сайт-специфическую эндонуклеазу, представляющую собой белково-нуклеиновый комплекс, в котором ДНК-гидролизующим модулем служит эндонуклеаза Cas9, а в качестве ДНК-связывающего модуля выступают две гидовые, частично двуцепочечные *tracr*-РНК:crPHK, либо одна, химерная РНК, в

которой crРНК и tracrРНК соединены с помощью олигорибонуклеотидного линкера (рис. 1.24) [47], [93]. Получившиеся системы в экспериментах на клеточных культурах показали отличные результаты: с их помощью можно как удалять из ДНК заданные участки, так и вставлять нужные последовательности.

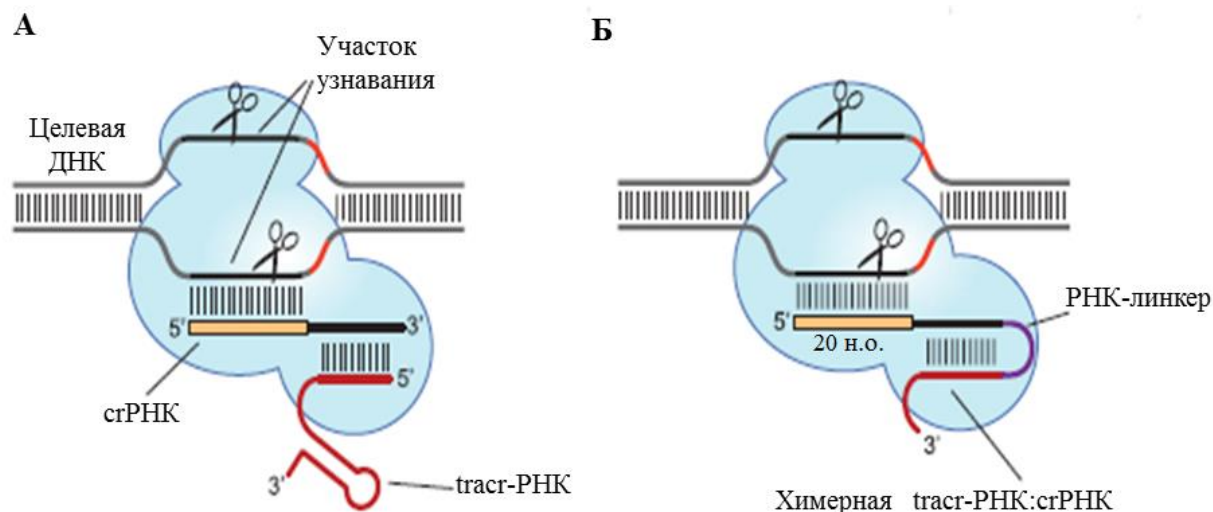


Рис. 1.24. Функционирование системы CRISPR/Cas9. **А.** Белково-нуклеиновый комплекс системы CRISPR/Cas9 с целевой ДНК. Эндонуклеаза Cas9 представлена голубым цветом, «ножницами» показано место гидролиза двух цепей двуцепочечной ДНК эндонуклеазой Cas9. Красным цветом обозначена tracrРНК, желтым – crРНК. **Б.** Искусственно созданный белково-нуклеиновый комплекс системы CRISPR/Cas9 с целевой ДНК, в котором две отдельные РНК – crРНК и tracrРНК – соединены с помощью олигорибонуклеотидного линкера и образуют одну химерную РНК [93].

Одними из первых систему CRISPR/Cas9 использовали Ву и соавт. для редактирования мутации в гене *Crygc* эмбриона мыши [124]. Мутация в этом гене приводит к развитию катаракты. После инъекции мРНК Cas9 и химерной гидовой РНК на стадии зиготы произошла гомологичная рекомбинация поврежденного участка гена *Crygc* с гомологичной хромосомой, несущей правильную последовательность гена *Crygc*. В результате данных манипуляций развился здоровый эмбрион мыши. В другом случае систему CRISPR/Cas9 применяли для исправления мутации в гене дистрофина, которая приводит к мышечной дистрофии Дюшенна [125]. На стадии зиготы проводили инъекцию мРНК Cas9, химерной гидовой РНК и одноцепочечного олигонуклеотида, служившего в качестве матрицы при гомологичной рекомбинации. Несмотря на то, что гомологичная рекомбинация произошла не во всех клетках (после стадии зиготы), результат эксперимента оказался положительным: развивались мыши без видимых проявлений мышечной дистрофии.

Лианг и соавт. продемонстрировали возможность редактирования генома человека на стадии зиготы с помощью системы CRISPR/Cas9 [126]. Авторы пытались исправить последовательность гена бета-гемоглобина, мутации в котором приводят к развитию бета-талассемии. Однако в ходе эксперимента появлялось множество нежелательных мутаций в геноме. Данная работа вызвала широкий резонанс как в научных кругах, так и в обществе [127] – [128]. По этическим соображениям и в целях безопасности легализация редактирования генома человека на стадии зиготы с помощью системы CRISPR/Cas9 в настоящее время не поддерживается научным сообществом [129].

1.6.6. Нуклеазы, узнающие «флэп»-структуру в ДНК

Описанные выше типы высокоспецифичных эндонуклеаз способны узнавать протяженную специфическую последовательность ДНК и гидролизовать ее в определенном положении. Однако недавно была сконструирована химерная нуклеаза, проявляющая строгую специфичность к субстрату с «флэп»-структурой [130]. Под «флэп»-структурой ДНК подразумевают дуплекс, в котором одна из цепей имеет свисающий, одноцепочечный участок. Созданная Ксу и соавт. [130] химерная нуклеаза состояла из соединенных в единую белковую молекулу Flap-эндонуклеазы 1 (FEN-1) и каталитического домена R.FokI. Природными субстратами FEN-1 являются ДНК с «флэп»-структурой. Эндонуклеаза FEN-1 участвует в процессах репликации и репарации ДНК, удаляя РНК-праймеры и поврежденные ДНК-фрагменты [131]. Особенности функционирования R.FokI были описаны выше (раздел 1.2.2).

Для тестирования активности полученной химерной нуклеазы *in vitro* была сконструирована гидовая ДНК, комплементарная участку целевой ДНК (рис. 1.25). Один нуклеотид на 3'-конце гидовой ДНК был некомплементарен соответствующему нуклеотиду в целевой ДНК и образовывал так называемую 3'-«флэп» структуру, узнаваемую FEN-1 [130]. После связывания химерной нуклеазы с такой «флэп» структурой каталитический домен R.FokI вносил разрыв в двуцепочечный участок. Для детекции продуктов реакции гидролиза на 5'-конец целевой ДНК вводили флуорофор Су5. Показано, что полученная химерная нуклеаза гидролизовала целевую ДНК, причем гидролиз происходил только в присутствии гидовой ДНК. Изолированные каталитический домен R.FokI и эндонуклеаза FEN-1 целевую ДНК не гидролизовали.

Активность химерной нуклеазы также анализировали *in vivo*. Для этого использовали трансгенные эмбрионы данио рерио, геном которых содержал ген флуоресцентного белка GFP. Гидовые ДНК, комплементарные участку гена GFP, и мРНК, кодирующую химерную нуклеазу, вводили в эмбрионы путем микроинъекции.

Последующий анализ генома данио рерио показал, что химерная нуклеаза гидролизовала ген белка GFP, однако с низкой эффективностью [130].

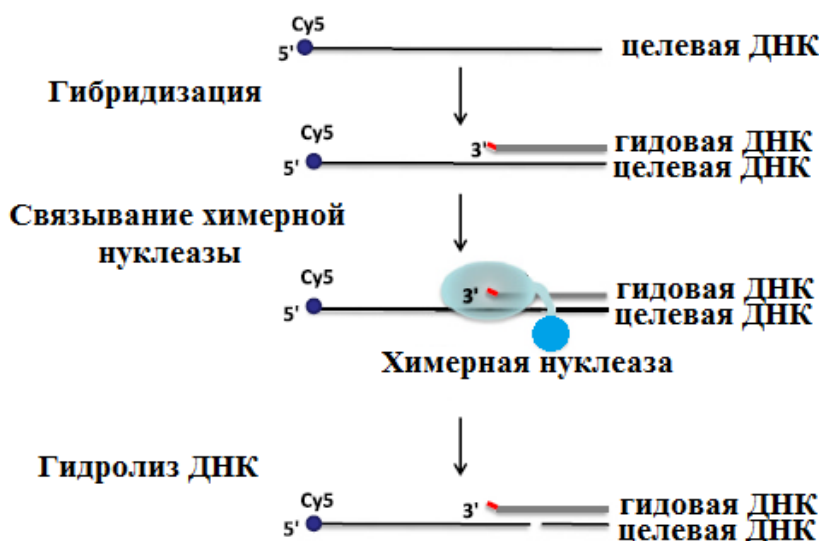


Рис. 1.25. Принцип функционирования *in vitro* структурно ориентированной химерной нуклеазы, состоящей из Flar эндонуклеазы 1 (выделена зеленым овалом) и каталитического домена R.FokI (выделен синим кругом). Неспаренный нуклеотид на 3'-конце гидовой ДНК выделен красным цветом.

Таким образом, в работе [130] впервые была продемонстрирована возможность создания структурно-зависимой нуклеазы, которая способна гидролизовать ДНК любой заданной последовательности. Специфичность такой нуклеазы определяют гидовые ДНК, образующие комплекс с целевой последовательностью. Недавно был описан еще один пример нуклеазы, функционирующей в присутствии гидовых ДНК – NgAgo (Natronobacterium gregoryi Argonaute) [132]. Ввиду простоты дизайна и синтеза гидовых ДНК подобные нуклеазы являются перспективными инструментами, которые в дальнейшем могут быть использованы для редактирования генома различных организмов.

1.7. Создание эндонуклеаз с регулируемой активностью

Как описано выше, для направленного гидролиза строго определенной последовательности в геноме используют как природные, так и искусственно сконструированные ферменты. Однако такие ферменты все же могут проявлять неспецифическую активность, поэтому создание эндонуклеаз с регулируемой активностью является актуальной задачей.

Для возможного использования ТФО-нуклеаз в условиях *in vivo* была разработана стратегия регулирования активности ЭР, входящей в состав такой ТФО-нуклеазы, с помощью внешнего сигнала [133].

Исходной точкой для этой работы послужил метод временной «блокировки» остатков цистеина, находящихся на поверхности димеризации R.MunI [134]. R.MunI является гомодимерным белком, который узнает в ДНК палиндромную последовательность 5'-C↓AATTG-3'/3'-GTAA↑C-5' (↓, ↑ – позиции гидролиза). Для «блокировки» остатки цистеина модифицировали нитробензильной группой, что препятствовало димеризации R.MunI и проявлению ферментативной активности. Дальнейшее облучение УФ-светом приводило к удалению нитробензильной группы и восстановлению активности R.MunI на 50% от исходного уровня. Модифицированная нитробензильной группой R.MunI была присоединена к триплекс-образующему олигонуклеотиду [133]. Как и ожидалось, полученный конъюгат не проявлял ферментативной активности. После облучения УФ-светом наблюдался гидролиз целевого субстрата, содержащего участок узнавания R.MunI между двумя триплекс-образующими последовательностями (рис. 1.26). В случае неспецифического субстрата, содержащего только участок узнавания R.MunI, гидролиз не наблюдался даже после продолжительной инкубации.

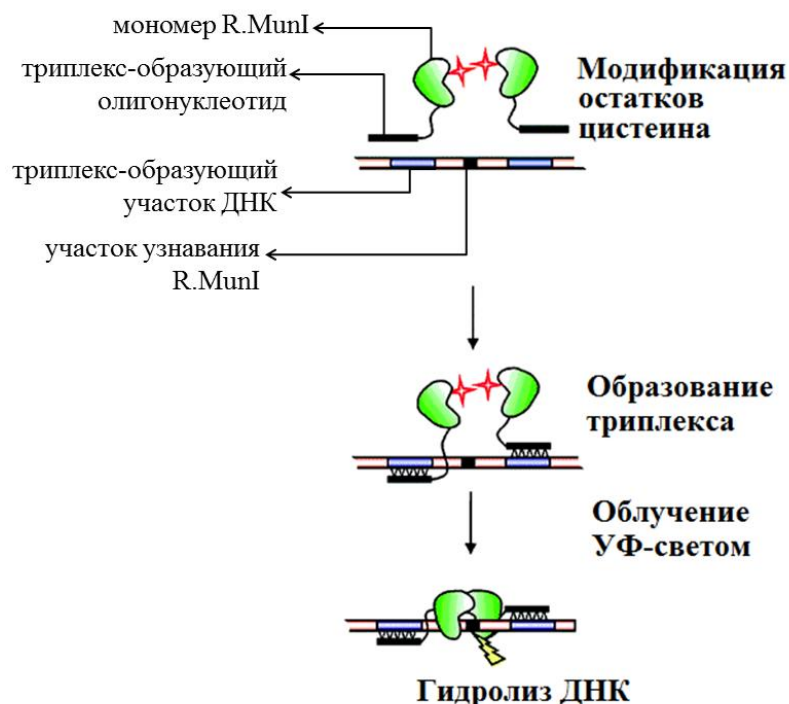


Рис. 1.26. Принцип регулирования активности конъюгата R.MunI с триплекс-образующим олигонуклеотидом за счет модификации остатков цистеина 2-нитробензилбромидом (НББ).

При создании белков, изменяющих свою активность в зависимости от облучения, широко применяются производные азобензола благодаря их уникальным свойствам: минимальное влияние дипольного момента среды на спектр поглощения и на процесс изомеризации, высокий выход *транс-цис*-перехода, существенное различие в геометрии между *цис*- и *транс*-изомерами (большая разница в расстоянии – $\sim 3.5 \text{ \AA}$ – и угле между бензольными кольцами молекулы азобензола в *цис*- и *транс*-конфигурации), короткое время изомеризации (1–10 пс), химическая устойчивость азобензола в отсутствие сильных восстановителей. *Транс*-конфигурация азобензола переходит в *цис*-конфигурацию при облучении ближним УФ-светом ($\sim 380 \text{ нм}$), а обратный переход осуществляется при облучении голубым светом (470 нм) или при инкубации в темноте [135] – [137] (схема 1.2).

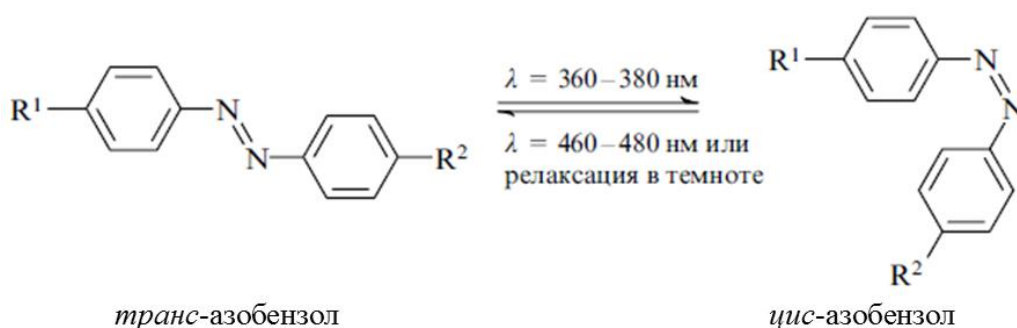


Схема 1.2

Фрагмент азобензола может быть введен в белки в процессе трансляции *in vitro* и *in vivo*, а также в результате химической модификации биомолекул. Стоит отметить, что химическая модификация является наиболее простым, эффективным и широко используемым методом [138].

Одним из способов регулирования активности ферментов с помощью остатков азобензола является изменение структуры α -спирали, находящейся в функционально значимой области белка, за счет изомеризации присоединенного к ней производного азобензола. В результате «фотопереключения» происходит либо разрушение α -спирали, либо изменение ее параметров, такой вариант регуляции структуры белка был назван методом «молекулярной пружины» [139].

Производные азобензола были успешно использованы для регулирования активности R.BamHI [140], R.PvuII [141], R.SsoII [142]. Подход для регулирования активности R.SsoII описан далее в разделе 2.4.

В случае R.PvuII для реализации подхода «молекулярная пружина» была создана мутантная форма фермента scPvuII (single chain PvuII), в которой С-конец одной субъединицы (N-субъединица) был соединен с N-концом другой субъединицы (С-субъединица) четырехзвенным пептидным линкером [141]. Известно, что в растворе wtR.PvuII существует в форме гомодимера [143]. Для регулирования активности scPvuII использовали 4,4'-бисмалеимидазобензол для соединения двух сближенных остатков цистеина, искусственно введенных в полипептидную цепь. В случае, когда две молекулы бисмалеимидазобензола находились рядом с каталитическим центром, а каталитически важный остаток Туг94 в непосредственной близости от него был заменен на Phe для уменьшения исходной активности фермента, был достигнут наилучший результат - 16-кратное различие в скоростях гидролиза ДНК белком при облучении УФ- и голубым светом [141].

Известно, что R.VamHI может специфически гидролизовать ДНК-дуплекс только в димерной форме [144]. Для регулирования активности этого фермента Накаяма и соавт. предложили подход, позволяющий влиять на процесс димеризации [140]. Аминокислоты в области контакта мономеров R.VamHI, которые играют ключевую роль в образовании димера, были заменены на производные азобензола. В результате были получены фотоактивируемые формы R.VamHI. В темноте ДНК-гидролизующая активность модифицированной R.VamHI (*транс*-конфигурация азобензола) была подавлена (степень расщепления ДНК-субстрата составляла 3%). Вероятно, азобензольный остаток в *транс*-конфигурации препятствовал взаимодействию двух мономеров R.VamHI. Облучение УФ-светом способствовало образованию правильной конформации димера (более компактная *цис*-конфигурация азобензола) и активность фермента практически полностью восстанавливалась (степень расщепления ДНК-субстрата достигала 98%).

* * *

Как следует из описанного выше, в научных исследованиях НЭ используются очень широко, однако они остаются мало исследованными ферментами. Целью данной работы являлось изучение механизма действия R.BspD6I, большая субъединица которой является НЭ, а также разработка методов регулирования активности R.SsoII и Nt.BspD6I для расширения границ их практического использования.

ГЛАВА 2. ГЕТЕРОДИМЕРНАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА РЕСТРИКЦИИ BspD6I И КОНЬЮГАТЫ ГОМОДИМЕРНОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ SsoII С ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДАМИ: ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ДНК

(Результаты и их обсуждение)

2.1. Характеристика объектов исследования

Одним из объектов данного исследования является гетеродимерная ЭР BspD6I, состоящая из двух различающихся по размеру и функциям субъединиц. Большая субъединица состоит из 604 а.о. (молекулярная масса – 70,8 кДа), малая – из 186 а.о. (молекулярная масса – 21,6 кДа). R.BspD6I узнает в двутяжевой ДНК последовательность 5'-GAGTC-3'/5'-GACTC-3', которая часто встречается в промоторах фаговых генов, например, бактериофага T7. Гидролиз ДНК происходит в присутствии ионов Mg^{2+} , которые выступают в качестве кофактора реакции расщепления (рис. 2.1) [145].

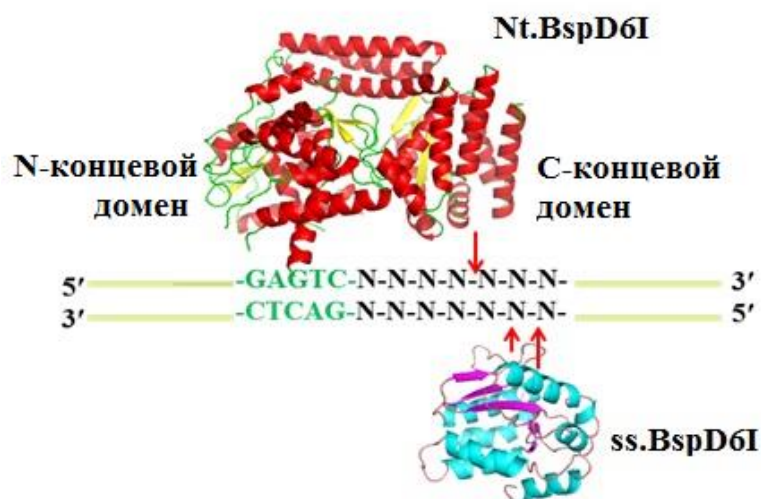


Рис. 2.1. Схема, демонстрирующая места гидролиза ДНК (красные стрелки) гетеродимерной R.BspD6I. Зеленым выделен участок узнавания R.BspD6I.

Большая субъединица R.BspD6I расщепляет «верхнюю» цепь ДНК на расстоянии 4 п.н. от узнаваемой последовательности в направлении 3'-конца. Малая субъединица R.BspD6I – ss.BspD6I (от англ. *s*mall *s*ubunit BspD6I) – гидролизует ДНК как на расстоянии 5 п.н. (~10%), так и на расстоянии 6 п.н. (~90%) нуклеотидов с 5'-конца от участка узнавания в противоположной цепи ДНК [145].

Большая субъединица R.BspD6I в отсутствие малой субъединицы может осуществлять разрыв («ник») только в одной цепи ДНК, то есть она является никующей эндонуклеазой, или никазой [59]. Ее обозначают как Nt.BspD6I. Строчная латинская буква

t указывает на то, что НЭ гидролизует «верхнюю» цепь ДНК (t – от англ. top: верхний). В отличие от Nt.BspD6I малая субъединица в изолированном виде не гидролизует субстрат, ее комплекс с ДНК пока не обнаружен. Предполагают, что малая субъединица входит в состав комплекса с большой субъединицей R.BspD6I и может ориентироваться таким образом, что становится способна к гидролизу «нижней» цепи ДНК (за ориентацию отвечает большая субъединица) [146]. Способность ss.BspD6I гидролизовать ДНК в двух соседних позициях может являться следствием либо слабого контакта с большой субъединицей, либо низкого сродства малой субъединицы к расщепляемой ДНК. Следует отметить, что до сих пор комплекс большой и малой субъединиц ни в присутствии, ни в отсутствие ДНК не зафиксирован. Методом РСА получены кристаллические структуры отдельно большой и малой субъединиц R.BspD6I [147] (рис. 2.2).

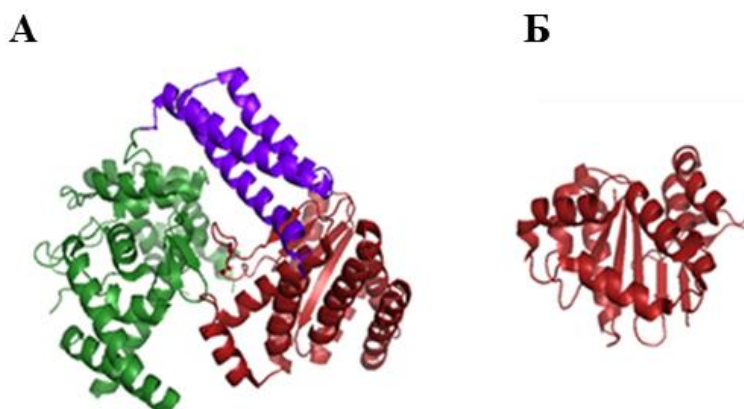


Рис. 2.2. А. Структура Nt.BspD6I (PDB код: 2ewf): N-концевой ДНК-связывающий домен (1-300 а.о., выделен зеленым), С-концевой каталитический домен (382-604 а.о., выделен красным) и расположенный между ними линкерный домен (301-381 а.о., выделен синим); Б. Структура ss.BspD6I (PDB код: 2p14).

Nt.BspD6I состоит из трех доменов: N-концевого, линкерного и С-концевого (рис. 2.2, А). Близким структурным гомологом Nt.BspD6I является R.FokI. N-Концевой домен R.FokI отвечает за узнавание и связывание ДНК, а С-концевой домен – за гидролиз ДНК [147]. На основании структурного сходства соответствующих доменов R.FokI и Nt.BspD6I было сделано предположение, что N-концевой домен Nt.BspD6I является ДНК-связывающим, С-концевой – каталитическим. Каталитический центр ЭР типа II образуют а.о., входящие в состав мотива PD...(D/E)XK (X – гидрофобный а.о.). В С-концевом домене Nt.BspD6I располагается сходная последовательность а.о., включающая R455, D456, E469, V470, E482. Результаты анализа свойств мутантных форм Nt.BspD6I, в которых один из этих остатков был подвергнут замене, подтверждают их существенную роль в катализе.

На основании сравнения пространственных структур Nt.BspD6I и ss.BspD6I можно полагать, что ss.BspD6I имеет только каталитический домен (рис. 2.3). В состав активного центра малой субъединицы предположительно входят а.о. D60, E73 и E86 [146].

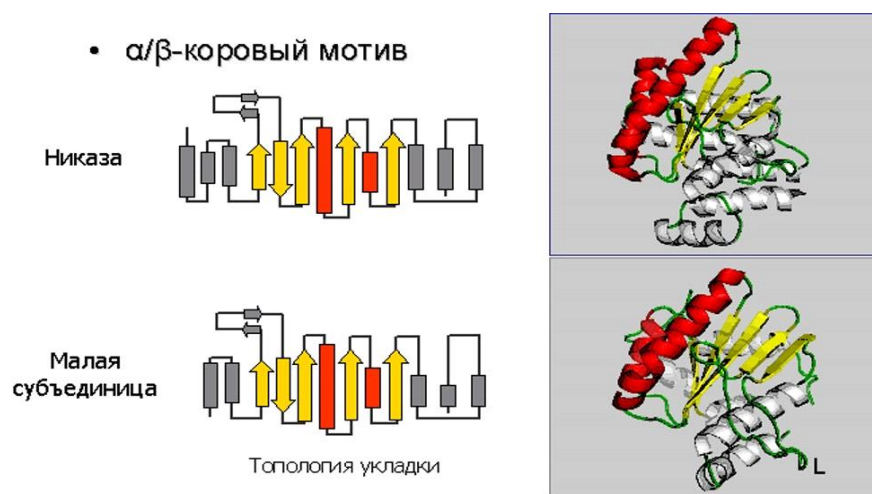


Рис. 2.3. Сравнение пространственных структур и топологии укладки структурных элементов ss.BspD6I и каталитического домена Nt.BspD6I. Желтым цветом обозначены β -тяжи, красным – α -спирали, которые, предположительно, участвуют во взаимодействии с ДНК. L – петля в малой субъединице [146].

Отсутствие ДНК-связывающего центра у ss.BspD6I, вероятно, и объясняет неспособность малой субъединицы R.BspD6I взаимодействовать с ДНК в отсутствие большой. На основании пространственных структур Nt.BspD6I и ss.BspD6I с помощью компьютерного моделирования была сконструирована модель комплекса обеих субъединиц R.BspD6I с ДНК (рис. 2.4) [147].

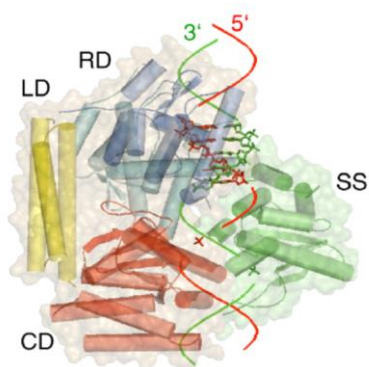


Рис. 2.4. Модель комплекса Nt.BspD6I и ss.BspD6I с ДНК. CD – каталитический домен Nt.BspD6I, LD – линкерный домен Nt.BspD6I, RD – ДНК-связывающий (узнающий) домен Nt.BspD6I, SS – малая субъединица R.BspD6I [147].

Однако эта модель требует экспериментального подтверждения. Необходимо отметить, что механизм взаимодействия R.BspD6I с ДНК практически не исследовался. Никующие эндонуклеазы, в том числе и Nt.BspD6I, несмотря на их большую

практическую значимость и, вероятно, важную роль в биологических процессах, также остаются малоизученным классом ферментов.

В качестве второго модельного белка была выбрана гомодимерная эндонуклеаза рестрикции SsoII. Она входит в систему рестрикции-модификации II-го типа бактерии *Shigella sonnei* 47 [148]. Белок имеет в своем составе 305 аминокислотных остатков (а.о.), его молекулярная масса составляет 35,9 кДа. Фермент узнаёт в двуцепочечной ДНК последовательность нуклеотидов 5'-↓CCN₃GG-3'/3'-GGNCC↑-5' (N = A, T, G или C) и гидролизует ДНК на границах этого участка в местах, указанных стрелками [11]. В связывании ДНК участвуют аминокислотные остатки R186, R187, R188 (контакты с гетероциклическими основаниями) и R116, R117, R119 (контакты с углеводофосфатным остовом), в катализе гидролиза ДНК-субстрата – E125, D160, K182, E195 [11]. R.SsoII является изошизомером и ближайшим гомологом эндонуклеазы рестрикции Ecl18kI (R.Ecl18kI). Ферменты отличаются одной аминокислотой – V232 в R.Ecl18kI соответствует I232 в R.SsoII. Для комплекса R.Ecl18kI с субстратом имеются данные рентгеноструктурного анализа (рис. 2.5), которые находятся в полном соответствии с результатами биохимических исследований контактов R.SsoII с ДНК и, таким образом, могут быть использованы при работе с R.SsoII.

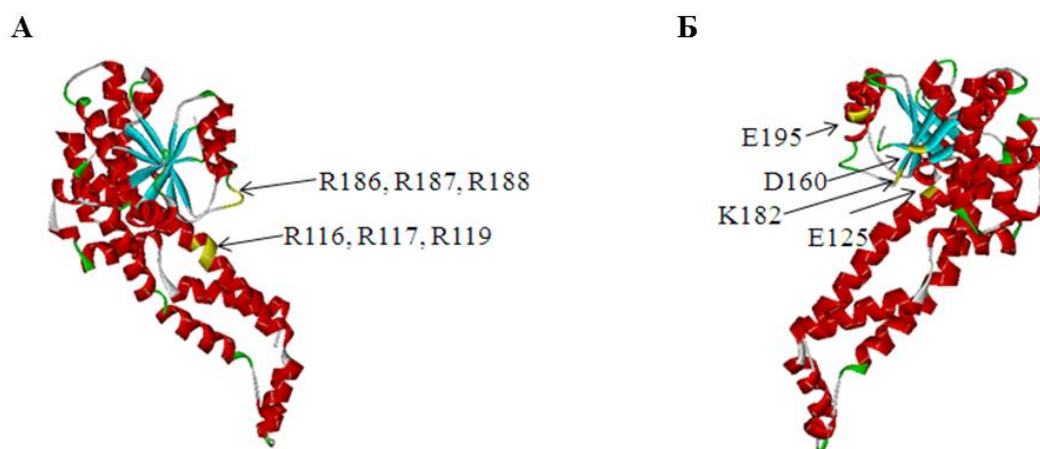


Рис. 2.5. Структура мономера R.SsoII, представленная на основе данных PCA для комплекса R.Ecl18kI с субстратом (PDB-код 2fqz, [149]). А – Аминокислоты, участвующие в связывании (контакт с гетероциклическими основаниями – R186, R187, R188; контакт с углеводофосфатным остовом – R116, R117, R119). Б – Аминокислоты, участвующие в катализе (E125, D160, K182, E195).

2.2. Изучение свойств эндонуклеазы рестрикции BspD6I и особенностей ее взаимодействия с ДНК

Основной задачей данной части исследования являлась характеристика взаимодействия Nt.BspD6I с немодифицированными ДНК-дуплексами различной длины,

содержащими участок узнавания фермента, и выявление ДНК-субстрата оптимальной структуры. Оценку эффективности связывания фермента с субстратом и гидролиза ДНК проводили методом гель-электрофореза. Для определения кинетических параметров взаимодействия НЭ с ДНК применяли метод акустической детекции на пьезоэлектрическом сенсоре. Впервые анализировалась способность Nt.BspD6I изгибать ДНК в процессе комплексообразования. Для этого использовали метод круговых перестановок, основанный на различной относительной подвижности ДНК-белковых комплексов в полиакриламидном геле (ПААГ) в зависимости от положения участка узнавания белка в субстрате. Важнейшим направлением работы стало установление взаимосвязи между функционированием двух субъединиц гетеродимерной ЭР BspD6I. Для решения этой задачи изучали взаимодействие Nt.BspD6I (большая субъединица) и малой субъединицы в составе гетеродимера с различными фрагментами ДНК, в том числе и модифицированными. Последние представляли собой дуплексы, содержащие остатки N6-метил-2'-дезоксиаденозина (m⁶A) в участке узнавания, нуклеозидную вставку с остатком азобензола в местах гидролиза или примыкающих к нему последовательностях, а также ДНК, имитирующую продукт гидролиза субстрата Nt.BspD6I.

2.2.1. Определение угла изгиба ДНК, индуцируемого никующей эндонуклеазой BspD6I

Как было отмечено выше, к настоящему моменту многие аспекты взаимодействия Nt.BspD6I с субстратом остаются невыясненными. Одним из таких аспектов является выяснение вопроса, изгибает ли Nt.BspD6I ДНК при связывании с участком узнавания. Отметим, что способность ЭР II типа вызывать при связывании изгиб ДНК не подчиняется никакой закономерности. В некоторых случаях ДНК остается в канонической В-форме, как например, в комплексе с R.BamHI, R.BsoBI, в то время как в специфическом комплексе с R.EcoRV ДНК оказывается изогнутой на 50° [16]. Существует несколько методов определения угла изгиба ДНК, индуцированного белком. Есть прямые методы, позволяющие непосредственно измерять угол изгиба ДНК: атомно-силовая микроскопия (АСМ) и рентгено-структурный анализ (РСА) [150]. Также существуют непрямые методы определения угла изгиба ДНК, такие как метод анализа круговыми перестановками и FRET (Ферстеровский резонансный перенос энергии, от англ. Förster resonance energy transfer).

В данной работе был использован метод круговых перестановок, предложенный Феррари и соавт. [151]. Ранее в работах по анализу движения молекул ДНК в

полиакриламидном геле (ПААГ) было показано, что в зависимости от наличия, положения и величины изгиба ДНК, последняя имеет различную электрофоретическую подвижность в геле [152]. Подвижность фрагмента ДНК с изгибом в центре намного ниже подвижности фрагмента ДНК той же длины с изгибом на конце.

Таким образом, для определения угла изгиба ДНК, вызванного связыванием с белком, необходимо сконструировать фрагменты ДНК одинаковой длины, но имеющие участок узнавания данного белка в различных положениях. Ключевое допущение данного метода в применении к ДНК-белковым комплексам заключается в том, что вся разница в подвижности объясняется изменением конформации ДНК. Предполагается, что вклад белка в подвижность комплекса не зависит от расположения его участка узнавания относительно конца фрагмента ДНК.

Проводя комплексообразование данных фрагментов ДНК с белком, индуцирующим изгиб ДНК, и анализируя комплексы методом «торможения» в ПААГ (метод основан на том, что электрофоретические подвижности ДНК-белкового комплекса и свободной ДНК различаются), можно получить соответствующую электрофореграмму, из которой и рассчитывается угол изгиба ДНК по формуле

$$y = ax^2 - bx + c \quad (1),$$

где y – отношение подвижностей ДНК в комплексе с белком и свободной ДНК; x – отношение расстояния от центра участка связывания до 5'-конца фрагмента к полной длине фрагмента. Угол изгиба ДНК определяется с помощью коэффициентов a , b и c по формуле

$$a = -b = 2c \times (1 - \cos\alpha) \quad (2),$$

где α – угол изгиба ДНК.

Нужные фрагменты ДНК можно получить, используя плазмиду, в которой участок узнавания анализируемого белка фланкирован многочисленными участками гидролиза различных ЭР. Проводя гидролиз плазмиды соответствующими ЭР, можно получить необходимое для анализа число фрагментов ДНК. Ранее была сконструирована плазида pBend2 [153], любезно предоставленная нам доктором В. Венде (Университет имени Ю. Либиха, г. Гиссен, Германия). Плазида pBend2 может быть амплифицирована в клетках *E. coli* и содержит селективный маркер – ген устойчивости к ампициллину. Она имеет длину 2688 п.н. и содержит мультирестрикционный участок длиной 240 п.н., состоящий из двух половин. Эти две половины представляют собой два идентичных набора участков узнавания различных ЭР.

В данной работе на основе плазмиды pBend2 были получены 120-звенные ДНК-дуплексы, содержащие участок узнавания Nt.BspD6I в различных положениях. При

анализе нуклеотидной последовательности плазмиды pBend2 было выяснено, что участок узнавания Nt.BspD6I встречается в мультирестрикционном участке только один раз и располагается почти в центре этого участка (рис. 2.6), что значительно упростило дальнейшее проведение эксперимента. Для амплификации мультирестрикционного участка проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием в качестве матрицы плазмиды pBEND2, для этого были подобраны праймеры F1 и R1 (рис. 2.6). Для получения целевых ДНК-дуплексов ПЦР-продукт длиной 436 п.н. подвергали гидролизу различными ЭР: BglII, NheI, SpeI, XhoI, EcoRV, SmaI, StuI или BamHI (рис. 2.7).

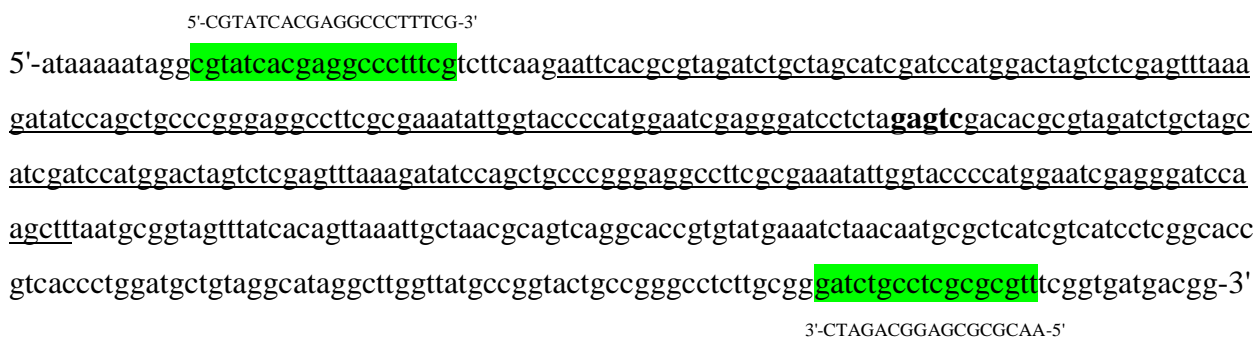


Рис. 2.6. Праймеры F1 и R1, а также участок плазмиды pBend2, которому они комплементарны (приведена последовательность только одной цепи, зеленым цветом показано место гибридизации праймеров). Мультирестрикционный участок длиной 240 п.н. подчеркнут, участок узнавания Nt.BspD6I выделен жирным шрифтом. Длина ПЦР-продукта составляет 436 п.н.



Рис. 2.7. Фрагмент плазмиды pBEND2 с участком узнавания Nt.BspD6I (выделен серым прямоугольником), фланкированным тандемно повторяющимися участками узнавания различных ЭР. В результате гидролиза ПЦР-продукта различными ЭР были получены 120-звенные фрагменты ДНК с различным положением участка узнавания Nt.BspD6I.

Анализ продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в агарозном геле (рис. 2.8). Видно, что целевой фрагмент длиной 436 п.н. является доминирующим продуктом реакции.

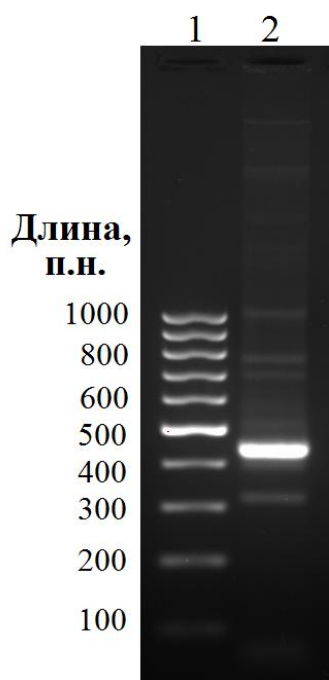


Рис. 2.8. Анализ продуктов ПЦР. Дорожка 1 – маркер длины ДНК, п.н.; 2 – реакционная смесь после проведения ПЦР. Электрофорез проводили в 2%-ном агарозном геле, содержащем EtBr, в течение 40-50 мин при напряженности поля 10 В/см. Зоны, содержащие ДНК, визуализировали под УФ.

После очистки ПЦР-фрагмента длиной 436 п.н. проводили независимые реакции, в каждой из которых его гидролизовали различными ЭР. Реакционные смеси анализировали в 7%-ном ПААГ. В качестве примера на рис. 2.9 приведен анализ продуктов реакции после гидролиза ПЦР-фрагмента R.BglII, в случае гидролиза другими ЭР наблюдалась похожая картина. Исходный ПЦР-фрагмент содержит 2 участка узнавания каждой из используемых ЭР, поэтому возможно образование трех различных продуктов гидролиза: в результате расщепления в первом или втором участке узнавания, а также одновременно в обоих. Как видно из рис. 2.9, целевой продукт длиной 120 п.н. не является основным продуктом реакции, поэтому этот продукт вырезали и выделяли из геля водным раствором перхлората лития. Затем ДНК-фрагмент осаждали ацетоном.

Ранее было показано, что Nt.BspD6I в зависимости от концентрации как в присутствии, так и в отсутствие ДНК может находиться в трех формах: в виде мономера, димера и тримера [154]. Задачей настоящей работы являлось определение угла изгиба ДНК, вызванного связыванием мономера Nt.BspD6I. Поэтому сначала необходимо было подобрать условия, при которых Nt.BspD6I эффективно связывает ДНК, но остается в мономерной форме.

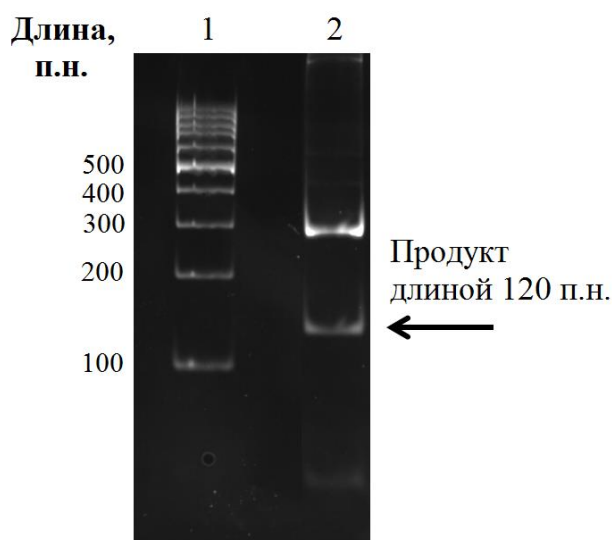


Рис. 2.9. Анализ продуктов гидролиза 436-звенного ПЦР-фрагмента R.VglII. Дорожка 1 – маркер длины ДНК, п.н.; 2 – реакционная смесь после гидролиза R.VglII в течение 15 ч при 37°C. Фотография 7%-ного ПААГ, окрашенного раствором SybrGold.

Для этого в качестве модельного субстрата использовали ДНК-фрагмент **I-D** в концентрации 100 нМ и изучали его комплексообразование с ферментом при возрастающих концентрациях последнего (рис. 2.10). Видно, что при концентрации 50 нМ Nt.BspD6I образует комплекс с ДНК преимущественно в виде мономера, тогда как при более высоких концентрациях наблюдается образование комплекса димера Nt.BspD6I с ДНК. Поэтому для дальнейшей работы была выбрана 50 нМ концентрация Nt.BspD6I.

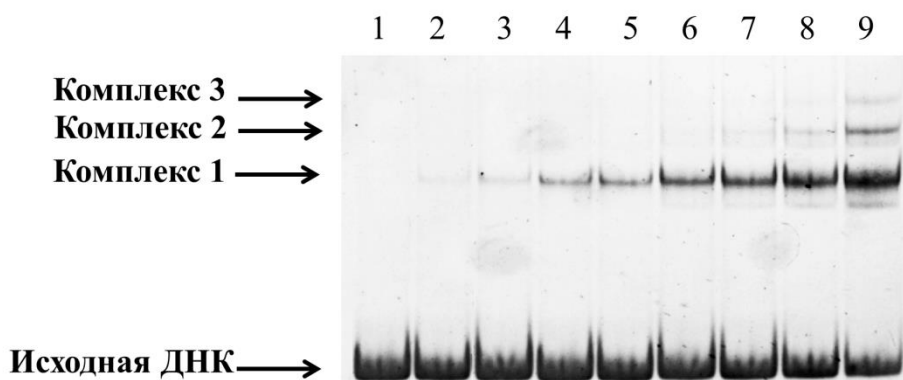


Рис. 2.10. Образование комплекса Nt.BspD6I с ДНК-дуплексом **I-D**. Фотография 7%-ного ПААГ после окрашивания SYBR Gold. Концентрация ДНК-дуплекса составляла 100 нМ, концентрация Nt.BspD6I - 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 нМ (дорожки 1-9, соответственно). Реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Комплекс 1 соответствует комплексу дуплекса **I-D** с мономером Nt.BspD6I, комплекс 2 – с димером Nt.BspD6I, комплекс 3 – с тримером Nt.BspD6I.

Затем проводили комплексообразование Nt.BspD6I со всеми полученными ДНК-дуплексами **I-A–I-H** (табл. 3.1), реакционные смеси анализировали в 7%-ном ПААГ, рассчитывали подвижность ДНК-белковых комплексов относительно подвижности свободной ДНК. На основе уравнений (1) и (2) был определен угол изгиба ДНК в комплексе с Nt.BspD6I, соответствующий $66 \pm 4^\circ$ (рис. 2.11). Эксперимент по

комплексообразованию Nt.BspD6I со 120-звенными ДНК-дуплексами проводили независимо 4 раза, точность аппроксимации полученных данных является высокой (коэффициент детерминации $R^2 = 0,99$).

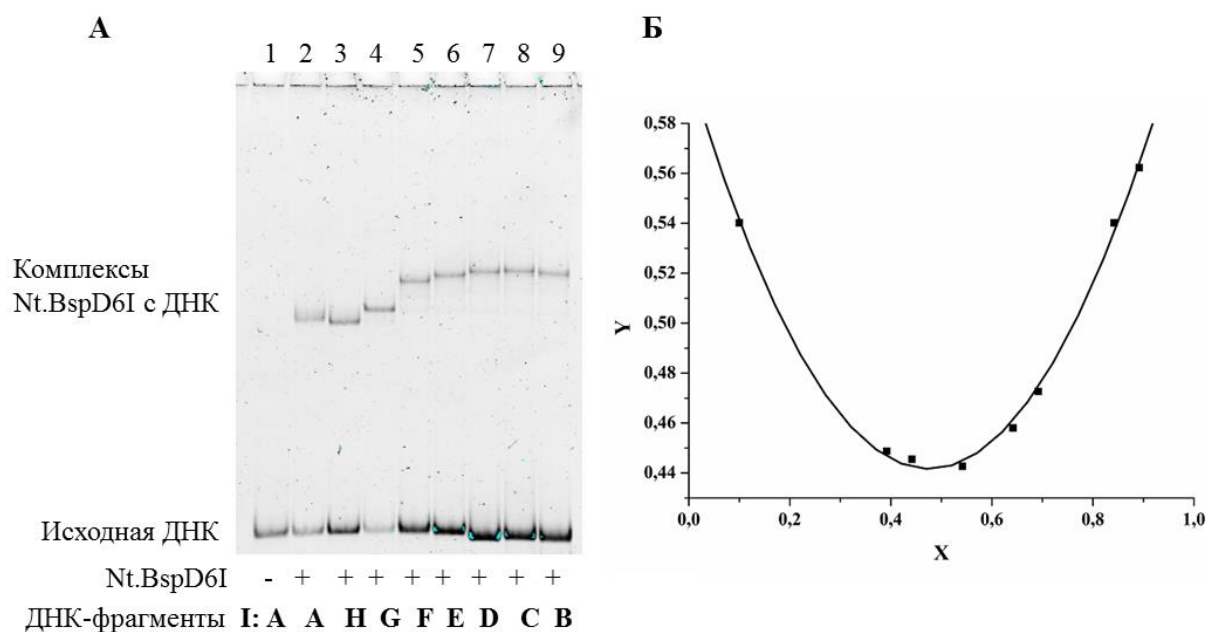


Рис. 2.11. Определение угла изгиба ДНК в комплексе с Nt.BspD6I. **А.** Комплексообразование Nt.BspD6I с ДНК-фрагментами **I-A–I-H**. Фотография 7%-ного ПААГ после окрашивания SYBR Gold. **Б.** Аппроксимация полученных данных параболической функцией $y = 0,85x^2 - 0,83x + 0,63$.

Надо заметить, что в предложенной ранее модели комплекса R.BspD6I с ДНК (рис. 2.4) изгиб не учитывается [147]. Вероятно, данная модель нуждается в корректировке с учетом полученных данных. В работе [155] с помощью метода АСМ также было продемонстрировано наличие изгиба некоторых молекул ДНК в комплексе с Nt.BspD6I. Авторы отметили, что в большинстве случаев посадка белка на ДНК не приводила к сильной деформации: ДНК оставалась вытянутой. Однако наряду с этим были детектированы молекулы, изогнутые в месте посадки белка под разными углами. В нашей работе впервые показано, что Nt.BspD6I при связывании изгибает ДНК, и определено значение угла изгиба ДНК.

Как сказано выше, ss.BspD6I не способна самостоятельно связывать ДНК, и можно было предположить, что она также не способна вызывать изгиб ДНК. Действительно, в наших экспериментах было показано, что присутствие ss.BspD6I не влияло на величину изгиба ДНК, индуцированного связыванием Nt.BspD6I. Возможно, наличие изгиба ДНК в комплексе с Nt.BspD6I также является необходимым фактором для проявления активности ss.BspD6I.

2.2.2. Характеристика свойств эндонуклеазы рестрикции *VspD6I* с помощью немодифицированных ДНК-дуплексов

Для дальнейшей характеристики взаимодействия R.*VspD6I* с ДНК-субстратом были использованы относительно короткие синтетические ДНК-лиганды. Такие ДНК-лиганды позволяют определить оптимальные условия функционирования ДНК-узнающих белков и охарактеризовать термодинамические и кинетические параметры процесса.

2.2.2.1. Влияние длины последовательностей, фланкирующих участок узнавания, на взаимодействие никующей эндонуклеазы *VspD6I* с ДНК

Известно, что функционирование эндонуклеаз рестрикции определяется, главным образом, их взаимодействием с участком узнавания в ДНК. Однако нуклеотидные последовательности, примыкающие к участку узнавания, оказывают значительный эффект на расщепление ДНК. Кроме того, длина фланкирующих последовательностей может быть существенной для формирования продуктивного фермент-субстратного комплекса [156].

На первом этапе работы необходимо было выбрать ДНК-субстрат оптимальной длины для изучения связывания и гидролиза R.*VspD6I*. Так как ДНК-узнающий центр эндонуклеазы рестрикции, предположительно, находится только в составе большой субъединицы (Nt.*VspD6I*) [147], то для подбора ДНК-субстрата оптимальной длины использовали только Nt.*VspD6I*. Для этой цели была предложена серия ДНК-дуплексов **II – VII**, длина которых составляла 14, 16, 19, 22, 26, 30 п.н., соответственно. Все они содержали участок узнавания Nt.*VspD6I* (рис. 2.12). В ДНК-дуплексах **VI** и **VII** последовательности, фланкирующие участок узнавания и место гидролиза – протяженные, их длина превышает 8 п.н. В ДНК-дуплексах **II**, **III**, **IV** последовательности, фланкирующие участок узнавания с 5'-конца – короткие (2 или 4 п.н.), а фланкирующие место гидролиза варьируют от 3 до 6 п.н. ДНК-дуплекс **V** является несимметричным относительно предполагаемого места посадки Nt.*VspD6I*. Он фланкирован только 2 п.н. с 5'-конца от узнаваемой Nt.*VspD6I* последовательности и 11-звенным фрагментом с 3'-конца от места гидролиза.

Оптимальная температура для функционирования Nt.*VspD6I* – 55°C [59], однако используемые ДНК-дуплексы являются достаточно короткими и температура плавления ($T_{пл}$) дуплекса **II** (52°C) близка к 55°C. Это означает, что при проведении экспериментов при 55°C дуплекс **II** может быть частично диссоциирован. Поэтому эффективность гидролиза дуплексов **II – VII** Nt.*VspD6I* оценивали при 37°C в течение 30 мин. При этой температуре Nt.*VspD6I* характеризуется достаточно высокой активностью (рис. 2.13).

Реакционная смесь содержала 10 мМ MgCl₂, т.к. ионы Mg²⁺ являются кофактором реакции расщепления ДНК эндонуклеазами [156]. Продукты гидролиза анализировали в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной. Радиоактивную метку (³²P) вводили на 5'-конец гидролизуемых Nt.BspD6I цепей ДНК-дуплексов.



Рис. 2.12. Структуры ДНК-дуплексов различной длины, используемых для изучения взаимодействия с Nt.BspD6I. Красным выделен участок узнавания Nt.BspD6I, стрелкой отмечено место гидролиза.

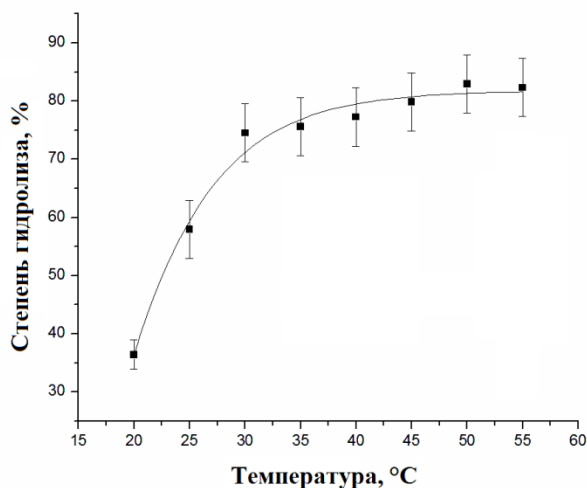


Рис. 2.13. График зависимости степени гидролиза Nt.BspD6I 30-звенного субстрата VII от температуры. Гидролиз проводился в течение 30 мин (10 нМ Nt.BspD6I, 10 нМ ДНК-дуплекс VII).

Показано, что Nt.BspD6I способна эффективно расщеплять все предложенные ДНК-дуплексы длиной от 14 до 30 п.н. (степени гидролиза дуплексов – больше 80%) (рис. 2.14, А). Следовательно, для протекания ферментативной реакции достаточно, чтобы фланкирующие последовательности с 5'-конца от участка узнавания составляли 2 п.н., а с 3'-конца от места гидролиза – 3 п.н.

Комплексообразование Nt.BspD6I с 5'-³²P ДНК-дуплексами различной длины изучали в течение 30 мин при 37°C в присутствии 10 мМ CaCl₂. Известно, что ионы Ca²⁺ способствуют формированию специфического фермент-субстратного комплекса, но в большинстве случаев препятствуют гидролизу ДНК эндонуклеазами рестрикции [156]. За ходом комплексообразования следили методом «торможения» в 7%-ном ПААГ в неденатурирующих условиях. Более прочный комплекс Nt.BspD6I образовала с 26- и 30-звенными ДНК-дуплексами (рис. 2.14, Б). Степени связывания для 26- и 30-звенных ДНК-дуплексов с Nt.BspD6I составили свыше 74%, тогда как для остальных составляли не более 50%.

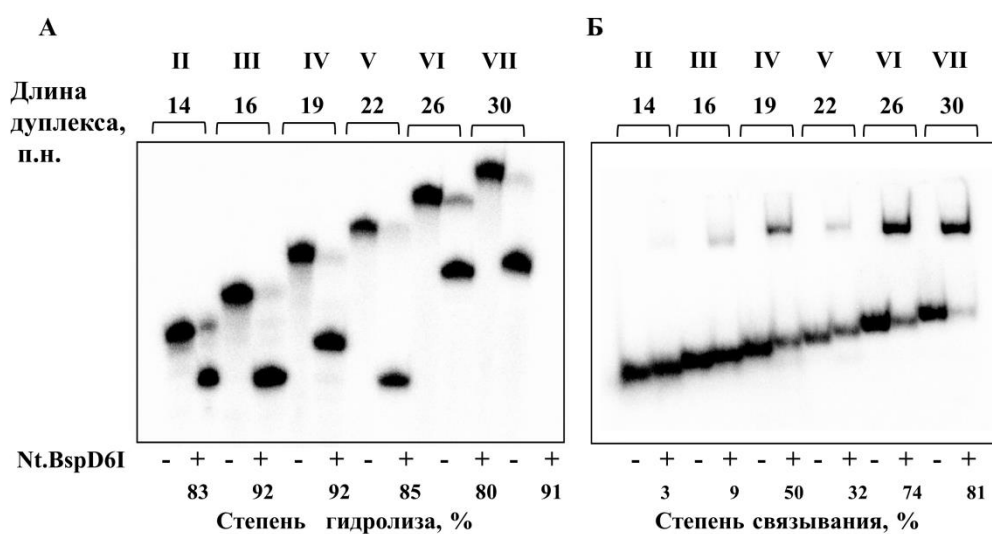


Рис. 2.14. А. Гидролиз Nt.BspD6I 5'-³²P-меченных ДНК-дуплексов II – VII, содержащих 14, 16, 19, 22, 26 и 30 п.н., соответственно. Радиоавтограф 20%-ного ПААГ, содержащего 7 М мочевины. Каждому ДНК-дуплексу соответствуют две дорожки: контроль (исходная ДНК) и результат гидролиза (ДНК-дуплекс + Nt.BspD6I). Концентрации Nt.BspD6I и ДНК-дуплексов во всех пробах одинаковы (10 нМ и 10 нМ, соответственно). Б. Связывание Nt.BspD6I с 5'-³²P-мечеными ДНК-дуплексами II – VII. Радиоавтограф 7%-ного ПААГ после электрофореза в неденатурирующих условиях. Каждому ДНК-дуплексу соответствуют две дорожки: контроль (исходная ДНК) и результат связывания белка с ДНК (ДНК-дуплекс + Nt.BspD6I). Концентрации Nt.BspD6I и ДНК-дуплексов во всех пробах одинаковы (25 нМ и 10 нМ, соответственно).

Сравнение эффективности комплексообразования Nt.BspD6I с дуплексами различной длины позволяет сделать вывод о том, что для эффективного связывания Nt.BspD6I с ДНК-дуплексом последний должен содержать не менее 4 п.н., фланкирующих участок узнавания с 5'-конца. Таким образом, Nt.BspD6I наиболее эффективно взаимодействует с 26- и 30-звенным ДНК-дуплексами.

Были определены константы диссоциации (K_d) комплексов Nt.BspD6I с дуплексами VI и VII. Традиционным методом является определение K_d методом Скэтчарда [157]. Однако его использование дает большую погрешность измерения [158]. Поэтому мы

использовали подход, в котором кажущуюся K_d определяли как концентрацию белка, при которой половина ДНК-лиганда находится в комплексе с белком [159].

Равновесие в растворе, содержащем ДНК-связывающий белок (E) и ДНК-лиганд (L), может быть описано следующим уравнением:



где EL – комплекс белка с ДНК-дуплексом.

Этот процесс характеризуется константой равновесия (диссоциации) K_d :

$$K_d = [E] \times [L] / [EL],$$

и следующими уравнениями материального баланса:

$$E_0 = [EL] + [E],$$

$$L_0 = [EL] + [L],$$

где [L], [E] и [EL] – равновесные концентрации ДНК-лиганда, белка и ДНК-белкового комплекса соответственно; E_0 и L_0 – общие (суммарные) концентрации ДНК-лиганда и белка.

Из приведенных выше уравнений следует, что $[EL] / L_0 = [E] / (K_d + [E])$.

Отношение $[EL]/L_0$ соответствует степени связывания ДНК-лиганда с белком, эта функция начинает возрастать от нуля и при увеличении концентрации [E] асимптотически приближается к максимальному значению, характерному для каждого случая. Если половина ДНК-лиганда связана с белком, то есть $[EL]/L_0 = 0,5$, то K_d эквивалентна концентрации несвязанного в комплекс белка [E]. Если концентрация ДНК-дуплекса меньше предполагаемого значения K_d , можно считать, что в уравнении $E_0 = [EL] + [E]$ равновесная концентрация комплекса [EL] мала и $[E] = E_0$.

На сегодняшний день широко доступно программное обеспечение, позволяющее обрабатывать экспериментальные данные с помощью нелинейных уравнений. Приблизительно оценить значение K_d можно методом нелинейной регрессии в программе Origin, используя в качестве регрессионной модели функцию гиперболы с уравнением $y = P1 \cdot x / (P2 + x)$ [160]. Параметр P1 в нашем случае равен 1, а P2 соответствует K_d , переменные x и y обозначают концентрацию добавленного белка и степень связывания ДНК, соответственно. В этом случае также делается допущение, что $[E] = E_0$, и как следствие значение K_d получается несколько завышенным. В случае высокого сродства Nt.BspD6I к дуплексам VI и VII абсолютное значение K_d окажется невелико, как и погрешность данного метода.

Чтобы определить концентрацию ДНК-дуплекса VI и VII, при которой можно корректно оценить кажущуюся K_d , было исследовано комплексообразование ДНК-

дуплексов (концентрации 1000, 100, 50, 20 и 5 нМ) с Nt.BspD6I в соотношении ДНК:белок – 1:5, 1:2, 1:1, 1:0,5. При использовании 5 нМ концентрации ДНК-дуплексов **VI** и **VII** «прикидочное» значение K_d было больше концентрации самих дуплексов. Таким образом, для определения кажущейся K_d выбрали 5 нМ концентрацию ДНК-лиганда, использование меньшей концентрации увеличило бы погрешность измерения.

Согласно результатам трех экспериментов K_d комплексов Nt.BspD6I с ДНК-дуплексами **VI** и **VII** равны 7 ± 1 нМ и 8 ± 1 нМ, что свидетельствует о высоком сродстве фермента к субстрату. В дальнейшем ДНК-дуплексы **VI** и **VII** были использованы в качестве базовых субстратов для изучения особенностей взаимодействия большой и малой субъединиц R.BspD6I с ДНК.

Уравнение Скэтчарда также может быть представлено в следующем виде:

$$[EL] / [L] = \alpha / K_d - [EL] / K_d,$$

где α – концентрация доступных участков связывания белка [161], что в нашем случае эквивалентно активной концентрации Nt.BspD6I. Для определения значения α была изучена зависимость отношения концентраций связанного в комплекс и свободного ДНК-субстрата (величины $[EL]/[L]$) от концентрации фермент-субстратного комплекса $[EL]$. Для этого в экспериментах по связыванию варьировали концентрацию радиоактивно меченного ДНК-дуплекса **VII** (от 1 до 10 нМ) при постоянной концентрации Nt.BspD6I (10 нМ). Полученную зависимость $[EL]/[L]$ от $[EL]$ аппроксимировали прямой линией, из уравнения прямой определяли значение коэффициента α (рис. 2.15). Согласно полученным данным, доля активного фермента в препарате Nt.BspD6I составляла 45%. Далее указывается общая концентрация фермента, определенная спектрофотометрически.

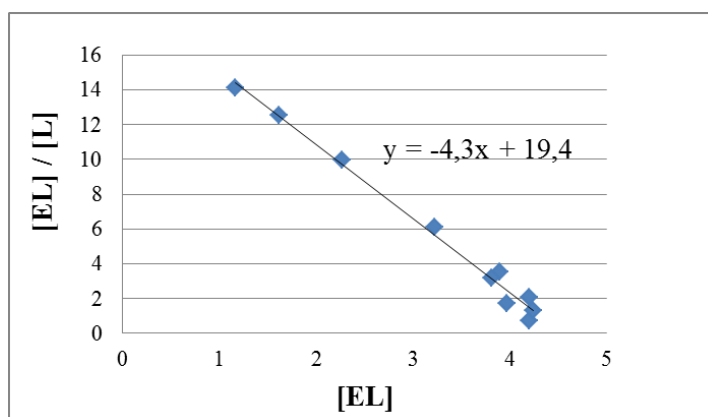


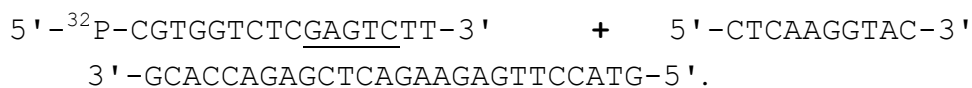
Рис. 2.15. Определение активной концентрации Nt.BspD6I с помощью уравнения Скэтчарда.

2.2.2.2. Влияние малой субъединицы *VspD6I* на активность никующей эндонуклеазы *VspD6I*

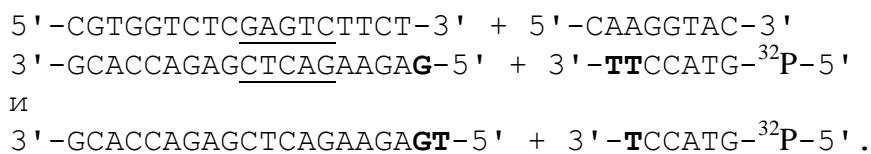
Для оценки влияния *ss.VspD6I* на активность *Nt.VspD6I* необходимо было подобрать условия, в которых эффективно происходит гидролиз обеих цепей ДНК. Активность *ss.VspD6I* проявляется только в присутствии *Nt.VspD6I* [145]. Оптимальное соотношение субъединиц в составе *R.VspD6I* определяли экспериментальным путем.

Изучали гидролиз *R.VspD6I* отдельно каждой из цепей 26-звенного субстрата **VI** (рис. 2.12). ³²P-метку вводили поочередно на 5'-конец одной из них. В качестве базовых условий использовали 10 нМ концентрацию *Nt.VspD6I*, 10 нМ концентрацию субстрата и проводили реакцию гидролиза при 37°C в течение 30 мин в присутствии 10 мМ MgCl₂. В этих условиях *Nt.VspD6I* гидролизует субстрат **VI** с высокой эффективностью (рис. 2.14.A).

Продуктами гидролиза *Nt.VspD6I* ДНК-дуплекса **VI** с ³²P-меткой в «верхней» цепи являются меченый 18-звенный олигонуклеотид, немеченый 8-звенный олигонуклеотид и комплементарный им немеченый 26-звенный олигонуклеотид:



Для подбора оптимальных условий гидролиза «нижней» цепи дуплекса **VI** малой субъединицей *R.VspD6I* к базовой реакционной смеси, содержащей *Nt.VspD6I* (10 нМ), добавляли *ss.VspD6I*. Концентрация малой субъединицы составляла 30, 60, 120 или 180 нМ. Таким образом, получали реакционные смеси с соотношением субъединиц *Nt.VspD6I*:*ss.VspD6I* – 1:3, 1:6, 1:12, 1:18. В этом случае дуплекс **VI** содержал ³²P-метку в «нижней» цепи. В ходе гидролиза этого субстрата гетеродимерным ферментом *VspD6I* образуются 6 продуктов, два из которых – 7-звенный и 6-звенный олигонуклеотиды – содержат метку (рис. 2.16):



Как видно из рис. 2.16, малая субъединица *R.VspD6I* эффективно гидролизует ДНК-дуплекс **VI** в используемых условиях при 12- и 18-кратном избытках (степени гидролиза – 63 ± 5% и 72 ± 6%, соответственно). Также заметно преобладание 6-звенного продукта гидролиза субстрата над 7-звенным, что согласуется с данными работы [145]. В дальнейших экспериментах использовали 12-кратный избыток *ss.VspD6I* относительно *Nt.VspD6I*.

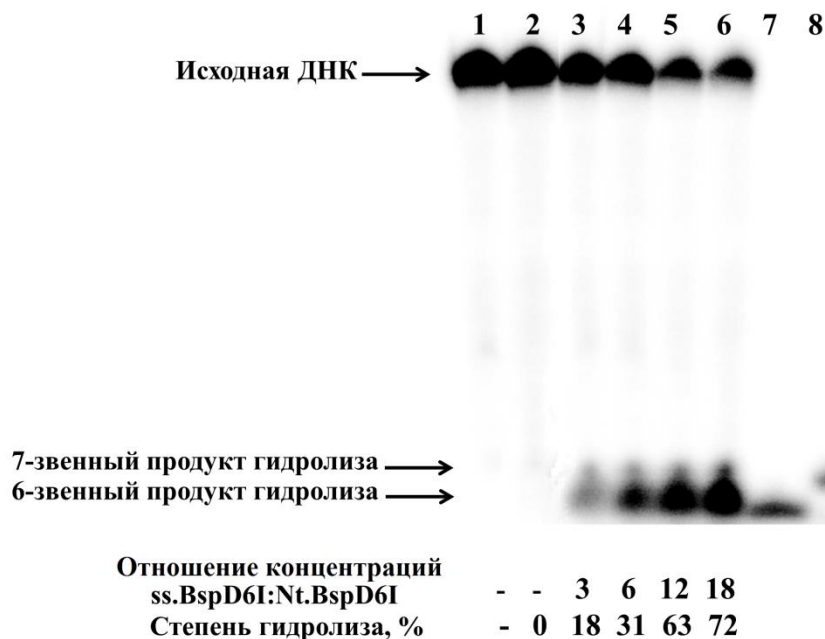


Рис. 2.16. Гидролиз R.BspD6I 26-звенного субстрата VI с меченной ^{32}P «нижней», расщепляемой ss.BspD6I, цепью (30 мин, 37°C). Радиоавтограф 20%-ного ПААГ с 7 М мочевиной. Дорожка 1 – контроль (исходный дуплекс VI), дорожка 2 – субстрат VI только в присутствии ss.BspD6I (180 нМ). В дорожках 3-6 представлены результаты гидролиза ДНК-дуплекса VI смесью Nt.BspD6I и ss.BspD6I (соотношение концентраций 1:3, 1:6, 1:12, 1:18). Концентрации дуплекса VI и Nt.BspD6I составляли 10 нМ. В дорожках 7 и 8 представлены маркеры длины ДНК: 6-звенный ($5'\text{-GTACCT-3}'$) и 7-звенный ($5'\text{-GTACCTT-3}'$) олигонуклеотиды, соответственно. Стандартная ошибка расчета степени гидролиза не превышала 8% от указанного значения.

После подбора условий функционирования ss.BspD6I был изучен гидролиз ДНК-дуплекса VI Nt.BspD6I в составе R.BspD6I в сравнении с его гидролизом свободной Nt.BspD6I. Гидролиз проводили при 37°C , ^{32}P -метка вводилась на 5'-конец гидролизуемой Nt.BspD6I «верхней» цепи ДНК-дуплекса. Использовали одинаковую для всех проб концентрацию Nt.BspD6I (10 нМ), ДНК-дуплекса (10 нМ). Концентрация ss.BspD6I в случае гидролиза ДНК гетеродимерной R.BspD6I составляла 120 нМ. Время инкубации варьировали от 0 до 10 мин (рис. 2.17).

Начальную скорость гидролиза рассчитывали как тангенс угла наклона кинетической кривой на участке, когда наблюдается линейная зависимость степени гидролиза от времени. Линейную зависимость изменения степени гидролиза наблюдали в течение 3 мин и 2 мин для Nt.BspD6I и R.BspD6I, соответственно. Начальные скорости гидролиза «верхней» цепи ДНК-дуплекса VI составили $6,2 \pm 0,7$ нМ/мин для Nt.BspD6I и $11,6 \pm 1$ нМ/мин – для Nt.BspD6I в составе большой субъединицы гетеродимерной R.BspD6I. То есть наличие 12-кратного избытка малой субъединицы относительно Nt.BspD6I в реакционной смеси повышает активность Nt.BspD6I примерно в 2 раза.

Вероятно, Nt.BspD6I быстрее диссоциирует из комплекса с дуплексом, в который внесены разрывы в обе цепи, по сравнению с дуплексом с одноцепочечным разрывом. Надо заметить, что степени гидролиза ДНК-дуплекса VI Nt.BspD6I как в присутствии, так и в отсутствие ss.BspD6I примерно за 8 мин достигают 80%, затем кривые гидролиза выходят на плато. На основании этих данных можно предположить, что накапливающийся продукт реакции гидролиза способен ингибировать действие Nt.BspD6I.

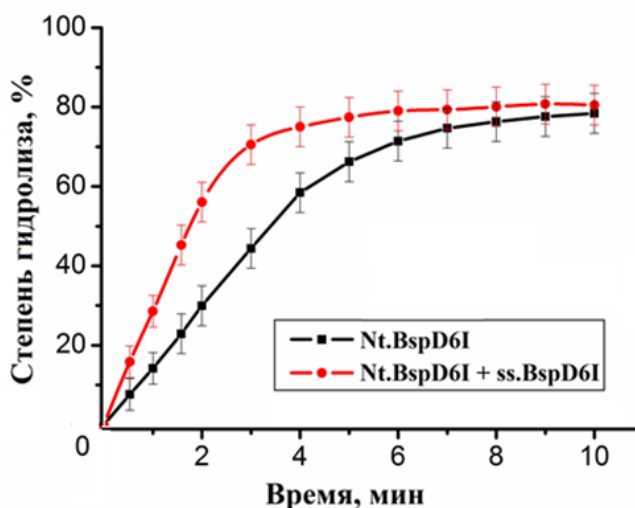
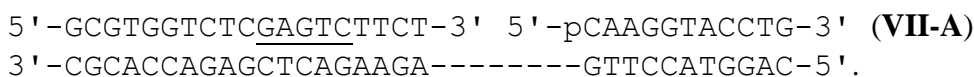


Рис. 2.17. Зависимость степени гидролиза «верхней» цепи ДНК-дуплекса VI Nt.BspD6I (черная кривая) и Nt.BspD6I в составе R.BspD6I (красная кривая) от времени.

2.2.2.3. Взаимодействие никующей эндонуклеазы BspD6I с дуплексом, имитирующим продукт гидролиза ферментом

В качестве аналога субстрата Nt.BspD6I, в котором отсутствует фосфодиэфирная связь, гидролизуемая Nt.BspD6I, был сконструирован 30-звенный ДНК-дуплекс VII-A (табл. 3.1):



В этом состоящем из трех олигонуклеотидов ДНК-дуплексе один из олигонуклеотидов «верхней» цепи несет на 5'-конце фосфатную группу, то есть ДНК-дуплекс VII-A имитирует продукт гидролиза 30-звенного ДНК-дуплекса VII Nt.BspD6I (рис. 2.12).

Прежде всего, была изучена способность Nt.BspD6I связываться со своим продуктом гидролиза. Исследовали комплексообразование Nt.BspD6I с ДНК-дуплексом VII-A в сравнении с ДНК-дуплексом VII, содержащими ³²P-метку в «верхней» цепи (рис. 2.18). Nt.BspD6I связывается со своим продуктом гидролиза (ДНК-дуплекс VII-A) так же эффективно, как и с немодифицированным субстратом (ДНК-дуплекс VII). Степени

связывания составили 80% в обоих случаях (рис. 2.18). Таким образом, стадия диссоциации Nt.BspD6I из комплекса с ДНК после гидролиза может быть лимитирующей стадией этой ферментативной реакции.

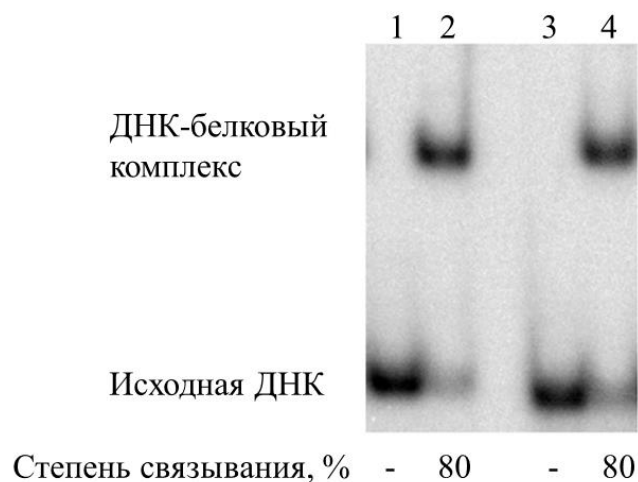


Рис. 2.18. Связывание Nt.BspD6I с 5'-³²P-меченными ДНК-дуплексами VII (дорожки 1, 2) и VII-A (дорожки 3, 4). Радиоавтограф 7%-ного ПААГ после электрофореза в неденатурирующих условиях. Дорожки 1, 3 – контроль (исходная ДНК), дорожки 2, 4 – результат связывания белка с ДНК (ДНК-дуплекс + Nt.BspD6I). Концентрации Nt.BspD6I и ДНК-дуплексов составляли 25 нМ и 10 нМ, соответственно.

Метод «торможения» в геле, применяемый при изучении ДНК-белковых взаимодействий, позволяет детектировать продукт реакции только после наступления равновесия, однако не позволяет судить о кинетике процесса связывания. Для изучения влияния разрыва, вносимого Nt.BspD6I, на кинетику связывания фермента с ДНК-субстратом, был использован метод акустической детекции на пьезоэлектрическом сенсоре. Данный метод позволяет анализировать связывание белка с поверхностью, на которой находится иммобилизованная ДНК.

2.2.2.4. Анализ кинетики взаимодействия никующей эндонуклеазы BspD6I с ДНК методом акустической детекции на пьезоэлектрическом сенсоре

Анализ кинетики взаимодействия Nt.BspD6I с ДНК проводили методом акустической детекции на пьезоэлектрическом сенсоре под руководством проф. Т. Хианика в отделении ядерной физики и биофизики факультета математики, физики и вычислительной техники Университета имени Коменского (г. Братислава, Словакия). Метод акустической детекции основан на использовании пьезоэлектрического резонатора, в котором под действием переменного тока высокой частоты происходит возбуждение ультразвуковых волн. Известно, что в кристалле кварца АТ-среза (срез под углом -35,15°) частота колебаний практически не зависит от температуры, поэтому его используют в качестве резонатора (рис. 2.19, А) [162]. Под воздействием электрического поля в

кварцевой пластинке происходит смещение слоев пластинки друг относительно друга (деформация сдвига по толщине – thickness shear mode (TSM), рис. 2.19, Б) [163].



Рис. 2.19. Пьезоэлектрический резонатор – кристалл кварца АТ-среза, на котором с двух сторон закреплены золотые электроды. **А:** фотография резонатора. **Б:** схематическое изображение колебаний по толщине.

Собственная резонансная частота колебаний использованного кварцевого резонатора составляет 8 МГц. При увеличении массы резонатора она уменьшается, что описывается уравнением Зауэрбрея [164]:

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\mu * \rho_q}} \Delta m$$

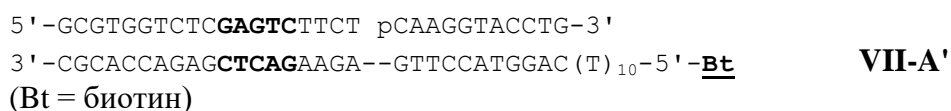
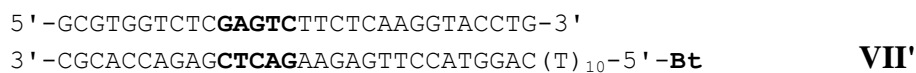
где Δf – изменение частоты колебания пьезоэлектрического резонатора (Гц), f_0 – его собственная частота колебаний, A – площадь поверхности электрода, μ – модуль сдвига кварца ($2,95 \times 10^{11}$ дин/см²), ρ_q – плотность кварца ($2,65$ г/см³), Δm – изменение массы резонатора при нанесении покрытия. Для резонаторов, использованных в данной работе, это уравнение может быть представлено следующим образом:

$$\Delta f_s = -2,26 \times 10^{-6} f_0^2 \Delta m/A \tag{3}$$

Как правило, взаимодействие биомолекул происходит в растворе, поэтому кварцевый резонатор устанавливали таким образом, чтобы он являлся одной из стенок проточной ячейки, в которую подают растворы веществ. После сборки такой проточной ячейки для изучения взаимодействия Nt.BspD6I с ДНК на золотом электроде проводили иммобилизацию нейтравидина. При этом происходило взаимодействие сульфгидрильных групп остатков Cys нейтравидина с золотом. Нейтравидин является производным белка авидина, характеризуется высокой специфичностью и эффективностью взаимодействия с биотином. При нейтральном значении рН нейтравидин не проявляет ДНК-связывающих свойств [165]. После иммобилизации нейтравидина добавляли раствор ДНК-дуплекса, меченного биотином, а затем – раствор исследуемого белка.

Было изучено взаимодействие Nt.BspD6I с аналогами ДНК-дуплексов VII и VII-A.

Так как при использовании акустического метода необходимо проводить иммобилизацию ДНК на поверхности золотого электрода, к 5'-концевому нуклеотиду «нижней» цепи каждого дуплекса ковалентно присоединяли остаток биотина. Также в «нижнюю» цепь были введены дополнительные 10 остатков тимидина для увеличения расстояния между поверхностью сенсора и ДНК-дуплексом:



Все эксперименты с помощью акустического метода проводили при 25°C, т.к. при более высоких температурах частота колебаний кристалла может зависеть от температуры, что приведет к появлению ошибок измерения. Экспериментальные кривые изменения динамического сопротивления (ΔR_m) и резонансной частоты (Δf_s) после различных модификаций поверхности сенсора изображены на рис. 2.20. После добавления нейтравидина наблюдалось резкое снижение резонансной частоты (155 Гц) и незначительное возрастание динамического сопротивления (0,2 Ом). Уменьшение резонансной частоты являлось результатом хемисорбции нейтравидина на поверхности золотого электрода, а возрастание динамического сопротивления указывало на увеличение вязкости раствора. Полученные данные согласуются с опубликованными ранее результатами [166] – [168]. На основе уравнения (3) было рассчитано, что поверхностная концентрация нейтравидина составляет примерно $16,2 \text{ пмоль} \cdot \text{см}^{-2}$.

После добавления ДНК-дуплекса **VII'**, растворенного в буфере Б1, к модифицированному нейтравидином сенсору наблюдалось падение резонансной частоты примерно на 20 Гц и увеличение динамического сопротивления на 2,7 Ом. Уменьшение резонансной частоты являлось результатом связывания биотинилированной ДНК с нейтравидином. Рост динамического сопротивления отображал увеличение вязкости слоя на сенсоре. Учитывая молекулярную массу дуплекса **VII'** (21,7 кДа), его поверхностная концентрация была оценена как $6 \text{ пмоль} \cdot \text{см}^{-2}$. Поверхностная концентрация дуплекса **VII-A'** ($8 \text{ пмоль} \cdot \text{см}^{-2}$) в аналогичных экспериментах была сравнима с концентрацией дуплекса **VII'**.

Известно, что большинство белков денатурирует в чистой воде, поэтому для сохранения активности Nt.BspD6I использовали буфер Б2. Наличие глицерина в этом буфере было связано с тем, что Nt.BspD6I в высокой концентрации хранили в буфере Д, содержащем 50% глицерина. При приготовлении растворов фермент разводили, при этом

концентрация глицерина оказывалась около 1%. Учитывая тот факт, что метод TSM очень чувствителен к вязкости раствора [169], концентрацию глицерина точно поддерживали в ходе всего эксперимента. После нанесения на сенсор буферов Б1 и Б2 наблюдали резкое падение резонансной частоты, поскольку по сравнению с водой буферы имели значительно большую вязкость и ионную силу за счет содержания в них глицерина и солей.

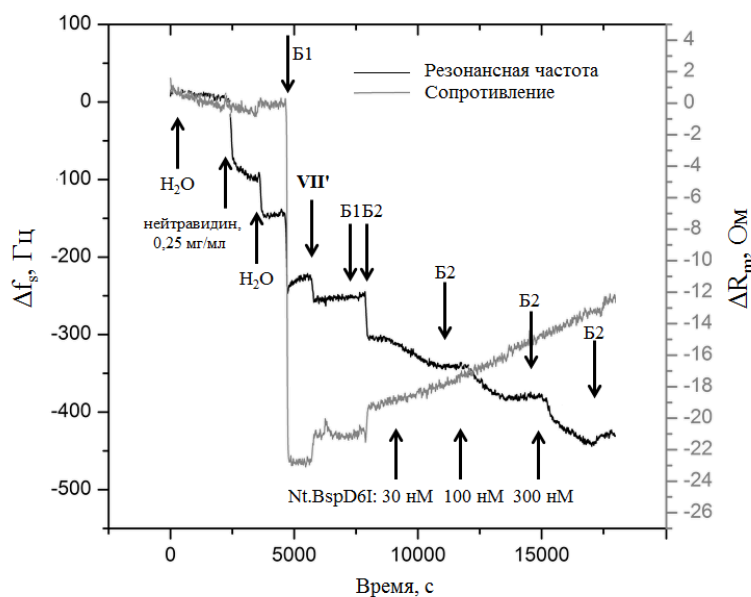


Рис. 2.20. Кинетика изменений резонансной частоты (Δf_s , чёрная кривая) и динамического сопротивления (ΔR_m , серая кривая), происходящих в результате последовательного нанесения на поверхность сенсора различных соединений: нейтравидина, биотинилированного ДНК-дуплекса VII' и Nt.BspD6I в различных концентрациях. Моменты добавления всех растворов указаны стрелками. Б1, Б2 – буферные растворы.

После промывания поверхности биосенсора буфером Б2 в ячейку подавали раствор Nt.BspD6I в буфере Б2. При этом наблюдали экспоненциальное снижение резонансной частоты. Последующее промывание буфером Б2 приводило к небольшому возрастанию резонансной частоты, что отображало существование сравнительно неустойчивой системы (рис. 2.20). По мере увеличения количества связанной с ДНК Nt.BspD6I наблюдалось постепенное возрастание R_m . Кинетические кривые для взаимодействия Nt.BspD6I с ДНК-дуплексом VII-A' характеризуются аналогичной формой. Максимальное изменение резонансной частоты после добавления раствора 1 мкМ Nt.BspD6I составляло – 200 Гц в случае дуплекса VII' и –140 Гц в случае дуплекса VII-A' (табл. 2.1). Ранее было показано, что Nt.BspD6I способна образовывать олигомерные формы при концентрациях выше 0,5 мкМ [154]. Учитывая молекулярную массу Nt.BspD6I (70,8 кДа), поверхностная концентрация фермента может быть оценена как 19,5 и 13,7 пмоль · см⁻² в случае

взаимодействия с дуплексами **VII'** и **VII-A'**, соответственно. На основании рассчитанных поверхностных концентраций фермента и ДНК можно предположить, что в среднем с дуплексом **VII'** было связано три молекулы Nt.BspD6I, а с дуплексом **VII-A'** – две молекулы Nt.BspD6I.

Таблица 2.1

Параметры связывания Nt.BspD6I с различными ДНК-дуплексами, полученные методом акустической детекции на пьезоэлектрическом сенсоре

ДНК-дуплекс	$k_a, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	k_d, c^{-1}	$K_d, \text{нМ}$	$-(\Delta f)_{\text{max}}, \text{Гц}$
VII'	14300 ± 150	$0,0007 \pm 0.00005$	46 ± 4	$200,0 \pm 23$
VII-A'	10700 ± 600	$0,0009 \pm 0.00005$	88 ± 11	$140,0 \pm 15$

k_a – константа скорости ассоциации; k_d – константа скорости диссоциации; K_d – кажущаяся равновесная константа диссоциации, рассчитанная как k_d/k_a ; $-(\Delta f)_{\text{max}}$ – максимальное изменение резонансной частоты сенсора, полученное в результате нанесения на сенсор 1 мкМ Nt.BspD6I.

В контрольном эксперименте вместо Nt.BspD6I на поверхность сенсора, модифицированную ДНК-дуплексом **VII'**, наносили сывороточный альбумин человека (ЧСА). При этом снижение резонансной частоты в диапазоне концентраций ЧСА от 0,1 до 1 мкМ было пренебрежимо малым. В другом контрольном эксперименте раствор Nt.BspD6I наносили на поверхность, модифицированную нейтравидином и не содержащую ДНК. Изменение резонансной частоты было также незначительным, динамическое сопротивление слегка увеличивалось. Таким образом показано, что связывание ЧСА с ДНК и связывание Nt.BspD6I с нейтравидином были незначительными по сравнению со связыванием Nt.BspD6I с ДНК (рис. 2.21).

Согласно подходу, изложенному в работе [166], изменения резонансной частоты описываются следующим образом

$$-\Delta f_s(t) = -(\Delta f_s)_{\text{max}} [1 - \exp(-kt)] \quad (4)$$

где $k = k_a[P] + k_d$; k_a и k_d – константы скорости ассоциации и диссоциации, соответственно; $[P]$ – это концентрация белка (Nt.BspD6I).

Величина k должна зависеть от концентрации Nt.BspD6I линейным образом [170]. Пересечение прямой с осью y дает значение k_d , а наклон полученной прямой – это значение k_a . Равновесную константу диссоциации вычисляли как $K_d = k_d/k_a$.

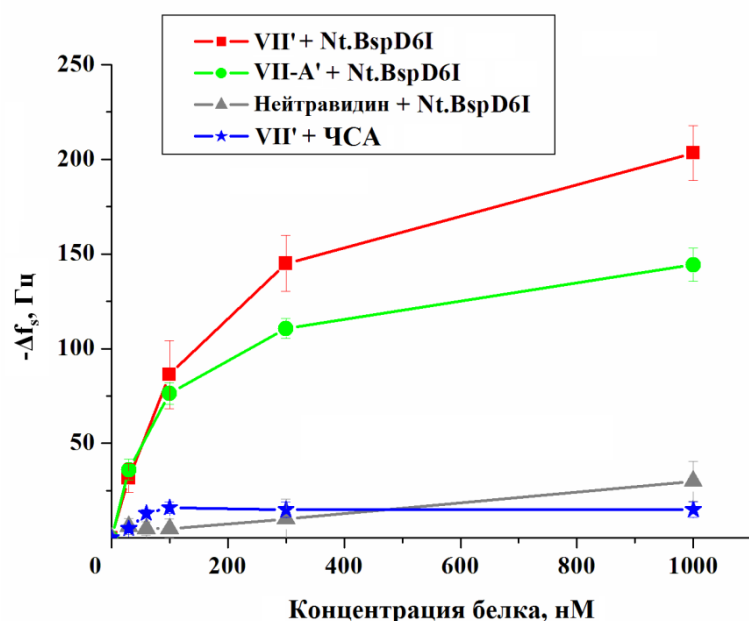


Рис. 2.21. Зависимость изменений резонансной частоты Δf_s от концентрации белка (Nt.BspD6I или ЧСА) для биосенсоров, поверхность которых модифицирована нейтравидином и различными биотинилированными ДНК (VII' или VII-A'). Также приведены результаты двух контрольных экспериментов: нанесение Nt.BspD6I на поверхность, модифицированную только нейтравидином (без ДНК), и нанесение ЧСА на поверхность, модифицированную ДНК-дуплексом VII'.

Необходимо заметить, что в нашем случае значения кинетических параметров являются кажущимися физическими величинами, так как они отражают совокупный эффект многостадийного процесса. Кроме того, $K_d \neq 1/K_a$, вследствие того, что процесс диссоциации фермента из комплекса с ДНК является одностадийным, а процесс ассоциации – как минимум, двухстадийным [163]. Процесс связывания фермента с ДНК включает в себя неспецифическое связывание ДНК-дуплекса, а затем поиск в нем специфического участка узнавания.

Для взаимодействия Nt.BspD6I с ДНК-дуплексами VII' и VII-A' были определены значения кинетических констант. Для этого изменения резонансной частоты в процессах ассоциации аппроксимировали уравнением (4) и строили графики зависимости значения k от концентрации Nt.BspD6I. Наклон полученных прямых был равен k_a , а пересечение прямых с осью y определяло значение k_d [166].

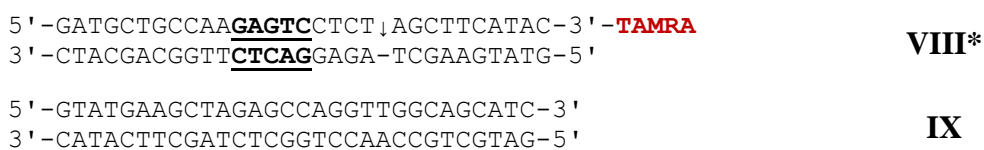
Рассчитанные значения кинетических параметров приведены в табл. 2.1. В случае взаимодействия Nt.BspD6I с ДНК-дуплексом VII' были получены статистически значимые более высокие значения k_a . Соответственно, значения K_d для этого комплекса были меньшими, что указывает на большее сродство Nt.BspD6I к ДНК-дуплексу VII' по сравнению с ДНК-дуплексом VII-A'.

Необходимо отметить, что значения K_d для комплекса Nt.BspD6I с дуплексом VII', определенные методом акустической детекции, оказались значительно выше значений,

полученных с помощью метода «торможения» в геле для дуплекса **VII**. Данному факту можно найти несколько объяснений. Во-первых, в методе акустической детекции используются довольно высокие концентрации реагирующих веществ для получения значимого сигнала в отличие от метода «торможения» в геле, где молекулы и их комплексы детектируют за счет содержания в них флуоресцентной или радиоактивной метки. Максимальная концентрация Nt.BspD6I, использованная в методе акустической детекции (1 мкМ), значительно превышает максимальную концентрацию Nt.BspD6I в случае метода «торможения» в геле (30 нМ). Более высокая концентрация фермента и, как следствие, отличающаяся стехиометрия ДНК-белкового комплекса могут быть причиной различных значений K_d , полученных с использованием двух разных методов. Во-вторых, необходимо также учитывать, что метод «торможения» в геле дает информацию о взаимодействии молекул в растворе, в то время как методом акустической детекции изучается ДНК-белковое взаимодействие, происходящее на поверхности сенсора. Несмотря на указанные различия, оба метода подтверждают способность Nt.BspD6I образовывать достаточно стабильный комплекс с продуктом собственного гидролиза.

2.2.2.5. Влияние неспецифического ДНК-дуплекса на активность никующей эндонуклеазы BspD6I

Известно, что большинство ДНК-узнающих белков способны неспецифически связывать ДНК. Для некоторых ДНК-связывающих белков (в том числе и для ЭР) неспецифическое связывание необходимо для проявления их процессивности – способности взаимодействовать с двумя или более специфическими участками в одной молекуле ДНК без высвобождения субстрата [171]. Ранее было показано, что Nt.BspD6I также способна неспецифически связывать двуцепочечную ДНК [154]. Для оценки степени такого связывания был изучен гидролиз 30-звенного ДНК-дуплекса **VIII***, содержащего флуоресцентную метку TAMRA (*) на 3'-конце «верхней» цепи, в зависимости от присутствия различных дуплексов-конкурентов. В качестве конкурентов использовали ДНК-дуплексы **VII**, **VII-A** и 30-звенный неспецифический дуплекс **IX**:



Для дуплексов-конкурентов были определены концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) (рис. 2.22).

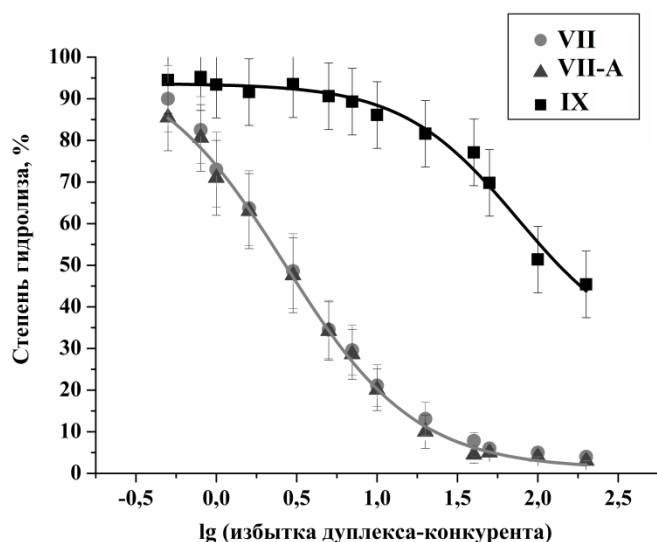


Рис. 2.22. Ингибирование гидролиза ДНК-дуплекса **VII*** (10 нМ) Nt.BspD6I (10 нМ) в присутствии дуплексов **VII**, **VII-A** и неспецифического дуплекса **IX**. Концентрации дуплексов-конкурентов варьировали от 0 до 2 мкМ. Избыток дуплекса-конкурента указан по оси x в логарифмической шкале. Реакцию проводили при 25°C в течение 30 мин.

В условиях реакции гидролиза дуплекс **VII** под действием Nt.BspD6I превращался в дуплекс **VII-A**, поэтому оба эти дуплекса практически одинаково влияли на активность Nt.BspD6I. Значение IC_{50} для дуплексов **VII** и **VII-A** соответствовало их трехкратному избытку в реакционной смеси (30 нМ). Неспецифический дуплекс **IX** такой же длины ингибировал активность Nt.BspD6I менее эффективно. Только при 100-кратном избытке данного дуплекса (1 мкМ) активность Nt.BspD6I снижалась до 50%. Таким образом, можно сделать вывод, что в данных условиях (25°C, 30 мин) неспецифическое связывание Nt.BspD6I с ДНК незначительно по сравнению со специфическим связыванием, а определенные ранее параметры взаимодействия Nt.BspD6I с ДНК (табл. 2.1) в основном отображают специфическое взаимодействие фермента с субстратом.

2.2.2.6. Способность малой субъединицы BspD6I гидролизовать «нижнюю» цепь после внесения одноцепочечного разрыва в «верхнюю» цепь никующей эндонуклеазой BspD6I

Показано, что ss.BspD6I в изолированном виде не способна образовывать комплексы с дуплексами **VII** и **VII-A**, ее присутствие также никак не влияет на образование комплексов Nt.BspD6I с этими дуплексами (рис. 2.23).

Далее изучали гидролиз дуплексов **VII** и **VII-A**, содержащих 5'-³²P-меченную «нижнюю» цепь, ss.BspD6I и в присутствии Nt.BspD6I (рис. 2.24).

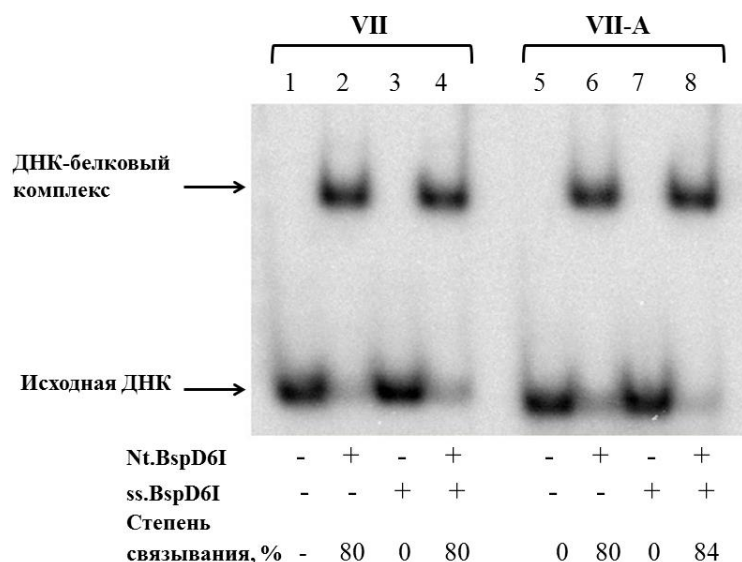


Рис. 2.23. Анализ комплексообразования Nt.BspD6I и ss.BspD6I с 5'-³²P-меченными ДНК-дуплексами VII и VII-A. Радиоавтограф 7%-ного ПААГ после электрофореза в неденатурирующих условиях. Дорожки 1, 5 – контроль (исходная ДНК). Реакционные смеси, содержащие Nt.BspD6I с ДНК – дорожки 2, 6; реакционные смеси, содержащие ss.BspD6I с ДНК – дорожки 3, 7; реакционные смеси, содержащие Nt.BspD6I с ДНК в присутствии ss.BspD6I – дорожки 4, 8. Концентрации ДНК-дуплексов составляли 10 нМ, Nt.BspD6I – 25 нМ, ss.BspD6I – 300 нМ.

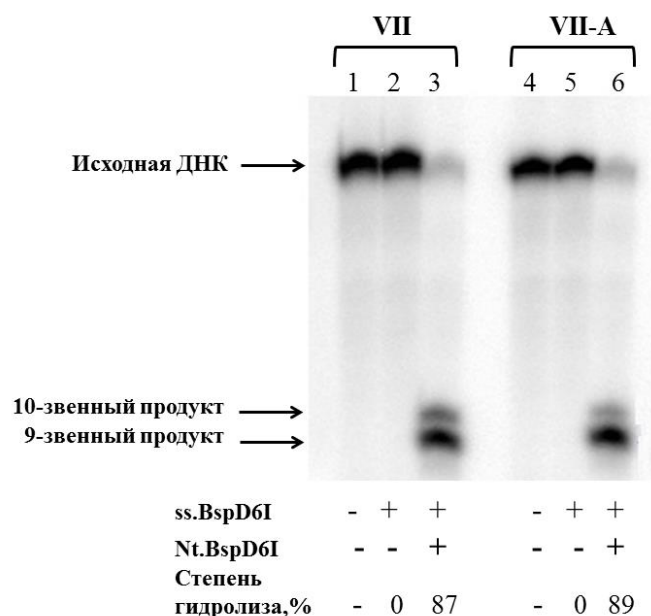


Рис. 2.24. Анализ продуктов гидролиза ДНК-дуплексов VII и VII-A, содержащих 5'-³²P-метку в «нижней» цепи, ss.BspD6I и смесью ss.BspD6I с Nt.BspD6I. Радиоавтограф 20%-ного ПААГ с 7 М мочевиной. Дорожки 1, 4 – контроль (исходный дуплекс). Реакционные смеси, содержащие ДНК и ss.BspD6I – дорожки 2, 5; реакционные смеси, содержащие ДНК, ss.BspD6I и Nt.BspD6I – дорожки 3, 6. Концентрации ДНК-дуплексов составляли 10 нМ, Nt.BspD6I – 10 нМ, ss.BspD6I – 120 нМ.

Показано, что ss.BspD6I в отсутствие Nt.BspD6I не способна гидролизовать дуплексы VII и VII-A (рис. 2.24, дорожки 2, 5). Гидролиз «нижней» цепи данных дуплексов возможен только при добавлении в реакцию смесь Nt.BspD6I (рис. 2.24,

дорожки 3, 6). При этом наблюдается образование двух меченых продуктов гидролиза «нижней» цепи: 10-звенного 5'-³²P-CAGGTACCTT-3' и преобладающего 9-звенного 5'-³²P-CAGGTACCT-3' олигонуклеотидов. Полученные результаты полностью согласуются с данными предыдущих работ [145]. Также была изучена кинетика гидролиза «нижней» цепи дуплексов **VII** и **VII-A**. Начальная скорость гидролиза при 37°C дуплекса **VII** оказалась сравнима с начальной скоростью гидролиза дуплекса **VII-A** (рис. 2.25).

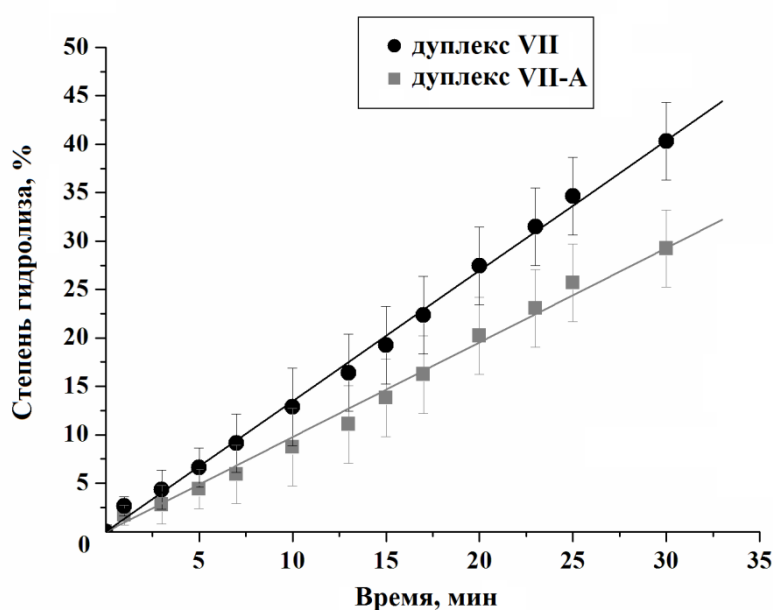


Рис. 2.25. Зависимость степени гидролиза «нижней» цепи ДНК-дуплексов **VII** и **VII-A** смесью ss.BspD6I с Nt.BspD6I от времени. Концентрации ДНК-дуплексов составляли 10 нМ, Nt.BspD6I – 10 нМ, ss.BspD6I – 120 нМ.

Полученные данные также косвенно подтверждают способность Nt.BspD6I оставаться в комплексе с ДНК-дуплексом после внесения одноцепочечного разрыва в «верхнюю» цепь. Благодаря этой способности Nt.BspD6I координирует ss.BspD6I на ДНК, что приводит к гидролизу «нижней» цепи. Несколько большую начальную скорость гидролиза дуплекса **VII** по сравнению с дуплексом **VII-A** можно объяснить большим сродством Nt.BspD6I к каноническому ДНК-дуплексу, что было показано методом акустической детекции (табл. 2.1).

Таким образом, функционирование Nt.BspD6I и ss.BspD6I является взаимозависимым. На первом этапе, вероятно, Nt.BspD6I связывает ДНК-субстрат, находит участок узнавания и изгибает ДНК. Как показано выше, гидролиз «верхней» и «нижней» цепей субъединицами R.BspD6I может происходить одновременно. После гидролиза «верхней» цепи Nt.BspD6I может оставаться связанной с продуктом гидролиза. Существование такого ДНК-белкового комплекса позволяет ss.BspD6I внести разрыв в

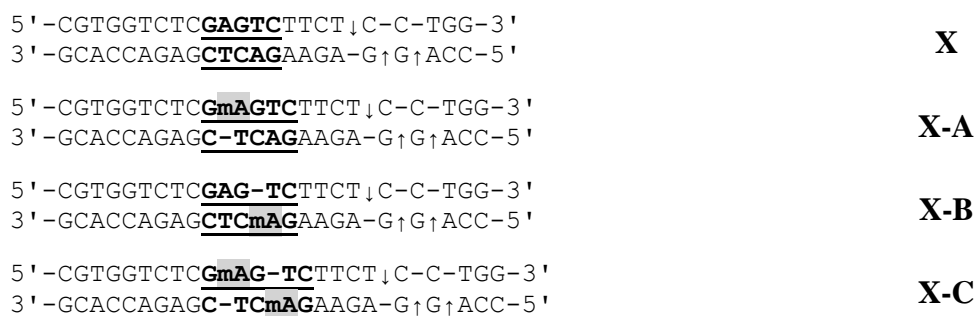
«нижнюю» цепь. Образование разрывов в обеих цепях ДНК-дуплекса способствует диссоциации фермент-субстратного комплекса.

2.2.3. Взаимодействие эндонуклеазы рестрикции VspD6I с метилированными ДНК-дуплексами

Считается, что Nt.VspD6I и ss.VspD6I являются компонентами системы рестрикции-модификации VspD6I [145]. В таком случае роль ЭР должна заключаться в гидролизе ДНК чужеродного происхождения, что препятствует функционированию такой ДНК в клетке. Благодаря действию клеточных ДНК-метилтрансфераз (МТаз) хозяйская ДНК специфическим образом модифицируется так, что ЭР оказываются по отношению к этой ДНК неактивными. Чужеродная ДНК, как правило, отличается по профилю метилирования от клеточной ДНК и поэтому оказывается чувствительной к действию ЭР.

Система Р-М VspD6I содержит также две ДНК-метилтрансферазы (МТазы). Последовательности генов этих МТаз полностью совпадают с последовательностями генов M1.BstSEI и M2.BstSEI, найденных в организме *Bacillus stearothermophilus* (Перевязова Т.А., неопубликованные данные, [172]). Чернухин и соавт. показали, что рекомбинантная M2.BstSEI в отсутствие M1.BstSEI способна метилировать аденозин в обеих цепях ДНК-дуплекса в последовательности 5'-GASTC-3' (S = G или C) [25]. Кинетические параметры метилирования ДНК M2.BstSEI (которая гомологична M2.VspD6I) также схожи с параметрами МТаз, узнающих палиндромные участки [25]. Было показано, что Nt.VspD6I не способна гидролизовать 23-звенный ДНК-дуплекс, содержащий остаток N6-метил-2'-дезоксаденозина (m^6A) в обеих цепях участка узнавания [10]. В данной работе было впервые изучено взаимодействие Nt.VspD6I с монометилированными ДНК-дуплексами, а также влияние остатка m^6A на функционирование ss.VspD6I.

В качестве монометилированных субстратов использовали 23-звенные дуплексы **X-A** и **X-B**. Дуплекс **X-C** содержал остатки m^6A в обеих цепях. В контрольных экспериментах использовали неметилированный дуплекс **X**:



mA – остаток 2'-дезоксид-6-метиладенозина

На первом этапе была изучена способность Nt.BspD6I связывать дуплексы X – X-C (рис. 2.26).

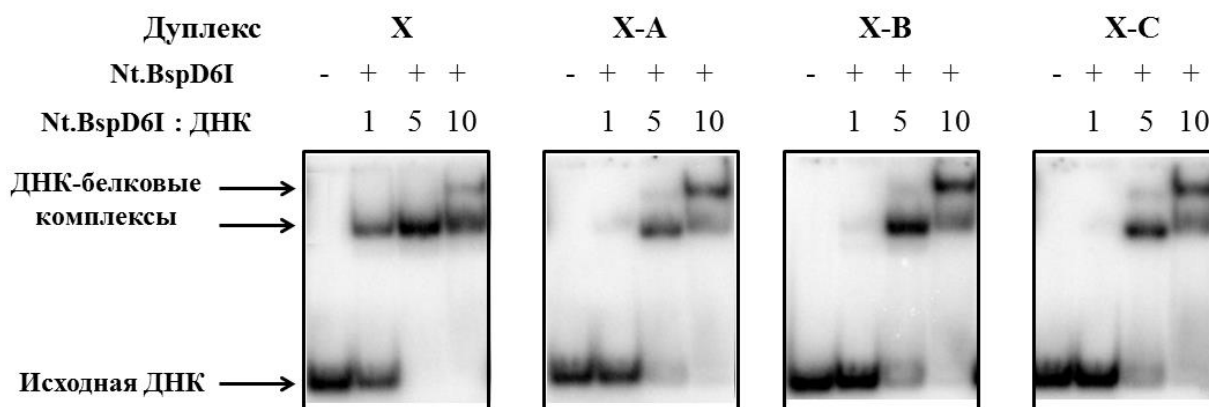
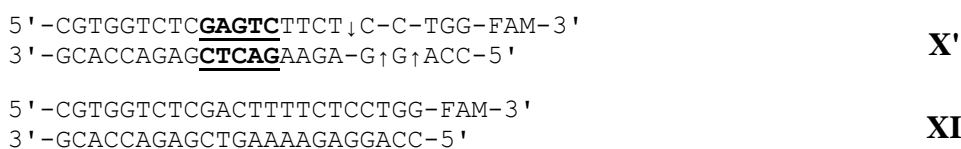


Рис. 2.26. Анализ комплексообразования Nt.BspD6I с 5'-³²P-мечеными ДНК-дуплексами X – X-C. Радиоавтограф 7%-ного ПААГ после электрофореза в неденатурирующих условиях. Над дорожками указано отношение концентраций Nt.BspD6I и ДНК-дуплекса. Концентрации ДНК-дуплексов составляли 10 нМ. Реакцию проводили при 37°C в течение 30 мин.

Наиболее эффективно Nt.BspD6I связывала неметилированный дуплекс X: при эквимольном соотношении фермента и ДНК около 50% субстрата находилось в комплексе с ферментом. В случае остальных дуплексов при таких концентрациях степень образования ДНК-белкового комплекса не превышала 10%. Однако при повышении концентрации Nt.BspD6I в реакционной смеси до 50 нМ и 100 нМ также наблюдалось эффективное комплексообразование фермента с дуплексами X-A – X-C. При 10-тикратном избытке фермента детектировали также образование второго ДНК-белкового комплекса, вероятно, соответствующего комплексу димера Nt.BspD6I с ДНК-дуплексом [154].

Для доказательства образования специфических комплексов Nt.BspD6I с дуплексами X-A – X-C было проверено комплексообразование Nt.BspD6I с неспецифическим 23-звенным дуплексом XI в сравнении с дуплексом X'. Оба дуплекса содержали флуоресцентную метку карбоксифлуоресцеин (FAM) на 3'-конце «верхней» цепи (рис. 2.27).



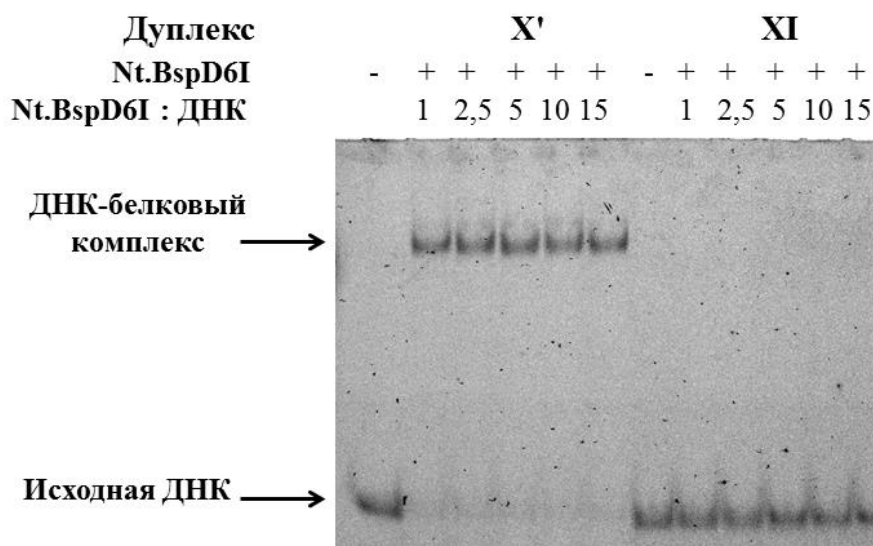


Рис. 2.27. Анализ комплексообразования Nt.BspD6I с FAM-мечеными ДНК-дуплексами **X'** и **XI**. Фотография 7%-ного ПААГ после электрофореза в неденатурирующих условиях. Над дорожками указано отношение концентраций Nt.BspD6I и ДНК-дуплекса. Концентрации ДНК-дуплексов составляли 10 нМ. Реакцию проводили при 37°C в течение 30 мин.

Из рис. 2.27 видно, что в диапазоне концентраций от 10 нМ до 150 нМ Nt.BspD6I не способна неспецифически связывать дуплекс **XI**. Следовательно, представленные на рис. 2.26 комплексы Nt.BspD6I с ДНК являются результатом специфического связывания. Однако в случае специфического дуплекса **X'** наблюдается образование только одного ДНК-белкового комплекса (рис. 2.27). Относительная подвижность этого комплекса близка к относительной подвижности первого комплекса Nt.BspD6I с дуплексом **X**, образующегося при более низких концентрациях фермента (рис. 2.26). Предположительно, такой ДНК-белковый комплекс соответствует комплексу мономера Nt.BspD6I с ДНК. Отсутствие второго специфического комплекса Nt.BspD6I с дуплексом **X'** может быть обусловлено наличием достаточно объемной молекулы FAM на 3'-конце «верхней» цепи, что препятствует димеризации Nt.BspD6I на ДНК.

Далее был проанализирован гидролиз дуплексов **X – X-C** Nt.BspD6I с использованием аналогичных концентраций фермента и ДНК (рис. 2.28).

Эффективный гидролиз Nt.BspD6I наблюдался только в случае немодифицированного дуплекса **X** (около 90%). Интересно заметить, что дуплекс **X-A**, содержащий остаток m⁶A только в «верхней» цепи, при 10-тикратном избытке Nt.BspD6I также подвергался гидролизу, но в незначительной степени (примерно на 10%). В остальных случаях гидролиз ДНК не наблюдался, даже при высоких концентрациях Nt.BspD6I, когда фермент эффективно связывал дуплекс (рис. 2.26). Полученные данные свидетельствуют о контактах Nt.BspD6I с аминок группой каждого из остатков А участка узнавания на стадии гидролиза ДНК. Возможно, присутствие остатка m⁶A в участке узнавания Nt.BspD6I

ингибирует конформационные изменения ДНК-белкового комплекса, необходимые для осуществления катализа.

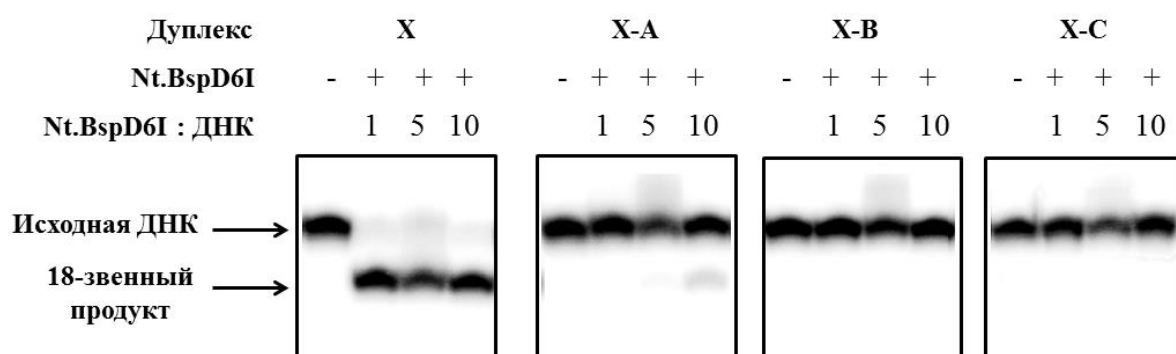


Рис. 2.28. Анализ продуктов гидролиза Nt.BspD6I ДНК-дуплексов X – X-C, содержащих 5'-³²P-метку в «верхней» цепи. Радиоавтограф 20%-ного ПААГ с 7 М мочевиной. Над дорожками указано отношение концентраций Nt.BspD6I и ДНК-дуплекса. Концентрации ДНК-дуплексов составляли 10 нМ. Реакцию проводили при 37°C в течение 30 мин.

Также было изучено влияние остатка m⁶A на активность ss.BspD6I в присутствии Nt.BspD6I (рис. 2.29).

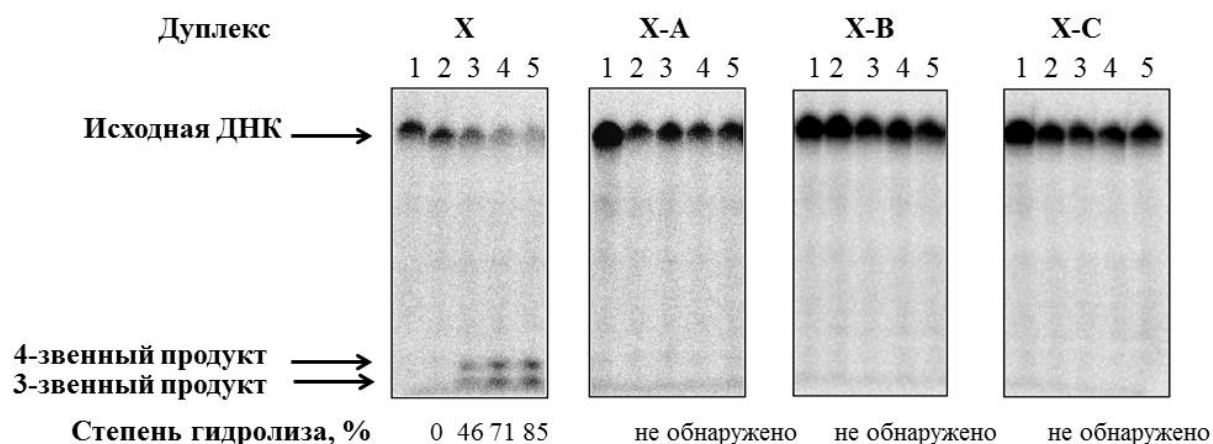


Рис. 2.29. Анализ продуктов гидролиза ss.BspD6I ДНК-дуплексов X – X-C, содержащих 5'-³²P-метку в «нижней» цепи. Радиоавтограф 20%-ного ПААГ с 7 М мочевиной. Концентрации ДНК-дуплексов составляли 10 нМ. Дорожки 1 – исходные ДНК-дуплексы, дорожки 2 – реакционная смесь, содержащая ДНК-дуплекс и ss.BspD6I (600 нМ), дорожки 3–5 – реакционные смеси, содержащие ДНК-дуплекс, Nt.BspD6I (10, 50, 100 нМ, соответственно) и ss.BspD6I (120, 600, 1200 нМ, соответственно). Реакцию проводили при 37°C в течение 30 мин.

Необходимо отметить, что эффективное специфическое связывание и гидролиз дуплексов Nt.BspD6I является необходимым условием проявления каталитической активности ss.BspD6I. При эквимольном соотношении Nt.BspD6I и метилированной ДНК степень комплексообразования была очень низкой (около 7%). При этом гидролиз как

«верхней», так и «нижней» цепи не происходил. Однако при 10-тикратном избытке Nt.BspD6I по отношению к ДНК фермент эффективно связывал и в незначительной степени расщеплял (на 10%) «верхнюю» цепь дуплекса **X-A**, содержащего остаток m⁶A только в «верхней» цепи. Несмотря на это, функционирование ss.BspD6I по-прежнему было заблокировано, т.е. в этом случае гидролиз ДНК Nt.BspD6I не являлся достаточным условием для проявления активности ss.BspD6I.

Гидролиз «нижней» цепи ss.BspD6I в присутствии Nt.BspD6I наблюдался только в случае дуплекса **X**, при этом Nt.BspD6I эффективно связывала и гидролизовала ДНК-субстрат. Вероятно, наличие одного или нескольких остатков m⁶A в участке узнавания фермента препятствует образованию «правильной» конформации Nt.BspD6I. В результате Nt.BspD6I не способна координировать ss.BspD6I на ДНК должным образом.

Полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что Nt.BspD6I и ss.BspD6I являются компонентами системы P-M BspD6I.

2.2.4. Взаимодействие эндонуклеазы рестрикции BspD6I с азобензолсодержащими ДНК-дуплексами

В мировой практике синтетические фрагменты ДНК, содержащие ненуклеозидные вставки, широко используются при изучении особенностей белково-нуклеиновых взаимодействий. Наличие ненуклеозидной вставки в составе ДНК-дуплекса как правило приводит к локальному возмущению структуры субстрата в той или иной мере, благодаря чему удается оценить степень значимости возможных ДНК-белковых контактов в модифицированном участке.

С помощью ДНК-дуплексов, содержащих ненуклеозидные аналоги в участке узнавания R.SsoII, были выявлены необычные особенности взаимодействия этого фермента с ДНК [173]. Полученные результаты также позволили предложить схему, представляющую те группы атомов в ДНК, которые участвуют во взаимодействии с R.SsoII.

ДНК-лиганды с апуриновым/апиримидиновым участком были использованы для изучения действия полимераз [174]. В работе [175] исследовали взаимодействие R.EcoRI с ДНК-дуплексами, содержащими остаток 1,3-бутандиола. При характеристике функционирования системы эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) также использовали ненуклеозидные вставки, содержащие остаток флуоресцеина [176]. Ненуклеозидные вставки вводили в качестве дополнительного звена в цепи ДНК и применяли такие производные в реакциях ферментативного лигирования с участием ДНК-

лигазы фага T4 и синтеза ДНК полимеразой Taq для эффективной дискриминации в ДНК-субстратах одиночных «мисматчей», удаленных от участка лигирования либо от участка начала синтеза ДНК [177] – [178].

К настоящему времени не получены кристаллические структуры комплексов Nt.BspD6I и ss.BspD6I с ДНК, также не существует биохимических данных о контактах R.BspD6I с субстратом. Было решено использовать модифицированные субстраты, которые могут быть полезны для изучения особенностей взаимодействия R.BspD6I с ДНК. Введение модификации в ДНК практически в любом случае влияет на конформацию двойной спирали. Нашей задачей было подобрать такую модификацию ДНК, которая в наименьшей степени влияла бы на конформацию ДНК-дуплекса – в таком случае полученные данные будут адекватно отображать реальную картину взаимодействия фермента с ДНК.

С другой стороны, одной из задач работы являлось создание подхода для регулирования каталитической активности Nt.BspD6I, поэтому планировалось, что введение модификации в ДНК будет ингибировать активность фермента. Вместе с тем, такое ингибирование должно быть обратимым. Это возможно при условии, что вводимая модификация может изменять свою конфигурацию в зависимости от внешнего воздействия, влияя таким образом на стабильность свободного ДНК-дуплекса и ДНК-дуплекса в комплексе с ферментом.

С учетом описанных требований наиболее оптимальной оказалась модификация, представляющая собой ненуклеозидную вставку на основе D-треонинола и содержащая азобензольную группу (АБ-вставка, рис. 2.30).

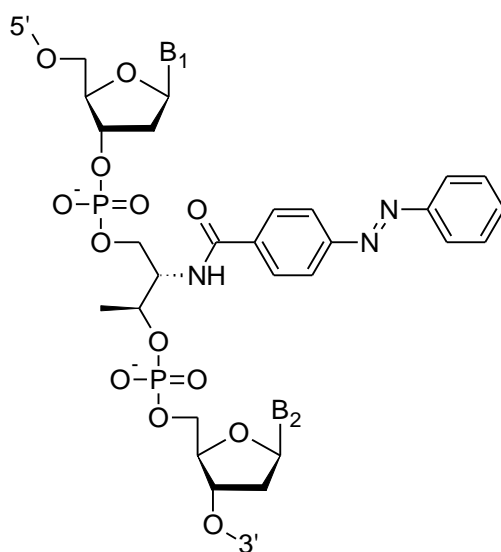


Рис. 2.30. Ненуклеозидная вставка на основе D-треонинола, содержащая азобензольную группу, в составе олигонуклеотидной цепи; B₁ и B₂ – гетероциклические основания.

Примечательной особенностью АБ-вставки в составе ДНК-дуплекса является то, что при видимом свете и в условиях проведения реакций, остаток азобензола находится в *транс*-конфигурации, интеркалируя между основаниями нуклеотидов, и стабилизирует дуплекс за счет включения в межплоскостные взаимодействия с гетероциклическими основаниями («стэкинг») [179].

Результаты ЯМР-спектроскопии [180] для таких модифицированных фрагментов ДНК свидетельствуют о том, что азобензол, находясь в *транс*-конфигурации, практически не влияет на конформацию двойной спирали ДНК (рис. 2.31), хотя увеличение длины углеводофосфатного остова в месте модификации все же происходит.

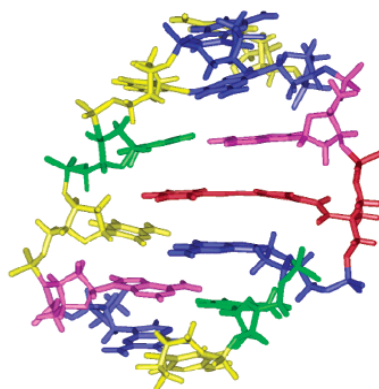


Рис. 2.31. Пространственная структура фрагмента ДНК, содержащего азобензольную нуклеозидную вставку в качестве дополнительного звена (выделена красным) [180].

Облучение модифицированного ДНК-дуплекса УФ-светом приводит к переходу азобензола в непланарную *цис*-конфигурацию, нарушению «стэкинга» и локальной дестабилизации дуплекса [181]. То есть облучение УФ-светом позволяет влиять на структуру ДНК (рис. 2.32). Такое свойство азобензольной вставки может быть использовано в дальнейшем для влияния с помощью облучения светом на стабильность ДНК-дуплекса и, как следствие, на активность связанного с ним фермента.

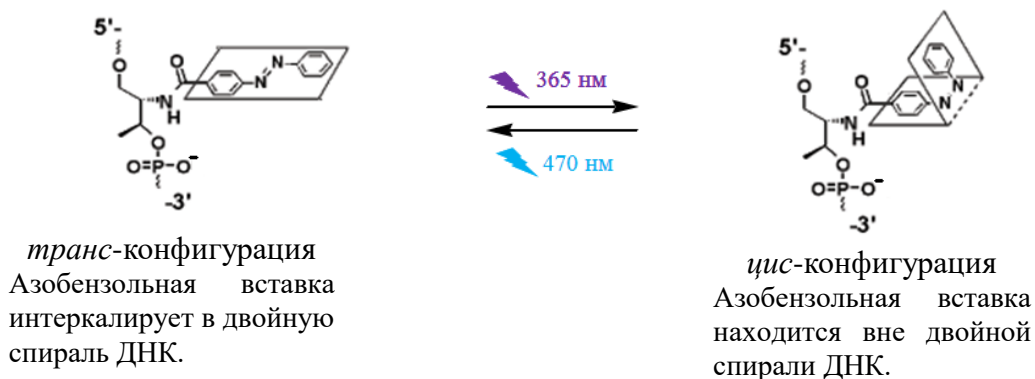


Рис. 2.32. Конфигурации производного азобензола в составе ДНК-дуплекса.

Мы предположили, что основную роль при связывании Nt.BspD6I с ДНК играет N-концевой домен фермента, взаимодействующий с участком узнавания, согласно предложенной ранее модели [147]. Гидролиз «верхней» цепи ДНК происходит в активном центре Nt.BspD6I, расположенном в ее С-концевом домене, а гидролиз «нижней» цепи – в активном центре ss.BspD6I (рис. 2.1). Можно допустить, что модификация участков ДНК, расщепляемых ферментом, будет оказывать бóльший эффект на его каталитическую активность, чем на ДНК-связывающую. Действительно, ранее в нашей лаборатории было показано, что введение ненуклеозидной вставки, представляющей собой остаток этилендиамина, в место гидролиза ЭР MvaI блокировало действие фермента в модифицированной цепи [182]. Таким образом, ненуклеозидную АБ-вставку в качестве дополнительного звена вводили как в позиции гидролиза Nt.BspD6I и ss.BspD6I, так и в прилегающие участки (рис. 2.33), что также позволило проанализировать точечные взаимодействия субъединиц с углеводофосфатным остовом в последовательностях, окружающих расщепляемые межнуклеотидные узлы. Специфический пентануклеотидный участок узнавания R.BspD6I модификации не подвергали.

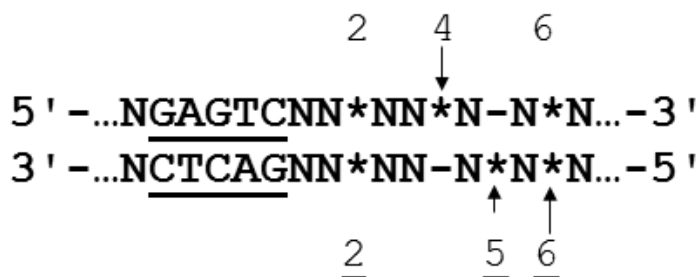


Рис. 2.33. Схема расположения ненуклеозидных вставок (*) в «верхней» и «нижней» цепях субстрата R.BspD6I, участок узнавания R.BspD6I подчеркнут. Стрелки в «верхней» и «нижней» цепях указывают на позиции гидролиза Nt.BspD6I и ss.BspD6I, соответственно. Ненуклеозидная вставка вводилась только в один из указанных межнуклеотидных узлов ДНК-дуплекса в качестве дополнительного звена.

Ненуклеозидную АБ-вставку в «верхней» цепи дуплекса вводили в качестве дополнительного звена в расщепляемый Nt.BspD6I межнуклеотидный узел (на рис. 2.33 – положение 4), а также между нуклеотидами на расстоянии двух звеньев с 5'-конца (положение 2) или с 3'-конца от него (положение 6). В «нижней» цепи ненуклеозидная вставка находилась либо в одной из позиций расщепления ДНК ss.BspD6I (положения 5, 6), либо после двух нуклеотидов с 5'-конца от участка узнавания (положение 2).

Таким образом, на основе 26-звенного субстрата R.BspD6I VI были сконструированы ДНК-дуплексы VI-A, VI-B, VI-C, VI-D, VI-E и VI-F, содержащие одну АБ-вставку в положениях 2, 4, 6, 2, 5, 6, соответственно (рис. 2.33), и изучено их

взаимодействие с Nt.BspD6I и ss.BspD6I при видимом свете (остаток азобензола находится в *транс*-конфигурации).

2.2.4.1. Взаимодействие ДНК-дуплексов, содержащих азобензольную группу, с нуклеазой BspD6I

Прежде всего, была исследована стабильность ДНК, содержащих АБ-вставку. Для этого регистрировали зависимость оптической плотности раствора дуплекса в зависимости от температуры. Метод позволяет проследить за процессом денатурации двутяжевых нуклеиновых кислот. Плавление немодифицированных олигонуклеотидных ДНК-дуплексов носит кооперативный характер, происходит в достаточно узком интервале температур (ΔT) и характеризуется температурой плавления ($T_{пл}$). $T_{пл}$ – это температура, при которой доли нуклеотидных звеньев в двуцепочечном и одноцепочечном состоянии равны. Введение точечной модификации в ДНК может приводить к изменению ΔT и $T_{пл}$.

Показано, что введение одного модифицированного звена практически не влияло на $T_{пл}$ 26-звенных дуплексов (табл. 2.2). Согласно данным литературы *транс*-конфигурация АБ-вставки на несколько градусов повышает $T_{пл}$ дуплекса по сравнению с немодифицированным дуплексом за счет своей способности интеркалировать между гетероциклическими основаниями нуклеиновой кислоты, однако данный эффект наблюдался для коротких восьмизвенных дуплексов [183]. $T_{пл}$ дуплексов **VI** и **VI-A – VI-F** практически совпадают, что свидетельствует о том, что в случае 26-звенных дуплексов вклад АБ-вставки в стабильность ДНК незначителен.

Далее исследовали связывание Nt.BspD6I с 26-звенными модифицированными ДНК-дуплексами по сравнению с немодифицированным ДНК-дуплексом **VI**. Показано, что при видимом свете, то есть в условиях, когда азобензол находится в *транс*-конфигурации, Nt.BspD6I формирует комплекс со всеми ^{32}P -меченными 26-звенными дуплексами **VI-A – VI-F**. Кажущиеся константы диссоциации комплексов определены, как описано в разделе 2.2.2.1, и представлены в табл. 2.2. Введение АБ-вставки незначительно снижало сродство Nt.BspD6I к модифицированным ДНК-дуплексам. При этом положение нуклеозидной вставки практически не влияло на значение K_d ДНК-белкового комплекса. По-видимому, это связано с тем, что азобензолсодержащие звенья располагались не в участке узнавания R.BspD6I, а в месте гидролиза ДНК Nt.BspD6I или ss.BspD6I, либо в непосредственной близости от них.

Таблица 2.2

Взаимодействие Nt.BspD6I с ДНК-дуплексами VI, VI-A – VI-F

ДНК-дуплекс	Последовательность ДНК-дуплекса	$T_{пл}, \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$	K_d комплекса Nt.BspD6I-ДНК, нМ	Начальная скорость гидролиза, нМ/мин
VI	5'-CGTGGTCTC <u>GAGTC</u> TTCTCAAGGTAC-3' 3'-GCACCAGAG <u>CTCAG</u> AAGAGTTCCATG-5' ↓ ↑ ↑ ↑	74	7 ± 1	$6,2 \pm 0,7$
VI-A	5'-CGTGGTCTC <u>GAGTC</u> TT ^x CTCAAGGTAC-3' 3'-GCACCAGAG <u>CTCAG</u> AA-GAGTTCCATG-5' ↓ ↑ ↑ ↑	75	11 ± 2	$0,5 \pm 0,1$
VI-B	5'-CGTGGTCTC <u>GAGTC</u> TTCT ^x CAAGGTAC-3' 3'-GCACCAGAG <u>CTCAG</u> AAGA-GTTCCATG-5' ↓ ↑ ↑ ↑	75	9 ± 2	$0,1 \pm 0,05$
VI-C	5'-CGTGGTCTC <u>GAGTC</u> TTCTCA ^x AGGTAC-3' 3'-GCACCAGAG <u>CTCAG</u> AAGAGT-TCCATG-5' ↓ ↑ ↑ ↑	75	12 ± 2	$3,7 \pm 0,2$
VI-D	5'-CGTGGTCTC <u>GAGTC</u> TT-CTCAAGGTAC-3' 3'-GCACCAGAG <u>CTCAG</u> AA ^x GAGTTCCATG-5' ↓ ↑ ↑ ↑	75	15 ± 3	$6,5 \pm 0,8$
VI-E	5'-CGTGGTCTC <u>GAGTC</u> TTCTC-AAGGTAC-3' 3'-GCACCAGAG <u>CTCAG</u> AAGAG ^x TTCCATG-5' ↓ ↑ ↑ ↑	75	15 ± 3	$5,8 \pm 0,7$
VI-F	5'-CGTGGTCTC <u>GAGTC</u> TTCTCA-AGGTAC-3' 3'-GCACCAGAG <u>CTCAG</u> AAGAGT ^x TCCATG-5' ↓ ↑ ↑ ↑	75	14 ± 3	$0,2 \pm 0,05$

^x и _x – обозначение ненуклеозидной вставки в «верхней» и «нижней» цепях, соответственно. ↓ и ↑ указывают на позиции гидролиза «верхней» и «нижней» цепей, соответственно.

Гидролиз Nt.BspD6I модифицированных ДНК-дуплексов VI-A – VI-F изучали в тех же условиях, как было описано выше для ДНК-дуплекса VI (раздел 2.2.2.2). Были рассчитаны начальные скорости гидролиза этих дуплексов под действием Nt.BspD6I (табл. 2.2). Оказалось, что положение модификации значительно влияет на начальную скорость гидролиза дуплекса Nt.BspD6I. Из модифицированных дуплексов наиболее эффективно расщепляются дуплексы VI-C, VI-D и VI-E. В случае дуплекса VI-C АВ-вставка находилась в «верхней» цепи в положении 6 (на расстоянии шести нуклеотидов с 3'-стороны от участка узнавания и двух нуклеотидов с 3'-стороны от места гидролиза Nt.BspD6I). Вероятно, Nt.BspD6I не формирует значимых контактов с данным положением, т.к. оно удалено как от участка узнавания, так и от позиции гидролиза Nt.BspD6I. В дуплексах VI-D и VI-E АВ-вставка локализована в «нижней» цепи в положениях 2 и 5 (на расстоянии 2 и 5 нуклеотидов с 5'-стороны от участка узнавания,

соответственно). Модификация в дуплексе **VI-D** находится между участком узнавания Nt.BspD6I и позицией ее гидролиза (в противоположной цепи), что теоретически могло бы влиять на активность фермента. Однако экспериментальные данные опровергают данное предположение. Также можно заключить, что Nt.BspD6I не формирует значимых контактов в «нижней» цепи между 5 и 6 нуклеотидами, считая с 5'-стороны от участка узнавания (неосновное место гидролиза ss.BspD6I и положение модификации в дуплексе **VI-E**).

Начальная скорость расщепления Nt.BspD6I ДНК-дуплекса **VI-A** с АБ-вставкой, находящейся в «верхней» цепи в положении 2 (между участком узнавания и местом гидролиза Nt.BspD6I), оказалась существенно ниже начальной скорости гидролиза немодифицированного дуплекса **VI** (примерно в 12 раз). Очевидно, что Nt.BspD6I контактирует с углеводофосфатным остовом в положении 2, поэтому нахождение АБ-вставки в этом участке ДНК значительно снижает скорость гидролиза (дуплекс **VI-A**). Введение модификации в гидролизуемый узел (дуплекс **VI-B**, положение 4) практически полностью блокирует гидролиз Nt.BspD6I. Таким образом, ДНК-дуплекс **VI-B** является негидролизуемым аналогом субстрата Nt.BspD6I. Фермент образует с этим дуплексом стабильный комплекс и практически его не расщепляет.

Неожиданным и интересным оказался тот факт, что негидролизуемым аналогом субстрата Nt.BspD6I оказался также дуплекс **VI-F**, содержащий АБ-вставку в основной позиции гидролиза ss.BspD6I. Это позволяет предположить, что Nt.BspD6I образует контакт с углеводофосфатным остовом в цепи ДНК, комплементарной цепи, расщепляемой этим ферментом. Возможно, таким образом Nt.BspD6I координирует ss.BspD6I на ДНК и обеспечивает гидролиз субстрата ss.BspD6I в «нижней» цепи.

2.2.4.2. Взаимодействие азобензолсодержащих дуплексов с малой субъединицей эндонуклеазы рестрикции BspD6I

Гидролиз азобензолсодержащих дуплексов **VI-A – VI-F** ss.BspD6I проводили в буфере В в присутствии Nt.BspD6I. Для анализа гидролиза ДНК ss.BspD6I ³²P-метку вводили на 5'-конец «нижней» цепи дуплексов. За ходом реакции, сопровождающейся образованием 6- и 7-звенных олигонуклеотидов, следили методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях. В качестве положительного контроля использовали ДНК-дуплекс **VI**. Гетеродимер R.BspD6I формировали в соотношении концентраций Nt.BspD6I:ss.BspD6I – 1:12.

Введение нуклеозидных АБ-вставок в «верхнюю» цепь в позиции 2 (дуплекс **VI-A**) и 6 (дуплекс **VI-C**) приводило к понижению эффективности гидролиза субстрата *ss.BspD6I* примерно на 15-20% (рис. 2.34.А). Важно отметить, что в ДНК-дуплексе **VI-C** модификация находилась напротив гидролизуемой малой субъединицей *R.BspD6I* фосфодиэфирной связи.

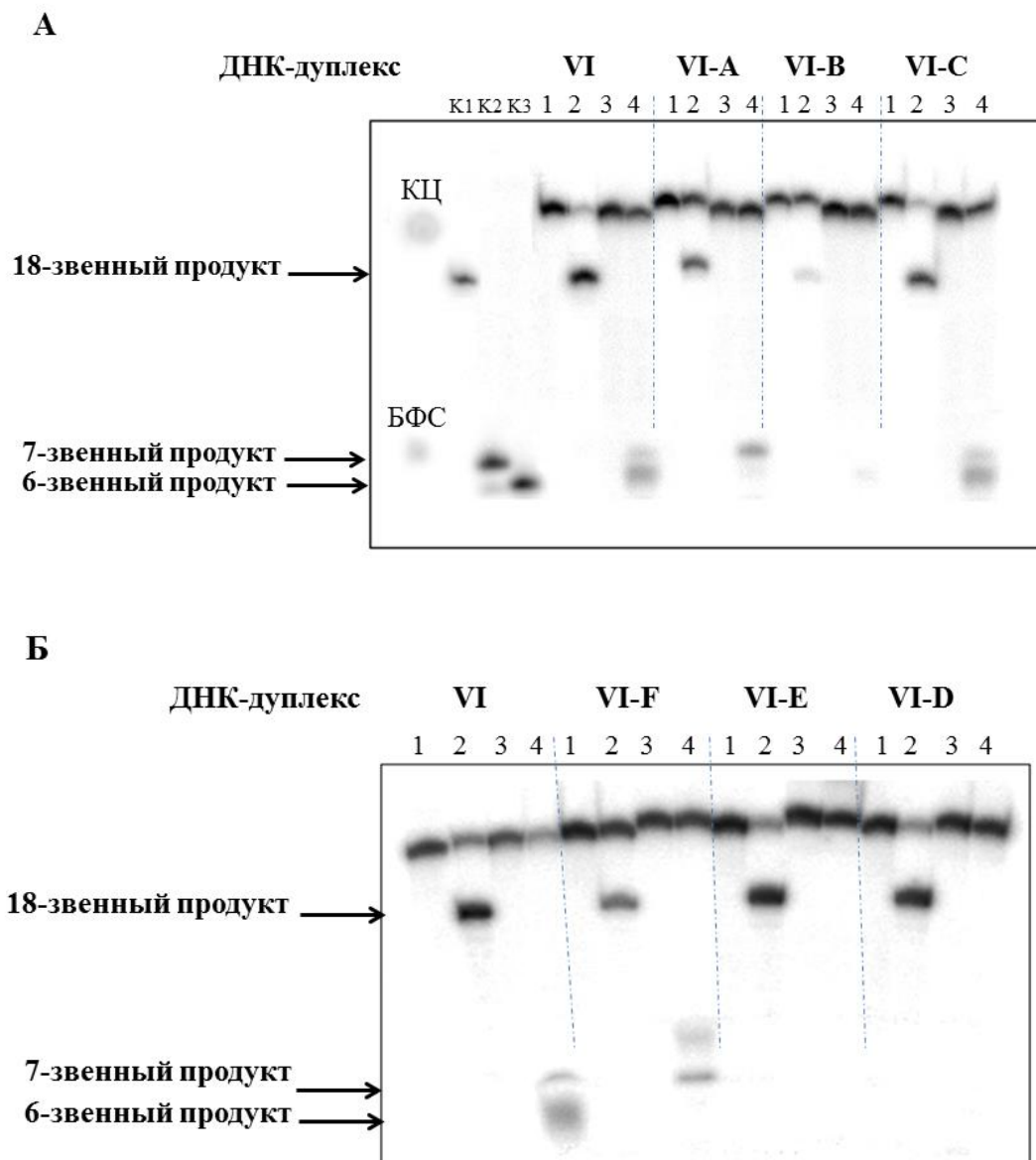


Рис. 2.34. Анализ продуктов гидролиза ДНК-дуплексов **VI-A – VI-C** (А) и **VI-D – VI-F** (Б) в сравнении с контрольным дуплексом **VI** под действием *Nt.BspD6I* или *ss.BspD6I* в присутствии *Nt.BspD6I*. Радиоавтограф 20%-ного ПААГ с 7 М мочевиной. Концентрации ДНК-дуплексов составляли 10 нМ. Дорожки 1 – исходные ДНК-дуплексы (^{32}P -метка в «верхней» цепи), дорожки 2 – реакционные смеси, содержащие ДНК-дуплекс (^{32}P -метка в «верхней» цепи) и *Nt.BspD6I* (10 нМ), дорожки 3 – исходные ДНК-дуплексы (^{32}P -метка в «нижней» цепи), дорожки 4 – реакционные смеси, содержащие ДНК-дуплекс (^{32}P -метка в «нижней» цепи), *Nt.BspD6I* (10 нМ) и *ss.BspD6I* (120 нМ). Реакции проводили при 37°C в течение 30 мин. КЦ – положение на геле красителя ксиленцианола, БФС – бромфенолового синего. К1, К2, К3 – контрольные образцы, содержащие радиоактивно меченные олигонуклеотиды, идентичные 18-, 7- и 6-тизвенным продуктам гидролиза, соответственно.

Негидролизуемый аналог Nt.BspD6I – ДНК-дуплекс **VI-B** (АБ-вставка – в месте гидролиза Nt.BspD6I) – малая субъединица так же, как и большая, практически не расщепляла. При гидролизе ss.BspD6I (в присутствии Nt.BspD6I) ДНК-дуплексов **VI, VI-B, VI-C, VI-F** наблюдается преобладание более короткого 6-тизвенного ³²P-меченного продукта гидролиза. Исключение составляет ДНК-дуплекс **VI-A**. Основным продуктом гидролиза этого ДНК-дуплекса с АБ-вставкой в положении 2 является 7-мизвенный ³²P-меченный олигонуклеотид (отношение 7- и 6-тизвенных продуктов составляет 4:1). Очевидно, что введение дополнительного ненуклеозидного звена в положение 2 влияет на конформацию комплекса Nt.BspD6I и ss.BspD6I с ДНК таким образом, что меняется специфичность действия ss.BspD6I.

Интересно, что наличие азобензольной вставки в «нижней» цепи вблизи участка узнавания в положении 2 (дуплекс **VI-D**), а также в положении 5 (дуплекс **VI-E**) – неосновное место гидролиза ДНК ss.BspD6I – блокирует каталитическую активность ss.BspD6I. Таким образом, в реакциях с использованием синтетических ДНК-дуплексов, содержащих АБ-вставку, впервые показано наличие контактов ss.BspD6I с ДНК, причем не только с местом гидролиза ДНК в «нижней» цепи, но также и вблизи участка узнавания (положение 2). Данные взаимодействия, по-видимому, играют ключевую роль в функционировании ss.BspD6I. Стоит напомнить, что ингибирования активности Nt.BspD6I при взаимодействии с этими дуплексами не наблюдалось.

При наличии модификации в основном месте гидролиза ДНК ss.BspD6I (положение 6, дуплекс **VI-F**) фермент сохраняет способность расщеплять ДНК в «нижней» цепи (рис. 2.34.Б), хотя эффективность гидролиза значительно снижена по сравнению с контрольным дуплексом **VI**. Это можно объяснить как наличием контактов ss.BspD6I с расщепляемым межнуклеотидным узлом, так и тем, что данный дуплекс практически не расщепляется Nt.BspD6I, что опосредованно влияет и на активность ss.BspD6I. В случае ДНК-субстрата **VI-F** продукты гидролиза «нижней» цепи – 5'-GTACCT**x**T-3' и 5'-GTACCT**x**-3' – содержат ненуклеозидную вставку (**x**), в результате их подвижность в геле уменьшается (рис. 2.34.Б): продукты гидролиза модифицированного субстрата мигрируют в геле медленнее, чем немодифицированного.

Сравнение влияния положения азобензольной вставки в ДНК-дуплексе на активность Nt.BspD6I и ss.BspD6I представлено в табл. 2.3.

Таблица 2.3

Взаимодействие Nt.BspD6I и ss.BspD6I (в присутствии Nt.BspD6I) с азобензолсодержащими дуплексами

ДНК-дуплекс	Последовательность ДНК-дуплекса	Относительная степень гидролиза (30 мин, 37°C) Nt.BspD6I, %	Относительная степень гидролиза (30 мин, 37°C) ss.BspD6I, %
VI	↓ 5'-CGTGGTCTC <u>GAGTC</u> TTCTCAAGGTAC-3' 3'-GCACCAGAG <u>CTCAGA</u> AAGAGTTCCATG-5' ↑↑	100	100
VI-A	↓ 5'-CGTGGTCTC <u>GAGTC</u> TT ^x CTCAAGGTAC-3' 3'-GCACCAGAG <u>CTCAGA</u> AA-GAGTTCCATG-5' ↑↑	81	77
VI-B	↓ 5'-CGTGGTCTC <u>GAGTC</u> TTCT ^x CAAGGTAC-3' 3'-GCACCAGAG <u>CTCAGA</u> AAGA-GTTCCATG-5' ↑↑	4	11
VI-C	↓ 5'-CGTGGTCTC <u>GAGTC</u> TTCTCA ^x AGGTAC-3' 3'-GCACCAGAG <u>CTCAGA</u> AAGAGT-TCCATG-5' ↑↑	100	86
VI-D	↓ 5'-CGTGGTCTC <u>GAGTC</u> TT-CTCAAGGTAC-3' 3'-GCACCAGAG <u>CTCAGA</u> AA ^x GAGTTCCATG-5' ↑↑	100	8
VI-E	↓ 5'-CGTGGTCTC <u>GAGTC</u> TTCTC-AAGGTAC-3' 3'-GCACCAGAG <u>CTCAGA</u> AAGAG ^x TTCCATG-5' ↑↑	100	11
VI-F	↓ 5'-CGTGGTCTC <u>GAGTC</u> TTCTCA-AGGTAC-3' 3'-GCACCAGAG <u>CTCAGA</u> AAGAGT ^x TCCATG-5' ↑↑	44	28

^x и _x – обозначение ненуклеозидной вставки в «верхней» и «нижней» цепях, соответственно. ↓ и ↑ указывают на позиции гидролиза «верхней» и «нижней» цепей, соответственно. Относительную степень гидролиза рассчитывали как отношение степени гидролиза модифицированного дуплекса к степени гидролиза дуплекса **VI**, умноженное на 100.

Из табл. 2.3 видно, что эффективное функционирование Nt.BspD6I является основополагающим фактором для действия ss.BspD6I. Однако из анализа полученных данных следует, что эффективный гидролиз ДНК Nt.BspD6I не всегда является достаточным условием для функционирования ss.BspD6I. Так, наличие АБ-вставки в «нижней» цепи в положениях 2 (дуплекс **VI-D**) или 5 (дуплекс **VI-E**) ингибирует действие ss.BspD6I, несмотря на то, что Nt.BspD6I эффективно гидролизует эти дуплексы. Вероятно, для проявления активности ss.BspD6I необходимы «правильная» конформация Nt.BspD6I в комплексе с ДНК и способность Nt.BspD6I эффективно гидролизовать «верхнюю» цепь, а также формирование «собственных» контактов с некоторыми

участками в «нижней» цепи ДНК. Данное предположение также согласуется с результатами, полученными в ходе анализа взаимодействия Nt.BspD6I с метилированными ДНК-дуплексами (раздел 2.2.3).

На рис. 2.35 представлена схема некоторых предполагаемых контактов Nt.BspD6I и ss.BspD6I с ДНК-субстратом, составленная на основе данных, описанных в разделах 2.2.3 и 2.2.4.

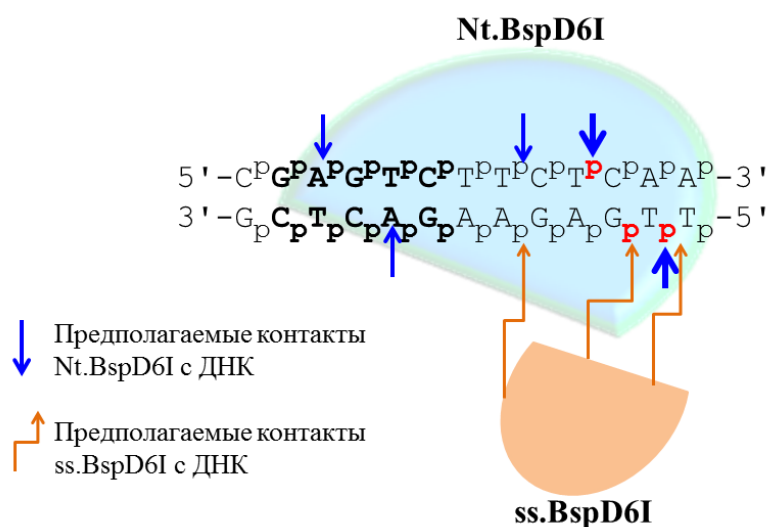


Рис.2.35. Схема некоторых предполагаемых контактов Nt.BspD6I и ss.BspD6I с ДНК.

Продemonстрировано, что Nt.BspD6I формирует контакты в «верхней» цепи не только с участком узнавания (в частности с N6-атомом аденина) и местом гидролиза, но также и с группами атомов в «нижней» цепи, например, с остатком аденозина участка узнавания и межнуклеотидным узлом, предпочтительно расщепляемым ss.BspD6I. В реакциях с использованием синтетических ДНК-дуплексов, содержащих АБ-вставку, впервые предсказано наличие контактов ss.BspD6I с ДНК, причем не только с местом гидролиза ДНК в «нижней» цепи, но также и в непосредственной близости от участка узнавания (положение 2). Данные взаимодействия, по-видимому, играют ключевую роль в функционировании ss.BspD6I.

2.3. Разработка подходов к регулированию активности никующей эндонуклеазы BspD6I с использованием модифицированных ДНК-дуплексов

Широкое применение ЭР в различных областях молекулярной биологии привело к необходимости разработки способов регулирования их активности с помощью внешнего сигнала [133], [140] – [142]. В последнее время появилось множество новых методов,

использующих свойство никующих эндонуклеаз специфически вносить одноцепочный разрыв в ДНК. Для создания химерных высокоспецифичных ферментов на основе никующих эндонуклеаз, а также для совершенствования существующих методов необходимо разрабатывать подходы, позволяющие регулировать активность НЭ с помощью внешнего сигнала.

Нами был предложен подход к направленному регулированию активности Nt.BspD6I, основанный на использовании синтетических ДНК-дуплексов. Идея подхода заключалась в использовании негидролизуемого аналога субстрата эндонуклеазы – ДНК-дуплекса, содержащего ненуклеозидную вставку с остатком азобензола в месте гидролиза ДНК Nt.BspD6I (рис. 2.36).

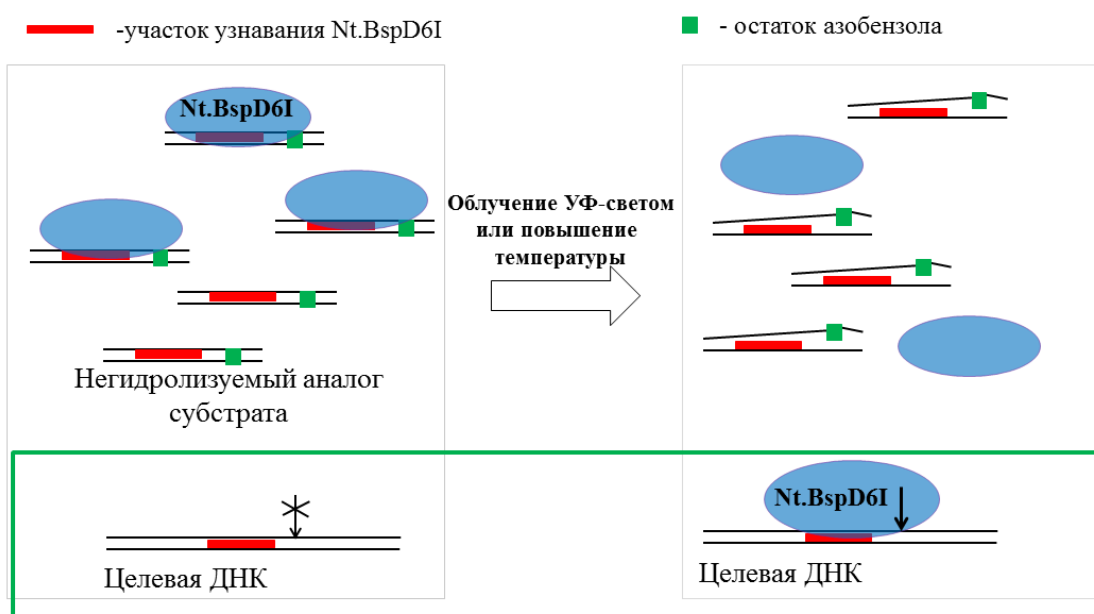


Рис. 2.36. Метод «молекулярной ловушки». Схематично изображены Nt.BspD6I (выделена синим цветом), ее участок узнавания (красным) как в целевой ДНК, так и в негидролизуемом ДНК-дуплексе. Ненуклеозидная вставка с остатком азобензола в составе негидролизуемого аналога субстрата (выделена зеленым квадратом) не препятствует связыванию с Nt.BspD6I; нагревание либо облучение ультрафиолетовым светом должно приводить к диссоциации комплекса Nt.BspD6I и молекулярной «ловушки», способствуя гидролизу целевой ДНК.

При больших избытках такого аналога субстрата относительно фермента ДНК-связывающий центр Nt.BspD6I будет занят негидролизуемым дуплексом, и целевая (например, геномная) ДНК не сможет подвергнуться расщеплению. Таким образом, негидролизуемый аналог субстрата будет выступать в качестве «ловушки», закрывающей ДНК-связывающий центр фермента. Негидролизуемый аналог субстрата должен быть подобран таким образом, чтобы небольшое нагревание и/или облучение УФ-светом приводило к дестабилизации и, как следствие, диссоциации дуплекса. В результате стабильность комплекса эндонуклеазы с синтетическим фрагментом ДНК существенно

понижится. «Ловушка», закрывающая ДНК-связывающий центр Nt.BspD6I, «приоткроеется» и фермент сможет связаться с целевой ДНК и гидролизовать её.

2.3.1. Подбор оптимальной структуры негидролизуемых аналогов субстрата Nt.BspD6I

Как было показано в разделе 2.2.4.1, стабильный в условиях проведения реакции и при видимом свете ДНК-дуплекс **VI-B**, содержащий одну (в месте гидролиза Nt.BspD6I) АБ-вставку, прочно, но непродуктивно связывается с ферментом, то есть не подвергается гидролизу.

На первом этапе работы была предложена модельная система, в которой в качестве целевой ДНК был использован радиоактивно меченный 30-звенный ДНК-дуплекс **VIII** (раздел 2.2.2.5). В качестве негидролизуемого аналога субстрата Nt.BspD6I для временного блокирования активности фермента был использован 26-звенный ДНК-дуплекс **VI-B**. Ненуклеозидная вставка в месте гидролиза Nt.BspD6I не препятствует связыванию белка, но в то же время Nt.BspD6I практически не гидролизует такой дуплекс (см. табл. 2.2).

Был проведен анализ эффективности гидролиза Nt.BspD6I ³²P-меченного субстрата **VIII** при различных избытках ДНК-дуплекса **VI-B** по отношению к нему (рис. 2.37). Показано, что возможно подобрать такое соотношение концентраций негидролизуемого аналога субстрата Nt.BspD6I и целевого субстрата, при котором происходит существенное ингибирование гидролиза последнего.



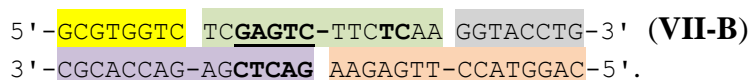
Рис. 2.37. Анализ продуктов гидролиза 30-звенного субстрата **VIII** Nt.BspD6I в присутствии ДНК-дуплекса **VI-B**. Радиоавтограф 20%-ного ПААГ с 7 М мочевиной. Условия инкубации – 30 мин при 37°C. Дорожка К – исходная ДНК (меченная ³²P «верхняя» цепь ДНК-дуплекса **VIII**), остальные дорожки – реакционные смеси после гидролиза субстрата **VIII** (10 нМ) Nt.BspD6I (10 нМ) в присутствии дуплекса **VI-B** (концентрацию варьировали от 0 до 1 мМ).

Соотношение субстрат : негидролизуемый аналог, при котором наблюдалось более, чем 90%-ное ингибирование гидролиза субстрата Nt.BspD6I, составляло 1:100. Далее

требовалось подобрать условия для дестабилизации негидролизующего аналога субстрата, чтобы освободить ДНК-связывающий центр Nt.BspD6I от ингибитора. Тогда фермент мог бы снова связываться с целевой ДНК и гидролизовать ее с высокой эффективностью.

Был изучен гидролиз 30-звенного субстрата **VIII** в присутствии 150-тикратного избытка дуплекса **VI-B** без облучения и при облучении УФ-светом с длиной волны 365 нм. Реакцию проводили при 37°C в течение 30 мин. В ходе экспериментов с облучением УФ-светом не удалось добиться восстановления активности Nt.BspD6I. Было показано, что облучение не влияет на функциональные свойства фермента. На основании полученных данных мы предположили, что *транс-цис*-переход одного остатка азобензола не может вызвать значительной дестабилизации 26-звенного ДНК-дуплекса с исходной температурой плавления равной 75°C.

Очевидно, что для регулирования активности Nt.BspD6I требовалось подобрать альтернативный негидролизующий аналог субстрата. Был сконструирован ДНК-дуплекс **VII-B**, «верхняя» цепь которого состояла из трех олигонуклеотидов, а «нижняя» – из двух:



Наличие в ДНК-дуплексе несовпадающих одноцепочечных разрывов приводит к значительному понижению его $T_{пл}$. Показано, что такой составной ДНК-дуплекс «плавится» в широком интервале температур от 15 до 40°C (рис. 2.38).

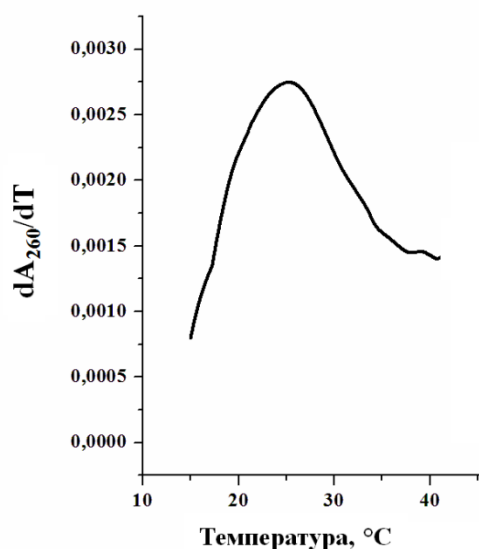
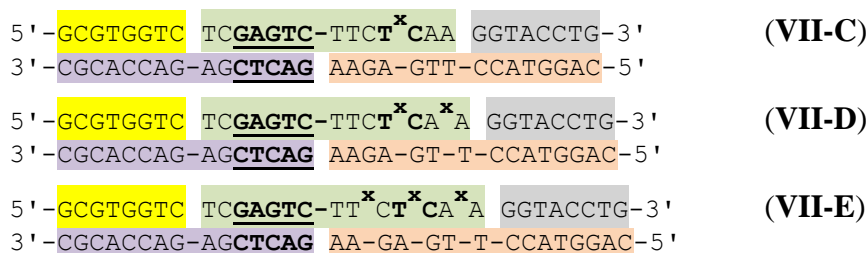


Рис. 2.38. Дифференциальная кривая плавления ДНК-дуплекса **VII-B**, состоящего из пяти олигонуклеотидов.

Основной компонент ДНК-дуплекса **VII-B** – это 14-звенный олигонуклеотид (выделен бирюзовым цветом), в который вводили одну или несколько АБ-вставок (обозначена как ^x, ДНК-дуплексы **VII-C**, **VII-D**, **VII-E**):



В ДНК-дуплексе VII-C в 14-звенном олигонуклеотиде в «верхней» цепи содержалась АБ-вставка в месте гидролиза Nt.BspD6I. Мы полагали, что состоящий из пяти олигонуклеотидов дуплекс VII-C может выступать в качестве негидролизуемого аналога субстрата так же, как и 26-звенный ДНК-дуплекс VI-B, в котором АБ-вставка тоже находилась в месте гидролиза Nt.BspD6I. Переход остатка азобензола из планарной *транс*- в непланарную *цис*- конфигурацию в 14-звенном олигонуклеотиде ДНК-дуплекса VII-C должен внести вклад в его дестабилизацию.

Для усиления влияния процесса фотоизомеризации остатка азобензола на стабильность составного ДНК-дуплекса в 14-звенный олигонуклеотид «верхней» цепи помимо АБ-вставки в месте гидролиза Nt.BspD6I вводился еще один дополнительный остаток азобензола в положение 6 (ДНК-дуплекс VII-D), либо еще два дополнительных остатка азобензола в положения 2 и 6 (ДНК-дуплекс VII-E). Такие дуплексы так же, как и ДНК-дуплекс VII-C, могут выступать в качестве негидролизуемых аналогов субстрата Nt.BspD6I. Можно было ожидать, что *транс-цис*-переход трех остатков азобензола в ДНК-дуплексе VII-E может оказать большее влияние на стабильность дуплекса, чем *транс-цис*-переход одного остатка азобензола, как это было показано для 8- и 20-тизвенных дуплексов в работах [179], [184].

ДНК-дуплексы VII-C, VII-D, VII-E, состоящие из пяти олигонуклеотидов, диссоциируют на отдельные олигонуклеотиды примерно в одинаковом интервале температур (от 15 до 40°C) (рис. 2.39). Их температуры «плавления» составили 25 ± 1°C, 28 ± 1°C, 24 ± 1°C, соответственно.

В качестве негидролизуемого аналога субстрата Nt.BspD6I для временного блокирования активности фермента первоначально был использован 30-звенный ДНК-дуплекс VII-C, состоящий из пяти олигонуклеотидов, АБ-вставка в котором находилась в месте гидролиза Nt.BspD6I. На первом этапе необходимо было подобрать избыток ДНК-дуплекса VII-C относительно немодифицированного субстрата. В качестве целевого субстрата выступал 30-звенный ДНК-дуплекс VIII* с флуоресцентной меткой TAMRA на 3'-конце (см. раздел 2.2.2.5).

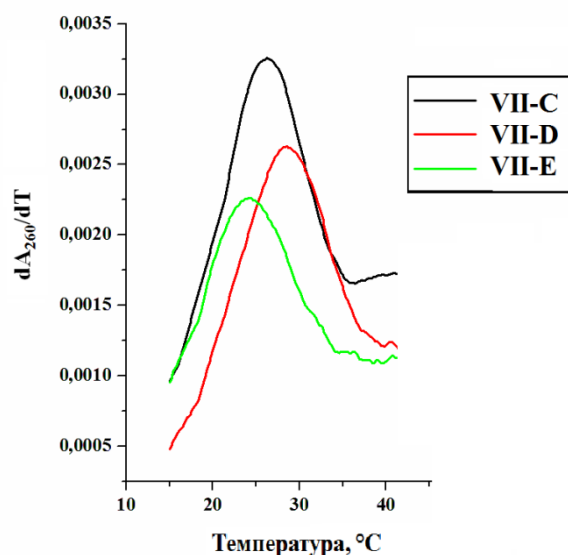


Рис. 2.39. Графики зависимости оптической плотности растворов ДНК-дуплексов **VII-C**, **VII-D**, **VII-E** в буфере В от температуры в дифференциальной форме. Концентрации дуплексов составляли 0,4-0,5 мкМ.

Был изучен гидролиз под действием Nt.BspD6I ДНК-дуплекса **VIII*** при различных избытках ДНК-дуплекса **VII-C** относительно субстрата (рис. 2.40). Реакцию проводили при 25°C – температуре, при которой дуплекс **VII-C** сохраняет свою двуспиральную структуру.

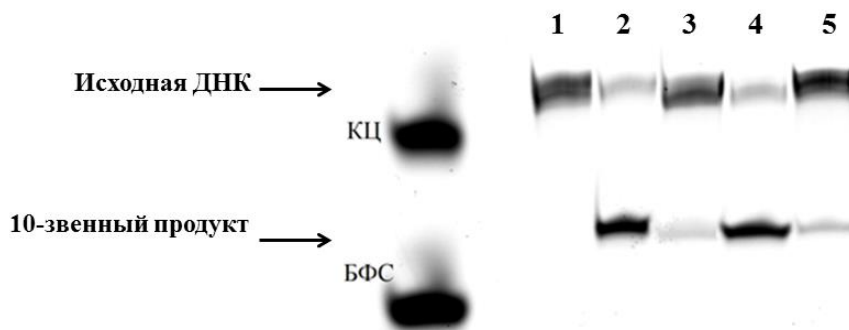


Рис. 2.40. Анализ в 20%-ном ПААГ, содержащем 7 М мочевины, продуктов гидролиза 30-звенного субстрата **VIII*** Nt.BspD6I в присутствии различных концентраций ДНК-дуплекса **VII-C**. Зоны ДНК детектировали по флуоресценции. Дорожка 1 – исходная ДНК, меченная флуорофором TAMRA; дорожки 2, 4 – реакционные смеси после гидролиза ДНК-дуплекса **VIII*** Nt.BspD6I; дорожки 3, 5 – реакционные смеси после гидролиза ДНК-дуплекса **VIII*** Nt.BspD6I в присутствии 200- и 300-кратного избытка ДНК-дуплекса **VII-C**, соответственно. Условия инкубации – 30 мин, 25°C. Концентрации Nt.BspD6I и ДНК-дуплекса **VIII*** составляли 10 нМ.

Для 90%-ного ингибирования Nt.BspD6I при 25°C потребовался 300-кратный избыток ДНК-дуплекса **VII-C** (рис. 2.40, дорожка 5). Вероятно, это связано с тем, что температура плавления предложенного дуплекса **VII-C**, состоящего из 5

олигонуклеотидов, также лежит в районе 25°C, т.е. ДНК-дуплекс **VII-C** лишь частично сохраняет двуспиральную форму при этой температуре.

Далее необходимо было проверить, является ли наблюдаемое ингибирование активности Nt.BspD6I ДНК-дуплексом **VII-C** специфичным при 25°C (рис. 2.41). Для этого эксперимента были использованы ДНК-дуплексы **VII-B**, **VII-C**, а также ДНК-дуплекс **XII**, не содержащий участок узнавания Nt.BspD6I:

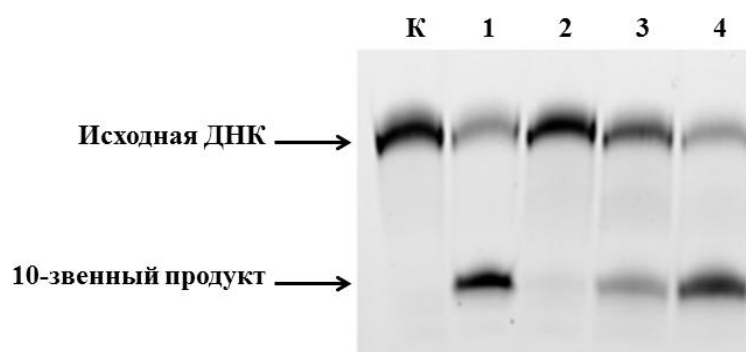
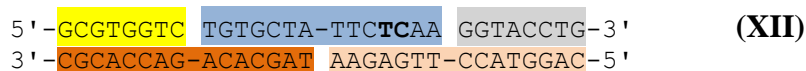


Рис. 2.41. Анализ в 20%-ном ПААГ, содержащем 7 М мочевины, продуктов гидролиза 30-звенного субстрата **VIII*** Nt.BspD6I в присутствии дуплексов-конкурентов. Зоны ДНК детектировали по флуоресценции. Реакцию проводили в течение 30 мин при 25°C. Дорожка К – исходная ДНК **VIII***, меченная TAMRA; дорожка 1 – реакционная смесь после гидролиза ДНК-дуплекса **VIII*** Nt.BspD6I; дорожки 2-4 – реакционные смеси после гидролиза ДНК-дуплекса **VIII*** Nt.BspD6I в присутствии ДНК-дуплексов **VII-B**, **VII-C** и **XII**, соответственно. Концентрация Nt.BspD6I составляла 10 нМ, субстрата **VIII*** – 10 нМ, дуплекса-конкурента – 3 мкМ.

Как видно из результатов, представленных на рис. 2.41, ДНК-дуплекс **XII**, не имеющий участка узнавания Nt.BspD6I, не ингибирует гидролиз целевого субстрата. Таким образом, ингибирование активности Nt.BspD6I с помощью негидролизуемого аналога субстрата **VII-C**, является специфичным. Немодифицированный ДНК-дуплекс **VII-B**, содержащий участок узнавания Nt.BspD6I, также снижает эффективность гидролиза субстрата **VIII*** Nt.BspD6I, однако менее эффективно по сравнению с ДНК-дуплексом **VII-C**, по-всей видимости, за счет собственного гидролиза.

Способность Nt.BspD6I гидролизовать дуплексы **VII-B** и **VII-C** была проверена экспериментально. Теоретически Nt.BspD6I может вносить разрыв в 14-звенный олигонуклеотид таких составных дуплексов, поэтому в этот олигонуклеотид вводили ³²P-метку. В качестве положительного контроля использовали канонический 14-звенный дуплекс **II** (раздел 2.2.2.1, рис. 2.12), также содержащий ³²P-меченную «верхнюю» цепь (рис. 2.42).

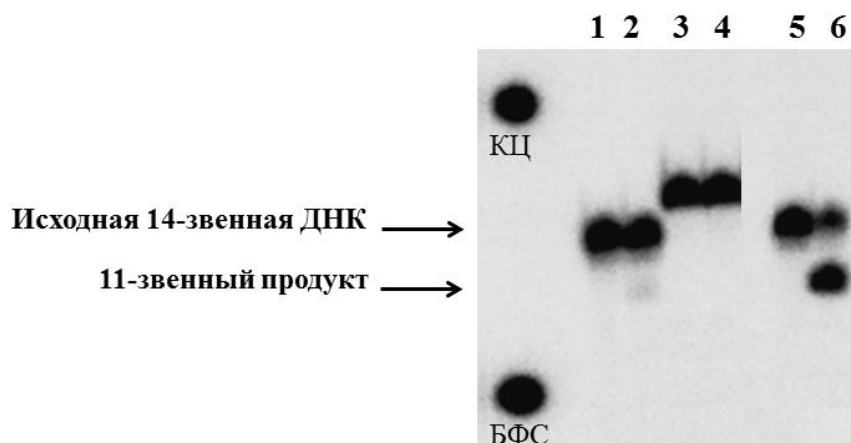


Рис. 2.42. Анализ продуктов гидролиза дуплексов **VII-B**, **VII-C** и **II** Nt.BspD6I. Радиоавтограф 20%-ного ПААГ с 7 М мочевиной. Условия инкубации – 3 ч при 25°C. Все дуплексы в «верхней» цепи содержали 14-звенный олигонуклеотид, меченный ³²P. Дорожки 1, 3, 5 – исходные дуплексы **VII-B**, **VII-C** и **II**, соответственно, дорожки 2, 4, 6 – реакционные смеси после гидролиза дуплексов **VII-B**, **VII-C** и **II**, соответственно. Концентрация ДНК и Nt.BspD6I составляли 10 нМ. КЦ – положение на геле красителя ксиленианола, БФС – бромфенолового синего.

Показано, что Nt.BspD6I действительно способна расщеплять составной дуплекс **VII-B**, хоть и в незначительной степени. В тех же условиях гидролиз Nt.BspD6I азобензолсодержащего дуплекса **VII-C** не был детектирован. Таким образом, наличие АБ-вставки в дуплексе **VII-C** делает его более эффективным ингибитором по сравнению с дуплексом **VII-B**. Предложенные олигонуклеотидные ингибиторы позволяют полностью выключать активность фермента при температуре, когда в отсутствие ингибитора Nt.BspD6I гидролизует субстрат с высокой эффективностью (80 %).

2.3.2. Изучение активности Nt.BspD6I в присутствии азобензолсодержащих дуплексов при облучении светом

Для проверки возможности фоторегуляции активности Nt.BspD6I с помощью азобензолсодержащего ДНК-дуплекса **VII-C** была изучена кинетика гидролиза 30-звенного субстрата **VIII*** (см. раздел 2.2.2.5) в присутствии 300-кратного избытка дуплекса **VII-C** при облучении УФ-светом с длиной волны 365 нм. Реакцию проводили при температуре 25°C (рис. 2.43).

Как видно из рис. 2.43, разницы в начальных скоростях гидролиза субстрата **VIII*** при 25°C в зависимости от облучения не наблюдалось. Поэтому было изучено влияние облучения на степень гидролиза дуплекса **VIII*** также при более высоких температурах, при которых, однако, стабильность негидролизуемого аналога субстрата **VII-C** резко

снижается. В результате, ни при какой температуре не удалось добиться разницы в активности Nt.BspD6I в зависимости от облучения (рис. 2.44).

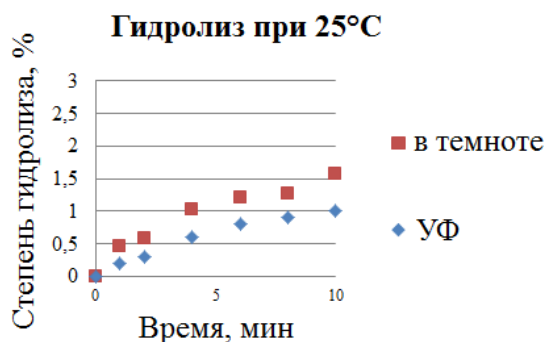


Рис. 2.43. График зависимости степени гидролиза Nt.BspD6I (10 нМ) целевой ДНК VIII* (10 нМ) в присутствии 300-кратного избытка ДНК-дуплекса VII-C при облучении УФ-светом (синие точки) и без облучения (красные точки) от времени. Здесь и далее в разделах 2.3.2. и 2.3.3. все эксперименты по гидролизу целевой ДНК в присутствии дуплексов-ингибиторов проводились не менее 3 раз. На графике приведены средние значения степени гидролиза. Погрешность эксперимента не превышала 11 % от указанного значения.

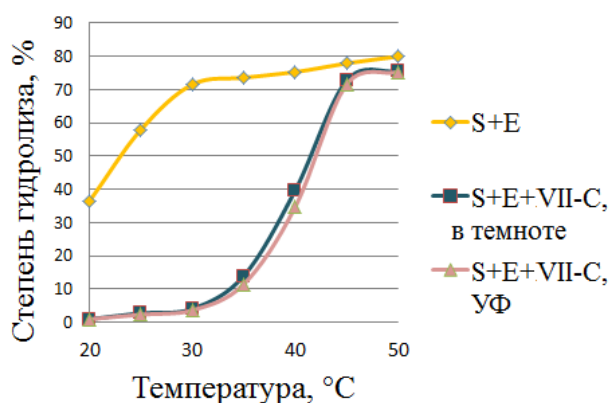


Рис. 2.44. График зависимости степени гидролиза Nt.BspD6I (E, 10 нМ) целевой ДНК VIII* (S, 10 нМ) в присутствии 300-кратного избытка ДНК-дуплекса VII-C при облучении УФ-светом (синия кривая) и без облучения (розовая кривая) от температуры. Зависимость степени гидролиза Nt.BspD6I целевой ДНК VIII* от температуры представлена в виде желтой кривой. Гидролиз проводился в течение 5 мин.

Зависимость степени гидролиза дуплекса VIII* Nt.BspD6I изучали также в присутствии 300-кратного избытка ДНК-дуплексов VII-D и VII-E, содержащих две и три АБ-вставки, соответственно. Реакцию проводили в температурном диапазоне 25-50°C в течение 5 мин в темноте и при облучении УФ-светом с длиной волны 365 нм (рис. 2.45).

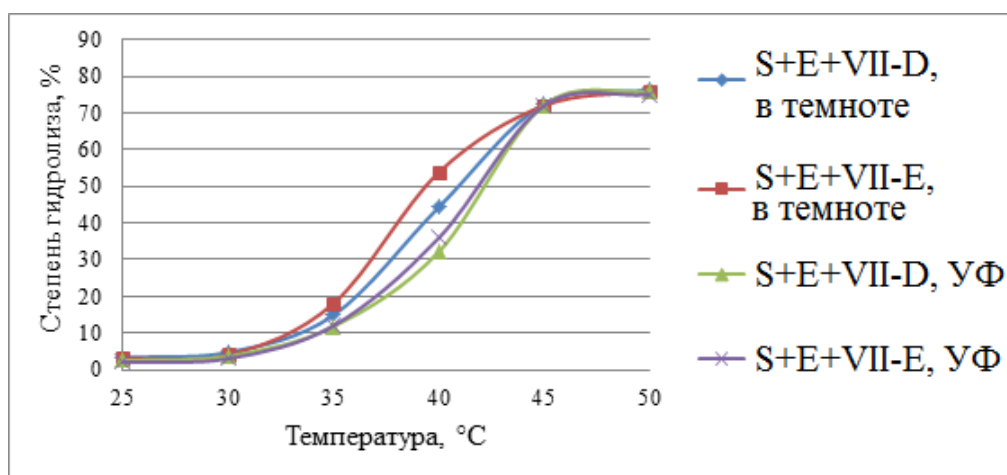


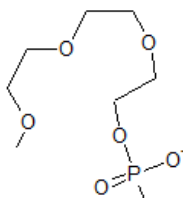
Рис. 2.45. График зависимости степени гидролиза Nt.BspD6I (E) целевой ДНК VIII*(S) в присутствии 300-кратного избытка ДНК-дуплексов VII-D или VII-E при облучении УФ-светом (зеленая и фиолетовая кривые, соответственно) и без облучения (голубая и красная кривые, соответственно). Гидролиз проводился в течение 5 мин (10 нМ Nt.BspD6I, 10 нМ ДНК-дуплекс VIII*, 3 мкМ ДНК-дуплексы VII-D и VII-E).

В ходе этого эксперимента добиться восстановления активности Nt.BspD6I при облучении УФ-светом также не удалось. Наблюдался обратный предполагаемому результат: при облучении УФ-светом ДНК-дуплексы VII-D и VII-E более эффективно ингибировали активность Nt.BspD6I. Этот факт свидетельствует о том, что Nt.BspD6I более прочно связывается с дуплексами VII-D и VII-E, содержащими остатки азобензола в *цис*-конфигурации. Возможно, при *транс-цис*-изомеризации остатков азобензола, входящих в состав дуплексов VII-D и VII-E, образуется такая конформация ДНК, которая является более предпочтительной для взаимодействия с Nt.BspD6I. Это предположение подтверждается тем, что наибольший эффект фотопереключения активности Nt.BspD6I наблюдался в случае дуплекса VII-E с тремя АБ-вставками: при 40°C разница в эффективности гидролиза субстрата в зависимости от облучения составляла 18% (54% без облучения и 36% при облучении УФ-светом). Ранее было показано, что облучение УФ-светом длиной волны 365 нм не влияет на активность самой Nt.BspD6I.

Однако, как видно из полученных данных, более выраженный эффект переключения активности Nt.BspD6I наблюдался в зависимости от температуры реакции гидролиза. Так, 300-кратный избыток ДНК-дуплекса VII-C по отношению к субстрату практически полностью блокирует активность Nt.BspD6I при 25-30°C, тогда как при 45°C эффект ингибирования этим дуплексом полностью исчезает, что связано с диссоциацией азобензолсодержащего дуплекса. Таким образом, показана возможность «выключения» активности Nt.BspD6I при 20°C с помощью предложенных дуплексов-ингибиторов. Повышение температуры в диапазоне от 30°C до 45°C приводит к полному восстановлению активности фермента.

2.3.3. Использование триэтиленгликольсодержащего дуплекса для регулирования активности Nt.BspD6I в зависимости от температуры

Ввиду того, что более выраженный эффект переключения активности Nt.BspD6I наблюдался в зависимости от температуры реакции гидролиза, был предложен альтернативный дуплекс-ингибитор, содержащий остаток триэтиленгликоля в качестве дополнительного звена в месте гидролиза Nt.BspD6I:



Введение такой модификации в ДНК является более простым и дешевым процессом по сравнению с синтезом азобензолсодержащих олигонуклеотидов. Ранее нуклеозидные вставки, содержащие два, четыре или шесть остатков триэтиленгликоля, были использованы при изучении закономерностей образования и структурных особенностей составных олигонуклеотидных комплексов [185]. В качестве дуплекса-ингибитора мы использовали 26-звенный ДНК-дуплекс **VI-G** с остатком триэтиленгликоля. Его температура плавления оказалась на 5-6°C ниже $T_{пл}$ аналогичного немодифицированного дуплекса **VI**, а также дуплекса **VI-B** с остатком АБ (табл. 2.4). Полученный результат согласуется с данными других авторов [186].

Таблица 2.4

Влияние нуклеозидных вставок различной природы на стабильность 26-звенных ДНК-дуплексов

ДНК-дуплекс	Последовательность ДНК-дуплекса	$T_{пл}$, ± 1 °C.
VI	$5' - \text{CGTGGTCTC} \underline{\text{GAGTC}} \text{TTCTCAAGGTAC} - 3'$ $3' - \text{GCACCAGAG} \underline{\text{CTCAGA}} \text{AAGAGTTCCATG} - 5'$	74
VI-B	$5' - \text{CGTGGTCTC} \underline{\text{GAGTC}} \text{TTCT}^* \text{CAAGGTAC} - 3'$ $3' - \text{GCACCAGAG} \underline{\text{CTCAGAA}} - \text{GAGTTCCATG} - 5'$	75
VI-G	$5' - \text{CGTGGTCTC} \underline{\text{GAGTC}} \text{TTCT}^y \text{CAAGGTAC} - 3'$ $3' - \text{GCACCAGAG} \underline{\text{CTCAGA}} \text{AAGA} - \text{GTTCCATG} - 5'$	69

x – АБ-вставка, y – остаток триэтиленгликоля. ↓ и ↑ указывают на позиции гидролиза R.BspD6I «верхней» и «нижней» цепей дуплекса, соответственно.

Далее была проанализирована способность Nt.BspD6I гидролизовать дуплекс **VI-G** (рис. 2.46).

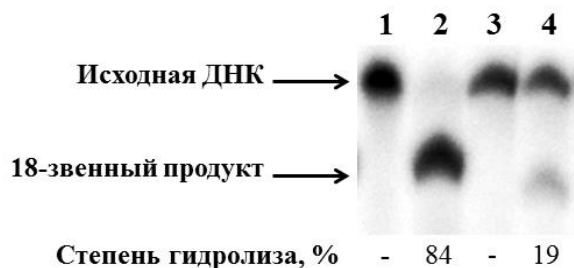
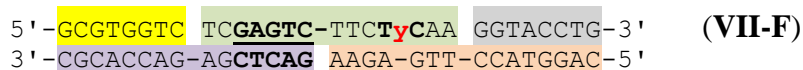


Рис. 2.46. Гидролиз под действием Nt.BspD6I 26-звенных дуплексов **VI** и **VI-G** (^{32}P -метка – в «верхней» цепи), 37°C, 30 мин. Радиоавтограф 20%-ного ПААГ с 7 М мочевиной. Дорожки 1, 3 – исходные дуплексы **VI** и **VI-G**, соответственно. Дорожки 2, 4 – реакционные смеси после гидролиза Nt.BspD6I (10 нМ) дуплексов **VI** и **VI-G** (10 нМ), соответственно.

Из полученных результатов видно, что активность Nt.BspD6I значительно подавлена при расщеплении ДНК-дуплекса **VI-G** с остатком триэтиленгликоля, расположенным в месте гидролиза ДНК ферментом (эффективность гидролиза составляла 19% за 30 мин). Несмотря на то, что АБ-вставка в составе ДНК-дуплекса **VI-B** создает большее препятствие для функционирования Nt.BspD6I (гидролиз ДНК проходит только на 8% за 30 мин), была проверена возможность использования триэтиленгликольсодержащего дуплекса для терморегуляции активности фермента. Для этого был сконструирован следующий 30-звенный дуплекс, состоящий из пяти олигонуклеотидов:



Проводили гидролиз Nt.BspD6I целевой ДНК **VIII*** (см. раздел 2.2.2.5) в присутствии 300-кратного избытка по отношению к субстрату ДНК-дуплекса **VII-F** в течение 5 мин в интервале температур от 25 до 50°C (рис. 2.47). Для сравнения аналогичную реакцию проводили в присутствии дуплекса **VII-C**, содержащего АБ-вставку в месте гидролиза Nt.BspD6I.

Из полученных данных следует, что ДНК-дуплекс **VII-F** также можно использовать для регулирования активности Nt.BspD6I в зависимости от температуры. При 25-30°C наблюдается почти полное ингибирование активности Nt.BspD6I 300-кратным избытком ДНК-дуплексов **VII-C** или **VII-F** по отношению к субстрату. При дальнейшем повышении температуры ДНК-дуплексы **VII-C** и **VII-F** диссоциируют, освобождая при этом ДНК-связывающий центр фермента. Надо заметить, что при температурах 40 и 45°C наблюдается более эффективное ингибирование Nt.BspD6I дуплексом **VII-F** по сравнению с дуплексом **VII-C**. Известно, что олигоэтиленгликолевые вставки могут

приводить к изгибу спирали ДНК [187]. Вероятно, возникающий таким образом изгиб дуплекса **VII-F** способствует более прочному связыванию с ферментом, что согласуется с полученными нами данными о способности Nt.BspD6I вызывать изгиб ДНК-субстрата при связывании с ним (раздел 2.2.1).

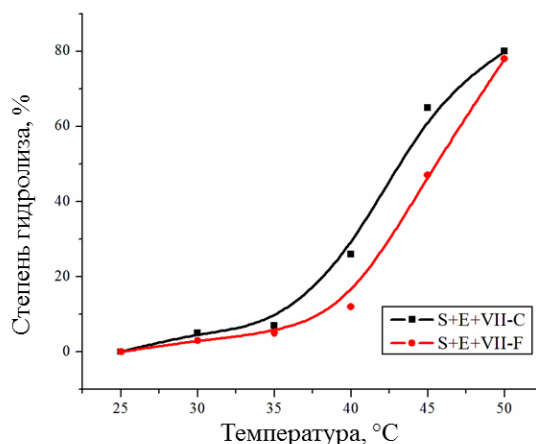


Рис. 2.47. График зависимости степени гидролиза Nt.BspD6I (E) целевой ДНК **VIII*** (S) в присутствии 300-кратного избытка ДНК-дуплексов **VII-F** (красная кривая) или **VII-C** (черная кривая). Гидролиз проводился в течение 5 мин (10 нМ Nt.BspD6I, 10 нМ ДНК-дуплекс **VIII***, 3 мкМ ДНК-дуплексы **VII-F** и **VII-C**).

Также была оценена возможность регулирования активности Nt.BspD6I при гидролизе протяженной ДНК с помощью дуплекса **VII-F**, используя в качестве модельного субстрата ДНК фага T7.

Длина ДНК фага T7 составляет около 40 тыс. п.н., она содержит 115 участков узнавания Nt.BspD6I (определено с помощью программы VectorNTI, США). НЭ расщепляют ДНК на фрагменты только в том случае, когда два противоположно ориентированных участка узнавания расположены на небольшом расстоянии друг от друга (рис. 2.48).

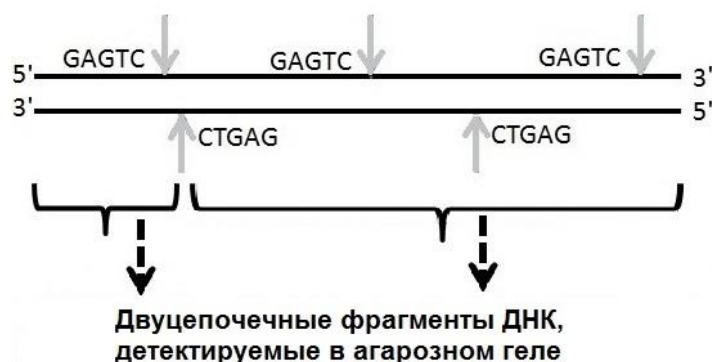


Рис. 2.48. Принцип тестирования гидролитической активности Nt.BspD6I при использовании в качестве субстрата ДНК фага T7. Серыми сплошными стрелками схематически показаны участки, гидролизуемые Nt.BspD6I.

В ДНК фага Т7 близко расположенные инвертированные участки 5'-GAGTC-3'/3'-СТСАГ-5' встречаются 4 раза, что в свою очередь обусловлено тем, что эти последовательности входят в состав фагоспецифических промоторов [188].

Проанализирован гидролиз Nt.BspD6I ДНК фага Т7 в отсутствие и в присутствии 60 мкМ ДНК-дуплекса VII-F, а также при добавлении неспецифического составного дуплекса XII (см. раздел 2.3.1) в течение 30 мин в интервале температур от 20 до 55°C (рис. 2.49). Бóльшая концентрация дуплекса VII-F (60 мкМ), использованная для ингибирования гидролиза фаговой ДНК по сравнению с экспериментом по гидролизу субстрата VIII* (3 мкМ), обусловлена бóльшим сродством фермента к протяженной фаговой ДНК по сравнению с 30-звенным субстратом.

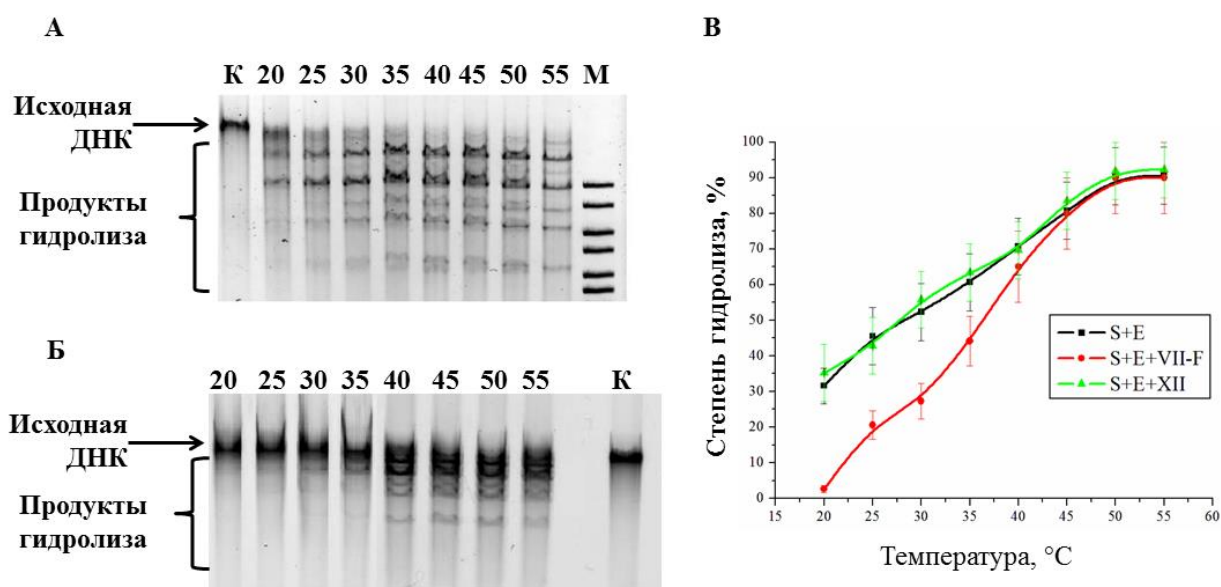


Рис. 2.49. Зависимость степени гидролиза Nt.BspD6I (E) ДНК фага Т7 (S) в отсутствие и в присутствии ингибиторов VII-F и XII от температуры. Реакцию проводили в течение 30 мин. Концентрация Nt.BspD6I составляла 12 нМ, ДНК фага Т7 – 0,2 нМ, дуплекса-конкурента – 60 мкМ. А и Б: анализ в 0,7 %-ном агарозном геле продуктов гидролиза ДНК фага Т7 Nt.BspD6I без добавления ингибитора и в присутствии дуплекса-конкурента VII-F, соответственно. Реакцию проводили при температурах, указанных над дорожками. Зоны ДНК детектировали по флуоресценции SYBR Gold. Дорожка К – исходная ДНК, дорожка М – ДНК-маркер. В: графики зависимости степени гидролиза Nt.BspD6I ДНК фага Т7 без добавления ингибитора (черная кривая) и в присутствии ДНК-дуплексов VII-F (красная кривая) и XII (зеленая кривая) от температуры.

Как видно из рис. 2.49, Nt.BspD6I достаточно эффективно расщепляет ДНК фага Т7 при 20°C. Добавление в реакцию смесь ДНК-дуплекса VII-F приводит к блокированию действия Nt.BspD6I при 20-25°C (рис. 2.49, Б), в то время как добавление неспецифического дуплекса XII в такой же концентрации практически не влияет на активность Nt.BspD6I (рис. 2.49, В). Активность Nt.BspD6I полностью восстанавливается при 45°C в случае использования дуплекса VII-F. Опираясь на наши результаты, можно

«программировать» температуру, при которой происходит гидролиз целевой ДНК Nt.BspD6I, варьируя концентрацию негидролизуемого дуплекса-ингибитора и его структуру (количество составляющих его олигонуклеотидов).

Разработанный подход может быть применен в реакции амплификации ДНК с вытеснением цепи [189]. Из-за неконтролируемой активности НЭ при использовании этого метода возможен высокий уровень синтеза нецелевых фрагментов ДНК. Для преодоления указанной проблемы мы предлагаем использовать специально сконструированные дуплексы-ингибиторы. Добавление их в реакционную смесь после инициации синтеза ДНК приведет к блокированию активности НЭ и позволит избежать накопления нежелательных продуктов. Амплификация ДНК с вытеснением цепи происходит в широком диапазоне температур в зависимости от типа используемых ДНК-полимеразы и НЭ. Предлагаемый нами подход позволяет подобрать оптимальный дуплекс-ингибитор для каждого отдельного случая.

НЭ также способны осуществлять матрично-независимый синтез ДНК *de novo* [54] – [55] (раздел 1.3). Однако можно предположить, что связывание НЭ в комплекс с негидролизуемыми аналогами субстрата способно снизить такую активность фермента.

2.4. Изучение свойств конъюгатов гомодимерной эндонуклеазы рестрикции SsoII с ДНК-фрагментами

Способность производных азобензола в составе ДНК влиять на стабильность дуплекса была использована для регулирования активности T7 РНК-полимеразы [190]. При облучении УФ-светом дуплекс в области промотора, содержащего азобензольную вставку в *цис*-конфигурации, подвергался локальной диссоциации, что способствовало образованию открытого комплекса РНК-полимеразы с промотором и инициации транскрипции. В темноте или при облучении видимым светом остаток азобензола в *транс*-конфигурации стабилизировал дуплекс, и РНК-полимераза образовывала в основном закрытый комплекс с промоторной областью, что препятствовало эффективной транскрипции.

Ранее в нашей лаборатории для регулирования активности ДНК-узнающих белков с помощью производных азобензола был предложен метод «молекулярных ворот». Идея этого метода основана на том, что многие ДНК-связывающие белки в активном состоянии представляют собой гомодимеры. Большинство из них при взаимодействии с ДНК подвергается конформационным изменениям. Это позволяет ДНК подойти к ДНК-связывающему центру белка, который находится в интерфейсе между двумя субъединицами гомодимера. Модифицируя белок производными азобензола вблизи ДНК-связывающего центра, можно сделать его недоступным для подхода субстрата из-за стерических препятствий в случае более «вытянутой» *транс*-конфигурации азобензола [142]. При облучении УФ-светом *транс*-конфигурация азобензола переходит в более компактную *цис*-конфигурацию, и ДНК-лиганд может попасть в ДНК-связывающий центр белка и вступить с ним во взаимодействие.

В качестве модельного белка для разработки данного метода использовали гомодимерную эндонуклеазу рестрикции SsoII (R.SsoII, см. раздел 2.1) [191]. Гомодимерные ЭР широко распространены среди ЭР II-го типа, и отдельные их представители являются хорошо изученными ферментами. Согласно базе данных REBASE (<http://rebase.neb.com/cgi-bin/crylist>) на сегодняшний день для 50 ЭР II-го типа и их комплексов с ДНК-субстратом с помощью метода РСА получены кристаллические структуры, в том числе и для R.Ecl18kI с 9-звенным ДНК-дуплексом (PDB-код 2fqz). Напомним, что R.Ecl18kI является изошизомером и ближайшим гомологом R.SsoII. Биохимические свойства R.SsoII также были подробно описаны в более ранних работах [11], [148], [192] – [193].

В рамках подхода «молекулярные ворота» ранее были синтезированы несимметричные производные азобензола, содержащие малеимидную группировку в

одном из бензольных ядер для модификации остатков цистеина белка, в другом – гидроксильную, amino-, одну или две карбоксильные группы, а также остаток цистеина. Этими производными были модифицированы 12 мутантных форм R.SsoII с различным взаимным расположением модифицируемых остатков цистеина в субъединицах гомодимера белка, изучена их ферментативная активность при облучении УФ- и голубым светом. Максимальная разница в начальных скоростях гидролиза субстрата модифицированной мутантной формой фермента при изомеризации азобензола изменялась в 2 раза [142]. Однако при этом модификация фермента не приводила к полному ингибированию функционирования R.SsoII. Очевидным недостатком этого метода являлся также низкий эффект переключения активности фермента, т.е. отношение начальной скорости гидролиза ДНК-дуплекса эндонуклеазой рестрикции при облучении УФ-светом (азобензол в *cis*-конформации) к начальной скорости гидролиза субстрата этим же белком при облучении голубым светом (азобензол в *trans*-конфигурации).

Задачей данного этапа работы было дальнейшее развитие метода «молекулярных ворот», то есть достижения большего эффекта фотопереключения активности гомодимерной R.SsoII. В качестве более существенного препятствия для проникновения ДНК в активный центр R.SsoII нами впервые было предложено использовать фрагменты ДНК, способные формировать дуплекс. Для этого в каждую из двух субъединиц гомодимерной R.SsoII необходимо было ввести самокомплементарные фрагменты ДНК, которые при сближении теоретически были способны гибридизоваться друг с другом (схема 2.1). Самокомплементарные олигонуклеотиды содержали в своем составе ненуклеозидную вставку (вставки) на основе D-треонинола с остатком азобензола (АБ-вставку, см. раздел 2.2.4).

Ожидалось, что при облучении голубым светом образованный самокомплементарными олигонуклеотидами дуплекс при температуре реакции будет закрывать активный центр белка и препятствовать проникновению субстрата. При облучении УФ-светом дуплекс будет диссоциировать и активность фермента восстановится. Для достижения такого эффекта важным условием является примерное равенство энергий образования дуплекса и изомеризации азобензольной группы. Ранее было показано, что при включении в состав олигонуклеотидной цепи производного D-треонинола, содержащего азобензольную группу, это условие выполняется [190].

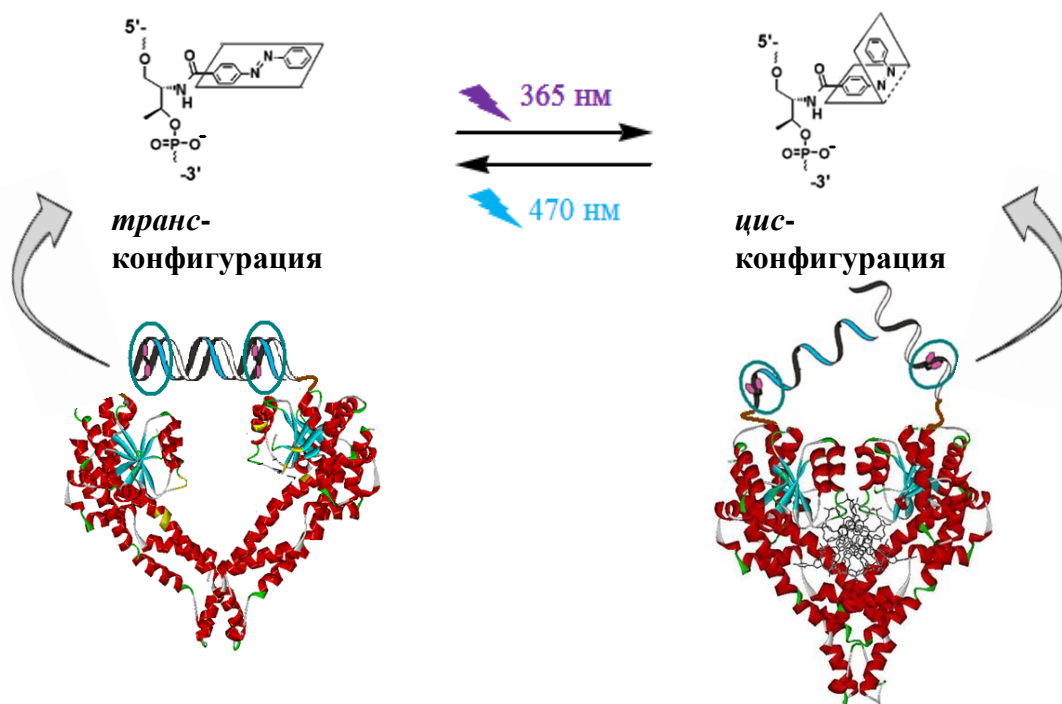
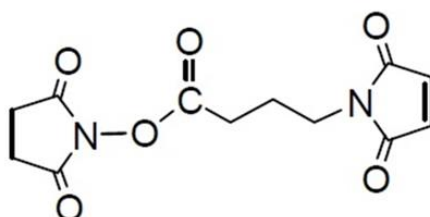


Схема 2.1

Не менее важной задачей работы являлись синтез конъюгатов R.SsoII с олигодезоксирибонуклеотидами и характеристика их свойств, в частности изучение способности гидролизовать субстрат в различных условиях. Такие исследования ранее не проводились.

При модификации белков различными реагентами наиболее удобными являются сульфгидрильные группы остатков цистеина, которые могут быть введены в состав белка методом сайт-направленного мутагенеза. Для ковалентного присоединения олигонуклеотида к R.SsoII был выбран бифункциональный реагент N-(γ -малеимидо-бутирилокси)сукцинимидный эфир (N- γ -maleimidobutyryl-oxysuccinimide ester, GMBS). За счёт содержащейся в нём малеимидной группы GMBS взаимодействует с SH-группами белка [13]. С другой стороны, сукцинимидная группа, входящая в состав GMBS, может реагировать с аминofункцией, которая должна быть введена на 5'-конец или на 3'-конец олигонуклеотида через гексаметиленовый линкер [13].

GMBS



2.4.1. Выбор положения модификации эндонуклеазы рестрикции SsoII олигонуклеотидом

В структуре R.SsoII дикого типа (wtR.SsoII) имеется 2 остатка цистеина в позициях 33 и 60. Для получения варианта белка R.SsoII(C33S/C60S), не содержащего остатков цистеина – R.SsoII(2CS) – в рамках предыдущих исследований был осуществлен сайт-направленный мутагенез гена этого белка. Далее было получено 5 мутантных форм R.SsoII(2CS), в которых один из аминокислотных остатков был заменен на цистеин: S171C, R174C, R198C, I220C, A224C [191].

Согласно анализу структуры комплекса R.Ecl18kI (изошизомера и ближайшего гомолога R.SsoII) с субстратом (см. раздел 2.1), гомодимер белка содержит внутренний и внешний «зажимы», которые окружают ДНК. Аминокислоты R198, I220 и A224 локализованы во внутреннем «зажиме», а аминокислоты S171 и R174 входят в состав внешнего «зажима» (рис. 2.50).

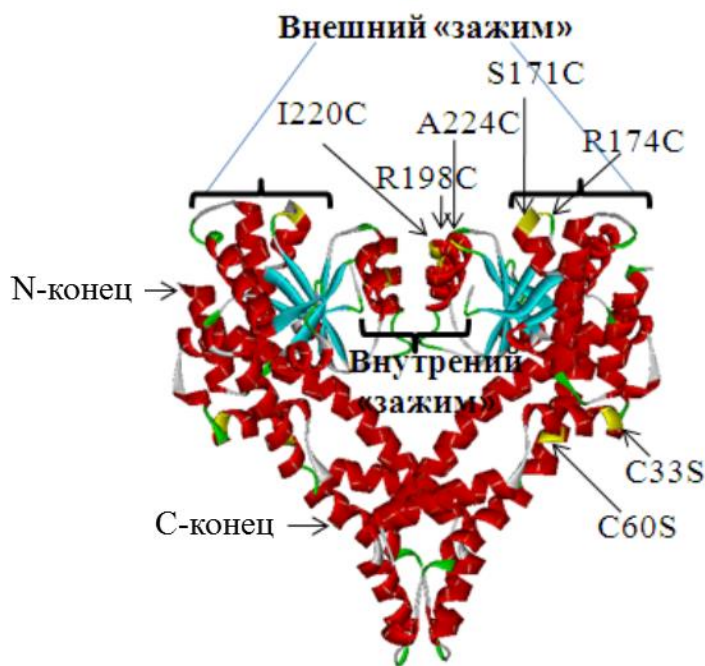


Рис. 2.50. Структура гомодимера R.SsoII (на основе данных PCA для R.Ecl18kI [149]). Указаны аминокислоты, замененные на цистеин: S171, R174, R198, I220, A224.

Для дальнейшей работы были выбраны мутантные формы фермента, содержащие остатки цистеина во внешнем «зажиме» белка, так как модификация остатков цистеина, локализованных во внутреннем «зажиме» с помощью олигонуклеотида может сильно повлиять на структуру белка, тем самым уменьшив его активность. Согласно данным работы [191] из двух мутантных форм R.SsoII, содержащих аминокислотную замену во «внешнем» зажиме ДНК-связывающего центра белка, наибольшую активность проявляет

R.SsoII(2CS/S171C). Для дальнейших экспериментов был выбран именно этот вариант фермента.

В нашей работе по аналогии с работой [191] проведена оценка реакционной способности остатков Cys гомодимера белка R.SsoII(2CS/S171C). Для этой цели использовали полиэтиленгликоль, модифицированный малеимидом (PEG-Mal, 5кДа). Преимущества использования PEG-Mal заключаются в следующем. Во-первых, в состав молекулы PEG-Mal, как и в состав предлагаемых нами производных олигонуклеотидов, входит малеимидная группировка, которая в обоих случаях взаимодействует с сульфгидрильной группой остатков цистеина. Во-вторых, формирование конъюгата R.SsoII(2CS/S171C) с PEG-Mal (молекулярная масса – 5 кДа) может быть детектировано в ходе гель-электрофореза по Лэммли [194]. Как видно из рис. 2.51, PEG-Mal способен взаимодействовать с остатками Cys в белке, что свидетельствует об их высокой реакционной способности. Таким образом, мутантную форму R.SsoII(2CS/S171C) можно использовать для дальнейшей модификации олигонуклеотидами.

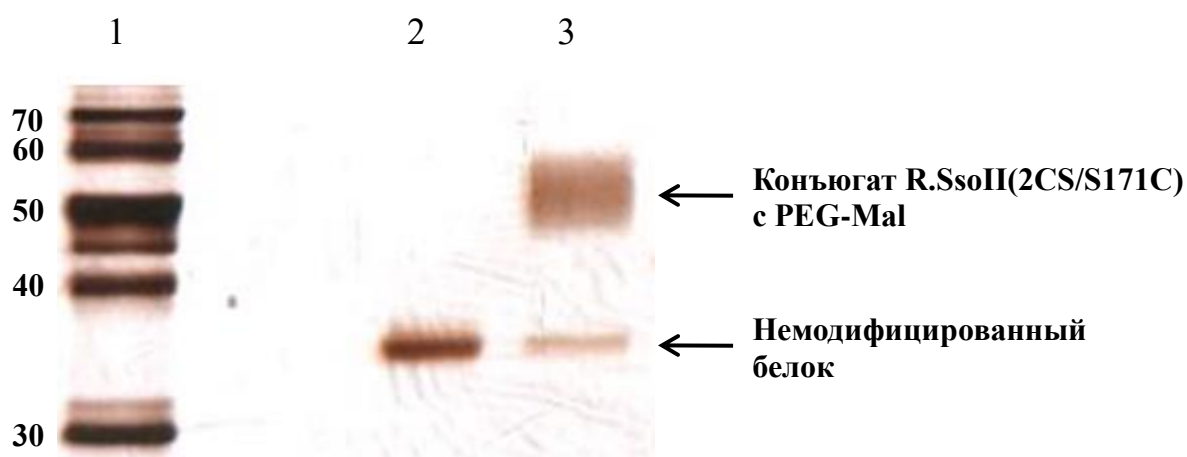


Рис. 2.51. Анализ методом гель-электрофореза по Лэммли взаимодействия мутантной формы R.SsoII(2CS/S171C) с PEG-Mal. Дорожка 1 – маркерные белки, молекулярная масса (кДа) указана слева; 2 – белок без добавления олигонуклеотида; 3 – взаимодействие белка с PEG-Mal. Гель окрашен раствором солей серебра.

2.4.2. Выбор структуры олигонуклеотида для ковалентного присоединения к эндонуклеазе рестрикции SsoII

Выбор структуры олигонуклеотида для присоединения к белку основывался на следующих требованиях. Во-первых, его нуклеотидная последовательность должна быть самокомплементарной. Использование самокомплементарных олигонуклеотидов обусловлено необходимостью модифицировать две идентичные субъединицы, образующие устойчивый гомодимер R.SsoII. Во-вторых, олигонуклеотид должен быть

достаточным протяженным, чтобы образующийся дуплекс полностью закрывал активный центр фермента и формировался при температуре, когда R.SsoII эффективно гидролизует ДНК. В-третьих, ДНК-дуплекс не должен быть слишком прочным, чтобы *цис-транс*-изомеризация азобензола оказывала влияние на его устойчивость. Изменяя длину, нуклеотидную последовательность олигонуклеотида и количество азобензольных групп в его составе, предполагалось добиться фоторегулирования процесса ассоциации-диссоциации дуплекса в нужном температурном диапазоне.

С помощью программы Accelrys DS Visualizer (Biovia, США) оценено расстояние между аминокислотными остатками 171 в гомодимере мутантной формы R.SsoII(2CS/S171C). Оно составило 46 Å. Длина 10-звенного олигонуклеотида №3 (табл. 2.5), содержащего аминолинкер на 5'-конце, равна примерно 54 Å:



Также в программе Accelrys DS Visualizer была получена модель конъюгата R.SsoII и 10-звенного дуплекса **XIV-B** (табл. 2.5) с аминолинкером, который присоединен к остатку Cys171 белка (рис. 2.52). Как видно из модели, 10-звенный дуплекс полностью закрывает ДНК-связывающий центр белка. Следовательно, для модификации белка нужно использовать олигонуклеотиды, длиной не менее 10 нуклеотидных звеньев.



Рис. 2.52. Модель конъюгата R.SsoII и 10-звенного олигодезоксирибонуклеотида с аминолинкером, присоединенным к Cys171 белка.

Вместе с тем, при образовании ДНК-дуплекса 10-звенным самокомплементарным олигонуклеотидом формируется двойная спираль, длина которой без аминолинкера составляет 34 Å. Мы предположили, что более эффективными «молекулярными воротами» для предотвращения «входа» субстрата в активный центр фермента будут самокомплементарные 14-звенные олигонуклеотиды (табл. 2.5). Для восстановления активности фермента необходимо было добиться диссоциации цепей дуплекса под действием УФ-света (*транс-цис*-переход остатка азобензола). Предполагалось, что

включение в состав олигонуклеотида двух (дуплексы **XV-B** и **XVI-B**) или трех (дуплекс **XVII-A**) АБ-вставок в качестве дополнительного звена позволит упростить эту задачу.

Также для присоединения к R.SsoII(2CS/S171C) были синтезированы 15- и 17-звенные олигонуклеотиды с разным количеством АБ-вставок и содержащие дополнительную пентатимидиновую последовательность на 5'-конце (табл. 2.5). Пентатимидиновая последовательность служила для увеличения длины «молекулярных ворот», при этом она не участвовала в формировании ДНК-дуплекса и, следовательно, не влияла значительно на его стабильность.

Синтезированные олигонуклеотиды содержали амиолинкер на 5'-конце для дальнейшего присоединения к белку с помощью бифункционального реагента GMBS (табл. 2.5, №№ 3, 4, 8 – 13). Для изучения влияния введения амиолинкера на формирование дуплекса использовали олигонуклеотиды, не содержащие амиолинкер (табл. 2.5, №№ 1, 2, 5 – 7). Синтез модифицированных и немодифицированных фрагментов ДНК был выполнен научн. сотр. Химического факультета МГУ Т.С. Зацепиным.

Таблица 2.5

Олигонуклеотиды, использованные для ковалентного присоединения к R.SsoII(2CS/S171C), и соответствующие им дуплексы

№ дуплекса	№ олигонуклеотида	Длина, н.о.	Последовательность дуплекса, 5' – 3'/3' – 5'
XIV	1	10	CACACGTGTG GTGTGCACAC
XIV-A	2	10	CAC ^x ACGT--GTG GTG--TGCA ^x CAC
XIV-B	3	10	NH ₂ (CH ₂) ₆ p-CACACGTGTG GTGTGCACAC-p(CH ₂) ₆ NH ₂
XIV-C	4	10	NH ₂ (CH ₂) ₆ p-CAC ^x ACGT--GTG GTG--TGCA ^x CAC-p(CH ₂) ₆ NH ₂
XV	5	14	CACACAGCTGTGTG GTGTGTCGACACAC
XV-A	6	14	CACA ^x CAGCTG--TG GTGT--GTCGAC ^x ACAC
XV-B	7	14	CA ^x CA ^x CAGCTG--TG--TG GT--GT--GTCGAC ^x AC ^x AC
XV-C	8	14	NH ₂ (CH ₂) ₆ p-CACA ^x CAGCTG--TG GTGT--GTCGAC ^x ACAC-p(CH ₂) ₆ NH ₂
XV-D	9	14	NH ₂ (CH ₂) ₆ p-CA ^x CA ^x CAGCTG--TG--TG GT--GT--GTCGAC ^x AC ^x AC-p(CH ₂) ₆ NH ₂

XVI-A	10	15	NH ₂ -(CH ₂) ₆ p-T ₅ -CAC ^X ACGT-GTG GTG-TGCA _X CAC-T ₅ -p(CH ₂) ₆ NH ₂
XVI-B	11	15	NH ₂ -(CH ₂) ₆ p-T ₅ -CA ^X CA-CG ^X TG--TG GT-GT _X GC--AC _X AC-T ₅ -p(CH ₂) ₆ NH ₂
XVII-A	12	17	NH ₂ -(CH ₂) ₆ p-T ₅ -A ^X CA-CA ^X CG-TG ^X TG--T T--GT _X GT-GC _X AC-AC _X A-T ₅ -p(CH ₂) ₆ NH ₂
	13	10	NH ₂ (CH ₂) ₆ p-TTTTTTTTTT

^X – остаток N-(4-карбоксиязобензил)-D-треонинола (АБ-вставка),
T₅ – пентатимидиновая последовательность.

2.4.3. Зависимость устойчивости ДНК-дуплексов от температуры

Была исследована устойчивость некоторых ДНК-дуплексов, содержащих АБ-вставку, в зависимости от температуры (табл. 2.6). Для этого регистрировали зависимость оптической плотности раствора исследуемого образца от температуры в буфере Ж при длине волны 260 нм (метод УФ-«плавления»).

Таблица 2.6

Некоторые физико-химические характеристики синтетических ДНК-дуплексов

№	Последовательность дуплекса, 5' – 3'/3' – 5'	T _{пл} , °C (±1)	h ₂₆₀ [*] , % (±3)	C ^{**} , 10 ⁻⁶ М	ΔT ^{***} , °C
XIV	CACACGTGTG GTGTGCACAC	51	16	2,8	35
XIV-A	CAC ^X ACGT--GTG GTG--TGCA _X CAC	55	10	3,3	48
XIV-C	NH ₂ (CH ₂) ₆ p-CAC ^X ACGT--GTG GTG--TGCA _X CAC-p(CH ₂) ₆ NH ₂	58	14	3,8	45
XV	CACACAGCTGTGTG GTGTGTCGACACAC	59	19	2,6	41
XV-A	CACA ^X CAGCTG--TGTG GTGT--GTCGAC _X ACAC	64	16	2,5	48
XV-B	CA ^X CA ^X CAGCTG--TG--TG GT--GT--GTCGAC _X AC _X AC	68	12	2,3	40
XV-C	NH ₂ (CH ₂) ₆ p-CACA ^X CAGCTG--TGTG GTGT--GTCGAC _X ACAC-p(CH ₂) ₆ NH ₂	65	12	2,5	43
XV-D	NH ₂ (CH ₂) ₆ p-CA ^X CA ^X CAGCTG--TG--TG GT--GT--GTCGAC _X AC _X AC-p(CH ₂) ₆ NH ₂	70	21	2,3	45

*h₂₆₀ – гиперхромный эффект,

**C – концентрация ДНК-дуплекса,

***ΔT – кооперативность перехода «спираль-клубок».

Результаты «плавления», полученные для 10-звенных дуплексов **XIV**, **XIV-A** и **XIV-C** показывают, что наличие азобензольной группы в *транс*-конфигурации в самокомплементарном олигонуклеотиде в качестве дополнительного звена повышает T_{пл} двойной спирали на 4°C (табл. 2.6). Это объясняется тем, что *транс*-азобензол за счёт

своего плоского строения способен интеркалировать между основаниями ДНК, тем самым стабилизируя дуплекс [179]. Введение амиолинкера на 5'-конец олигонуклеотида дополнительно повышает температуру плавления двуспиральной системы на 3°C (рис. 2.53), по-видимому, за счёт образования ионной связи между аминогруппой с межнуклеотидным фосфатом.

Для каждого дуплекса были записаны спектры поглощения до и после его термической диссоциации. Известно, что переход *транс*-конфигурации азобензола в *цис*-конфигурацию сопровождается уменьшением поглощения раствора при 340 нм – характеристической длине волны максимума поглощения азобензола [195]. Показано, что после перехода «спираль-клубок» и последующей ренатурации дуплекса АБ-группы в составе олигонуклеотидных цепей не изменяют свою *транс*-конфигурацию (рис. 2.54).

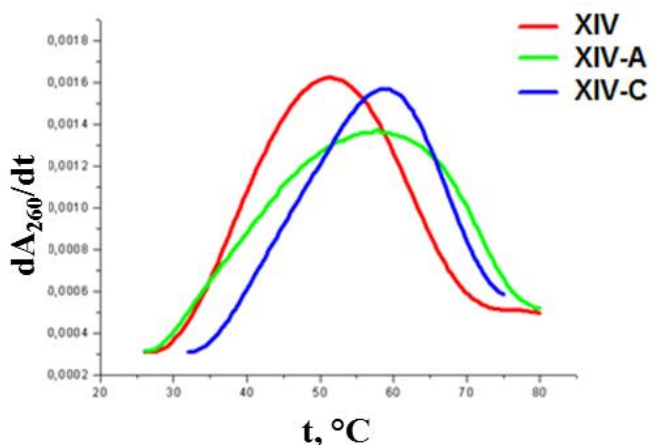


Рис. 2.53. Зависимости оптической плотности (при $\lambda = 260$ нм) растворов ДНК-дуплексов **XIV**, **XIV-A** и **XIV-C** в буфере Ж от температуры, представленные в дифференциальной форме. Концентрации дуплексов составляли 2,3 – 3,8 мкМ.

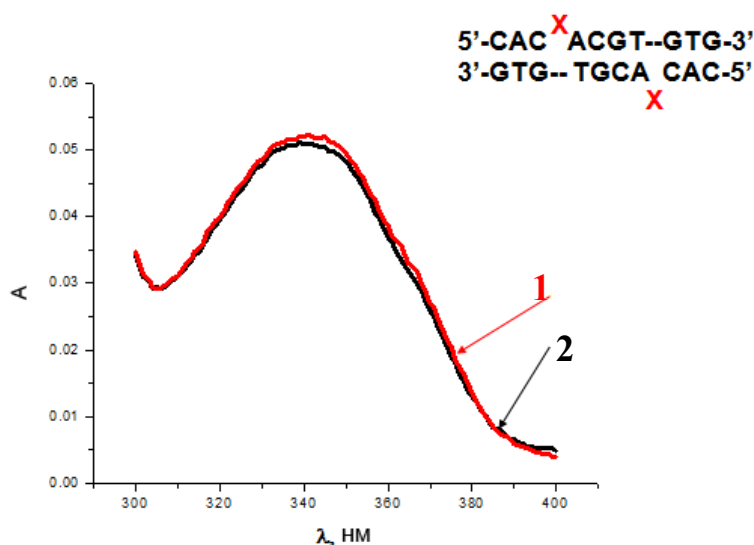


Рис. 2.54. Спектры поглощения 10-звенного азобензолсодержащего дуплекса **XIV-A** при температуре 20°C до (1) и после (2) его плавления.

Аналогичные результаты были получены для 14-звенных дуплексов (табл. 2.6, **XV - XV-D**). Установлено, что АБ-вставка повышает $T_{пл}$ двойной спирали на 5°C. Для дуплекса **XV-B** с четырьмя такими модификациями (две азобензолные вставки на олигонуклеотид) наблюдается более сильный стабилизирующий эффект – повышение $T_{пл}$ на 9°C.

Надо заметить, что самокомплементарные олигонуклеотиды способны существовать в растворе в трех формах – одноцепочечной (клубкообразной), шпилечной, формирующейся при внутримолекулярной ассоциации комплементарных фрагментов, и в форме ДНК-дуплекса, образованного при взаимодействии двух молекул олигонуклеотида. Известно, что стабильность шпилечной структуры не зависит от концентрации образующего ее олигонуклеотида, а стабильность дуплекса, образованного двумя олигонуклеотидами, повышается с повышением их концентрации. Для анализа возможных структур самокомплементарных олигонуклеотидов была изучена зависимость оптической плотности растворов 14-звенного олигонуклеотида №5 (табл. 2.5), взятого в различных концентрациях, от температуры [196].

Серия УФ-«плавлений» олигонуклеотида №5 в буферном растворе Ж показала, что при повышении концентрации ДНК от 2,5 мкМ до 52,5 мкМ температура плавления формируемой олигонуклеотидом №5 структуры увеличивается в среднем на 6°C. Это свидетельствует о преимущественном образовании межмолекулярного ДНК-дуплекса за счет ассоциации двух молекул олигонуклеотида. Зависимость $T_{пл}$ от концентрации олигонуклеотида №5 ниже 2,5 мкМ не исследовалась в связи с недостаточной чувствительностью спектрофотометра. При низких концентрациях ДНК-фрагментов нельзя исключить образования шпилечных структур.

Далее проводили эксперименты с облучением УФ-светом азобензолсодержащих 10- и 14-звенных ДНК-дуплексов. При этом наблюдалось уменьшение оптической плотности раствора при 340 нм, что свидетельствовало о переходе *транс*-конфигурации остатка азобензола в *цис*-конфигурацию [195]. Этот процесс полностью обратим, т.к. после воздействия на образец в течение 5 мин видимым светом оптическая плотность раствора принимала свое первоначальное значение (рис. 2.55).

«Плавление» азобензолсодержащих дуплексов проводили при постоянном облучении УФ-светом. Для этого главным научным сотрудником кафедры высокомолекулярных соединений Химического факультета МГУ А.Ю. Бобровским была сконструирована специальная установка (рис. 2.56).

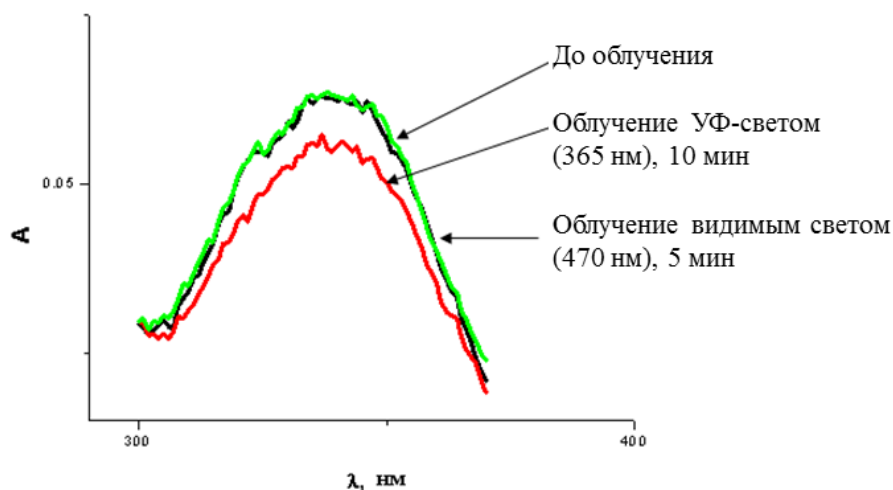


Рис. 2.55. Фотоизомеризация остатка азобензола в составе дуплекса XIV-A в буфере Ж, концентрация 3,3 мкМ.

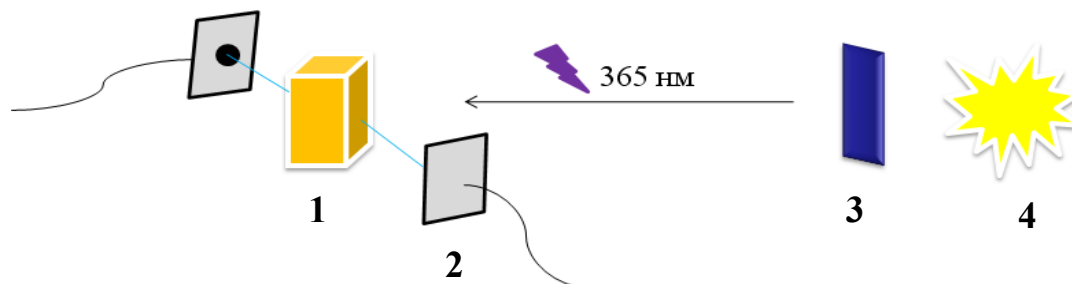


Рис. 2.56. Схема установки для регистрации зависимости оптической плотности растворов ДНК-дуплексов, содержащих азобензол, в зависимости от температуры при непрерывном облучении УФ-светом: 1 – кювета в термостатируемом кюветном отделении; 2 – спектрофотометр; 3 – светофильтр, пропускающий свет с длиной волны 365 нм; 4 – ртутная лампа.

Образец помещался в полностью прозрачную кварцевую кювету в термостатируемом кюветном отделении. Свет от лампы, проходя через светофильтр, облучал олигонуклеотид, а установленный под углом спектрофотометр измерял поглощение при 260 нм при различных температурах. Было показано, что при переходе АБ-группы из *транс*- в *цис*-конфигурацию температура плавления 10-звенного дуплекса XIV-A уменьшается на 12°C по сравнению с $T_{пл}$, полученной при плавлении того же дуплекса без облучения, и составляет 43°C (рис. 2.57). Такой эффект объясняется тем, что неплоская *цис*-форма, не способная интеркалировать в двойную спираль, создаёт стерические помехи и локальное искажение структуры, что приводит к дестабилизации двойной спирали [179]. Таким образом, наши данные позволяли надеяться, что при облучении УФ-светом и температуре реакции около 40 – 45°C, по крайней мере, часть дуплекса XIV-A будет находиться в диссоциированной форме.

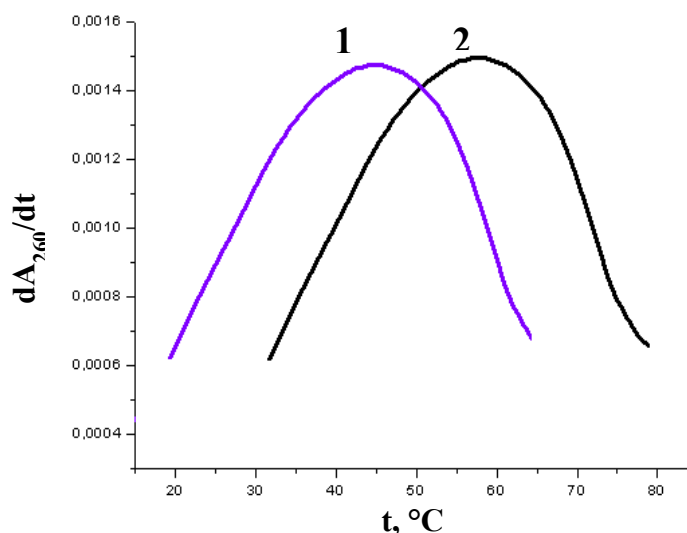


Рис. 2.57. Графики зависимости оптической плотности раствора ДНК-дуплекса XIV-A в буфере Ж от температуры в дифференциальной форме при облучении УФ-светом (кривая 1) и без облучения (кривая 2). Концентрация дуплекса составляла 3,3 мкМ.

Полученные результаты согласуются с данными литературы. Показано, что введение модификации, содержащей АБ-группу в *транс*-конфигурации в качестве дополнительного звена стабилизирует ДНК-дуплексы. При *транс-цис*-изомеризации наблюдается снижение стабильности двойной спирали [179]. Следует отметить, что физико-химические свойства ДНК-дуплексов, сформированных самокомплементарными олигонуклеотидами, которые содержат две или четыре симметрично расположенные АБ-вставки, изучены нами впервые.

2.4.4. Модификация мутантной формы R.SsoII(2CS/S171C) олигонуклеотидами, содержащими азобензольную вставку

Для модификации R.SsoII различными реагентами наиболее удобными являются сульфгидрильные группы остатков цистеина, которые были введены ранее в состав фермента методом сайт-направленного мутагенеза гена, кодирующего этот белок [191]. На первом этапе получали олигонуклеотид с малеимидной группировкой, которая быстро и с высоким выходом может взаимодействовать в дальнейшем с сульфгидрильной функциональной группой остатка цистеина. Для модификации олигонуклеотида использовали бифункциональный реагент GMBS (раздел 2.4), активированная карбоксильная группировка которого взаимодействует с концевой аминогруппой олигонуклеотида (рис. 2.58).

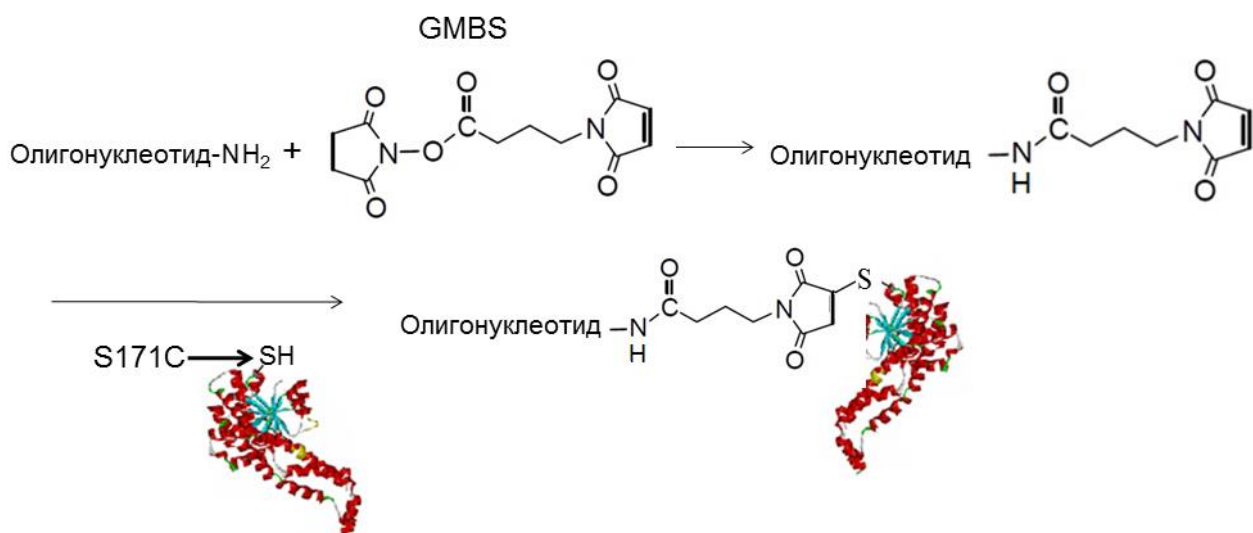


Рис. 2.58. Схема получения ДНК-белкового конъюгата с использованием GMBS.

Необходимо отметить, что параллельно с нашими исследованиями аналогичная стратегия получения конъюгатов ферментов с азобензолсодержащими олигонуклеотидами была использована в работе Йоу и соавт. [197]. Целью авторов являлась разработка подхода для регулирования функционирования системы взаимосвязанных ферментов: глюкозооксидазы и пероксидазы хрена. Для этого в ходе независимых реакций получали конъюгат глюкозооксидазы с азобензолсодержащим олигонуклеотидом и конъюгат пероксидазы хрена с комплементарным олигонуклеотидом, после чего их объединяли в одну реакцию смесь. Модификация гомодимерной ЭР в двух одинаковых позициях самокомплементарными азобензолсодержащими олигонуклеотидами была проведена в нашей работе впервые.

Прежде всего, были подобраны условия модификации 10-звенного олигонуклеотида №3 (табл. 2.5) бифункциональным реагентом. Олигонуклеотид №3 не содержал АБ-вставок. Для проведения реакции использовали 500-кратный избыток раствора GMBS в ДМСО. Из-за малой растворимости в воде в ходе реакции (при добавлении водного раствора олигонуклеотида) GMBS частично выпадает в осадок. Реакцию останавливали добавлением этаноламина. Предполагалось, что этаноламин прореагирует с активированной карбоксильной группой избытка реагента. Анализ реакционной смеси методом ВЭЖХ в ион-парном варианте показал, что в ходе реакции образуется несколько продуктов. По-видимому, этаноламин за счёт реакционноспособной аминогруппы взаимодействует с остатком малеимида модифицированного олигонуклеотида или оксогруппами гетероциклических оснований. В дальнейшем реакцию останавливали

добавлением буфера Трис-НСl (рН 8,0). В этом случае образовывался один продукт реакции – олигонуклеотид с введенной малеимидной группировкой.

После модификации олигонуклеотида №3 GMBS ключевым этапом являлось удаление избытка бифункционального реагента, оставшегося в реакционной смеси. Данная стадия является необходимой, так как при последующей модификации белка такой реакционной смесью свободный GMBS может вступать в реакцию с сульфгидрильными группами остатков цистеинов и, таким образом, снижать выход ДНК-белкового конъюгата. GMBS также способен реагировать с аминоклассами аминокислотных остатков мутантной формы R.SsoII(2CS/S171C), образуя при этом различные межмолекулярные и внутримолекулярные белок-белковые конъюгаты, что значительно затрудняет выделение и снижает выходы целевого продукта реакции.

Для отделения целевого продукта от непрореагировавшего GMBS проводили гель-фильтрацию на колонке NAP-5 с носителем на основе Сефадекса G25. Учитывая большой избыток GMBS в реакционной смеси, гель-фильтрацию проводили дважды. Выход олигонуклеотида №3а, содержащего малеимидную группу, оценивали с помощью обращено-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте (рис. 2.59). Он составил более 90%, так как на хроматограмме (рис. 2.59, Б) практически отсутствовал пик, по времени удерживания соответствующий исходному олигонуклеотиду №3 (рис. 2.59, А).

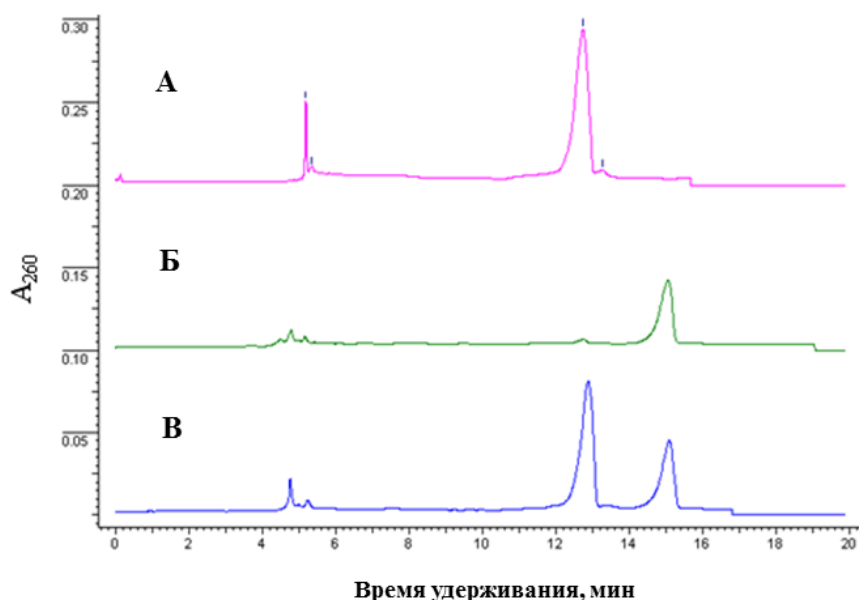


Рис. 2.59. Анализ реакционной смеси методом обращено-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте. А – водный раствор олигонуклеотида №3; Б – смесь, полученная в ходе реакции между олигонуклеотидом №3 и GMBS; В – контрольный раствор, содержащий исходный олигонуклеотид №3 и олигонуклеотид №3а, модифицированный GMBS.

Второй этап заключался в получении конъюгата олигонуклеотида с белком. К мутантной форме R.SsoII(2CS/S171C) добавляли 20-кратный избыток водного раствора

олигонуклеотида №3а, содержащего малеимидную группу (рис. 2.58). Большая молекулярная масса олигонуклеотида уменьшает подвижность его конъюгата с белком в полиакриламидном геле по сравнению с немодифицированным ферментом. Это позволяет детектировать образование конъюгата методом гель-электрофореза по Лэммли. При анализе этим методом виден сдвиг зоны, соответствующей комплексу мутантной формы R.SsoII с олигонуклеотидом №3а относительно исходного белка (рис. 2.60). Выход ДНК-белкового конъюгата составлял примерно 95%.

Для оценки эффективности прохождения реакции R.SsoII(2CS/S171C) с олигонуклеотидом №3а также использовали PEG-Mal (5 кДа). Оказалось, что после инкубации олигонуклеотида с мутантной формой R.SsoII(2CS/S171C) в течение 1 ч при дальнейшем добавлении PEG-Mal новый продукт, характеризующийся меньшей подвижностью по сравнению с белково-нуклеиновым конъюгатом, не образуется (данные не приведены). Это означает, что все реакционноспособные остатки цистеина R.SsoII(2CS/S171C) уже прореагировали на первом этапе с малеимидной группой олигонуклеотида и их дальнейшая модификация невозможна.

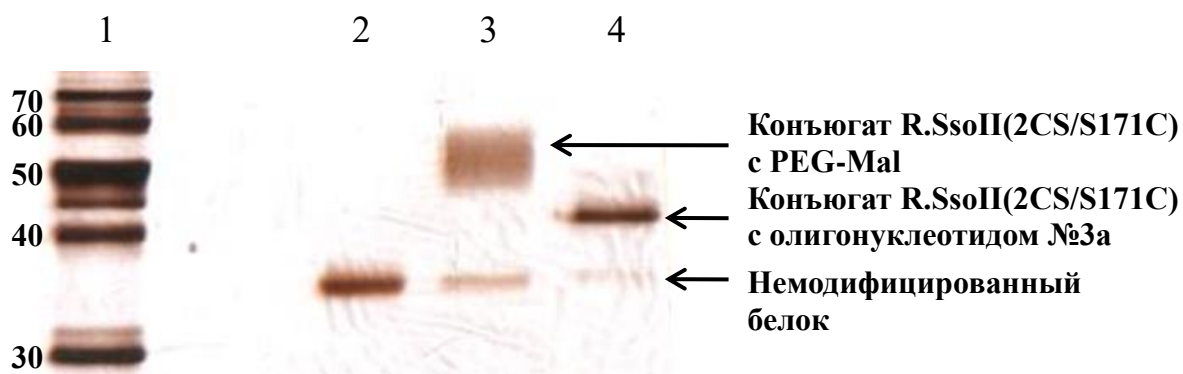


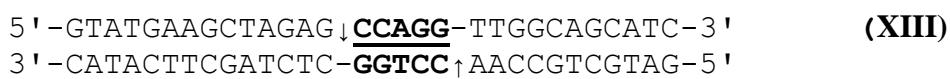
Рис. 2.60. Анализ методом гель-электрофореза по Лэммли взаимодействия мутантной формы R.SsoII(2CS/S171C) с модифицированным 10-звенным олигонуклеотидом №3а. Дорожка 1 – маркерные белки, молекулярная масса (кДа) указана слева; 2 – белок без добавления олигонуклеотида; 3 – взаимодействие белка с PEG-Mal; 4 – конъюгат белка с модифицированным олигонуклеотидом №3а. Гель окрашен раствором солей серебра.

Учитывая, что практически весь белок R.SsoII(2CS/S171C) находится в составе ковалентно связанного комплекса с олигонуклеотидом, полученный конъюгат не отделяли от непрореагировавшего белка. От избытка олигонуклеотида, присутствующего в реакционной смеси, полученный конъюгат также не отделяли. Поскольку олигонуклеотид не содержит участок узнавания фермента, его присутствие не должно препятствовать анализу гидролитической активности модифицированной мутантной формы R.SsoII.

Разработанная методика была использована для получения конъюгатов R.SsoII(2CS/S171C) с немодифицированными олигонуклеотидами №3 и №13, а также с олигонуклеотидами №№ 4, 8 – 12, содержащими АБ-вставку(и) (табл. 2.5).

2.4.5. Гидролиз ДНК-субстрата конъюгатами R.SsoII(2CS/S171C) с азобензол-содержащими олигонуклеотидами в зависимости от облучения УФ-светом

В качестве ДНК-субстрата для проверки эффекта изменения активности R.SsoII в составе конъюгатов с азобензолсодержащими олигонуклеотидами был выбран 30-звенный ДНК-дуплекс **XIII**, содержащий в центре единственный участок узнавания фермента (выделен жирным шрифтом и подчеркнут).



Ранее было показано, что такой дуплекс эффективно гидролизуеться немодифицированной формой R.SsoII при 37°C (позиции гидролиза отмечены стрелками) (71).

В «нижнюю» цепь дуплекса **XIII** вводили ³²P-метку, что позволяло следить за ходом реакции гидролиза методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях с последующей автордиографией (детектировали образование 11-звенного радиоактивно меченного фрагмента ДНК).

По описанной выше схеме был получен конъюгат R.SsoII(2CS/S171C) с 10-звенным олигонуклеотидом №4 (см. табл. 2.5), содержащим один остаток азобензола (в соответствующем дуплексе **XIV-C** содержатся два остатка азобензола). Первоначально была изучена гидролитическая активность конъюгата при 37°C без облучения (остатки азобезола в *транс*-конфигурации) и при облучении светом длиной волны 365 нм (рис. 2.61). Для перевода АБ-группы в составе олигонуклеотида №4 в *цис*-форму проводили предоблучение его конъюгата с R.SsoII(2CS/S171C) УФ-светом ($\lambda = 365$ нм) в течение 10 мин. Далее в реакцию добавляли ДНК-субстрат **XIII** и продолжали облучение на протяжении всего времени инкубации. В контрольном эксперименте использовали немодифицированный фермент R.SsoII(2CS/S171C).

Установлено, что начальная скорость гидролиза субстрата **XIII** конъюгатом R.SsoII(2CS/S171C)_4 (конъюгат R.SsoII(2CS/S171C) с олигонуклеотидом №4) примерно на порядок меньше начальной скорости гидролиза этого субстрата немодифицированным ферментом при одной и той же температуре (табл. 2.7). Этот факт может быть связан как с уменьшением активности белка вследствие его модификации, так и с тем, что

азобензолсодержащие олигонуклеотиды в составе димерного белка препятствуют «входу» субстрата в ДНК-связывающий центр.

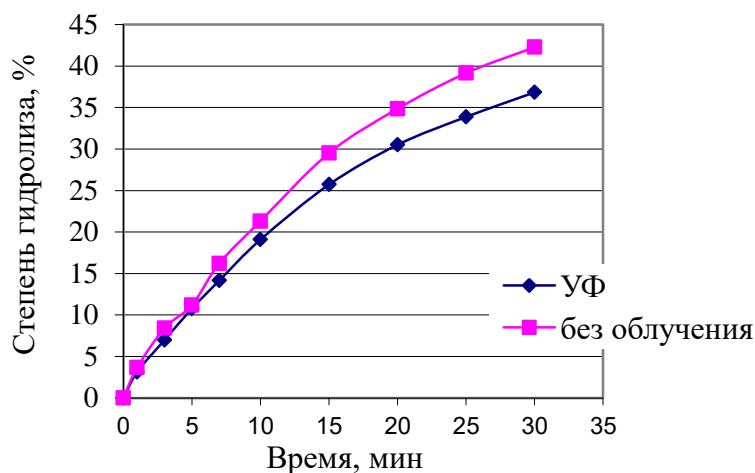


Рис. 2.61. Кинетические кривые расщепления ДНК-субстрата **XIII** (20 нМ) конъюгатом R.SsoII(2CS/S171C) с олигонуклеотидом №4 (концентрация димерного фермента – 50 нМ) при облучении УФ-светом и без облучения при 37°C.

Таблица 2.7

Начальные скорости гидролиза ДНК-субстрата **XIII** немодифицированным ферментом R.SsoII(2CS/S171C) и конъюгатом R.SsoII(2CS/S171C) с олигонуклеотидом №4

Фермент, температура реакции	Начальная скорость гидролиза без облучения, нМ/мин	Начальная скорость гидролиза при УФ-облучении ($\lambda=365$ нм), нМ/мин
R.SsoII(2CS/S171C), 37°C	5,7±0,3	5,6±0,3
R.SsoII(2CS/S171C)_4, 37°C	0,17±0,04	0,16±0,04
R.SsoII(2CS/S171C)_4, 45°C	0,33±0,04	0,34±0,04

Контрольные эксперименты показали, что ферментативная активность мутантной формы R.SsoII(2CS/S171C) без облучения и при облучении УФ-светом одинакова (табл. 2.7).

Однако ожидаемой нами активации действия конъюгата R.SsoII(2CS/S171C)_4 за счет *транс-цис* перехода остатка азобензола при УФ-воздействии и инкубации при 37°C, к сожалению, не наблюдалось. Так как $T_{пл}$ дуплекса **XIV-C** составляет 58°C (см. табл. 2.6), были определены начальные скорости гидролиза субстрата конъюгатом R.SsoII(2CS/S171C)_4 без облучения и при облучении УФ-светом при более высокой температуре – 45°C. При данной температуре немодифицированный фермент

R.SsoII(2CS/S171C) практически полностью сохраняет свою каталитическую активность (рис. 2.62). В то же время стабильность дуплекса **XIV-C** (в случае его образования) в составе конъюгата R.SsoII(2CS/S171C)₄ понижается при повышении температуры и изомеризация остатков азобензола может оказывать бóльший дестабилизирующий эффект. Однако и при 45°C разницы в начальных скоростях гидролиза в зависимости от облучения не наблюдалось. Вместе с тем отметим, что значения начальных скоростей гидролиза ДНК конъюгатом R.SsoII(2CS/S171C)₄ при 45°C были выше соответствующих значений при 37°C (табл. 2.7).

Из полученных данных можно сделать вывод, что бóльшее влияние на активность конъюгата R.SsoII(2CS/S171C)₄ оказывала температура реакции, а не облучение УФ-светом. Повышение температуры реакции приводит к диссоциации структур, образуемых самокомплементарным олигонуклеотидом (дуплекса или шпильки) в составе конъюгата R.SsoII(2CS/S171C)₄, также повышается флуктуация присоединенных олигонуклеотидов, что в совокупности приводит к открытию «входа» в активный центр фермента и возрастанию его каталитической активности.

Для увеличения вероятности образования межмолекулярного ДНК-дуплекса в составе конъюгата была увеличена длина присоединяемых олигонуклеотидов за счет добавления на 5'-конец пяти тимидиновых звеньев. Мы полагали, что спейсер T₅ отдалит самокомплементарную часть олигонуклеотида от белка и будет способствовать образованию дуплекса. Для увеличения вклада изомеризации АБ-групп в диссоциацию дуплекса их количество в его составе было увеличено до 4 (дуплексы **XV-D**, **XVI-B**) и 6 (дуплекс **XVII-A**).

По разработанной методике были получены конъюгаты R.SsoII(2CS/S171C) с олигонуклеотидами 8 – 12 (табл. 2.5). Однако ни в одном из случаев не удалось добиться разницы в начальных скоростях гидролиза субстрата **XIII** ДНК-белковым конъюгатом в зависимости от облучения ни при 37°C, ни при 45°C. Стоит отметить, что с увеличением длины присоединяемого олигонуклеотида наблюдалось закономерное снижение активности соответствующих ДНК-белковых конъюгатов, т.к. более протяженные олигонуклеотиды более эффективно закрывали «вход» в ДНК-связывающий центр фермента и блокировали его активность. В качестве примера на рис. 2.62 представлена температурная зависимость эффективности гидролиза субстрата **XIII** конъюгатом R.SsoII(2CS/S171C) с 15-звенным олигонуклеотидом №10. Конъюгат R.SsoII(2CS/S171C) с 17-звенным олигонуклеотидом №12 практически не проявлял активность во всем диапазоне температур. Таким образом, присоединяя самокомплементарные

олигонуклеотиды вблизи ДНК-связывающего центра гомодимерной R.SsoII, нам впервые удалось обратимо «выключить» активность фермента при 25 – 30°C.

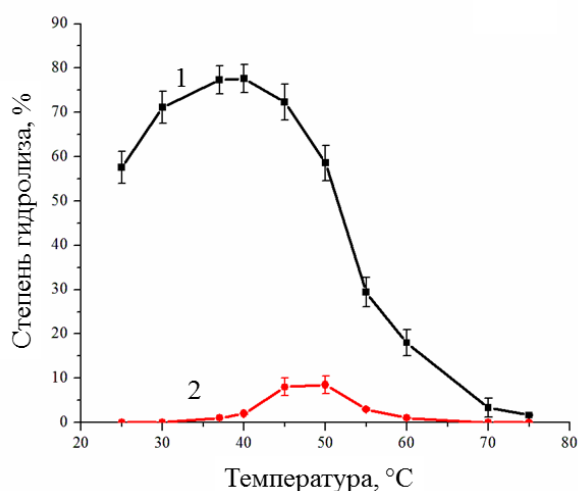


Рис. 2.62. Температурная зависимость эффективности гидролиза ДНК-субстрата XIII (20 нМ) немодифицированным ферментом R.SsoII(2CS/S171C) (кривая 1, выделена черным цветом) и ДНК-белковым конъюгатом R.SsoII(2CS/S171C)_10 (кривая 2, выделена красным цветом). Концентрации ферментов составляли 50 нМ (в расчете на димер).

2.4.6. Гидролиз ДНК-субстрата конъюгатами R.SsoII(2CS/S171C) с олигонуклеотидами в зависимости от температуры

Как показано выше, на гидролитическую активность конъюгатов R.SsoII(2CS/S171C)_4 и R.SsoII(2CS/S171C)_10 влияла температура инкубации реакционной смеси, поэтому реальной задачей представлялась проверка возможности направленного регулирования функционирования фермента за счет варьирования температуры. Нами был получен конъюгат R.SsoII(2CS/S171C) с 10-звенным олигонуклеотидом №3 (R.SsoII(2CS/S171C)_3), не содержащим остатков азобензола (табл. 2.5), и изучена эффективность гидролиза им субстрата XIII в зависимости от температуры. В контрольных экспериментах исследовали влияние температуры на активность немодифицированного фермента R.SsoII(2CS/S171C) и конъюгата R.SsoII(2CS/S171C) с олигонуклеотидом №13 (R.SsoII(2CS/S171C)_13). Олигонуклеотид №13 содержит десять тимидиновых звеньев и амилинкер на 5'-конце. Таким образом, он не способен формировать какую-либо структуру между двумя субъединицами фермента.

Были определены степени гидролиза субстрата XIII после инкубации в течение 30 мин с немодифицированным ферментом и двумя ДНК-белковыми конъюгатами R.SsoII(2CS/S171C)_3 и R.SsoII(2CS/S171C)_13 в температурном диапазоне 25-75°C (рис. 2.63).

Показано, что немодифицированный фермент эффективно гидролизует субстрат **XIII** при 25°C. Наибольшую степень гидролиза под действием R.SsoII(2CS/S171C) наблюдали при 37-40°C (рис. 2.63, кривая 1). Присоединение к этому ферменту как олигонуклеотида №3, так и олигонуклеотида №13 приводило к практически полному блокированию ферментативной активности при 25°C (рис. 2.63, кривые 2, 3).

При повышении температуры реакции от 25 до 45°C эффективность гидролиза субстрата **XIII** в присутствии R.SsoII(2CS/S171C)_13 возрастала. По всей видимости, за счет увеличения флуктуаций олигонуклеотида происходило открытие «входа» в активный центр фермента. Вместе с тем, при всех использованных температурах степень гидролиза субстрата **XIII** конъюгатом R.SsoII(2CS/S171C)_3 оказалась выше, чем в случае конъюгата R.SsoII(2CS/S171C)_13. При повышении температуры до 45°C ДНК-белковый конъюгат проявлял максимальную активность (рис. 2.63, кривая 2). Полученный результат можно объяснить способностью олигонуклеотида №3 к формированию как дуплексной, так и шпилечной структур (раздел 2.4.3).

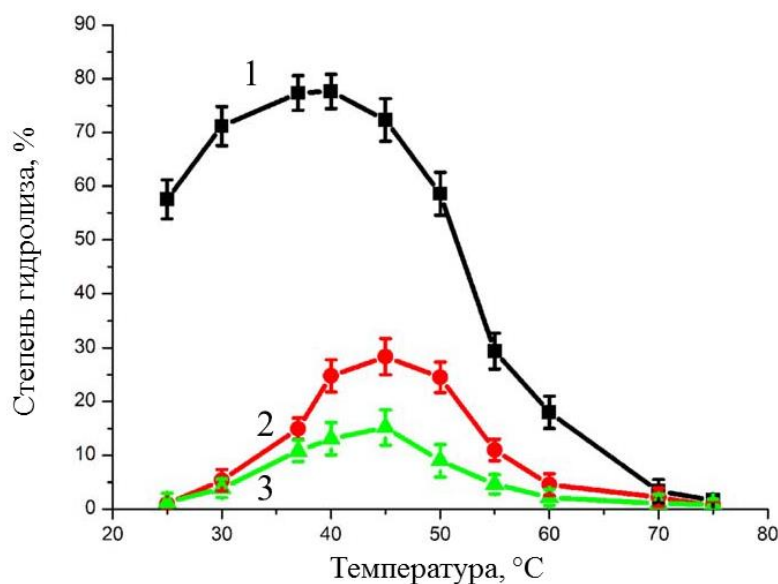


Рис. 2.63. Температурная зависимость эффективности гидролиза ДНК-субстрата **XIII** (20 нМ) немодифицированным ферментом R.SsoII(2CS/S171C) (кривая 1, выделена черным цветом) и двумя ДНК-белковыми конъюгатами – R.SsoII(2CS/S171C)_3 (кривая 2, выделена красным цветом) и R.SsoII(2CS/S171C)_13 (кривая 3, выделена зеленым цветом). Концентрации всех ферментов составляли 50 нМ (в расчете на димер).

Напомним, что олигонуклеотид №3 способен формировать дуплекс с $T_{пл}$ около 54°C (табл. 2.6). Мы полагаем, что при 45°C происходит не только частичная диссоциация дуплекса, образованного самокомплементарным олигонуклеотидом №3, но и формирование двух шпилек, которые являются менее значимым стерическим препятствием для проникновения субстрата в активный центр фермента по сравнению с олигонуклеотидом той же длины, но не образующим каких-либо структур (рис. 2.64).

Если бы олигонуклеотид №3 не образовывал шпильку в составе конъюгата, то ферментативная активность R.SsoII(2CS/S171C)₃ была бы ниже (при формировании дуплекса) или сопоставима (при диссоциации дуплекса) с активностью конъюгата R.SsoII(2CS/S171C)₁₃.

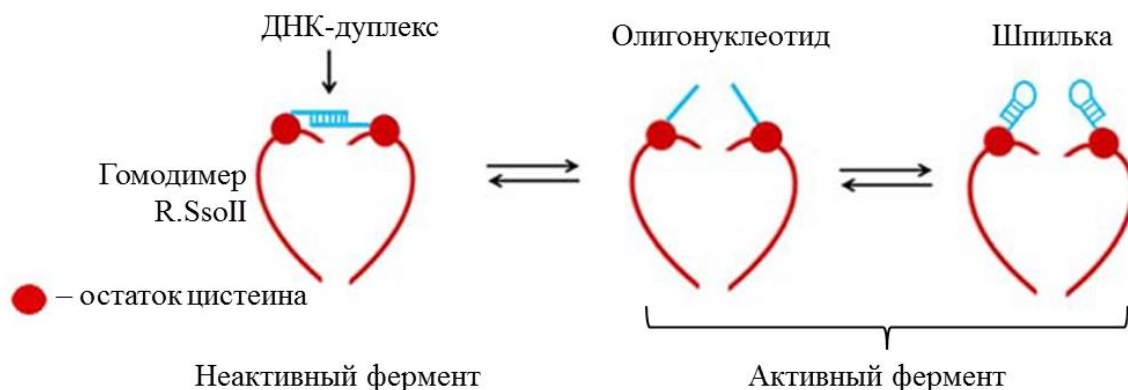


Рис. 2.64. Схематичное изображение конъюгата R.SsoII(2CS/S171C)₃ с возможными структурами, образуемыми самокомплементарным олигонуклеотидом №3.

В отличие от немодифицированного фермента R.SsoII(2CS/S171C) активность ДНК-белковых конъюгатов полностью «выключена» при 25°C. Повышение температуры позволяет постепенно «включать» активность конъюгатов, приводя к возрастанию начальной скорости гидролиза примерно в 30 раз при 45°C (рис. 2.65, Б). Активность немодифицированного фермента R.SsoII(2CS/S171C) также возрастает при нагревании реакционной смеси от 25°C до 45°C, но при этом начальная скорость гидролиза субстрата повышается только примерно в 3 раза (рис. 2.65, А).

Отметим, что использование самокомплементарного олигонуклеотида №3 является более эффективным при создании термопереключаемого фермента (активность конъюгата R.SsoII(2CS/S171C)₃ при повышении температуры восстанавливается в бóльшей степени, чем активность R.SsoII(2CS/S171C)₁₃). Однако несамоекомплементарный олигонуклеотид той же длины также может выполнять роль молекулярного «заслона», уменьшая ферментативную активность в зависимости от температуры.

Таким образом, нами была показана возможность создания термопереключаемой гомодимерной ЭР путем ковалентного присоединения олигонуклеотида в определенное положение белковой молекулы.

Также была изучена возможность обратимого переключения активности ДНК-белковых конъюгатов в зависимости от температуры. Для этого одну и ту же порцию фермента нагревали и охлаждали в течение 30 мин несколько раз, измеряя при этом начальную скорость гидролиза субстрата XIII (рис 2.65, А, Б). Изменение температурного

режима происходило в следующем порядке: 25°C, 37°C, 45°C, 37°C, 25°C, 37°C, 45°C, 37°C, 25°C.

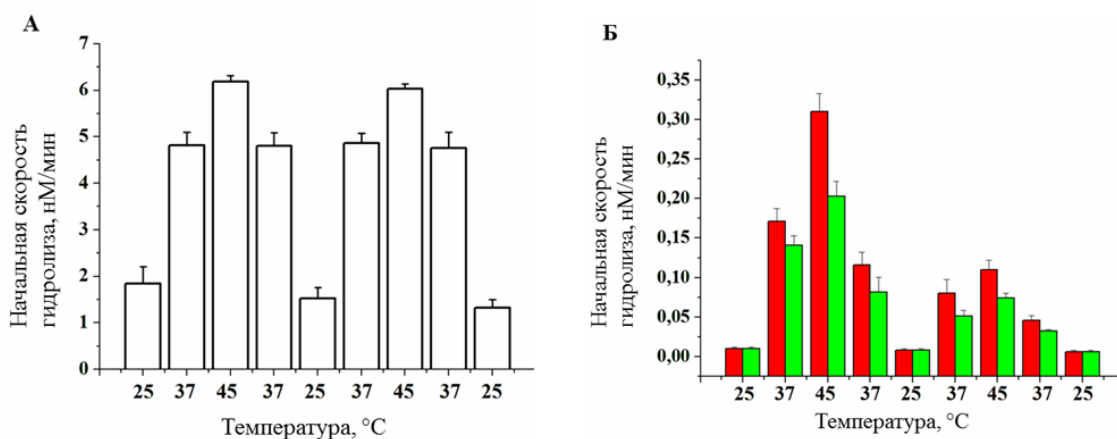


Рис. 2.65. Сравнение начальных скоростей гидролиза 30-звенного ДНК-дуплекса XIII в течение двух циклов нагревания-охлаждения немодифицированным ферментом R.SsoII(2CS/S171C) (А) и ДНК-белковыми конъюгатами R.SsoII(2CS/S171C)_3 (красные столбики) и R.SsoII(2CS/S171C)_13 (зеленые столбики) (Б).

Показано, что немодифицированный фермент R.SsoII(2CS/S171C) полностью сохраняет свои свойства на протяжении двух циклов нагревания–охлаждения. Активность ДНК-белковых конъюгатов R.SsoII(2CS/S171C)_3, R.SsoII(2CS/S171C)_13 постепенно снижается, что может быть обусловлено потерей стабильности фермента в результате модификации. Однако общая тенденция изменения ферментативной активности в зависимости от температуры также сохраняется на протяжении двух циклов нагревания–охлаждения.

Мы предполагаем, что разработанный подход «молекулярные ворота» для регулирования активности фермента с помощью температуры достаточно универсален и может быть использован для воздействия на активность других симметричных белков, связывающих субстрат в полости, например, таких как трансмембранные каналы, шапероны. Изменяя длину и последовательность присоединяемого олигонуклеотида, можно регулировать активность фермента в нужной степени в зависимости от температуры.

Данный подход позволяет конструировать белки с явно выраженными термозависимыми свойствами. Такие белки могут быть использованы в качестве моделей при изучении термозависимых процессов, происходящих в живых организмах. Так, например, известно, что некоторые транскрипционные факторы растений изменяют свою способность связывать ДНК в зависимости от температуры среды [198] – [200]. В организмах животных и вирусах также найдены процессы, регулируемые температурным режимом [201] – [202].

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Реактивы и материалы

Реактивы: [γ - ^{32}P]-АТФ с удельной радиоактивностью 1000 Кюри/моль (ВО «Изотоп», Россия); 1,4-димеркапто-2,3-бутандиол (1,4-дитиотреит, ДТТ), 30 %-ный раствор акриламида/*N,N'*-метиленабисакриламида (29:1), глицерин, глицин, дрожжевой экстракт, изопропил- β -*D*-тиогалактопиранозид (ИПТГ), имидазол, кумасси бриллиантовый синий G-250, пептон, трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), фенилметансульфонил-фторид (PMSF), хлорид натрия (AppliChem, Германия); формамид (Fluka, Швейцария); агароза (Invitrogen, США); *N*-2-гидроксиэтилпиперазин-*N'*-2-этансульфоновая кислота (HEPES), борная кислота, бромистый этидий (EtBr), бромфеноловый синий (БФС), гидроксид натрия, диметилсульфоксид (ДМСО), ксиленцианол, персульфат аммония, перхлорат лития, соляная кислота, моногидрат хлорида магния, додецилсульфат натрия (ДСН), этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА) (Merck, Германия); уксусная кислота (ROTH, Германия); кумасси бриллиантовый синий R-250 (Serva, Германия); PEG-Mal (5 кДа) (Sigma, США); *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин (TEMED) (Reanal, Венгрия); ацетон ос.ч. (ЗАО «Экос-1», Россия);

Ферменты и белки: эндонуклеазы рестрикции BglII, NheI, SpeI, XhoI, EcoRV, SmaI, StuI, BamHI; ДНК-полимераза Phusion High-Fidelity, бычий сывороточный альбумин (БСА) (Thermo Fisher Scientific, США); Т4-полинуклеотидкиназа (10 ед. акт./мкл) (Fermentas, Литва). нейтравидин (Pierce Biotechnology, США), человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) (Sigma-Aldrich, США).

Препараты никующей эндонуклеазы BspD6I и малой субъединицы эндонуклеазы рестрикции BspD6I в буфере Д были любезно предоставлены проф. Л.А. Железной (Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино).

Маркеры молекулярной массы: маркеры молекулярной массы белков PageRuler™ 10–200 кДа, ДНК-маркер GeneRuler™ 1 kb 250–10000 п. н. (Thermo Fisher Scientific, США).

Буферные растворы

Буфер А: 10 mM Трис-НСl (рН 7,8), 150 mM КСl, 10 mM СаСl₂, 1 mM ДТТ, 0,1 мг/мл БСА

Буфер Б1: 10 mM Трис-НСl (рН 7,8), 150 mM КСl, 10 mM СаСl₂, 1 mM ДТТ

Буфер Б2: 10 mM Трис-НСl (рН 7,8), 150 mM КСl, 10 mM СаСl₂, 1 mM ДТТ, 0,96% глицерин (m/V)

Буфер В: 10 мМ Трис-НСl (рН 7,8), 150 мМ КСl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 0,1 мг/мл БСА

Буфер Г: 50 мМ Трис-НСl, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ ДТТ, рН 7,6

Буфер Д: 10 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 50 мМ КСl, 0,1 мМ EDTA, 50% глицерин (m/V)

Буфер Е: 10 мМ Трис-НСl, 25% глицерин, 1,2% (w/V) ДСН, 250 мМ ЭДТА, 0,1% (w/V) бромфеноловый синий, рН 8,0.

Буфер Ж: 10 мМ Трис-НСl, 15 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, рН 7,5

Буфер ТВЕ: 50 мМ Трис-борат, 1 мМ ЭДТА, рН 8,3

Буфер ТГ: 25 мМ Трис-НСl, 0,19 М глицин, 0,1 % (w/V) ДСН, рН 8,3.

Буфер ТВ: 10 мМ HEPES, рН 6,7, 15 мМ CaCl₂, 250 мМ КСl, 55 мМ MnCl₂

Питательная среда LB: 1 % (m/V) пептон, 0,5 % (m/V) дрожжевой экстракт, 0,5 % (m/V) NaCl, рН 7,5. Среду LB автоклавировали и после охлаждения добавляли требуемые антибиотики. Для приготовления агаризованных сред непосредственно перед автоклавированием добавляли агар в количестве 15 г на 1 л среды.

Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы сотрудником Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова Т.С. Зацепиным, а также фирмой Синтол (Россия). Плаزمида pBend2 была любезно предоставлена доктором В. Венде (Университет имени Юстуса Либиха, институт Биохимии, г. Гиссен, Германия).

Таблица 3.1

Использованные ДНК-дуплексы

Обозначение	Последовательность (5'→3'/3'→5')*	Длина, п.н.
I-A – I-H**	...NNNNNGAGTCNNNNN... ...NNNNNCTCAGNNNNN...	120
II	TCGAGTCTTCTCAA AGCTCAGAAGAGTT	14
III	TCGAGTCTTCTCAAGG AGCTCAGAAGAGTTCC	16
IV	TCTCGAGTCTTCTCAAGGT AGAGCTCAGAAGAGTTCCA	19
V	TCGAGTCTTCTCAAGGTACCTG AGCTCAGAAGAGTTCCATGGAC	22
VI	CGTGGTCTCGAGTCTTCTCAAGGTAC GCACCAGAGCTCAGAAGAGTTCCATG	26
VI-A	CGTGGTCTCGAGTCTT*CTCAAGGTAC *** GCACCAGAGCTCAGAA-GAGTTCCATG	26
VI-B	CGTGGTCTCGAGTCTT*CAAGGTAC GCACCAGAGCTCAGAAGA-GTTCCATG	26

VI-C	CGTGGTCTCGAGTCTTCTCA*AGGTAC GCACCAGAGCTCAGAAGAGT-TCCATG	26
VI-D	CGTGGTCTCGAGTCTT-CTCAAGGTAC GCACCAGAGCTCAGAA _x GAGTTCCATG	26
VI-E	CGTGGTCTCGAGTCTTCTC-AAGGTAC GCACCAGAGCTCAGAAGAG _x TTCATG	26
VI-F	CGTGGTCTCGAGTCTTCTCA-AGGTAC GCACCAGAGCTCAGAAGAGT _x TCCATG	26
VI-G	CGTGGTCTCGAGTCTTCT ^y CAAGGTAC **** GCACCAGAGCTCAGAAGA-GTTCCATG	26
VII	GCGTGGTCTCGAGTCTTCTCAAGGTACCTG CGCACCAGAGCTCAGAAGAGTTCATGGAC	30
VII-A	GCGTGGTCTCGAGTCTTCT pCAAGGTACCTG CGCACCAGAGCTCAGAAGA--GTTCCATGGAC	30
VII'	GCGTGGTCTCGAGTCTTCTCAAGGTACCTG CGCACCAGAGCTCAGAAGAGTTCATGGAC (T) ₁₀ - Bt *****	30
VII-A'	GCGTGGTCTCGAGTCTTCT pCAAGGTACCTG CGCACCAGAGCTCAGAAGA--GTTCCATGGAC (T) ₁₀ - Bt	30
VII-B	CGGTGGTC TCGAGTC -TTCTCAA GGTACCTG CGCACCAG-AG CTCAG AAGAGTT-CCATGGAC.	30
VII-C	CGGTGGTC TCGAGTC -TTCT ^x CAA GGTACCTG CGCACCAG-AG CTCAG AAGA-GTT-CCATGGAC	30
VII-D	CGGTGGTC TCGAGTC -TTCT ^x CA ^x A GGTACCTG CGCACCAG-AG CTCAG AAGA-GT-T-CCATGGAC	30
VII-E	CGGTGGTC TCGAGTC -TT ^x CT ^x CA ^x A GGTACCTG CGCACCAG-AG CTCAG AA-GA-GT-T-CCATGGAC	30
VII-F	CGGTGGTC TCGAGTC -TTCT ^y CAA GGTACCTG CGCACCAG-AG CTCAG AAGA-GTT-CCATGGAC	30
VIII	GATGCTGCCAA GAGTC CCTCTAGCTTCATAC CTACGACGGTT CTCAG GAGATCGAAGTATG	30
IX	GTATGAAGCTAGAGCCAGGTTGGCAGCATC CATACTTCGATCTCGGTCCAACCGTCGTAG	30
X	CGTGGTCTC GAGTC TTCTCCTGG GCACCAGAG CTCAG AAGAGGACC	23
X-A	CGTGGTCTC GmAGTC TTCTCCTGG ***** GCACCAGAG C-TCAG AAGAGGACC	23
X-B	CGTGGTCTC GAG-TC TTCTCCTGG GCACCAGAG CTCmAG AAGAGGACC	23
X-C	CGTGGTCTC GmAG-TC TTCTCCTGG GCACCAGAG C-TCmAG AAGAGGACC	23
X'	CGTGGTCTC GAGTC TTCTCCTGG-FAM GCACCAGAG CTCAG AAGAGGACC	23
XI	CGTGGTCTCGACTTTTCTCCTGG-FAM GCACCAGAGCTGAAAAGAGGACC	23
XII	CGGTGGTC TGTGCTA -TTCTCAA GGTACCTG CGCACCAG-ACACGAT AAGAGTT-CCATGGAC	30
XIII	GTATGAAGCTAGAG CCAGG TTGGCAGCATC CATACTTCGATCTC GGTCC AACCGTCGTAG	30

XIV	CACACGTGTG GTGTGCACAC	10
XIV-A	CAC [*] ACGT-GTG GTG-TGCA _x CAC	10
XIV-B	NH ₂ (CH ₂) ₆ p-CACACGTGTG GTGTGCACAC-p (CH ₂) ₆ NH ₂	10
XIV-C	NH ₂ (CH ₂) ₆ p-CAC [*] ACGT-GTG GTG-TGCA _x CAC-p (CH ₂) ₆ NH ₂	10
XV	CACACAGCTGTGTG GTGTGTCGACACAC	14
XV-A	CACA [*] CAGCTG-TGTG GTGT-GTCGAC _x ACAC	14
XV-B	CA [*] CA [*] CAGCTG-TG-TG GT-GT-GTCGAC _x AC _x AC	14
XV-C	NH ₂ (CH ₂) ₆ p-CACA [*] CAGCTG-TGTG GTGT-GTCGAC _x ACAC-p (CH ₂) ₆ NH ₂	14
XV-D	NH ₂ (CH ₂) ₆ p-CA [*] CA [*] CAGCTG-TG-TG GT-GT-GTCGAC _x AC _x AC-p (CH ₂) ₆ NH ₂	14
XVI-A	NH ₂ - (CH ₂) ₆ p-T ₅ -CAC [*] ACGT-GTG ***** GTG-TGCA _x CAC-T ₅ -p (CH ₂) ₆ NH ₂	15
XVI-B	NH ₂ - (CH ₂) ₆ p-T ₅ -CA [*] CA-CG [*] TG-TG GT-GT _x GC-AC _x AC-T ₅ -p (CH ₂) ₆ NH ₂	15
XVII-A	NH ₂ - (CH ₂) ₆ p-T ₅ -A [*] CA-CA [*] CG-TG [*] TG-T T-GT _x GT-GC _x AC-AC _x A-T ₅ -p (CH ₂) ₆ NH ₂	17

*Участок узнавания Nt.BspD6I выделен подчеркиванием, участок узнавания R.SsoII – двойным подчеркиванием

120-звенные ДНК-дууплексы **I-A – I-H содержали участок узнавания Nt.BspD6I в различных положениях

*** ^x и _x – обозначение нуклеозидной вставки с остатком азобензола (остаток N-(4-карбоксиазобензил)-D-треонинола) в «верхней» и «нижней» цепях, соответственно

**** y – остаток триэтиленгликоля

***** Bt – биотин

***** m⁶A – остаток N6-метил-2'-дезоксиаденозина

***** T₅ – пентатимидиновая последовательность

3.2. Приборы и методы

Микрообъемы растворов дозировали автоматическими дозаторами Pipetman (Gilson, Франция) и Research (Eppendorf, Германия) с точностью 5 %. Водородный показатель растворов измеряли на потенциометре РВ-11 (Sartorius, США) с точностью до 0,01 единицы рН. Упаривание микроколичеств водных растворов проводили на вакуумном испарителе Speed Vac (Savant, США). Центрифугирование микрообъемов проводили на микроцентрифугах Eppendorf (Германия). Центрифугирование больших объемов проводили на центрифугах J6-НС (Beckmann, США) и J2-21 (Beckmann, США). Радиоактивность ³²P-меченых препаратов определяли методом счёта по Черенкову в импульсах в минуту на счетчике Tracor Analytic Delta 300 (ThermoQuest/CE Instruments, США). Спектры поглощения водных растворов олигонуклеотидов, плазмидных ДНК и

белков в УФ-области регистрировали на приборах Cary 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer (Varian, США) и NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, США) при комнатной температуре. Для специфического облучения использовали лампы, испускающие УФ-свет с длиной волны 365 нм (Vachofer, Германия и Vilber Lourmat, Франция).

Синтез немодифицированных олигодезоксирибонуклеотидов осуществляли на автоматическом синтезаторе ASM 800 компании BIOSSET (Россия) по стандартному регламенту с использованием коммерческих реагентов и растворителей под руководством с.н.с. НИИ ФХБ имени Белозерского МГУ Романовой Е.А. В качестве полимерного носителя применяли стекло с определенным размером пор (CPG-500), удельная загрузка полимера первым мономерным звеном составляла около 40-60 мкмоль/г. 3'-Амидофосфиты нуклеозидов использовали в виде 0,05 М растворов в абсолютном ацетонитриле.

Олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие а) ненуклеозидную вставку на основе D-треонинола, модифицированного азобензольной группой, б) остаток триэтиленгликоля, в) 3'-концевой карбокситетраметилпродамин (флуорофор TAMRA), были синтезированы с.н.с. Химического факультета МГУ Т.С. Зацепиным.

Очистка олигонуклеотидов в геле. Электрофорез олигонуклеотидов в денатурирующих условиях проводили в плоском 20x20x0,1 см ПААГ, содержащем 19% акриламида, 1% *N,N'*-метиленбисакриламида, 7 М мочевины, в TBE-буфере при напряженности поля 50 В/см.

Выделение олигонуклеотидов из геля. Олигонуклеотиды элюировали из геля 2 М водным раствором перхлората лития в течение 14 ч при комнатной температуре и осаждали ацетоном. Осадок центрифугировали, промывали ацетоном и высушивали в вакууме.

Спектры поглощения водных растворов олигонуклеотидов в УФ-области записывали на спектрофотометре Cary Eclipse (Varian, США). Концентрацию нуклеотидного материала определяли спектрофотометрически по формуле Бугера-Ламберта-Бера. Молярные коэффициенты экстинкции (ϵ_{260}) олигонуклеотидов рассчитывали в программе OligoAnalyser (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>).

ДНК-дуплексы формировали из комплементарных олигонуклеотидов, смешивая их в эквимольных количествах, затем нагревали до 90°C и медленно охлаждали.

Определение термической стабильности ДНК-дуплексов. Растворы ДНК-дуплексов в буфере В нагревали до 90°C (5 мин) и медленно охлаждали до комнатной

температуры («отжиг»). Плавление дуплексов осуществляли на спектрофотометре U-2800A HITACHI с температурным регулятором SPR-10 HITACHI (Япония). Использовали термостатируемые кварцевые кюветы Hellma (Германия) с длиной оптического пути 1 см. УФ-поглощение фиксировали при длине волны 260 нм, соблюдая следующий температурный режим: 15°C – 10 мин, нагрев от 15°C до 65°C – 100 мин. Результаты представляли как в интегральной (зависимость оптической плотности раствора дуплекса от температуры $f(T) = A_{260}$), так и в дифференциальной форме: $f(T) = \Delta A_{260}/(\Delta T)$. Для обработки экспериментальных данных использовали программу Origin. Температуру плавления дуплексов определяли по максимуму первой производной оптической плотности по температуре. Температуру плавления определяли как среднее арифметическое двух или трех независимых экспериментов. Ошибка составляла 1°C.

Введение ^{32}P -метки в олигонуклеотиды. ^{32}P -Метку на 5'-конец олигонуклеотидов вводили с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 (5 ед. акт.) в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (0,4 МБк) в буфере Г при 37°C в течение 30 мин. Меченый олигонуклеотид выделяли на колонке MicroSpin G-50 (GE Healthcare, США). Радиоактивность ^{32}P -меченных препаратов определяли методом счета по Черенкову в импульсах в минуту на счетчике Tracor Analytic Delta 300 («ThermoQuest/CE Instruments», США).

Концентрацию нуклеотидного материала определяли спектрофотометрически по формуле Бугера–Ламберта–Бера: $c = A_{260}/\epsilon_{260} \cdot l$, где c – концентрация нуклеотидного материала, A_{260} – оптическая плотность раствора при 260 нм, ϵ_{260} – молярный коэффициент экстинкции при 260 нм, l – длина оптического пути. Молярные коэффициенты экстинкции олигонуклеотидов рассчитывали с помощью программы OligoAnalyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>).

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически. Молярные коэффициенты экстинкции при 280 нм (ϵ_{280}) рекомбинантных белков были рассчитаны на основе их аминокислотных последовательностей с помощью программы ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>).

3.3. Общие методики

3.3.1. Методики, использованные при определении угла изгиба ДНК, индуцированного связыванием Nt.BspDI

3.3.1.1. Приготовление компетентных клеток для получения плазмиды pBend2

Клетки *E. coli* DH5 α выращивали в течение ночи при 37°C в 5 мл среды LB, не содержащей антибиотик (37°C, 230 об./мин). Полученную культуру (5 мл) переносили в 250 мл среды LB без антибиотика, и растили до оптической плотности при 600 нм, равной

0,3-0,4 (~12 ч). Культуру клеток помещали в центрифужные стаканы по 50 мл, выдерживали в бане со льдом в течение 10 мин и затем центрифугировали при 3000-4000 об./мин в течение 10 мин при 4°C. Надосадочную жидкость сливали, к осадку добавляли по 16 мл буфера ТВ и ресуспендировали клетки. Выдерживали в бане со льдом в течение 10 мин, затем снова центрифугировали в течение 10 мин при 4°C при 3300 об./мин. Жидкость над осадком декантировали, осадок из клеток аккуратно ресуспендировали в 4 мл буфера ТВ. Добавляли 300 мкл ДМСО (до конечной концентрации 7%), перемешивали пипетированием и выдерживали в течение 10 мин в бане со льдом. Полученную суспензию раскапывали в пробирки по 100-200 мкл, немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при -75°C. Клетки использовали для трансформации в течение 6 месяцев.

3.3.1.2. Трансформация клеток плазмидой pBend2 методом теплового шока

Компетентные клетки (100-200 мкл) размораживали и выдерживали в бане со льдом в течение нескольких минут (от 1 до 10). К 50 мкл компетентных клеток добавляли плазмиду pBend2, выдерживали в бане со льдом в течение 5-30 мин (методика хорошо работает в этом интервале времен, можно выбрать любое), затем при 42°C в течение 30-50 с и немедленно помещали в баню со льдом на 1-5 минут. После этого к клеткам добавляли 950 мкл среды LB без антибиотиков и выдерживали от 40 мин до 2 ч (методика хорошо работает в этом интервале времен, можно выбрать любое) при 37°C и покачивании со скоростью 230 об./мин. Клетки осаждали центрифугированием в течение 1 мин со скоростью 8000 об./мин при комнатной температуре, надосадочную жидкость удаляли. Добавляли 100 мкл среды LB, осадок ресуспендировали и втирали в чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Колонии выращивали в течение 16-18 ч при 37°C.

3.3.1.3. Анализ клонов и получение мультирестрикционного участка плазмиды pBend2 с помощью ПЦР

Проверку клонов на наличие плазмиды pBend2 осуществляли с помощью ПЦР. Для этого брали часть проверяемой колонии с чашки Петри и добавляли в смесь для ПЦР в качестве матрицы. В дальнейшем для получения мультирестрикционного участка плазмиды pBend2 длиной 436 п.н. в качестве матрицы использовали очищенную плазмиду pBend2.

Для проведения ПЦР использовали пару праймеров F1 и R1 (табл. 3.2, рис. 2.5). Условия ПЦР приведены в таблице 3.3.

Таблица 3.2

Название праймера	Последовательность, 5' → 3'	T _{пл} в составе дуплекса, °С	% пар GC	Длина, н.о.
F1	CGTATCACGAGGCCCTTTCG	58,0	60	20
R1	AACGCGCGAGGCAGATC	58,7	65	17

Таблица 3.3

Условия ПЦР для получения фрагмента ДНК длиной 436 п.н.

Этап	Температура, °С	Время, мин	Количество циклов
Первоначальная денатурация	95	2	1
Денатурация	95	0,5	30
Гибридизация праймеров	60	0,5	
Элонгация	72	0,5	
Финальная элонгация	72	5-15	1

Тонкостенные пробирки для ПЦР помещали в баню со льдом, затем готовили стоковую смесь, состоящую из воды, буфера, дезоксинуклеозидтрифосфатов, праймеров, ДНК-матрицы и ДНК-полимеразы Phusion® High-Fidelity. Объем стоковой смеси рассчитывали, исходя из числа реакций (плюс ещё одна реакция для уменьшения ошибки эксперимента, связанной с ошибкой пипетирования). Объем смеси для одной реакции составлял 20 мкл.

Состав реакционной смеси: прямой праймер F1 (10 мкМ) – 1 мкл; обратный праймер R1 (10 мкМ) – 1 мкл; смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (2,5 мМ) – 2 мкл; пятикратный буфер High-Fidelity – 4 мкл; ДНК-матрица (10 нг/мкл) – 1 мкл; ДНК-полимераза Phusion® High-Fidelity – 0,2 мкл; ДМСО – 0,6 мкл; вода – 10,2 мкл.

После добавления всех компонентов реакции образцы тщательно перемешивали пипетированием и осаждали капли. Пробирки помещали в термоциклер Mastercycler (Eppendorf, Германия), снабжённый нагреваемой крышкой. Анализ реакционной смеси проводили в 2%-ном агарозном геле, продукт реакции очищали с помощью набора «PCR clean-up and gel extraction» (Macherey-Nagel, Германия).

3.3.1.4. Гидролиз линейных фрагментов ДНК эндонуклеазами рестрикции

Гидролиз ДНК проводили при температуре, оптимальной для соответствующих ферментов (37°С). Состав реакционной смеси: 1-8 мкл ДНК (до 100 нг/мкл), 1 мкл фермента, 1 мкл 10-тикратного реакционного буфера для соответствующего фермента; объем реакционной смеси доводили водой до 10 мкл. Анализ реакционной смеси

проводили в 7%-ном ПААГ, продукт реакции вырезали из геля и очищали осаждением ацетоном в присутствии перхлората лития.

3.3.1.5. Комплексообразование никующей эндонуклеазы *VspD6I* с ДНК-фрагментами для определения угла изгиба ДНК

Комплексообразование *Nt.VspD6I* с ДНК-дуплексами проводили в течение 30 мин при 37°C в 10 мкл буфера А. Концентрация ДНК-фрагмента в одной реакционной смеси составляла 100 нМ, белка – 50 нМ. За образованием комплексов *Nt.VspD6I* с ДНК следили методом электрофореза в плоских 200 × 200 × 1,5 мм ПААГ, содержащих 7% акриламида и N,N'-бисакриламида (акриламид: N,N'-бисакриламид = 29 : 1). Электрофорез проводили в буфере TBE при силе тока 15 мА. Для визуализации полос гель окрашивали раствором SybrGold (Invitrogen, США) в течение 30 мин и фотографировали с помощью геледокументирующей системы ChemiDoc (BioRad, США).

Электрофоретические подвижности рассчитывали как расстояние, пройденное зоной, соответствующей исходной ДНК или ДНК-белковому комплексу, с момента входа в гель. Углы изгиба ДНК рассчитывали с помощью формул (1) и (2) (раздел 2.2.1).

3.3.2. Анализ связывания и гидролиза никующей эндонуклеазой *VspD6I* и эндонуклеазой рестрикции *VspD6I* синтетических ДНК-дуплексов

3.3.2.1. Комплексообразование *Nt.VspD6I* и *R.VspD6I* с ДНК-дуплексами

Комплексообразование с ДНК-дуплексами, содержащими флуоресцентную метку TAMRA либо радиоактивную метку ³²P на 3'-конце либо на 5'-конце, соответственно, в одной из цепей, проводили в течение 30 мин при 37°C в 10 мкл буфера А. Использовали 10 нМ ДНК-дуплекс и *Nt.VspD6I* в концентрациях от 1 до 100 нМ. Для формирования функционально активного гетеродимера *R.VspD6I* к *Nt.VspD6I* добавляли 12-тикратный избыток малой субъединицы.

За образованием комплексов *Nt.VspD6I* и *R.VspD6I* с ДНК следили методом электрофореза, как описано в разделе 3.3.1.5. С помощью прибора Typhoon FLA 9500 детектировали флуоресценцию ДНК либо получали радиоавтограф геля. Обсчет гелей либо радиоавтографов производили в программе ImageQuant (GE Healthcare, Великобритания). Степень связывания ДНК-субстрата ферментом рассчитывали как отношение интенсивности зон, соответствующих комплексу, к суммарной интенсивности всех зон в дорожке.

Значения K_d комплексов *Nt.VspD6I* с ДНК определяли как среднее арифметическое значение, полученное в результате не менее трех независимых экспериментов. Считали,

что значению K_d комплексов Nt.BspD6I с ДНК-дуплексами соответствует концентрация Nt.BspD6I, при которой степень связывания ^{32}P -меченного ДНК-субстрата составляет половину от максимально возможного для данного ДНК-дуплекса значения. Стандартную ошибку определяли в программе Origin по формуле $SE = s/n^{0.5}$, где SE – стандартная ошибка, s – стандартное отклонение, n – количество независимых экспериментов по комплексообразованию.

3.3.2.2. Гидролиз Nt.BspD6I и R.BspD6I ДНК-дуплексов

Гидролиз ДНК-дуплексов, содержащих флуоресцентную метку TAMRA либо радиоактивную метку ^{32}P на 3'-конце либо на 5'-конце, соответственно, в одной из цепей, проводили в течение 30 мин при 37°C в 10 мкл буфера В. Использовали 10 нМ Nt.BspD6I и 10 нМ ДНК-дуплекс. Для формирования функционально активного гетеродимера R.BspD6I к Nt.BspD6I добавляли 12-тикратный избыток малой субъединицы BspD6I.

Продукты гидролиза разделяли в 20%-ном ПААГ размером 200 × 200 × 1,5 мм (акриламид: N,N'-бисакриламид = 19 : 1) с 7 М мочевиной при напряженности поля 30 В/см. Зоны, соответствующие флуоресцентно- или радиоактивно меченной ДНК детектировали и анализировали, как описано выше в разделе 3.3.2.1. Анализ интенсивности зон в гелях или на радиоавтографах проводили в программе ImageQuant (GE Healthcare, Великобритания). Степень расщепления ДНК-субстрата ферментом рассчитывали как отношение интенсивности зон, соответствующих продуктам гидролиза, к суммарной интенсивности всех зон (исходная ДНК и продукты реакции).

Начальные скорости гидролиза (k) ДНК-дуплексов R.BspD6I и Nt.BspD6I рассчитывали как угловой коэффициент (тангенс угла наклона) начального прямолинейного участка кинетической кривой. Угловой коэффициент прямой определяли графически с помощью программы Origin. Стандартную ошибку определяли в программе Origin по формуле $SE = s/n^{0.5}$, где SE – стандартная ошибка, s – стандартное отклонение, n – количество независимых экспериментов (не меньше трех).

3.3.3. Анализ связывания никующей эндонуклеазой BspD6I синтетических ДНК-дуплексов методом акустической детекции на пьезоэлектрическом сенсоре

В качестве сенсора использовали кристалл кварца АТ-среза с собственной резонансной частотой 8 МГц (CH Instruments, США), на котором с обеих сторон закреплены тонкие пластинки золота с площадью поверхности 0,2 см², выступающие в роли электродов. Перед использованием кристалл кварца очищали обработкой ультразвуком в течение 5 мин в этаноле (130). После этого кристалл закрепляли между

силиконовыми кольцами так, чтобы он представлял собой одну из стенок проточной ячейки (90). Изучаемые растворы подавали в ячейку с помощью насоса Genie Plus (Kent Scientific, США) со скоростью 50 мкл/мин, регистрируя резонансную частоту и сопротивление с помощью прибора 8712ES (Agilent Technologies, США) (131). Каждый раствор подавали до тех пор, пока резонансная частота не стабилизировалась. Все эксперименты проводили при 25°C.

Поверхность сенсора промывали деионизованной водой, затем раствором нейтравидина (концентрация 0,25 мг/мл) в воде и снова водой для удаления молекул нейтравидина, не связавшихся с поверхностью. Далее сенсор промывали буфером Б1, наносили раствор биотинилированного ДНК-дуплекса с концентрацией 1 мМ и снова промывали буфером Б1 для удаления ДНК, не связавшейся с нейтравидином. Затем систему уравнивали буфером Б2, после чего наносили растворы Nt.BspD6I (концентрации 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1,0 мкМ) в буфере Б2. После каждого добавления Nt.BspD6I сенсор промывали буфером Б2, а затем добавляли раствор Nt.BspD6I с большей концентрацией. В качестве отрицательного контроля вместо Nt.BspD6I использовали растворы сывороточного альбумина человека (ЧСА) с концентрациями 0,1, 0,3, 1, 3, 10 мкМ в буфере Б2. В качестве еще одного отрицательного контроля растворы Nt.BspD6I в буфере Б2 наносили на сенсор, модифицированный только нейтравидином, без добавления ДНК.

3.3.4. Регулирование активности никующей эндонуклеазы BspD6I с помощью облучения светом и изменения температуры реакции

3.3.4.1. Фоторегуляция активности Nt.BspD6I

Активность Nt.BspD6I в зависимости от облучения УФ-светом определяли в ходе реакции гидролиза ДНК-субстрата VIII*, содержащего флуоресцентную метку TAMRA на 3'-конце «верхней» цепи, в присутствии 300-кратного избытка ингибиторов при облучении УФ-светом и без облучения. Реакционные смеси без добавления фермента облучали УФ-светом с длиной волны 365 нм в течение 10 мин при нужной температуре, а затем тестировали активность Nt.BspD6I, продолжая при этом облучать образцы. Гидролиз проводили в течение 5 мин при температурах 25, 30, 35, 40, 45, 50°C в 10 мкл буфера В. Использовали 10 нМ Nt.BspD6I, 10 нМ ДНК-субстрат, 3 мкМ дуплекс-ингибитор.

Анализ реакционных смесей проводили в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной и определяли степени расщепления ДНК-субстрата ферментом, как описано в разделе

3.3.2.2. Здесь и далее все эксперименты по гидролизу целевой ДНК в присутствии дуплексов-ингибиторов проводились не менее 3 раз. На графиках приведены средние значения степени гидролиза. Погрешность эксперимента не превышала 12 % от указанного значения.

3.3.4.2. Терморегуляция активности *Nt.BspD6I*

Активность *Nt.BspD6I* в зависимости от температуры реакции в присутствии 300-кратного избытка азобензол- или триэтиленгликольсодержащих ДНК-дуплексов определяли в ходе реакции гидролиза ДНК-субстрата VIII*, содержащего флуоресцентную метку TAMRA на 3'-конце «верхней» цепи. Гидролиз проводили в течение 5 мин при температурах 25, 30, 35, 40, 45, 50°C в 10 мкл буфера В. Использовали 10 нМ *Nt.BspD6I*, 10 нМ ДНК-субстрат, 3 мкМ дуплекс-ингибитор.

Анализ реакционных смесей проводили в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной и определяли степени расщепления ДНК-субстрата ферментом, как описано в разделе 3.3.2.2.

3.3.4.3. Гидролиз ДНК фага T7 в зависимости от температуры

ДНК фага T7 гидролизовали *Nt.BspD6I* в течение 30 мин при 20, 25, 30, 35, 40, 45 и 50°C в 10 мкл буфера В. Использовали 12 нМ *Nt.BspD6I* и 0,2 нМ ДНК фага T7. В случае добавления дуплекса-конкурента его концентрация составляла 60 мкМ. Перед нанесением на гель в пробы добавляли краситель SybrGold (Life Technologies, США), который, взаимодействует с углеводофосфатным остовом двуцепочечной ДНК. Анализ реакционных смесей проводили в 0,7%-ном агарозном геле в буфере TBE при напряженности поля 10 В/см. В качестве маркера длины ДНК использовали препарат GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США). С помощью прибора Turphoon детектировали флуоресценцию SybrGold, связанного с ДНК. Степень расщепления ДНК-субстрата ферментом рассчитывали, как описано в разделе 3.3.2.2.

3.3.5. Выделение препаратов *R.SsoII(2CS/S171C)* методом аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе

Плазмидная ДНК, содержащая ген мутантной формы *R.SsoII(2CS/S171C)*, была получена ранее в лаборатории (119). Выделение препаратов *R.SsoII(2CS/S171C)* проводили методом аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе согласно разработанному ранее протоколу (119).

3.3.6. Получение конъюгатов эндонуклеазы рестрикции SsoII(2CS/S171C) с олигонуклеотидами

3.3.6.1. Модификация олигонуклеотида N-(γ -малеимидобутирилокси)сукцинимидным эфиром (GMBS)

К 30 мкл 0,28 мМ раствора олигонуклеотида, содержащего аминогруппу, в буфере PBS добавляли 20 мкл 0,21 М раствора GMBS в ДМСО. Реакцию проводили в течение 1 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Для отделения целевого продукта от непрореагировавшего GMBS дважды проводили гель-фильтрацию на колонке NAP-5 с носителем на основе Сефадекса G25. Выход реакции оценивали с помощью ВЭЖХ в ион-парном варианте. Выход составлял около 90%.

3.3.6.2. ВЭЖХ-анализ реакционных смесей после модификации олигонуклеотида бифункциональным реагентом GMBS

Анализ реакционных смесей, полученных при модификации олигонуклеотидов, проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте на хроматографе Waters (США) с шагом элюции 0,5 или 1 нуклеотидное звено в минуту. Использовали колонку 4,6×250 мм с сорбентом Luna C-18(2) (размер частиц 5 мкм). Условия аналитического разделения: температура колонки – 45°C; элюент – 48 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,0), содержащий 2 мМ дигидрофосфат тетрабутиламмония, логарифмический градиент ацетонитрила 5-40%; расход элюента – 1 мл/мин.

3.3.6.3. Модификация эндонуклеазы рестрикции SsoII(2CS/S171C) полиэтиленгликолем, содержащим остаток малеимида (PEG-Mal).

К 10 мкл 10 мкМ раствора фермента в расчёте на мономер в буфере PBS добавляли 0,5 мкл 5 мМ раствора PEG-Mal в ДМСО и выдерживали 15 мин при комнатной температуре. Реакционную смесь анализировали методом гель-электрофореза по Лэммли.

3.3.6.4. Модификация эндонуклеазы рестрикции SsoII(2CS/S171C) олигонуклеотидами.

К 3 мкл 35,7 мкМ раствора R.SsoII(2CS/S171C) (в расчете на мономер) добавляли 7 мкл 90 мкМ раствора модифицированного GMBS олигонуклеотида, содержащего малеимидную группу, в буфере PBS, и выдерживали 1 ч при комнатной температуре. Выход полученного конъюгата оценивали методом гель-электрофореза по Лэммли.

3.3.7. Изучение активности эндонуклеазы рестрикции SsoII(2CS/S171C) в зависимости от облучения светом и изменения температуры реакции

3.3.7.1. Изучение активности R.SsoII(2CS/S171C) и ее конъюгатов в зависимости от облучения светом

Для перевода азобензольной группы в составе олигонуклеотидов в *цис*-конфигурацию проводили предоблучение модифицированного фермента УФ-светом ($\lambda=365$ нм) в течение 10 мин УФ-лампой (Vachofer, Германия). Далее в буфере Ж добавляли ДНК-субстрат **XIII** и продолжали облучение на протяжении всего времени инкубации с ферментом. Для перевода азобензольной группы в *транс*-конфигурацию облучение не проводили.

Концентрация субстрата **XIII** в реакционной смеси составляла 20 нМ, концентрация димерного фермента (модифицированного и немодифицированного) – 50 нМ, реакцию проводили в буфере Ж. Реакционные смеси анализировали в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной и определяли степени расщепления ДНК-субстрата ферментом, как описано в разделе 3.3.2.2.

3.3.7.2. Изучение активности R.SsoII(2CS/S171C) и ее конъюгатов в зависимости от температуры

Активность R.SsoII(2CS/S171C) и ее конъюгатов в зависимости от температуры реакции определяли в ходе реакции гидролиза радиоактивно меченного ДНК-субстрата **XIII**. Гидролиз проводили в течение 30 мин при температурах 20, 25, 30, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 75°C в 10 мкл буфера Ж. Концентрация субстрата **XIII** в реакционной смеси составляла 20 нМ, концентрация димерного фермента (модифицированного и немодифицированного) – 50 нМ. Анализ реакционных смесей проводили в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной и определяли степени расщепления ДНК-субстрата ферментом, как описано в разделе 3.3.2.2.

ВЫВОДЫ

1. Продемонстрировано влияние большой и малой субъединиц эндонуклеазы рестрикции *VspD6I* на функционирование друг друга. Показано, что начальная скорость гидролиза ДНК-субстрата большой субъединицей в присутствии малой субъединицы в 2 раза выше. Установлено, что катализ гидролиза двух цепей ДНК эндонуклеазой рестрикции *VspD6I* происходит, когда обе ее субъединицы находятся в составе одного фермент-субстратного комплекса, вместе с тем малая субъединица может расщеплять ДНК уже после того, как большая субъединица «разрезала» свою цепь.
2. Установлено, что большая субъединица эндонуклеазы рестрикции *VspD6I* (никующая эндонуклеаза) индуцирует изгиб ДНК при связывании с субстратом. Угол изгиба ДНК составляет $66 \pm 4^\circ$.
3. Впервые обнаружено влияние ненуклеозидной вставки, содержащей остаток азобензола и находящейся в различных положениях ДНК-лиганда, на функционирование эндонуклеазы рестрикции *VspD6I*. Каталитическая активность большой субъединицы при этом не является единственным необходимым фактором для проявления активности малой субъединицы. Большая субъединица сближена с участками гидролиза ДНК малой субъединицей, обеспечивая её локализацию на ДНК.
4. В качестве ингибиторов активности большой субъединицы эндонуклеазы рестрикции *VspD6I* при 25°C предложено использовать ДНК-лиганды с модифицированным межнуклеотидным узлом в месте гидролиза и одноцепочечными разрывами. Повышение температуры реакционной смеси до 45°C приводит к диссоциации дуплекс-ингибиторов, высвобождению фермента и восстановлению его активности.
5. Впервые показано, что самокомплементарные олигодезоксирибонуклеотиды, селективно присоединенные к димеру мутантной формы эндонуклеазы рестрикции *SsoII* в непосредственной близости от его ДНК-связывающего центра, блокируют гидролиз субстрата при 25°C . Продемонстрировано существенное увеличение эффективности гидролиза субстрата ДНК-белковым конъюгатом при повышении температуры. «Включение» и «выключение» активности конъюгата эндонуклеазы рестрикции *SsoII* с олигодезоксирибонуклеотидом в интервале от 25 до 45°C обратимо и может происходить в течение двух циклов нагревания-охлаждения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kornberg A., Baker T. DNA Replication. // New York : 2nd ed. W.H. Freeman and Co., 1992.
2. Landthaler M., Lau N.C., Shub D.A. Group I intron homing in Bacillus phages SPO1 and SP82: a gene conversion event initiated by a nicking homing endonuclease. // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186, P. 4307–4314.
3. Абдурашитов М.А., Беличенко О.А., Шевченко А.В., Дегтярев С.Х. N.BstSE – сайт-специфическая нуклеаза из *Bacillus stearothermophilus* SE-589. // *Молекуляр. биология.* 1996. Т. 30. С. 1261–1267.
4. Van Ness J., Van Ness L.K., Galas D.J. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. V. 100, P. 4504–4509.
5. Yang J., Zhang Z., Zhang X.A., Luo Q. A ligation-independent cloning method using nicking DNA endonuclease. // *Biotechniques.* 2010. V. 49, P. 817–821.
6. Wang H., Hays J.B. Simple and rapid preparation of gapped plasmid DNA for incorporation of oligomers containing specific DNA lesions. // *Mol. Biotechnol.* 2001. V. 19. P. 133–140.
7. Bath J., Green S.J., Turberfield A.J. A free-running DNA motor powered by a nicking enzyme. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005. V. 44. P. 4358–4361.
8. Gabsalilow L., Schierling B., Friedhoff P., Wende W., Pingoud A. Site- and strand-specific nicking of DNA by MutH-derived fusion proteins. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. P. e83.
9. Van Nierop G., de Vries A., Holkers M., Vrijzen K., Gonçalves M. Stimulation of homology-directed gene targeting at an endogenous human locus by a nicking endonuclease. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. P. 5725–5736.
10. Железная Л.А., Перевязова Т.А., Альжанова Д.В., Матвиенко Н.И. Сайт-специфическая нуклеаза из штамма *Bacillus species* D6. // *Биохимия.* 2001. Т. 66. С. 1215–1220.
11. Судьина А.Е. Эндонуклеазы рестрикции SsoII, PspGI и MboI: изучение свойств и определение ДНК-связывающих мотивов. // *Дисс. канд. хим. наук.* Москва. 2004. 149 с.
12. Kanaya S., Nakai C., Konishi A., Inoue H., Ohtsuka E., Ikehara M. A hybrid ribonuclease H. A novel RNA cleaving enzyme with sequencespecific recognition. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 8492–8498.

13. Eisenschmidt K., Lanio T., Simoncsits A., Jeltsch A., Pingoud V., Wende W., Pingoud A. Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage. // *Nucleic Acids Res.* 2005. V. 33. P. 7039–7047.
14. Pingoud A., Jeltsch A. Structure and function of type II restriction endonucleases. // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. P. 3705–3727.
15. Roberts R.J., Belfort M., Bestor T., Bhagwat A.S., Bickle T.A., Bitinaite J., Blumenthal R.M., Degtyarev S.Kh., Dryden D.T., Dybvig K., Firman K., Gromova E.S., Gumpert R.I., Halford S.E., Hattman S., Heitman J., Hornby D.P., Janulaitis A., Jeltsch A., Josephsen J., Kiss A., Klaenhammer T.R., Kobayashi I., Kong H., Krüger D.H., Lacks S., Marinus M.G., Miyahara M., Morgan R.D., Murray N.E., Nagaraja V., Piekarowicz A., Pingoud A., Raleigh E., Rao D.N., Reich N., Repin V.E., Selker E.U., Shaw P.C., Stein D.C., Stoddard B.L., Szybalski W., Trautner T.A., Van Etten J.L., Vitor J.M., Wilson G.G., Xu S.Y. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31, P. 1805–1812.
16. Pingoud A., Wilson G.G., Wende W. Type II restriction endonucleases—a historical perspective and more. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. P. 7489–7527.
17. Sugisaki H., Kita K., Takanami M. The FokI restriction-modification system. II. Presence of two domains in FokI methylase responsible for modification of different DNA strands. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 5757–5761.
18. Francia M.V., Clewell D.B., de la Cruz F., Moncalian G. Catalytic domain of plasmid pAD1 relaxase TraX defines a group of relaxases related to restriction endonucleases. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. V. 110. P. 13606–13611.
19. Chan S.H., Zhu Z., Van Etten J.L., Xu S.Y. Cloning of CviPII nicking and modification system from chlorella virus NYs-1 and application of Nt.CviPII in random DNA amplification. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. 6187–6199.
20. Chan S.H., Zhu Z., Dunigan D.D., Van Etten J.L., Xu S.Y. Cloning of Nt.CviQII nicking endonuclease and its cognate methyltransferase: M.CviQII methylates AG sequences. // *Protein Expr. Purif.* 2006. V. 49. P. 138–150.
21. Geider K., Meyer T.F., Baumel I., Reimann A. Proteins and nucleotide sequences involved in DNA replication of filamentous bacteriophage. // *Advan. Expt. Med. Biol.* 1984. V. 179. P. 45–54.

22. Landthaler M., Shub D.A. The nicking homing endonuclease I-BasI is encoded by a group I intron in the DNA polymerase gene of the *Bacillus thuringiensis* phage Bastille. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. 3071–3077.
23. Landthaler M., Shen B.W., Stoddard B.L., Shub D.A. I-BasI and I-HmuI: two phage intron-encoded endonucleases with homologous DNA recognition sequences but distinct DNA specificities. // *J. Mol. Biol.* 2006. V. 358. P. 1137–1151.
24. Chan S.-H., Stoddard B.L., Xu S. Natural and engineered nicking endonucleases – from cleavage mechanism to engineering of strand specificity. // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. P. 1–18.
25. Чернухин В.А., Сеггевисс Дж., Каширина Ю.Г., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. Рекомбинантная ДНК-метилтрансфераза M2.BstSEI из никазно-метиلاзной системы NM.BstSEI: получение и свойства. // *Молекуляр. биология.* 2009. Т. 43, С. 10–18.
26. Morgan R.D., Calvet C., Demeter M., Agra R., Kong H. Characterization of the specific DNA nicking activity of restriction endonuclease N.BstNBI. // *Biol. Chem.* 2000. V. 381. P. 1123–1125.
27. Дедков В.С., Абдурашитов М.А., Янковский Н.К., Килева Е.В., Мякишева Т.В., Попиченко Д.В., Дегтярев С.Х. Новая сайт-специфическая ДНК-никаза N.Bst9I *Bacillus stearothermophilus* 9. // *Биотехнология.* 2001. V. 4. P. 3–8.
28. Higgins L.S., Besnier C., Kong H. The nicking endonuclease N.BstNBI is closely related to type IIS restriction endonucleases MlyI and PleI. // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. P. 2492–2501.
29. Besnier C.E., Kong H. Converting MlyI endonuclease into a nicking enzyme by changing its oligomerization state. // *EMBO J.* 2001. V. 21. P. 782–786.
30. Xu Y., Lunnen K.D., Kong H. Engineering a nicking endonuclease N.AlwI by domain swapping. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001. V. 98. P. 12990–12995.
31. Skowron P., Kaczorowski T., Tucholski J., Podhajska A.J. Atypical DNA-binding properties of class-IIS restriction endonucleases: evidence for recognition of the cognate sequence by a FokI monomer. // *Gene.* 1993. V. 125. P. 1–10.
32. Halford S.E., Catto L.E., Pernstich C., Rusling D.A., Sanders K.L. The reaction mechanism of FokI excludes the possibility of targeting zinc finger nucleases to unique DNA sites. // *Biochem. Soc. Trans.* 2011. V. 39. P. 584–588.

33. Bitinaite J., Wah D.A., Aggarwal A.K., Schildkraut I. FokI dimerization is required for DNA cleavage. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998. V. 95. P. 10570–10575.
34. Sanders K.L., Catto L.E., Bellamy S.R., Halford S.E. Targeting individual subunits of the FokI restriction endonuclease to specific DNA strands. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. P. 2105–2115.
35. Xu S.Y., Zhu Z., Zhang P., Chan S.H., Samuelson J.C., Xiao J., Ingalls D., Wilson G.G. Discovery of natural nicking endonucleases Nb.BsrDI and Nb.BtsI and engineering of top-strand nicking variants from BsrDI and BtsI. // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. 4608–4618.
36. Stankevicius K., Lubys A., Timinskas A., Vaitkevicius D., Janulaitis A. Cloning and analysis of the four genes coding for Bpu10I restriction-modification enzymes. // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. P. 1084–1091.
37. Janulaitis A., Stankevicius K., Lubys A., Markauskas A. EP 1176204 A Nuclease. // European Patent Office. 2002.
38. Heiter D.F., Lunnen K.D., Wilson G.G. Site-specific DNA-nicking mutant of the heterodimeric restriction endonuclease R.BbvCI. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 348. P. 631–640.
39. Bellamy S.R.W., Milsom S.E., Scott D.J., Daniels L.E., Wilson G.G., Halford S.E. Cleavage of individual DNA strands by the different subunits of the heterodimeric restriction endonuclease BbvCI. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 348. P. 641–653.
40. Armalyte E., Bujnicki J.M., Giedriene J., Gasiunas G., Kosiński J., Lubys A. Mva1269I: a monomeric type IIS restriction endonuclease from *Micrococcus varians* with two EcoRI- and FokI-like catalytic domains. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 41584–41594.
41. Too P.H., Zhu Z., Chan S.H., Xu S.Y. Engineering Nt.BtsCI and Nb.BtsCI nicking enzymes and applications in generating long overhangs. // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38. P. 1294–1303.
42. Kostiuk G., Sasnauskas G., Tamulaitiene G., Siksnys V. Degenerate sequence recognition by the monomeric restriction enzyme: single mutation converts BcnI into a strand-specific nicking endonuclease. // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. P. 3744–3753.
43. Zhang P., Too P.H., Samuelson J.C., Chan S.H., Vincze T., Doucette S., Bäckström S., Potamouis K.D., Schramm T.M., Forrest D., Schwartz D.C., Xu S.Y. Engineering BspQI nicking enzymes and application of N.BspQI in DNA labeling and production of single-strand DNA. // *Protein Expr. Purif.* 2010. V. 69. P. 226–234.

44. Zhu Z., Samuelson J.C., Zhou J., Dore A., Xu S. Engineering strand-specific DNA nicking enzymes from the type IIS restriction endonucleases BsaI, BsmBI, and BsmAI. // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 337. P. 573–583.
45. Samuelson J.C., Zhu Z., Xu S.Y. The isolation of strand-specific nicking endonucleases from a randomized SapI expression library. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. 3661–3671.
46. Belfort M., Roberts R.J. Homing endonucleases: keeping the house in order. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 3379–3388.
47. Podevin N., Davies H., Hartung F., Nogue' F., Casacuberta J. Site-directed nucleases: a paradigm shift in predictable, knowledge-based plant breeding. // *Trends Biotechnol.* 2013. V. 31. P. 375–383.
48. Niu Y., Tenney K., Li H., Gimble F.S. Engineering variants of the I-SceI homing endonuclease with strand-specific and site-specific DNA-nicking activity. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 382. P. 188–202.
49. McConnell Smith A., Takeuchi R., Pellenz S., Davis L., Maizels N., Monnat R.J.Jr., Stoddard B.L. Generation of a nicking enzyme that stimulates site-specific gene conversion from the I-AniI LAGLIDADG homing endonuclease. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. V. 106. P. 5099–5104.
50. Antipova V.N., Zheleznaya L.A., Zyrina N.V. Ab initio DNA synthesis by Bst polymerase in the presence of nicking endonucleases Nt.AlwI, Nb.BbvCI, and Nb.BsmI. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2014. V. 357. P. 144–150.
51. Liang X., Jensen K., Frank-Kamenetskii M.D. Very efficient template/primer-independent DNA synthesis by thermophilic DNA polymerase in the presence of a thermophilic restriction endonuclease. // *Biochemistry.* 2004. V. 43. P. 13459–13466.
52. Zyrina N.V., Zheleznaya L.A., Dvoretzky E.V., Vasiliev V.D., Chernov A., Matvienko N.I. N.BspD6I DNA nickase strongly stimulates template-independent synthesis of non-palindromic repetitive DNA by Bst DNA polymerase. // *Biol. Chem.* 2007. V. 388. P. 367–372.
53. Zyrina N.V., Artiukh R.I., Svad'bina I.V., Zheleznaia L.A., Matvienko N.I. Effect of single-stranded DNA binding proteins on template/primer-independent DNA synthesis in the presence of nicking endonuclease Nt.BspD6I. // *Bioorg. Khim.* 2012. V. 38. P. 199–205.
54. Hanaki K., Odawara T., Nakajima N., Shimizu Y.K., Nozaki C., Mizuno K., Muramatsu T., Kuchino Y., Yoshikura H. Two different reactions involved in the primer/template-independent

- polymerization of dATP and dTTP by Taq DNA polymerase. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 244. P. 210–219.
55. Ogata N., Miura T. Creation of genetic information by DNA polymerase of the thermophilic bacterium *Thermus thermophiles*. // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. P. 4657–4661.
56. Luzziotti N., Knappe S., Richter I., Seidel R. Nicking enzyme-based internal labeling of DNA at multiple loci. // *Nat. Protoc.* 2012. V. 7. P. 643–653.
57. Hosoda K., Matsuura T., Kita H., Ichihashi N., Tsukada K., Urabe I., Yomo T. A novel sequence-specific RNA quantification method using nicking endonuclease, dual-labeled fluorescent DNA probe, and conformation-interchangeable oligo-DNA. // *RNA.* 2008. V. 14. P. 584–592.
58. He Y., Jiang T. Nickase-dependent isothermal DNA amplification. // *Adv. Biosci. Biotechnol.* 2013. V. 4. P. 539–542.
59. Железная Л.А., Перевязова Т.А., Железнякова Е.Н., Матвиенко Н.И. Некоторые свойства сайт-специфической нуклеазы BspD61 и возможность ее применения в гибридном анализе ДНК. // *Биохимия.* 2002. Т. 67. С. 498–502.
60. Lee L.G., Connell C.R., Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. // *Nucleic Acids Res.* 1993. V. 21. P. 3761–3766.
61. Sassolas A., Leca-Bouvier B.D., Blum L.J. DNA biosensors and microarrays. // *Chem. Rev.* 2008. V. 108. P. 109–139.
62. Pavlov V., Xiao Y., Gill R., Dishon A., Kotler M., Willner I. Amplified chemiluminescence surface detection of DNA and telomerase activity using catalytic nucleic acid labels. // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. P. 2152–2156.
63. Su X.D., Robelek R., Wu Y.J., Wang G.Y., Knoll W. Detection of point mutation and insertion mutations in DNA using a quartz crystal microbalance and MutS, a mismatch binding protein. // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. P. 489–494.
64. Lei J.P., Ju H.X. Signal amplification using functional nanomaterials for biosensing. // *Chem. Soc. Rev.* 2012. V. 41. P. 2122–2134.
65. Paleček E., Bartoščík M. Electrochemistry of nucleic acids. // *Chem. Rev.* 2012. V. 112. P. 3427–3481.

66. Chen Y., Wang Q., Xu J., Xiang Y., Yuan R., Chai Y. A new hybrid signal amplification strategy for ultrasensitive electrochemical detection of DNA based on enzyme-assisted target recycling and DNA supersandwich assemblies. // *Chem. Commun.* 2013. V. 49. P. 2052–2054.
67. Tachibana A., Tohiguchi K., Ueno T., Setogawa Y., Harada A., Tanabe T. Preparation of long sticky ends for universal ligation-independent cloning: sequential T4 DNA polymerase treatments. // *J. Biosci. Bioeng.* 2009. V. 107. P. 668–669.
68. Walhout A.J., Temple G.F., Brasch M.A., Hartley J.L., Lorson M.A., van den Heuvel S., Vidal M. GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. // *Methods Enzymol.* 2000. V. 328. P. 575–592.
69. Zhu B., Cai G., Hall E.O., Freeman G.J. In-fusion assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations. // *Biotechniques.* 2007. V. 43. P. 354–359.
70. Hilario E. End labeling procedures: an overview. // *Mol. Biotechnol.* 2004. V. 28. P. 77–80.
71. Sandor Z., Calicchio M.L., Sargent R.G., Roth D.B., Wilson J.H. Distinct requirements for Ku in N nucleotide addition at V(D)J- and non-V(D)J-generated double-strand breaks. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. 1866–1873.
72. Zohar H., Muller S.J. Labeling DNA for single-molecule experiments: methods of labeling internal specific sequences on double-stranded DNA. // *Nanoscale.* 2011. V. 3. P. 3027–3039.
73. Pfannschmidt C., Langowski J. Superhelix organization by DNA curvature as measured through site-specific labeling. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 275. P. 601–611.
74. Перевозчикова С.А. Характеристика начальных этапов функционирования системы репарации ДНК-«мисматчей» *Escherichia coli* с использованием модифицированных ДНК. // *Дисс. канд. хим. наук.* Москва. 2013. 171 с.
75. Neely R.K., Deen J., Hofkens J. Optical mapping of DNA: single-molecule-based methods for mapping genomes. // *Biopolymers.* 2011. V. 95. P. 298–311.
76. Xiao M., Phong A., Ha C., Chan T.F., Cai D., Leung L., Wan E., Kistler A.L., DeRisi J.L., Selvin P.R., Kwok P.Y. Rapid DNA mapping by fluorescent single molecule detection. // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. e16.
77. Single molecule linear analysis of DNA in nano-channel labeled with sequence specific fluorescent probes. Das S.K., Austin M.D., Akana M.C., Deshpande P., Cao H., Xiao M. // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38. P. e177.

78. Persson F., Tegenfeldt J.O. DNA in nanochannels – directly visualizing genomic information. // *Chem. Soc. Rev.* 2010. V. 39. P. 985–999.
79. Warnecke P.M., Bestor T.H. Cytosine methylation and human cancer. // *Curr. Opin. Oncol.* 2000. V. 12. P. 68–73.
80. Jones P.A., Baylin S.B. The epigenomics of cancer. // *Cell.* 2007. V. 128. P. 683–692.
81. Gutjahr A., Xu S. Engineering nicking enzymes that preferentially nick 5-methylcytosine-modified DNA. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. P. e77.
82. Wang G., Xu X.S. Peptide nucleic acid (PNA) binding-mediated gene regulation. // *Cell Research.* 2004. V. 14. P. 111–116.
83. Kutuyavin I.V., Rhinehart R.L., Lukhtanov E.A., Gorn V.V., Meyer R.B., Gamper H.B. Oligonucleotides containing 2-aminoadenine and 2-thiothymine act as selectively binding complementary agents. // *Biochemistry.* 1996. V. 35. P. 11170–11176.
84. Hoshika S., Chen F., Leal N.A., Benner S.A. Artificial genetic systems: self-avoiding DNA in PCR and multiplexed PCR. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2010. V. 49. P. 5554–5557.
85. Ackermann D., Famulok M. Pseudo-complementary PNA actuators as reversible switches in dynamic DNA nanotechnology. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. P. 4729–4739.
86. Smolina I., Demidov V. Sequence-universal recognition of duplex DNA by oligonucleotides via pseudocomplementarity and helix invasion. // *Chem. Biol.* 2003. V. 10. P. 591–595.
87. Demidov V., Protozanova E., Izvolsky K., Price C., Nielsen P., Frank-Kamenetskii M. Kinetics and mechanism of the DNA double helix invasion by pseudocomplementary peptide nucleic acids. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. V. 99. P. 5953–5958.
88. Lohse J., Dahl O., Nielsen P.E. Double duplex invasion by peptide nucleic acid: a general principle for sequence-specific targeting of double-stranded DNA. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999. V. 96. P. 11804–11808.
89. Izvolsky K.I., Demidov V.V., Nielsen P.E., Frank-Kamenetskii M.D. Sequence-specific protection of duplex DNA against restriction and methylation enzymes by pseudocomplementary PNAs. // *Biochemistry.* 2000. V. 39. P. 10908–10913.
90. Protozanova E., Demidov V.V., Nielsen P.E., Frank-Kamenetskii M.D. Pseudocomplementary PNAs as selective modifiers of protein activity on duplex DNA: the case of type II restriction enzymes. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. 3929–3935.

91. Fonfara I., Curth U., Pingoud A., Wende W. Creating highly specific nucleases by fusion of active restriction endonucleases and catalytically inactive homing endonucleases. // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. P. 847–860.
92. Pingoud A., Wende W. Generation of novel nucleases with extended specificity by rational and combinatorial strategies. // *ChemBioChem.* 2011. V. 12. P. 1495–1500.
93. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. // *Science.* 2012. V. 337. P. 816–821.
94. Pâques F., Duchateau P. Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. // *Curr. Gene Ther.* 2007. V. 7. P. 49–66.
95. Stoddard B. Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. // *Structure.* 2011. V. 19. P. 7–15.
96. Arnould S., Delenda C., Grizot S., Desseaux C. Pâques F., Silva G.H., Smith J. The I-CreI meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2011. V. 24. P. 27–31.
97. Durrenberger F., Rochaix J. Characterization of the cleavage site and the recognition sequence of the I-CreI DNA endonuclease encoded by the chloroplast ribosomal intron *Chlamydomonas reinhardtii*. // *Molecular and General Genetics.* 1993. V. 236. P. 409–414.
98. Redondo P., Prieto J., Muñoz I., Alibés A., Stricher F., Serrano L., Cabaniols J., Daboussi F., Arnould S., Perez C., Duchateau P., Pâques F., Blanco F., Montoya G. Molecular basis of xeroderma pigmentosum group C DNA recognition by engineered meganucleases. // *Nature.* 2008. V. 456. P. 107–111.
99. Seligman L.M., Chisholm K.M., Chevalier B.S., Chadsey M.S., Edwards S.T., Savage J.H., Veillet A.L. Mutations altering the cleavage specificity of a homing endonuclease. // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. P. 3870–3879.
100. Sussman D., Chadsey M., Fauce S., Engel A., Bruett A., Monnat Jr. R., Stoddard B.L., Seligman L.M. Isolation and characterization of new homing endonuclease specificities at individual target site positions. // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 342. P. 31–41.
101. Arnould S., Chames P., Perez C., Lacroix E., Duclert A., Epinat J., Stricher F., Petit A., Patin A., Guillier S., Rolland S., Prieto J., Blanco F., Bravo J., Montoya G., Serrano L., Duchateau P., Pâques F. Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets. // *J. Mol. Biol.* 2006. V. 355. P. 443–458.

102. Chevalier B., Stoddard B. Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. P. 3757–3774.
103. Perkel J. The new genetic engineering toolbox. // *Biotechniques.* 2013. V. 54. P. 185–188.
104. Perez-Pinera P., Ousterout D.G., Gersbach C.A. Advances in targeted genome editing. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2012. V. 16. P. 268–277.
105. Doyon Y., Vo T.D., Mendel M.C., Greenberg S.G., Wang J., Xia D.F., Miller J.C., Urnov F.D., Gregory P.D., Holmes M.C. Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. // *Nat. Methods.* 2011. V. 8. P. 74–79.
106. Urnov F.D., Rebar E.J., Holmes M.C., Zhang H.S., Gregory P.D. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. // *Nat. Rev. Genet.* 2010. V. 11. P. 636–646.
107. Ramirez C.L., Certo M.T., Mussolino C., Goodwin M.J., Cradick T.J., McCaffrey A.P., Cathomen T., Scharenberg A.M., Joung J.K. Engineered zinc finger nickases induce homology-directed repair with reduced mutagenic effects. // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. P. 5560–5568.
108. Wang J., Friedman G., Doyon Y., Wang N.S., Li C.J., Miller J.C., Hua K.L., Yan J.J., Babiarz J.E., Gregory P.D., Holmes M.C. Targeted gene addition to a predetermined site in the human genome using a ZFN-based nicking enzyme. // *Genome Res.* 2012. V. 22. P. 1316–1326.
109. Christian M., Cermak T., Doyle E.L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., Voytas D.F. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. // *Genetics.* 2010. V. 186. P. 757–761.
110. Scholze H., Boch J. TAL effector-DNA specificity. // *J. Virulence.* 2010. V. 1. P. 428–432.
111. Murakami M.T., Sforça M.L., Neves J.L., Paiva J.H., Domingues M.N., Pereira A.L., Zeri A.C., Benedetti C.E. The repeat domain of the type III effector protein PthA shows a TPR-like structure and undergoes conformational changes upon DNA interaction. // *Proteins.* 2010. V. 78. P. 3386–3395.
112. Mak A.N., Bradley P., Cernadas R.A., Bogdanove A.J., Stoddard B.L. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. // *Science.* 2012. V. 335. P. 716–719.
113. Wefers B., Meyer M., Ortiz O., Angelis M.H., Hansen J., Wurst W., Kühn R. Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. V. 110. P. 3782–3787.

114. Metzger M.J., McConnell-Smith A., Stoddard B.L., Miller A.D. Single-strand nicks induce homologous recombination with less toxicity than double-strand breaks using an AAV vector template. // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. P. 926–935.
115. Davis L., Maizels N. DNA nicks promote efficient and safe targeted gene correction. // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e23981.
116. Strobel S., Dervan P. Site-specific cleavage of a yeast chromosome by oligonucleotide-directed triple-helix formation. // *Science.* 1990. V. 249. P. 73–75.
117. Pei D., Corey D., Schultz P. Site-specific cleavage of duplex DNA by a semisynthetic nuclease via triple-helix formation. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990. V. 87. P. 9858–9862.
118. Moser H., Dervan P. Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation. // *Science.* 1987. V. 238. P. 645–650.
119. Duca M., Vekhoff P., Oussedik K., Halby L., Arimondo P.B. The triple helix: 50 years later, the outcome. // *Nucleic Acids Res.* 2008. V. 36. P. 5123–5138.
120. Horvath P., Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. // *Science.* 2010. V. 327. P. 167–170.
121. Sorek R., Kunin V., Hugenholtz P. CRISPR – a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2008. V. 6. P. 181–186.
122. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. // *Science.* 2013. V. 339. P. 819–823.
123. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. // *Science.* 2013. V. 339. P. 823–826.
124. Wu Y., Liang D., Wang Y., Bai M., Tang W., Bao S., Yan Z., Li D., Li J. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. // *Cell Stem Cell.* 2013. V. 13. P. 659–662.
125. Long C., McAnally J.R., Shelton J.M., Mireault A.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. // *Science.* 2014. V. 345. P. 1184–1188.
126. Liang P., Xu Y., Zhang X., Ding C., Huang R., Zhang Z., Lv J., Xie X., Chen Y., Li Y., Sun Y., Bai Y., Songyang Z., Ma W., Zhou C., Huang J. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygotes. // *Protein Cell.* 2015. V. 6. P. 363–372.
127. Cyranoski D. Ethics of embryo editing divides scientists. // *Nature.* 2015. V. 519, P. 272.

128. Lanphier E, Urnov F, Haecker SE, Werner M, Smolenski J. Don't edit the human germ line. // *Nature*. 2015. V. 519. P. 410–411.
129. Savić N., Schwank G. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. // *Transl. Res.* 2016. V. 168. P. 15–21.
130. Xu S., Cao S., Zou B., Yue Y., Gu C., Chen X., Wang P., Dong X., Xiang Z., Li K., Zhu M., Zhao Q., Zhou G. An alternative novel tool for DNA editing without target sequence limitation: the structure-guided nuclease. // *Genome Biol.* 2016. V. 17. P. 186.
131. Kao H.I., Henricksen L.A., Liu Y., Bambara R.A. Cleavage specificity of *Saccharomyces cerevisiae* flap endonuclease 1 suggests a double-flap structure as the cellular substrate. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 14379–14389.
132. Gao F., Shen X.Z., Jiang F., Wu Y., Han C. DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute. // *Nat. Biotechnol.* 2016. V. 34. P. 768–773.
133. Silanskas A., Zaremba M., Sasnauskas G., Siksnyš V. Catalytic activity control of restriction endonuclease-triplex forming oligonucleotide conjugates. // *Bioconjug. Chem.* 2012. V. 23. P. 203–211.
134. Silanskas A., Foss M., Wende W., Urbanke C., Lagunavicius A., Pingoud A., Siksnyš V. Photocaged variants of the *MunI* and *PvuII* restriction enzymes. // *Biochemistry*. 2011. V. 50. P. 2800–2807.
135. Lednev I.K., Ye T.Q., Matousek P., Towrie M., Foggi P., Neuwahl F.V.R., Umopathy S., Hester R.E., Moore J.N. Femtosecond time-resolved UV-visible absorption spectroscopy of trans-azobenzene: dependence on excitation wavelength. // *Chem. Phys. Lett.* 1998. V. 290. P. 68–74.
136. Fujino T., Arzhantsev Y.S., Tahara T. Femtosecond time-resolved fluorescence study of photoisomerization of trans-azobenzene. // *J. Phys. Chem. A*. 2001. V. 105. P. 8123–8129.
137. Nägele R., Hoche R., Zinth W., Wachtveitl J. Femtosecond photoisomerization of cis-azobenzene. // *Chem. Phys. Lett.* 1997. V. 272. P. 489–495.
138. Volgraf M., Gorostiza P., Numano R., Kramer R., Isacoff E., Trauner D. Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. // *Nat. Chem. Biol.* 2006. V. 2. P. 47–52.
139. Woolley G.A., Jaikaran A.S., Berezovski M., Calarco J.P., Krylov S.N., Smart O.S., Kumita J.R. Reversible photocontrol of DNA binding by a designed GCN4-bZIP protein. // *Biochemistry*. 2006. V. 45. P. 6075–6084.

140. Nakayama K., Endo M., Majima T. Photochemical regulation of the activity of an endonuclease BamHI using an azobenzene moiety incorporated site-selectively into the dimer interface. // *Chem. Commun. (Camb)*. 2004. V. 21. P. 2386–2397.
141. Schierling B., Noël A.J., Wende W., Hien le T., Volkov E., Kubareva E., Oretskaya T., Kokkinidis M., Römpf A., Spengler B., Pingoud A. Controlling the enzymatic activity of a restriction enzyme by light. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010. V. 107. P. 1361–1366.
142. Hien le T., Zatsopin T.S., Schierling B., Volkov E.M., Wende W., Pingoud A., Kubareva E.A., Oretskaya T.S. Restriction endonuclease SsoII with photoregulated activity—a "molecular gate" approach. // *Bioconjug. Chem.* 2011. V. 22. P. 1366–1373.
143. Horton J.R., Nastri H.G., Riggs P.D., Cheng X. Asp34 of PvuII endonuclease is directly involved in DNA minor groove recognition and indirectly involved in catalysis. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 284. P. 1491–1504.
144. Newman M., Strzelecka T., Dorner L.F., Schildkraut I., Aggarwal A.K. Structure of restriction endonuclease BamHI and its relationship to EcoRI. // *Nature*. 1994. V. 368. P. 660–664.
145. Юнусова А.К., Рогулин Е.А., Артюх Р.И., Железная Л.А., Матвиенко Н.И. Белок, кодируемый открытой рамкой считывания, расположенной рядом с геном никазы BspD6I, в комплексе с никазой образует эндонуклеазу рестрикции. // *Биохимия*. 2006. V. 71. P. 1002–1005.
146. Железная Л.А., Качалова Г.С., Артюх Р.И., Юнусова А.К., Перевязова Т.А., Матвиенко Н.И. Никующие эндонуклеазы. // *Успехи биологической химии*. 2009. Т. 49. С. 107–128.
147. Kachalova G.S., Rogulin E.A., Yunusova A.K., Artyukh R.I., Perevyazova T.A., Matvienko N.I., Zheleznaya L.A., Bartunik H.D. Structural analysis of the heterodimeric type IIS restriction endonuclease R.BspD6I acting as a complex between a monomeric site-specific nickase and a catalytic subunit. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 384. P. 489–502.
148. Упорова Т.М., Карташова И.М., Скрипкин Е.А., Лопарева Е., Никольская И.И. Эндонуклеазы рестрикции из *Shigella sonnei* 47. // *Вопросы медицинской химии*. 1985. Т. 31. С. 131–136.
149. Bochtler M., Szczepanowski R. H., Tamulaitis G., Grazulis S., Czapinska H., Manakova E., Siksnys V. Nucleotide flips determine the specificity of the Ecl18kI restriction endonuclease. // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 2219–2229.

150. Garcia R., Bustamante C.J., Reich N.O. Sequence-specific recognition by cytosine C5 and adenine N6 DNA methyltransferases requires different deformations of DNA. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. V. 93. P. 7618–7622.
151. Ferrari S., Harley V.R., Pontiggia A., Goodfellow P.N., Lovell-Badge R., Bianchi M.E. SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. // *The EMBO Journal.* 1992. V. 1. P. 4497–4506.
152. Crothers M., Woo H-M. The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. // *Nature.* 1984. V. 308. P. 509–513.
153. Kim J., Zwieb C., Wu C., Adhya S. Bending of DNA by gene-regulatory proteins: construction and use of a DNA bending vector. // *Gene.* 1989. V. 85. P. 15–23.
154. Секерина С.А., Гришин А.В., Рязанова А.Ю., Артюх Р.И., Рогулин Е.А., Юнусова А.К., Орецкая Т.С., Железная Л.А., Кубарева Е.А. Олигомеризация сайт-специфической нуклеазы BspD6I при повышенных концентрациях белка. // *Биоорг. химия.* 2012. Т. 38. С. 431–438.
155. Мачулин А.В., Дерюшева Е.И., Юнусова А.К., Железная Л.А., Сердюк И.Н. Исследование сайт-специфического связывания ДНК с нуклеазой Nt.BspD6I на уровне одиночных молекул методом атомно-силовой микроскопии. // *Биофизика.* 2012. Т. 57. С. 432–436.
156. Pingoud A., Fureiter M., Pingoud V., Wende W. Type II restriction nucleases: structure and mechanism. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2005. V. 62. P. 685–707.
157. Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1949. V. 51. P. 660–672.
158. Fuchs H., Gessner R. The result of equilibrium-constant calculations strongly depends on the evaluation method used and on the type of experimental errors. // *Biochem. J.* 2001. V. 359. P. 411–418.
159. Goodrich J.A., Kugel J.F. Binding and kinetics for molecular biologists. // *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* 2007.
160. Heffler M.A., Walters R.D., Kugel J.F. Using electrophoretic mobility shift assays to measure equilibrium dissociation constants: GAL4-p53 binding DNA as a model system. // *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2012. V. 40. P. 383–387.

161. Weder H.G., Schildknecht J., Lutz R.A., Kesselring P. Determination of binding parameters from Scatchard plots. Theoretical and practical considerations. // *Eur. J. Biochem.* 1974. V. 42. P. 475–481.
162. Селеменев В.Ф., Калач А.В. Теоретические основы определения органических соединений в воздухе с применением пьезорезонансных сенсоров. // *Конденсир. среды и межфаз. границы.* 2005. Т. 4. С. 401–405.
163. Рязанова А.Ю. Структурно-функциональная характеристика C5-цитозиновой ДНК-МТазы SsoII и её комплексов с ДНК-лигандами. // *Дисс. канд. хим. наук.* Москва. 2012. 193 с.
164. Sauerbrey G. The use of oscillator for weighing thin layers and for microweighing. // *Z. Phys.* 1959. V. 155. P. 206–210.
165. Johnson I., Spence M.T.Z. Molecular probes handbook, a guide to fluorescent probes and labeling technologies. // *11th ed. Life Technologies.* 2010.
166. Tassew N., Thompson M. Kinetic characterization of TAR RNA-Tat peptide and neomycin interactions by acoustic wave biosensor. // *Biophys. Chem.* 2003. V. 106. P. 241–252.
167. Lucklum R., Doerner S., Schneider T., Schlatt-Masuth B., Jacobs T., Hauptmann P. Real-time kinetic analysis with quartz crystal resonator sensors. // *IEEE Int. Freq. Contr. Symp. Proceedings.* 2006. P. 528–534.
168. Ryazanova A.Y., Kubareva E.A., Grman I., Lavrova N.V., Ryazanova E.M., Oretskaya T.S., Hianik T. The study of the interaction of (cytosine-5)-DNA methyltransferase SsoII with DNA by acoustic method. // *Analyst.* 2011. V. 136. P. 1227–1233.
169. Ballantine D.S., White R.M., Martin S.J., Ricco A.J., Frye G.C., Zellars E.T., Wohltjen H. Acoustic wave sensors. Theory, design, and physico-chemical applications. // *San Diego: Academic Press Inc.* 1997.
170. Skladal P. Piezoelectric quartz crystal sensors applied for bioanalytical assays and characterization of affinity interactions. // *J. Braz. Chem. Soc.* 2003. V. 14. P. 491–502.
171. Zhou H.X. A model for the mediation of processivity of DNA-targeting proteins by nonspecific binding: dependence on DNA length and presence of obstacles. // *Biophys. J.* 2005. V. 88. P. 1608–1615.
172. Гололобова Н.С., Охупкина С.С., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Первичная структура оперона NM.BstSEI из *Bacillus stearotherophilus* SE-589, продуцента сайт-специфической нуклеазы N.BstSEI. // *Молекуляр. биология.* 2005. Т. 39. С. 960–964.

173. Petrauskene O.V., Gromova E.S., Romanova E.A., Volkov E.M., Oretskaya T.S., Shabarova Z.A. DNA duplexes containing methylated bases or non-nucleotide inserts in the recognition site are cleaved by restriction endonuclease R.EcoRII in presence of canonical substrate. // *Gene*. 1995. V. 157. P. 173–176.
174. Cai H., Bloom L.B., Eritja R., Goodman M.F. Kinetics of deoxyribonucleotide insertion and extension at abasic template lesions in different sequence contexts using HIV-1 reverse transcriptase. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 23567–23572.
175. Wilk A., Koziolkiewicz M., Grajkowski A., Uznanski B., Stec W.J. Backbone-modified oligonucleotides containing a butanediol-1,3 moiety as a 'vicarious segment' for the deoxyribosyl moiety – synthesis and enzyme studies. // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 2065–2068.
176. Лукьянчикова Н.В., Петрусева И.О., Евдокимов А.Н., Сильников В.Н., Лаврик О.И. ДНК, содержащие эффективно процессируемое системой эксцизионной репарации нуклеотидов фотоактивное повреждение, и их взаимодействие с белками репарации. // *Биохимия*. 2016. Т. 81. С. 263–274.
177. Yang H.L., Jiang H.J., Fang W.Y., Xu Y.Y., Liao D.F., He F.C. High fidelity PCR with an off/on switch mediated by proofreading polymerases combining with phosphorothioate-modified primer. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 328. P. 265–272.
178. Hu Y.J., Li Z.F., Diamond A.M. Enhanced discrimination of single nucleotide polymorphism in genotyping by phosphorothioate proofreading allele-specific amplification. // *Anal. Biochem.* 2007. V. 369. P. 54–59.
179. Asanuma H., Matsunaga D., Liu M., Liang X., Zhao J., Komiyama M. Photo-regulation of DNA function by azobenzene-tethered oligonucleotides. // *Nucleic Acids Res. Suppl.* 2003. V. 3. P. 117–118.
180. Liang X., Asanuma H., Kashida H., Takasu A., Sakamoto T., Kawai G., Komiyama M. NMR study on the photoresponsive DNA tethering an azobenzene. Assignment of the absolute configuration of two diastereomers and structure determination of their duplexes in the transform. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. P. 16408–16415.
181. Kashida H., Liang X., Asanuma H. Rational design of functional DNA with a non-ribose acyclic scaffold. // *Current Organic Chemistry*. 2009. V. 13. P. 1065–1084.
182. Кузнецова С.А. Синтез и свойства новых аналогов ДНК, содержащих неприродные межнуклеотидные вставки, реакционноспособные группировки и пептиды. // *Дисс. докт. хим. наук*. Москва. 2000. 279 с.

183. Asanuma H., Takarada T., Yoshida T., Tamaru D., Liang X., Komiyama M. Enantioselective incorporation of azobenzenes into oligodeoxyribonucleotide for effective photoregulation of duplex formation. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001. V. 40. P. 2671–2673.
184. Asanuma H., Matsunaga D., Komiyama M. Clear-cut photo-regulation of the formation and dissociation of the DNA duplex by modified oligonucleotide involving multiple azobenzenes. // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf)*. 2005. V. 49. P. 35–36.
185. Pyshnaya I.A., Pyshnyi D.V., Lomzov A.A., Zarytova V.F., Ivanova E.M. The influence of the non-nucleotide insert on the hybridization properties of oligonucleotides. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2004. V. 23. P. 1065–1071.
186. Пышный Д.В. Молекулярные инструменты на основе составных олигонуклеотидных конструкций. // *Дисс. докт. хим. наук*. Москва. 2011. 443 с.
187. Виноградова О.А., Еремеева Е.В., Ломзов А.А., Пышная И.А., Пышный Д.В. Изогнутые дцДНК с заданными геометрическими характеристиками на основе комплексов мостиковых олигонуклеотидов. // *Биоорг. химия*. 2009. Т. 35. С. 384–396.
188. Dunn J.J., Studier F.W. Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. // *J. Mol. Biol.* 1983. V. 166. P. 477–535.
189. Joneja A., Huang X. Linear nicking endonuclease-mediated strand-displacement DNA amplification. // *Anal. Biochem.* 2011. V. 414. P. 58–69.
190. Asanuma H., Liang X., Nishioka H., Matsunaga D., Liu M., Komiyama M. Synthesis of azobenzene-tethered DNA for reversible photo-regulation of DNA functions: hybridization and transcription. // *Nature Protocols*. 2007. V. 2. P. 203–212.
191. Ле Тхи Хиен. Конструирование эндонуклеаз рестрикции с фоторегулируемой активностью. // *Дисс. канд. хим. наук*. Москва. 2010. 152 с.
192. Pingoud V., Geyer H., Geyer R., Kubareva E., Bujnicki J.M., Pingoud A. Identification of base-specific contacts in protein-DNA complexes by photocrosslinking and mass spectrometry: a case study using the restriction endonuclease SsoII. // *Mol. Biosyst.* 2005. V. 1. P. 135–141.
193. Pingoud V., Sudina A., Geyer H., Bujnicki J.M., Lurz R., Lüder G., Morgan R., Kubareva E., Pingoud A. Specificity changes in the evolution of type II restriction endonucleases: a biochemical and bioinformatic analysis of restriction enzymes that recognize unrelated sequences. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 4289–4298.
194. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.

195. Merino E., Ribagorda M. Control over molecular motion using the cis-trans photoisomerization of the azo group. // *Beilstein J. Org. Chem.* 2012. V. 8. P. 1071–1090.
196. Hald M., Pederson J.B., Stein P.S., Kirpekar F., Jacobsen J.P. A comparison of the hairpin stability of the palindromic d(CGCG(A/T)4CGCG) oligonucleotides. // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 23. P. 4576–4582.
197. You M., Wang R.W., Zhang X., Chen Y., Wang K., Peng L., Tan W. Photon-regulated DNA-enzymatic nanostructures by molecular assembly. // *ACS Nano.* 2011. V. 5. P. 10090–10095.
198. Koini M.A., Alvey L., Allen T., Tilley C.A., Harberd N.P. High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. // *Curr. Biol.* 2009. V. 19. P. 408–413.
199. Chiu R.S., Nahal H., Provart N.J., Gazzarrini S. The role of the Arabidopsis FUSCA3 transcription factor during inhibition of seed germination at high temperature. // *BMC Plant Biol.* 2012. V. 12. P. 15.
200. Zhang B., Hu Z., Zhang Y., Li Y., Zhou S. A putative functional MYB transcription factor induced by low temperature regulates anthocyanin biosynthesis in purple kale. // *Plant Cell Rep.* 2012. V. 31. P. 281–289.
201. Dennis S., Sheth U., Feldman J.L., English K.A., Priess J.R. *C. elegans* germ cells show temperature and age-dependent expression of Cer1, a Gypsy/Ty3-related retrotransposon. // *PLoS Pathogens.* 2012. V. 8. P. e1002591.
202. Ulmanen I., Broni B., Krug R.M. Influenza virus temperature sensitive cap (m7GpppNm)-dependent endonuclease. // *J. Virol.* 1983. V. 45. P. 27–35.