

耻垢分枝杆菌宿主整合因子(IHF)对 DNA 拓扑结构的影响*

陈媛媛^{1,2)} 张先恩^{1,3)**} 毕利军^{4)**}

⁽¹⁾ 中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101; ⁽²⁾ 中国科学院大学, 北京 100049;

⁽³⁾ 中国科学院生物大分子科教融合卓越中心, 北京 100101; ⁽⁴⁾ 中国科学院生物物理研究所核酸生物学重点实验室, 北京 100101)

摘要 结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)是结核病的病原菌, 每年导致数百万人死亡。对于分枝杆菌基本生物学特性的研究有助于新的药物及治疗手段的研发。耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*)是分枝杆菌属中的一种非致病菌, 与结核分枝杆菌亲缘关系较近, 是实验室常用的研究分枝杆菌的模式菌种。分枝杆菌主要编码三种染色质蛋白, 类组蛋白 HU、Lsr2 和宿主整合因子 IHF。为研究 IHF 在染色体包装中的作用, 我们在大肠杆菌中表达、纯化了耻垢分枝杆菌 IHF 蛋白(MsIHF), 并对其影响 DNA 拓扑结构的性质进行了系统分析。体外研究的结果表明, MsIHF 以同二聚体的形式存在, 其对负超螺旋 DNA 具有一定的结合偏好性, 同时, 该蛋白可以有效地固定 DNA 负超螺旋。进一步的研究表明, MsIHF 可以调控拓扑异构酶的活性。MsIHF 的结合明显地抑制拓扑异构酶 I 的松弛活性, 而与此相反, 该蛋白可以轻微地促进旋转酶引入 DNA 负超螺旋的能力。以上结果提示, MsIHF 可能通过调控拓扑异构酶的活性影响染色体 DNA 的结构, 进而调控其包装。

关键词 分枝杆菌, 宿主整合因子, DNA 结合蛋白, DNA 超螺旋, DNA 拓扑异构酶

学科分类号 Q71, Q51

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0271

染色质蛋白在所有细胞生物中均发挥着至关重要的作用, 它们负责在压缩包装基因组 DNA 的同时调控 DNA 复制、修复及转录过程中分子机器与基因组 DNA 的互作。在细菌细胞中存在着多种 DNA 结合蛋白(例如, HU、IHF、H-NS、Fis 及 Lrp 等), 这些蛋白质共同将染色体 DNA 包装成为一个有序的结构——拟核^[1-2]。这些蛋白质具有不同程度的序列特异性, 通过弯折、桥联或者缠绕 DNA 行使包装功能^[3]。此外, 一些染色质蛋白还起到了全局性的转录调控功能, 缺失这类蛋白往往导致多效性的表型变化^[2-4]。大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的多种染色质蛋白的性质和功能, 包括 IHF、HU 以及 H-NS 等, 已得到了深入的研究。H-NS 通常结合在富含 AT 的基因间区, 调控两侧基因的表达^[5]。该蛋白也可以与远处结合的 H-NS 分子聚合, 有效地连接相距较远的 DNA 片段^[6]。HU 蛋白是异二聚体, 不具有序列特异性, 可以促进 DNA 弯折及缠绕^[3, 7]。IHF 也是异二聚体, 与 HU 蛋白的结构

具有较高的同源性, 其结合可以明显地造成 DNA 弯折, 然而该蛋白通常结合在特异的 DNA 序列, 例如细菌基因组(*attB* 位点)及噬菌体 DNA 上的整合位点(*attP* 位点)^[8]。

不同的细菌门中染色质蛋白的种类及功能具有明显的多样性。其中放线菌(包括链霉菌及分枝杆菌等)编码 HU 的类似蛋白但缺少明显的 IHF 或 H-NS 的同源蛋白。近期的研究表明, 分枝杆菌含有一类 H-NS 的同功蛋白——Lsr2^[9]。而在结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)与耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*)也发现了一类具有促进噬菌体 DNA 整合的活性蛋白, 因此命名为 mIHF^[10-11]。与 *E. coli*

* 中国科学院(KJZD-EW-TZ-L04, XDPB0305)和国家自然科学基金(U1401224)资助项目。

** 通讯联系人。

张先恩. Tel: 010-64888148, E-mail: zhangxe@ibp.ac.cn

毕利军. Tel: 010-64888464, E-mail: blj@ibp.ac.cn

收稿日期: 2017-07-11, 接受日期: 2017-10-13

IHF 相似, 该蛋白是一种小分子、热稳定的蛋白, 倾向于结合弯曲 DNA, 且可以与噬菌体整合酶以及 *attP* DNA 形成稳定的复合物^[10-11]. 与 *E. coli* IHF 相似, mIHF 的胞内含量在对数后期以及进入静止期时达到最大^[12-13]. 然而, 2 种蛋白在一级序列及二级结构上没有明显的相似性, 二者的 DNA 序列偏好性也明显不同, 而且前者不能取代 mIHF 的胞内功能^[13]. 值得注意的是, mIHF 对 *M. smegmatis* 的存活是必需的^[12], 同时该蛋白似乎对 *M. tuberculosis* 的生长也很重要^[14]. 这些结果表明 mIHF 在分枝杆菌胞内的功能不仅止于噬菌体 DNA 整合, 而很可能在染色体组织包装中发挥作用.

近期, 对 *M. tuberculosis* 编码的 mIHF 蛋白 (MtIHF) 的研究结果显示^[11], MtIHF 在体外可以促进 DNA 压缩成为类似拟核的结构或者高级的纤维状结构, 且该活性依赖于其偏好序列在 DNA 上的位置. 另外, 对与 mIHF 亲缘关系较近的 *Streptomyces coelicolor* IHF (sIHF) 的研究表明, sIHF 对该菌的染色体凝集以及生孢过程中的染色体分离具有十分重要的作用^[15], sIHF 可以在体内和体外影响拓扑异构酶的活性, 并明显改变 DNA 的拓扑结构^[15]. 超螺旋有助于 DNA 的凝集以及高级结构的形成, 而影响 DNA 拓扑结构是染色质蛋白的特点之一. 然而, mIHF 对 DNA 拓扑结构的影响仍不清楚.

M. tuberculosis 基因组中注释的 MtIHF 比来源于 *M. smegmatis* 的 mIHF 蛋白 (为与 MtIHF 进行区别, 命名为 MsIHF) 多出了一个长约 85 个氨基酸的 N 端结构域^[11, 16], 其余序列同源性非常高 (图 1). 但也有研究表明在 *M. tuberculosis* H37Rv 胞内的天然 MtIHF 不含有 N 端结构域^[17]. 最近的研究表明 N 端结构域的缺失对 MtIHF 的活性没有影响^[18]. 因此对 MsIHF 的研究有助于对 mIHF 生理功能的理解. 在本研究中, 我们对 MsIHF 对 DNA 拓扑结构的影响进行了系统的研究. 结果显示, MsIHF 在溶液中以同二聚体的形式存在, 虽然其对不同拓扑形式的质粒 DNA 亲和力相近, 但该蛋白可以有效地固定 DNA 负超螺旋. 进一步的研究表明, MsIHF 明显地抑制拓扑异构酶 I 的活性, 推测该蛋白在体内可能参与调控染色体 DNA 的超螺旋状态, 进而调节染色体的结构. 本研究的结果不仅为证实 mIHF 参与染色体包装提供了直接的证据, 而且有助于揭示 mIHF 参与 DNA 包装的分子机制.

1 材料与方法

1.1 蛋白质表达与纯化

以耻垢分枝杆菌基因组 DNA 为模板, 利用引物 (F1: 5' TAATCATATG GCCCTTCC CCAGTTGAC 和 R1: 5' TAATCTCGAG TTACGACTGGT-CGAACTTC) PCR 扩增 MsIHF 的编码基因片段, 克隆至表达载体 pET-28a 的 *Nde* I -*Xho* I 位点, 并转化大肠杆菌感受态细胞 BL21. 在 LB 培养基中大量培养菌体, 在培养物 A_{600} 达到 0.6 时加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 诱导表达, 37℃ 继续培养 3 h 后, 6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体. 细胞重悬于缓冲液 A (Buffer A: 20 mmol/L Tris-Cl pH 8.0, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Imidazole), 超声破碎细胞, 10 000 r/min 离心 15 min, 收集上清. 将裂解液上清上样至以 Buffer A 预平衡的 Histrap HP 柱 (GE Healthcare), 用 Buffer A 清洗 10 个柱体积, 以洗脱缓冲液 B (Buffer B: 20 mmol/L Tris-Cl pH 8.0, 500 mmol/L NaCl, 250 mmol/L Imidazole) 梯度洗脱蛋白. 收集含有 MsIHF 蛋白组分, 透析至缓冲液 C (Buffer C: 20 mmol/L Tris-Cl pH 6.8, 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA) 中, 使用 Histrap SP 柱 (GE Healthcare) 进行进一步分离、纯化, 以洗脱缓冲液 D (Buffer D: 20 mmol/L Tris-Cl pH 6.8, 1 mol/L KCl, 1 mmol/L EDTA) 梯度洗脱蛋白. 收集含有 MsIHF 蛋白组分, 透析至 Buffer C 中备用, SDS-PGE 检测蛋白质纯度.

1.2 分子筛凝胶过滤层析

使用 HiLoad10/300 Superdex 75 柱 (GE healthcare) 对纯化的 MsIHF 蛋白进行分子尺寸排阻色谱分析. 取 100 μ l MsIHF 蛋白样品 (1 mg) 上样到以 Buffer C 预平衡的分子筛柱, 流速为 0.5 ml/min, A_{280} 检测蛋白洗脱. 层析柱的空体积 (v_0) 和柱体积 (v_t) 分别利用蓝葡聚糖和二甲基蓝进行测定. MsIHF 蛋白分子的保留体积可以通过公式 $K_{av} = (v_e - v_0) / (v_t - v_0)$ 进行计算, 其中 v_e 为洗脱峰体积. 在相同条件下, 利用低分子质量蛋白质标准 (GE healthcare) 标定该分子筛柱, 分别计算 K_{av} , 对 $\lg M_r$ 作标准曲线, 然后通过该曲线计算 MsIHF 蛋白的分子质量.

1.3 琼脂糖凝胶阻滞实验

分别制备超螺旋 (supercoiled, Sc)、线性 (linear, L) 以及松弛环状 (relaxed, R) 的质粒 pBR22

DNA, 按照 1 : 1 : 1 的比例混合. 按不同蛋白 / DNA 质量比(0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0)将 MsIHF 与 150 ng 的 DNA 混合, 室温孵育 15 min. 以 1% 的琼脂糖凝胶在 1×TAE 中电泳分析蛋白质-DNA 复合物, 凝胶在溴化乙锭溶液(0.5 mg/L)中染色, 紫外光下成像.

1.4 切刻-闭环实验

切刻 - 闭环实验参照文献中方法进行^[9]: 利用切口酶 Nb. Bpu10I(Fermentas)按照说明书条件处理超螺旋 pBR322 制备仅含有单个切刻位点的 pBR322 DNA. 每个反应取 0.2 μg 单切刻 DNA, 分别与不同量的 MsIHF 蛋白混合(蛋白 / DNA 质量比分别为 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0), 体系中含有 1×T4 连接酶反应缓冲液(40 mmol/L Tris-Cl pH 7.8, 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L ATP 以及 100 mg/L BSA), 25℃ 下孵育 15 min. 向体系中加入 T4 DNA 连接酶(2U; Fermentas)启动连接反应, 25℃ 下孵育 5 min. 然后加入 5×终止缓冲液(250 mmol/L EDTA 和 2.5 % SDS)终止反应, 并以 0.5 g/L 的蛋白酶 K 在 55℃ 下除去体系中的蛋白. 样品中 DNA 的超螺旋状态以 1% 的琼脂糖凝胶在 1×TAE 中进行电泳分析, 凝胶在溴化乙锭溶液(0.5 mg/L)中染色, 紫外光下成像.

1.5 DNA 松弛与超螺旋实验

为检测 MsIHF 对拓扑异构酶 I (Topo I ; NEB)

松弛超螺旋 DNA 活性的影响, 0.3 μg 超螺旋 pBR322 以 1 U 的 Topo I 进行松弛(反应条件参照酶的说明书), 反应中分别加入不同量的 MsIHF 蛋白(蛋白 / DNA 质量比分别为 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0), 37℃ 下反应 30 min. 另外, 以松弛的质粒 pBR322 为底物, 检测 MsIHF 对旋转酶(gyrase; NEB)引入 DNA 负超螺旋活性的影响. 反应体系中含有 0.3 μg 松弛的 pBR322、gyrase 以及不同量的 MsIHF 蛋白(蛋白 / DNA 质量比分别为 0, 0.125, 0.25, 0.5), 37℃ 下反应 30 min(反应条件参照酶的说明书). 以上反应的终止、体系中蛋白的去除以及样品中 DNA 超螺旋状态的分析, 参照 1.4 中方法进行.

2 结 果

2.1 MsIHF 在溶液中形成二聚体

序列比对的结果显示(图 1), mIHF 蛋白与 *E. coli* 来源的 2 种 IHF 亚基(IHFα 与 IHFβ)的序列相似性非常低, 而与 *S. coecolor* 来源的 sIHF 同源性很高. 其中, MsIHF 与 MtIHF 的 C 端序列的一致性接近 100%. 由于有证据表明 *M. tuberculosis* H37Rv 胞内的天然 MtIHF 可能并不含有其基因组中注释的 N 端约 85 个氨基酸^[7], 因此可以推测 MsIHF 与 MtIHF 具有相同的生化性质及生理功能. 同时值得注意的是, *E. coli* 来源的 IHF 与

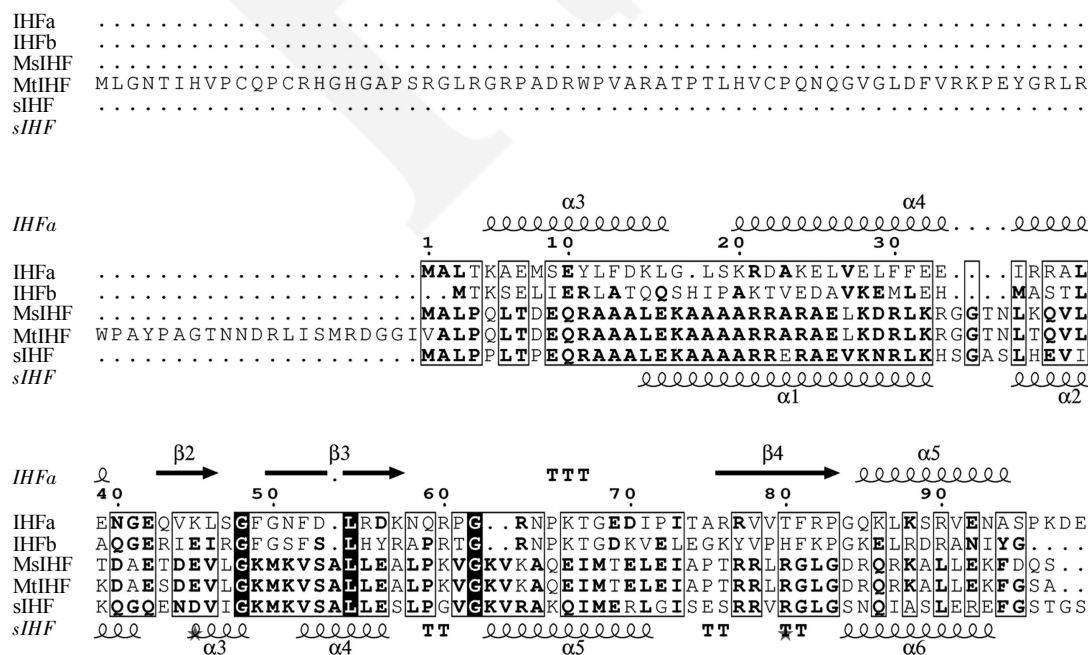


Fig. 1 Sequence alignment of selected IHF homologues

Sequences are from *E. coli* (IHFα, b1712; and IHFβ, b0912), *M. smegmatis* (MsIHF, MSMEG_3050), *M. tuberculosis* (MtIHF, Rv1388) and *S. coelicolor* (sIHF, Sco1480). The secondary structures of IHFα (PDB code: 2IIE) and sIHF (PDB code: 4ITQ) are indicated.

S. coecolor 来源的 sIHF 的二级结构之间区别非常明显, 提示放线菌中的 IHF 蛋白可能具有较为独特的功能。

含有 N 端 His 标签(6×his)的重组 MsIHF 蛋白经镍柱亲和层析及阳离子交换层析纯化得到(图 2a)。经 SDS-PAGE 检测, MsIHF 蛋白呈现单一条带(纯度大于 97%), 其表观分子质量接近 14 ku, 与重组蛋白的理论分子质量(13349.41 u)相近。对该条带进行胶内酶解及肽指纹图谱分析的结果进一步确认

该蛋白即为 MsIHF(数据未显示)。多数细菌中的 IHF 为异二聚体, 而链霉菌及分枝杆菌则只编码一个 IHF 亚基。其中 sIHF 为单体形式^[15], 而 MtIHF 为同二聚体^[11, 17]。为确认 MsIHF 在溶液中的聚集形式, 利用分子尺寸排阻层析测定了该蛋白在溶液中的分子质量(图 2b)。层析结果显示, MsIHF 在洗脱时形成单一的洗脱峰, 根据标准曲线计算得到其分子质量约为 26.6 ku, 表明该蛋白在溶液中形成稳定的同二聚体。

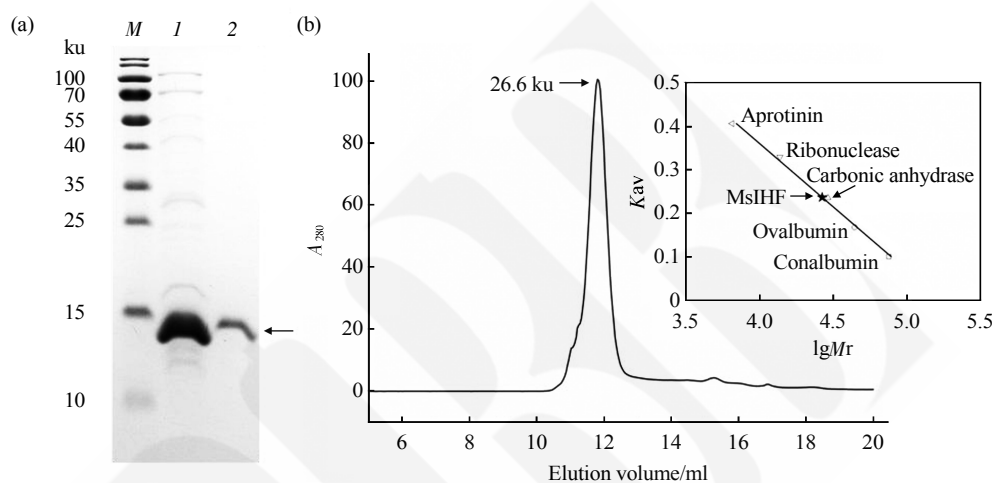


Fig. 2 Characterization of purified MsIHF

(a) Purified recombinant MsIHF sample was analyzed by SDS-PAGE through a 15% gel. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue and imaged. (b) Gel filtration chromatography of MsIHF. The protein sample was loaded at an amount of ~1 mg in 100 μ l, as described in “Materials and methods”. The Y-axis represents the absorbance at 280 nm. Inset is the analysis of the gel filtration experiment shown in panel (b). The standard curve was generated by linear least squares regression analysis. Molecular weight markers (conalbumin, 75 ku; ovalbumin, 44 ku; carbonic anhydrase, 29 ku; ribonuclease, 13.7 ku; aprotinin, 6.5 ku) are indicated. The calculated molecular mass of the sample peak of MsIHF is also shown.

2.2 MsIHF 结合 DNA

我们进而利用琼脂糖凝胶阻滞实验分析了 MsIHF 与不同拓扑结构形式(负超螺旋、线性及松弛形式)的质粒 pBR322 DNA 的相互作用(图 3a)。结果显示, 随着蛋白量的增加 3 种形式 DNA 的迁移率均逐渐下降。事实上, 在蛋白质浓度较低时(蛋白/DNA 质量比为 0.25; MsIHF 二聚体浓度约为 0.14 μ mol/L)即可观察到 3 种形式的 DNA 均发生轻微的泳动减慢, 表明 MsIHF 可以很好地结合 3 种 DNA。而当蛋白质/DNA 质量比提高为 0.5 时, 线性 DNA 的条带变得不规则, 可能是由于 MsIHF 的不均一结合所致。蛋白质/DNA 质量比提高为 1.0 时, 超螺旋 DNA 的条带呈弥散状(smear), 推测 MsIHF 的结合改变了 DNA 的构象。当蛋白质/DNA 质量比高于 2.0 时, 松弛与线性 DNA 的

阻滞条带重合, 表明此时二者与 MsIHF 所形成的复合物的结构可能十分相似。当质量比达到 16.0 时, 阻滞条带均呈现规则、锐利的形态, 且迁移率不再变化, 这一结果提示, 蛋白/DNA 质量比在 8 左右时 MsIHF 在 DNA 上的结合接近饱和, 此时蛋白质二聚体/DNA 摩尔比约为 848:1。鉴于 pBR22 DNA 的长度为 4 361 bp, 因此, 可以估算出 MsIHF 在 DNA 上的最大结合密度约为 5 bp/蛋白质二聚体。这一数值小于之前对其他细菌编码的 IHF 的报道^[20-22], 但却与 sIHF-DNA 复合物晶体中的 DNA 结合位点的大小(~4 bp)相似^[15], 这一点提示来自于放线菌的 IHF 可能具有独特的 DNA 结合模式。

分别对 3 种形式的 DNA 电泳迁移率的变化对蛋白二聚体浓度作图(图 3b), 发现迁移率的改变可以较好地反映 DNA 分子上 MsIHF 蛋白的结合数

量. 按照半数 DNA 被结合时的蛋白质浓度为解离常数这一定义, 可以计算出 MsIHF 结合超螺旋、线性及松弛质粒 DNA 的解离常数(K_D)分别约为

0.8、1.2 以及 $1.7 \mu\text{mol/L}$. 这一结果表明, 与线性或松弛环状 DNA 相比, MsIHF 倾向于结合超螺旋 DNA.

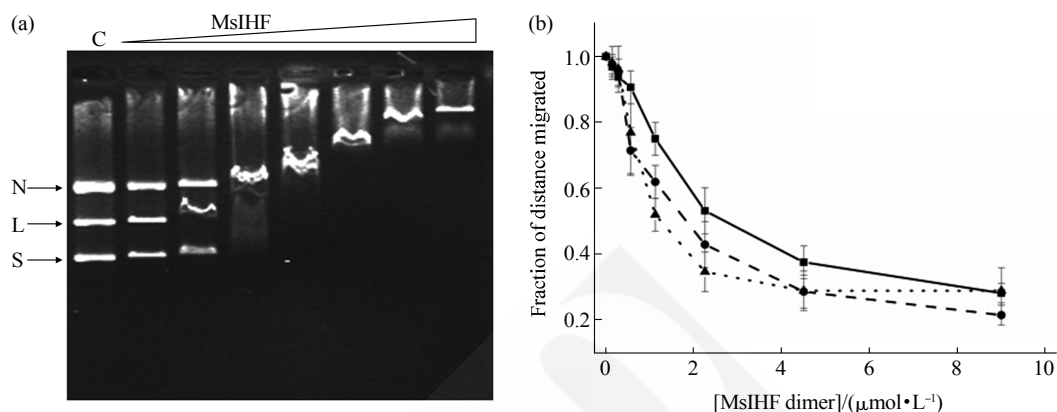


Fig. 3 MsIHF binding to plasmid DNA in different forms

(a) Agarose gel shift analysis of MsIHF binding to pBR322 DNA in supercoiled (S), linear (L) and nicked (N) forms. Protein/DNA mass ratios were 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 and 16, respectively. (b) Binding curves for MsIHF binding to supercoiled, linear and nicked DNA. Each curve was an average of the data from three independent experiments. ■—■: Nicked DNA; ●—●: Linear DNA; ▲—▲: Supercoiled DNA.

2.3 MsIHF 在体外固定 DNA 负超螺旋

多数染色质蛋白可以固定 DNA 负超螺旋, 而我们的结果也表明 MsIHF 对超螺旋 DNA 具有一定的偏好. 因此我们利用切刻 - 闭环实验检测了 MsIHF 固定 DNA 超螺旋的能力(图 4a). 在反应体系中存在或不存在 MsIHF 的情况下, 含有单一

口的质粒 pBR322 DNA 以 T4 DNA 连接酶进行连接, 并以琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的超螺旋状态. 需要指出的是, 在 25°C 时, T4 DNA 连接酶的连接产物在电泳中表现为轻度的正超螺旋而不是松弛形态. 这可能是由于连接反应与电泳的实验条件(如, 温度、离子强度等)的差别所造成的^[23]. 而随

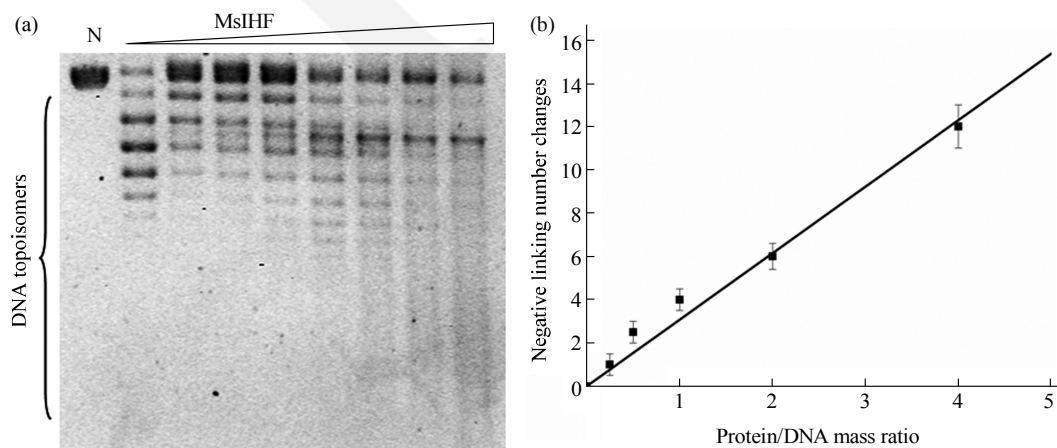


Fig. 4 DNA nick-closure assays

(a) MsIHF constrains negative DNA supercoils. Plasmid DNA containing a single nick was incubated in the presence of increasing amounts of MsIHF before ligation by T4 DNA ligase. Protein/DNA mass ratios were 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 and 16, respectively. N, pBR322 with a single nick. (b) A plot of the negative linking number change against the protein/DNA mass ratio by linear fit with the software Origin 7.5. The linking number change of pBR322 nick closed in the presence or absence of MsIHF was measured by resolving plasmid topoisomers on an agarose gel, as shown in Figure 4a, and subsequent band counting. Each data point was an average of the data from three independent experiments.

着 MsIHF 蛋白浓度的增加, 连接产物中的正超螺旋逐渐减少并转变为负超螺旋, 继而负超螺旋数持续增加. 这一结果表明 MsIHF 在体外可以有效地固定 DNA 负超螺旋.

pBR322 DNA 连接产物的连环数 (linking number) 的变化可以通过条带计数得到, 对蛋白 / DNA 质量比作图 (图 4b), 线性拟合曲线的斜率即可表示 MsIHF 固定 DNA 超螺旋的效率. 如图 4b 所示, 当质量比为 1 : 1 时 (MsIHF 蛋白二聚体与 DNA 的摩尔比约为 106 : 1), MsIHF 可以在每个 DNA 分子上大约固定 3 个 DNA 负超螺旋. 也就是说, 大约 36 个蛋白二聚体分子的结合固定 1 个负超螺旋. 根据 DNA 结合实验的结果, 当 MsIHF 的结合达到饱和时 (pBR322 分子上约结合 848 个 MsIHF 蛋白二聚体分子) 大约可以在每个 pBR322 DNA 分子上固定约 24 个负超螺旋, 而在切刻 - 闭环实验中蛋白质饱和时可计数的负超螺旋约为 20 个, 与上述理论计算值相近.

2.4 MsIHF 调控拓扑异构酶的活性

虽然 MsIHF 的结合可以直接改变 DNA 的拓扑结构, 但在细菌胞内 DNA 的超螺旋水平主要由旋转酶以及拓扑异构酶 I 来调控^[24], 因此我们进而分析了 MsIHF 对 DNA 拓扑异构酶活性的影响 (图 5). 由于高浓度的 MsIHF 会干扰 Topo I 对旋转酶与 DNA 的结合 (数据未显示), 因此实验均在较低蛋白质浓度下进行 (蛋白 / DNA 质量比小于 1.0), 在此条件下超过 75% 的底物 DNA 未被 MsIHF 所覆盖,

基本不影响拓扑异构酶与 DNA 的互作. 结果显示, MsIHF 在体外实验中明显抑制 Topo I 的松弛活性 (图 5a). 当反应体系中不存在 MsIHF 时, Topo I 可以将超螺旋质粒 DNA 完全松弛, 而随着 MsIHF 浓度的提高, Topo I 的松弛活性也逐渐下降. 值得注意的是, 在相同的 MsIHF 浓度下, 相比于切刻 - 闭环实验的结果, 松弛实验中 MsIHF 蛋白所造成的连环数的改变要更加的明显. 如图 5b 所示, 当蛋白 / DNA 质量比为 0.5 时, DNA 产物与松弛 DNA 的负连环数之差约为 6, 而在切刻 - 闭环实验中, 相同浓度的 MsIHF 固定的负超螺旋数小于 2. 这一区别提示 MsIHF 对 Topo I 活性的影响不完全缘于其固定的负超螺旋, 可能还存在其他互作机制.

与 Topo I 的情况不同, MsIHF 可以轻微地促进旋转酶的活性 (图 5c). 当反应体系中不存在 MsIHF 时, 旋转酶可以在松弛的质粒 DNA 上引入负超螺旋, 形成一系列含有负超螺旋的拓扑异构体条带; 随着反应体系中 MsIHF 浓度的提高, 可以观察到电泳迁移率较慢的拓扑异构体条带逐渐减少, 可以推断 MsIHF 促进了旋转酶引入 DNA 负超螺旋的活性. 虽然本实验中由于产物中多数 DNA 分子的负超螺旋程度很高, 无法通过电泳条带计数来准确计算其 DNA 连环数的变化, 但根据该变化比较细微这一事实, 可以推测 MsIHF 对旋转酶活性的促进可能主要来自于其固定 DNA 负超螺旋的活性.

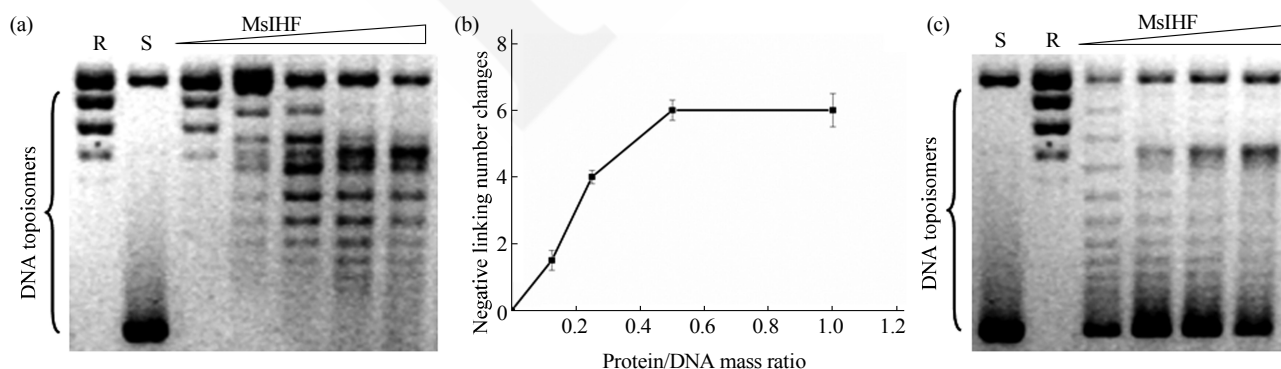


Fig. 5 MsIHF modulated the activities of topoisomerases in vitro

(a) MsIHF inhibits DNA relaxation by topoisomerase I from *E. coli*. Negatively supercoiled plasmid DNA was relaxed by *E. coli* Topo I in the presence of increasing amounts of MsIHF. Protein/DNA mass ratios were 0, 0.125, 0.25, 0.5 and 1.0, respectively. R: Relaxed circular DNA; S: Negatively supercoiled DNA. (b) A plot of the negative linking number change against the protein/DNA mass ratio. The linking number change of pBR322 relaxed by Topo I in the presence or absence of MsIHF was measured by resolving plasmid topoisomers on an agarose gel, as shown in Figure 5a, and subsequent band counting. Each data point was an average of the data from three independent experiments. (c) MsIHF stimulates the supercoiling activity of gyrase from *E. coli*. Relaxed plasmid DNA was relaxed by *E. coli* Topo I in the presence of increasing amounts of MsIHF. Protein/DNA mass ratios were 0, 0.125, 0.25 and 0.5, respectively. R: Relaxed circular DNA; S: Negatively supercoiled DNA.

3 讨 论

细菌中的拟核相关蛋白通常具有两种主要的生理功能：其一，将染色质 DNA 包装、折叠形成拟核；其二，调控细胞中重要基因的表达。由于这类蛋白质在胞内的含量丰富且具有较低的序列偏好性，它们一般通过调整 DNA 结构来进行转录调控^[2,29]。*Mycobacterium* 编码 3 种主要的拟核相关蛋白——HU、Lsr2 以及 mIHF。其中 Lsr2 和 mIHF 仅在放线菌中保守。mIHF 与其他细菌所编码的 IHF 的序列相似性很低(图 1)，因此研究 mIHF 的生理功能有助于揭示分枝杆菌独特的生物学性质。

本研究在体外系统分析了 MsiHF 对 DNA 拓扑结构的影响，发现 MsiHF 倾向于结合超螺旋 DNA，且可以固定 DNA 负超螺旋。此前的研究表明，MtIHF 的 C 端结构域(与 MsiHF 高度同源的结构域)可以在质粒 DNA 上形成不同角度的弯折^[7]，而全长的 MtIHF 同样表现出缠绕和弯曲短片段 DNA 的能力^[11]，这可能是 MsiHF 固定 DNA 负超螺旋的机制。本研究还发现 MsiHF 可以在体外调节拓扑异构酶(尤其是 Topo I)的活性，而这种调控不完全归结于其固定 DNA 负超螺旋的能力，提示 MsiHF 可能通过某种未知的机制直接或间接地影响 Topo I 的松弛活性。此前的研究显示，*M.tuberculosis* 编码的 HU 蛋白(MtHU)可以通过直接与 Topo I 的相互作用来促进其活性^[26]。需要指出的是，MtHU 的调控特异性针对 MtTopo I，而不影响 *E. coli* 来源的 Topo I (EcTopo I)，而 MsiHF 则可以有效地抑制 EcTopo I 的松弛活性，说明 MsiHF 可能并非通过与 Topo I 的互作而影响其活性。虽然 mIHF 蛋白家族成员的长度具有多样性，但均具有保守的 C 端结构域。而近期研究则表明，MtIHF 蛋白的 C 端结构域与全长蛋白质的生化性质基本一致^[18]，因此对 MsiHF 的研究可以帮助理解 mIHF 蛋白家族的生理功能。值得注意的是，mIHF 对分枝杆菌的生长是必需的^[12,14]，说明在分枝杆菌细胞内 mIHF 对染色体 DNA 的组织包装是必需的。而 HU 和 mIHF 对拓扑异构酶活性的不同影响，提示它们在 DNA 超螺旋水平的调节过程中发挥相反的作用，并进而参与全局性的转录调控。

参 考 文 献

[1] Wu L J. Structure and segregation of the bacterial nucleoid. Curr

- Opin Genet Dev, 2004, **14**(2): 126–132
- [2] Dame R T. The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. Mol Microbiol, 2005, **56**(4): 858–870
- [3] Dillon S C, Dorman C J. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. Nat Rev Microbiol, 2010, **8**(3): 185–195
- [4] Browning D F, Grainger D C, Busby S J W. Effects of nucleoid-associated proteins on bacterial chromosome structure and gene expression. Curr Opin Microbiol, 2010, **13**(6): 773–780
- [5] Fang F C, Rimsky S. New insights into transcriptional regulation by H-NS. Curr Opin Microbiol, 2008, **11**(2): 113–120
- [6] Dame R T, Noom M C, Wuite G J L. Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation. Nature, 2006, **444**(7117): 387–390
- [7] Guo F S, Adhya S. Spiral structure of *Escherichia coli* HU alpha beta provides foundation for DNA supercoiling. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, **104**(11): 4309–4314
- [8] Swinger K K, Rice P A. IHF and HU: flexible architects of bent DNA. Curr Opin Struc Biol, 2004, **14**(1): 28–35
- [9] Gordon B R G, Li Y F, Wang L R, et al. Lsr2 is a nucleoid-associated protein that targets AT-rich sequences and virulence genes in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, **107**(11): 5154–5159
- [10] Pedulla M L, Lee M H, Lever D C, et al. A novel host factor for integration of mycobacteriophage L5. P Natl Acad Sci USA, 1996, **93**(26): 15411–15416
- [11] Sharadamma N, Harshavardhana Y, Ravishankar A, et al. Molecular dissection of *Mycobacterium tuberculosis* integration host factor reveals novel insights into the mode of DNA binding and nucleoid compaction. Biochemistry, 2015, **54**(26): 4142–4160
- [12] Pedulla M L, Hatfull G F. Characterization of the mIHF gene of *Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol, 1998, **180**(20): 5473–5477
- [13] Bushman W, Thompson J F, Vargas L, et al. Control of directionality in lambda-site specific recombination. Science, 1985, **230**(4728): 906–911
- [14] Sassetti C M, Boyd D H, Rubin E J. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. Mol Microbiol, 2003, **48**(1): 77–84
- [15] Swiercz J P, Nanji T, Gloyd M, et al. A novel nucleoid-associated protein specific to the actinobacteria. Nucleic Acids Res, 2013, **41**(7): 4171–4184
- [16] Camus J C, Pryor M J, Médigue C, et al. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Microbiology, 2002, **148**(Pt 10): 2967–2973
- [17] Mishra A, Vij M, Kumar D, et al. Integration host factor of *Mycobacterium tuberculosis*, mIHF, compacts DNA by a bending mechanism. Plos One, 2013, **8**(7): e69985
- [18] Sharadamma N, Harshavardhana Y, Muniyappa K. Defining the functionally important domain and amino acid residues in *Mycobacterium tuberculosis* integration host factor for genome stability, DNA binding, and integrative recombination. J Bacteriol,

- 2017, **199**(19):e00357
- [19] Zhang Z F, Zhao M, Wang L, *et al.* Roles of Leu28 side chain intercalation in the interaction between Cren7 and DNA. *Biochem J*, 2017, **474**(10): 1727–1739
- [20] Rice P A, Yang S, Mizuuchi K, *et al.* Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell*, 1996, **87**(7): 1295–1306
- [21] Lynch T W, Read E K, Mattis A N, *et al.* Integration host factor: putting a twist on protein-DNA recognition. *Journal of Molecular Biology*, 2003, **330**(3): 493–502
- [22] Bao Q, Chen H, Liu Y, *et al.* A Divalent metal-mediated switch controlling protein-induced DNA bending. *Journal of Molecular Biology*, 2007, **367**(3): 731–740
- [23] Mai V Q, Chen X L, Hong R, *et al.* Small abundant DNA binding proteins from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* constrain negative DNA supercoils. *J Bacteriol*, 1998, **180** (9): 2560–2563
- [24] Dorman C J, Dorman M J. DNA supercoiling is a fundamental regulatory principle in the control of bacterial gene expression. *Biophys Rev*, 2016, **8**(Suppl 1): 89–100
- [25] Dorman C J. Genome architecture and global gene regulation in bacteria: making progress towards a unified model? *Nat Rev Microbiol*, 2013, **11**(5): 349–355
- [26] Ghosh S, Mallick B, Nagaraja V. Direct regulation of topoisomerase activity by a nucleoid-associated protein. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**(17): 11156–11165

Effects of Integration Host Factor (IHF) From *Mycobacterium smegmatis* on DNA Topological Structure*

CHEN Yuan-Yuan^{1,2)}, ZHANG Xian-En^{1,3)**}, BI Li-Jun^{4)**}

⁽¹⁾ National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁽²⁾ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

⁽³⁾ CAS Center for Excellence in Biomacromolecules, Beijing 100101, China

⁽⁴⁾ Key Laboratory of RNA Biology, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract *Mycobacterium tuberculosis* is the pathogen of tuberculosis which causes about millions people death annually. *M. smegmatis*, as a type of non-pathogenic strain of *Mycobacterium* closely related to *M. tuberculosis*, is the most studied model strain in laboratory. *Mycobacterium* encodes three types of chromatin proteins, *i.e.* histone-like protein HU, Lsr2 and integration host factor (IHF). To investigate the functional roles of IHF in chromosomal DNA organization, we expressed and purified IHF protein from *M. smegmatis* (MsIHF) in *Escherichia coli*, and analyzed the effects of MsIHF on DNA topology *in vitro*. MsIHF exists as a stable homodimer in solution. MsIHF exhibits preferred binding to negatively supercoiled DNA rather than linear or relaxed DNA. This protein is also capable of constraining negative DNA supercoils. Further analyses showed modulations of topoisomerase activities by MsIHF *in vitro*. MsIHF obviously inhibits the relaxation of supercoiled DNA by topoisomerase I from *E. coli*. By contrast, this protein slightly stimulates *E. coli* gyrase to introduce negative supercoils into relaxed DNA. These data suggests that MsIHF may alter the topological structure of chromosomal DNA through modulation of the activities of topoisomerases, and therefore regulates the organization of chromosome.

Key words *Mycobacterium*, integration host factor, DNA binding protein, DNA supercoiling, DNA topoisomerase

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0271

*This work was supported by grants from The Chinese Academy of Sciences (KJZD-EW-TZ-L04, XDPB0305) and The National Natural Science Foundation of China (U1401224).

**Corresponding author.

ZHANG Xian-En. Tel: 86-10-64888148, E-mail: zhangxe@ibp.ac.cn

BI Li-Jun. Tel: 86-10-64888464, E-mail: blj@ibp.ac.cn

Received: July 11, 2017 Accepted: October 13, 2017