

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ М3.BstF5I ИЗ СИСТЕМЫ РЕСТРИКЦИИ–МОДИФИКАЦИИ BstF5I

© 2010 г. В.А.Чернухин^{1*}, В.В. Кузнецов², Д.А. Гончар¹,
Ю.Г. Каширина¹, Н.А. Нетесова², С.Х. Дегтярев¹

¹ Научно-производственное объединение «Сибэнзим»,
630117 Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12, факс: (383)333-6853,
электронная почта: valera@sibenzyme.ru

² Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор» Роспотребнадзора, 630559 Кольцово Новосибирской обл.,
факс: (383)336-7409, электронная почта: ninanet@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 03.10.08
После доработки 21.01.09

Определены оптимальные условия метилирования ДНК ферментом М3.BstF5I из *Bacillus stearothermophilus* и установлены кинетические параметры реакции модификации ДНК фага λ и ряда олигонуклеотидных субстратов. Сравнение кинетических параметров М1.BstF5I и М3.BstF5I показало, что при близких температурных оптимумах и сродстве к ДНК М3.BstF5I в оптимальных условиях имеет примерно в 4 раза меньшее число оборотов ($0,24 \text{ мин}^{-1}$) и модифицирует полуметилированный сайт узнавания менее эффективно, чем неметилированный. В отличие от трех других метилаз системы рестрикции–модификации BstF5I фермент М3.BstF5I способен дополнительно модифицировать неканоническую последовательность ДНК 5'-GGATC-3' со скоростью, которая более чем на порядок меньше скорости метилирования канонического сайта узнавания ДНК 5'-GGATG-3'.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК-метилтрансфераза, ферментативная кинетика, сайтспецифичность.

Сайтспецифичные ДНК-метилтрансферазы (метилазы, М) катализируют перенос метильной группы от S-аденозил-L-метионина (SAM) на аминогруппу аденина или цитозина или же на С5-атом цитозина. Большинство известных в настоящее время ДНК-метилаз прокариотических организмов входит в состав так называемых систем рестрикции–модификации (РМ-систем). Входящие в РМ-системы рестриктазы способны гидролизовать ДНК, предотвращая таким образом репликацию чужеродной ДНК в бактериальной клетке. ДНК-Метилазы, модифицируя тот же сайт узнавания, что и рестриктазы, защищают хозяйскую ДНК от гидролиза.

Уникальная РМ-система BstF5I из *Bacillus stearothermophilus* F5 включает в себя четыре сайтспецифичные ДНК-метилтрансферазы. Ферменты М1.BstF5I и М3.BstF5I модифицируют аденин в последовательности ДНК 5'-GGATG-3',

а М2.BstF5I и М4.BstF5I — в последовательности 5'-CATCC-3' в комплементарной цепи ДНК. Ранее нами были изучены свойства ДНК-метилтрансфераз М2.BstF5I и М4.BstF5I [1], некоторые свойства ДНК-метилтрансферазы М1.BstF5I [2], а также было описано клонирование гена М3.BstF5I и определение модифицируемого этим ферментом основания [3]. ДНК-Метилтрансферазы участвуют в регуляции транскрипции генов, репликации, репарации [4], а также важны для патогенности [5].

Наиболее изученными являются РМ-системы второго типа, которые объединяются рядом общих признаков: для проявления ферментативной активности эндонуклеаз рестрикции из кофакторов необходимы только Mg^{2+} , а место гидролиза находится внутри или вблизи сайта узнавания [6]. В большинстве известных РМ-систем узнается палиндромная последовательность ДНК. В этом случае для защиты хозяйской ДНК достаточно одной ДНК-метилтрансферазы, модифицирующей обе цепи участка узнавания с использованием SAM в качестве донора метильной группы. В данной большой

Принятые сокращения: М — метилаза, SAM — S-аденозил-L-метионин, ГАП — гидроксилпатит, ДТТ — дитиотреитол.

* Адресат для корреспонденции.

группе РМ-систем выделяется подгруппа IIS, в которой сайтом узнавания является непалиндромная последовательность ДНК. В этом случае для защиты бактериальной ДНК требуются две метилтрансферазы, одна из которых узнает верхнюю цепь, а другая — нижнюю [6]. В некоторых случаях возможно также метилирование обеих цепей непалиндромной последовательности одним белком, что объясняется наличием в белковой последовательности двух отдельных доменов, каждый из которых ответствен за узнавание своей цепи, как, например, в случае метилазы FokI, у которой N- и C-концевые домены метилируют разные цепи [7–9]. Существуют также промежуточные РМ-системы с вырожденным симметричным сайтом узнавания метилазы (например, 5'-GASTC-3') и непалиндромной последовательностью узнавания рестриктазы (5'-GAGTC-3'), являющейся одним из вариантов сайта узнавания метилазы [10].

Ранее нами выявлены в РМ-системе BstF5I две пары метилаз с одинаковой субстратной специфичностью [1–3, 11]. Эндонуклеаза рестрикции BstF5I узнает непалиндромную последовательность ДНК 5'-GGATG-3'. M1.BstF5I и M3.BstF5I узнают и метилируют аденин в верхней цепи этой последовательности узнавания, а M2.BstF5I и M4.BstF5I модифицируют аденин в нижней цепи [12].

Цель данной работы — изучение субстратной специфичности, биохимических и кинетических свойств M3.BstF5I в сравнении со свойствами метилазы M1.BstF5I [3] и N-концевого домена метилазы FokI [9], имеющих одинаковые сайты узнавания.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы. В настоящей работе были использованы бактериальные штаммы *B. stearothermophilus* F5 из коллекции микроорганизмов НПО «Сибэнзим» (Россия), штамм *Escherichia coli* RRI, а также следующие реактивы и компоненты питательных сред: Tris («Promega», США), акриламид, бис-акриламид, KH_2PO_4 , NaHCO_3 , ампициллин («Хеликон», Россия), ЭДТА («Fluka AG», Швейцария), агароза («Hybaid-AGS», Германия), дитиотреитол (ДТТ), Triton X-100 (ICN, США), лизоцим («Serva», Германия), SAM («New England Biolabs», США), [^3H - CH_3]SAM («Amersham», Англия), дифенилметилсульфонилфторид (PSMF) («Sigma», США), фосфоцеллюлоза P11 («Whatman», Англия), гидроксилпатит, гепаринсефароза («BioRad», США), сефакрил S-200, триптон, дрожжевой экстракт («Organotechnie», Франция), ферменты и препа-

раты ДНК (НПО «Сибэнзим»), маркер молекулярных масс белков: БСА (66,2 кДа), овальбумин (45 кДа), карбоновая ангидраза (31 кДа), ингибитор трипсина (21,5 кДа) («Хеликон»). Остальные реагенты были отечественного производства квалификации х.ч.

Выращивание биомассы M3.BstF5I. Получение рекомбинантной плазмиды pJW-MF5-3 путем клонирования гена ДНК-метилтрансферазы M3.BstF5I в экспрессионный вектор pJW описано нами ранее [3]. Клетки *E. coli* RRI трансформировали плазмидой pJW-MF5-3. Отдельную колонию засевали во флакон со 100 мл жидкой питательной среды LB, содержащей триптон (10 г/л), дрожжевой экстракт (5 г/л), NaCl (5 г/л), pH 7,0–7,3, и ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Культуру подращивали при перемешивании среды на качалке при 30° и 150 об/мин в течение ночи. Затем выросшей культурой инокулировали 0,5-л колбы с 200 мл свежей среды LB с ампициллином, клетки растили при перемешивании на качалке при 30° и 180 об/мин до поглощения $A_{550} = 0,8–0,9$. После этого проводили термоиндукцию при 42° в течение 4 ч. Клетки собирали центрифугированием на центрифуге J2-21 («Beckman», США) при 3000 об/мин и 4°. Биомассу хранили при –20°.

Выделение фермента M3.BstF5I. Все процедуры по выделению фермента осуществляли при 4°. В процессе выделения при 25° использовали: буфер А, содержащий 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 10 мМ β -меркаптоэтанол, 7 мМ ЭДТА, 5%-ный глицерин; буфер В, содержащий 10 мМ KH_2PO_4 (pH 7,3), 10 мМ β -меркаптоэтанол, 7 мМ ЭДТА, 5%-ный глицерин, 0,2 М NaCl; буфер С, содержащий 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 10 мМ β -меркаптоэтанол, 7 мМ ЭДТА, 0,1 М NaCl, 50%-ный глицерин.

Биомассу клеток *E. coli* (9,5 г), содержащих M3.BstF5I, суспендировали в 40 мл буфера А с лизоцимом (0,4 мг/мл) на магнитной мешалке в течение 30 мин. Суспензию обрабатывали ультразвуком на дезинтеграторе Sonyprep 150 (MSE, Англия) по 40 с 8 раз с интервалами по 1 мин для охлаждения. В процессе разрушения клеток добавляли Triton X-100 до 0,1%-ной концентрации. Клеточные остатки удаляли центрифугированием при 15 000 об/мин в течение 30 мин на центрифуге J2-21. В супернатант добавляли ингибитор протеиназ PMSF до концентрации 1 мкМ и 200 мМ NaCl. Хроматографическую очистку проводили с использованием фосфоцеллюлозы P11, гидроксилпатита (ГАП), гепарин-сефарозы, сефакрила S-200. Грубый экстракт наносили на колонку с фосфоцеллюлозой (1,6 × 20 см, объем 20 мл), предварительно уравновешенной буфером А с 0,2 М NaCl. Промывали двумя объема-

ми этого же буфера. Элюцию проводили 200 мл линейного градиента NaCl от 0,2 до 0,9 М в буфере А, и собирали 50 фракций по 4 мл. Фракции, содержавшие пик активности M3.BstF5I, объединяли и наносили на колонку с ГАП объемом 4 мл, предварительно уравновешенным буфером Р, и промывали двумя объемами буфера Р. Сорбированный материал элюировали 120 мл линейного градиента фосфата калия от 0,01 до 0,25 М в буфере Р. Собирали 40 фракций по 3 мл. Фракции, содержавшие целевую активность, разбавляли в 3 раза буфером А и наносили на колонку с гепарин-сефарозой объемом 4 мл, предварительно уравновешенной буфером А. Промывали двумя объемами буфера А с 0,1 М NaCl. Фермент элюировали 100 мл линейного градиента NaCl от 0,1 до 0,8 М в буфере А. Собирали 40 фракций по 2 мл. Фракции, содержавшие M3.BstF5I, осаждали 75%-ным сульфатом аммония.

Осадок центрифугировали при 12 000 об/мин на центрифуге J2-21 в течение 30 мин, растворяли в 4 мл буфера А, наносили на колонку со 120 мл сефакрила S-200 (2,0 × 80 см). Гель-фильтрацию проводили 120 мл буфера А с 0,1%-ным Triton X-100 и 0,3 М NaCl со скоростью 20 мл/ч. Целевые фракции разбавляли в 2 раза буфером А, содержавшим 0,05% дезоксихолата натрия, и проводили рехроматографию на ГАП. Фракции, содержавшие активный фермент M3.BstF5I, объединяли и концентрировали против буфера С в течение 16 ч. Полученный препарат M3.BstF5I хранили при -20°.

Препарат фермента M1.BstF5I с концентрацией белка 100 мкМ выделяли так же, как описано ранее [2].

Тестирование активности M3.BstF5I во фракциях. Активность M3.BstF5I в хроматографическом профиле определяли по защите ДНК фага λ от гидролиза эндонуклеазой рестрикции BstF5I. Для этого из фракций отбирали аликвоты по 2 мкл, разбавляли в 5 раз SE-буфером Y (33 мМ Tris-ацетат, pH 7,9, 10 мМ ацетат магния, 66 мМ ацетат калия, 1 мМ ДТТ) и 2 мкл разбавленного раствора добавляли к 20 мкл реакционной смеси, содержавшей 1 мкг ДНК фага λ в SE-буфере Y и 80 мкМ SAM. Смесь инкубировали при 60° в течение 15 мин, затем добавляли по 1 мкл препарата эндонуклеазы рестрикции BstF5I и выдерживали еще 15 мин при 60°. Продукты реакции разделяли в 1%-ном агарозном геле, обрабатывали раствором этидия бромистого и наблюдали в УФ-свете. Присутствие во фракциях примесных белков определяли с помощью электрофореза в денатурирующем Ds-Na-ПААГ. Для этого аликвоты из фракций по 25 мкл наносили на гель и проводили электрофорез по стандартной методике [13].

Определение количества включенных в ДНК метильных групп. Для проведения реакции метилирования использовалась реакционная смесь, содержащая 100 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 0,2 мг/мл БСА. В реакции использовался меченный тритием SAM.

При определении зависимости активности M3.BstF5I от pH использовали 100 мМ лимонную кислоту (цитрат натрия) при pH 4,0–6,5, 100 мМ Tris-HCl при pH 7,0–9,5 и 100 мМ карбонат натрия (бикарбонат натрия) при pH 10,0–11,0 [14].

При определении температурной зависимости активности фермента, pH-зависимости и зависимости скорости реакции от концентрации одного из субстратов время реакции подбирали таким образом, чтобы концентрация продуктов реакции метилирования (концентрация метилированных последовательностей ДНК) не превышала 10% начальной концентрации сайтов метилирования.

Реакцию метилирования останавливали нанесением аликвоты на фильтр DE-81 («Whatman»), который трижды промывали 0,02 М гидрокарбонатом натрия по 20 мин и затем водой. После высушивания фильтра количество включенной тритиевой метки определяли путем измерения радиоактивности с помощью сцинтилляционного счетчика Марк III.

Статистическая обработка результатов. Для вычисления параметров функций, соответствующих кинетическим моделям, использовали регрессионный анализ, проводимый с помощью программы Origin 5.0 («Microcal», США). Каталитическую константу и константу Михаэлиса определяли регрессионным анализом функции Михаэлиса, описывающей экспериментальные данные, с помощью минимизации величины χ^2 [<http://www.microcal.com>].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение препарата фермента M3.BstF5I. После проведения термоиндукции синтеза белка рекомбинантный фермент выделяли из биомассы *E. coli*, как описано в разд. «Методы исследования».

Результаты определения активности M3.BstF5I после первой хроматографии на фосфоцеллюлозе P11 и оценки количества и степени чистоты целевого белка с помощью электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях приведены на рис. 1.

Фермент элюировался с 30-й по 42-ю фракцию хроматографического профиля, что соответствует концентрации NaCl 0,45–0,65 М. На последующих стадиях очистки целевой белок

элюировался при концентрациях фосфата калия 82–195 мМ (ГАП), NaCl — 0,52–0,66 М (гепарин-сефароза). После рехроматографии на ГАП фермент элюировался при концентрации фосфата калия 170–210 мМ.

В результате из 9,5 г биомассы получили 10,5 мг высокоочищенного препарата M3.BstF5I. Электрофоретическая подвижность белка (рис. 1, в) соответствует данным о первичной структуре (41,1 кДа), а расчетная молярная концентрация составляет 36 мкМ.

Зависимость активности M3.BstF5I от температуры. Как видно на рис. 2, а, максимальная активность для M3.BstF5I наблюдается при 60°,

что близко к 55° — температурному оптимуму для M1.BstF5I [2]. Температурные оптимумы обоих ферментов соответствуют таковым для рестриктазы BstF5 и ДНК метилтрансфераз M2.BstF5I и M4.BstF5I [1]. Таким образом, повторные эксперименты не подтвердили оптимум активности фермента M3.BstF5I в низкотемпературной области, наблюдаемый ранее [2].

Зависимость активности ферментов от pH. Влияние pH на активность фермента изучали при 60° (рис. 2, б). Наибольшую активность фермент проявляет в диапазоне pH 7,0–8,5, что соответствует обычному pH-оптимуму для ДНК метилтрансфераз.

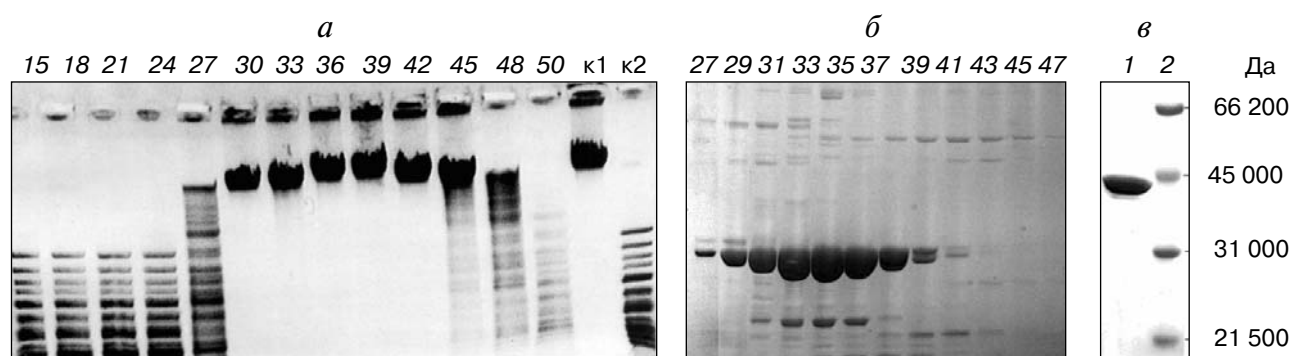


Рис. 1. Анализ активности (а) и чистоты белка M3.BstF5I (б) после первой стадии хроматографии на фосфоцеллюлозе P11 и в конечном препарате (в). а — Электрофореграмма хроматографического профиля M3.BstF5I. Номера дорожек соответствуют номерам фракций, 30–42 — пик метилазной активности, к1 — исходная реакционная смесь, к2 — ДНК фага λ, обработанная эндонуклеазой рестрикции BstF5I. б — Тестирование по белку (10%-ный Ds-Na-ПААГ) хроматографического профиля M3.BstF5I. Номера дорожек соответствуют номерам фракций. в — Электрофореграмма (10%-ный Ds-Na-ПААГ) конечного препарата M3.BstF5I (1) и маркера молекулярных масс (2)

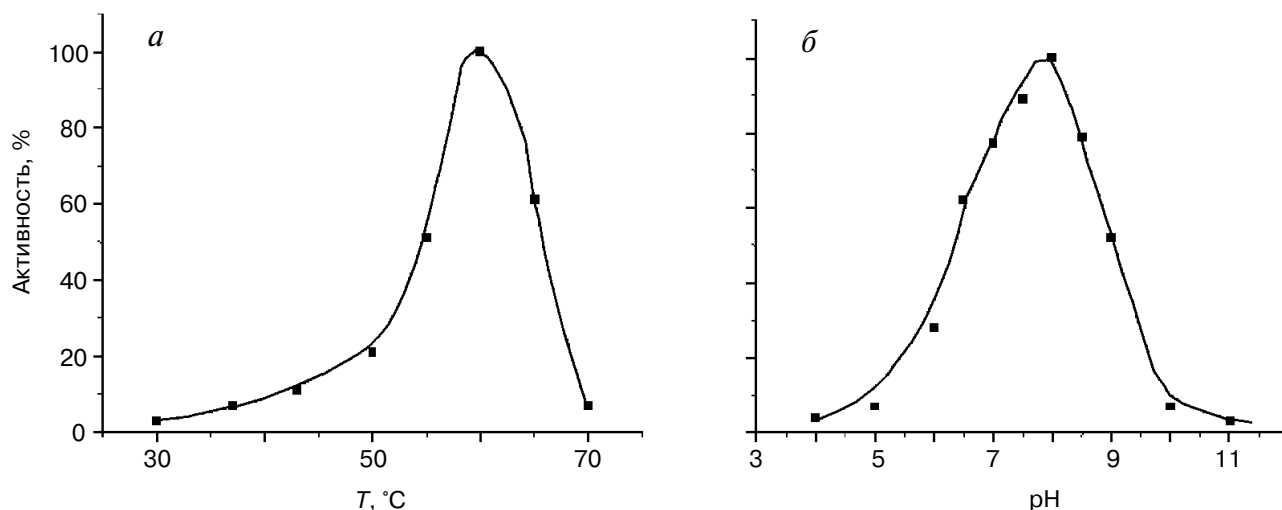


Рис. 2. Зависимость скорости метилирования ферментом M3.BstF5I ДНК фага λ от температуры (а) и pH (б). Концентрация ДНК в пересчете на сайты 5'-GGATG-3' — 1,3 мкМ, SAM — 5 мкМ, M3.BstF5I — 120 нМ; время реакции 15 мин

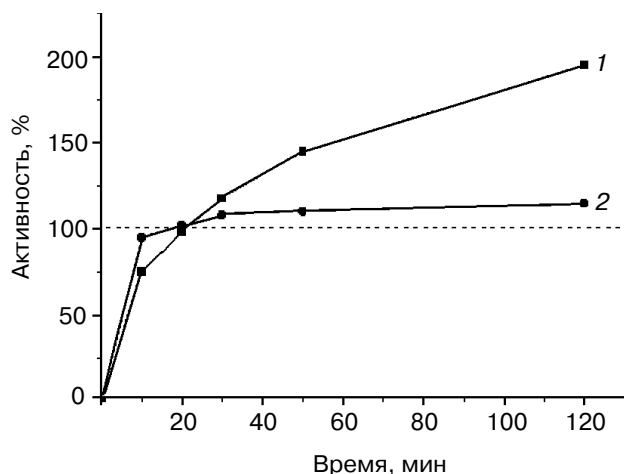


Рис. 3. Зависимость от времени количества метильных групп, включенных в ДНК. 1 – M1.BstF5I, 100 нМ; 2 – M3.BstF5I, 100 нМ. Концентрация ДНК фага λ в пересчете на сайты 5'-GGATG-3' – 100 нМ, SAM – 5 мкМ

Все дальнейшие измерения активности проводили при 60° и pH 8,0. Активность M3.BstF5I максимальна в отсутствие Na^+ и K^+ (как и у ферментов M.AluI, Dam *E. coli*, M.HhaI, M.HpaII [15]) и с увеличением концентрации солей снижается (данные не приводятся).

Исследование субстратной специфичности M3.BstF5. На рис. 3 приведены данные по метилированию ДНК фага λ ферментами M3.BstF5I и M1.BstF5I в оптимальных для каждого из них условиях проведения реакции. Концентрация сайтов 5'-GGATG-3', входящих в состав ДНК фага λ , составляет 100 нМ (штриховая линия). Как видно из сравнения кривых, метилаза M3.BstF5I относительно быстро модифицирует один сайт, а затем происходит дополнительная модификация ДНК с существенно меньшей скоростью. Это, видимо, связано с тем, что M3.BstF5I в отличие от M1.BstF5I модифицирует не только сайт 5'-GGATG-3', но и другие неканонические сайты.

Возможное неканоническое метилирование ДНК ферментом M3.BstF5I изучали с помощью гидролиза различными ферментами плазмиды pF5-32, полученной путем встраивания гена M3.BstF5I в вектор pMTL22 [2] и последующей трансформации клеток штамма *E. coli* JM119, дефектного по гену dam-метилазы. На рис. 4 приведены результаты гидролиза плазмиды pF5-32 различными рестриктазами. Метилирование ферментом M3.BstF5I *in vivo* приводит к блокированию гидролиза плазмидной ДНК рестриктазой BstF5I (рис. 4, дорожка 2). Эндо-

нуклеаза рестрикции Kzo9I, узнающая последовательность 5'-GATC-3' и не чувствительная к наличию в сайте узнавания метилированного аденина, полностью гидролизует ДНК (рис. 4, дорожка 3). В то же время появляется 1,7–1,8 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) дополнительного фрагмента (дорожка 4) при гидролизе ДНК ферментом BstKTI, который также узнает последовательность 5'-GATC-3', но не расщепляет ее при наличии в сайте узнавания двух метилированных аденинов [16]. Согласно первичной структуре плазмиды pF5-32, фрагмент ДНК длиной 1,792 т.п.н. образуется при блокировании гидролиза единственной последовательности 5'-GGATCC-3'. Эта последовательность будет метилироваться ферментом M3.BstF5I *in vivo*, если помимо канонического сайта узнавания 5'-GGATG-3' он также модифицирует нуклеотидную последовательность 5'-GGATC-3'. В этом случае метилирование сайтов 5'-GGATC-3' приведет к модификации последовательности 5'-GGATCC-3' по обеим цепям и блокированию гидролиза рестриктазой BstKTI, что мы и наблюдаем в эксперименте.

Примечательно, что неканоническое метилирование обнаружено и для некоторых других

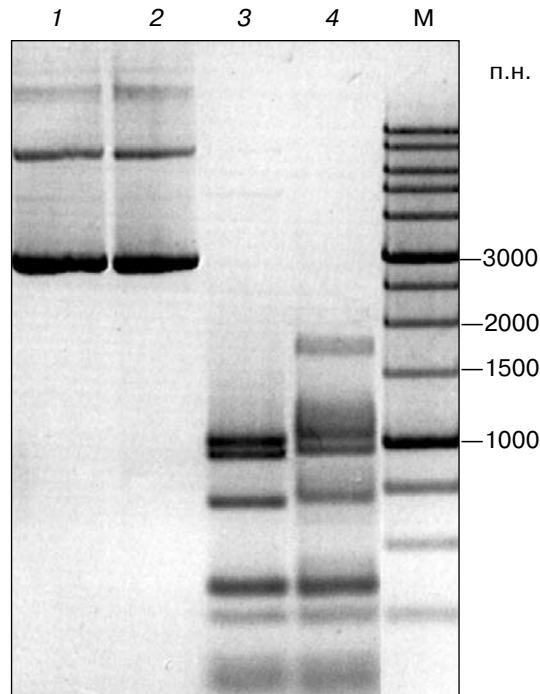


Рис. 4. Рестрикционный анализ плазмиды pF5-32. 1 – pF5-32; 2–4 – pF5-32, обработанная рестриктазами BstF5I, Kzo9I и BstKTI соответственно; М – маркер

метиляз и, видимо, не является исключением. Возможность неканонического метилирования ферментами показана как для метилаз, модифицирующих палиндромные сайты узнавания (например, метилазы EcoDam и T4Dam с каноническим сайтом 5'-GATC-3' [17, 18], HaeIII с каноническим сайтом 5'-GGCC-3' [19], EcoRI с каноническим сайтом 5'-GAATTC-3' [20]), так и для ферментов с непалиндромными последовательностями узнавания (например, для метилазы FaeI с каноническим сайтом 5'-CCCGC-3' [21]). При этом N-концевой домен метилазы FokI, с которым M3.BstF5I наиболее гомологична и имеет одинаковый сайт узнавания 5'-GGATG-3' [2, 3], также проявляет звездчатую активность [9].

Определение и сравнение стационарных кинетических параметров M1.BstF5I и M3.BstF5I. Изучение кинетических параметров реакции метилирования ДНК ферментами M1.BstF5I и M3.BstF5I проводилось нами как на природном высокополимерном субстрате, в качестве которого использовали ДНК фага λ , так и на синтетических олигонуклеотидах.

Для получения более концентрированного раствора ДНК фага λ и уменьшения его вязкости мы предварительно провели гидролиз фаговой ДНК рестриктазой VspI (сайт узнавания АТТААТ). Все кинетические параметры на высокомолекулярной ДНК определяли на полученной смеси фрагментов ДНК фага λ . В наших расчетах концентрация сайтов метилирования 5'-GGATG-3' определялась умножением молярной концентрации ДНК фага λ на число сайтов 5'-GGATG-3' в одной молекуле ДНК (150 сайтов).

Зависимость активности M1.BstF5I и M3.BstF5I от концентрации SAM и ДНК фага λ приведена на рис. 5. Как видно на рисунке, экспериментальные точки хорошо соответствуют кривой Михаэлиса [22]. Кинетические параметры (константа Михаэлиса, каталитическая константа, коэффициент специфичности), вычисленные как описано в разд. «Методы исследования», приведены в табл. 1. Значения каталитической константы и константы Михаэлиса по SAM для фермента M1.BstF5I оказались меньше ранее описанных [22] приблизительно в 2 и 5 раз соответственно.

Сравнение кинетических параметров M1.BstF5I и M3.BstF5I показало, что при близких температурных оптимумах M3.BstF5I в оптимальных условиях имеет примерно в 4 раза меньшее число оборотов. При этом значение константы Михаэлиса по ДНК фага λ в оптимальных для обоих ферментов условиях совпало и оказалось равным 0,11 мкМ, а значение этой константы по SAM для M3.BstF5I оказалось примерно в 2 раза большим.

Анализ кинетических параметров реакции модификации M3.BstF5I на олигонуклеотидных дуплексах. Для изучения кинетических параметров метилирования синтетических дуплексов использованы следующие взаимно комплементарные олигонуклеотиды:

- 1 – 5'-CGGCCAGCGGATGCGGGAGCG,
- 2 – 5'-CGCTCCCGCATCCGCTGGCCG,
- 3 – 5'-CGGCCAGCGG(m6A)TGCGGGAGCG,
- 4 – 5'-CGCTCCCGC(m6A)TCCGCTGGCCG,

где m6A – N6-метиладенин.

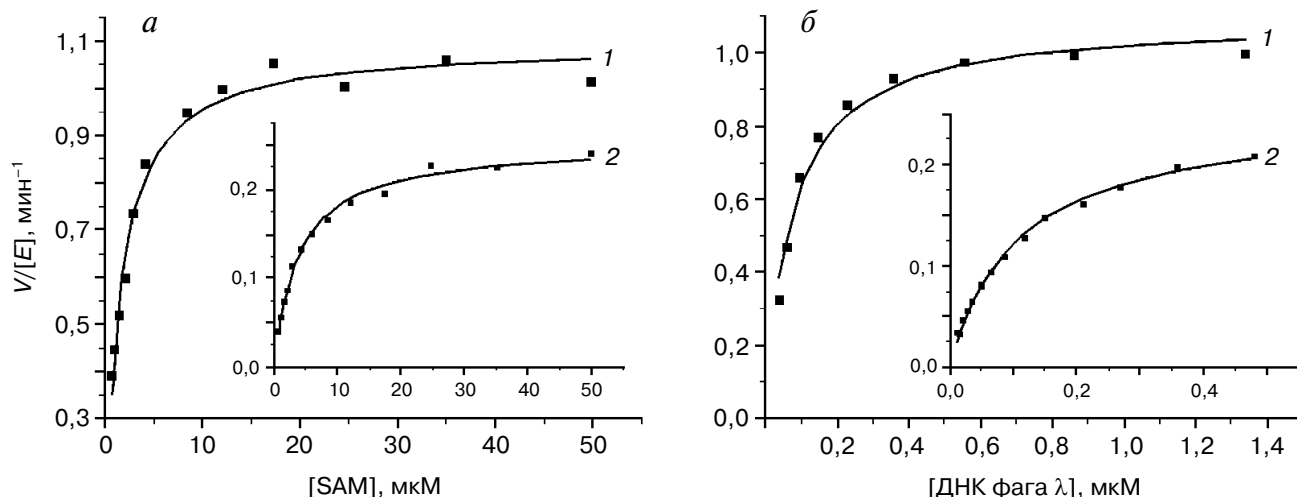


Рис. 5. Зависимости скорости метилирования ДНК фага λ от концентраций SAM (а) и рестриктов ДНК фага λ (б). 1 – M1.BstF5I, 2 – M3.BstF5I. Концентрация ДНК фага λ в пересчете на сайты 5'-GGATG-3' – 1,3 мкМ, M1.BstF5I – 24,7 нМ, M3.BstF5I – 100 нМ; время реакции 20 мин

Таблица 1. Кинетические параметры реакций, катализируемых ДНК-метилтрансферазами, узнающими последовательность 5'-GGATG-3'

Фермент (температура)	Субстрат	$k_{\text{кат}}$, мин ⁻¹	K_m ДНК, мкМ	K_m SAM, мкМ
M1.BstF5I (55°)*	ДНК фага λ	0,98	0,11	1,47
	неметилированный дуплекс 1/2	0,328	0,229	0,682
	полуметилированный дуплекс 1/4	0,51	0,16	
M3.BstF5I (60°)*	ДНК фага λ	0,24	0,11	3,3
	неметилированный дуплекс 1/2	0,053	0,168	4,36
	полуметилированный дуплекс 1/4	0,032	0,09	
	дуплекс 5/6 с неканоническим сайтом 5'-GGATC-3'	0,0026	3,3	—
M.FokI, N-концевой домен (37°)**	ДНК фага λ	0,20	0,0007	0,4
	немодифицированный дуплекс 21 п.н.	0,007	1,24	—
	полуметилированный дуплекс 21 п.н.	0,12	1,13	—

* Приведены кинетические параметры, измеренные на полуметилированном олигонуклеотидном дуплексе 1/4.

** Приведено значение K_m на ДНК фага λ в расчете на концентрацию молекул ДНК фага λ , а не сайтов 5'-GGATG-3'.

Олигонуклеотиды с нечетными номерами комплементарны олигонуклеотидам с четными номерами. Олигонуклеотиды 1 и 3, а также 2 и 4 отличаются друг от друга наличием или отсутствием N6-метиладенина. На рис. 6 приведены зависимости скорости метилирования ферментами M1.BstF5I и M3.BstF5I олигонуклеотидного дуплекса 1/2 от концентрации SAM, а на рис. 7 — зависимости скорости метилирования от концентраций неметилированного (1/2) и полуметилированного (1/4) дуплексов. При этом метилирование уже модифицированного дуплекса 3/2 не происходит (данные не приведены), что свидетельствует об отсутствии неканонического метилирования дуплекса 1/2 ферментом M3.BstF5I. Таким образом, использование в качестве субстрата для метилирования олигонуклеотидных дуплексов 1/2 и 1/4 позволяет анализировать исключительно каноническое метилирование M3.BstF5I. Вычисленные на основе представленных зависимостей кинетические параметры приведены в табл. 1.

Скорости метилирования ферментами M1.BstF5I и M3.BstF5I высокополимерной ДНК и олигонуклеотидных субстратов различны (табл. 1). Каталитические константы и коэффициенты специфичности по SAM и ДНК для высокомолекулярного субстрата в несколько раз больше. Таким образом, оба фермента эффективнее модифицируют ДНК фага λ , чем короткие ДНК-субстраты. Предпочтительное метилирование высокомолекулярной ДНК наблюдалось и для других сайтспецифических ДНК-ме-

тилтрансфераз. Для ДНК-метилтрансфераз EcoDam, EcaI, EcoRII и MspI (табл. 2) значение каталитической константы также приблизительно в 3–7 раза выше для высокомолекулярного субстрата, чем в случае метилирования олигонуклеотидных дуплексов [23–26].

В табл. 1 представлены данные о свойствах M3.BstF5I и двух других ДНК-метилтрансфераз: M1.BstF5I [2] и N-концевого домена M.FokI [27, 28], также имеющих сайт узнавания 5'-GGATG-3'. Каталитические константы модификации ДНК

Таблица 2. Каталитические константы ДНК-метилтрансфераз, которые предпочтительнее метилируют полимерную ДНК

ДНК-Метилтрансфераза	Субстрат	Каталитическая константа, мин ⁻¹	Источник
EcoDam	плазмидная ДНК дуплекс	19,02	[23]
		6,6	
EcoRII	ДНК фага λ дуплекс	0,042 0,006	[25]
MspI	ДНК фага λ дуплекс	0,17 0,056	[26]
EcaI	ДНК фага λ дуплекс	0,019 0,0047	[24]

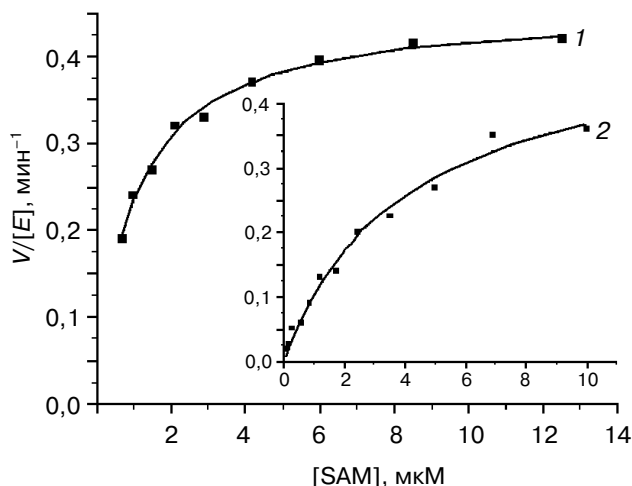


Рис. 6. Зависимости скоростей метилирования M1.BstF5I и M3.BstF5I олигонуклеотидного дуплекса 1/2 от концентрации SAM. 1 – M1.BstF5I (24,7 нМ), 2 – M3.BstF5I (28,7 нМ). Концентрация олигонуклеотидного дуплекса для M1.BstF5I – 5 мкМ, для M3.BstF5I – 7 мкМ; время реакции 20 мин

фага λ высокоомологичными ферментами M3.BstF5I и *N*-концевым доменом M.FokI практически не отличаются и в 4 раза меньше $k_{\text{кат}}$ для M1.BstF5I. Значения K_m ДНК λ для всех трех ферментов практически одинаковы и составляют 0,1 мкМ. Однако более существенные различия в свойствах ферментов наблюдаются при модификации олигонуклеотидных дуплексов,

содержащих последовательность 5'-GGATG-3'. Для M1.BstF5I $k_{\text{кат}}$ в 6 раз превышает $k_{\text{кат}}$ для M3.BstF5I и более чем в 40 раз $k_{\text{кат}}$ для *N*-концевого домена M.FokI. Столь существенное различие в скорости реакции модификации олигонуклеотидного дуплекса *N*-концевым доменом может быть связано со структурой данного белка, полученного расщеплением M.FokI пополам и добавлением лидерного гистидинового пептида. Сравнение полученного синтетического белка с высокоомологичным ему природным ферментом M3.BstF5I показывает, что сконструированный *N*-концевой домен M.FokI помимо гистидинов содержит дополнительные 20 аминокислотных остатков на *C*-конце, пять из которых – лизины [27]. Таким образом, *N*-концевой домен M.FokI содержит значительное количество избыточных положительно заряженных аминокислотных остатков, что, видимо, приводит к неспецифичному взаимодействию с фосфатами олигонуклеотида и изменению структуры последнего из-за его небольших размеров [27]. Поскольку у протяженной ДНК фага λ такого заметного изменения свойств ДНК не происходит, необходимая конформация двойной спирали, по-видимому, сохраняется и $k_{\text{кат}}$ не меняется. При этом из-за наличия дополнительных положительно заряженных аминокислотных остатков K_m ДНК для дуплекса получается несколько лучше для *N*-концевого домена M.FokI по сравнению с ферментами M1.BstF5I и M3.BstF5I.

Сравнение кинетических параметров модификации полуметилированного дуплекса (рис. 7)

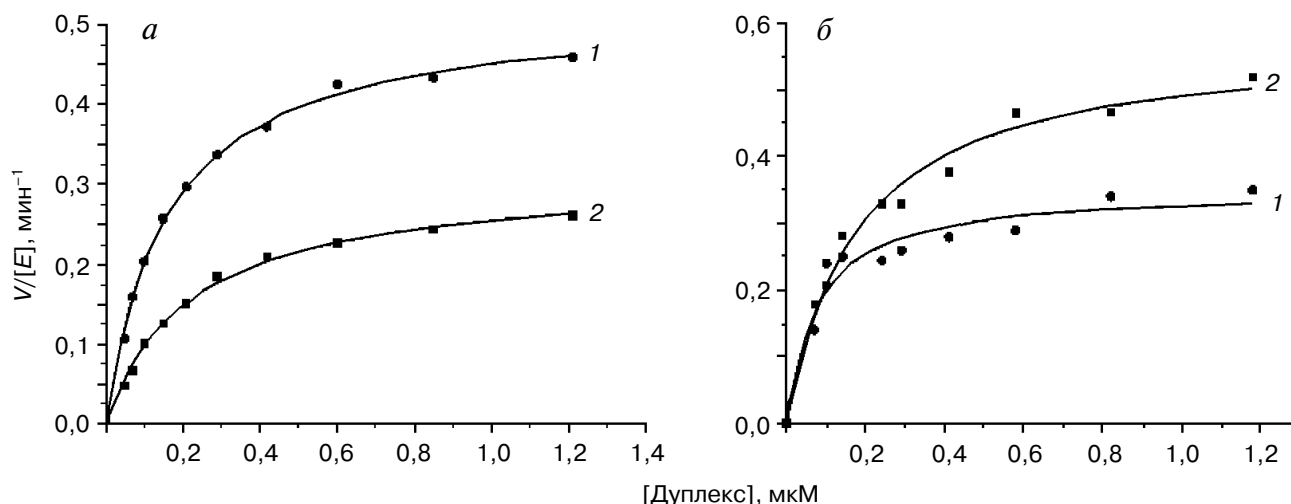


Рис. 7. Зависимости скоростей метилирования M1.BstF5I и M3.BstF5I неметилированного (1/2) и полуметилированного (1/4) олигонуклеотидных дуплексов от концентрации ДНК. а – M1.BstF5I (24,7 нМ), б – M3.BstF5I (28,7 нМ), 1 – полуметилированный дуплекс (1/4), 2 – неметилированный дуплекс (1/2). Концентрация SAM – 30 мкМ; время реакции 20 мин

показывает, что в случае M1.BstF5I наблюдается увеличение k_{kat} по сравнению с k_{kat} неметилованного олигонуклеотида, тогда как для M3.BstF5I происходит уменьшение k_{kat} . В итоге в случае модификации полуметилованного дуплекса k_{kat} для M1.BstF5I в 16 раз превышает k_{kat} для M3.BstF5I. При этом значения $K_{\text{м ДНК}}$ для обоих ферментов различаются менее чем в 2 раза, что свидетельствует о преимущественном метилировании ДНК после репликации в бактериальной клетке ферментом M1.BstF5I.

Фермент M3.BstF5I метилирует также неканонический сайт узнавания 5'-GGATC-3' (рис. 3). В связи с этим мы установили кинетические параметры модификации ферментом M3.BstF5I олигонуклеотидного дуплекса, содержащего последовательность 5'-GGATC-3'. Структура использованного дуплекса приведена ниже (полужирным шрифтом выделена последовательность 5'-GGATC-3'/5'-GATCC-3'):

5 – 5'-CAGTTTAGGATCCATTTCAC-3',

6 – 3'-GTCAAATCCTAGGTAAAGTG-5'.

Зависимость скорости метилирования ферментом M3.BstF5I от концентрации олигонуклеотидного дуплекса 5/6 приведена на рис. 8, а вычисленные на основе представленных зависимостей кинетические параметры – в табл. 1.

Каталитическая константа метилирования олигонуклеотидного дуплекса с сайтом 5'-GGATC-3' в 20 раз меньше каталитической константы реакции модификации олигонуклеотидного дуплекса с каноническим сайтом, а коэффициент специфичности этой реакции ($k_{\text{kat}}/K_{\text{м ДНК}}$) меньше в 400 раз. В результате метилирование сайта 5'-GGATC-3' ферментом M3.BstF5I, наблюдаемое нами как *in vivo* (рис. 3), так и *in vitro* (рис. 8), происходит с существенно меньшей эффективностью по сравнению с метилированием канонического сайта 5'-GGATG-3'.

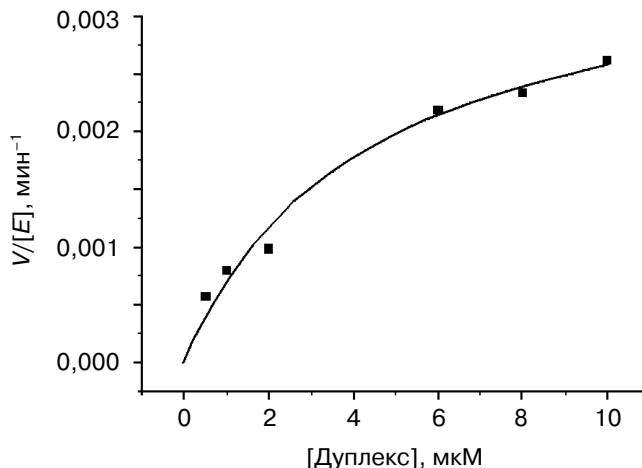


Рис. 8. Зависимость скорости метилирования от концентрации олигонуклеотидного дуплекса 5/6 с неканоническим сайтом 5'-GGATG-3'. Концентрация SAM – 10 мкМ, M3.BstF5I – 100 нМ; время реакции 60 мин

Таким образом, по сравнению с M3.BstF5I фермент M1.BstF5I более активен и специфичен в реакции модификации полуметилованной ДНК и, видимо, именно он участвует в пострепликативном метилировании ДНК. Роль фермента M3.BstF5I в функционировании клетки остается неясной. Гены метилаз M2.BstF5I и M3.BstF5I характеризуются близкими и более низкими значениями GC-содержания (29,1 и 29,0% соответственно) по сравнению с также близкими значениями GC-содержания для генов M1.BstF5I и M4.BstF5I (32,3 и 32,2% соответственно). Этот факт наряду с описанной ранее высокой гомологией второй и третьей метилаз изоспецифичным C- и N-доменам метилазы FokI соответственно [2] свидетельствует в пользу существования каких-то дополнительных функций для пары метилаз M2.BstF5I и M3.BstF5I по сравнению с M1.BstF5I и M4.BstF5I.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чернухин В.А., Голикова Л.Н., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Каширина Ю.Г., Нетесова Н.А., Дегтярев С.Х. (2003) *Биохимия*, **68**, 1183–1192.
2. Нетесова Н.А., Голикова Л.Н., Овечкина Л.Г., Евдокимов А.А., Малыгин Э.Г., Гололобова Н.С., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. (2002) *Молекуляр. биология*, **36**, 136–143.
3. Голикова Л.Н., Нетесова Н.А., Гуторов В.В., Белавин П.А., Абдурашитов М.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. (2000) *Молекул. биология*, **34**, 443–447.
4. Kedar, G.C., Oscan, F., Gusman, E.C., Smith, D.W., Newman, V.G., and Zyskind, J.W. (2000) *J. Microbiol. Biotechnol.*, **2**, 301–310.
5. Dryden, D.T. (1999) in *S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structures and Functions* (Cheng, X., Blumenthal, R.M., eds), World Scientific, Singapore, pp. 283–340.
6. Pingoud, A., and Jeltsch, A. (2001) *Nucl. Acids Res.*, **29**, 3705–3727.
7. Kita, K., Kotani, H., Sugisaki, H., and Takanami, M. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 5751–5756.

8. Sugisaki, H., Kita, K., and Takanami, M. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 5757–5761.
9. Friedrich, T., Fatemi, M., Gowher, H., Leismann, O., and Jeltsch, A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1480**, 145–159.
10. Morgan, R.D., Calvet, C., Demeter, M., Agra, R., and Kong, H. (2000) *Biol. Chem.*, **381**, 1123–1125.
11. Degtyarev, S.Kh., Netesova, N.A., Abdurashitov, M.A., and Shevchenko, A.V. (1997) *Gene*, **187**, 217–219.
12. Kossykh, V.G., Schlagman, S.L., and Hattman, S.M. (1996) *J. Biol. Chem.*, **270**, 14389–14393.
13. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
14. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. (1991) *Справочник биохимика*, Мир, Москва.
15. New England Biolabs (2002–2003) *Catalog and Technical Reference*.
16. Надеев А.Н., Чернухин В.А., Севастьянова О.О. (2006) *Биотехнология*, **2**, 5–10.
17. Buryanov, Y.I., Zinoviev, V.V., Gorbunov, T.A., Tuzikov, F.V., Rechkunova, N.I., Malygin, E.G., and Batev, A.A. (1988) *Gene*, **74**, 67–69.
18. Malygin, E.G., Petrov, N.A., Gorbunov, T.A., Kossykh, V.G., and Hattman, S.M. (1997) *Nucl. Acids Res.*, **30**, 3880–3885.
19. Cohen, H.M., Tawfik, D.S., and Griffiths, A.D. (2002) *Nucl. Acids Res.*, **30**, 3880–3885.
20. Reich, N.O., and Mashhoon, N. (1991) *Biochemistry*, **30**, 2933–2939.
21. Чернухин В.А., Каширина Ю.Г., Суханова К.С., Абдурашитов М.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. (2005) *Биохимия*, **70**, 829–837.
22. Корниш-Боуден Э. (1979) *Основы ферментативной кинетики*, Мир, Москва.
23. Thielking, V., Dubois, S., Eritja, R., and Guschlbauer, W. (1997) *Biol. Chem.*, **378**, 407–415.
24. Szilak, L., Der, A., Deak, F., and Venetianer, P. (1993) *Eur. J. Biochem.*, **218**, 727–733.
25. Kossykh, V.G., Schlagman, S.L., and Hattman, S. (1995) *FEBS Lett.*, **370**, 75–77.
26. Bhattacharya, S.K., and Dubey, A.K. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 14743–14749.
27. Leismann, O., Roth, M., Friedrich, T., Wende, W., and Jeltsch, A. (1998) *Eur. J. Biochem.*, **251**, 899–906.
28. Kaczorowski, T., Sektas, M., Skowron, P., and Podhajska, A.J. (1999) *Mol. Biotechnol.*, **13**, 1–15.

ANALYSIS OF SUBSTRATE SPECIFICITY AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF DNA METHYLTRANSFERASE M3.BstF5I THE FROM BstF5I RESTRICTION–MODIFICATION SYSTEM

V. A. Chernukhin^{1*}, V. V. Kuznetsov², D. A. Gonchar¹,
Yu. G. Kashirina¹, N. A. Netesova², S. Kh. Degtyarev¹

¹ SibEnzyme Ltd, ul. Timakova 2/12, Novosibirsk 630117, Russia;
fax: (383)333-6853, E-mail: valera@sibenzyme.ru

² FSRI State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”,
Koltsovo 630559, Novosibirsk region, Russia;
fax: (383)336-7409, E-mail: ninanet@vector.nsc.ru

Received October 3, 2008
Revision received January 21, 2009

In the present work we have determined the optimal temperature, salt concentration, and pH value for M3.BstF5I activity. The steady-state kinetic parameters of DNA modification with M3.BstF5I DNA methyltransferase have been determined. M3.BstF5I and M1.BstF5I have similar temperature and pH optima, values of K_m DNA, but k_{cat} for M3.BstF5I is 0.24 min⁻¹ and four times less than k_{cat} for M1.BstF5I. Unlike M1.BstF5I, the third DNA methyltransferase modifies hemi-methylated DNA less effectively. In contrast to other BstF5I DNA methyltransferases, M3.BstF5I can modify a noncanonical sequence differing from 5'-GGATG-3'. The kinetic properties of methylation of noncanonical site 5'-GGATC-3' have been studied.

Key words: DNA-methyltransferase, enzyme kinetics, site-specificity