

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. Ломоносова

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Ле Тхи Хиен

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ЭНДОНУКЛЕАЗ
РЕСТРИКЦИИ С ФОТОРЕГУЛИРУЕМОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

МОСКВА – 2010

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и в Институте биохимии Университета имени Ю. Либиха (г. Гиссен, Германия) в группе профессора А. Пингоуда.

Научные руководители: доктор химических наук, профессор
Орецкая Татьяна Семеновна

доктор химических наук
Кубарева Елена Александровна

Официальные оппоненты: доктор химических наук
Михайлов Сергей Николаевич

доктор биологических наук
Железная Людмила Алексеевна

Ведущая организация:

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Защита состоится 27 апреля 2010 года в 16 часов на заседании Диссертационного совета Д 501.001.41 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, аудитория 501.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан 26 марта 2010 г.

Учёный секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук

Смирнова И.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Человеческий геном включает около 30000 различных генов. Нуклеотидные замены в геноме могут привести к различным болезням. Коррекция мутаций эффективно возвращает фенотип болезни в первоначальную форму. Одна из самых многообещающих стратегий исправления мутаций основана на гомологичной рекомбинации. Главная проблема при исправлении нарушений генома путем замены дефектного участка генов заключается в том, чтобы стимулировать рекомбинацию, так как ее эффективность очень низка. Известно, что гидролиз целевой нуклеотидной последовательности приводит к появлению концов ДНК, склонных к рекомбинации, последовательно увеличивая частоту гомологичной рекомбинации в десятки тысяч раз.

В «хирургии» генома в качестве молекулярных инструментов для расщепления ДНК вблизи дефектного гена находят применение различные ферменты, в том числе эндонуклеазы рестрикции (ЭР), нуклеазы, содержащие структурный модуль «цинковые пальцы», и эндонуклеазы генной конверсии. Специфическое расщепление ДНК в нужном участке является ключевым требованием этого метода. Для точечного гидролиза ДНК в геноме человека, содержащем приблизительно 3 миллиарда пар нуклеотидов, используют мегануклеазы – сиквенс-специфические эндонуклеазы с протяженным участком узнавания. Однако в процессе поиска целевого субстрата ферменты, направлено гидролизующие ДНК, могут проявлять неспецифическую активность. Поэтому актуальной задачей является регулирование их действия. Процесс нежелательного расщепления ДНК можно попытаться минимизировать, «включая» и «выключая» активность фермента в определенные моменты времени посредством внешних воздействий, таких как свет. Для управления активностью белков посредством света все большее применение находят «фотопереклюватели» – производные азобензола (*Banghart et al., 2004; Nakayama et al., 2004; Volgraf et al., 2006; Harvey et al., 2008*). Цис-транс-изомеризация азобензола протекает быстро под действием света с длиной волны более 300 нм и, следовательно, позволяет активировать/инактивировать белки *in vivo*. В настоящей работе в качестве объектов для разработки подходов к регулированию ферментативной активности использованы гомодимерные эндонуклеазы рестрикции II-го типа SsoII (R.SsoII) и PvuII (R.PvuII).

Цель и задачи исследования. Цель работы заключалась в модификации мутантных форм эндонуклеаз рестрикции SsoII и PvuII производными азобензола для конструирования ферментов с фоторегулируемой активностью.

В ходе работы необходимо было решить следующие задачи.

1. На основании данных рентгеноструктурного анализа выбрать аминокислотные остатки в R.SsoII для их замены на цистеин для последующей модификации производными азобензола.
2. Получить мутантные формы R.SsoII, содержащие остаток (остатки) цистеина в выбранной позиции.

3. Синтезировать производные азобензола, подтвердить их структуру, исследовать их химические и оптические свойства.
4. Модифицировать мутантные формы R.SsoII производными азобензола.
5. Исследовать гидролитическую активность набора мутантных форм R.SsoII, модифицированных производными азобензола, при облучении светом определенной длины волны.
6. Сравнить эффективность и возможность применения метода «молекулярных ворот», разработанного для R.SsoII, и метода «молекулярной пружины», предложенного для R.PvuII, для фоторегулирования активности белков.

Научная новизна. Предложены и разработаны два подхода к регулированию активности эндонуклеаз рестрикции II-го типа при облучении светом определенной длины волны: метод «молекулярных ворот» на примере R.SsoII и метод «молекулярной пружины», примененный для R.PvuII.

Впервые продемонстрировано, что гидролитическая активность мутантных форм R.SsoII регулируется светом, если одно из бензольных колец асимметричного производного азобензола присоединено к белку вблизи от «входа» в его ДНК-связывающий центр, «закрывая» или «открывая» его для взаимодействия с ДНК-субстратом в нужный момент времени. Начальная скорость гидролиза ДНК под действием света с длиной волны 365 и 470 нм различается в 2 раза, когда в каждой субъединице R.SsoII к остатку Cys, находящемуся внутри ДНК-связывающего «кармана» (C224), и к остатку Cys, локализованному на его внешней поверхности (C174), присоединены производные азобензола, содержащие гидроксильную группу. Такой же эффект достигается при сближении хелатообразующих групп молекул азобензола, присоединенных к остатку Cys171, за счет формирования комплексного соединения в присутствии ионов никеля.

Идея второго подхода заключалась в использовании симметричного производного азобензола (4,4'-бисмалеимидазобензола) для соединения двух сближенных остатков цистеина R.PvuII. Показано, что при специфическом облучении происходит изомеризация азобензола, который работает как «пружина», изменяя локальную конформацию белка и, как следствие, его активность. Установлено, что максимальный эффект – 16-кратное различие в начальной скорости гидролиза ДНК-субстрата при облучении светом с длиной волны 365 и 470 нм наблюдается, когда две субъединицы PvuII соединены пептидным линкером, существенный для катализа остаток Tyr94 заменен на Phe, а две молекулы азобензола локализованы либо рядом с каталитическим центром фермента, либо в пептидном линкере в непосредственной близости от него.

Разработан новый метод синтеза разнообразных асимметричных производных азобензола, содержащих малеимидную группировку в одном из бензольных ядер для модификации цистеина белка, в другом – гидроксильную, amino-, одну или две карбоксильных группы, цистеин, а также олигонуклеотиды. Предложена новая, оригинальная методика выделения конъюгата белка с присоединенным к нему олигонуклеотидом.

Практическая значимость работы. Предложенные и развитые в данной работе методы фоторегулирования активности белков – «молекулярные ворота» для R.SsoII и «молекулярная пружина» для R.PvuII – можно применить не только для эндонуклеаз рестрикции, но и для других белков.

Регулирование ферментативной активности ЭР под действием света открывает новые перспективы для контроля за расщеплением ДНК и создания безопасных молекулярных инструментов для манипуляции генами. Так, модифицированная нуклеаза может быть доставлена в ядро клетки в малоактивном состоянии для последующей дистанционной активации внешним сигналом (УФ-светом) после связывания с ДНК в специфичном сайте. Неспецифическое расщепление ДНК можно уменьшить путем снижения нуклеазной активности после гидролиза целевого участка посредством облучения голубым светом.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в российских и международных периодических изданиях. Результаты были представлены на конференции «Ломоносов-2007» (Москва, Россия, апрель 2007 г.), конференции «Offspring-Meeting of the International Research Training Group Giessen/Marburg-Moscow» (Москва, Россия, февраль 2008 г.), IV-ом съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, Россия, май 2008 г.), конференции «Human Resources Development in the Study of Nucleic Acids» (Хания, Греция, июнь – июль 2008 г.), 34-ом конгрессе FEBS «Life's Molecular Interactions» (Прага, Чехия, июль 2009 г.), конференции «Nucleic Acids at the Chemistry-Biology Interface» (Манчестер, Великобритания, сентябрь 2009 г.).

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация изложена на 152 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы (посвящен методам регулирования активности белков под действием света), обсуждение результатов, экспериментальную часть, выводы и список цитируемой литературы. Материал иллюстрирован 72 рисунками, 25 схемами, 23 таблицами. Библиографический указатель включает в себя 135 цитированных работ.

Работа выполнена при поддержке программы РФФИ-ННИО «Международные исследовательские группы с участием молодых ученых» (гранты 08-04-91974 ННИОМ_a и IRTG GRK 1384).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Эндонуклеазы рестрикции SsoII и PvuII

В настоящей работе в качестве объектов для конструирования фоторегулируемых ферментов использованы гомодимерная эндонуклеаза рестрикции SsoII (R.SsoII)* и мутантная форма эндонуклеазы рестрикции PvuII (scPvuII), в которой С-конец одной

* Плазмиды, несущие ген R.SsoII или ген R.SsoII без остатков Cys, были любезно предоставлены Карягиной А.С. (НИИЭиМ РАМН) и Пингоуд В. (Институт биохимии Университета им. Ю. Либиха, Германия).

субъединицы соединен с N-концом другой субъединицы пептидным линкером Gly-Ser-Gly-Gly (*Meramveliotaki et al., 2007*). Основой для конструирования мутантных форм R.SsoII послужили результаты рентгеноструктурного анализа комплекса эндонуклеазы рестрикции Ecl18kI (R.Ecl18kI) с субстратом (*Bochtler et al., 2006*). R.Ecl18kI является изоизомером и ближайшим гомологом R.SsoII (ферменты отличаются одной аминокислотой – Val232 в R.Ecl18kI соответствует Ile в R.SsoII). R.SsoII входит в систему рестрикции-модификации II-го типа бактерии *Shigella sonnei* 47 (*Угорова и др., 1985*). Фермент узнает в двутяжевой ДНК последовательность нуклеотидов 5'-↓CCNGG-3'/3'-GGNCC↑-5' (N = A, T, G или C) и гидролизует ДНК на границах этого участка в местах, указанных стрелками. R.PvuII входит в систему рестрикции-модификации II-го типа бактерии *Proteus vulgaris* (*Gingeras et al., 1981*). R.PvuII дикого типа в растворе существует в форме гомодимера. Фермент узнает в двутяжевой ДНК последовательность нуклеотидов 5'-CAG↓CTG-3'/3'-GTC↑GAC-5' и гидролизует ДНК в середине этого участка, как указано стрелками.

2. Подходы к фоторегулированию активности эндонуклеаз рестрикции

Для конструирования фоторегулируемого белка требуется прежде всего селективно присоединить к нему светочувствительные соединения. Для модификации белка различными реагентами наиболее удобными являются тиольные группы остатков цистеина, которые могут быть введены в состав белка методом сайт-направленного мутагенеза. В качестве фотопереключателя чаще всего используются производные азобензола. *Транс*-конфигурация азобензола переходит в *цис*-конфигурацию при облучении УФ-светом (365 нм), а обратный переход осуществляется при облучении голубым светом (470 нм) или при термической релаксации (схема 1). *Цис-транс*-изомеризация азобензола при специфическом облучении протекает быстро, эффективно и практически не зависит от окружающей среды.

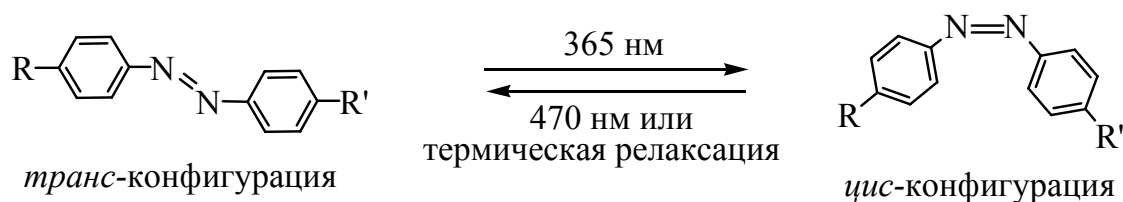


Схема 1.

В работе предлагаются два подхода к регулированию активности эндонуклеаз рестрикции при специфическом облучении. Идея первого подхода основана на том, что большинство эндонуклеаз рестрикции в активном состоянии представляют собой гомодимеры. Многие из них при взаимодействии с субстратом подвергаются конформационным изменениям, что позволяет ДНК подойти к ДНК-связывающему центру фермента, который находится в интерфейсе между двумя субъединицами гомодимера. Модифицируя белок асимметричными производными азобензола вблизи

от ДНК-связывающего или каталитического центра, можно сделать его недоступным для подхода ДНК из-за стерических препятствий в случае более «вытянутой» *транс*-конфигурации производных азобензола. При облучении УФ-светом *транс*-форма азобензола переходит в более компактную *цис*-форму, расстояние между концами двух молекул азобензола увеличивается, и субстрат может попасть в ДНК-связывающий центр белка. Такая тактика регулирования активности белка может быть названа методом фоторегулируемых «молекулярных ворот» (схема 2).

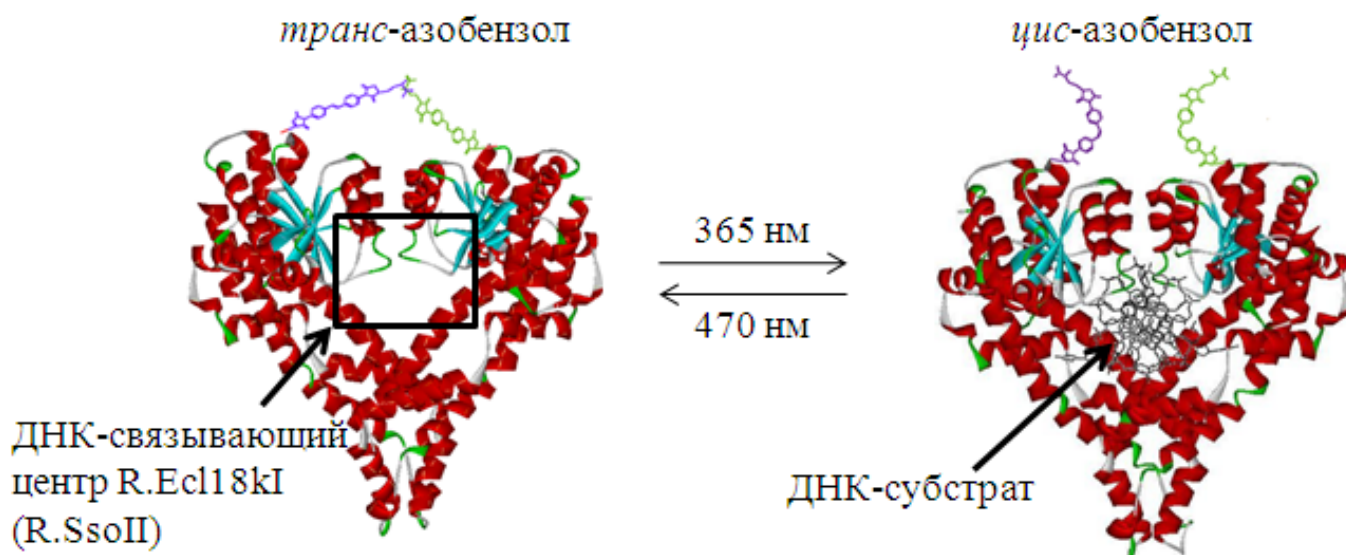


Схема 2.

Второй подход к регулированию активности белка назван методом «молекулярной пружины» (схема 3). Он заключается в использовании симметричных производных азобензола для соединения двух сближенных остатков цистеина белка. При изменении длины волны возбуждающего света происходит изомеризация азобензола, который работает как пружина, изменяя локальную конформацию белка, что может привести к изменению его активности.

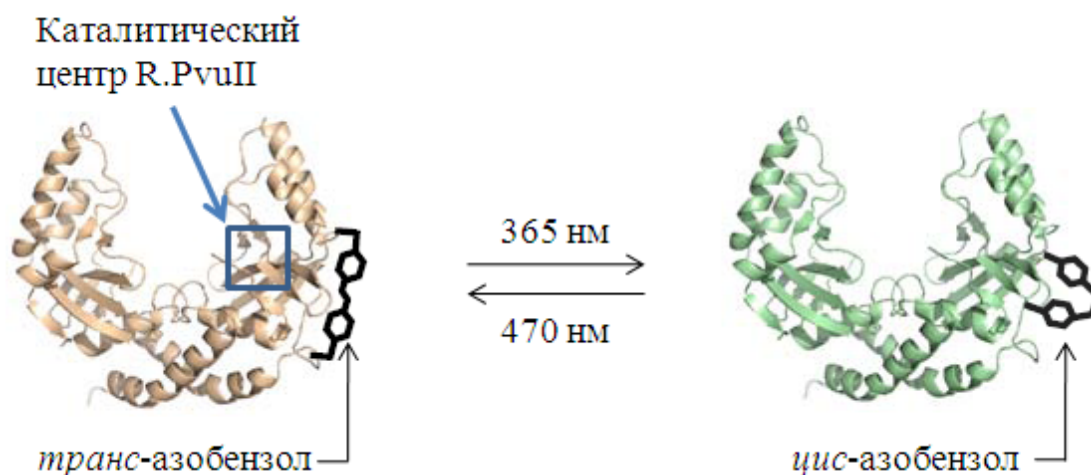


Схема 3.

3. Конструирование и характеристика мутантных форм R.SsoII

В структуре R.SsoII дикого типа (wtR.SsoII) имеется 2 остатка цистеина в позиции 33 и 60. Был получен вариант белка R.SsoII(C33S/C60S), не содержащий остатков цистеина – cfR.SsoII (или 2CS), и проведен сайт-направленный мутагенез гена этого белка. Согласно анализу структуры комплекса R.Ecl18kI с субстратом гомодимер белка содержит внутренний и внешний «зажимы», которые окружают ДНК. В мономере cfR.SsoII были выбраны две аминокислоты S171 и R174, входящие в состав внешнего «зажима» и три аминокислоты R198, I220 и A224, локализованные во внутреннем «зажиме» (рис. 1). Было получено 5 мутантных форм cfR.SsoII, в которых один из перечисленных выше остатков заменен на Cys. Можно предположить, что чем больше молекул азобензола находится вблизи от «входа» в ДНК-связывающий центр белка, тем больше стерический эффект и тем больше влияние облучения на активность белка. Поэтому были получены еще 6 мутантных форм cfR.SsoII с 2, 3 или 4 остатками цистеина в положениях 171, 174, 198, 220 и 224 или 198 в различных комбинациях.

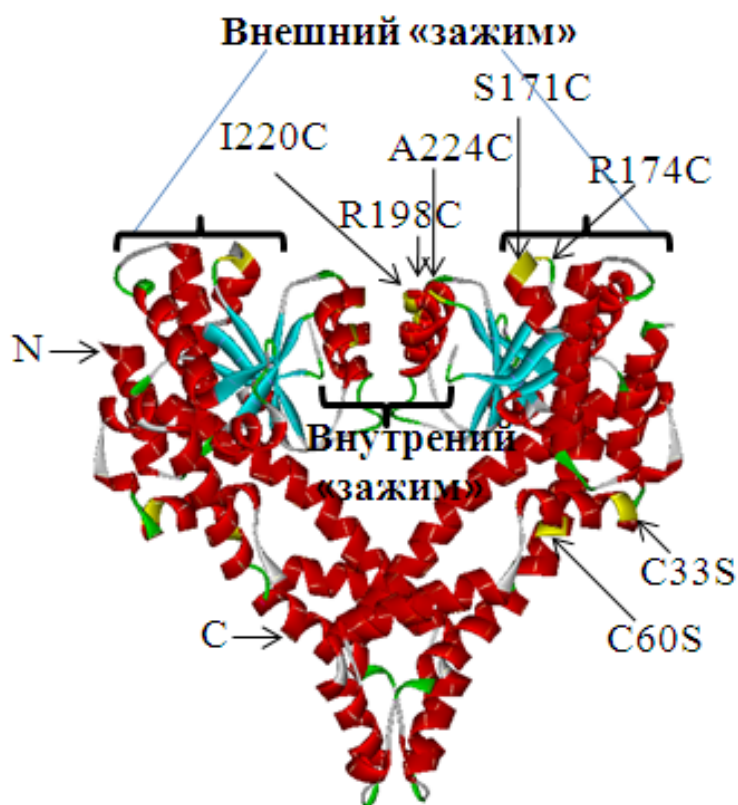


Рис. 1. Структура гомодимера R.SsoII (на основе данных PCA для R.Ecl18kI (Bochtler et al, 2006)). Указаны аминокислоты, замененные на цистеин: S171, R174, R198, I220, A224.

4. Анализ реакционной способности остатков цистеина мутантных форм R.SsoII

Для оценки реакционной способности остатков Cys мутантных форм R.SsoII использовали полиэтиленгликоль, содержащий группировки малеимида (PEG-Mal). Большая молекулярная масса PEG-Mal (5 кДа) позволяет фиксировать образование его конъюгата с мутантными формами R.SsoII методом гель-электрофореза по Лэммли. PEG-Mal практически количественно взаимодействует с большинством мутантных форм R.SsoII, что свидетельствует о высокой реакционной способности остатков Cys в этих белках при взаимодействии с остатком малеимида (рис. 2).

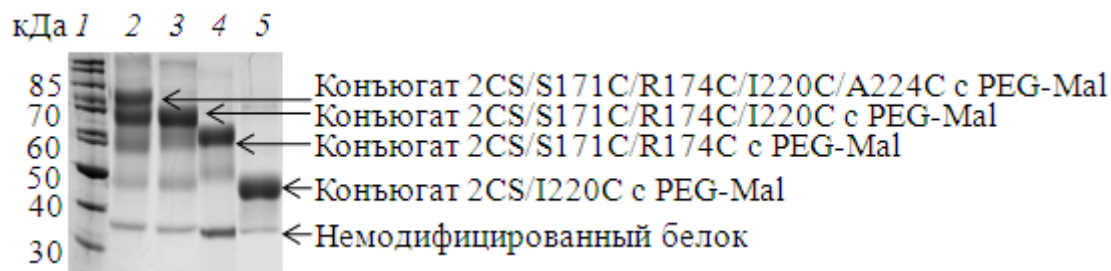


Рис. 2. Анализ методом гель-электрофореза по Лэммли взаимодействия мутантных форм R.SsoII (5 мкМ), содержащих 1 (дорожка 5), 2 (дорожка 4), 3 (дорожка 3) или 4 (дорожка 2) остатка цистеина в мономере белка с PEG-Mal (5 кДа, 500 мкМ). Дорожка 1 – маркерные белки, молекулярная масса (кДа) указана слева. Гель окрашен раствором кумасси G250.

5. Гидролиз ДНК-субстрата мутантными формами R.SsoII

Ферментативную активность мутантных форм R.SsoII оценивали по способности белка гидролизовать 873-звенный ДНК-субстрат, содержащий единственный участок узнавания этого фермента. Реакционную смесь анализировали методом гель-электрофореза с последующим окрашиванием геля раствором бромистого этидия. Продуктами расщепления являются ДНК-дуплексы длиной 530 и 338 нуклеотидных пар (н.п.).

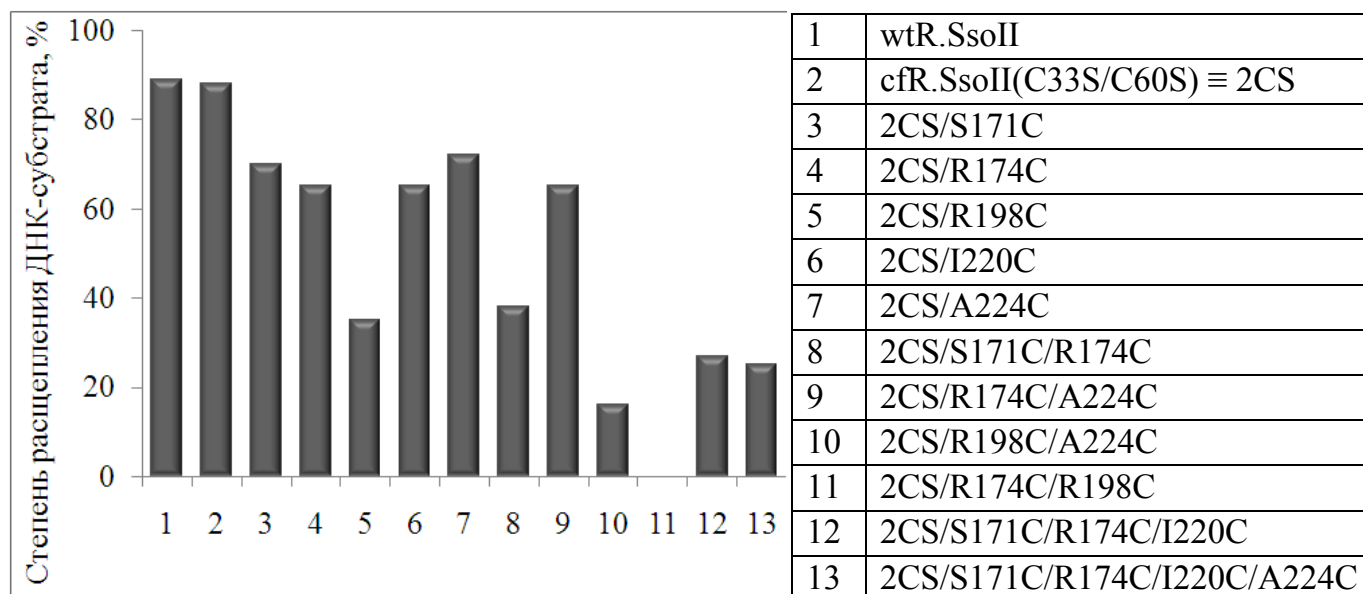


Рис. 3. Гистограмма, отражающая степень расщепления ДНК-субстрата мутантными формами R.SsoII за 15 мин при 37°C. Концентрация ДНК-субстрата составляла 20 нМ. Концентрация фермента (20 – 300 нМ) была подобрана так, чтобы степень расщепления ДНК-субстрата находилась в пределах от 20% до 90%. Степень расщепления ДНК определяли как среднее арифметическое трех независимых экспериментов. Ошибка измерения не превышала 8%.

Показано, что ферментативная активность мутантных форм R.SsoII зависит от положения и от количества введенных остатков цистеина. Чем ближе аминокислотный остаток (а.о.), заменяемый на Cys, расположен к ДНК-связывающему центру фермента

и чем большее число аминокислот заменено на цистеин, тем менее активна эта мутантная форма R.SsoII (рис. 3).

6. Синтез производных азобензола

Для регулирования доступности ДНК-связывающего центра фермента при облучении светом определенной длины волны было предложено использовать несимметричные производные азобензола, содержащие в одном из бензольных колец малеимидную группировку для связывания с остатком цистеина белка, а в другом – различные заместители. В качестве заместителя выбраны функциональные группы, которые при определенном расположении друг относительно друга удерживаются в сближенном состоянии при образовании комплекса с ионом металла (рис. 4, *а*) или в результате формирования ДНК-дуплекса (рис. 4, *в*). При определенном расположении заместителя относительно аминокислоты из другой субъединицы белка принцип «молекулярных ворот» реализуется за счет образования водородных связей и/или кислотно-основных взаимодействий (рис. 4, *б*). Таким образом, заместитель на свободном конце производного азобензола может повлиять на функционирование белка.

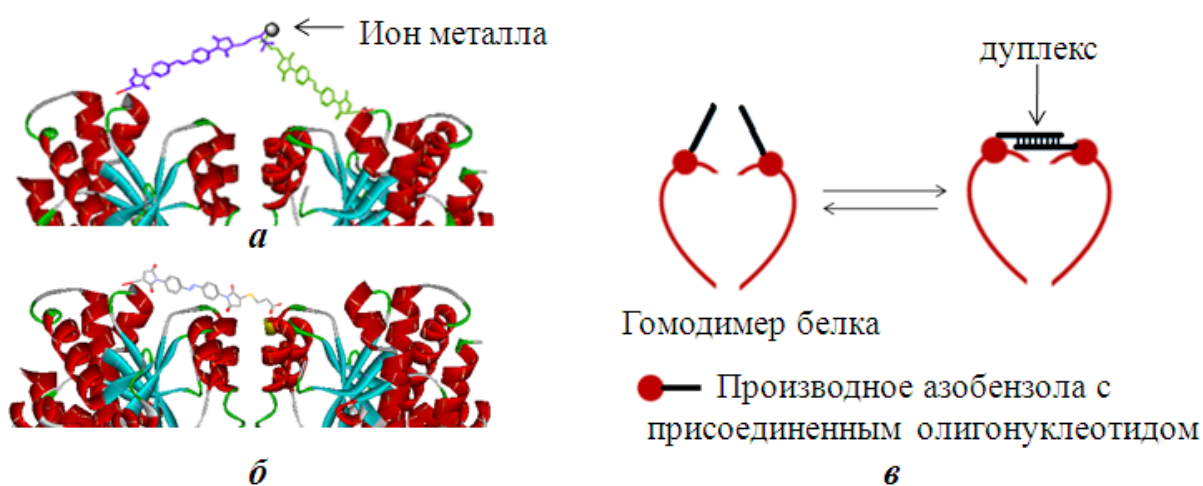


Рис. 4. Схематическое изображение метода «молекулярных ворот». Обратимое блокирование активного центра белка с помощью производных азобензола: *а* – комплексообразование в присутствии иона металла, *б* – кислотно-основное взаимодействие производного азобензола со сближенной аминокислотой одной из субъединиц гомодимера белка, *в* – формирование ДНК-дуплекса.

Для получения производных азобензола был синтезирован 4,4'-бисмалеимидазобензол (**1**), к которому присоединяли различные тиосоединения (схема 4, табл. 1). Впервые были разработаны оригинальные методики для синтеза библиотеки новых производных азобензола, содержащих в одном из бензольных колец малеимидную группировку для связывания с остатком цистеина белка, а в другом – заместители, несущие различные функциональные группы: гидроксильную (**2**), одну или две карбоксильные группы (**3**) и (**5**), аминофункцию (**4**), а также группировки,

способные образовывать комплексные соединения (6), или фрагмент ДНК (7) (табл. 1). Их структура была подтверждена методом УФ-, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

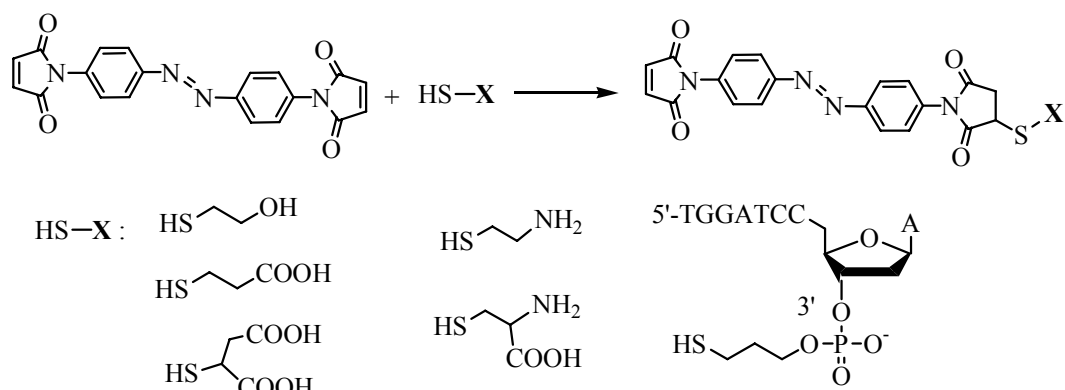


Схема 4.

Таблица 1. Синтезированные производные азобензола.

Тип взаимодействия в молекуле белка	Сокращенное название	Номер	Структура производных азобензола
Ковалентная связь	ВМAB	1	
Водородная связь, кислотнo-основные взаимодействия	МАВОН	2	
	МАВСООН	3	
	МАВ-Am	4	
	МАВ-Suc	5	
Образование комплекса с ионами металлов	МАВ-Cys	6	
Формирование ДНК-дууплекса	МАВ-oligo I	7	

7. Модификация белка производными азобензола

Для модификации мутантных форм R.SsoII производными малеимидазобензола к раствору белка добавляли 10-кратный избыток раствора одного из соединений (1) – (7) при комнатной температуре. Молекулярная масса веществ (1) – (6) существенно меньше молекулярной массы R.SsoII. Поэтому присоединение любого из них практически не влияет на подвижность белка в геле в условиях анализа. Для оценки эффективности протекания реакции через 10 мин после начала инкубации мутантной формы R.SsoII с производным малеимидазобензола к аликвоте реакционной смеси добавляли избыток PEG-Mal (5 кДа). Образование конъюгата белок-PEG-Mal фиксировали методом электрофореза по Лэммли. Выход белка, модифицированного одним из соединений (1) – (6), был близок к 95%. Показано, что заместители практически не влияют на реакционную способность малеимидной группы. Таким образом, соединения (1) – (6) могут быть использованы для эффективной и селективной модификации белков.

В случае присоединения производного азобензола (7), содержащего олигонуклеотид, большая молекулярная масса МАВ-oligo I (3 кДа) позволяет различить в геле зоны, соответствующие конъюгату и исходному белку (рис. 5, дорожки 3, 5, 7). Выход конъюгата достигает 50%. В контрольном эксперименте МАВ-oligo I инкубировали cfR.SsoII, не содержащей остатков Cys. Образование конъюгата в этом случае не наблюдалось.

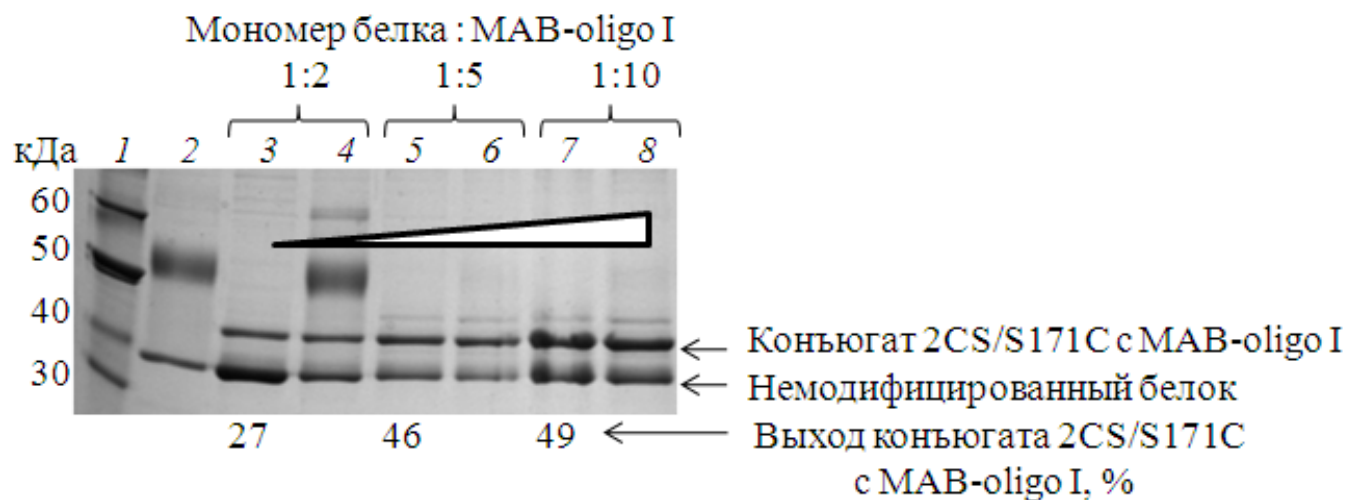


Рис. 5. Анализ методом гель-электрофореза по Лэммли взаимодействия мутантной формы 2CS/S171C (5 мкМ) с МАВ-oligo I. Дорожки 3, 5, 7 – белок инкубировали с 2-, 5- и 10-кратным избытком МАВ-oligo I (10, 25, 50 мкМ соответственно). Дорожки 4, 6, 8 – белок первоначально инкубировали с 2-, 5- и 10-кратным избытком МАВ-oligo I, затем с PEG-Mal (5 кДа, 500 мкМ). Дорожка 2 – белок инкубировали с PEG-Mal. Дорожка 1 – маркерные белки, молекулярная масса (кДа) указана слева. Гель окрашен раствором кумасси G250.

8. Оптические свойства мутантных форм R.SsoII, модифицированных производными азобензола

Для выяснения способности производных азобензола к *цис-транс*-изомеризации после их присоединения к белкам мутантные формы R.SsoII, модифицированные производными азобензола, облучали УФ- и голубым светом, затем регистрировали их спектры поглощения (рис. 6).

Для спектров поглощения производных азобензола характерен пик с максимумом 340 нм. Анализ оптических свойств замещенных азобензолов и производных азобензола, присоединенных к остаткам цистеина белка, не выявил существенных различий. Следовательно, процесс *цис-транс*-изомеризации протекает одинаково для азобензольных производных в свободном виде и после их присоединения к белкам.

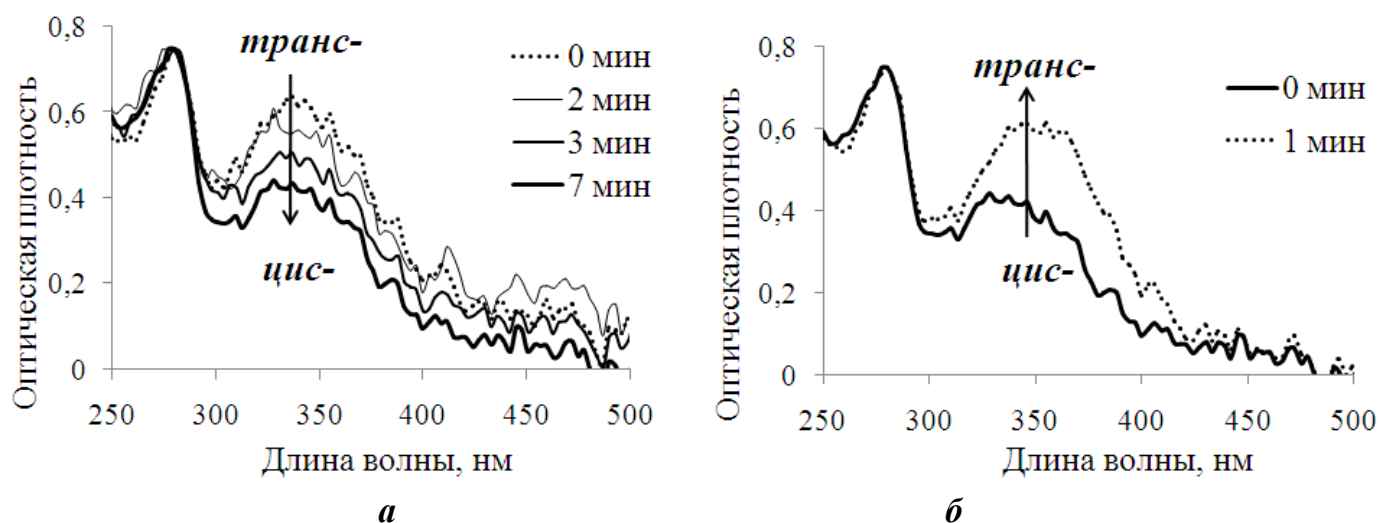


Рис. 6. Спектр поглощения конъюгата 2CS/S171C/R174C с MAVCOOH: *а* – *транс*→*цис*-изомеризация при облучении УФ-светом с длиной волны 365 нм; *б* – *цис*→*транс*-изомеризация при облучении голубым светом с длиной волны 470 нм.

9. Гидролиз ДНК-субстрата мутантными формами R.SsoII, модифицированными МАВОН, МАВСООН, МАВ-Am и МАВ-Suc при специфическом облучении

В ходе работы необходимо было выбрать такую модифицированную производным азобензола мутантную форму R.SsoII, которая бы проявляла максимальную разницу в эффективности расщепления ДНК при облучении УФ- и голубым светом (**фотоэффект**).

Первоначально фермент облучали светом соответствующей длины волны («предоблучение»). Затем ЭР добавляли к ДНК-субстрату и продолжали облучение. После 1, 2, 3, 5, 7, 10 мин инкубации отбирали пробы по 10 мкл, анализировали их методом гель-электрофореза, определяли степень гидролиза ДНК и строили кинетические кривые, из которых определяли начальную скорость расщепления субстрата модифицированными мутантными формами R.SsoII. Фотоэффект рассчитывали как отношение начальной скорости гидролиза ДНК-дуплекса

эндонуклеазой рестрикции при облучении УФ-светом (азобензол в *цис*-конфигурации) к начальной скорости гидролиза субстрата этим же белком при облучении голубым светом (азобензол в *транс*-конфигурации). Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2. Сравнение ферментативной активности мутантных форм R.SsoII, модифицированных производными азобензола, при облучении УФ- и голубым светом.

	Фермент	Фотоэффект
1	wtR.SsoII	1,00 ± 0,01
2	cfR.SsoII	1,1 ± 0,1
3	2CS/S171C-МАВОН	1,00 ± 0,01
4	2CS/R174C-МАВОН	1,10 ± 0,01
5	2CS/R198C-МАВОН	1,2 ± 0,1
6	2CS/I220C-МАВОН	1,3 ± 0,2
7	2CS/A224C-МАВОН	1,4 ± 0,2
8	2CS/R174C/A224C-МАВОН	2,4 ± 0,4
9	2CS/S171C/R174C-МАВОН	1,3 ± 0,2
10	2CS/S171C-МАВСООН	1,2 ± 0,1
11	2CS/R174C-МАВСООН	1,1 ± 0,1
12	2CS/R198C-МАВСООН	1,00 ± 0,01
13	2CS/A224C-МАВСООН	1,3 ± 0,2
14	2CS/174/224-COОН	1,1 ± 0,1
15	2CS/R174C-МАВ-Suc	0,8 ± 0,1
16	2CS/171-МАВ-Am	1,2 ± 0,1
17	2CS/174-МАВ-Am	1,00 ± 0,01

Наибольшая разница в скоростях гидролиза (в 2 раза) была получена для варианта 2CS/R174C/A224C-МАВОН. В нем одна молекула МАВОН присоединена к остатку Cys, который находится внутри ДНК-связывающего «кармана» (C224), а другая – к остатку Cys, который находится на его внешней поверхности (C174). Можно предположить возможность образования водородных связей между гидроксильными группами молекул азобензола в *транс*-конфигурации, что усиливает разницу в скоростях гидролиза ДНК ферментом при облучении УФ- и голубым светом (рис. 7). Остальные мутантные формы R.SsoII, модифицированные МАВОН, МАВСООН, МАВ-Am и МАВ-Suc, не проявляли значительного фотоэффекта при специфическом облучении. Соотношение скоростей близко к единице. Контрольные эксперименты показали, что ферментативная активность wtR.SsoII и cfR.SsoII при облучении УФ- и голубым светом сравнима (табл. 2).

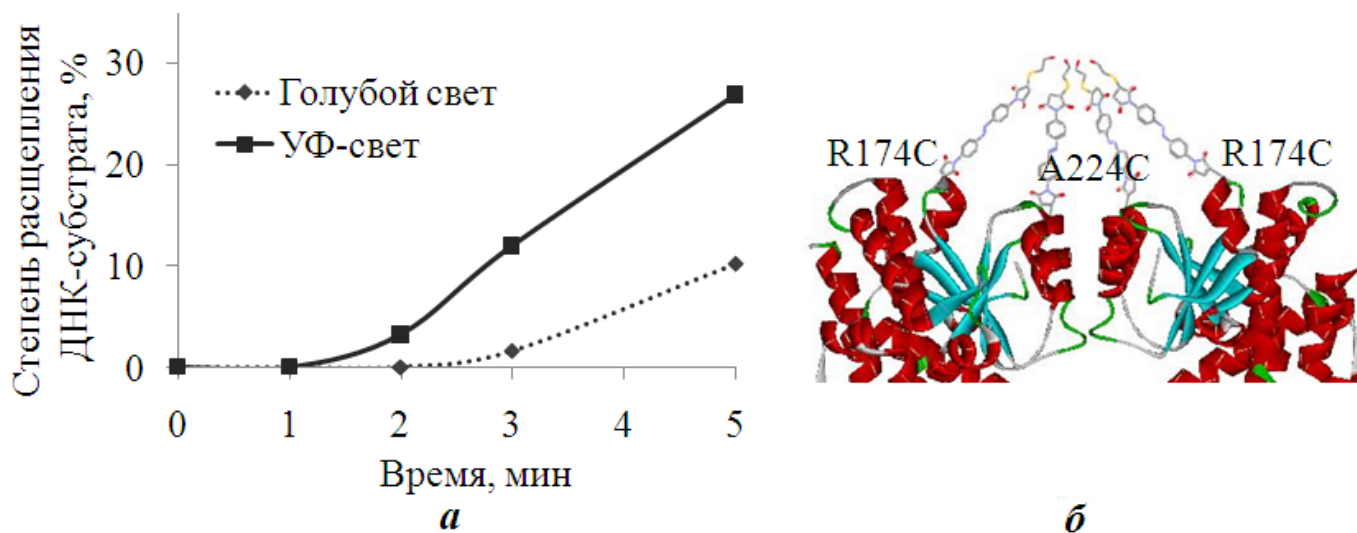


Рис. 7. а – Гидролиз ДНК-субстрата белком 2CS/R174C/A224C-МАВОН при облучении голубым светом и УФ-светом. Концентрация субстрата – 20 нМ, фермента – 500 нМ. **б** – Схематическое изображение 2CS/R174C/A224C-МАВОН.

10. Гидролиз ДНК-субстрата мутантной формой R.SsoII, модифицированной олигонуклеотидсодержащим производным азобензола, при специфическом облучении

Для создания существенного препятствия для «входа» ДНК в ДНК-связывающий центр фермента целесообразно использовать свойство комплементарных олигонуклеотидов формировать дуплекс. Такое взаимодействие обратимо и кооперативно и может реализоваться при сближении фрагментов ДНК, введенных в каждую из двух субъединиц гомодимерной ЭР с помощью производного азобензола (рис. 4, в).

Выбор структуры олигонуклеотида для присоединения к бисмалеимидазобензолу основывался на следующих требованиях. Во-первых, нуклеотидная последовательность должна быть самокомплементарной. Во-вторых, олигонуклеотид должен быть достаточным протяженным, чтобы дуплекс формировался при температуре, когда wtR.SsoII эффективно гидролизует ДНК ($> 20^{\circ}\text{C}$). В-третьих, ДНК-дуплекс не должен быть слишком прочным, чтобы *цис-транс*-изомеризация азобензола оказывала влияние на его образование. В результате был выбран 8-звенный олигонуклеотид 5'-TGGATCCA-3' (oligo I), образующий дуплекс с расчетной температурой плавления 24°C . Следовательно, гидролиз ДНК-субстрата должен протекать при температуре не выше, чем это значение. Показано, что скорость гидролиза субстрата 2CS/S171C-MAV-oligo I при $24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ при облучении УФ-светом в 1,7 раз больше, чем при облучении голубым светом.

11. Гидролиз ДНК-субстрата мутантной формой R.SsoII, содержащей хелатообразующую группировку, при облучении УФ- и голубым светом

В данной работе было синтезировано производное малеимидазобензола, содержащее остаток цистеина в одном из бензольных колец (МАВ-Cys (6)), т.к. цистеин и его производные образуют комплексные соединения со многими ионами металлов (*Lenz et al., 1964*). После присоединения МАВ-Cys к белку при *транс*-конфигурации азобензола группировки для координирования иона металла могут сблизиться. Такого рода прочный «заслон» должен препятствовать входу субстрата в ДНК-связывающий центр. Анализ структуры R.SsoII показал, что наиболее предпочтительной мутантной формой для присоединения МАВ-Cys является белок 2CS/S171C.

Были определены кинетические параметры реакций гидролиза ДНК R.SsoII дикого типа и белка 2CS/S171C-МАВ-Cys. Рассчитывали начальные скорости гидролиза ферментами 20-звенного ДНК-дуплекса при различных его концентрациях. Из полученных данных определяли значения константы Михаэлиса (K_M) и максимальную скорость ($V_{\text{макс}}$) ферментативных реакций (табл. 3).

Таблица 3. Кинетические характеристики реакций гидролиза 20-звенного субстрата эндонуклеазами рестрикции.

Фермент	$V_{\text{макс}}$, нМ/мин	K_M , нМ
wtR.SsoII	100 ± 13	$4,07 \pm 0,65$
2CS/S171C-МАВ-Cys	77 ± 5	$17,03 \pm 0,09$

Показано, что значение K_M реакции с участием 2CS/S171C-МАВ-Cys в 4 раза больше, чем значение K_M реакции с участием wtR.SsoII, в то время как значения максимальных скоростей гидролиза ДНК обоими ферментами различаются незначительно. То есть 20-звенный дуплекс имеет меньшее сродство к модифицированному белку 2CS/S171C-МАВ-Cys по сравнению с ферментом дикого типа. Это соответствует ожиданиям, так как производные азобензола, находящиеся вблизи от входа субстрата в ДНК-связывающий центр, должны препятствовать взаимодействию фермента с ДНК.

Ранее было показано, что ионы Ni^{2+} и Co^{2+} образуют комплексы с цистеином и его производными, причем константа устойчивости таких комплексов выше в случае ионов Ni^{2+} (*Lenz et al., 1964*). Вместе с тем, ионы Ni^{2+} оказывает бóльший ингибирующий эффект на функционирование ЭР (*Halford et al., 1995, Baldwin et al., 1999*). Установлено, что wtR.SsoII способна гидролизовать ДНК-субстрат, если в реакционной смеси наряду с 10 мМ $MgCl_2$ содержится 1 – 10 мкМ $CoSO_4$ или 1 мкМ $NiCl_2$. Скорость расщепления ДНК-субстрата wtR.SsoII при облучении в отсутствие и в присутствии ионов Co^{2+} или Ni^{2+} сравнима. Мутантная форма 2CS/R171C-МАВ-Cys в отсутствие ионов металлов гидролизует ДНК-субстрат с одинаковой скоростью при

облучении как УФ-, так и голубым светом. В присутствии ионов никеля (концентрация 1 мкМ) начальная скорость расщепления ДНК модифицированным ферментом при облучении УФ-светом в два раза больше, чем при облучении голубым светом (рис. 8). Очевидно, что наблюдаемое изменение активности 2CS/R171C-МАВ-Cys под действием возбуждающего света разной длины волны обусловлено только образованием комплекса с ионами металлов (рис. 9).

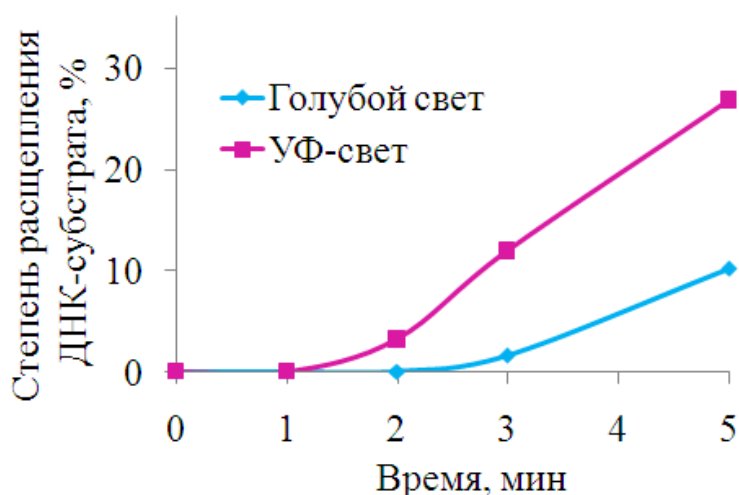


Рис. 8. Гидролиз ДНК-субстрата ферментом 2CS/R171C-МАВ-Cys в присутствии ионов Ni^{2+} (концентрация 1 мкМ) при облучении голубым и УФ-светом. Кинетические кривые расщепления ДНК-субстрата.

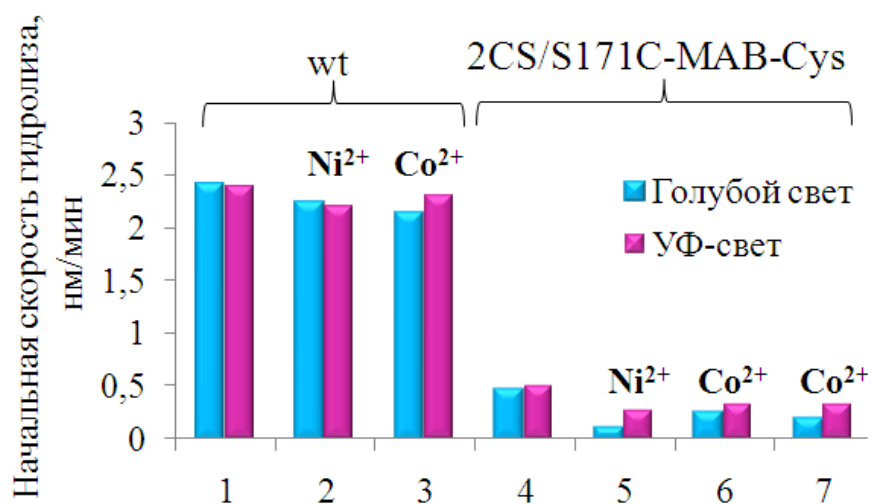


Рис. 9. Сравнение начальных скоростей расщепления 837-звенного ДНК-дуплекса ферментами: wtR.SsoII (колонки 1–3) и 2CS/S171C-МАВ-Cys (колонки 4–7) в отсутствие и в присутствии ионов Co^{2+} или Ni^{2+} при облучении голубым и УФ-светом.

	Фермент	Фотоэффект
1	wt	$1,00 \pm 0,01$
2	wt + 1 мкМ NiCl_2	$1,00 \pm 0,02$
3	wt + 1 мкМ CoSO_4	$1,1 \pm 0,1$
4	2CS/S171C-МАВ-Cys	$1,1 \pm 0,1$
5	2CS/S171C-МАВ-Cys + 1 мкМ NiCl_2	$2,2 \pm 0,2$
6	2CS/S171C-МАВ-Cys + 1 мкМ CoSO_4	$1,2 \pm 0,1$
7	2CS/S171C-МАВ-Cys + 10 мкМ CoSO_4	$1,6 \pm 0,1$

12. Эндонуклеаза рестрикции PvuII с фоторегулируемой активностью

Метод «молекулярной пружины» был разработан для R.PvuII совместно с аспирантом Б. Ширлингом под руководством проф. А. Пингоуда (Германия). Было получено 28 мутантных форм scPvuII, содержащих одну или несколько пар сближенных остатков цистеина, которые могут быть соединены с помощью бисмалеимидазобензола (ВМАВ) (1). Подобраны пары а.о., локализованные в трех α -спиралях scPvuII, две из которых находятся в ДНК-связывающем субдомене (V89/Q96, R129/S133), а одна расположена в каталитическом субдомене (K147/E151) фермента, пары а.о. в петлях и β -листах рядом с активным центром (T49/N62, E66/Q96, I74/E110) и пары а.о., в которых одна из аминокислот находится в линкере (I), соединяющем N- и C-субъединицы белка, а другая локализована рядом с каталитическим центром (I/D61 и I/N62) (рис. 10, а). Указанные аминокислоты были заменены на Cys. Расстояние между двумя атомами серы остатков Cys в одной паре должно составлять 8 ± 3 Å, что необходимо для их эффективного соединения *цис*-бисмалеимидазобензолом (рис. 10, б).

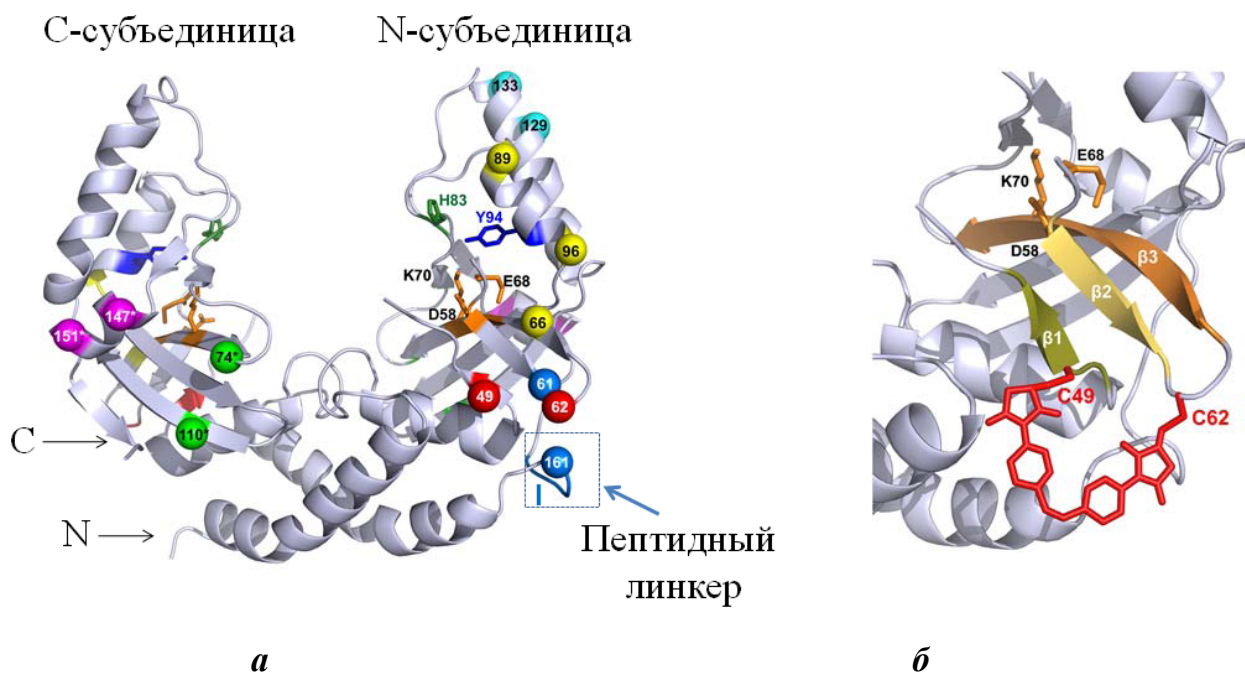


Рис. 10. а – Пространственная структура scPvuII. Отмечены а.о., которые заменяли на Cys для соединения с бисмалеимидазобензолом: T49C/N62C, E66C/Q96C, I74C*/E110C*, V89C/Q96C, R129C/S133C и K147C*/E151C*. Аминокислоты, образующие пару, взаимодействующую с ВМАВ, обозначены шариками, окрашенными одинаковым цветом; I – пептидный линкер, соединяющий N- и C-субъединицы белка. Аминокислоты, находящиеся в C-субъединице белка, отмечены звездочкой. Аминокислотные остатки каталитического центра (D58, E68, K70) выделены оранжевым цветом. H83 и Y94, замененные на Ala и Phe, выделены зеленым и синим цветом, соответственно. б – Область scPvuII, содержащая β -листы (β 1, β 2, β 3) и каталитический центр. «Сшивка» C49 и C62 *цис*-бисмалеимидазобензолом.

Восемь из 28 мутантных ферментов содержали дополнительные аминокислотные замены в ДНК-связывающем центре (H83A) и рядом с каталитическим центром (Y94F), что снижало их способность взаимодействовать с субстратом.

В качестве ДНК-субстрата использовали суперскрученную плазмиду рАТ, содержащую один участок узнавания R.PvuII. Определяли начальную скорость ее перехода в линейную или открытую форму в результате гидролиза каждой из мутантных форм scPvuII при специфическом облучении (рис. 11, а). Лучшего результата – 16-кратного различия в скоростях гидролиза ДНК при облучении УФ- и голубым светом – удалось добиться, когда существенный для катализа остаток Tyr94 был заменен на Phe, а две молекулы азобензола локализованы либо рядом с каталитическим центром фермента (sc(T49C/N62C)₂(Y94F)₂-ВМАВ) (рис. 11, б), либо в пептидном линкере и в непосредственной близости от него.

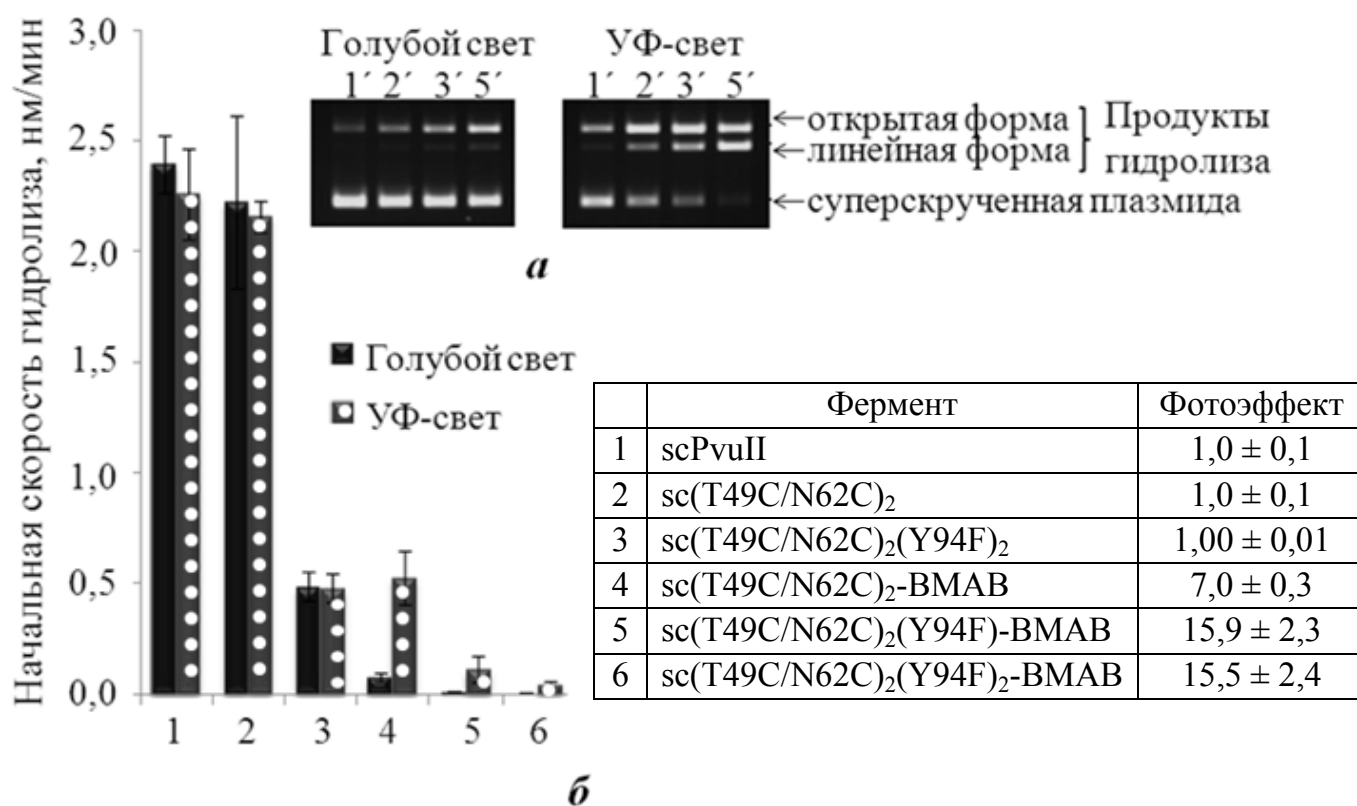


Рис. 11. а – Анализ реакционной смеси методом гель-электрофореза после гидролиза суперскрученной плазмиды рАТ мутантной формой sc(T49C/N62C)₂(Y94F)₂-ВМАВ при облучении голубым и УФ-светом. Концентрация субстрата – 4 нМ, фермента – 12 нМ. **б** – Сравнение начальных скоростей расщепления плазмиды рАТ мутантными ферментами scPvuII при облучении голубым и УФ-светом. Условные обозначения: sc(T49C/N62C)₂ – scPvuII содержит остатки Cys в положениях 49 и 62 в обеих N- и C-субъединицах; sc(T49C/N62C)₂(Y94F)₂ – мутантный белок sc(T49C/N62C)₂, у которого остаток Tyr94 был заменен на Phe в обеих N- и C-субъединицах; sc(T49C/N62C)-ВМАВ – мутантный белок sc(T49C/N62C), два остатка Cys которого соединены бисмалеимидазобензолом.

Ниже приведено краткое сравнение двух подходов к модулированию активности эндонуклеаз рестрикции посредством света.

Подход	«Молекулярные ворота»	«Молекулярная пружина»
ЭР	R.SsoII	scPvuII
Максимальный фотоэффект	2 раза Высокая степень подвижности фотопереклювателя относительно белка → «ослабленное» влияние изомеризации производного азобензола на белок	16 раз Значительное влияние производного азобензола как «механической пружины» на локальную конформацию фермента
Фото-переключатель	Асимметричные производные азобензола, содержащие в одном из бензольных колец малеимидную группировку для связывания с остатком цистеина белка, а в другом – различные заместители (требуется синтезировать производные азобензола с различными заместителями)	Симметричный «сшивающий» реагент, содержащий остаток азобензола (более простой синтез)
Выбор положений в белке для введения производных азобензола	В непосредственной близости от входа субстрата в ДНК-связывающий или каталитический центр белка (более простой выбор мест модификации)	- Во всех областях белка (α -спираль, β -лист, β -шпилька,...) недалеко от активного центра с учетом расстояния между двумя остатками цистеина для их успешного соединения бис-малеимидазобензолом (кропотливый поиск оптимальных мест модификации) - Соединение двух субъединиц пептидным линкером
Введение фотопереклювателя в белок	Один продукт присоединения	Сложная смесь продуктов присоединения бисмалеимид-азобензола
Предполагаемый механизм	Специфическое облучение → изомеризация азобензола → стерическое затруднение для входа субстрата в ДНК-связывающий центр → изменение активности белка	Специфическое облучение → изомеризация азобензола («механическая пружина») → изменение локальной конформации белка → изменение активности белка

ВЫВОДЫ

1. Разработан метод регулирования активности гомодимерной эндонуклеазы рестрикции II-го типа SsoII, основанный на модификации белка производными азобензола, – метод «молекулярных ворот».
2. Для реализации метода «молекулярных ворот» предложены новые методики синтеза разнообразных асимметричных производных азобензола, содержащих малеимидную группировку в одном из бензольных ядер для модификации цистеина белка, в другом – гидроксильную, амино-, одну или две карбоксильные группы, остаток цистеина, а также олигонуклеотиды.
3. Получено 11 мутантных форм эндонуклеазы рестрикции SsoII, содержащих остаток (остатки) цистеина в выбранных позициях, проведена их модификация различными производными малеимидазобензола и протестирована способность белков с «фотопереключаемыми» молекулами гидролизовать ДНК при облучении светом с длиной волны 365 и 470 нм.
4. Впервые продемонстрировано двукратное изменение ферментативной активности эндонуклеазы рестрикции SsoII при альтернативном облучении в случае, когда два азобензольных «фотопереключателя» с гидроксильной или хелатообразующей группой селективно присоединены к мутантной форме белка в непосредственной близости от его ДНК-связывающего центра.
5. Найдены положения в структуре мутантных форм эндонуклеазы рестрикции PvuII, модификация которых симметричными производными азобензола приводит к 16-кратному различию в начальной скорости гидролиза ДНК-субстрата при изменении длины волны возбуждающего света.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

1. Schierling B., Noël A.J., Wende W., **Le Thi Hien**, 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. USA.*, 2010, v. 107, N 4, p. 1361 – 1366.
2. **Ле Тхи Хиен**, Ширлинг Б., Рязанова А.Ю., Зацепин Т.С., Волков Е.М., Кубарева Е.А., Орецкая Т.С., Величко Т.И., Пингоуд А. Новые производные азобензола для направленной модификации белков. // *Биоорганическая химия*, 2009, т. 35, N 5, с. 610 – 617.
3. **Le Thi Hien**, Oretskaya T.S., Zatsepin T.S. Metal ion chelate-assisted ligation (CHESS LIGA) for SNP detection on microarrays. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, v. 19, N 15, p. 4018 – 4021.
4. Schierling B., Noël A.J., **Thi H.L.**, Wende W., Pingoud A. Development of a «photoswitchable» restriction endonuclease. // *FEBS Journal*, 2009, v. 276, Suppl. 1, p. 291.
5. **Le Thi Hien**, Oretskaya T.S., Zatsepin T.S. Metal ion chelate-assisted ligation (CHESS LIGA) for SNP detection on microarrays. // Abstract book of conference «Nucleic Acids at the Chemistry-Biology Interface», 2009, Manchester, England, p. 85.
6. **Hien Le Thi**, Zatsepin T.S., Oretskaya T.S. Chelate ligation of modified oligodeoxynucleotides on DNA template UV thermal melting study. // Abstract book of Offspring-Meeting of the International Research Training Group Giessen/Marburg-Moscow (DFG-RFBR-funded), 2008, Moscow, Russia, p. 33.
7. Schierling B., Noel A.J., **Thi H.L.**, Wende W., Pingoud A. Development of a photoswitchable restriction enzyme. // Abstract book of Asia Link Workshop «Human Resources Development in the Study of Nucleic Acids», 2008, Chania, Greece, p. 33.
8. Орецкая Т.С., **Ле Тхи Хиен**, Ян Фань, Федотова Е.А., Хомякова Е.А. Модифицированные олигонуклеотиды: химия и молекулярно-биологические исследования. // Сборник материалов IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, 2008, Новосибирск, Россия, с. 99.
9. **Ле Т.Х.**, Зацепин Т.С. Синтез модифицированных олигонуклеотидов для «обратимого лигирования» на ДНК-матрицах. // Материалы международной научной конференции молодых ученых «Ломоносов-2007». Химия. Цикл наук о живом. Москва, Россия, с. 520.