

Модулирование нуклеазной активности Флар-эндонуклеаз на примере РНКазы Н бактериофага Т4

Кузницын Р.А., Холод Н.С., Шляпников М.Г., Грановский И.Э.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН);
rafailkuzn@gmail.com

Флар-эндонуклеазы являются одними из ключевых ферментов, участвующих в таких процессах метаболизма ДНК, как репликация, рекомбинация и репарация. Семейство FEN1 структурно специфичных Флар-эндонуклеаз является наиболее охарактеризованным. Известно, что нуклеазы семейства FEN1 проявляют 5'-экзо- и флар-эндонуклеазную активности в отношении широкого диапазона РНК- и ДНК-субстратов. РНКазы Н бактериофага Т4 является типичным представителем нуклеаз семейства FEN1. Основная функция РНКазы Н заключается в удалении РНК-затравок при синтезе отстающей цепи репликативной вилки, но помимо этого фермент обладает также 5'-экзо- и флар-эндонуклеазной активностями на двунитевой ДНК. На сегодняшний день большинство белков бактериофага Т4, вовлеченных в процессы репликации и рекомбинации, выделены и охарактеризованы *in vitro*, поэтому фаг Т4 является удобным модельным объектом для изучения этих процессов.

Исследования условно летальных мутантов бактериофага Т4 показали, что выключение генов 46 и 47 (кодируют комплекс Mre11/Rad50) приводит к фенотипу "DNA arrest" (DA), который проявляется в остановке синтеза ДНК в позднее время инфекции и снижению выхода фага. Отобранные в результате спонтанного мутагенеза фаги, способные частично супрессировать DA-фенотип и давать жизнеспособное потомство, получили название *das*-мутанты (от англ. DNA arrest suppressor). Было установлено, что *das*-мутации приводят к заменам в РНКазе Н, которые находятся вне каталитического центра фермента. Более того, биохимический анализ выявил, что одиночные замены V43I или M42I приводят к значительному повышению экзонуклеазной активности РНКазы Н *in vitro*.

На основании анализа структуры РНКазы Н установлено, что замены M42 и V43 лежат на спирали Н2, причем функциональные группы этих аминокислотных остатков ориентированы в разные стороны - в направлении спиралей Н1 и Н4, соответственно. Спираль Н1 непосредственно участвует в расплетании двухцепочечной ДНК, а спираль Н4 взаимодействует с разветвленным участком ДНК-субстрата. Молекулярное моделирование позволяет предположить, что V43 взаимодействует с S107, находящимся на спирали Н4, а M42 – с F32, лежащим на спирали Н1, определяя относительное положение данных спиралей и характер их взаимодействия с субстратом. Для проверки этого предположения был проведен мутагенез гена РНКазы Н и получены очищенные препараты следующих мутантных форм фермента: S107T, S107G и F32A, содержащие единичные замены, а также двойные замены V43I, S107T; V43I, S107G и M42I, F32A. Биохимический анализ показал, что замена в 107 положении действительно влияет на экзонуклеазную активность фермента *in vitro*: S107G снижает действие V43I, тогда как S107T усиливает эффект. Также было обнаружено, что замена F32A в большей степени влияет на эндонуклеазную активность РНКазы Н. Как оказалось, эндонуклеазная активность двойного мутанта M42I, F32A драматически падает, тогда как экзонуклеазная активность практически не меняется по сравнению с ферментом дикого типа. Таким образом, изменяя взаимодействие и относительное положение спиралей Н1, Н2 и Н4 в структуре РНКазы Н фага Т4 можно модулировать соотношение экзо- и эндонуклеазной активностей фермента.