

УДК 577.21:577.151

РЕКОМБИНАНТНАЯ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗА M1.Bst19I ИЗ *Bacillus stearothermophilus* 19: ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

© 2010 г. Ю. Э. Томилова^{1*}, В. В. Кузнецов², М. А. Абдурашитов¹,
Н. А. Нетесова², С. Х. Дегтярев¹

¹Научно-производственное объединение “СибЭнзим”, Новосибирск, 630117

²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”,
Кольцово, Новосибирская область, 630559

Поступила в редакцию 29.12.2009 г.

Принята к печати 09.03.2010 г.

Ген ДНК-метилтрансферазы M1.Bst19I из системы рестрикции–модификации Bst19I (сайт узнавания 5'-GCATC-3') штамма *Bacillus stearothermophilus* 19 клонирован в составе вектора экспрессии pJW, содержащего тандем термоиндуцибельных промоторов P_R/P_L фага λ. Высокоочищенный препарат фермента выделен из биомассы клеток *Escherichia coli*, где он накапливался в растворимой форме, с помощью хроматографии на различных носителях. Фермент M1.Bst19I имеет температурный оптимум 50°C и проявляет максимальную активность при pH 8.0. M1.Bst19I модифицирует аденин в последовательности 5'-GCATC-3'. Определены кинетические параметры реакции метилирования ДНК M1.Bst19I. Показано, что константа Михаэлиса (K_m) для ДНК фага λ равна 0.68 ± 0.07 мкМ, K_m для S-аденозил-L-метионина — 2.02 ± 0.31 мкМ. Значение каталитической константы (k_{cat}) составило 1.8 ± 0.05 мин⁻¹. Сравнительное изучение аминокислотных последовательностей субстратраспознающего домена M1.Bst19I и других α-N6-ДНК-метилтрансфераз позволило предположить, что существуют два типа ферментов, содержащих в узнаваемой последовательности триплет ATG или ATC.

Ключевые слова: ДНК-метилтрансферазы, *Bacillus stearothermophilus*, ферментативная кинетика, аминокислотная последовательность.

RECOMBINANT DNA-METHYLTRANSFERASE M1.Bst19I FROM *Bacillus stearothermophilus* 19: PURIFICATION, PROPERTIES AND AMINO ACIDS SEQUENCE ANALYSIS, by J. E. Tomilova^{1*}, V. V. Kuznetsov², M. A. Abdurashitov¹, N. A. Netesova², S. Kh. Degtyarev¹ (¹SibEnzyme, Novosibirsk, 630117 Russia; *e-mail: jtom@sibenzyme.ru; ²State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Kol'tsovo, Novosibirsk region, 630559 Russia). The M1.Bst19I DNA-methyltransferase gene from restriction-modification system Bst19I (recognition sequence 5'-GCATC-3') in *Bacillus stearothermophilus* 19 has been cloned in the expressing vector pJW, that carries a tandem of thermo inducible promoters P_R/P_L from phage λ. Highly purified enzyme has been isolated by chromatography on various resins from *E. coli* cells where it accumulates in a soluble form. Study of M1.Bst19I properties has revealed that enzyme has a temperature optimum 50°C and demonstrates the maximum activity at pH 8.0. M1.Bst19I modifies adenine in sequence 5'-GCATC-3'. Kinetic parameters of M1.Bst19I DNA methylation reaction have been determined as follows: K_m for λ DNA is 0.68 ± 0.07 μM, K_m for S-adenosyl-L-methionine is 2.02 ± 0.31 μM. Catalytic constant (k_{cat}) is 1.8 ± 0.05 min⁻¹. Comparative analysis of Target Recognition Domain amino acid sequences for M1.Bst19I and others α-N6-DNA methyltransferases has allowed to suppose a presence of two types of the enzymes containing a triplet ATG or ATC in the recognition sequence.

Key words: DNA-methyltransferase, *Bacillus stearothermophilus*, enzyme kinetics, amino acid sequence.

Принятые сокращения: РМ-система — система рестрикции–модификации; М., метилаза — сайт-специфическая ДНК-метилтрансфераза; ДТТ — дитиотреитол; ГАП — гидроксипатит; ПЦР — полимеразная цепная реакция; SAM — S-аденозил-L-метионин; TRD — субстратраспознающий домен (target recognition domain); БСА — бычий сывороточный альбумин; ПААГ — полиакриламидный гель; SDS — додецилсульфат Na.

* Эл. почта: jtom@sibenzyme.ru

ДНК-метилтрансферазы (метилазы, М.) — сайт-специфические ферменты, катализирующие перенос метильной группы от донора, S-аденозил-L-метионина, на адениновое или цитозиновое основание в определенной нуклеотидной последовательности. Значительная часть известных на сегодняшний день бактериальных метилаз входит в состав так называемых систем рестрикции—модификации (PM-систем), в которых эндонуклеаза рестрикции защищает бактериальную клетку от проникновения чужеродной ДНК, а ДНК-метилтрансфераза, модифицируя хозяйскую ДНК, защищает ее от гидролиза собственной рестриктазой. Наиболее распространены и изучены так называемые PM-системы типа II, в которых эндонуклеазы рестрикции в присутствии ионов Mg^{2+} специфически узнают короткую нуклеотидную последовательность (4–8 п.н.) и гидролизуют ее вблизи или внутри сайта узнавания [1]. Ранее мы описали фермент Bst19I, который узнает непалиндромную последовательность GCATC и расщепляет ДНК на расстоянии 4 и 6 н. (в верхней и нижней цепях соответственно) от сайта узнавания, в отличие от прототипа SfaNI, узнающего и расщепляющего GCATC(5/9) [2].

Большинство PM-систем с непалиндромной узнаваемой последовательностью (подтип IIS) включают либо две ДНК-метилтрансферазы, каждая из которых модифицирует одну из цепей ДНК [3, 4], либо одну ДНК-метилтрансферазу, состоящую из двух доменов, которые отвечают за метилирование разных цепей сайта узнавания [5].

Нами определены и описаны нуклеотидные последовательности и взаимное расположение в опероне генов двух ДНК-метилтрансфераз — M1.Bst19I и M2.Bst19I, входящих в PM-систему Bst19I [6]. Анализ аминокислотных последовательностей, кодируемых этими генами, показал, что обе метилазы относятся к классу α -N6-ДНК-метилтрансфераз и, следовательно, метилируют адениновые остатки в положении N6. Сравнение с другими метилазами, принадлежащими к этому же классу, позволило предположить, что они модифицируют адениновые основания в верхней и нижней цепях сайта узнавания.

Цель данной работы состояла в выделении, изучении свойств рекомбинантной ДНК-метилтрансферазы M1.Bst19I и сравнительном анализе аминокислотной последовательности субстратраспознающего домена.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы и реактивы. В работе использовали штаммы *Bacillus stearothermophilus* 19 из коллекции штаммов НПО “СибЭнзим” (Новосибирск, Россия) и *Escherichia coli* RRI (“New England Biolabs”), а также следующие реактивы и компонен-

ты питательных сред: Трис (“Promega”), ампициллин, акриламид, бис-акриламид (“Хеликон”, Россия), маркер белковый для электрофореза (“Fermentas”, Литва), EDTA (“Fluka AG”), агарозу (“Hybaid-AGS”, Германия), глицерин, β -меркаптоэтанол, дитиотреитол, тритон X-100 (“ICN”), лизоцим, краситель Coomassie brilliant blue G-250 (“Serva”), S-аденозил-L-метионин (SAM) (“New England Biolabs”), $[^3H-CH_3]SAM$ (“Amersham”), фенилметилсульфонилфторид (PSMF) (“Sigma”), фосфоцеллюлозу P-11 (“Whatman”), гидроксипатит, триптон, дрожжевой экстракт (“Organotechnie”, Франция). Использовали ферменты и препараты ДНК фага λ (0.5 мг/мл) (НПО “СибЭнзим”, Россия). Остальные реагенты — отечественного производства квалификации х.ч.

Клонирование гена *bst19IM1* в *E. coli* и получение биомассы. Геномную ДНК *B. stearothermophilus* 19 выделяли согласно [7].

Ген *bst19IM1* (GenBank acc. no GU556968) амплифицировали с помощью ПЦР с геномной ДНК и ген-специфичных праймеров:

M1d: 5'-GGTGGTCACATATGTTGAAAGTTG-3';

M1r: 5'-TGAAATGCCCCACTTAGGATCCTAC-TAG-3' (подчеркнуты сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции FauNDI и BamHI).

Полученный фрагмент ДНК обрабатывали рестриктазами и клонировали в векторе экспрессии pJW [8], содержащем тандем термоиндуцибельных промоторов P_R/P_L фага λ , по сайтам рестрикции BamHI и FauNDI. Рекомбинантные клоны отбирали с помощью ПЦР на лизатах клеток с праймерами M1d и M1r. В результате были отобраны клоны, содержащие плазмиду pJW-bst19IM1 с геном *bst19IM1*.

После термоиндукции получали лизаты клеток *E. coli*, содержащих плазмиду pJW-bst19IM1, выявляли в них рекомбинантный белок с помощью электрофореза в 10%-ном денатурирующем SDS-ПААГ [9]. Гель окрашивали красителем Coomassie brilliant blue G-250. С целью проверки функциональной активности белка после индукции выделяли плазмидную ДНК и оценивали ее устойчивость к гидролизу эндонуклеазой рестрикции SfaNI.

Для наработки биомассы клетки *E. coli* RRI, несущие плазмиду pJW-bst19IM1, высевали в 24 флакона объемом 0.5 л со 100 мл жидкой питательной среды LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), и подрашивали на термостатированной качалке при 30°C и 180 об/мин до оптической плотности $A_{550} = 0.8–0.9$. Далее клетки термоиндуцировали при +42°C в течение 3 ч, собирали центрифугированием при 6000 g на центрифуге J2-21 (“Beckman”) и хранили при –20°C.

Выделение фермента M1.Bst19I. Все манипуляции проводили при температуре +4°C. Биомассу (3 г) суспендировали в 17 мл буфера А (10 мМ

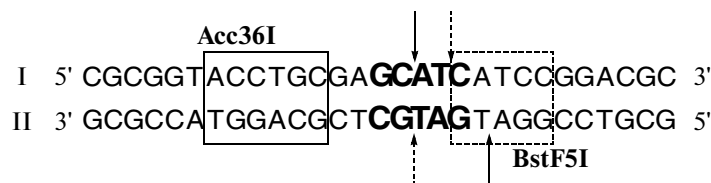


Рис. 1. Структура синтетического олигонуклеотидного дуплекса, использованного при определении метилируемого основания. Жирным выделен сайт узнавания ферментов РМ-системы Bst19I. Рамками и стрелками обозначены соответственно сайты узнавания и точки расщепления эндонуклеаз рестрикции Acc36I (сплошные линии) и BstF5I (пунктирные линии).

Трис- HCl , pH 7.5 при 25°C, 10 mM β -меркаптоэтанол, 0.1 mM EDTA, 5% глицерина), содержащего 0.3 мг/мл лизоцима, в течение 40 мин. Клетки разрушали ультразвуком на дезинтеграторе Soniprep 150 ("MSE"). Обломки клеток удаляли центрифугированием при 15000 g и +4°C в течение 30 мин на центрифуге J2-21.

К супернатанту добавляли ингибитор протеаз PMSF до концентрации 0.1 mM, NaCl до концентрации 0.2 M и 15 мл фосфоцеллюлозы P-11, предварительно уравновешенной буфером А с 50 mM NaCl. Полученную смесь оставляли на 1 ч, периодически перемешивая вращением стакана, затем переносили в колонку (10 см $\times$ 2 см) и промывали 40 мл буфера А с 50 mM NaCl. Сорбированный материал вымывали линейным градиентом NaCl

(0.1–0.85 M) в буфере А объемом 150 мл. Собирали 40 фракций по 3.7 мл.

Фракции, содержащие метилазную активность (40 мл), объединяли, диализовали в течение 1 ч против буфера А и наносили на колонку с гепарин-сефарозой (колонка 10 см $\times$ 2 см, объем 12 мл), предварительно уравновешенную буфером А с 50 mM NaCl. Колонку промывали двумя объемами буфера А. Фермент элюировали линейным градиентом NaCl (0.05–0.8 M) в буфере А объемом 150 мл. Собирали 50 фракций по 3 мл.

Наиболее активные фракции (33 мл) объединяли, разбавляли в 2 раза буфером А и наносили на колонку с ГАП (объем 5 мл, размер 10 см $\times$ 2 см), предварительно уравновешенную буфером В (10 mM KH_2PO_4 , pH 7.2 при 25°C, 0.1 mM EDTA, 10 mM β -меркаптоэтанол, 5% глицерина, 0.2 M NaCl). Колонку промывали двумя объемами буфера В. Фермент элюировали линейным градиентом KH_2PO_4 (10–300 mM) в буфере В объемом 100 мл. Собирали 30 фракций по 3.3 мл.

Конечный препарат фермента получали диализом и концентрированием наиболее активных фракций против 100 мл концентрирующего буфера (10 mM Трис- HCl , pH 7.6 при 25°C, 10 mM β -меркаптоэтанол, 0.1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 50%-ный глицерин) в течение 16 ч при +4°C. Концентрацию белка определяли по методу [10].

Определение активности метилазы в хроматографических фракциях. Активность метилазы в хроматографическом профиле определяли по защите ДНК фага λ от гидролиза эндонуклеазой рестрикции SfaNI, узнающей и гидролизующей последовательность 5'-GCATC-3'. С этой целью из фракций отбирали аликвоты по 2 мкл, которые разбавляли в 10 раз SE-буфером Y (33 mM Трис-ацетат, pH 7.9 при 25°C, 10 mM ацетат магния, 66 mM ацетат калия, 1 mM ДТТ). Разбавленную фракцию (2 мкл) добавляли к 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг ДНК фага λ в SE-буфере Y и 160 мкМ SAM. Смесь инкубировали при 37°C в течение 15 мин, затем добавляли по 1 мкл препарата эндонуклеазы рестрикции SfaNI и выдерживали еще 30 мин при 37°C. Продукты реакции разделяли в 1%-ном агарозном геле,

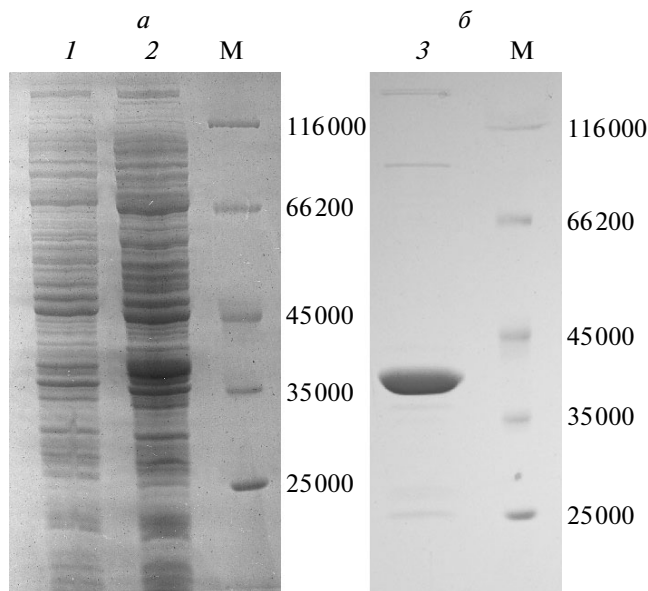


Рис. 2. Электрофореграмма в 10%-ном SDS-ПААГ белков клеточного лизата штамма RRI *E. coli*, несущего плазмиду pJW-bst19IM1, (a), и препарата фермента (b). 1 – До термоиндукции; 2 – после термоиндукции (стрелкой указана полоса, соответствующая M1.Bst19I); 3 – конечный препарат фермента; М – маркер молекулярных масс (цифры справа указывают их молекулярные массы, Да).

окрашивали раствором бромистого этидия и фотографировали в УФ-свете.

Определение оптимальных условий и стационарных кинетических параметров реакции метилирования ДНК фага λ . Температуру, pH и концентрацию солей, обеспечивающие наибольшую активность фермента, определяли по интенсивности включения $[H^3]SAM$ за 1 ч. Реакционная смесь содержала: 100 мМ Трис-HCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ ДТТ, 0.2 мг/мл БСА, 2% глицерин, 10 мкМ $[H^3]SAM$, 1 мкМ ДНК фага λ (в пересчете на сайты узнавания фермента), 10.8 нМ M1.Bst19I.

Оптимальную температуру определяли в диапазоне от 25 до 60°C, оптимальное значение pH — в диапазоне от 4 до 11. Концентрацию солей варьировали от 0 до 150 мМ.

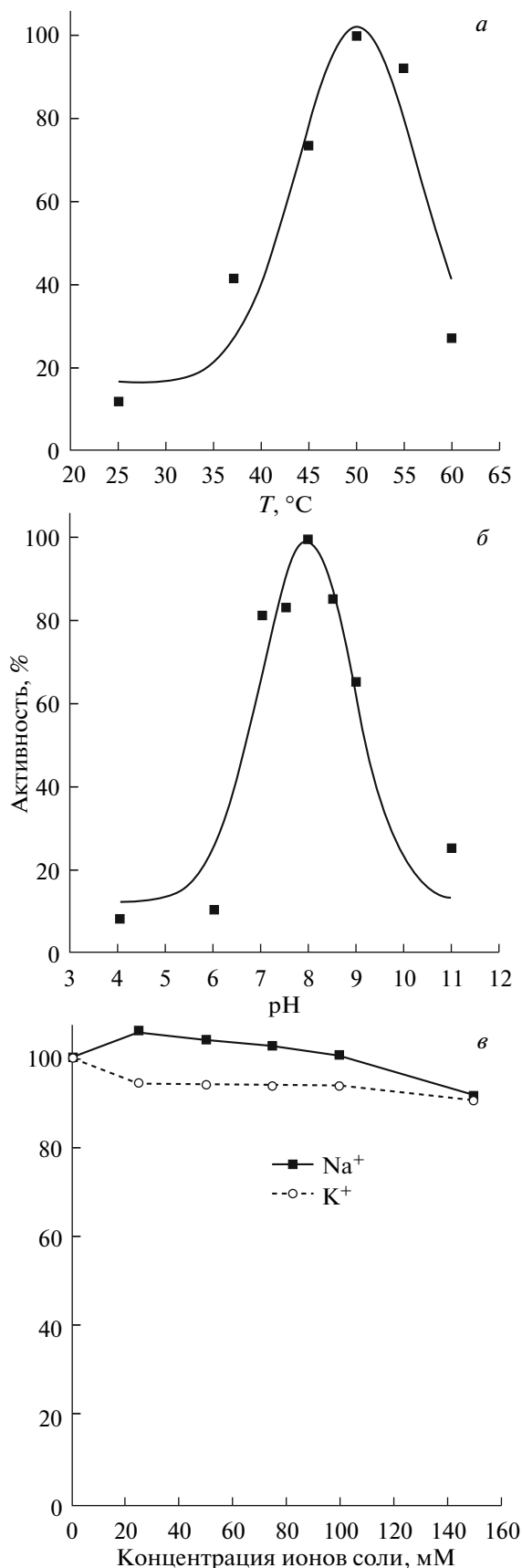
Реакцию метилирования останавливали, нанося аликвоты на фильтр ДЕ-81 ("Whatman"). Фильтр трижды промывали в 0.02 М водном растворе $NaHCO_3$ по 20 мин, затем водой и 70%-ным спиртом. Фильтр высушивали и измеряли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике Марк III ("Searle Analytic Inc.", США).

Начальную скорость реакции определяли в течение первых 20 мин с таким расчетом, чтобы процент метилирования ДНК не превышал 10%.

Определение модифицируемого основания. С этой целью использовали синтетический дуплекс I/II, образованный двумя комплементарными олигонуклеотидами (I и II). Структура дуплекса изображена на рис. 1.

Дуплекс I/II подвергали исчерпывающему метилированию $[H^3]SAM$ в следующих условиях: объем реакционной смеси 60 мкл, концентрация фермента — 1 мкМ, SAM — 3.3 мкМ, концентрация дуплекса — 10 мкМ, время реакции — 2 ч. Затем ДНК осаждали этанолом с ацетатом калия по стандартной методике [11]. Осадок растворяли в 36 мкл воды и добавляли 4 мкл SE-буфера Y. Таким образом готовили две реакционные смеси, к одной из которых добавляли 20 ед. акт. эндонуклеазы рестрикции BstF5I, а к другой — 8 ед. акт. Acc36I. Инкубировали в течение 2 ч при 65 и 37°C соответственно. Полученные в результате гидролиза фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной, элюировали из геля, осаждали 2%-ным раствором $LiClO_4$ в ацетоне, осадок растворяли в буфере TE и наносили на фильтры ДЕ-81. Фильтры промывали и подсчитывали количество включенной метки, как описано в разделе "Определение оптимальных условий и стационарных кинетических параметров".

Рис. 3. Зависимости скорости метилирования ДНК фага λ ферментом M1.Bst19I от температуры (а), pH (б) и концентрации ионов Na^+ и K^+ (в). Концентрации: фермента — 10 нМ, ДНК фага λ в пересчете на сайты 5'-GCATC-3' — 1 мкМ, SAM — 10 мкМ.



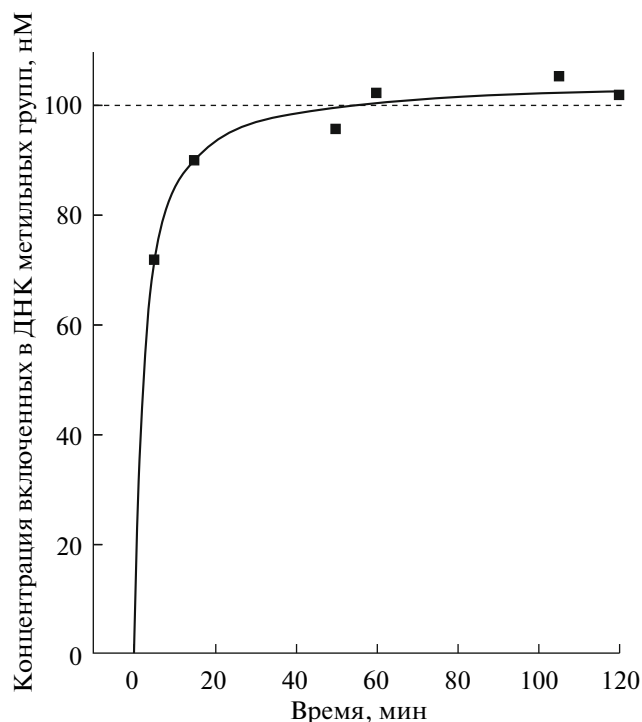


Рис. 4. Зависимость концентрации метилированных в ДНК фага λ сайтов от времени инкубации (концентрации: M1.Bst19I — 100 нМ, ДНК в пересчете на сайты — 100 нМ и SAM — 2 мкМ).

Статистическая обработка результатов и анализ аминокислотных последовательностей. Параметры функций, соответствующих кинетическим моделям, вычисляли с использованием регрессионного анализа, проводимого с помощью программы Origin 5.0. (Microcal, США, <http://www.microcal.com>). Каталитическую константу и константу Михаэлиса определяли регрессионным анализом функции Михаэлиса, описывающей экспериментальные данные, с помощью минимизации величины χ^2 .

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit 7.0.5 с параметрами по умолчанию (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Аминокислотные последовательности, использованные для сравнения, взяты из баз данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) и REBASE (<http://rebase.neb.com>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клонирование гена и получение препарата фермента M1.Bst19I

На первом этапе работы с помощью ПЦР с геномной ДНК *B. stearothermophilus* 19 получен фрагмент длиной 935 п.н., содержащий ген *bst19IM1*. Этот фрагмент клонировали в вектор

pJW по сайтам рестрикции *FauNDI* и *BamHI*, как описано в разделе “Экспериментальная часть”. В результате этих манипуляций отобрана плазмида pJW-bst19IM1, содержащая ген *bst19IM1*.

После термоиндукции получали лизат трансформированных клеток *E. coli*, присутствие рекомбинантного белка в котором определяли методом диск-электрофореза. Показано, что в клетках *E. coli* синтезируется дополнительный белок с мол. массой 37 кДа (рис. 2а), что соответствовало теоретически рассчитанной молекулярной массе M1.Bst19I.

Кроме того, плазмидная ДНК, выделенная из биомассы индуцированных клеток, обладала устойчивостью к действию эндонуклеазы рестрикции *SfaNI*, что говорит о функциональной активности индуцируемого белка.

Препарат рекомбинантной метилтрансферазы M1.Bst19I получали из 3 г биомассы. Схема очистки фермента включала хроматографию на фосфоцеллюлозе P-11, гепарин-сефарозе и ГАП. С использованием этой схемы получен препарат высокоочищенного фермента (9 мл) с концентрацией целевого белка 0.85 г/л, что соответствует молярной концентрации 22.7 мкМ.

Степень гомогенности метилазы M1.Bst19I проверяли с помощью денатурирующего белкового электрофореза в 10%-ном SDS-ПААГ (рис. 2б). Как видно из электрофореграммы, молекулярная масса очищенного фермента близка к 37 кДа, что соответствует расчетной величине.

Зависимость ферментативной активности от температуры, pH и концентрации солей натрия и калия

Зависимость активности M1.Bst19I от температуры представлена на рис. 3а. Оптимальную температуру можно рассматривать как интервал температур, в котором активность фермента составляет не менее 90% от максимальной. Этот интервал лежит между 47 и 57°C, поэтому дальнейшие опыты, связанные с метилированием M1.Bst19I, проводили при 50°C.

На рис. 3б приведена зависимость активности M1.Bst19I от величины pH. Эта зависимость характеризуется резким пиком с максимальной активностью при pH 8, поэтому дальнейшие опыты проводили при pH 8.

Влияние различных концентраций хлоридов натрия и калия на активность метилазы показано на рис. 3в. Видно, что в использованном диапазоне концентраций эти ионы практически не влияют на активность M1.Bst19I. Все дальнейшие опыты проводили в присутствии 10 мМ NaCl.

Таблица 1. Радиоактивность меченных тритием рестрикционных фрагментов, полученных после гидролиза метилированного дуплекса I/II рестриктазами Acc36I и BstF5I

Эндонуклеаза рестрикции	Нуклеотидная последовательность рестрикционных фрагментов	Радиоактивность, имп./мин
Верхняя цепь		
Acc36I	5'-cgcggtacctgcgagc-3'	120
	5'- at catccggacgc-3'	500
BstF5I	5'-cgcggtacctgcgag cat -3'	750
	5'- cat ccggacgc-3'	100
Нижняя цепь		
Acc36I	5'-gcgtccgga-3'	170
	5'-tgatgctcgaggtagccgcg-3'	117
BstF5I	5'-gcgtccggat gat -3'	75
	5'-gctcgaggtagccgcg-3'	70

Примечание. Жирным выделена последовательность, узнаваемая ферментами РМ-системы Bst19I.

Определение модифицируемого основания

Для исключения неканонического метилирования, т.е. возможности модификации изучаемой метилазой нуклеотидных последовательностей, отличных от сайта узнавания РМ-системы Bst19I, ДНК фага λ (концентрация в пересчете на сайты 5'-GCATC-3' – 100 нМ) метилировали избытком [H^3]SAM. На рис. 4 приведена кривая зависимости концентрации включенных в ДНК метильных групп от времени. Видно, что к концу первого часа количество метилированного субстрата выходит на плато, соответствующее количеству канонических сайтов узнавания РМ-системы. Следовательно, метилаза M1.Bst19I метилирует только одно основание и только в сайте узнавания 5'-GCATC-3'.

Модифицируемое основание определяли, как описано в разделе “Экспериментальная часть”. На рис. 1 показаны позиции гидролиза олигонуклеотидного дуплекса I/II эндонуклеазами рестрикции BstF5I и Acc36I. В табл. 1 приведены результаты измерения радиоактивности (импульсы в минуту) каждого рестрикционного фрагмента, полученного при расщеплении метилированного дуплекса I/II этими рестриктазами.

Таким образом, показано, что ДНК-метилтрансфераза M1.Bst19I модифицирует аденин в верхней цепи, и это согласуется с результатами анализа аминокислотной последовательности M1.Bst19I, которая содержит все домены, характерные для N6-ДНК-метилтрансфераз [6].

Определение стационарных кинетических параметров M1.Bst19I

Стационарные кинетические параметры определяли с использованием ДНК фага λ и SAM в качестве субстратов. Экспериментальные зависимости скорости реакции от концентрации ДНК и SAM приведены на рис. 5а,б, по ним построены кривые, описываемые уравнением Михаэлиса–Ментен. По этим кривым вычислены следующие кинетические параметры реакции метилирования ДНК ферментом M1.Bst19I – $k_{\text{cat}} = 1.8 \pm 0.05 \text{ мин}^{-1}$; $K_{\text{мДНК}} = 0.68 \pm 0.07 \text{ мкМ}$, $K_{\text{мSAM}} = 2.02 \pm 0.31 \text{ мкМ}$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Получение и биохимические свойства ДНК-метилтрансферазы M1.Bst19I

Использованный нами вектор pJW ранее применяли для клонирования некоторых ДНК-метилтрансфераз, включая T4-Dam-метилазу [8] и другие ферменты [12, 13], при этом выход целевого белка составлял 0.1–2 мг/г биомассы. У нас выход M1.Bst19I составлял 2.5 мг/г, что близко к верхней границе значений для данного вектора.

M1.Bst19I проявляет максимальную активность при температуре 50–55°C, что соответствует оптимальной температуре роста штамма *B. stearothermophilus* 19 (55°C) и характерно для ДНК-метилтрансфераз из умеренно термофильных штаммов [12, 13, 15, 16]. Однако температурный оптимум эндонуклеазы рестрикции из той же РМ-системы Bst19I на 10°C выше, чем у метилазы [2].

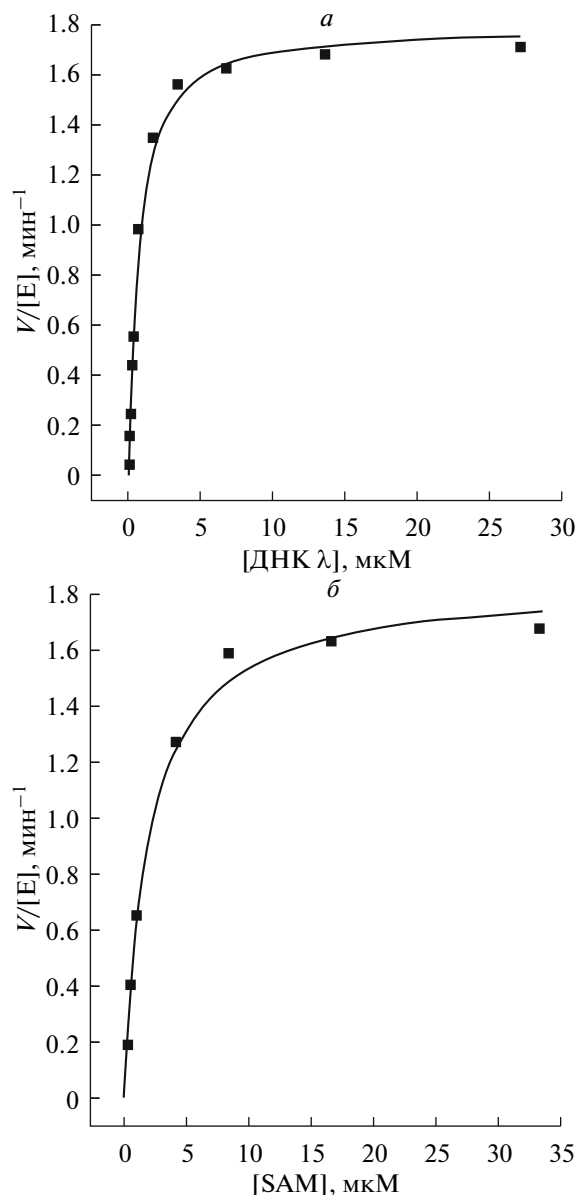


Рис. 5. Зависимости скорости метилирования ДНК ферментом M1.Bst19I *a* — от концентрации ДНК (*a*) и SAM (*б*). Время реакции 60 мин, концентрация фермента — 10 нМ, ДНК — 3.8 мкМ, SAM — 16.7 мкМ.

Оптимум pH метилазы M1.Bst19I типичен для ферментов данного класса [12–14]. Подобную зависимость активности фермента от величины pH с пиком в области 7–8.5 можно описать в рамках модели, учитывающей присутствие двух ионизируемых групп в молекуле фермента, она достаточно хорошо соответствует уравнению Михаэлиса [17].

Обращает на себя внимание тот факт, что активность изучаемого фермента практически не зависит от концентрации ионов Na^+ и K^+ в реак-

ционной смеси. Как правило, ДНК-метилазы проявляют максимальную активность в присутствии указанных ионов в невысоких концентрациях [12–14]. Активность большинства из них сильно снижается, если концентрация NaCl или KCl превышает 100 мМ.

Сравнение кинетических параметров ДНК-метилаз типа IIS

Ранее мы показали, что у ферментов, модифицирующих палиндромные сайты узнавания, константы Михаэлиса на протяженных ДНК более чем на порядок ниже, чем у ферментов, принадлежащих к РМ-системам типа IIS и метилирующих несимметричные сайты узнавания [12]. Такое отличие значений $K_{\text{мДНК}}$ обусловлено, видимо, разными механизмами связывания ДНК ферментами этих двух групп. В связи с этим мы сравнивали кинетические свойства только ДНК-метилтрансфераз из РМ-систем типа IIS. В табл. 2 приведены полученные нами кинетические параметры фермента M1.Bst19I, а также опубликованные ранее значения каталитической константы и $K_{\text{м}}$ для реакции метилирования ДНК фага λ другими ДНК-метилтрансферазами, имеющими несимметричные сайты узнавания. Как видно из табл. 2, значения каталитической константы и $K_{\text{м}}$ для всех ферментов варьируют в пределах 0.24–2.6 min^{-1} и 0.11–1.29 мкМ соответственно. При этом, кинетические свойства M1.Bst19I наиболее близки к свойствам M2.BstF5I: оба фермента имеют высокие значения k_{cat} , а $K_{\text{мДНК}}$ практически одинаковы. Близость значений $K_{\text{мДНК}}$ у M1.Bst19I и M2.BstF5I обусловлена, видимо, одинаковой структурой ферментов, относящихся к типу α -N6-ДНК-метилтрансфераз, и значительным сходством их аминокислотных последовательностей [6]. Кроме того, как мы отмечали ранее, оба фермента узнают последовательности, содержащие общий тетрауклеотид 5'-CATC'-3', который, по-видимому, опознается ими сходным образом [6]. Таким образом, достаточно высокая гомология первичных структур M1.Bst19I и M2.BstF5I, сходство сайтов узнавания и близость кинетических параметров реакции метилирования позволяют с большой вероятностью говорить о том, что в связывании ДНК и катализе у этих ферментов участвуют аналогичные структурные элементы.

Сравнение первичной структуры α -N6-ДНК-метилтрансфераз

Сравнение аминокислотных последовательностей α -N6-ДНК-метилтрансфераз, к которым относится M1.Bst19I, проведенное ранее, позволило выявить ряд структурных элементов, общих

Таблица 2. Кинетические параметры некоторых ДНК-метилтрансфераз типа IIS*

Фермент (сайт узнавания)	k_{cat} , мин ⁻¹	$K_{m\text{ ДНК}}$, мкМ	$K_{m\text{ SAM}}$, мкМ	Ссылка
M1.Bst19I(GCATC)	1.8	0.68	2.02	Данная работа
M2.BstF5I (CATCC)	2.6	0.72	0.67	[13]
M4.BstF5I(CATCC)	0.99	1.29	0.94	[13]
M1.BstF5I (GGATG)	0.98	0.11	1.47	[15]
M3.BstF5I (GGATG)	0.24	0.11	3.3	[16]
M.FokI		0.18	0.6	[14]

* Субстратом служила ДНК фага λ .

для всех ферментов [18]. Ферменты этого типа модифицируют аденин, который находится во втором или третьем положении сайта узнавания в составе АТ-пары. α -N6-ДНК-метилтрансферазы содержат 9 консервативных участков, включая районы FxGxG и DPPY, и, кроме того, так называемый TRD, который определяет субстратную специфичность фермента и находится между консервативными участками III и IV [18]. Выравнивание аминокислотных последовательностей 12 ферментов этого типа, проведенное отдельно по 9 консервативным участкам, выявило в них ряд общих аминокислот, помимо районов FxGxG и DPPY [18]. Однако сравнительное изучение района TRD ранее не проводили.

На рис. 6 представлено выравнивание TRD α -N6-ДНК-метилтрансфераз вместе с окружающими его консервативными участками III и IV. Наряду с M1.Bst19I приведены аминокислотные последовательности 25 других ферментов, имеющих 10 различных сайтов узнавания как палиндромных, так и несимметричных. Первые 10 аминокислотных остатков M1.Bst19I в этом выравнивании относятся к участку III. Нам не удалось выявить в этом мотиве консервативных остатков аспарагиновой или глутаминовой кислоты, найденных ранее [18]. В то же время консервативный участок IV (район DPPY), завершающий выравнивание, на основе наших данных можно представить в виде DxxYxDPPY.

Как видно из рис. 6, собственно TRD в процессе выравнивания разделился на три отдельных блока, названных нами TRD-I (район 19–40), TRD-II (район 50–79) и TRD-III (район 83–123). Здесь и далее нумерация ведется от первой аминокислоты выравнивания. Все TRD-I содержат Arg(TRD32) и Asn(TRD24) в 20 из 26 последовательностей. TRD-II в 20 ферментах содержат алифатические аминокислоты в положении TRD50 и

в TRD63 – в 21 структуре, а также Gly(TRD77) – в 19. TRD-III не имеет таких высокоомологичных участков, за исключением Arg/Lys(TRD85) в 21 последовательности и алифатической аминокислоты в положении TRD95 в 22 структурах.

В нашей предыдущей работе [6], исходя из известной пространственной структуры метилазы M.DpnIIA, мы определили вероятное расположение наиболее консервативных аминокислотных остатков метилазы M1.Bst19I на гипотетической трехмерной модели. Сопоставление положения наиболее консервативных аминокислотных остатков TRD с полученными нами ранее данными показало, что TRD-I расположен в малом домене белка и играет структурную роль, тогда как TRD-II, также локализованный в малом домене, принимает непосредственное участие в специфическом взаимодействии с ДНК. TRD-III соединяет малый и большой домены белка.

Существенно более высокая гомология наблюдается при разбиении всех аминокислотных последовательностей каждого блока TRD на подгруппы в зависимости от узнаваемой ферментом нуклеотидной последовательности. На рис. 6 первая подгруппа размещена в верхней части выравнивания (последовательности 1–11), она включает 11 ферментов или их фрагментов, во втором или третьем положении сайта узнавания которых находится АТС. Вторая подгруппа находится в нижней части выравнивания (последовательности 15–25), он состоит из 11 ферментов или их половинок, во втором или третьем положении сайта узнавания которых находится АТГ. Структура TRD у ферментов, которые не имеют триплетов АТС или АТГ в сайте узнавания (EcoRV, SspI и Sse9I), представлена между ферментами данных подгрупп (последовательности 12–14). И, наконец, аминокислотная последовательность TRD фермента M.HpyC1I (последовательность 26) с

		1	10	20	30	40	50	60	68			
1	M1. Bst19I	99	--KYGFEFYCE	---	SSTGLSNYNKE	KYKALROFYNNKKQNNNP	YFDLIFYVITVYGFNNQIRBKK			GCATC	GU556968	
2	M.SfaNI C	496	--KNGYEFYSAN	---	SASGLGAYNKE	KELKLRKDYNNNS	-----	PSPILFYLVVYGFNNQIRENS		GCATC	GU565605	
3	M.BhaIA	100	--KYGYSKYGCE	---	SGSGLAAYNKE	HFLKLRQDYNNRMEDTI	---	YYDLAFYLLTVYGFNNQIRENK		GCATC	BAB07722	
4	M.BstF5I2	95	IDHILSHIETRI	---	QEYNLSKSNKE	GYLADROYNNKH	-----	RFILDLVYVTCYSENVHIRENS		CATCC	CAI52506	
5	M.FokI C	433	VEEVIAHIERRI	---	EEYGLSKSNE	EFGKAFNNYNNKT	-----	KKPDLTYLICYSFNQYFRNN		CATCC	CAA24933	
6	M.StsI C	431	PVKLVQQIEEKI	---	DEWGLSKTNE	DAFLAPKKHYNTN	-----	PNPDLVYVLSFSYNNQYFRNN		CATCC	BAA01876	
7	M.DpnIIA	78	PQELIEILKVHQ	---	EYNSKEYYLD	RSADRDERIDMMSEV	QRAARI	LYMLRVNENGLYRVNS		GATC	AAA88580	
8	M.EcoKDam	70	TDEYVQAARELFVP	---	ETNCAEVYVQ	PEEENKSDPFRR	---	AVLFYINRYGYNGLCRVNL		GATC	AAC76412	
9	M1. MboI	77	PDDLIGYIENLQSHYDKLTD	LESKKPYFYHKKRQVFNQRTSNDIEQ	---	AGLFIFLNKSAFNGLYRVNK				GATC	BAA03071	
10	M.ThalI	80	PLKLIAAKLDLKF	---	NNREDYYEARS	LNSTEDPVKR	---	SALLIYNNRHGYNGLYRVNS		GATC	CAC11782	
11	M.CviAI	74	TEELIEELKSLK	---	NSEEDYYENK	KIFNSLKKEGHFSVKASALFIYNNKTCERGLYREGP				GATC	AAC96931	
12	M.EcoRV	76	TGDLVKDFLYRE	---	GEKLLLSNGE	YYYEVRENNYKEP	---	LDLFILNRSCEFGHIRENS		GATATC	AAG18132	
13	M.Sse9I	90	EPGYTETETCEAS	---	RYFPQPKNGARVD	AIENADDR	---	YADSWMRPILITSLILAADE		AATT	CAA65583	
14	M.SspI	118	YGGDLDTSGSAI	QPDGTTKPKQVHNT	TRKLDGIRDEISLS	---	DMETEKAVALTSLILAADE			AATATT	I20888*	
15	M.CviAII	94	IPGFVTLTYSPR	---	GHRMYFTEDI	AMRIDITRENI	ERMKER	-----	VSTDEYNFLLASILLTSADS	CATG	AAC96619	
16	M.CviQVII	91	TSGFVTMTYSPR	---	GHRMYFTEDN	AMRIDITROHIERMKDS	---	ISKDEYHFLLASILLTSADT		CATG	AAC03127	
17	M.Hpy166IV	91	KKGFIYSHYSLG	---	GSSRQYFSET	NAQKIDAMRLKIEELKLSQ	---	NIDNCAYYFLLASILLSEADK		CATG	AAC45818	
18	M.HpyI	91	RKGFISHYSLG	---	GSSRQYFSET	NAQKIDAVRLKIEELKLSQ	---	NIDNCAYYFLLASILLSEADK		CATG	AAC45814	
19	M.NlaIII	91	REGLIYQHYCLGSGSERQ	---	YFSDENGGKIDAVRI	QIEEWKNT	---	YIDEDTYFLLATLLEGADK		CATG	CAA38356	
20	M.BhaIB	152	EDNVYSINFGGT	---	YFTEYNARKIGYVRE	ETEKMSDE	---	LNAREKAILITSLIYAMDK		GATGC	BAB07723	
21	M.SfaNI N	163	IHGVDKNFNGK	---	YFSDENGGKIDAVRI	QIEETIYND	---	LNAREKAILITSLIYAMDK		GATGC	GU565605	
22	M2. Bst19I	166	EDNVVSAHFGGT	---	YFTEYNARKIGYVRE	ETEKMGDS	---	LSFREKAILITSLIYAMDK		GATGC	GU565604	
23	M.BstF5I3	101	NNSFICRNYSNENCERM	YFTNENAKRIDFTRTKIEEWFNNN	---	LTENEYFYLLAGLIESVPF				GGATG	CAI52507	
24	M.FokI N	98	HEFFLTHNYSNYPNGCERM	YFTVENASRIDFTRLTNRWKNES	---	LTNELEFAYLLAIDIEAVPF				GGATG	AAA24933	
25	M.StsI N	96	DETI GYEVAYSPTGEAN	YLSVHNAKKIDITRSQTESKWNQN	---	LTTEHEYYYLLSLLIEALPF				GGATG	BAA01876	
26	M.HpyC11I	24	EENYFSQHFSNK	---	FESYKDCVTKG	STREHIESLN	---	LDKLNKDI LLTSLIYSMDK		GATGG ?	BAD00169	
										(CCATC ?)		
1	M1. Bst19I	164	KGNMNIIPVGK	---	RDENENIQNNY	QYFIQVQVQNDIF	QCRDFRDM	INDLT	---	EGDFLYADPPY	GCATC	GU556968
2	M.SfaNI C	551	KGEYNLPVGK	---	RDENK-MEEK	DRKFVKVIQDSPIEYSTKDFREVSID	---	TGDFLYADPPY		GCATC	GU565605	
3	M.BhaIA	160	KGHYNIPVGK	---	RDENEKIKTND	VNFIRIIEKEDIDFICSDFREVEIEMS	---	QGDFLYADPPY		GCATC	BAB07722	
4	M.BstF5I2	152	KHEENAPBGG	---	NRSHEFNDT	LKKKLVDFVNEHISKNI	VFTNND	FEISLDEFG	---	PMDFFYCDPPY	CATCC	CAI52506
5	M.FokI C	490	NQENNNPBBGR	---	ERSQFSPALK	KKKLVLFIEALHEKNVQVCSEFEHFNFSQLD	---	QNDLVYCDPPY		CATCC	AAA24933	
6	M.StsI C	488	SMEENNPBBGR	---	NRSHEFSENMR	NNLNFTVKLTLDATFTDNYFNEFDFSNLT	---	SNDFLYCDPPY		CATCC	BAA01876	
7	M.DpnIIA	138	KNQENVPYGR	---	YKNPKIVDEEL	ISASVYINNQLKIEKVGDFEKAVDVR	---	TGDFVYCDPPY		GATC	AAA88580	
8	M.EcoKDam	128	RGENVPBBGR	---	YKKP-YFPEAE	YHFAEKQNAFFYCYSYADSMARAD	---	DASVYCDPPY		GATC	AAC76412	
9	M1. MboI	142	NNQENVPBGN	---	YKKPTFVDKEN	ILNISKKLQNTKILSGDFELVLAHLFNN	---	FPCLFYCDPPY		GATC	BAA03071	
10	M.ThalI	136	ENKENVPBBGR	---	YSNPRMPSSEN	IMAFSNILKSCITLNLDFEMAVSHAT	---	RGDFVYCDPPY		GATC	CAC11782	
11	M.CviAI	132	-NGENVPBGGH	---	YKNPNWINAD	LRGWSDKIKNVEFSCLPYQDFLNDVG	---	EHDFVYCDPPY		GATC	AAC96931	
12	M.EcoRV	132	KGGENVPBCKKPNRFAQA	YITKISNQVDRISEIISKGN	YTFLCQSF	EKTIGMVN	---	RDDVYCDPPY		GATATC	AAG18132	
13	M.Sse9I	144	VDSTTGVMQA	---	YLRQWAARAHND	DELRLPDLIAGDG	---	DVAREDAVTLAQELPRVQLMYCDPPY		AATT	CAA65583	
14	M.SspI	176	VDNTLGHETS	---	YLKESVSPRSF	KEHMKIKPIFINSEDNQVLKGDIFASMTNI	---	NVDFAVCDPPY		AATATT	I20888*	
15	M.CviAII	152	VKNTSVVYGA	---	YLRKEKKTALK	RNVFAPLHTRSTTVTLETFNEDATELEI	---	KTDIAYVDDPY		CATG	AAC96619	
16	M.CviQVII	149	VKNTSVIYGA	---	FLKKEKKTASK	HMKLPLHTRSTTVRLETFNEDATELEI	---	KTDIAYVDDPY		CATG	AAC03127	
17	M.Hpy166IV	152	VANTASVYGA	---	FLKRLKKSQK	ELLKGAHFDLSLNAEVYQDASELIGKI	---	SGDILYDDPY		CATG	AAC45818	
18	M.HpyI	152	VANTASVYGA	---	FLKRLKKSQK	ELLKGAHFDLSLNAEVYQDASELIGKI	---	SGDILYDDPY		CATG	AAC45814	
19	M.NlaIII	153	VANTASVYGA	---	FLKRLKKSQK	ELLKGAHFDLSLNAEVYQDASELIGKI	---	SGDILYDDPY		CATG	CAA38356	
20	M.BhaIB	206	VANTVGHYDA	---	YRRK-LDSIK	ELKLMPEFNDGLNNGKIFKEDANELVRKI	---	SADLVYDDPY		GATGC	BAB07723	
21	M.SfaNI N	216	VANTVGHYDA	---	YRRK-MDTFK	PIYLRVPEFNKNGV	---	NEIYNEDANQLVRKI	---	KTDLVYDDPY	GATGC	GU565605
22	M2. Bst19I	220	VANTTGHYDA	---	FRRK-LDTTKEI	KLLVPEFKDEIKNGNRIYNEDANKLVNRI	---	TADLVYDDPY		GATGC	GU565604	
23	M.BstF5I3	163	VSNISGTYGA	---	YLRHNDKRAF	KPELIKLDVPIHKNERSFNKDSNELIREL	---	EGDILYDDPY		GGATG	CAI52507	
24	M.FokI N	160	ISNISGTYGA	---	YLRHNDKRALG	KKRLTLDIGNNHYANKTYNEDANSLEIKV	---	YGDILYDDPY		GGATG	AAA24933	
25	M.StsI N	158	ISNTTGTGGA	---	FLKHNDKRS	LNDDELQDFTIFDNKQKAFNEDANELVQKI	---	KADIVYDDPY		GGATG	BAA01876	
26	M.HpyC11I	76	IANTVGHYDA	---	YRRKEILQDR	FIFELISPIKHKDN	---	IMIERKNANELAKTL-KIDLVIDDPY		GATGG ?	BAD00169	
										(CCATC ?)		

Рис. 6. Выравнивание аминокислотных последовательностей TRD и окружающих его консервативных мотивов III и IV M1.Bst19I и других α -N6-ДНК-метилтрансфераз. Справа от выравнивания указаны сайты узнавания ДНК-метилаза (модифицируемое основание подчеркнуто) и номера в базах данных GenBank и REBASE(*).

известным сайтом узнавания, но неопределенной модифицируемой цепью ДНК, приведена в конце рис. 6.

В табл. 3 представлены консервативные аминокислотные остатки, найденные в каждом из трех блоков

TRD, у ферментов первой и второй подгрупп. Как видно из приведенных данных, количество консервативных аминокислот во второй подгруппе (21) значительно больше, чем в первой (11), а в TRD-III совсем нет гомологичных аминокислот, характерных только

Таблица 3. Консервативные аминокислоты в блоках TRD, характерные для α -N6-ДНК-метилтрансфераз, содержащих ATC (подгруппа 1) и ATG (подгруппа 2) в сайте узнавания

TRD-I	TRD-II	TRD-III
<i>Подгруппа 1</i>		
Glu(TRD26), Phe/Tyr(TRD28), Phe/Tyr(TRD35), Asn(TRD36)	Leu(TRD55), Phe/Tyr(TRD60), Asn(TRD61), Arg(TRD65), Asn(TRD67), Phe/Tyr(TRD72), Asn(TRD73), Pro(TRD75)	—
<i>Подгруппа 2</i>		
Tyr(TRD19), Phe(TRD20), Ala(TRD25), Ile(TRD28) и (TRD35), Asp/Gly(TRD29), Glu(TRD36)	Leu(TRD58), Leu/Ile(TRD59), Leu(TRD62), Asp/Pro(TRD67), Val/Ile(TRD69), Asn(TRD71), Thr/Ile(TRD72), Tyr(TRD76), Ala(TRD78)	Asp(TRD115), Ala(TRD116), Leu(TRD119)

Примечание. Нумерация аминокислот начинается с первой аминокислоты в выравнивании, приведенном на рис. 6.

для первой подгруппы. При определении положения аминокислот на известной пространственной модели фермента M.DpnIIA, входящего в первую подгруппу, оказалось, что Phe/Tyr(TRD60), Asn(TRD61), Arg(TRD65), Asn(TRD67), Asn(TRD73), Pro(TRD75) располагаются в малом домене в непосредственной близости от молекулы ДНК. Видимо, эти аминокислоты принимают участие в узнавании общих для данной подгруппы нуклеотидов. Эти предположения согласуются с результатами работ по изучению EcoK-Dam-метилтрансферазы [19, 20]. Оказалось, что именно указанные нами аминокислотные остатки из района TRD-II участвуют в процессе “выворачивания” метилируемого основания из двойной спирали ДНК [21], что необходимо для более тесного контакта мишени с активным центром фермента, представленным у α -N6-ДНК-метилтрансфераз консервативным мотивом DPPY. При этом некоторые аминокислоты, Phe/Tyr(TRD60) и Asn(TRD61), вклиниваются между соседними с аденином основаниями в сайте узнавания и занимают его место, спариваясь с тимином в комплементарной цепи. Другие, например Lys(TRD63), Pro(TRD75) и Arg(TRD65), взаимодействуют с остальными нуклеотидами узнаваемой последовательности. На основании этих данных можно предполагать, что остальные консервативные аминокислоты, приведенные в табл. 3, также участвуют в образовании фермент-субстратного комплекса, и их состав напрямую зависит от сайта узнавания фермента. Кроме того, присутствие изолейцина в положении TRD131 у ферментов второй подгруппы, т.е. практически на границе с консервативным участком IV, соответствует непалиндромному сайту узнавания.

В связи с установленным различием TRD двух подгрупп α -N6-ДНК-метилтрансфераз интересным представляется определение модифицируемой цепи ДНК в непалиндромном сайте узнавания M.HpyCII, также относящегося к ферментам этого типа. Субстратная специфичность этого фермента известна, однако не ясно, метилирует данный

фермент GATGG в верхней цепи или комплементарную ей последовательность CCATC. Исходя из расположения гомологичных аминокислот, характерных для всех трех блоков TRD (табл. 3), M.HpyCII можно отнести к ферментам второй подгруппы, метилирующих аденин в последовательности GATGG.

Близкие значения кинетических параметров k_{cat} и $K_{m,днк}$ у M1.Bst19I и M2.BstF5I связаны, видимо, с их принадлежностью к одному типу ферментов (α -N6-ДНК-метилтрансферазам) и присутствием в последовательности, узнаваемой обоими ферментами, триплета ATC. Все остальные метилазы, представленные в табл. 2, либо имеют сайт узнавания с триплетом ATG, либо не относятся к α -N6-ДНК-метилтрансферазам (M4.BstF5I).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pingoud A., Jeltsch A. 2001. Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.* **29**, 3705–3727.
2. Томилова Ю.Э., Дедков В.С., Шинкаренко Н.М., Попиченко Д.В., Дегтярев С.Х. 2002. Эндонуклеаза рестрикции Bst19 I из штамма *Bacillus stearothermophilus*, узнающая последовательность ДНК 5'-GCATC-3'. *Биотехнология*. **6**, 17–20.
3. Sugisaki H., Yamamoto K., Takanami M. 1991. The HgaI restriction-modification system contains two cytosine methylase genes responsible for modification of different DNA strands. *J. Biol. Chem.* **266**, 13952–13957.
4. Bitinaite J., Maneliene Z., Menkevicius S., Klimasauskas S., Butkus V., Janulaitis A.A. 1992. Alw261, Eco31I and Esp3I – type IIs methyltransferases modifying cytosine and adenine in complementary strands of the target DNA. *Nucleic Acids Res.* **20**, 4981–4985.
5. Friedrich T., Fatemi M., Gowhar H., Leismann O., Jeltsch A. 2000. Specificity of DNA binding and methylation by the M.FokI DNA methyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1480**, 145–159.

6. Томилова Ю.Э., Абдурашитов М.А., Голикова Л.Н., Нетесова Н.А., Дегтярев С.Х. 2004. Клонирование, установление первичной структуры и сравнительный анализ ДНК-метилтрансфераз из систем рестрикции-модификации SfaNI и Bst19I. *Молекуляр. биология*. **38**, 997–1004.
7. Smith C.L., Klco S.R., Cantor C.R. 1987. *Genome Analysis: A Practical Approach*. Ed. Davies K. Oxford, UK: IRL Press.
8. Kossykh V.G., Schlagman S.L., Hattman S.M. 1995. Phage T4 DNA [N6-adenine]methyltransferase. Overexpression, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* **270**, 14389–14393.
9. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680–685.
10. Ehresmann B., Imbault P., Well J. P. 1973. Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. *Anal. Biochem.* **54**, 454–463.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. 1984. *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование*. М.: Мир.
12. Чернухин В.А., Seggewiss J., Каширина Ю.Г., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. 2009. Рекомбинантная ДНК-метилтрансфераза M2.BstSEI из никазно-метилязной системы NM.BstSEI: получение и свойства. *Молекуляр. биология*. **43**, 10–18.
13. Чернухин В.А., Голикова Л.Н., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Каширина Ю.Г., Нетесова Н.А., Дегтярев С.Х. 2003. Метилтрансферазы M.BstF5I-2 и M.BstF5I-4 системы рестрикции-модификации BstF5I из *Bacillus stearothermophilus* F5. *Биохимия*. **68**, 1183–1192.
14. Kaczorowski T., Sektas M., Skowron P., Podhajska A.J. 1999. The FokI methyltransferase from *Flavobacterium okeanokoites* – purification and characterization of the enzyme and its truncated derivatives. *Mol. Biotechnol.* **13**, 1–15.
15. 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. Сравнительное изучение свойств ДНК-метилтрансфераз M. Bst F5I-1 и M. Bst F5I-3 системы рестрикции-модификации Bst F5I из *Bacillus stearothermophilus* F5. *Молекуляр. биология*. **36**, 136–143.
16. Чернухин В.А., Кузнецов В.В., Гончар Д.А., Каширина Ю.Г., Нетесова Н.А., Дегтярев С.Х. 2010. Субстратная специфичность и биохимические свойства ДНК-метилтрансферазы BstF5I-3 из системы рестрикции-модификации BstF5I. *Биохимия*. **75**, 78–87.
17. Корниш-Боуден Э. 1979. *Основы ферментативной кинетики*. М.: Мир.
18. Malone T., Blumenthal R.M., Cheng X. 1995. Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes. *J. Mol. Biol.* **253**, 618–632.
19. Horton J.R., Liebert K., Bekes M., Jeltsch A., Cheng X. 2006. Structure and substrate recognition of the *Escherichia coli* DNA adenine methyltransferase. *J. Mol. Biol.* **358**, 559–570.
20. Horton J.R., Liebert K., Hattman S., Jeltsch A., Cheng X. 2005. Transition from nonspecific to specific DNA interactions along the substrate-recognition pathway of dam methyltransferase. *Cell*. **121**, 349–361.
21. Cheng X., Roberts R.J. 2001. AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. *Nucleic Acids Res.* **29**, 3784–3795.