

УДК 577.21.577.151

КЛОНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКИХ И КИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ M1.BspACI

М.В. Тарасова^{1,2}, В.В. Кузнецов³, Н.А. Нетесова³, Д.А. Гончар¹, С.Х. Дегтярев¹

¹Научно-производственное объединение “СибЭнзим”, г. Новосибирск;

²Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск;

³ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл.; e-mail: tarasovamv@sibenzyme.ru)

Гены ДНК-метилтрансфераз системы рестрикции-модификации BspACI из *Bacillus psychrodurans* AC клонировали в клетках *E. coli*. Анализ аминокислотных последовательностей белков, кодируемых этими генами, показал, что они оба относятся к классу C5 ДНК-метилтрансфераз. Ген M1.BspACI субклонировали в составе экспрессирующего вектора pJW2. Препарат высокоочищенного рекомбинантного фермента получали с помощью хроматографии на различных носителях. Установлено, что M1.BspACI модифицирует первый цитозин в последовательности 5'-CCGC-3'. Определены кинетические параметры реакции метилирования ДНК ферментом и показано, что каталитическая константа оказалась равной $0,095 \pm 0,002 \text{ мин}^{-1}$, K_m ДНК фага λ — $0,053 \pm 0,007 \text{ мкМ}$, K_m SAM — $5,1 \pm 0,3 \text{ мкМ}$.

Ключевые слова: ДНК-метилтрансфераза, клонирование генов, *Bacillus psychrodurans*, ферментативная кинетика.

ДНК-метилтрансферазы (метилазы, М) — сайт-специфические ферменты, катализирующие перенос метильной группы от донора, S-аденозил-L-метионина (SAM), на адениновое или цитозиновое основание в определенной нуклеотидной последовательности. У прокариотических организмов, как правило, эти ферменты вместе с эндонуклеазами рестрикции (рестриктазами, R) образуют системы рестрикции-модификации (RM-системы), основной функцией которых является защита клетки от чужеродной ДНК. Большинство RM-систем с несимметричными узнаваемыми последовательностями (подтип IIS) включают чаще всего две ДНК-метилтрансферазы, каждая из которых модифицирует лишь одну из цепей ДНК.

Ранее нами был выявлен штамм *Bacillus psychrodurans* AC, который продуцирует эндонуклеазу рестрикции, узнающую непалиндромную последовательность 5'-CCGC-3' [1]. В представленной работе описано клонирование, выделение, биохимические и субстратные свойства рекомбинантной ДНК-метилтрансферазы M1.BspACI.

Методы исследования

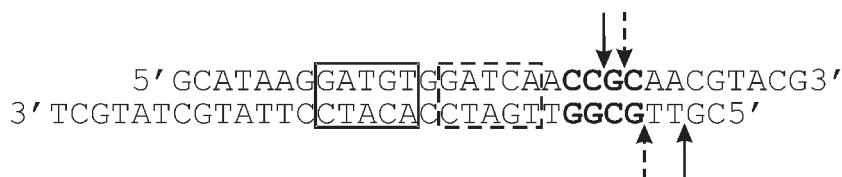
Клонирование генов метилтрансфераз

РМ системы BspACI выполнялось согласно стандартным методам [2]. Суммарная плазмидная ДНК, состоящая из PstI- и Zsp2I-фрагментов хромосомной ДНК *Bacillus psychrodurans* AC в составе плазмидного вектора pUC19, обрабатывалась рестриктазой BspACI и трансформировалась в клетки *E. coli* ER2267. Плазмида одного из полученных таким

образом клонов использовалась для субклонирования гена метилтрансферазы в составе вектора pJW2 по сайтам рестрикции FauNDI и BamHI. Полученные клоны подвергали термоиндукции и наблюдали появление полосы, соответствующей целевому белку, в 10%-м SDS-полиакриламидном геле.

Выделение рекомбинантной M1.BspACI проводили путем последовательной хроматографической очистки на колонках с использованием следующих носителей: фосфоцеллюлозы P-11, гидроксилапатита — для второй и пятой стадий, гепарин-сефарозы, сефакрила S-200. Наличие активной M1.BspACI в профиле определяли по защите ДНК фага λ от гидролиза рестриктазой BspACI (инкубированной с аликватами из фракций). Отсутствие примесных белков в готовом препарате контролировали с помощью электрофореза в 10%-м SDS-полиакриламидном геле. Оптимальную температуру, pH и концентрацию ионов калия и натрия определяли по интенсивности включения меченного SAM за 60 мин реакции.

Определение метилируемого основания в сайте узнавания M1.BspACI проводилось с помощью олигонуклеотидного дуплекса M1AC (рисунок).



Структура синтетического олигонуклеотидного дуплекса M1AC. Жирным шрифтом выделен сайт узнавания M1.BspACI, в сплошной рамке сайт узнавания R.FokI, в пунктирной — R.AlwI, места расщепления ДНК указанными ферментами обозначены соответственно сплошными и пунктирными стрелками

Дуплекс метилировали M1.BspACI с использованием меченого тритием SAM, делили на две равные части и расщепляли рестриктазами FokI и AlwI. Затем для каждого фрагмента подсчитывали количество включенной метки.

Определение стационарных кинетических параметров реакции метилирования ДНК по каждому из субстратов проводилось при насыщении по другому субстрату. Реакцию проводили с использованием меченого тритием SAM в течение 1 ч при оптимальных условиях работы фермента. Определение наличия неканонического метилирования проводилось в условиях реакции одного оборота.

Результаты и их обсуждение

Клонирование генов метилаз РМ системы BspACI. В результате отбора клонов, несущих вектор pUC19 со встроенными фрагментами хромосомной ДНК *B. psychrodurans* AC, была получена плаزمида pMBspACI, содержащая вставку длиной около 4 т.п.н., обладающая защитой к гидролизу рестриктазой BspACI. Анализ аминокислотных последовательностей двух открытых рамок трансляции длиной 320 и 455 аминокислотных остатков, обнаруженных во вставке, показал их принадлежность к классу C5-метилтрансфераз. Плазмида pMBspACI была использована для дальнейшего субклонирования одного из генов метилаз в составе экспрессирующего вектора pJW2. В итоге была получена рекомбинантная плазмида pM1BspACI, несущая функционально активный ген *bspACI1*.

Выделение препарата ДНК-метилтрансферазы. Из 4,5 г сырой биомассы было получено 4,5 мл гомогенного препарата фермента с концентрацией 0,35 мкг/мкл. Были определены оптимальные условия работы рекомбинантного фермента: максимальная его активность проявлялась при температуре 30°, pH 8 и отсутствии ионов калия и натрия в реакционной среде.

Определение метилируемого основания. После расщепления H-меченого дуплекса M1AC отдельно рестриктазами FokI и AclWI было получено восемь

Значения каталитических параметров некоторых ДНК-метилтрансфераз IIS типа

Фермент, сайт узнавания	Субстрат	k_{cat} , мин ⁻¹	K_m ДНК, нМ	K_m SAM, мкМ	Ссылка
EcoRII CCWGG	ДНК фага λ	2,52	0,22	—	[4]
EcoHK31I YGGCCR	плазмида pWM2372	3,0	2	0,58	[5]
MspI CCGG	ДНК фага λ	10,2	1,8	0,013	[6]
M1.BspACI CCGC	ДНК фага λ	0,095	53	5,1	Данная работа

одноцепочечных фрагментов ДНК. Максимальные значения количества радиоактивной метки были зафиксированы для фрагментов длиной 21 и 20 нуклеотидов, что может наблюдаться только в том случае, если M1.BspACI образует 5'-(5mC)CGC-3'.

Определение стационарных кинетических параметров реакции метилирования ДНК. Значение константы Михаэлиса, вычисленное регрессионным анализом на основе данных, полученных при измерении скорости реакции метилирования от концентрации ДНК фага λ , составило $0,053 \pm 0,007$ мкМ. Константа Михаэлиса для второго субстрата, SAM, оказалась равной $5,1 \pm 0,3$ мкМ. Значение каталитической константы составило $0,095 \pm 0,002$ мин⁻¹. Ранее в нашей лаборатории было показано, что K_m ДНК у IIS метилтрансфераз более чем на порядок выше, чем K_m ДНК у ферментов, узнающих симметричные последовательности [3]. Полученное нами значение K_m ДНК M1.BspACI согласуется с данной закономерностью (таблица). Также мы показали, что каталитическая константа M2.BspACI более чем в 25 раз ниже минимального значения этого параметра для представленных в таблице 2 C5-метилтрансфераз с палиндромными сайтами узнавания.

Таким образом, в случае как N6-, так и C5-метилтрансфераз, ферменты, узнающие палиндромные сайты узнавания, проявляют большую активность и эффективнее связываются с ДНК, чем метилтрансферазы, модифицирующие непалиндромные последовательности ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тарасова М.В. и др. Новая сайт-специфическая эндонуклеаза BspACI из *Bacillus psychrodurans* AC узнает последовательность 5'-CCGC-3'/3'-GGCG-5' // Вестн. биотехнол. и физ.-хим. биол. 2010. Т. 5. № 1. С. 16—24.
2. Sambrook J. et al. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 с.
3. Чернухин В.А. и др. Рекомбинантная ДНК-метилтрансфераза M2.BstSEI из никазно-метиلاзной системы NM.BstSEI: получение и свойства // Мол. биол. 2009. Т. 43. № 1. С. 10—18.

4. Kossykh V.G. et al. Function of Pro-185 in the ProCys of conserved motif IV in the EcoRII [cytosine-C5]-DNA methyltransferase // FEBS Lett. 1995. Vol. 370. N 1—2. P. 75—77.
5. Lee K.F. et al. Overproduction, purification and characterization of M.EcoHK31I, a bacterial methyltransferase with two polypeptides // Biochem. J. 1996. Vol. 314. N 1. P. 321—326.
6. Bhattacharya S.K. et al. Kinetic mechanism of cytosine DNA methyltransferase MspI // J. Biol.Chem. 1999. Vol. 274. N 21. P. 14743—14749.

CLONING AND ANALYSIS OF BIOCHEMICAL AND CATALYTIC PROPERTIES OF DNA METHYLTRANSFERASE M1.BspACI

M.V. Tarasova, V.V. Kuznetsov, N.A. Netesova, D.A. Gonchar, S.Kh. Degtyarev

Genes coding for the DNA methyltransferases of restriction-modification system BspACI from *Bacillus psychrodurans* AC have been cloned in *E. coli* cells. The analysis of amino acid sequences of the proteins showed that both these genes belong to C5 DNA methyltransferases. Gene *bspACIM1* has been subcloned in pJW2 vector. High-purity recombinant enzyme has been obtained with chromatography on different carriers. It has been shown that M1.BspACI modifies the first cytosine residue in the sequence 5'-CCGC-3'. Kinetic parameters have been determined. The catalytic constant appears to be $0,095 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$, $K_m \text{ ДНК фара } \lambda = 0,053 \pm 0,007 \text{ мкМ}$, $K_m \text{ SAM} = 5,1 \pm 0,3 \text{ мкМ}$.

Key words: DNA-methyltransferase, gene cloning, *Bacillus psychrodurans*, enzyme kinetics.

Сведения об авторах

Тарасова Маргарита Владимировна — Научно-производственное объединение “СибЭнзим”, г. Новосибирск; Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Новосибирский государственный университет (НГУ), Новосибирск. E-mail: tarasovamv@sibenzyme.ru

Кузнецов Виталий Викторович — ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл.

Нетесова Нина Александровна — канд. биол. наук, ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл.

Гончар Данила Александрович — канд. биол. наук, Научно-производственное объединение “СибЭнзим”, г. Новосибирск.

Дегтярев Сергей Харитонович — докт. биол. наук, проф., Научно-производственное объединение “СибЭнзим”, г. Новосибирск.