

Молекулярная мимикрия против «иммиграционного контроля»

Доктор биологических наук,
профессор
Г.Б.Завильгельский,
кандидат биологических наук
С.М.Расторгуев

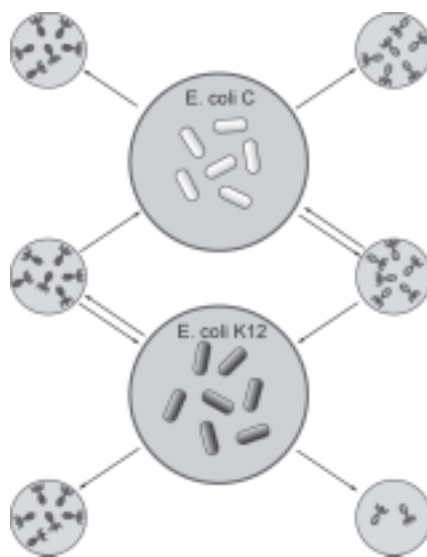
Что такое мимикрия, мы знаем с детства: достаточно вспомнить мир насекомых. Это и бабочки, например белянки, похожие на несъедобных геликонид, и разнообразные мухи-журчалки, или сирфиды, неотличимые от ос, шмелей и пчел по своей желто-черной полосатой окраске, отпугивающей птиц, и зеленые кузнечики и гусеницы, похожие на травинки, и многие другие.

Что такое иммиграционный контроль, известно каждому, кто хоть раз пересекал границу и показывал пограничникам свой паспорт с отметкой визы.

Но при чем тут микроорганизмы? Чтобы ответить на этот вопрос, нам придется вернуться в 1953 год. Именно тогда были опубликованы две статьи, вошедшие в историю современной биологии. Первая — статья Дж.Уотсона и Ф.Крика в «Nature» о двойной спирали ДНК — имела огромный успех, а ее авторы вскоре стали лауреатами Нобелевской премии. Вторая, статья Г.Бертани и Дж.Вейгла в «Journal of Bacteriology», привлекла внимание лишь специалистов-микробиологов.

В опыте Бертани — Вейгла на первый взгляд не было ничего особенно интересного. Бактериальный вирус — бактериофаг лямбда, прошедший цикл развития на штамме бактерий *Escherichia coli C*, при высева на другом штамме (*Escherichia coli K12*) обнаруживал резкое снижение титра (примерно на четыре порядка) по сравнению с титром при высева на изначальном штамме (рис. 1). Но это узкоспециальное наблюдение привело к открытию систем рестрикции — модификации ДНК, а без них было бы невозможным создание генетической инженерии. (Нобелевскую премию за открытие систем рестрикции — модификации значительно позже, в 1978 году, получили В.Арбер, Г.Смит и Д.Натанс, которые расшифровали механизм действия рестриктаз и метилаз.)

В этой статье рассказано об «анти-рестрикции» — явлении, в котором



1
Схема опыта Бертани — Вейгла: открытие феномена рестрикции — модификации. Бактерии Escherichia coli K12 содержат фермент рестрикции — модификации EcoKI; бактерии Escherichia coli C его не содержат. Поэтому, если заразить фагом лямбда клетки E.coli C, то ДНК фагов-потомков будет немодифицированной. В штамме K12 их ДНК деградирует, и фага становится мало, однако при пересеве на E.coli C он продолжает благоденствовать. Фаги, выросшие в суровых условиях — в штамме K12, успешно размножаются в обоих штаммах

неожиданным и удивительным образом соединились двойная спираль Уотсона — Крика, мимикрия и система рестрикции — модификации ДНК.

Молекулярная таможня

Ферментные системы рестрикции — модификации у бактерий представляют собой аналог иммиграционного контроля на клеточно-молекулярном уровне. В бактериальную клетку могут проникать молекулы ДНК, «свои» (например, от другой бактерии во время обмена генетическим матери-

алом — об этом мы расскажем чуть позже) или «чужие» (например, при заражении бактериофагом). Понятно, что клетка должна уметь различать «свою» и «чужую» ДНК и при необходимости избавляться от чужой. Для этого и существуют рестрикция и модификация.

Рестрикционные эндонуклеазы, или рестриктазы, делают в ДНК разрывы. Но не где попало: каждая рестриктаза ориентируется только на свою, специфическую последовательность «букв»-нуклеотидов — так называемый сайт рестрикции. (Эта способность аккуратно разрезать ДНК и сделала рестриктазы бесценным инструментом в руках генных инженеров.)

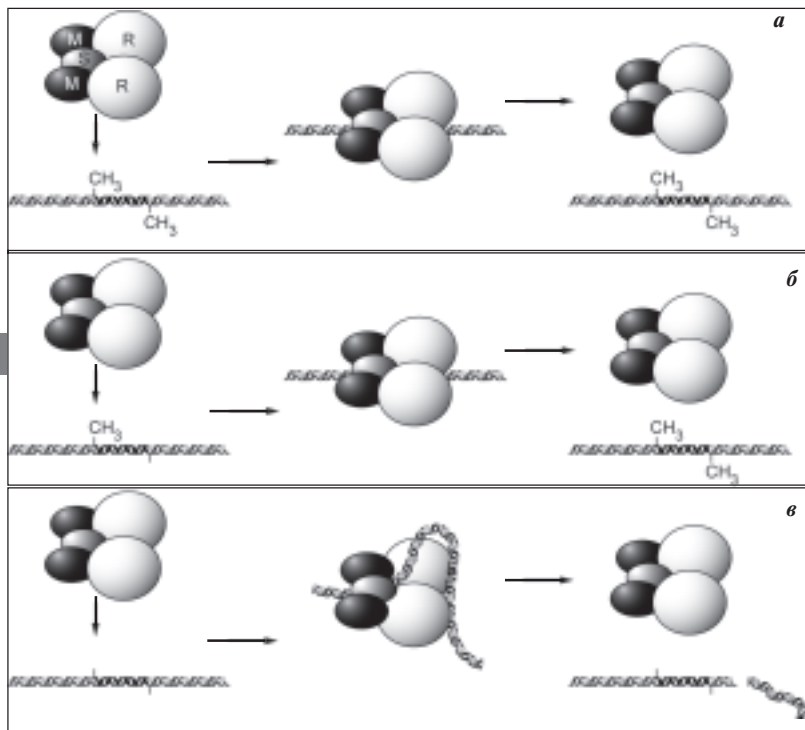
Вот, например, сайт, который узнает фермент рестрикции — модификации штамма кишечной палочки *EcoKI* (этот сайт обозначается как SK).
5'-AACNNNNNNGTGC-3'
3'-TTGNNNNNNNCACG-5'

(A — аденин, T — тимин, C — цитозин, G — гуанин, N — произвольное азотистое основание.)

Выделены аденины (A), которые фермент метилирует — присоединяет к ним группу CH₃ в шестом положении пуринового кольца. Это и есть модификация, вторая активность фермента. Зачем она нужна?

Порезать на кусочки опасную чужую ДНК — дело полезное. Но что, если сайт рестрикции встретится в собственной ДНК бактерии? «Родную» ДНК от расщепления защищает метилирование: фермент пришивает метильные группы к узнаваемым последовательностям. Если рестриктазы — это суровые пограничники, то метилтрансферазы — внутриклеточные визовые службы, которые выдают всем, кому положено, молекулярный паспорт для прохождения иммиграционного контроля. А работают те и другие в самом тесном контакте.

Фермент *EcoKI* состоит из пяти субъединиц, R₂M₂S (рис. 2). Две R-субъединицы (от «рестрикционная эндонуклеаза») расщепляют немодифицированную, то есть чужую, ДНК. Две M-субъединицы (от «метилтрансфераза») метилируют адениловые



2
 Вот так фермент рестрикции — модификации проверяет «паспорт» у ДНК:
 а — обе нити ДНК в сайте sK метилированы; комплекс распадается;
 б — одна из нитей ДНК в сайте sK метилирована; метилаза (M) присоединяет CH_3 к адениловому остатку во второй нити;
 в — обе нити в сайте sK не метилированы, значит, ДНК чужая; фермент протаскивает ее через R-субъединицы и затем разрывает

остатки в сайте — ставят штамп визы. S-субъединица — это «узнаваза»: именно она узнает sK-сайт в ДНК и формирует с ним прочный комплекс. Дальнейшие действия фермента зависят от состояния сайта. Если обе нити в нем метилированы, то фермент покидает ДНК: паспорт в порядке. Если одна из нитей метилирована, а вторая — нет (например, потому, что вторая недавно синтезирована), то метилаза M присоединяет CH_3 -группу к соответствующему адениловому остатку, и только после этого комплекс диссоциирует. Если же обе нити ДНК не метилированы — это означает, что ДНК чужая. И тут вступает в силу неумолимый закон рестрикционной активности.

Перед разрезанием неметилированной ДНК происходит ее транслокация — протаскивание двуспиральной нити через R-субъединицы, причем связь S-субъединицы с сайтом сохраняется. Фермент *EcoKI* относится к рестриктазам I типа: он расщепляет нить ДНК в случайно выбранном месте на значительном расстоянии от сайта, в отличие от рестриктаз II типа, которые делают двойные разрывы в ДНК непосредственно в сайте «узна-

вания». Протаскивание нити ДНК через фермент требует значительных энергетических затрат, поэтому рестриктазы I типа являются АТФ-зависимыми, а рестриктазы II типа — АТФ-независимыми. Далее у нас пойдет речь только о рестриктазах I типа.

Отметим еще одну особенность комплекса *EcoKI* с sK-сайтом. S-субъединица связывается лишь с крайними константными элементами сайта, AAC и GTGC. В результате биспиральная ДНК в этом месте претерпевает деформацию — значительный изгиб, что также требует энергетических затрат.



3
 Конъюгативный перенос плазмиды. В сайте *OriT* фермент никаза делает односторонний разрыв, к нему прикрепляется ДНК-праймаза и начинает синтезировать вторую нить для переноса в бактерию-реципиент. На оставшейся в клетке-доноре кольцевой ДНК синтезируется комплементарная нить

Рестрикционный барьер непроницаем для любой чужеродной ДНК, каким бы способом она ни проникла в клетку — при инъекции из фаговой головки, при трансформации (внедрении в клетку чужеродной ДНК по воле экспериментатора) или при конъюгативном переносе. О том, что это такое и почему некоторым чужакам все-таки удастся проскользнуть мимо пограничников, мы поговорим в следующей главе.

Плазмиды и антирестрикция

Конъюгация — особый вид контакта между бактериальными клетками, при котором они соединяются перемычкой, как сообщающиеся сосуды. А конъюгативный перенос — это перемещение из клетки в клетку особых молекул ДНК, плазмид. Они могут быть кольцевыми или линейными, состоят в среднем из 100 тысяч пар нуклеотидов. Плазмиды способны к самокопированию, что сближает их с вирусами. Однако они не могут стабильно существовать вне бактериальной клетки и, следовательно, должны считаться симбионтами. (Почему симбионтами, а не паразитами — об этом чуть позже.)

Успех для плазмиды, как и для всех живых организмов, вплоть до самых сложных, — это стабильность существования, быстрое размножение и распространение в природе. Эти задачи плазмиды решает с помощью двух групп генов, ответственных за репликацию плазмидной ДНК и за конъюгативный перенос. Они занимают, как правило, более половины длины плазмиды. Обе группы генов необходимы, иначе плазмиды не будут реплицироваться (то есть размножаться) и не смогут переноситься из клетки в клетку. Кроме того, в плазмиде содержатся гены, помогающие переносу (назовем их генами-помощниками), — это еще примерно 10—15 тысяч пар нуклеотидов. Оставшаяся часть плазмиды бывает заполнена «случайными» элементами, такими, как транспозоны, содержащие гены

резистентности к антибиотикам, тяжёлым металлам, гены вирулентности и т. д. Плазмида может содержать и фрагменты генов других организмов. Отсюда понятно, что многие плазмиды несут и полезную для бактерии генетическую информацию: неплохо, к примеру, заразиться от клетки-соседа умением жить в среде с антибиотиком!

Область, в которой располагаются гены-помощники, называется «лидерной», так как она примыкает к сайту *oriT*. Этот сайт — начало (*origin*) конъюгативной репликации: отсюда плазмида начинает копироваться, с тем чтобы копия была отправлена в другую клетку. Среди генов «лидерной» области подробно изучены только четыре гена. В этой статье пойдет речь о генах *ard*.

В процессе эволюции как у конъюгативных плазмид, так и у некоторых бактериофагов возникли системы, способствующие преодолению рестрикционных барьеров. Это явление получило название антирестрикции.

Оказалось, что конъюгативным плаздам безопасность обеспечивает специальный белок — антирестриктаза, который как раз и кодируется геном *ard* (*alleviation of restriction of DNA*). Впервые гены *ard* обнаружил один из авторов этой статьи, Г.Б.Завильгельский, с коллегами еще в 1984—1985 годах. А в начале 90-х нами и группой английских ученых во главе с Б.Уилкинсом гены *ard* были секвенированы и определена первичная структура белков *Ard*.

Гены *ard* (к настоящему времени известно несколько их разновидностей, которые получили индексы *ardA*, *ardB*, *ardC*) кодируют небольшие, очень кислые белки — ингибиторы клеточных рестриктаз — метилтрансфераз I типа. Показано, что гены *ard* играют важную роль в «жизненном цикле» конъюгативных плазмид, помогая им преодолевать рестрикционные барьеры при переносе из одного вида бактерий в другие.

Интересно, что у двух бактериофагов, T7 и P1, также имеются гены, кодирующие белки-антирестриктазы: эти белки называют соответственно *Osc* и *DarA*. Однако этот пример уникален. Нужно иметь в виду, что у фага

в принципе больше возможностей преодоления межклеточных рестрикционных барьеров, чем у плазмиды. Фаги (кроме так называемых умеренных) используют бактериальную клетку не для совместного существования, а лишь для размножения и затем разрушают ее.

Белки-антирестриктазы (как плазмидные, так и фаговые) ингибируют только ферменты систем рестрикции — модификации I типа, гены которых расположены, как правило, в хромосоме бактерий, но не рестрикционные эндонуклеазы II типа, гены которых обычно расположены на плазмидах.

Поддельный паспорт

В 2000 году мы предположили, что антирестриктазы семейства *Ard*, а также некоторые другие мимикрируют под ДНК. Это отнюдь не метафора: сегодня термин «белковая мимикрия ДНК» (*protein mimicry of DNA*) прочно вошел в обиход, и этот термин абсолютно точно описывает наблюдаемое явление. Судите сами: строение молекулы антирестриктазы напоминает В-форму ДНК (то есть обычную спираль), причем распределение по поверхности белка отрицательных зарядов, создаваемых остатками аспарагиновой и глутаминовой аминокислот, имитирует распределение отрицательно заряженных фосфатных групп по поверхности ДНК (рис. 4). Активная форма фаговой антирестриктазы *Osc*, представленной на рисунке, — это димер (*Osc*)₂, причем важен угол между продольными осями мономеров. Если он близок к 34°, димер наиболее точно подражает форме биспиральной ДНК, имеющей в центре изгиб (кинк).

С позиции классического ферментативного катализа механизм антирестрикции представляет собой пример конкурентного ингибирования: молекула-ингибитор, структурно подобная субстрату, занимает активный центр фермента. Цель мимикрии ясна: обмануть иммиграционный контроль. Антирестриктаза вытесняет нить ДНК из комплекса с ферментом и сама занимает ее место. Пока фермент занят изучением поддельного документа, конъюгативная плазмида или бактериофаг избегает досмотра.

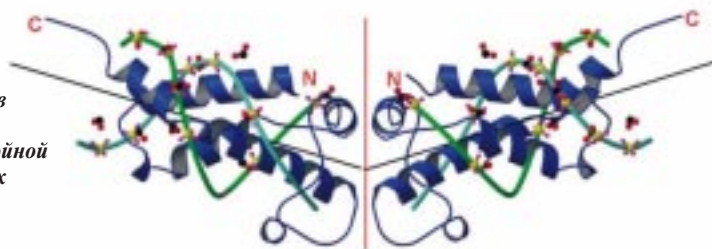
Теперь рассмотрим чуть подробнее, как работают антирестриктазы.

Выяснилось, что *ArdA* и фаговая антирестриктаза *Osc* ингибируют обе активности фермента — и эндонуклеазную, и модификационную. Логично было предположить, что антирестрикционный белок формирует комплекс с S-субъединицей фермента I типа (*R₂M₂S*), вытесняя ДНК, — естественно, при этом невозможна ни та, ни другая активность. Однако позднее были получены данные о том, что некоторые природные белки *ArdA* ингибируют лишь эндонуклеазную активность фермента *EcoKI*. Гены, кодирующие эти белки, расположены в конъюгативных плазмидах R16 и R64 (эти данные опубликованы в 2003—2004 годах группой Уилкинса и нами). Кроме того, мы показали, что если заменить некоторые аминокислотные остатки в белке *ArdA*, то мутантный белок также будет ингибировать рестрикцию, но не модификацию.

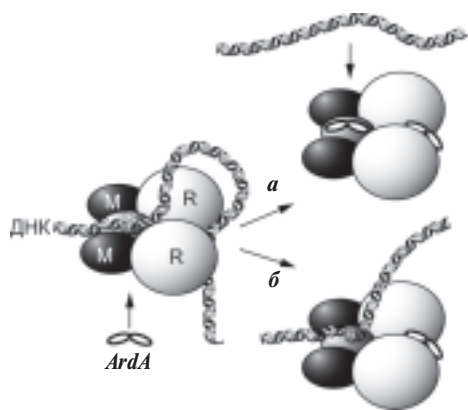
С точки зрения клетки, в которую попадает плазмида с геном *ArdA*, это хорошо: при таких условиях в ней сохраняется нормальный процесс модификации собственной ДНК. Но это значит, что антирестриктаза связывается с ферментом в двух местах: при формировании первого комплекса ингибируются обе активности фермента (эндонуклеазное расщепление и метилирование ДНК), а при формировании второго — ингибируется лишь эндонуклеазная активность, а метилазная сохраняется.

Сравнивая аминокислотные последовательности антирестриктаз *ArdA*, обладающих одной или обеими активностями, мы убедились, что различие между ними весьма незначительно. Причем практически 99%-ное восстановление антимолификационной активности происходило при замене у первого белка одной-единственной аминокислоты.

В качестве рабочей гипотезы мы предложили такую схему взаимодействия белков *ArdA* с ферментами рестрикции — модификации I типа (рис. 5). Белок *ArdA* способен связываться и с S-субъединицей, распознающей sK-сайт, и с R-субъединицей, которая отвечает за транслокацию и эндонуклеазное расщепление немоди-



4
Сотрудники Эдинбургского и Кембриджского университетов во главе с Т. Драйденом построили изображение димера антирестриктазы (*Osc*)₂. На него «наложены» участки двойной спирали, точками отмечено совпадение позиций фосфатных групп ДНК и отрицательно заряженных аминокислотных остатков белка. Мимикрия налицо!



5

Возможно, именно так антирестриктаза ArdA мешает работать ферменту рестрикции — модификации:

а — когда ArdA образует комплекс с S-субъединицей и вытесняет ДНК из активного центра, ингибируются и эндонуклеазная, и метилазная активности фермента;

б — ArdA образует комплекс только с R-субъединицей — фермент метилирует ДНК, но не расщепляет ее

фицированной ДНК. В первом случае выключаются обе активности. Однако эта связь может быть легко нарушена, если белок ArdA (например, из-за точечных мутаций) не образует димера или в этом димере нарушается критический угол между продольными осями мономеров. Связь же ArdA с R-субъединицей, по-видимому, не требует особой структуры димера. Напомним, что в R-субъединице происходит транслокация цепи ДНК, следовательно, комплекс не является сайт-специфичным. Поэтому мутантный ArdA ингибирует лишь рестрикцию, а метилазная активность не мешает — ведь ДНК остается связанной с S-субъединицей, и M-субъединица специфически метилирует адениловые остатки в sK-сайте. И в самом деле, известно, что *in vitro* с EcoKI в форме R₂M₂S связывается два димера, а с метилазной формой M₂S — только один димер (Ocr)₂.

Можно предположить, что константа связывания ArdA с R-субъединицей выше, чем с S-субъединицей. Тогда белки ArdA в естественных условиях при умеренном синтезе, защищая плазмидную ДНК при конъюгативном переносе, будут ингибировать лишь рестрикцию, не затрагивая метилирования. (И выдача паспортов для клеточной ДНК продолжается, и чужаков не предадут смертной казни за нарушение границы.) Только если сконструировать гибридную плазмиду, с ко-

торой пойдет суперпродукция белка ArdA, может иметь место ингибирование обеих активностей фермента.

Как становятся антирестриктазами

Еще одна удивительная особенность антирестриктаз — в том, что их аминокислотные последовательности совершенно не сходны между собой. Так, в бактериальных ArdA, ArdB, ArdC, фаговых Ocr и DarA обнаруживается лишь небольшой гомологичный участок из 14 аминокислотных остатков, который назван «антирестрикционным мотивом». Для него характерно строго постоянное расположение отрицательных зарядов, то есть аспарагиновой и глутаминовой аминокислот, о которых мы уже говорили, а также наличие гидрофобных аминокислот в конце, в середине и в начале.

Мы обратили внимание, что подобный мотив имеется в белках ArsR — репрессорах *ars*-оперонов (ответственны за резистентность бактериальных клеток к ионам мышьяка). И в самом деле, гены *arsR* из бактерии *Acidiphilium multivorum*, введенные в клетки *Echerichia coli* K12, ингибировали фермент EcoKI, подобно антирестриктазам! Заметим, что *ars*-опероны располагаются, как правило, в конъюгативных плазидах, способных к горизонтальному переносу генов между бактериями различных видов.

Пример ArsR наводит на мысль, что самые разные белки, содержащие антирестрикционный мотив, в принципе могут ингибировать клеточные рестриктазы I типа. По-видимому, именно таково происхождение белков ArdB и ArdC, которые, как и репрессор мышьякового оперона, лишь частично ингибируют ферменты рестрикции — модификации. Белок ArdB гомологичен известному киллер-белку KlcA (он убивает клетки, которые утратили плазмиду, несущую ген этого белка), а белок ArdC — белку TraC1 (этот белок — праймаза, фермент, синтезирующий праймер: короткий фрагмент ДНК, который становится началом новой цепи). Отметим, что белок ArdB,

став антирестриктазой, потерял способности киллера. Создается впечатление, что мутации, сформировавшие антирестрикционный мотив, превратили эти белки в ингибиторы рестриктаз, но испортили их прежнюю активность. Однако группу белков ArdA, сходных между собой, вероятно, можно считать истинными антирестриктазами, сформировавшимися в процессе эволюции как противодействие рестрикционному барьеру.

Белковая мимикрия ДНК — новый механизм регуляции

В заключение отметим, что белковая мимикрия известна не только у антирестриктаз. Впервые ее описал в 1999 году Дж.Тайнер с коллегами (США) у белка Ugi, состоящего всего из 84 аминокислотных остатков. Этот белок кодируется бактериофагом PBS2 (его бактерия-хозяин — *Bacillus subtilis*), и он ингибирует фермент, который тоже работает с ДНК, исправляет в ней повреждения — урацил-ДНК-гликозилазу. Позднее подобная мимикрия наблюдалась в эукариотическом рибосомальном факторе элонгации EF-G — белке, «помогающем» рибосоме, который имитировал участок транспортной РНК, и в другом белке, который у эукариот участвует в синтезе РНК на матрице ДНК. (Обратите внимание: речь идет уже не о бактериях, а о высших организмах.) Однако у всех этих белков лишь небольшая часть напоминает по структуре ДНК, тогда как антирестриктазы полностью подобны двойной спирали.

Таким образом, мы можем говорить о новом механизме регуляции активности ферментов, совершающих манипуляции с ДНК. Основной принцип его работы — использование особых белков, имитирующих структуру ДНК. Такие белки формируют комплексы с ферментами, прочно связываясь с участком, ответственным за взаимодействие с ДНК, и тем самым ингибируя активность этих ферментов. Еще один пример изящества и остроумия, с каким природа решает свои задачи.

