

УДК 577.151.03

## N-КОНЦЕВАЯ ГЕКСАГИСТИДИНОВАЯ МЕТКА НА $\beta$ -ЗАЖИМЕ ФАКТОРА ПРОЦЕССИВНОСТИ ЗАКРЫВАЕТ Gly66 И ВЛИЯЕТ НА РОСТ КЛЕТОК *Escherichia coli* B834 (DE3)<sup>1</sup>

© 2019 г. А. А. Patoli<sup>a, 2, \*</sup>, В. В. Patoli<sup>a, \*\*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Microbiology, University of Sindh, Jamshoro, 71000 Pakistan

\*e-mail: atifpatoli@gmail.com

\*\*e-mail: bushrapatoli@gmail.com

Поступила в редакцию 16.12.2017 г.

После доработки 10.01.2018 г.

Принята к публикации 22.01.2018 г.

В методах экспрессии рекомбинантных белков широко используются аффинные метки, или теги (tags). Наибольшее распространение получили такие аффинные метки, как глутатион-S-трансфераза (GST), полигистидин, связывающий мальтозу белок (MBP) и стрептавидин, которые используют для усиления экспрессии, повышения растворимости и упрощения процедуры очистки белка. Известно, что большие аффинные теги (MBP, GST) влияют на конформационную гомогенность и, следовательно, трехмерную структуру белков *in vivo*. Нами исследовано влияние небольшого аффинного гексагистидинового тега, 6×His, на рост клеток. В клетках *Escherichia coli* получена сверхэкспрессия полноразмерного  $\beta$ -зажима, фланкированного гексагистидиновым тегом, или без него, и коэкспрессия этих белков с усеченным DnaE. После IPTG-индукции экспрессию белка анализировали электрофорезом в денатурирующем ПААГ. По результатам анализа кривых роста, полученных для индуцированных и неиндуцированных клеток, показано, что темпы роста клеток со сверхэкспрессией  $\beta$ -зажима, не содержащего 6×His, снижены по сравнению с теми, которые экспрессировали  $\beta$ -зажим с тегом. На основании данных электрофоретического анализа растворимых и нерастворимых белковых фракций и опубликованной структуры  $\beta$ -зажима с гексагистидиновым тегом (PDB: 4K74) мы предполагаем, что N-концевой 6×His-тег на  $\beta$ -зажиме закрывает остаток Gly66, что в конечном счете влияет на способность белка взаимодействовать с  $\delta$ -субъединицей погрузчика зажима.

**Ключевые слова:** аффинная метка, гексагистидиновый тег,  $\beta$ -зажим, погрузчик зажима, ДНК-полимераза

DOI: 10.1134/S0026898419010129

### ВВЕДЕНИЕ

ДНК-полимеразы используют белки скользящего зажима (факторы процессивности) для создания плотных топологических “тисков” на ДНК. Скользящие зажимы ДНК – важнейшие компоненты механизма репликации, которые обеспечивают быструю репликацию ДНК за счет повышения процессивности ДНК-полимераз [1]. С момента их открытия в качестве факторов процессивности обнаружено, что эти скользящие зажимы вовлечены почти в каждый процесс, относящийся к репликации, модификации и репарации ДНК, и, таким образом, рассматриваются как динамичные координаторы репликации ДНК, репарации ДНК и толерантности

ДНК к повреждениям. Несмотря на значительные различия в последовательностях, эти белки структурно консервативны во всех трех доменах жизни [2].

У бактерий скользящий зажим, называемый  $\beta$ -зажимом и кодируемый геном *dnaN* [3], первоначально был идентифицирован по его способности прижимать репликативную ДНК-полимеразу к матрице ДНК, что значительно повышало процессивность фермента [4]. Анализ кристаллической структуры показал следующее: в отличие от PCNAs (proliferating cell nuclear antigens), ДНК-зажимов полимераз эукариот/архей, которые образуют гомотример [5],  $\beta$ -зажим *E. coli* представляет собой гомодимер, с расположением головки к-хвосту двух промоторов, в форме полумесяца каждый, с молекулярной массой ~40.6 кДа. Общая структура  $\beta$ -зажима подобна кольцу в форме звезды, диаметр которого приблизительно 80 Å, с

<sup>1</sup> Статья представлена авторами на английском языке

<sup>2</sup> Место учебы: School of Biology, Queens Medical Centre, University of Nottingham, Nottingham, NG7 2UH, UK.

большим центральным каналом с диаметром  $\sim 35\text{\AA}$ , что вполне подходит для размещения в нем двухщепочной (дц) ДНК [6, 7].

Гидрофильный карман, который расположен у основания С-концевого хвоста каждого мономера  $\beta$ -зажима, по-видимому, вовлечен в формирование контакта с зубактериальным мотивом связывания зажима (clamp binding motif; CBM) [8]. Этот пептидсвязывающий карман  $\beta$ -зажима лежит между доменами I и III на каждом мономере [9, 10]. Зажимсвязывающий карман может иметь дополнительные точки контакта с зажимом, как следует из кристаллической структуры ДНК-полимеразы Pol IV-LF *E. coli*, которая взаимодействует также и с ребром  $\beta$ -зажима [11].

Погрузчик зажимов,  $\gamma$ -комплекс, собирает  $\beta$ -зажимы на праймированной матричной (primer-template; p/t) ДНК (где они могут быть использованы полимеразой), а также при необходимости может удалять зажимы из ДНК [12]. В *E. coli* комплекс погрузчика зажима состоит из 5 различных субъединиц, а именно:  $\gamma\delta\delta\delta'\chi\psi\omega$ . Среди них  $\delta$ -субъединица — основная, взаимодействующая с  $\beta$ -зажимом, которая может быстро открывать интерфейс димера [13]. Субъединице  $\delta$  присуща внутренняя активность открытия зажима, так как она может открыть  $\beta$ -кольцо при полном отсутствии АТФ и других субъединиц. Кристаллическая структура  $\delta$ -субъединицы в комплексе с мономером  $\beta$ -зажима показывает, что N-концевой домен (домен I)  $\delta$ -субъединицы участвует во взаимодействии с  $\beta$ -зажимом, а взаимодействие между  $\delta$  и  $\beta$  ограничивается одной гранью кольца  $\beta$  и не включает напрямую интерфейс димера [13]. Stewart и др. [14] предположили, что  $\delta$ -субъединица открывает только один интерфейс  $\beta$ -димера при погрузке зажима на p/t-ДНК. Исследования мутагенеза показали, что замена Glu66 на Glu66 в  $\beta$ -зажиме приводит к нарушению взаимодействия  $\beta$ -зажима с  $\delta$ -субъединицей [15].

Как только  $\beta$ -димер загружается на молекулу ДНК, полимеразы рекрутируется на  $\beta$ -зажим. ДНК-полимераза III *E. coli* связывается с зажимом через его  $\alpha$ -субъединицу, кодируемую *DnaE*. Белок DnaE состоит из 1160 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 129.9 кДа. Каталитический сайт DnaE расположен в N-концевой области, в то время как С-концевая, из 243 аминокислотных остатков, непосредственно контактирует с  $\beta$ 2-зажимом [3]. Эта область содержит два  $\beta$ -связывающих мотива [16]. Первый расположен на остатках 920–924, а второй вблизи края С-конца полноразмерного белка — на остатках 1154–1159 [17]. Этот домен также содержит два предполагаемых структурных элемента: спираль-шипилька-спираль (HhH) (аминокислотные остатки 835–850) [18] и OB-fold (аминокислотные остатки 999–1073) [19], — которые часто вовлече-

ны в связывание нуклеиновых кислот [17]. Geogescu и соавт. [20] показали, что OB-укладка усиливает сродство полимеразы к  $\beta$ 2-зажиму на p/t ДНК. Известно, что в состав DnaE *E. coli* входит два CBM [16, 17]. Один CBM расположен на остатках 920–924 (Seq; QADMF) и называется внутренним CBM (i-CBM); а другой — вблизи края С-конца полноразмерного белка, на остатках 1154–1159 (Seq; QVELEF), и называется внешним CBM (e-CBM) [16]. На основании результатов ингибирования белок–белковых взаимодействий модифицированными пептидами, биоинформатического анализа и дрожжевой двугибридной системы Dalrymple и др. [21] предложили для CBM консенсусную последовательность QL[SD]LF. С помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) также показано, что при замене i-CBM в полноразмерном DnaE консенсусной последовательностью связывание между  $\beta$ 2-зажимом и DnaE усиливается примерно в 120 раз [17]. В данной работе получена сверхэкспрессия меченого гексагистицином  $\beta$ -зажима в экспрессионном штамме *E. coli* и продемонстрировано влияние аффинной метки на рост клеток и ослабление связывания меченого  $\beta$ -зажима с комплексом погрузчика.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Плазмиды, праймеры и штаммы.** Для экспрессии  $\beta$ -зажима две отдельные плазмиды pACYC184-11b [22], кодирующие ген *dnaN* с  $6\times\text{His}$ -тегом и без него, были любезно предоставлены доктором Dr. Karen A. Bunting (University of Nottingham, UK). Плазмиды назвали соответственно pACYC11-dnaNh и pACYC11-dnaN. Праймеры, использованные в данном исследовании, были синтезированы Eurofins MWG GmbH. При дизайне прямых праймеров учитывали, что N-концевой  $6\times\text{His}$ -тег должен входить в состав экспрессируемого конструкта DnaE. В таблице приведены последовательности праймеров. Для клонирования использовали химически компетентную *E. coli* DH5a. Для экспрессии целевых генов, клонированных в pET-векторы, использовали клетки химически компетентного штамма *E. coli* B834 (DE3), содержащие индуцируемую изопропил- $\beta$ -D-1-тиога-лактопиранозидом (IPTG) РНК-полимеразу T7. Плазмиды pET11 (“Novagen”) использовали для экспрессии *dnaE* с  $6\times\text{His}$ -тегом и без него.

**Клонирование *DnaE* $\Delta$ 912 and *DnaE* $\Delta$ 912h.** Используя праймеры E912-f, E912-r и E912h-f, E912h-r (таблица 1), а также геномную ДНК *E. coli* в качестве матрицы, амплифицировали 950 С-концевых остатков *dnaE* с  $6\times\text{His}$ -тегом на N-конце и без него. Амплифицированные продукты клонировали в составе экспрессионных векторов pET-11, используя по отдельности рестрикционные сайты NdeI и BamHI. Полученные плазмиды

**Таблица 1.** Используемые в исследовании плазмиды

Конструкция	Праймер	Последовательность, 5' → 3'
dnaEД912 (912–1160, 750 п.н.)	E912-f	<u>CATATG</u> CAACACGCGAAAGCG
	E912-r	CCCGGATCCTTATGATCAAACTCCAGTTCC
dnaEД912h (912–1160, 751 п.н.)	E912h-f	GGAATTCC <u>CATATG</u> CATCATCATCATCACGCGAAAGCGGAAGC
	E912h-r	CCCGGATCCTTATGATCAAACTCCAGTTCC
dnaEД912hM	iCBM-f	GCGGAAGCTATCGGT <u>CAGCTGGATCTGTTC</u> GCGGTGCTCGCCGAAG

Примечание. f – прямой праймер, r – обратный праймер, CATATG – сайт рестрикции NcoI, GGAATTC – сайт рестрикции BamHI, CATCATCATCATCAC – последовательность, кодирующая 6×His, CAGCTGGATCTGTTC – консенсусный β-связывающий мотив.

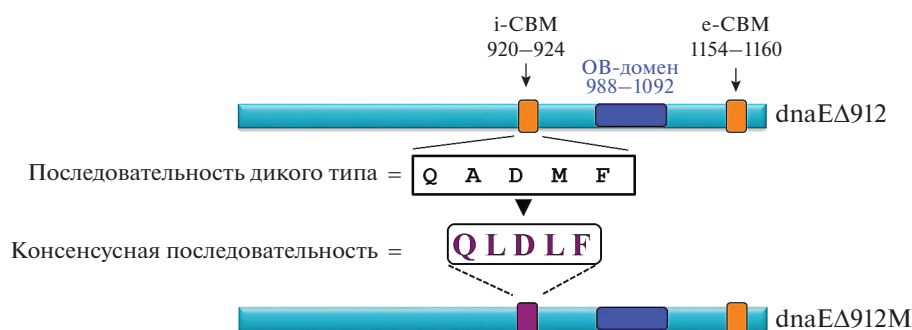
назвали соответственно pAPdnaEД912h и pAPdnaEД912. Клетки DH5α использованы для клонирования и амплификации этих плазмид. Наличие вставок исходных последовательностей дикого типа в соответствующих ориентациях подтверждено секвенированием ДНК.

**Мутагенез DnaEД912h.** Мутагенез внутреннего зажимсвязывающего мотива в составе DnaEД912 проведен с использованием мутантного праймера (iCBM-f, таблица) и набора QuickChange Multi-Site-Directed Mutagenesis Kit (“Stratagene”). Плазмида dnaEД912 использовалась в качестве матрицы в трехэтапной процедуре мутагенеза, в соответствии с инструкциями производителя. Мутантный праймер, содержащий две требуемые мутации (приводят к заменам A921L и M923L), использовали для замены консервативной последовательности i-CBM дикого типа на консенсусную (рис. 1). Полученную плазмиду с нужными мутациями назвали dnaEД912hM.

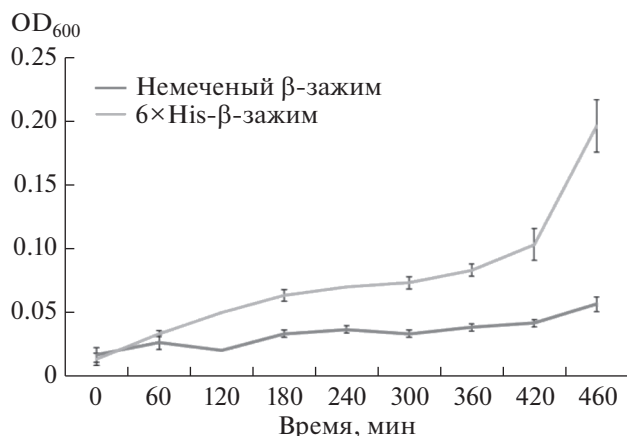
**Сверхэкспрессия и коэкспрессия белков.** С целью получить сверхэкспрессию химически компетентные клетки *E. coli* B834 (DE3) трансформировали по отдельности pACYC11-dnaN и pACYC11-dnaNh. Полученные клетки названы βb834 и Hisβb834 соответственно. Для коэкспрессии клетки βb834 и Hisβb834 сделали химически компетентными и трансформировали pAPdnaEД912 и pAPdnaEД912h в различных комбинациях. Клет-

ки помещали на плашки с LB-агаром, содержащим соответствующие антибиотики. Свежие трансформанты выращивали в LB-бульоне до экспоненциальной фазы ( $OD_{600} = 0.6–0.8$ ). На этом этапе клетки индуцировали IPTG (конечная концентрация 0.1 mM) и дополнительно выдерживали в течение 4 ч при 25°C. Клетки собирали центрифугированием, лизировали с помощью ультразвука в буфере А (50 mM HEPES, pH 7.0, 200 mM NaCl, 20 mM имидазол), лизат центрифугировали при 13000 об./мин в течение 15 мин при 4°C и собирали супернатант. Пре-, пост-, растворимые и нерастворимые фракции анализировали электрофорезом в денатурирующем ПААГ.

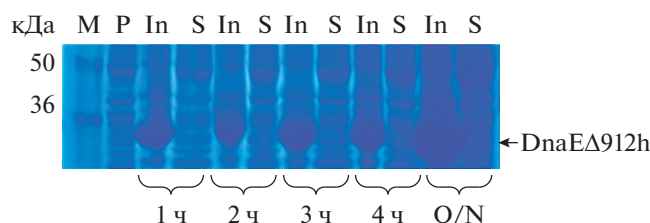
**Анализ роста клеток.** Трансформированные клетки растили в 5 мл LB-бульона, содержащего соответствующие антибиотики, до экспоненциальной фазы ( $OD_{600} = 0.6–0.8$ ). Эти культуры затем использовали для построения кривых роста и сравнительного анализа. Для оценки роста клеток в жидких средах использовали 100 мкл каждой культуры для инокуляции 5 мл LB-бульона, содержащего соответствующий антибиотик и 0.1 mM IPTG. Пробирки инкубировали при 37°C в водяной бане при встряхивании (180 об./мин). Оптическую плотность при 600 нм измеряли каждый час и полученные данные использовали для построения кривых роста. Эксперименты повторя-



**Рис. 1.** Схематичное представление мутагенеза внутреннего β<sub>2</sub>-зажимсвязывающего мотива dnaEД912h. Внутренний зажимсвязывающий мотив (920QADMF924) в составе dnaEД912h заменили консенсусной последовательностью (QL[S/D]LF). A921 и M923 были заменены остатками лейцина. i-CBM – внутренний зажимсвязывающий мотив, e-CBM – внешний зажимсвязывающий мотив, ОВ-домен – олигонуклеотид/олигосахаридсвязывающий домен.



**Рис. 2.** Кривые роста клеток со сверхэкспрессией немеченого и меченного 6×His β-зажима в присутствии 0.1 мМ IPTG. Кривые роста построены по трем параллелям, полосы ошибок показывают стандартные отклонения.



**Рис. 3.** Электрофоретический анализ растворимых (S) и нерастворимых (In) фракций клеток со сверхэкспрессией DnaEΔ912h. М – маркеры молекулярной массы; P – перед индукцией; O/N – инкубация в течение ночи.

ли в трех параллелях несколько раз. Кривые роста строили по средним значениям репрезентативных наборов трехкомпонентных множеств. Контрольные пробы, без IPTG, анализировали параллельно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Сравнительный анализ клеток со сверхэкспрессией DnaNh and DnaN*

На кривых роста клеток со сверхэкспрессией β-зажима, меченного или немеченого 6×His, видно, что после индукции рост клеток замедлился из-за избыточной экспрессии целевого белка, что становится обременительным для клетки. Однако клетки со сверхэкспрессией немеченого β-зажима росли медленнее тех, которые экспрессировали β-зажим с 6×His-тегом (рис. 2). В обоих случаях времена генерации рассчитывали с использованием уравнения реакции первого порядка для времени удвоения. Разница во времени генерации клеток, экспрессирующих β-зажим и 6×His-β-зажим, составила приблизительно 21.53%. Статистическую значимость различий оценивали с помощью одностороннего парного *t*-критерия. Получено ста-

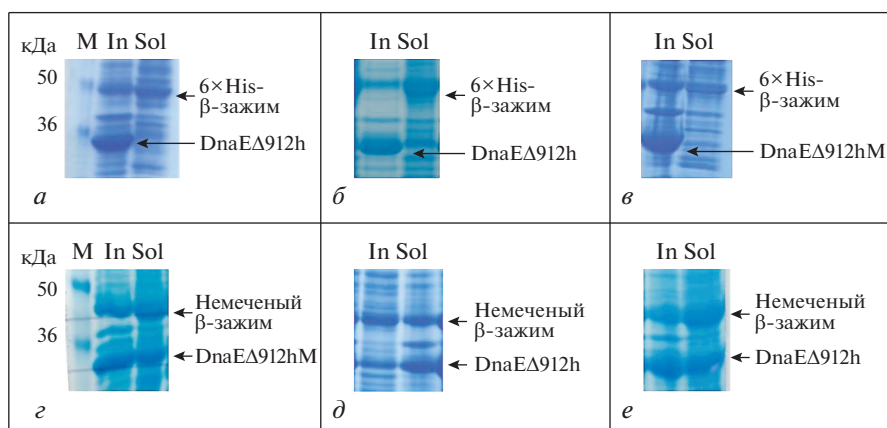
стистически значимое *p*-value ( $p = 0.0074$ ). Различия в росте, как правило, предполагают внесение помех в нормальный процесс репликации при сравнении избыточной экспрессии 6×His-β-зажима по сравнению с немеченым β-зажимом.

### *При сверхэкспрессии С-концевой DnaE остается нерастворимым*

Экспрессионные штаммы *E. coli* B834 (DE3) были трансформированы рAPdnaEΔ912h. Свежие трансформанты выращивали в 50 мл LB-бульона, содержащего соответствующие антибиотики. При достижении оптической плотности 0.6 (при 600 нм) проводили индукцию, используя 0.1 мМ IPTG при 25°C. После 4-ч инкубации наблюдалось незначительное снижение скорости роста клеток, что вполне ожидаемо и обусловлено нагрузкой на клетку при сверхэкспрессии большинства белков. Клетки лизировали ультразвуком в буфере, содержащем 50 мМ HEPES и 200 мМ NaCl, и получали растворимую фракцию. Образцы, собранные перед индукцией, растворимые и нерастворимые фракции анализировали электрофорезом в SDS-ПААГ (рис. 3). Как видно из данных, представленных на рис. 3, С-концевой фрагмент, DnaE-CTD, находится в нерастворимых фракциях, предположительно из-за быстрой аккумуляции при сверхэкспрессии или по причине, обусловленной особенностями его структуры (ранее охарактеризован Lamers и др. [16] как неструктурированный). Мы апробировали различные условия индукции и температурные режимы, но ни один из вариантов не дал растворимую форму DnaE-CTD.

### *Солюбилизация DnaE наблюдается при коэкспрессии с безгистидиновым DnaN, но не с 6×His-меченым DnaN*

Клетки βB834, экспрессирующие не меченый гистидином β-зажим, и клетки HisβB834, экспрессирующие 6×His-меченый β-зажим, по отдельности трансформировали DnaEΔ912. Полученные клетки растили в 50 мл LB-бульона, содержащего соответствующие антибиотики. После индукции 0.1 мМ IPTG при 25°C в течение 4 ч клетки собирали, лизировали ультразвуком в буфере, содержащем 50 мМ HEPES и 200 мМ NaCl, и получали растворимую фракцию, как описано выше. Растворимую и нерастворимую фракции анализировали электрофорезом в SDS-ПААГ. В том случае, когда немеченый DnaE912 экспрессировался с не содержащим тега β-зажимом, оба коэкспрессируемых белка находились в растворимой фракции (рис. 4e), из чего можно предположить, что коэкспрессируемый β-зажим в этих клетках повышает растворимость DnaE912, по-видимому, вследствие белок–белковых взаи-



**Рис. 4.** Электрофоретический анализ растворимой и нерастворимой фракций коэкспрессированных белков. *a* – DnaEΔ912, коэкспрессированный с 6×His-β-зажимом; *б* – DnaEΔ912h, коэкспрессированный с 6×His-β-зажимом; *в* – DnaEΔ912hM, коэкспрессированный с 6×His-β-зажимом; *г* – DnaEΔ912hM, коэкспрессированный с немеченым β-зажимом; *д* – DnaEΔ912h, коэкспрессированный с немеченым β-зажимом; *е* – DnaEΔ912, коэкспрессированный с немеченым β-зажимом. In – нерастворимая фракция, Sol – растворимая фракция, M – маркеры молекулярной массы.

модействий. Растворимость DnaE912h не изменялась при коэкспрессии с немеченым β-зажимом (рис. 4д). Однако в случае клеток, коэкспрессирующих немеченый DnaE912 с 6×His-β-зажимом, в растворимой фракции оказался только β-зажим, в то время как DnaE912 оставался в нерастворимой фракции (рис. 4а), из чего можно сделать вывод о наличии помех для связывания коэкспрессированных белков. Эти различия могут быть связаны с гексагистидиновым тегом на N-конце β-зажима. Известно, что слитные теги в некоторых случаях увеличивают растворимость белков, хотя часто они нарушают укладку белка. В данном примере структура 6×His-β-зажима известна [23] и никаких возмущений по сравнению с β-зажимом дикого типа не обнаружено. С целью проверить, влияет ли 6×His-тег на DnaE-CTD на растворимость DnaE-CTD, 6×His-меченый DnaE-CTD (DnaEΔ912h) коэкспрессировали с 6×His-β-зажимом. После экспрессии растворимые и нерастворимые фракции анализировали электрофорезом в ПААГ. В результате 6×His-DnaE-CTD был обнаружен в нерастворимой фракции (рис. 4б), из чего следует, что 6×His-тег на DnaE-CTD не влияет на растворимость DnaE-CTD. Мы также генерировали мутантный вариант DnaE912h с мутацией в i-CBM (DnaE912hM) для коэкспрессии его с меченым и немеченым β-зажимом тем же способом. Показано, что при замене i-CBM в полном размере DnaE консенсусной последовательностью связывание между β2-зажимом и DnaE увеличивается примерно в 120 раз [16]. Анализ растворимой и нерастворимой фракций электрофорезом в SDS-ПААГ показал наличие DnaE912hM в нерастворимой фракции после коэкспрессии с 6×His-меченым β-зажимом (рис. 4в), а в случае коэкспрессии с немеченым β-зажимом DnaE912hM

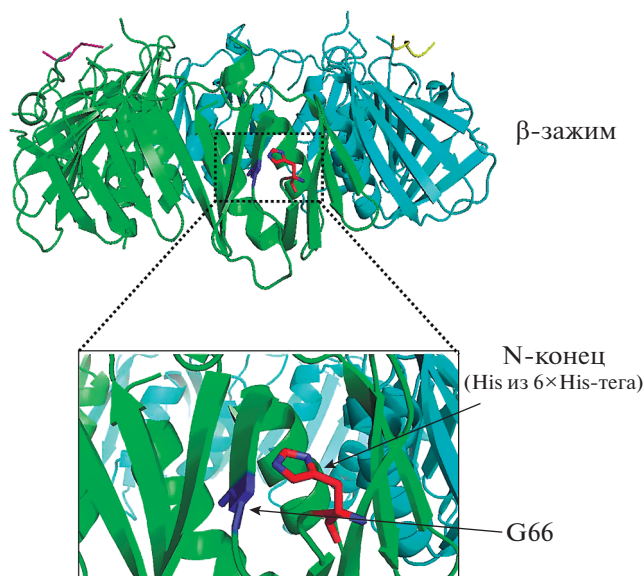
найден в растворимой форме (рис. 4г). Это наблюдение позволяет предположить, что наличие шести гистидинов на N-конце β-зажима, по-видимому, прямо или косвенно препятствует связыванию DnaE-CTD.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На основании результатов проведенного исследования можно предположить, что слияние 6×His-тега с N-концом β-зажима мешает взаимодействию между DnaE-CTD и β-зажимом. Изучено влияние N-концевого 6×His-тега на связывание β-зажима с DnaE-CTD путем сравнения скорости роста клеток, избыточно экспрессирующих β-зажим с 6×His и без него. Клетки со сверхэкспрессией 6×His-β-зажима росли быстрее, чем те, которые сверхэкспрессировали немеченый β-зажим. Из этого можно сделать вывод, что 6×His-β-зажим не мешает нормальному процессу репликации, чего нельзя сказать о сверхэкспрессии β-зажима в немеченой форме. Ранее, используя тот же 6×His-меченый β-зажим, мы проанализировали его кристаллическую структуру в комплексе с флуоресцентно меченным синтетическим β-связывающим белком UmuC полимеразы V с разрешением 2.5 Å [23]. Из-за недостаточной электронной плотности структуру 6×His-тега не удалось смоделировать полностью. Только последний остаток 6×His-тега, ассоциированный с мономером β-зажима, смоделировали в составе структуры; остальная часть тега, по-видимому, неупорядочена. Глядя на положение 6×His-тега на N-конце и анализируя различные возможные ориентации неупорядоченных остатков, кажется, что 6×His-тег может закрывать остаток Gly66 β-зажима (рис. 5).

Температурочувствительный штамм *E. coli* (dnaN159), кодирующий мутантную форму β-за-





**Рис. 5.** Кристаллическая структура β-зажима—пептида Pol V (PDB: 4K74). Аминокислотный остаток Gly66 (выделена синим цветом) находится вблизи последнего гистидина 6×His-тега (красный) на N-конце.

жима (β159), хорошо исследован на иерархичность использования полимераз, в том числе в двойном мутанте с Gly66Ala и Gly174Ala [24]. У этого мутантного β-зажима нарушено взаимодействие с репликативной формой ДНК-полимеразы. Кроме того, мутантный штамм dnaN159 обладает множественными репликативными и репарационными фенотипами, в том числе чувствительностью к ультрафиолетовому излучению, абсолютной зависимостью от активности полимеразы Pol I для сохранения жизнеспособности, усиленным Pol V-зависимым мутагенозом и измененной индукцией глобального SOS-ответа [25]. Maul и др. [26] показали, что обе замены, Gly66 на Glu66 и Gly174 на Ala174, в β159 необходимы для термочувствительного фенотипа роста штамма dnaN159. Единичная замена, Gly66 на Glu66, в зажиме приводила к ослаблению взаимодействия β-зажима с δ-субъединицей погрузчика зажима, в то время как Gly174 вовлечен в связывание оцДНК, а замена Gly174 на Ala174 нарушала взаимодействие β-зажим—субъединица Pol III. Оклюзия Gly66 гексагистидиновым тегом на сверхэкспрессированном β-зажиме, возможно, влияет на способность зажима взаимодействовать с открывателем кольца δ и, в конечном счете, на его погрузку на праймированную ДНК. Коэкспрессия DnaE в системе, где сверхэкспрессируется 6×His-меченый β-зажим, приводит к аккумуляции DnaE как нерастворимого белка, а не продуцирует стабильный комплекс в растворимой форме. Хотя прямое связывание DnaE с β-зажимом остается неизменным, как в случае β-зажима с Gly66 [26], взаимодействие DnaE-CTD со сверхэкспресси-

рованным 6×His-меченым свободным β-зажимом чувствительно к воздействию, возможно, из-за отсутствия р/т-ДНК, так как для стабильного взаимодействия между DnaE-CTD и β-зажимом необходима оцДНК, чтобы связаться с ОВ-укладкой [20], которая реализуется только в том случае, когда β-зажим загружается на ДНК. Это невозможно, если DnaE-CTD находится в нерастворимой фракции. Также не исключено, что по близости от Gly66 β-зажима есть вторичный сайт взаимодействия между DnaE-CTD и β-зажимом, что дает общий стабилизирующий эффект. Появление остатков гистидина на N-конце может препятствовать этому взаимодействию, в результате чего DnaE-CTD присутствует в нерастворимой фракции при коэкспрессии с 6×His-меченым β-зажимом.

Выражаем благодарность Dr. Karen A. Bunting и Dr. Jody A. Winter за их руководство в ходе выполнения этой исследовательской работы.

Проект финансировался НЕС Pakistan и University of Sindh, Jamshoro (Пакистан) и выполнялся в School of Biology, Queens Medical Centre, University of Nottingham (Великобритания).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Goedken E.R., Kazmirski S.L., Bowman G.D., O'Donnell M., Kuriyan J. (2005) Mapping the interaction of DNA with the *Escherichia coli* DNA polymerase clamp loader complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 183–190.
- Scouten Ponticelli S.K., Duzen J.M., Sutton M.D. (2009) Contributions of the individual hydrophobic clefts of the *Escherichia coli* beta sliding clamp to clamp loading, DNA replication and clamp recycling. *Nucleic Acids Res.* **37**, 2796–2809.
- Burgers P.M., Kornberg A., Sakakibara Y. (1981) The *dnaN* gene codes for the beta subunit of DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**, 5391–5395.
- Kuriyan J., O'Donnell M. (1993) Sliding clamps of DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* **234**, 915–925.
- Lehman I.R. (1974) DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science.* **186**, 790–797.
- Kong X.P., Onrust R., O'Donnell M., Kuriyan J. (1992) Three-dimensional structure of the beta subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell.* **69**, 425–437.
- Georgescu R.E., Kim S.S., Yurieva O., Kuriyan J., Kong X.P., O'Donnell M. (2008a) Structure of a sliding clamp on DNA. *Cell.* **132**(1), 43–54.
- Duzen J.M., Walker G.C., Sutton M.D. (2004) Identification of specific amino acid residues in the *E. coli* beta processivity clamp involved in interactions with DNA polymerase III, UmuD and UmuD'. *DNA Repair (Amst).* **3**(3), 301–312.
- Gulbis J.M., Kelman Z., Hurwitz J., O'Donnell M., Kuriyan J. (1996) Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell.* **87**, 297–306.
- Burnouf D.Y., Olieric V., Wagner J., Fujii S., Reinbolt J., Fuchs R.P., Dumas P. (2004) Structural and biochemical analysis of sliding clamp/ligand interactions sug-

- gest a competition between replicative and translesion DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* **335**(5), 1187–1197.
11. Bunting K.A., Roe S.M., Pearl L.H. (2003) Structural basis for recruitment of translesion DNA polymerase Pol IV/ DinB to the beta-clamp. *EMBO J.* **22**, 5883–5892.
  12. Yao N., Turner J., Kelman Z., Stukenberg P.T., Dean F., Shechter D., Pan Z.-Q., Hurwitz J., O'Donnell M. (1996) Clamp loading, unloading and intrinsic stability of the PCNA,  $\beta$  and gp45 sliding clamps of human, *E. coli* and T4 replicases. *Genes Cells.* **1**(1), 101–113. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.07007.x>.
  13. Jeruzalmi D., Yurieva O., Zhao Y., Young M., Stewart J., Hingorani M., O'Donnell M., Kuriyan J. (2001) Mechanism of processivity clamp opening by the delta subunit wrench of the clamp loader complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell.* **106**, 417–428.
  14. Stewart J., Hingorani M.M., Kelman Z., O'Donnell M. (2001) Mechanism of  $\beta$  clamp opening by the delta subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. *J. Biol. Chemistry.* **276**(22), 19182–19189.
  15. Heltzel J.M., Scouten Ponticelli S.K., Sanders L.H., Duzen J.M., Cody V., Pace J., Snell E.H., Sutton M.D. (2009) Sliding clamp-DNA interactions are required for viability and contribute to DNA polymerase management in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **387**, 74–91.
  16. Lamers M.H., Georgescu R.E., Lee S.G., O'Donnell M., Kuriyan J. (2006) Crystal structure of the catalytic alpha subunit of *E. coli* replicative DNA polymerase III. *Cell.* **126**(5), 881–892.
  17. Dohrmann P.R., McHenry C.S. (2005) A bipartite polymerase-processivity factor interaction: only the internal beta binding site of the alpha subunit is required for processive replication by the DNA polymerase III holoenzyme. *J. Mol. Biol.* **350**(2), 228–239.
  18. Doherty A.J., Serpell L.C., Ponting C.P. (1996) The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2488–2497.
  19. Theobald D.L., Mitton-Fry R.M., Wuttke D.S. (2003) Nucleic acid recognition by OB fold proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 115–133.
  20. Georgescu R.E., Kurth I., Yao N.Y., Stewart J., Yurieva O., O'Donnell M. (2009) Mechanism of polymerase collision release from sliding clamps on the lagging strand. *EMBO J.* **28**(19), 2981–2991.
  21. Dalrymple B.P., Kongsuwan K., Wijffels G., Dixon N.E., Jennings P.A. (2001) A universal protein-protein interaction motif in the eubacterial DNA replication and repair systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**(20), 11627–11632.
  22. Fribourg S.I., Romier C., Werten S., Gangloff Y.G., Poterszman A., Moras D. (2001) Dissecting the interaction network of multiprotein complexes by pairwise coexpression of subunits in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **306**(2), 363–373.
  23. Patoli A.A., Winter J.A., Bunting K.A. (2013) The UmuC subunit of the *E. coli* DNA polymerase V shows a unique interaction with the  $\beta$ -clamp processivity factor. *BMC Struct. Biol.* **13**, 12.
  24. Delmas S., Matic I. (2006) Interplay between replication and recombination in *Escherichia coli*: impact of the alternative DNA polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 4564–4569.
  25. Sutton M.D. (2004) The *Escherichia coli* dnaN159 mutant displays altered DNA polymerase usage and chronic SOS induction. *J. Bacteriol.* **186**, 6738–6748.
  26. Maul R.W., Ponticelli S.K., Duzen J.M., Sutton M.D. (2007) Differential binding of *Escherichia coli* DNA polymerases to the beta-sliding clamp. *Mol. Microbiol.* **65**, 811–827.

## THE N-TERMINAL 6×His Tag ON $\beta$ -CLAMP PROCESSIVITY FACTOR OCCLUDES Gly66 AND AFFECTS THE GROWTH OF *Escherichia coli* B834 (DE3) CELLS

A. A. Patoli<sup>1,\*</sup>, B. B. Patoli<sup>1,\*\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Microbiology, University of Sindh, Jamshoro, 71000 Pakistan*

\*e-mail: atifpatoli@gmail.com

\*\*e-mail: bushrapatoli@gmail.com

The affinity tags in fusion proteins are extensively used in protein expression techniques. The most common affinity tags, such as glutathione S-transferase (GST), poly-histidine, maltose binding protein (MBP), and streptavidin tags, are routinely used for increasing expression, improving solubility, and facilitating protein purification. The large affinity tags (MBP, GST) are known to influence the conformational homogeneity and, therefore, the three-dimensional structure of *in vivo* folded proteins. The current study described *in vivo* effects of small affinity fusion 6×His tag on the growth of cells. Hexa-histidine tagged full length  $\beta$ -clamp and non-hexa-histidine tagged  $\beta$ -clamp were over-expressed and co-expressed in possible combinations with truncated DnaE in *Escherichia coli* expression strain. After the induction with IPTG, the protein expression was assessed by SDS PAGE. The comparative analysis of the growth curves generated for the induced and un-induced cells demonstrated a decrease in growth rates of the cells over-expressing non-6×His tagged  $\beta$ -clamp as compared to 6×His tagged  $\beta$ -clamp. Based on the analysis of the soluble and insoluble protein fractions by SDS PAGE gels and published His-tagged  $\beta$ -clamp structure (PDB: 4K74) we propose that N-terminal 6×His Tag on  $\beta$ -clamp occludes its Gly66 to ultimately affect its ability to interact with the  $\delta$  subunit of the clamp loader.

**Keywords:** affinity tag, 6×His-tag,  $\beta$ -clamp, clamp loader, DNA polymerase