

**Изучение пространственных особенностей
взаимодействия гиразы (ДНК-топоизомеразы II) и
пентапептидного белка qnrB**

Автор: Труфанов Павел Валерьевич

Класс: 11

Научный руководитель: Метелев Михаил Васильевич

Содержание

Введение.....	3
Строение и общий механизм работы топоизомеразы II.....	3
Ингибирование гиразы антибиотиками.....	4
Плазмидная устойчивость к антибиотикам.....	4
Цель работы.....	5
Методы.....	5
Результаты.....	8
Выводы.....	9
Выражаю благодарность.....	10
Список литературы.....	10

Введение

Гириза – один из важнейших ферментов прокариотических клеток, ответственный за топологические состояния молекулы ДНК, совершающий «хирургические операции» с её нитями [6]. Гириза является уникальным ферментом, который способен создавать отрицательную сверхспирализацию кольцевой ДНК бактерий. Отрицательная сверхспирализация играет ключевую роль в регуляции экспрессии генов микроорганизмов.

В процессе репликации молекулы ДНК естественно повышается натяжение её нитей. Строение и механизм работы гиризы обеспечивают возможность *переброски* нитей ДНК. В итоге образуются отрицательные сверхвитки, что ослабляет напряжение. Затрачивая две молекулы АТР, гириза делает разрыв в одной из цепей ДНК и пронесит сквозь него вторую цепь. Далее происходит лигирование порванного участка (рис. 1).

Строение и общий механизм работы топоизомеразы II

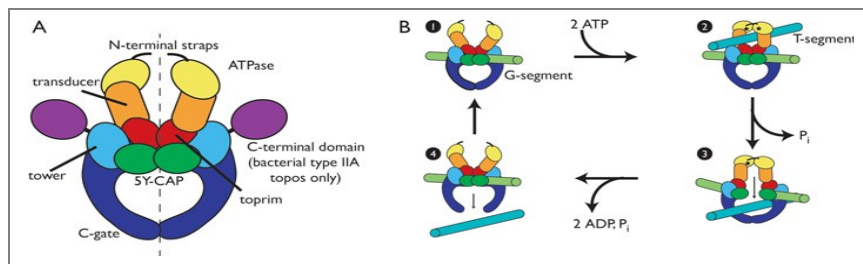


Рис. 1. А. Строение ДНК-топоизомеразы II. АТР-азные домены: *GHKL* [*gyrase histidine kinase and MukL*] (окрашены жёлтым) и *transducer*-домены (оранжевые); домены *gates*: *toprim* и *5Y-CAP* [*catabolite gene activator protein*]; *C-gate* (тёмно-синий); *CTD*-домен (фиолетовый); В. Схема механизма работы гиризы.

Топоизомераза представляется собой тетрамер из двух А и двух В, субъединиц. Субъединица В состоит из АТР-азного домена и домена *toprim*, которые играют ключевую роль в топологических операциях. Остальные домены, изображенные на рис. 1, являются составляющими субъединицы А. Домены *toprim* и *5Y-CAP* контролируют прохождение нити ДНК сквозь фермент связывая одну из цепей ДНК, так называемые *G*-сегмент (*gate segment*). Вторая нить ДНК, *T-segment* (*transfer segment*), захватывается в результате АТР-зависимой димеризации АТР-азных доменов, что ведёт к разрыву *G*-сегмента. Далее *T*-сегмент проходит сквозь этот разрыв. Затем *G*-сегмент лигируется и ещё один димерный интерфейс – *C-gate* – обеспечивает возможность выхода *T*-сегмента. Получившийся АDP отщепляется и фермент готов к новому каталитическому циклу. В клетке этот механизм позволяет гиризе катализировать повышение и понижение внутримолекулярного напряжения ДНК, преобразовывать топологию молекулы ДНК и, тем самым активно управлять хромосомными суперструктурами.

Ингибирование гиразы антибиотиками

Нарушения каталитического цикла могут приводить к смертельным для клетки двуцепочечным разрывам цепей ДНК.

Гираза является уникальным ферментом прокариот, этого фермента нет у эукариотических организмов (в том числе и у человека), поэтому она является важной мишенью для антибактериальных препаратов.

Изучение механизма работы гиразы имеет потенциальное значение для проектирования и синтеза антимикробных препаратов, ингибирующих ДНК гиразу и соответственно имеет важное медицинское значение.

В настоящее время выделяют два класса антибиотиков, ингибирующих гиразу:

1. **аминокумарины**, конкурируют за связывание с активным центром, находящемся в В субъединице (GyrB).
2. **хинолоны**, связываются с гиразой и стабилизируют состояние разрыва G-сегмента ДНК, таким образом, блокируя деятельность фермента в промежуточной стадии цикла, что может послужить причиной двуцепочечного разрывов ДНК и гибели клетки. Устойчивость к хинолонам зачастую связана с накоплением мутаций в ДНК гиразе.

Плазмидная устойчивость к антибиотикам

Недавно был открыт абсолютно новый механизм устойчивости. Он связан с защитой ДНК-гиразы белком qng, ген которого находится на плазмиде. Было установлено, что наличие плазмиды несущей qng повышает устойчивость к фторхинолонам в несколько раз. Плазмиды являются мобильными элементами микроорганизмов и способны передаваться между патогенными штаммами бактерий, делая их устойчивыми к антибиотикам.

Клонирование и последующее секвенирование обнаруженного гена *qnr* показало, что соответствующий ему белок qng является белком, содержащим пентапептидные повторы (*pentapeptide repeat proteins [PRP]* [4]). В настоящее время найдено уже много PRP, которые блокируют действие хинолонов *in vivo* и *in vitro* [5].

В данной работе предполагалось выяснить особенности взаимодействия гиразы с PRP qngB. Полученные данные могут быть использованы для определения механизма защиты гиразы с помощью PRP и проектирования антибактериальных препаратов, эффективность которых не ослаблялась бы действием этих белков.

Белок qngB представляет собой димер из двух одинаковых цепей, которые соединяются С-концами. Белок состоит из пентапептидных повторов и закручен в спираль. Целый белок имеет продолговатую форму и диаметр спирали, схожий с таковым в молекуле ДНК (рис.2).

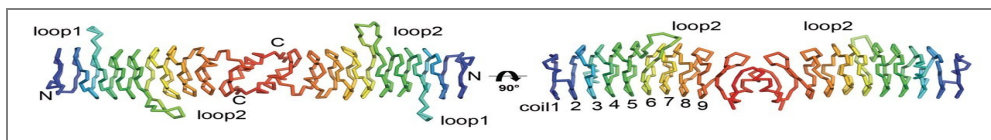


Рис.2. Пентапептидный белок qnrB.

QnrB повышает минимальную ингибирующую концентрацию микроцина В и ципрофлоксацина в 4-8 и 60 раз соответственно.

Таким образом, изучение взаимодействия qnrB и гиразы имеет несомненный научный интерес и является потенциально полезным для решения ряда проблем в молекулярной биологии и медицине.

Данная работа проводилась под научным руководством Михаила Метелева и в рамках его исследований в лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ИБГ РАН.

Цель работы

Целью было уточнение механизма связывания ДНК гиразы с QnrB, определение доменов ДНК гиразы, ответственных за связывание с QnrB.

Также необходимо отметить, что работа носила преимущественно учебный характер, и кроме указанной научной цели, была поставлена также цель ознакомления с некоторыми важными методами молекулярной биологии.

Методы

Сначала были выбраны фрагменты гиразы, для которых планировалось выяснить наличие или отсутствие связывания друг с другом и qnrB.

Было выбрано шесть фрагментов:

- gyrA_full – цепь А целиком;
- gyrB_full – цепь В целиком;
- gyrA_(1-525) – цепь А, первые 525 нуклеотидов;
- gyrA_CTD – боковой домен цепи А;
- gyrB_toprim – центральный домен, входящий в состав gates;
- gyrB_ATPase – АТР-азный домен цепи В.

Исследуемый фрагмент гена амплифицировался с помощью ПЦР, для этого использовались специально заказанные праймеры, соответствующие концам фрагмента. Далее он вставлялся в бактерии *Escherichia coli* в составе pJet-вектора, куда был помещён также с помощью ПЦР. pJet-вектор – это плазмида, содержащая ряд генов, кодирующих отборочные признаки. Плазмида помещается в бактерию методом электропорации. Далее бактерии выращиваются в среде, где выживают только клетки, получившие плазмиду, хотя их и меньший процент.

Главные элементы pJet – это ген устойчивости к антибиотику (ампициллину) и ген, содержащий внутри себя сайт, куда может встраиваться продукт ПЦР. Если вставка не происходит, и две части сайта не разобщены, тогда ген является убийственным для клетки. Таким образом выжить могут только клетки, получившие pJet, содержащий вставку. В итоге эти клетки образовывали колонии на питательной среде, содержащей ампициллин.

Вышеназванные действия предпринимались для «очистки» генетического материала — отделения необходимых участков ДНК от прочих продуктов ПЦР. После этого ДНК из бактерий выделяли, для чего использовался специальный kit, и с помощью электрофореза разгоняли. Участки ДНК проходят в геле расстояние соответствующее длине цепи. Так мы могли получить изолированный pJet со вставленным в него фрагментом топоизомеразы, который затем вырезался из pJet-вектора с помощью рестриктазы и вставлялся в другой вектор, один из элементов *дигибридной системы* [3].

Дигибридная система (ДС) была ключевым инструментом в данной работе. Она является генетическим подходом для обнаружения взаимодействий между белками *in vivo* и основана на нахождении любого достаточно сильного взаимодействия между двумя белками, способного активировать транскрипцию. В ДС один из взаимодействующих белков, прикреплён к ДНК через оператор транскрипции, а второй связан с субъединицей бактериальной РНК-полимеразы (РНКП) (рис.3.).

Для сведения всех элементов в одну систему необходимы три вектора (рис.4.). Один вектор содержит оператор транскрипции и один из исследуемых белков (qnrV или один из фрагментов гиразы). Второй вектор кодирует ДНК-связывающий домен РНКП и другой белок (qnrV или другой фрагмент гиразы), прикреплённый к домену. Третий вектор (*reporter*) содержит *lacZ*. С этого вектора происходят итоговые транскрипция и трансляция. Важным условием является отсутствие гена *lacZ* в бактериальной хромосоме.

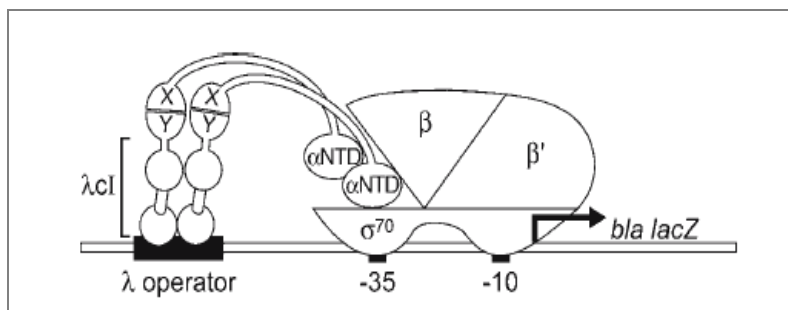


Рис. 3. Схема инициации транскрипции в дигибридной системе. Домены X и Y, двух изучаемых белков соединены, соответственно, с α -NTD и λ cI – активаторами транскрипции с тест промотора. β , β' , и σ^{70} – это субъединицы бактериальной РНКП. Тест промотор управляет экспрессией гена *lacZ* [1].

Ген *lacZ* кодирует β -галактозидазу – белок, способный расщеплять дисахариды. Среда, в которой проверялась дигибридная система, содержала col-галактозу (col-Gal), где col – краситель, соединённый с галактозой. При достаточном сродстве белков X и Y, транскрипция инициируется, и синтезируется РНК, содержащая ген *lacZ*. Далее в клетке вырабатывается β -галактозидаза, которая расщепляет col-Gal на галактозу и краситель col, который окрашивает колонии *E. coli* в красный цвет. Интенсивность окрашивания соответствует степени сродства белков.

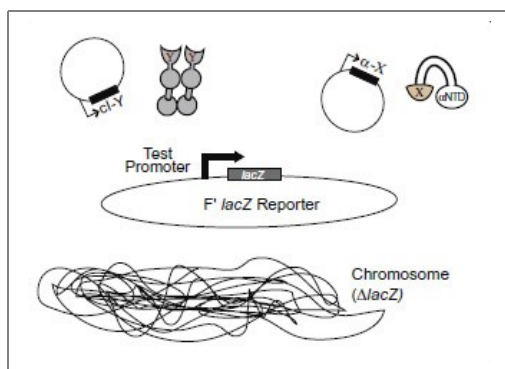


Рис. 4. Дигибридная система ^[1].

Результаты

QnrB и выбранные части гиразы включались в дигибридную систему в разных сочетаниях. Исходя из полученных результатов, можно судить о сродстве пептидных цепей.

Наиболее важным было выяснить, к каким участкам фермента имеет сродство qnrB, т.к. это дало бы возможность определить локализацию точек связывания. Такое взаимодействие достаточно хорошо наблюдалось лишь с gyrA (1-525). Также было, но более слабое, взаимодействие с gyrB full и при этом отсутствие такового у qnrB с изолированными доменами В цепи. Последний факт является важным результатом. Он говорит о необходимости наличия некой конформации, специальной формы и определённых размеров конструкции субстрата, для возможности положительной гибридизации с qnrB. Поэтому взаимодействие лишь с частью гиразы, с В цепью, слабее, чем с целым белком, а с отдельными доменами его вообще нет. Суть в целостности всей системы топоизомеразы.

Полные цепи не имеют положительного связывания между собой, потому что при изоляции их друг от друга нарушается конформация, необходимая для формирования целого фермента.

Димеризация наблюдалась у qnrB, а так же у gyrA (1-525).

Имелось также положительное связывание gyrA full и gyrB toprim, что связано, очевидно, с их близким расположением в молекуле.

Можно предположить, что gyrA (1-525) – наиболее важная структурная часть гиразы, т.к. с ней обнаружено максимум (пять) взаимодействий.

Видимо, за связывание с qnrB ответственны gyrA (1-525) и часть полной цепи В. QnrB с gyrB toprim не взаимодействует, значит в В цепи в связывании участвуют АТР-азные домены. В gyrA (1-525) взаимодействие может обуславливать та часть, которая ближе к АТР-доменам, т.к. длина qnrB не достаточно велика для того чтобы взаимодействовать со слишком отдалёнными друг от друга доменами фермента. В таком случае больше всего подходит домен 5Y-CAP.

Логично предположить, что схожесть qnrB с небольшим участком молекулы ДНК имеет некоторое значение в эффективности повышения устойчивости клетки к антибиотику. Т.о. включение гена qnr в геном крайне выгодно для бактерий: белок имеет идеальные стерические характеристики для того чтобы заменить собой ДНК в гиразной реакции. Это блокирует молекулу гиразы, но в то же время препятствует связыванию с гиразой антибиотика. К тому же, ген qnrB располагается на плазмиде, что позволяет бактерии использовать его лишь в случае необходимости.

Такие результаты подтверждаются дальнейшим исследованием вопроса с использованием 3D-моделей гиразы и qnrB (М.Метелев).

Табл. 1. Результаты.

	gyrA full	gyrB full	gyrA (1-525)	gyrA CTD	gyrB toprim	gyrB ATPase	qnrB
gyrAfull	-	-	+	-	+	-	-
gyrBfull	-	-	+	+/-	-	-	+/-
gyrA (1-525)	+	+	+	-	+	-	+
gyrA CTD	-	+/-	-	+	+	-	-
gyrB toprim	+	-	+	+	-	-	-
gyrB ATPase	-	-	-	-	-	-	-
qnrB	-	+/-	+	-	-	-	++

Выводы

1. В связывании ДНК-топоизомеразы II с PRP qnrB наиболее важен участок фермента gyrA (1-525);
2. Ответственные за взаимодействие точки находятся также в АТР-азных доменах и, возможно, в домене 5Y-CAP;
3. Для защиты гиразы от антибиотика важную роль играет соответствие форм и размеров самой гиразы с таковыми qnrB.

Выражаю благодарность

Михаилу Васильевичу Метелеву за научное руководство в работе;

Северинову Константину Викторовичу за предоставление возможности практики на базе ИБГ РАН;

Учителям: Бабенко Евгению Борисовичу, Ракитиной Наталии Григорьевне за помощь в организации работы;

Тихомирову Алексею Владимировичу за комментарии к докладу.

Список литературы

1. **Bryce E. Nickels**, «Genetic assays to define and characterize protein–protein interactions involved in gene regulation», Waksman Institute and Department of Genetics, Rutgers, The State University of New Jersey, 190 Frelinghuysen Road, Piscataway, NJ 08854, United States;
2. **A.J. Schoeffler and J.M. Berger**, «Recent advances in understanding structure–function relationships in the type II topoisomerase mechanism», Department of Molecular and Cell Biology, University of California;
3. **Simon L. Dove and Ann Hochschild** «A Bacterial Two-Hybrid System Based on Transcription Activation»;
4. **Vetting M.W. et al.** «Pentapeptide repeat proteins», *Biochemistry*. 2006 Jan 10;45(1):1-10;
5. **Перельман С.** «Структурно-функциональный анализ белка McbG» ИБГ РАН, М. 2010
6. **Сосинский А.Б.** «Узлы. Хронология одной математической теории» 2005. 112 с.