

На правах рукописи

СОКОЛОВ АНДРЕЙ СЕРГЕЕВИЧ

**ХОМИНГ-ЭНДОНУКЛЕАЗА SegD БАКТЕРИОФАГА T4: БИОХИМИЧЕСКАЯ И
ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА**

Специальность 03.01.03 – Молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино – 2018

Работа выполнена в лаборатории энзимологии генетических процессов Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г. К. Скрыбина РАН

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук

Грановский Игорь Эдуардович, заведующий лабораторией энзимологии генетических процессов, ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино.

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, **Прилипов Алексей Геннадьевич**, руководитель лаборатории молекулярной генетики, НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи», г. Москва

Кандидат химических наук,

Ламан Александр Георгиевич, старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии Филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пущино.

Ведущая организация:

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва.

Защита диссертации состоится _____ 2018 г. в ____ ч. на заседании диссертационного совета Д 217.013.01 при ФГБУ "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский институт" по адресу: 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ ГосНИИгенетика НИЦ «Курчатовский институт».

Автореферат разослан _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
Кандидат химических наук

Т. Л. Воюшина

Актуальность проблемы. Хоминг-эндонуклеазы являются особым классом сайт-специфических эндодезоксирибонуклеаз. Эти ферменты, как правило, вносят разрыв в ДНК родственного аллеля, лишённого гена хоминг-эндонуклеазы, и инициируют тем самым перенос собственного гена и фланкирующих областей в вариант аллеля, не содержащий ген нуклеазы. Данный процесс получил название “хоминг” (от англ. *homing* – возвращение домой).

Отличительной чертой хоминг-эндонуклеаз является способность узнавать протяженные (до 40 п.н.), часто вырожденные последовательности ДНК. Данная особенность обеспечивается уникальной стратегией узнавания сайтов гидролиза хоминг-эндонуклеазами. В связи с этим изучение данных ферментов расширяет границы наших представлений о природе ДНК-белковых взаимодействий, и представляет большой интерес с точки зрения создания эндонуклеаз с заданной специфичностью.

Хоминг-эндонуклеазы обнаруживаются у широкого круга организмов: у бактериофагов, зубактерий, архей, а также у эукариотических организмов (Belfort et al., 2005). Открытые рамки считывания, кодирующие данный класс ферментов, обнаружены в составе интронов, интеинов и в виде свободностоящих ОРС. Геномы бактериофагов, по-видимому, наиболее обогащены генами хоминг-эндонуклеаз (Edgell et al., 2000). Так, у бактериофага T5 среди 162 ОРС, по крайней мере 9 кодируют хоминг-эндонуклеазы (асс. по AY543070, Диссертация Акуленко Н. В.), а в геноме фага T4 насчитывается 15 (уже доказанных и предполагаемых) генов хоминг-эндонуклеаз. Они занимают около 15 т.п.о., что составляет 11 % фагового генома (Belfort et al., 2005). По-видимому, хоминг-эндонуклеазы могут являться существенным фактором эволюции фагов. Показано, что данные ферменты, помимо направленного переноса собственных генов, могут вызывать и перенос примыкающих к гену хоминг-эндонуклеазы участков ДНК и, тем самым, инициировать обмен фрагментами ДНК. В связи с этим интересна роль хоминг-эндонуклеаз в функционировании геномов крупных бактериофагов, таких как T4 и T5.

Ранее, на основании компьютерного анализа последовательности ДНК фага T4 были идентифицированы семь ОРС, продукты которых проявляют сходство с интронкодируемой хоминг-эндонуклеазой I-TevI. На N-конце транслируемых продуктов данных ОРС обнаружен вырожденный вариант мотива GIY-10 а.о.-YIG, характерный для одноименного семейства хоминг-эндонуклеаз. Предсказанные белки являются близкими по размеру основными белками. Сходство данных белков с интронкодируемыми хоминг-эндонуклеазами позволило предположить, что данные белки также являются сайт-специфическими эндонуклеазами. Для данной группы белков предложено общее название Seg (*s*imilar to *e*ndonucleases of group I *i*ntrons).

К настоящему моменту показано, что гены *segA*, *B*, *C*, *E*, *F* и *G* кодируют Mg^{2+} -зависимые сайт-специфические эндонуклеазы (Sharma et al., 1994; Kadyrov et al., 1997; Belle et al., 2002; Liu et al., 2003; Brok-Volchanskaya et al., 2008). Для данных белков, за исключением SegA, была показана способность инициировать генетический обмен между T-четными бактериофагами. Тем не менее, в литературе отсутствует информация о свойствах и функциональной активности кодируемого геном *segD* белка, об экспрессии гена *segD* в ходе развития бактериофага T4 и его мобильности. Данная работа посвящена изучению эндонуклеазы SegD бактериофага T4.

Цель и задачи исследования. Цель работы - изучить, действительно ли ген *segD* кодирует сайт-специфическую эндонуклеазу, способную инициировать хоминг собственного гена. В соответствии с этой целью работы были поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать распространенность гена *segD* среди T-четных фагов.
2. Разработать схему очистки эндонуклеазы SegD, выделить белок, охарактеризовать его ферментативные свойства и идентифицировать его сайт гидролиза в геноме T-четных фагов.
3. Изучить способность эндонуклеазы SegD инициировать хоминг собственного гена.
4. Сконструировать модель для изучения SegD-инициируемой рекомбинации в *rII*-локусе бактериофага T4. Проанализировать в модельной системе зависимость SegD-инициируемой рекомбинации в данном локусе от уровня SegD в клетках.

Научная новизна работы.

В данной работе была определена структурная организация области генов 23 - 24 у 14 Т-четных бактериофагов. Было установлено, что ген *segD*, помимо Т4, присутствует у фагов RB55, RB59 и Т6.

Охарактеризован новый фермент, хоминг-эндонуклеаза SegD, который является Mg^{2+} -зависимой сайт-специфической эндонуклеазой. Данная эндонуклеаза способна гидролизовать как немодифицированную ДНК, так и природную ДНК Т-четных фагов, содержащую гликозилированные остатки гидроксиметилцитозина.

Сайт гидролиза эндонуклеазы SegD обнаружен в геномах всех проанализированных фагов. Эта ситуация является крайне необычной, поскольку, как правило, предпочтительный сайт гидролиза хоминг-эндонуклеазы располагается в фаге, не содержащем ген хоминг-эндонуклеазы.

Изучена способность эндонуклеазы SegD инициировать мобильность собственного гена. Было показано, что в условиях природного уровня экспрессии эндонуклеаза SegD не способна инициировать мобильность собственного гена. При искусственном увеличении количества эндонуклеазы SegD в клетке, она способна инициировать мобильность собственного гена, а также генетическую конверсию в удаленном локусе по искусственно введенному сайту данной эндонуклеазы.

В этом исследовании описана новая сайт-специфическая эндонуклеаза SegD. Полученные в настоящей работе данные о свойствах эндонуклеазы SegD расширяют наши знания о хоминг-эндонуклеазах, принадлежащих к мало изученному GIY-YIG-семейству хоминг-эндонуклеаз.

Научно-практическая ценность.

Полученные в данной работе результаты имеют в основном фундаментальное значение, однако некоторые из них могут найти и практическое применение. Изученная в данной работе эндонуклеаза SegD может быть использована для создания нуклеаз с заданной специфичностью.

Данные о мобильности гена *segD* фага Т4 могут быть использованы для изучения механизмов сайт-специфической рекомбинации и создания новых систем направленного переноса и замещения генетической информации. Штамм-продуцент эндонуклеазы SegD и разработанная схема очистки могут быть использованы для получения препаративных количеств белка, необходимых, например, для определения пространственной структуры данной сайт-специфической эндонуклеазы.

Методология и методы исследования.

Работа выполнена с использованием современных методов молекулярной биологии и генной инженерии (ПЦР, молекулярное клонирование, мутагенез, разделение ДНК с помощью гель-электрофореза в пульсирующих полях, ДНК-ДНК гибридизация по Саузерну), биохимии (хроматографическое разделение белков, электрофорез белков в полиакриламидном геле), вирусологии (работа с бактериофагами, получение рекомбинантных фагов) и генетики (скрещивание бактериофагов, генетический анализ потомства скрещиваний).

Положения, выносимые на защиту:

1. Ген *segD* фага Т4 экспрессируется в ходе инфекционного цикла Т4; он не является существенным для его развития и отсутствует в геномах большинства Т4-родственных фагов.

2. Ген *segD* кодирует Mg^{2+} -зависимую сайт-специфическую эндонуклеазу, подобную хоминг-нуклеазам семейства GIY-YIG. Эндонуклеаза SegD узнает протяженную ассиметричную последовательность ДНК и нечувствительна к природным модификациям ДНК Т-четных бактериофагов.

3. В геномах Т4-родственных бактериофагов, содержащих ген *segD*, имеется сайт гидролиза кодируемой им эндонуклеазы.

4. Эндонуклеаза SegD не способна инициировать хоминг собственного гена при природном уровне данного фермента в клетке.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Результаты работы опубликованы в рецензируемых научных журналах. Материалы диссертации были представлены на международных конференциях “38th FEBS Congress” (Saint Petersburg, 2013), “Molecular Genetics of Bacteria and Phages” (Madison, 2007), а также 10-ой Пущинской школе-конференции молодых учёных (Пущино, 2006) и ежегодной сессии Ученого совета ИБФМ РАН, посвященной подведению итогов конкурса научных работ (Пущино, 2005).

Апробация диссертационной работы была проведена на заседании секции «Молекулярная биология» Ученого совета НИЦ "Курчатовский институт"-ГосНИИГенетика, а также на совместном семинаре лаборатории молекулярной микробиологии, биологии плазмид и биохимии клеточной поверхности микроорганизмов Учреждения Российской Академии наук Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина РАН.

Публикации. Основное содержание диссертации изложено в 3-х статьях в рецензируемых научных журналах (см. перечень в разделе «Список работ, опубликованных по теме диссертации»).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка используемой литературы. Диссертация изложена на __ страницах, материал иллюстрирован __ рисунками и __ таблицами. Библиография включает __ ссылок.

Личный вклад соискателя

Представленная диссертационная работа является результатом научных исследований автора. Основная часть экспериментальной работы была осуществлена соискателем лично, за исключением экспериментов по определению точек гидролиза и границ сайта узнавания эндонуклеазы SegD, выполненных автором совместно с сотрудником ИБФМ РАН И. Э. Грановским.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Анализ межгенной области 23-24 у Т4-родственных бактериофагов. Гены хоминг-эндонуклеаз неравномерно распространены среди Т-четных фагов. Поэтому первым этапом работы был анализ встречаемости гена *segD* среди фагов, родственных Т4. Ген *segD* бактериофага Т4 располагается между генами 23 и 24, кодирующих белки капсида оболочки.

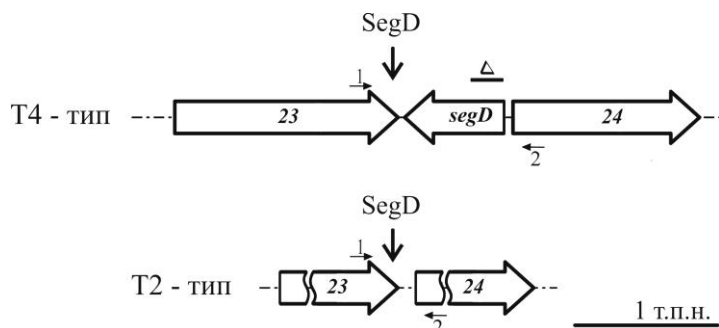


Рис. 1. Генетические карты области генов 23 - 24 Т-четных бактериофагов. Внизу приведен относительный размер в т.п.н. Вертикальными стрелками обозначено положение сайта расщепления эндонуклеазы SegD. Положение праймеров указано горизонтальными стрелками. Δ - область делеции, внесенная в ОРС *segD* Т4.

С целью изучения встречаемости гена *segD* среди других представителей семейства Т-четных фагов, был проведен ПЦР-анализ области генов 23 - 24 фагов, родственных Т4. Были проанализированы следующие фаги: Т2L, Т6, RB1, RB2, RB3, RB4, RB6, RB7, RB8, RB9, RB10, RB15, RB55 и RB59. Поскольку исследуемые фаги являются близкородственными Т4 и проявляют высокую гомологию последовательностей ДНК, для амплификации исследуемых областей анализируемых фагов, были использованы праймеры 1 и 2 (рис. 1), комплементарные последовательности ДНК генов 23 и 24 фага Т4. После амплификации соответствующей области генов, проводили сравнение размеров полученных ПЦР-фрагментов между исследуемыми фагами и фагом Т4 (рис. 2).

Оказалось, что одинаковыми по размеру с Т4 являются ПЦР-фрагменты, наработанные с ДНК фагов Т6, RB55 и RB59 (~1100 п.н.), что косвенно указывает на наличие ОРС *segD* у этих фагов.

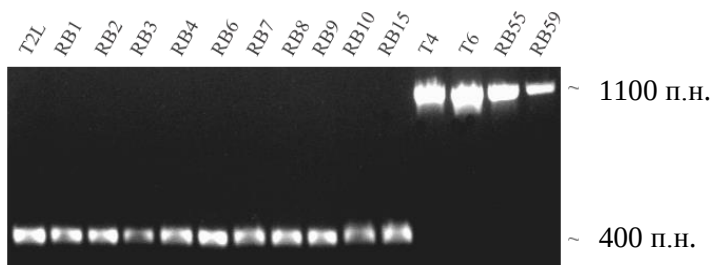


Рис. 2. ПЦР-анализ области генов 23 - 24 родственных Т-четным бактериофагов. Справа указан размер амплифицированных фрагментов ДНК.

В случае фагов Т2L, RB1, RB2, RB3, RB4, RB6, RB7, RB8, RB9, RB10 и RB15, размер ПЦР-фрагмента составил ~400 п.н, что однозначно указывало на то, что в геномах данных фагов в области генов 23 - 24 отсутствует ОРС *segD*, размер которой составляет 672 п.н.

Далее была определена нуклеотидная последовательность данной области у исследуемых фагов. Было установлено, что генетическая организация области генов 23-24 у фагов Т2L, RB1, RB2, RB3, RB4, RB6, RB7, RB8, RB9, RB10 и RB15 одинакова. Структура правого и левого флангов секвенированных фрагментов у различных фагов сходна с бактериофагом Т4, и включает фрагменты генов 23 и 24. У бактериофагов Т6, RB55 и RB59, как и предполагалось, присутствует ОРС *segD*, причем нуклеотидная последовательность ОРС *segD* у фагов RB55 и RB59 полностью идентична фагу Т4, а в случае фага Т6 существует одна нуклеотидная замена в гене *segD*, не приводящая к изменению аминокислотной последовательности белка. Таким образом, всю проанализированную фаговую коллекцию можно разбить, по структуре организации межгенной области 23-24, на две группы, отличающиеся наличием, либо отсутствием ОРС *segD*.

Очистка белка SegD. С целью изучения свойств фермента SegD был получен очищенный препарат белка. Учитывая токсичность Seg-эндонуклеаз для клеток *E. coli*, ген *segD* был клонирован в плазмидном векторе pET-19mod под контролем T7lac-промотора и экспрессирован в наиболее подходящей для этого системе «промотор/PHK-полимераза фага T7» (Studier and Moffatt, 1986). Особенностью данного вектора является то, что он позволяет нарабатывать в *E. coli* гибридные белки, на N-конец которых добавлена аминокислотная последовательность из шести остатков гистидина и сайт гидролиза TEV протеазы.

На первом этапе выделения проводилась хроматография на Ni-NTA-агарозе. Вторым этапом было отщепление N-концевого гистидинового «довеска» с использованием TEV-протеазы. Таким образом, полученный препарат SegD имеет на N-конце два дополнительных аминокислотных остатка - глицин и гистидин, оставшиеся от сайта гидролиза TEV-протеазы. Разработанная схема очистки позволила использовать преимущество высокоэффективной металл-хелатной хроматографии и получить препарат SegD, максимально соответствующий белку дикого типа (рис. 3).

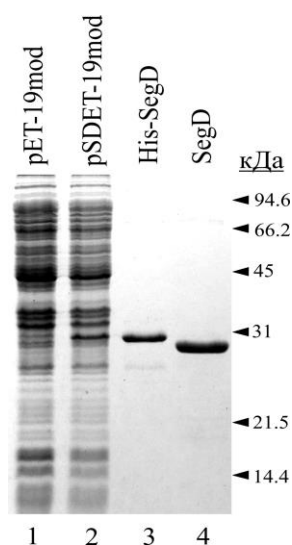


Рис. 3. Продукция в *E. coli* и очистка эндонуклеазы SegD.

Фракционирование белков проведено в 12% ДСН-ПААГ. Представлены: экстракты клеток BL21(DE3)/pLysE, трансформированные вектором pET-19mod (1) или рекомбинантной плазмидой pSDET-19mod (2), содержащей OPC *segD*; очищенный препарат эндонуклеазы SegD до (3) и после (4) обработки TEV-протеазой.

Исследование биохимических свойств эндонуклеазы SegD. Для изучения основных биохимических свойств данного фермента был проведен анализ эндонуклеазной активности SegD при различных условиях *in vitro*. Выбор субстрата для гидролиза был обусловлен тем что, как правило, сайт гидролиза хоминг-эндонуклеазы располагается в безнуклеазном аллеле. Ранее предпочтительные сайты гидролиза эндонуклеаз SegB, C, F и G были обнаружены в геноме бактериофага T2. Поэтому в качестве субстрата для анализа использовали плазмиду pUT2LsD, содержащую область генов 23 - 24 фага T2L, линейаризованную по сайту эндонуклеазы рестрикции *SspI*.

Для эффективного гидролиза большинству эндонуклеаз в качестве кофактора требуются ионы металлов. Поэтому было исследовано влияние двухвалентных (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) и моновалентных (Na^{+} , K^{+}) катионов на активность SegD (рис. 4A, 5B, 5Г).

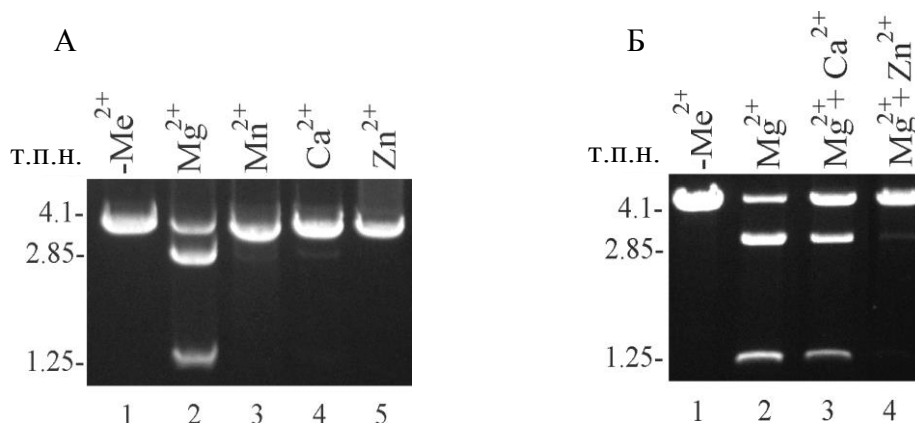


Рис. 4. Влияние двухвалентных катионов на активность SegD. В качестве субстрата использовали плазмиду pUT2LsD, содержащую область генов 23-24 фага T2L, линейаризованную по SspI. -Me²⁺ – реакция в отсутствии двухвалентных катионов. Конечная концентрация катионов в реакционной смеси составляет 10 мМ. В случае присутствия двух катионов, концентрация каждого из них составляла 5 мМ.

В отсутствии в реакционной смеси двухвалентных катионов (Me²⁺) активность SegD не обнаруживается (рис. 4А, дорожка 1). Сайт-специфическая эндонуклеазная активность проявляется в присутствии катионов Mg²⁺. При замене ионов Mg²⁺ на Mn²⁺, Ca²⁺ или Zn²⁺ SegD не способен эффективно гидролизовать субстрат (рис. 4А, дорожки 3 - 5), что, по-видимому, обусловлено несоответствием размера данных катионов активному центру фермента. Оптимальная концентрация ионов Mg²⁺ находится в диапазоне от 2 до 5 мМ (рис. 5Г).

Для некоторых ферментов (EcoRV, эндонуклеаза V и др.) показано, что в небольших концентрациях каталитически неактивные катионы могут усиливать расщепление, опосредованное другим катионом. Поэтому было проверено, не оказывают ли стимулирующее действие на активность SegD катионы Ca²⁺ и Zn²⁺ в присутствии ионов Mg²⁺. Наличие ионов Ca²⁺ в реакционной смеси снижает эффективность расщепления субстрата, из чего можно сделать вывод о возможной конкуренции за активный центр между катионами Mg²⁺ и Ca²⁺ (рис. 4Б, дорожка 3). В присутствии катионов Zn²⁺ в реакционной смеси наблюдалось полное подавление Mg²⁺-зависимой эндонуклеазной активности SegD (рис. 4Б, дорожка 4).

Показано, что для проявления ферментативной активности эндонуклеазе SegD не требуется наличие моновалентных катионов в реакционной смеси, тем не менее, небольшие концентрации K⁺, до 50 мМ, стимулируют работу фермента. Увеличение концентрации NaCl и, в меньшей степени, KCl приводит к снижению общей активности фермента (рис. 5В).

Было проанализировано влияние на активность SegD таких факторов как pH и температура. Установлено, что эндонуклеаза SegD активна в широком диапазоне pH от 6,5 до 9,5 (рис. 5А). При pH 5,5 гидролиз практически отсутствовал. С увеличением pH активность фермента возрастала, и наибольший процент гидролизованного субстрата наблюдался при pH 7,0 – 8,0.

Результаты исследования влияния температуры на активность SegD представлены на рис. 5Б. Максимальная активность SegD наблюдалась при температуре 30 °С. Данный температурный оптимум совпадает с оптимумами ближайших родственных белков, таких как SegB и SegE.

Кроме того, установлено, что БСА и Тритон X-100 оказывают стимулирующее действие на активность SegD за счет повышения стабильности фермента в реакционной смеси (рис. 5Д и Е).

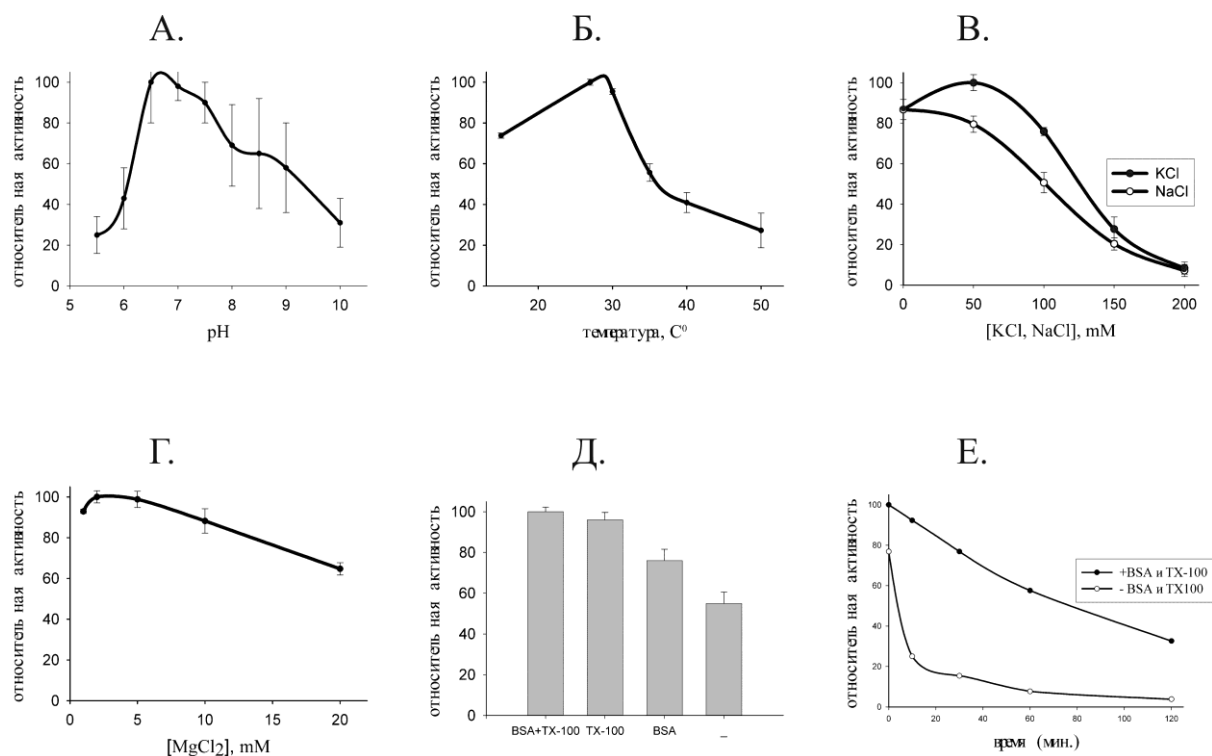


Рис. 5. Анализ биохимических свойств эндонуклеазы SegD. Влияние на активность эндонуклеазы SegD: pH (А), температуры (Б), моновалентных катионов Na⁺ и K⁺ (В), катионов Mg²⁺ (Г); влияние БСА и Тритона X-100 на эндонуклеазную активность SegD (Д); влияние БСА и Тритона X-100 на стабильность эндонуклеазы SegD (Е).

Была исследована структура 5'- и 3'-концов, образующихся после разрыва фосфодиэфирной связи ДНК эндонуклеазой SegD. Для этого продукты гидролиза инкубировали с ДНК-лигазой фага Т4 (рис. 6). Известно, что необходимым условием для проявления активности этого фермента является наличие 5'-Р и 3'-ОН концов. В результате реакции продуктов гидролиза с ДНК-лигазой Т4, наблюдалось появление фрагмента большего размера (рис. 6, проба 3), и поэтому был сделан вывод, что эндонуклеаза SegD расщепляет ДНК-субстрат с образованием 5'-Р и 3'-ОН концов, как и подавляющее большинство эндонуклеаз.

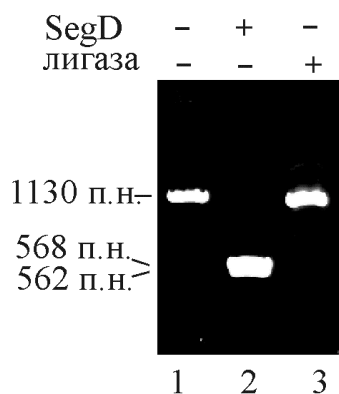


Рис. 6. Лигирование продуктов гидролиза эндонуклеазы SegD. ПЦР-фрагмент фага T2L (дорожка 1) был обработан эндонуклеазой SegD (дорожка 2). Фермент инактивировали прогреванием при 65 °C в течение 20 мин. Затем, продукты гидролиза инкубировали с 1 ед. Т4 ДНК-лигазы при 10 °C в течение 16 ч (дорожка 3). Слева указаны размеры фрагментов ДНК.

Картирование сайта гидролиза эндонуклеазы SegD. Для хоминг-эндонуклеаз, SegB, C, E, F, и G показана способность инициировать мобильность собственных генов по механизму, аналогичному процессу хоминга интронов. Так как данная форма конверсии генов требует наличия разрыва в последовательности ДНК родственного аллеля, не кодирующего нуклеазу, в области генов 23 - 24, был проведен поиск участков расщепления для эндонуклеазы SegD. По аналогии с другими Seg-эндонуклеазами было предположено, что в геноме фагов, у которых не был обнаружен ген *segD*, будет присутствовать сайт расщепления для данной эндонуклеазы. В

качестве субстратов использовали ПЦР-фрагменты области генов 23 - 24 фагов, нуклеотидная последовательность которых была определена ранее. Анализ показал, что эндонуклеаза SegD гидролизует ДНК фагов, как не содержащих, так и содержащих ген *segD*, с близкой эффективностью (данные не приведены). В ходе рестрикционного картирования было установлено, что сайт гидролиза эндонуклеазы SegD находится в области 3'-конца гена 23 (данные не приведены). То, что в геномах фагов, содержащих ген *segD*, имеется сайт кодируемой им эндонуклеазы, который эффективно гидролизует *in vitro*, является нетипичным для хоминг-эндонуклеаз.

Сайт гидролиза эндонуклеазы SegD находится на конце гена 23. Для того чтобы охарактеризовать последовательность ДНК, узнаваемую SegD, были установлены точки гидролиза и границы сайта узнавания в области гена 23. При определении границ сайта узнавания SegD был использован метод, предложенный Венцлау с соавт. (Wenzlau et al., 1989). Для этого продукты четырех секвенирующих реакций, полученные в присутствии соответствующих терминаторов с праймерами, комплементарными последовательности выше и ниже сайта расщепления, гидролизуют SegD. Продукты секвенирующих реакций, которые не содержат сайт узнавания, не расщепляются эндонуклеазой, что и определяет минимальную последовательность, необходимую для расщепления. Были локализованы точки гидролиза (рис. 7).

Установлено, что SegD вносит двухцепочечный разрыв в последовательность ДНК, расположенную в конце 23 гена бактериофага T2L (рис. 1). В результате гидролиза ДНК SegD образуются 3'-выступающие концы длиной три нуклеотидных остатка. Минимальная последовательность ДНК, узнаваемая эндонуклеазой SegD, составляет 16 нуклеотидных остатков. Разрыв, вносимый в молекулу ДНК SegD, смещен относительно центра узнаваемой белком последовательности. Кроме того, сайт гидролиза ДНК SegD не обладает симметрией второго порядка, как в случае, например, эндонуклеаз рестрикции второго типа.

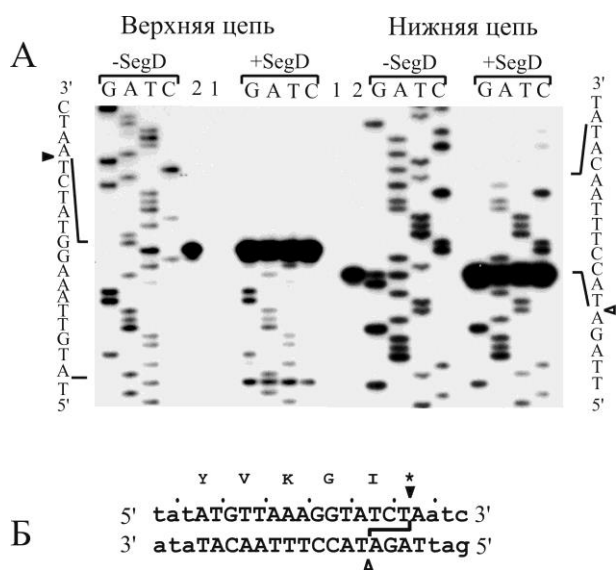


Рис. 7. Определение точек гидролиза и границ сайта узнавания SegD.

(А) Представлена радиоавтограмма участков секвенирующего геля для верхней и нижней цепей ДНК: продукты реакции элонгации меченного праймера до (1) и после (2) инкубации с SegD; G, A, T и C – продукты секвенирующих реакций, полученные в присутствии соответствующих терминаторов до и после инкубации с SegD, как указано. Слева и справа приведены участки последовательностей верхней и нижней цепей ДНК, соответственно. Положение точек разрывов ДНК в верхней и нижней цепях указано черными и белыми стрелками соответственно. Результаты анализа обобщены в части (Б), в которой минимальная последовательность ДНК, необходимая для гидролиза SegD, выделена заглавными буквами.

У всех проанализированных бактериофагов - T4, T6, RB55, RB59, T2L, RB1, RB2, RB4, RB6, RB7, RB8, RB9, RB10 и RB15- нуклеотидные последовательности сайтов гидролиза оказались идентичны.

Дополнительно, был проведен анализ области гена 23 у 15-ти T4-родственных бактериофагов, последовательности которых представлены в базе данных GenBank. Два фага, T4T и ECML-134, содержат ген *segD*. У остальных 13 фагов – ime09, vB EcoM, ACG-C40, phiD1, RB3, RB14, RB32, RB51, Shfl2, AR1, wV7, JS98 и Bp7 – ген *segD* отсутствует. Установлено, что все фаги содержат сайт SegD, последовательность которого идентична установленной ранее для фага T2L (данные приведены в диссертационной работе).

Природные модификации ДНК Т-четных фагов не влияют на специфичность и эффективность гидролиза SegD. Ситуация, когда в геноме фага Т4 одновременно присутствует ген хоминг-эндонуклеазы SegD и ее сайт гидролиза, является необычной. Можно предположить, что отсутствие разрыва в сайте гидролиза в собственном геноме фага Т4, связано с модификацией ДНК фага. ДНК Т-четных бактериофагов имеет необычную структуру: остаток цитозина метилируется и представляет собой 5-гидроксиметилцитозин (ОМЦ); кроме того, все гидроксильные группы 5-гидроксиметилцитозиновых оснований модифицированы в результате ковалентного связывания с глюкозой. Ввиду того, что во всех ранее проводившихся экспериментах использовались плазмиды, либо синтетические фрагменты ДНК, содержащие немодифицированный цитозин, интерес представляло установление влияния природных модификаций ДНК фага на активность эндонуклеазы SegD.

Для этого, наряду с фагами дикого типа, были выбраны для анализа два мутантных штамма фага Т4, Т4290 и Т4alc7. Фаг Т4290 дефектен по генам α - и β -гликозилтрансфераз, осуществляющих перенос глюкозы на ОМЦ. Бактериофаг Т4alc7 дефектен по гену гидроксиметилазы, в результате чего он содержит цитозиновую ДНК.

Для детального анализа специфичности SegD на модифицированной ДНК фагов, геномная ДНК была гидролизована эндонуклеазой рестрикции *SmiI*. Данная эндонуклеаза нечувствительна к природной модификации ДНК Т-четных фагов, поскольку не имеет остатков цитозина в последовательности сайта узнавания (5'-АТТТАААТ-3'). Продукты гидролиза ДНК фагов *SmiI* обрабатывали эндонуклеазой SegD и разделяли при помощи гель-электрофореза в инверсионных полях. Оказалось, что ДНК всех исследуемых фагов расщепляются эндонуклеазой SegD со сходной эффективностью и специфичностью (рис. 8). Ранее установлено, что гликозильные остатки, ковалентно связанные с гидроксиметилцитозином, ориентированы в большой желобок (Revel et al., 1983). Поскольку модификации ДНК Т-четных фагов (гликозилирование и гидроксиметилирование) не влияли на эффективность и специфичность гидролиза, можно предположить, что SegD узнает ДНК преимущественно по малому желобку, как это было показано для другой хоминг-эндонуклеазы Т4, I-TevI (Bryk et al., 1993).

С помощью Саузерн-анализа с 32 P-меченным зондом к области генов 23 - 24 было показано, что эндонуклеаза SegD вносит разрыв в ДНК фага Т2L, Т4 и его производных в 3'-конец гена 23 (рис. 8Б). Таким образом, установлено, что исследуемые модификации ДНК существенно не влияют на узнавание и каталитическую активность SegD.

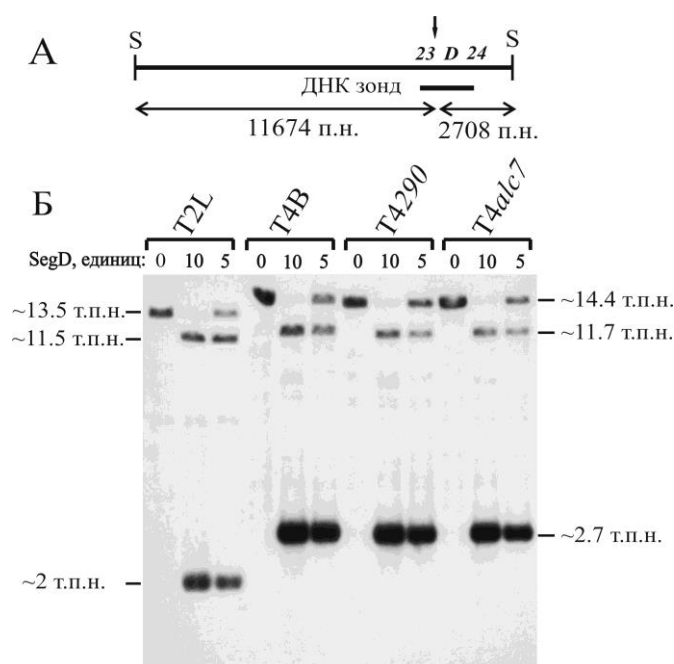


Рис.8. Влияние природных модификаций ДНК Т-четных фагов на эффективность гидролиза эндонуклеазой SegD. (А) Схема фрагмента *SmiI* (S) фага Т4, содержащего область генов 23 – 24. Вертикальной стрелкой указан сайт гидролиза эндонуклеазы SegD. Двусторонними стрелками указаны продукты гидролиза SegD, а также приведены их размеры. Горизонтальной линией отмечено положение ДНК-зонда, использованного для гибридизации. Положение генов 23 и 24 указано над схемой. (Б) Саузерн-блот анализ продуктов гидролиза ДНК фагов Т2L и Т4В, Т4290 Т4alc7 *SmiI* и SegD. Продукты гидролиза ДНК были разделены в 1% агарозном геле с помощью инверсионного пульс-электрофореза. Количество единиц активности SegD в реакции указано над дорожками.

Ген *segD* экспрессируется в клетках *E. coli*, инфицированных фагом Т4. Для проверки того, что ген *segD* экспрессируется в ходе развития бактериофага Т4 и кодирует функционально

активную хоминг-эндонуклеазу семейства GIY-YIG, экстракты клеток *E. coli*, инфицированных фагом Т4, были протестированы на наличие нуклеазной активности, характерной для SegD. В качестве отрицательного контроля был получен фаг Т4ΔsegD с делецией в области 5'-конца гена *segD* (3-208 н.о.) приводящей к сдвигу рамки считывания данной ОРС. Результаты тестирования эндонуклеазной активности в экстрактах клеток *E. coli*, инфицированных каждым из фагов представлены на рис. 9.

Т.П.Н.

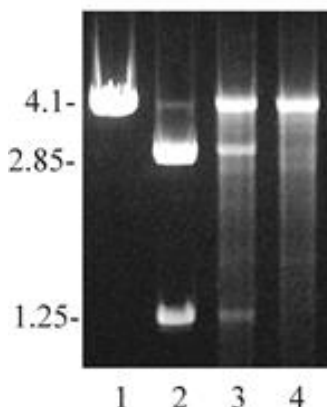


Рис. 9. Активность эндонуклеазы SegD в экстрактах клеток *E. coli*, инфицированных фагом Т4. Линеаризованную плазмиду рUT2LsD (1), содержащую сайт гидролиза эндонуклеазы SegD, инкубировали с экстрактом клеток *E. coli* BL21, инфицированных фагом Т4 (3), либо Т4ΔsegD (4). Продукты реакции разделяли электрофоретически в 1% агарозе. В качестве маркеров использовали фрагменты ДНК, образуемые при гидролизе данной плазмиды очищенным препаратом SegD (2).

Из рисунка видно, что инкубация ДНК-субстрата с экстрактом клеток, инфицированных фагом Т4, приводит к образованию дискретных фрагментов ДНК (дорожка 3), которые совпадают по размеру с продуктами гидролиза ДНК препаратом эндонуклеазы SegD *in vitro*. При инкубации ДНК-субстрата с экстрактом клеток, инфицированных фагом Т4ΔsegD (дорожка 4), образование этих фрагментов не наблюдается. Результаты анализа свидетельствуют, что сайт-специфическая эндонуклеазная активность, наблюдаемая в экстрактах Т4-инфицированных клеток, соответствует активности эндонуклеазы SegD. Эти данные однозначно свидетельствуют о том, что ген *segD* экспрессируется в ходе инфекционного цикла развития Т4.

Наследование гена *segD* потомством скрещиваний *segD*⁺ и *segD*⁻ фагов.

Хоминг, как частый случай генной конверсии, обусловлен внесением предпочтительного разрыва в один из аллелей. Последовательность обнаруженного сайта SegD на 3'-конце гена 23 идентична у всех проанализированных *segD*⁺ и *segD*⁻ фагов. Это позволило предположить, что в скрещиваниях таких фагов не будет происходить хоминг гена *segD*, поскольку эндонуклеаза SegD будет вносить разрывы в оба родительских аллеля с равной вероятностью. Для проверки этого предположения было проанализировано наследование ОРС *segD* в потомстве скрещиваний фагов Т4В (*segD*⁺) и Т2L (*segD*⁻). Ранее Расселлом и Хаски для смешанных инфекций этих фагов было описано так называемое явление частичного исключения (Russell et al., 1974). Данное явление заключается в том, что генетические маркеры Т4 предпочтительно наследуются потомством. При этом, исключение маркеров фага Т2 в потомстве происходит неравномерно, варьируя от ~ 70% до 100%. В связи с этим можно было ожидать, что соотношение фагов *segD*⁺/*segD*⁻ будет увеличено в потомстве. Для учета явления частичного исключения в анализ был введен дополнительный генетический маркер – амбер-мутация в гене 14 (бактериофаг В20). Ген 14 находится на расстоянии ~ 11,5 т.п.н. от ОРС *segD*, и является независимо наследуемым маркером. Если при ко-инфекции фаг В20 будет ограничивать развитие реципиентного фага (Т2L), то доля потомства, содержащая амбер-мутацию, будет изменяться. В качестве контроля была проанализирована мобильность генов *segB* и *segC*, для которых ранее был показан хоминг в скрещиваниях Т4 и Т2. Анализ показал, что при скрещивании фагов В20 и Т2L доля потомства, дающая положительный сигнал на гибридизацию с зондом к ОРС *segD*, составляла около 73%. При этом доля потомства с амбер-мутацией приближалась к 65 %. В случае генов *segB* и *segC* величина процента наследования генов потомством скрещиваний приближалась к 100% (данные не приведены). Наблюдаемое увеличение в потомстве доли *segD* относительно амбер-мутации в гене 14 не позволяет сделать однозначный вывод, обусловлено ли это хомингом гена *segD*,

который происходит с меньшей эффективностью, чем хоминг *segB* и *segC*, либо это связано со сложным характером наследования маркеров в потомстве скрещиваний Т4 и Т2L.

В связи с этим, для анализа способности SegD инициировать хоминг была сконструирована экспериментальная модель на основе фага Т4. В данной модели в качестве одного из родителей был использован бактериофаг D2 (*segD*⁻) - производный Т4, у которого область генов 23 – 24 замещена на гомологичную область фага Т2L. В качестве второго родителя был использован фаг В20dm (*segD*⁺). Данный фаг является производным фага В20, в котором в последовательность сайта SegD внесены замены 3 н.о., существенно снижающие эффективность его гидролиза *in vitro* (рис. 12).

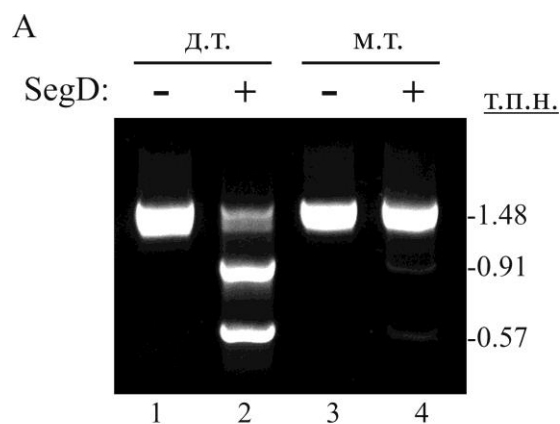


Рис. 12. Влияние нуклеотидных замен в сайте узнавания на эффективность гидролиза сайта, эндонуклеазой SegD *in vitro*.

А. Гидролиз ПЦР продуктов фагов Т4 (д.т.) и В20dm (м.т.), соответственно.

1 и 3 до инкубации с SegD

2 и 4 после инкубации с SegD.

Б. Сравнение природного (д.т.) и мутантного (м.т) сайтов SegD.

Измененные нуклеотиды выделены рамкой. Последовательность сайта гидролиза приведена заглавными буквами. Сверху указана аминокислотная последовательность С-конца белка 23.

Б



Были проведены скрещивания фага D2 с В20 и В20dm и проанализировано, как ОРС *segD* и *am14* наследуются потомством (табл. 1).

Таблица 1. Наследование гена *segD* и амбер-мутации в гене 14 потомством смешанных инфекций *segD*⁺ и *segD*⁻ фагов.

Скрещивания	Доля потомства, содержащего ген <i>segD</i> , %	Доля потомства с амбер-мутацией в гене 14, %
В20 × D2	50±1,5	48±5,7
В20dm × D2	47,8±4,3	45±3,4

Соотношение родительских фагов составляло 1:1. Приведены результаты трех независимых экспериментов для каждого скрещивания. Представлено среднее значение ± стандартное отклонение. Скрещивания фагов проводили на супрессорном штамме *E. coli* В₄₀supI. Процент потомства, содержащий амбер-мутацию, рассчитан как отношение разницы между титром потомства на супрессорном и бессупрессорном штаммах к титру на супрессорном штамме, умноженное на 100. Процент потомства, содержащего ген *segD*, рассчитан как отношение количества фаговых бляшек, дающих положительный сигнал при гибридизации с ДНК-зондом к данному гену, к общему количеству проанализированных фаговых бляшек, умноженное на 100.

В обоих скрещиваниях доля фагов в потомстве с амбер-мутацией в гене 14 незначительно отличалась от 50%, что в пределах погрешности соответствовало титру родительских фагов. Доля фагов, содержащих ОРС *segD*, в обоих скрещиваниях не изменялась и была также около 50%.

Таким образом, в модельных скрещиваниях *segD*⁺ и *segD*⁻ фагов хоминг гена *segD* не происходит независимо от интактности сайта SegD в одном из родителей.

Как было установлено ранее, ген эндонуклеазы SegD экспрессируется в ходе развития бактериофага T4. Было сделано предположение, что природный уровень эндонуклеазы в клетке недостаточен для инициации хоминга собственного гена. Для проверки данного предположения были проведены скрещивания фагов B20dm и D2 в штамме *E. coli*, продуцирующем эндонуклеазу SegD. В качестве хозяина для скрещиваний был выбран штамм *E. coli* BL21(DE3)/pLysE/pSDet-19mod, который ранее был использован при получении препарата эндонуклеазы SegD. Через 50 мин. после добавления индуктора клетки совместно инфицировали фагами B20 и D2, либо B20dm и D2. Потомство фагов было проанализировано на наследование ОРС *segD* и *am14* (табл. 2). Также экстракты клеток были проверены на наличие SegD-специфической эндонуклеазной активности и показано её существенное увеличение относительно её природного уровня при T4-инфекции (данные не приведены).

Таблица 2. Наследование гена *segD* и амбер-мутации в гене *14* потомством смешанных инфекций B20 × D2 и B20dm × D2 при повышенном содержании эндонуклеазы SegD в клетках.

Скрещивания	Доля потомства, содержащего ген <i>segD</i> , %	Доля потомства с амбер-мутацией в гене <i>14</i> , %
B20 × D2	57±3	55±3
B20dm × D2	94±5	62±6

Соотношение родительских фагов составляло 1:1. Приведены результаты трех независимых экспериментов для каждого скрещивания. Представлено среднее значение ± стандартное отклонение. Скрещивания фагов проводили на штамме *E. coli* BL21(DE3)/pLysE/pSDet-19mod. Процент потомства, содержащий амбер-мутацию, рассчитан как отношение разницы между титром потомства на супрессорном и бессупрессорном штаммах к титру на супрессорном штамме, умноженное на 100. Процент потомства, содержащего ген *segD*, рассчитан как отношение количества фаговых бляшек, дающих положительный сигнал при гибридизации с ДНК-зондом к данному гену, к общему количеству проанализированных фаговых бляшек, умноженное на 100.

Установлено, что доли фагов с амбер-мутацией и геном *segD* в потомстве скрещивания B20 и D2 составили 55 и 57%, соответственно. Данное значение в пределах погрешности соответствует титру родительских фагов. В случае скрещивания фагов B20dm и D2, доля потомства, содержащего ОРС *segD*, увеличилась до 94 %. При этом доля маркера *am14* составила 62%. Наблюдаемое увеличение доли гена *segD* в потомстве свидетельствует о том, что происходит хоминг данного гена. По-видимому, в условиях повышенного уровня SegD репарация двухцепочечного разрыва в SegD-сайте фага-реципиента проходит недостаточно эффективно, что приводит к частичному ограничению фага D2. Об этом свидетельствует некоторое увеличение в потомстве маркера *am14* родительского фага B20dm с нарушенным сайтом SegD.

Таким образом, хоминг *segD* может проходить в условиях повышенного содержания фермента в клетке относительно природного уровня и при наличии предпочтительного сайта гидролиза в реципиентном фаге.

Анализ SegD-инициируемой рекомбинации в *rII*-локусе T4. Гены *segD* и 23 являются поздними генами (Luke et al., 2002). Ген 23 кодирует мажорный белок головки, и его продукция составляет до 30% всего синтезируемого белка на поздней стадии инфекционного цикла (Young et al., 1981). Было предположено, что высокий уровень транскрипционной активности делает сайт недоступным для эндонуклеазы SegD. Для проверки данного предположения была исследована способность SegD инициировать рекомбинацию в *rII*-локусе T4. Ранее, для хоминг-эндонуклеаз SegC и I-TevI фага T4, которые также кодируются поздними генами, была показана способность инициировать рекомбинацию в данном локусе после инсерции в него соответствующих сайтов этих эндонуклеаз (Shcherbakov et al., 2002, Stohr et al., 2002). В соответствии с этим в 5'-конец гена *rIIB* фага D2 был встроен фрагмент ДНК размером 37 п.н., содержащий сайт SegD. В полученном фаге D2ets9 данная вставка приводила к нарушению гена *rIIB*. Известно, что *rII*-мутанты фага T4

не способны расти на штаммах *E. coli*, лизогенных по фагу λ . Этот признак был использован для генетического анализа потомства скрещивания фагов T4B и D2ets9, которые обладают фенотипом rII^+ и rII^- , соответственно. Как ожидалось, внесение разрыва эндонуклеазой SegD в аллель *ets9* будет приводить к снижению доли маркера rII^- в потомстве, поскольку матрицей для репарации будет служить интактный аллель дикого типа фага T4B. В качестве контроля был проведен анализ наследования rII^- -маркеров потомством скрещивания T4B и D2insZ. Бактериофаг D2insZ содержит негидролизующую вставку, фрагмент ОРС *lacZ E. coli*, которая находится в том же положении ОРС $rIIB$ и приводит к её нарушению (Shcherbakov et al., 2002). Результаты скрещивания фагов приведены в таблице 3 (колонка 1). Анализ показал, что в потомстве обоих скрещиваний изменение доли rII^- -мутантов не происходило. Таким образом, в отличие от SegC и I-TevI, эндонуклеаза SegD не инициирует генную конверсию в rII^- -локусе. Следовательно, неспособность SegD инициировать хоминг собственного гена не обусловлена специфическим расположением сайта SegD в фаговом геноме.

Дополнительно, была проанализирована SegD-инициируемая рекомбинация в rII^- -локусе при повышенном уровне SegD в клетке. Было проведено скрещивание фагов T4B и D2ets9 на штамме *E. coli*, экспрессирующем SegD. Очевидно, что уровень белка SegD в клетках будет зависеть от времени, прошедшего с момента индукции синтеза данного белка. Учитывая это, генетическую конверсию в rII^- -локусе анализировали в зависимости от времени индукции синтеза эндонуклеазы SegD (таблица 3). В случае пары фагов T4B и D2insZ, как и ожидалось, изменения доли маркеров в потомстве не происходит. В скрещиваниях T4B $\times$ D2ets9 наблюдалось снижение доли в потомстве фагов, имеющих rII^- -фенотип (маркер *ets9*). При этом, если инфекция проводилась через 10 и 30 минут после индукции, доля rII^- -фагов уменьшалась до $\sim 25\%$, тогда как через 50 минут – до 4%.

Необходимо отметить, что для скрещиваний, проводившихся в штамме *E. coli* с повышенным содержанием SegD в клетках, наблюдалось снижение урожая фагов (данные не приведены). Так, при инфекции через 50 минут индукции, урожай падал в ~ 2 раза, тогда как через 70 минут падение составило ~ 2 порядка. Падение урожая фагов может быть обусловлено снижением жизнеспособности клеток *E. coli* ввиду токсичности эндонуклеазы SegD. Также можно предположить, что избыток эндонуклеазы SegD на ранней стадии инфекции приводит к появлению неспецифических разрывов в фаговой ДНК, которые не способны эффективно репарироваться, что приводит к ограничению развития фага.

Таблица 3. Наследование rII^- -фенотипа потомством смешанных инфекций фагов T4B и D2insZ или D2ets9.

Скрещивания	^а Доля потомства (%) с фенотипом rII^- .	^б Доля потомства (%) с фенотипом rII^- .	^в Доля потомства (%) с фенотипом rII^- .		
			10 мин.	30 мин.	50 мин.
T4B $\times$ D2insZ	50 $\pm$ 2,8	49 $\pm$ 1,8	49 $\pm$ 2,5	48 $\pm$ 3	48 $\pm$ 3
T4B $\times$ D2ets9	51 $\pm$ 1,3	51 $\pm$ 1,2	25 $\pm$ 1	20,5 $\pm$ 5	6 $\pm$ 1

Соотношение родительских фагов составляло 1:1. Приведены результаты двух независимых экспериментов для каждого скрещивания. Представлено среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Доля потомства, содержащего rII^- -мутацию, рассчитана как отношение разницы между титрами на пермиссивном и непермиссивном штаммах к титру на пермиссивном штамме, умноженное на 100. Скрещивание проводилось в условиях природного уровня SegD в клетках *E. coli* (а) CR-63, (б) BL21(DE3)/pLysE и в условиях повышенного уровня SegD (в) BL21(DE3)/pLysE/pSDet-19mod. 10 мин., 30 мин., 50 мин – время индукции гена *segD* до заражения фагами.

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что природный уровень экспрессии эндонуклеазы SegD не достаточен для инициации хоминга собственного гена, а также генетической рекомбинации в rII^- -локусе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Геном бактериофага Т4 содержит 15 генов хоминг-эндонуклеаз, для большинства из которых показана способность инициировать генетический обмен между Т4 и родственными фагами. В данной работе охарактеризована новая эндонуклеаза SegD фага Т4, относящаяся к семейству GIY-YIG эндонуклеаз. Ген *segD* экспрессируется в ходе развития бактериофага Т4. Эндонуклеаза SegD узнает сайт протяженностью 16 п.н. и гидролизует его с образованием 3'-выступающих концов длиной 3 н.о. Фермент с близкой эффективностью гидролизует как немодифицированную ДНК, так и ДНК Т-четных фагов, содержащую гликозилированные остатки гидроксиметилцитозина. Сайт эндонуклеазы SegD расположен на 3'-конце гена 23 на расстоянии 52 п.н. от сайта инсерции ОРС *segD*. У 29-ти Т4-родственных бактериофагов, проанализированных в данной работе, последовательность сайта узнавания оказалась идентична. Случай с эндонуклеазой SegD является нетипичным для хоминг-эндонуклеаз, поскольку, как в геномах фагов, содержащих ген *segD*, так и родственных фагов, в которых данный ген отсутствует, имеется сайт гидролиза данной эндонуклеазы.

В условиях природного уровня экспрессии эндонуклеаза SegD не способна инициировать мобильность собственной ОРС, даже в случае, если ее сайт узнавания искусственно нарушен в геноме *segD*⁺ фага. При увеличении количества фермента в клетке, эндонуклеаза SegD способна инициировать хоминг, а также генетическую рекомбинацию в сайте SegD, искусственно введенном в *rII*-локус. По-видимому, при природном уровне экспрессии гена *segD*, активности эндонуклеазы SegD недостаточно для внесения разрывов в фаговую ДНК *in vivo*.

ВЫВОДЫ

1. Определена структурная организация области генов 23-24 фагов Т2L, Т6 и группы из 12-ти RB-фагов. Ген *segD*, помимо фага Т4, обнаружен у фагов Т6, RB55 и RB59. У остальных фагов в данном локусе ген *segD* отсутствует.
2. Показано, что SegD является Mg²⁺-зависимой сайт-специфической эндонуклеазой. Определены оптимальные условия работы фермента: максимальная активность фермента наблюдается при значении pH 7,0 – 8,0, концентрации катионов K⁺ 50 мМ, Mg²⁺ 2,5 мМ и температуре 30 °С.
3. Эндонуклеаза SegD узнает протяженную ассиметричную последовательность ДНК длиной 16 п.н. и гидролизует её с образованием 3'-выступающих концов длиной три нуклеотидных остатка. Природные модификации ДНК Т-четных бактериофагов не влияют на эффективность гидролиза эндонуклеазой SegD.
4. Сайт гидролиза эндонуклеазы SegD расположен на 3'-конце гена 23, и его последовательность идентична в геномах 29-ти проанализированных Т4-родственных бактериофагов.
5. Ген *segD* экспрессируется в ходе развития бактериофага Т4: в экстрактах клеток *E.coli*, инфицированных фагом, наблюдается активность, характерная для эндонуклеазы SegD.
6. Эндонуклеаза SegD не способна инициировать хоминг собственного гена при скрещивании Т-четных бактериофагов, а также генетическую рекомбинацию на модели *rII*-локуса. Для инициации данных процессов требуется повышенный, в сравнении с природным, уровень эндонуклеазы SegD в клетке.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

- 1) Sokolov A. S., Latypov O. R., Kolosov P. M., Shlyapnikov M. G., Bezlepkina T. A., Kholod N. S., Kadyrov F. A., Granovsky I. E. 2018. **Phage T4 endonuclease SegD that is similar to group I intron endonucleases does not initiate homing of its own gene.** Virology, 515, 215-222.
- 2) Соколов А. С., Грановский И. Г. 2014. **Хоминг-эндонуклеаза SegD бактериофага Т4: биохимические свойства.** “Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю. А. Овчинникова”, Т.10, №3, стр. 5-11.
- 3) Brok-Volchanskaya V. S., Kadyrov F. A., Sivogrivov D. E., Kolosov P. M., Sokolov A. S., Shlyapnikov M. G., Kryukov V. M., Granovsky I. E. 2008. **Phage T4 SegB protein is a homing endonuclease required for the preferred inheritance of T4 tRNA region occurring in co-infection with a related phage.** Nucleic Acids Res., 6, 2094-2105.

Материалы конференций

- 1) Granovsky I., Latypov O., Sokolov A., Kolosov P., Shlyapnikov M. 2013. **Double strand breaks introduced by phage T4 homing endonuclease SegD is repaired by alternative mechanism.** 38th FEBS Congress, July 6–11, p. 67, Saint Petersburg, Russia.
- 2) Brok-Volchanskaya V., Kadyrov F., Sivogrivov D., Kolosov P., Sokolov A., Shlyapnikov M., Kryukov V., Granovsky I. 2007. **Phage T4 SegB protein is a homing endonuclease required for the preferred inheritance of T4 tRNA region occurring in co-infection with a related phage.** Proceedings of “Molecular Genetics of Bacteria and Phages”, p. 165, Madison, USA.
- 3) Соколов А. С., Грановский И. Э. 2006. **Хоминг-эндонуклеаза SegD бактериофага Т4.** Труды “10^{ой} Пушкинской школы-конференции молодых ученых: Биология – наука XXI века”, стр. 343, Пушкино, Россия.