

Рекомбинантная дуплекс - специфическая нуклеаза (ДСН).

Анисимова В.Е.; Щеглов А.С., Богданова Е.А., Лукьянов С.А.

молодой ученый; сотрудники; зав. лаб. член-корр РАН.

Институт Биоорганической Химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; Москва, Россия

E-mail: evanika@yandex.ru; jukart@mail.ru; katya@ibch.ru; luk@ibch.ru

Ранее в нашей лаборатории из гепатопанкреаса камчатского краба был выделен и охарактеризован новый фермент – ДСН. Аминокислотная последовательность этого белка гомологична последовательностям РНК, ДНК - неспецифических нуклеаз. Ферменты этой группы эффективно гидролизуют как РНК, так и ДНК, как одно цепочечную (о.ц.), так и двух цепочечную (д.ц.). Однако ДСН гидролизует только д.ц. ДНК, и не взаимодействует с о.ц. ДНК и РНК. Уникальная субстратная специфичность, с одной стороны, и первичная структура, характерная для неспецифического фермента – с другой, делают структурно - функциональную организацию ДСН очень интересной. Для изучения структурно-функциональной организации фермента необходимо получить рекомбинантный белок в активном виде. Мы клонировали и экспрессировали ДСН в клетках *E. coli*. Поскольку при этом исследуемый белок полностью выпадал в тела включения, мы разработали систему его выделения и ренатурации. Поскольку все РНК, ДНК - неспецифические нуклеазы, за исключением нуклеазы королевской креветки, филогенетически далеки от ДСН, мы клонировали несколько нуклеаз, гомологичных ДСН, из других видов ракообразных. Мы сравнили аминокислотные последовательности ДСН и других неспецифических эндонуклеаз, а также оценили их филогенетическое сходство. Анализ филогенетического сходства показал, что представители семейства РНК, ДНК - неспецифических нуклеаз делятся на 2 больших группы: группу ДСН-подобных нуклеаз и группу Sm-подобных («классических») нуклеаз. Выравнивание аминокислотных последовательностей выявило различие этих двух групп ферментов: ДСН – подобные нуклеазы содержат дополнительную «вставку» из 20–25 аминокислот, разделяющих остатки, гомологичные активному центру Sm-подобных нуклеаз. Кроме того, согласно выравниванию, нуклеазный домен ДСН-подобных нуклеаз включает большее число аминокислотных остатков, чем предсказывают соответствующие программы. Изучение нуклеазного домена ДСН проводилось параллельно двумя взаимодополняющими методами: точечным мутагенезом предполагаемых аминокислот активного центра и созданием укороченных вариантов белка, с последующей экспрессией и функциональным анализом. Мы показали, что этот домен действительно включает значительно большее количество остатков, чем нуклеазный домен Sm-подобных нуклеаз. Активный центр ДСН отличается от такового Sm нуклеазы: некоторые аминокислотные остатки ДСН, гомологичные каталитическим остаткам Sm-нуклеазы, практически не влияют на активность ДСН. ДСН, лишенная 87 N-концевых аминокислот (ДСН-ф3), сохраняла нуклеазную активность, тогда как делеция более протяженных участков приводила к утрате активности. Однако свойства ДСН-ф3 существенно отличаются от свойств ДСН: его удельная активность примерно в 1000 ниже, он утрачивает специфичность, устойчивость к протеиназе К и термостабильность. Эти данные позволяют нам предположить следующую эволюционную гипотезу: ДСН-подобные нуклеазы возникли из обычной неспецифической нуклеазы, которая случайным образом увеличилась приблизительно на 100 аминокислот. Дальнейшая эволюция привела к «включению» этого участка в новообразованный домен. Именно этот участок позволил «развить» предпочтение двух цепочечного субстрата. Кроме того, на основании вышеперечисленных данных мы выделили ДСН и подобные ей нуклеазы в отдельное семейство.