Получение и функциональная характеристика рекомбинантного HU-белка из микоплазмы SPIROPLASMA MELLIFERUM.

Эльцина А. А., Ларина Д. С., Степанова М. Г., Корженевский Д. А., Бойко К. М., Ракитина Т. В.
Московский физико — технический институт (Государственный университет)
Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт"
Институт биоорганической химии РАН

ДНК связывающие HU белки («H» от гистоноподобные и «U» от U93 – штамма E. Coli, из которого белок был первоначально выделен [1]) присутствуют во всех бактериях. HU белки можно рассматривать как предшественники гистонов эукариот. Их основная функция состоит в поддержании суперскрученности и компактизации геномной ДНК прокариотической клетки, кроме того, они участвуют в процессах репликации, рекомбинации, репарации транскрипции и адаптации.

Первоначально был изучен HU белок из E. coli, и, в частности, было установлено, что генетический нокаут генов, кодирующих две субъединицы HU белка, хотя и не убивает эту бактерию, но существенно нарушает её ростовые и адаптационные способности [2].

HU белки отсутствуют в эукариотической клетке и поэтому являются потенциальными фармакологическими мишенями для разработки антибактериальных препаратов, востребованных в медицине и ветеринарии. В настоящее время активно проводятся структурно-функциональные исследования HU белков из бактерий, вызывающих инфекционные заболевания человека и животных.

Особый интерес, в этом плане, представляют HU белки из паразитических микроорганизмов: редуцированный геном и ограниченные биосинтетические возможности которых, делают потерю HU белка летальной для большинства паразитических бактерий. Примером являются бактерии класса микоплазм, в большинстве из которых по данным, полученным в работе [3], именно HU белки заменяют отсутствующие компоненты репарационной системы MMR (mismatch repair).

Целью данной работы было сравнительное изучение нового HU белка из микоплазмы Spiroplasma meliferum (SpmHu) с целью расширения и уточнения современных представлений о структурно-функциональных особенностях HU белков из микоплазм, а также получения рекомбинантного белка, пригодного для структурных исследований.

В рамках работы был проведён анализ аннотированного генома бактерии и осуществлено клонирование единственного гена, кодирующего аналог гистоноподобного белка. Клонированный ген был использован для получения штамма-продуцента рекомбинантного HU белка, слитого на N-конце с аминокислотной последовательностью шести гистидинового тага и сайтом узнавания/расщепления протеазы TEV, а также для проведения теста на комплементацию дефицита роста клеток E.coli с делетированными генами собственных HU белков.

Было показано, что выделенный из штамма-продуцента рекомбинантный HU белок обладает ожидаемой ДНК-связывающей активностью и может быть наработан в количестве и с качеством позволяющими проводить структурные исследования самого белка и его комплексов с ДНК. Также было установлено, что индуцибельная экспрессия SpmHu в клетках E.coli с двойным нокаутом генов hupA и hupB, восстанавливает нарушение ростовых характеристик, вызванное отсутствием собственных HU белков. Таким образом, впервые было экспериментально подтверждено, что гипотетический ДНК-связывающий белок HU-beta из Sp. meliferum действительно обладает всеми свойствами, характерными для гистоноподобных белков, и вслед за HU белками из Acholeplasma laidlawii и Mycoplasma gallisepticum, является третьим представителем данного класса белков из микоплазм, изученным на настоящий момент.

1. Drlica K, Rouviere-Yaniv J., Histonelike proteins of bacteria. Microbiol Rev, 1987. 51(3): p. 301-19.
2. Huisman O, Faelen M, Girard D, Jaffe A, Toussaint A, and Rouviere-Yaniv J., (1989) Multiple defects in Escherichia coli mutants lacking HU protein, J Bacteriol 171, 3704-3712.
3. Kamashev D, Oberto J, Serebryakova M, Gorbachev A, Zhukova Y, Levitskii S, Mazur AK, Govorun V., Mycoplasma gallisepticum produces a histone-like protein that recognizes base mismatches in DNA. Biochemistry. 2011 Oct 11;50(40):8692-702. Epub 2011 Sep 14.