

УДК 632.3
DOI 10.17513/use.38095

ЭНДОНУКЛЕАЗЫ БАКТЕРИЙ РОДА *XANTHOMONAS* И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ

Трофимов В.А., Данилова М.П.

ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет
имени Н.П. Огарева», Саранск, e-mail: geneticlab@yandex.ru

Бактерии рода *Xanthomonas* являются важным модельным объектом для генетических исследований, поскольку их относительно просто культивировать, имеется расшифрованный геном, кроме того, они имеют важнейшее народнохозяйственное значение как продуценты ксантана. С практической точки зрения интерес представляют гены эндонуклеаз и кодируемые ими белки, участвующие в репарации поврежденных ДНК и клеточном иммунитете. Также особое внимание привлекают TAL-белки (Transcription Activator-Like Effectors), которые, будучи частью системы геномного редактирования TALEN, обеспечивают нацеливание каталитического домена с эндонуклеазной активностью на целевую последовательность нуклеотидов. В данной статье будут обозначены некоторые эндонуклеазы, закодированные в геноме бактерий рода *Xanthomonas* штамма MAFF106181, а также раскрыты их роль и перспективы практического использования в генной инженерии. Кроме того, рассматривается возможность модификации системы геномного редактирования TALEN в области каталитического домена, обеспечивающего необходимый разрыв в цепи ДНК. В классическом варианте расщепляющий домен системы TALEN представлен эндонуклеазой рестрикции FokI. Авторы обозначили возможность его замены рестриктазой XcmI. Отметим, что приведенные данные базируются на основе анализа сведений о количественном нуклеотидном и аминокислотном составе нескольких эндонуклеаз, полученных при анализе генетических последовательностей из базы данных GenBank в программной среде UGENE.

Ключевые слова: бактерии, *Xanthomonas campestris*, эндонуклеазы, рестриктазы, бактериальный иммунитет

ENDONUCLEASES OF BACTERIA OF THE GENUS *XANTHOMONAS* AND THEIR BIOLOGICAL ROLE

Trofimov V.A., Danilova M.P.

Ogarev National Research Mordovia State University, Saransk, e-mail: geneticlab@yandex.ru

Bacteria of the genus *Xanthomonas* are an important model object for genetic research, since they are relatively easy to cultivate, there is a decoded genome and they have the most important national economic importance as producers of xanthan. From a practical point of view, endonuclease genes and their encoded proteins involved in DNA damage repair and cellular immunity are of interest. Also, special attention is drawn to TAL proteins (Transcription Activator-Like Effects), which, being part of the TALEN genomic editing system, provide targeting of the catalytic domain with endonuclease activity to the target sequence of nucleotides. This article will identify some endonucleases encoded in the genome of bacteria of the genus *Xanthomonas* strain MAFF106181, as well as reveal their role and prospects for practical use in genetic engineering. In addition, the possibility of modifying the TALEN genomic editing system in the area of the catalytic domain that provides the necessary break in the DNA chain is being considered. In the classical version, the splitting domain of the TALEN system is represented by the restriction endonuclease FokI. The authors indicated the possibility of its replacement by XcmI restrictase. Note that these data are based on the analysis of information on the quantitative nucleotide and amino acid composition of several endonucleases obtained by analyzing genetic sequences from the GenBank database in the UGENE program.

Keywords: Bacteria, the *Xanthomonas campestris*, endonucleases, restrictases, bacterial immunity

Бактерии рода *Xanthomonas* паразитируют на растениях и нередко являются возбудителями черной гнили. Представители данного рода бактерий были дифференцированы на две основные группы: вызывающие реакцию сверхчувствительности в области инокуляции (или системную) и не инициирующие появление защитной реакции после внедрения. Для бактерий рода *Xanthomonas* характерны богатый видовой состав и обилие различных штаммов с особенностями, затрагивающими параметры устойчивости к чужеродным агентам, продукции полисахарида и т.п.

В свою очередь, *Xanthomonas campestris*, являясь отличным модельным объектом, характеризуется многообразием групп штаммов, которые различаются не только по генетическим признакам, но и по серологическим, а также патогенетическим. Ряд штаммов рассматриваемого микроорганизма может инициировать заболевание только у определенных растений, что указывает на несовместимые взаимодействия между штаммами и их растениями-мишенями. Теория «ген за геном» Флора предполагает, что такое несовместимое взаимодействие между микробными патогенами и растени-

ями определяет специфичность патогенов-хозяев и регулируется геном авирулентности (*avr*) патогена и геном родственной устойчивости (*R*) патогена. *Xanthomonas campestris* генетически разделен на более чем 140 патовариантов (*pv.*).

Так, у ряда штаммов микроорганизма *Xanthomonas campestris* наблюдалась устойчивость к некоторым антибиотикам. Штаммы Xc1, Xc2, B570, B610 обладали устойчивостью к канамицину и стрептомицину. Штамм B611 показал частичную невосприимчивость к левомицетину [1].

Патоген способен длительное время сохраняться в семенах растений, а также находиться в растительных остатках до двух лет с возможностью инфицирования здоровых растений [2].

Также отмечалось, что бактерии рода *Bacillus* оказывали ингибирующее воздействие на бактерии рода *Xanthomonas*.

Рассматривая аспект устойчивости бактерий к чужеродным агентам, необходимо акцентировать внимание на бактериальном иммунитете, который может осуществляться посредством системы рестрикции-модификации, изменения бактериальных клеточных рецепторов, системы CRISPR/Cas. Так, система CRISPR/Cas основывается на «запоминании» внедренного извне агента. Помимо таргетного участка, она содержит в себе расщепляющий домен, представляющий из себя белок с нуклеазной активностью [3].

Здесь же отметим важную роль эндонуклеаз в генной инженерии, которая, несомненно, велика. Ферменты с эндонуклеотической активностью имеют различные свойства и параметры. К примеру, эндонуклеазы рестрикции используются в системах геномного редактирования и позволяют решить ряд актуальных проблем, включая противостояние различным патологиям и разработку лекарственных препаратов, биотоплива, подхода к генной терапии.

Так, традиционно выделяют три группы эндонуклеаз рестрикции. Однако ряд источников классифицирует их еще на две дополнительные группы: рестриктазы 4-го и 5-го типа. Предоставим обзорную информацию для ознакомления.

Рестриктазы четвертого типа разрезают ДНК метилирующими метками, а их сайт узнавания содержит в себе нуклеотидные цепи с остатками метилированного или гидроксиметилированного цитозина. Они также состоят из субъединиц и требуют наличия ГТФ и магния в роли кофактора.

Пятый тип включает рестриктазы, ассоциированные с системой CRISPR/Cas. В этом случае полипептид включает в себя подструктурные элементы: эндонуклеазы рестрикции первых трех типов. Именно это обуславливает простоту, гибкость и эффективность функционирования данной системы и ее внедрение в генную инженерию.

Исходя из изложенного выше, можно подытожить, что эндонуклеазы по большому счету являются ключевым моментом в реализации защитной функции бактерий.

Интересно, что бактерии рода *Xanthomonas* при поражении растительных объектов вводят в их клетки эффекторные (регуляторные) TAL-белки, которые проникают в генетический аппарат – ядро клетки-мишени, впоследствии они регулируют активность генов путем активации транскрипции в цитоплазме клеток пораженного растительного объекта.

Эти белки распознают целевые участки с регуляторным профилем (промоторные области) необходимых генов и прочно связываются с ними, повышая при этом восприимчивость растения к патогену и тогда же влияя на экспрессию. TAL-белки синтезируются системой секреции III типа, которая кодируется кластером генов *hrp*. Отмечается, что множество генов с эффекторной активностью рассредоточено по всему геному.

Важно уточнить, что системы секреции III типа являются одним из нескольких типов бактериальных систем секреции, она встречается у ряда грамотрицательных бактерий и представляет собой комплекс функционально связанных белковых структур.

Данная система служит для обнаружения присутствия клеток эукариотических организмов и их поражения посредством выделения TAL-белков в мишень.

TAL-белки имеют относительно простую, линейную систему кодирования, которая тогда же допускает неоднозначность: некоторые пары аминокислот кодируют несколько нуклеотидов. Аминокислотная последовательность ДНК-узнающего фрагмента TAL-белков включает 34 аминокислотных остатков, которые стабильно повторяются. В них содержатся и переменные участки – аминокислоты в позициях 12 и 13. Именно они специфично кодируют нуклеотидную последовательность в связующем звене (сайте связывания).

Основной целью исследования является изучение генетических особенностей бактерий *Xanthomonas campestris*, анализ струк-

турно-функциональных особенностей эндонуклеаз, синтезируемых данным микроорганизмом, а также изучение возможности внедрения альтернативного расщепляющего домена в систему геномного редактирования TALEN.

Материалы и методы исследования

Методы анализа выбраны стандартные. Сюда входят сравнительный, биоинформатический анализ с использованием базы данных NCBI и программы UGENE, анализ и синтез научной литературы. Объект исследования – микроорганизм *Xanthomonas campestris*.

Результаты исследования и их обсуждение

В качестве эталонного объекта был выбран конкретный вид, полученный из изолята редиса, – *Xanthomonas campestris pv. raphani*, штамм MAFF 106181. Штамм MAFF 106181 состоит из единственной кольцевой хромосомы длиной 4 942 039 п.н. с содержанием ГЦ равным 65,29 %. PGAP идентифицировал 4269 (по данным от 2022 г. – 4279) генов, включая 6 генов рРНК и 53 гена тРНК (по данным исследования Т. Фудзикавы и Иноуэ, 2020). Количество синтезируемых белков соответствует 4041 (по данным исследования от 2022 г. – 4065). Их функции и классификация многообразны [4].

Далее проведены отбор белков с эндонуклеазной активностью и их биоинформатический анализ для дальнейшего потенциального использования в геномной инженерии, следуя при этом практическим целям.

Прежде обозначим, что эндонуклеазы со специфическим сайтом узнавания являются одним из главных инструментов в области молекулярной биологии и разделов генетики. В настоящее время продолжается поиск новых эффективных эндонуклеаз и их модификации, дабы расширить возможности применения в геномной инженерии. Традиционно после выделения из микроорганизма фермент очищается в несколько этапов, включая стадии гель-фильтрации и хроматографии (обычно на фосфоцеллюлозе).

Некоторые представители эндонуклеаз, которые имеют единый сайт узнавания, различаются по способности гидролизировать ДНК в зависимости от положения метилированного нуклеотида в самом сайте узнавания.

К примеру, в геноме *Xanthomonas campestris pv. raphani* (штамм MAFF 106181)

синтезируются 22 белка, связанных с эндонуклеазной активностью, которая может являться единственным ферментным профилем либо же входить в состав мультикомплексного плана.

В геноме обнаружены гены, кодирующие HNH-эндонуклеазы; классические эндонуклеазы, участвующие в процессах репарации; белки, содержащие домен эндонуклеазы; неспецифические ДНК/РНК – эндонуклеазы; эндонуклеазы репарации несоответствия ДНК семейства MutL; эндонуклеазы, ассоциированные с системой CRISPR; субъединицы эндонуклеаз рестрикции и сами рестрикторные эндонуклеазы.

Наименьшую длину в аспекте аминокислотных остатков составляет одна из HNH-эндонуклеаз (кодируется 71 аминокислота), а максимум в рассматриваемом пласте характерен для субъединицы R эндонуклеазы рестрикции первого типа, необходимой как для эндонуклеазной, так и для АТФ-азной активности. Тут количество аминокислотных остатков достигает 1004.

В свою очередь, эндонуклеазы репарации несоответствия ДНК из семейства MutL ориентированы на репарацию ошибочно спаренных нуклеотидов, делецию неправильно интегрированных оснований. Для того чтобы начать устранение ошибок, механизм репарации несоответствия отличает вновь синтезированную цепь от эталонной (родительской).

Относительно ДНК/РНК неспецифических эндонуклеаз обозначено несколько основополагающих аспектов: данный вид ферментов обладает способностью расщеплять одноцепочечные и двухцепочечные нуклеиновые кислоты, одним из необходимых условий для их активности является присутствие в среде двухвалентного металла (магния).

Xanthomonas campestris синтезирует несколько эндонуклеаз рестрикции – гидролаз, способных катализировать расщепление фосфодиэфирных связей чужеродной ДНК. Данные ферменты характерны в большей мере для прокариотических организмов. Они подразумевают защитную функцию, отличая собственный генетический материал от внедренного извне и имея специфический сайт «узнавания», который в конечном итоге служит ориентиром для совершения разреза.

При использовании биоинформатической программы UGENE и базы данных PubMed (NCBI) был проведен ознакоми-

тельный анализ генов, кодирующих белковые элементы, которые как-либо связаны с эндонуклеазным профилем.

Также рассмотрено два генетических участка, кодирующих родственные эндонуклеазы рестрикции. Они присутствуют и в микроорганизме *E. coli*, формируя Mgt-систему рестрикции.

Ниже дана общая характеристика для упомянутой системы со ссылками на гены и белковые продукты, которые были обнаружены в *Xanthomonas campestris*, однако подробно исследованы в *E. coli*. В *Xanthomonas campestris* это гены с ID (база NCBI) 58015512 (WP_076057030.1) и 58013825 (WP_076055657.1). Они кодируют соответственно 277 и 333 аминокислотных остатков. Нуклеотидная последовательность характеризуется длиной в 1302 п.н. и в 1084 п.н. во втором случае.

Данные белки – ферменты IV типа, которые узнают модифицированную, как правило – метилированную ДНК и представляют собой, как упоминалось ранее, Mgt систему *E. coli*.

Отдельного внимания заслуживает эндонуклеаза Cas1f (длина нуклеотидной последовательности – 1286 п.н., количество кодируемых аминокислотных остатков – 329), ассоциированная с CRISPR типа I-F с ID 58011564 (WP_014509413.1), основное значение которой заключается в осуществлении бактериального «иммунитета». Очевидны перспективы модификации cas-домена в рамках системы CRISPR/cas для решения ряда практических задач.

Обнаружение TAL(TALE)-белков у микроорганизмов рода *Xanthomonas* стало отправной точкой для создания новой системы геномного редактирования – системы TALEN. TAL-белки расшифровываются как Transcription Activator-Like Effectors. Связываясь с ДНК и тогда же активируя экспрессию целевых генов, они имитируют факторы транскрипции у эукариот. Данные белки имеют сложную структуру, в которую входит несколько основных элементов: ДНК-связывающий домен, сигнал ядерной локализации и домен, инициирующий транскрипцию гена-мишени.

ДНК-связывающий участок состоит из мономеров, образующих тандемные повторы из 34 аминокислотных остатков, где определяющими являются переменные участки (Repeat Variable Di-residue, RVD) в позициях 12 и 13, именно они обеспечивают узнавание нужного нуклеотида. RVD-участки при этом могут связываться с раз-

ными нуклеотидами, эффективность связывания тогда же будет различаться. На этот фактор влияет и наличие тимидина перед 5'-концом нуклеотидной последовательности. Именно с этого начинается связывание с мономерами. Завершающий тандемный повтор на деле состоит из 20 аминокислотных остатков [5, 6].

В настоящее время широко применяется рестриктаза XcmI, выделенная непосредственно из *Xanthomonas campestris*. Указанный выше фермент катализирует расщепление фосфодиэфирных связей в самом специфическом сайте узнавания. Фермент был получен в результате модификации *E. coli* (в нее был внедрен необходимый ген из *Xanthomonas campestris*), что может быть вызвано пониженной экспрессией данного гена в нативных условиях непосредственно у *Xanthomonas campestris*, либо же простотой и предсказуемостью работы с *E. coli*.

XcmI активна при температуре в 37 °С, а инактивация происходит в условиях 65 °С и выше, к метилированию данная рестриктаза не чувствительна. Ферментативную активность можно регулировать посредством буфера и достигнуть в конечном итоге ста процентов. Сайт рестрикции состоит из 15 нуклеотидов, он симметричен, а срединная часть (позиции от 4-й до 12-й включительно) может содержать любое азотистое основание. Данная эндонуклеаза рестрикции относится ко второму типу.

Заключение

Эндонуклеазы рестрикции являются важным и незаменимым инструментом генной инженерии, обеспечивающим целевые разрезы и последующее вырезание интересных генетических фрагментов.

После проведения анализа было выявлено, что исследуемый объект *Xanthomonas campestris* синтезирует множество белков, которые тем или иным образом связаны с эндонуклеазной активностью. Были разобраны их функции и попытка интеграции в систему геномного редактирования (в частности, TALEN).

В рассматриваемом микроорганизме обнаружено 22 белка, которые прямо или косвенно связаны с эндонуклеазной активностью (включая субъединицы рестриктаз и эндонуклеазы с мультикомплексным действием). Это эндонуклеазы, ассоциированные с системой CRISPR/Cas, осуществляющие функцию бактериального «иммунитета» и представляющие большой интерес для генной инженерии, это эндонуклеазы

семейства EхеM/NucH, которые отвечают за множество функций: естественную трансформацию, образование биопленок и т.д., это и рестриктазы, входящие в состав системы рестрикции-модификации, осуществляющей защиту клетки от чужеродного генетического материала.

Расщепляющий домен в системе TALEN в общих случаях представлен рестриктазой FokI. Основополагающим аспектом для применения FokI в системе TALEN является то, что расщепление ДНК опосредуется через неспецифический домен расщепления.

Итак, FokI катализирует гидролиз двухцепочечной ДНК рядом со специфическим сайтом узнавания, что в совокупности с невысокой ценой (до 3 тыс. руб. по данным сайта SibEnzyme на момент написания работы) и эффективном комбинировании с TAL-белками делает ее применение довольно привлекательным, поскольку в рамках системы TALEN распознавание ДНК определяется доменом TAL-белков.

Гипотетически любая другая рестриктаза, которая обладает аналогичными (или даже более подходящими относительно поставленной задачи) свойствами, может быть использована для данной системы геномного редактирования. Этот тезис частично определяет цель и актуальность данной работы.

Но стоит учесть и то, что ни одна эндонуклеаза рестрикции не может быть оптимальной для всех целей, так как свойства отдельно взятой рестриктазы влияют на потенциал нацеливания, спектр нецелевых разрезов, простоту и экономический аспект использования.

Ряд альтернативных эндонуклеаз рестрикции в рамках интегрирования в систему TALEN может включать, к примеру, мономерные, димерные нуклеазы, нуклеазный домен системы CRISPR/Cas и т.п.

Рассматривая рестриктазу XcmI как потенциальную альтернативу FokI, можно выделить несколько особенностей: фермент XcmI катализирует расщепление ДНК внутри специфического сайта узнавания, она также подходит для расщепления двухцепочечной молекулы ДНК. То, что разрез делается внутри сайта узнавания, сужает круг решаемых задач и характеризуется излишней спецификой для синтетических систем геномного редактирования.

Список литературы

1. Майоров П.С. Чувствительность бактерий *Xanthomonas campestris* к некоторым антибиотикам // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы XI Международной научно-практической конференции (Ульяновск, 23–24 июня 2021 г.). Ульяновск: УлГАУ, 2021. С. 82–86.
2. Габор Б., Као Дж., Краузе Д. Руководство по болезням крестоцветных. Semen, 2013. 52 с.
3. Nemudryi A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., Zakian S.M. TALEN and CRISPR / Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery // Acta Naturae. 2014. Vol. 6, Is. 3. P. 19–40.
4. Fujikawa T., Inoue Y. Genome Sequences of Two Pathogens of Cruciferous Crops, *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* MAFF 106181 and *X. campestris* pv. *campestris* MAFF 301176 // Microbiol Resour Announc. 2020. Vol. 9, Is. 42. P. 20. DOI: 10.1128/MRA.00887-20.
5. Kay S., Hahn S., Marois E., Hause G., Bonas U. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator // Science. 2007. Vol. 318, Is. 5850. P. 648–651. DOI: 10.1126/science.1144956.
6. Lamb B.M., Mercer A.C., Barbas C.F. Directed evolution of the TALE N-terminal domain for recognition of all 5' bases // Nucleic Acids Res. 2013. Vol. 41, Is. 21. P. 9779–9785. DOI: 10.1093/nar/gkt754.