

Архивная копия публикации

Документ восстановлен из архивной версии сайта SibEnzyme.

Текст публикации сохранён полностью, однако четыре исходных рисунка отсутствовали во всех найденных архивных снимках.

В соответствующих местах документа оставлены поясняющие отметки.

Archived publication copy

This document was recovered from an archived SibEnzyme website.

The publication text is complete, but four original figures were unavailable in every archived snapshot found. Explanatory notices remain in the corresponding locations in the document.

Архивная копия публикации SibEnzyme

Источник: https://web.archive.org/web/20090107014604id_/http://sciencerussian.sibenzyme.com/article9_article_34_1.phtml

Сохранено из Wayback Machine для восстановления материалов принадлежавшего SibEnzyme сайта.

Вторая ДНК-метилтрансфераза из системы рестрикции-модификации BstF5I гомологична С-концевым доменам метилаз FokI и StsI

М. А. Абдурашитов*, Н. А. Нетесова, Л. Н. Голикова, В. В. Гуторов, П. А. Белавин, С. Х. Дегтярев
* - автор для переписки

Определена нуклеотидная последовательность гена ДНК-метилтрансферазы M.BstF5I-2, входящей в систему рестрикции-модификации штамма *Bacillus stearothermophilus* F5. На бактериальной хромосоме ген bstF5IM-2 располагается за геном метилазы M.BstF5I-1 и имеет ту же ориентацию. Кодированный геном bstF5IM-2 белок содержит консервативные участки, специфичные для адениновых ДНК-метилтрансфераз класса D₁₂. ДНК-метилаза M.BstF5I-2 гомологична С-концевым доменам ДНК-метилаз FokI и StsI, имеющим ту же последовательность узнавания. Таким образом, система рестрикции-модификации BstF5I содержит уникальный фермент M.BstF5I-1, модифицирующий верхнюю цепь узнаваемой последовательности, и M.BstF5I-2, гомологичный С-концевым частям ферментов-изошизомеров M.FokI и M.StsI, модифицирующих вторую цепь ДНК в участке узнавания.

Сайт-специфичные ДНК-метилтрансферазы (метилазы, М.) широко распространены среди прокариот. Как правило, они вместе с эндонуклеазами рестрикции образуют бактериальную систему рестрикции-модификации, защищающую клетку от внедрения чужеродной ДНК. Метилазы осуществляют перенос метильной группы от S-аденозилметионина на один из нуклеотидов узнаваемой последовательности с образованием N6-метиладенина, C5-метилцитозина или N4-метилцитозина. В соответствии с производимой модификацией ДНК-метилазы разделяются на три группы, причем внутри каждой группы, как показало сравнительное изучение, ферменты имеют целый ряд гомологичных участков, так называемых консервативных мотивов. В молекулах адениновых ДНК-метилаз выявлены 10 различных мотивов [1,2], состав и взаиморасположение которых формируют три подгруппы этих ферментов - D₁₂, D₂₁ и N₁₂ [3], заметно отличающихся друг от друга и по пространственной структуре. Большая часть адениновых ДНК-метилаз узнает палиндромные участки в ДНК. В этом случае для обеспечения защиты достаточно одной метилазы, так как ею может быть модифицирована каждая из цепей ДНК внутри участка узнавания. Системы рестрикции-модификации с непалиндромным участком узнавания содержат две ДНК-метилтрансферазы, каждая из которых модифицирует лишь одну из цепей ДНК в узнаваемой нуклеотидной последовательности. Исключениями являются система рестрикции-модификации FokI [4] и гомологичная ей система StsI [5], которые содержат по одной метилазе, однако, данные белки состоят из двух доменов [6], каждый из которых содержит полный набор консервативных мотивов типа D₁₂. Размер этих доменов (300-350 аминокислотных остатков) примерно совпадает со средним размером обычных ДНК-метилаз. С помощью генно-инженерных методов клонировали фрагменты ДНК, кодирующие каждый из доменов метилазы FokI (M.FokIN и M.FokIC). Экспрессия этих фрагментов привела к получению двух функционально активных метилаз, модифицирующих только одну из цепей ДНК в участке узнавания фермента [7]. Таким образом, ген метилазы FokI можно рассматривать как продукт слияния двух генов ДНК-метилтрансфераз [8].

Ранее нами был обнаружен штамм F5 *Bacillus stearothermophilus*, продуцирующий эндонуклеазу рестрикции BstF5I, которая узнает ту же последовательность нуклеотидов 5'-GGATG-3', что и эндонуклеазы рестрикции FokI и StsI, но расщепляет ДНК в положении 2/0, что существенно отличается от места гидролиза ДНК рестриктазами FokI (9/13) и StsI (10/14) [9]. Мы также клонировали ген ДНК-метилтрансферазы BstF5I-1 из системы рестрикции-модификации BstF5I и показали, что кодируемый этим геном фермент относится к подгруппе D₂₁ метилаз и, соответственно, не гомологичен ни одному из доменов M.FokI и M.StsI, входящих в подгруппу метилаз D₁₂ [10]. M.BstF5I-1 метилирует адениновый остаток в верхней цепи узнаваемой нуклеотидной последовательности, как и N-концевые домены M.FokI и M.StsI.

Настоящая работа посвящена клонированию гена и сравнительному анализу первичной структуры второй ДНК-метилтрансферазы (M.BstF5I-2), входящей в систему рестрикции-модификации BstF5I.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Геномную клонотеку получали с помощью частичного гидролиза ДНК *B. stearothermophilus* F5 эндонуклеазой рестрикции AluI. Рестрикционные фрагменты с использованием лигазной сшивки встраивали в плазмиду pMTL22, обработанную рестриктазой SmaI. Клетки *E. coli* RR1 трансформировали дотированными ДНК, выделяли пул плазмид и обрабатывали эндонуклеазой рестрикции BstF5I. После трансформации клеток *E. coli* RR1 продуктами гидролиза рестриктазой BstF5I получили два клона, несущих устойчивые к расщеплению данным ферментом плазмиды. Рестриктазное картирование показало, что полученные плазмиды, названные pF521, идентичны и содержат вставку размером около 1200 п.н. Нуклеотидную последовательность клонированного фрагмента ДНК определяли с помощью метода Максама-Гилберта.

Поиск гомологии и выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с применением программы FASTA и ALIGN из пакета FASTA 2.0 [11], а множественное выравнивание - с применением программы Clustal W 1.7 [12]. Для просмотра и анализа в сети Интернет пространственной структуры белка M.DpnM, содержащейся в [базе данных PDB](#), использовали ЯВА-апплет QuickPDB v.1.1 (Ilya Shindyalov, Phil Bourne).

Все генно-инженерные манипуляции проводили согласно [13].

В работе использовали препараты ДНК, ферменты и олигонуклеотиды производства ООО "СибЭнзим" (Новосибирск).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности M.BstF5I-2

Ранее мы сообщили о клонировании Ksp22I-Ksp22I-фрагмента *B. stearothermophilus* F5, содержащего ген метилазы M.BstF5I-1 [10]. Анализ первичной структуры показал, что клонированный нами AluI-AluI-фрагмент ДНК того же штамма перекрывается с геном M.BstF5I-1 на 119 п.н. Объединив известные данные, получили нуклеотидную последовательность из 3363 п.н., представляющую часть хромосомы штамма-хозяина (рис. 1). Изучение последовательности AluI-AluI-фрагмента выявило открытую рамку трансляции (ОРТ), расположенную в позиции 2197-3081. Эта ОРТ имеет хорошо выраженную сигнальную последовательность Шайна-Дальгарно (рис. 2). Защита ДНК плазмиды pF521, несущей данную ОРТ, от гидролиза R.BstF5I однозначно свидетельствует, что она кодирует сайт-специфичную ДНК-метилтрансферазу.

Как показано на рис. 1, два гена ДНК-метилаз BstF5I разделены спейсером из 204 п.н. Ген ДНК-метилтрансферазы M.BstF5I-2 (bstF5IM-2) располагается за геном, кодирующим метилазу

M.BstF5I-1, причем оба гена направлены одинаково. Интересно отметить, что между двумя генами находятся тандемный повтор (длины звеньев 33 и 34 п.н., из них 31 п.н. идентичны), инвертированный повтор (длина звена 8 п.н.), а также АТ-богатый участок из 32 п.н. (рис. 2). Пока еще не выяснено, играют ли эти структурные особенности какую-либо роль в транскрипции и трансляции генов оперона системы рестрикции-модификации BstF5I. Можно лишь предположить, что структурная комбинация "инвертированный повтор - АТ-богатая последовательность", аналогичная Rho-независимым терминаторам, но, в отличие от них, не содержащая значительного количества GC-пар в повторе, в данном случае может выполнять роль аттенюатора транскрипции.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 1. Расположение генов ДНК-метилтрансфераз системы рестрикции-модификации BstF5I на секвенированном участке бактериальной хромосомы.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 2. Структура участка, разделяющего два гена ДНК-метилтрансфераз системы рестрикции-модификации BstF5I.

Выделены старт-кодон и последовательность Шайна-Дальгарно (SD) в гене *bstF5M-2*.

Содержание идентичных нуклеотидных пар в клонированном гене *bstF5IM-2* и в последовательностях, кодирующих С-домены метилаз FokI и StsI, составляет 61.6 и 59.6% соответственно. Аминокислотная последовательность белка M.BstF5I-2 содержит все консервативные мотивы, характерные для ДНК-метилтрансфераз класса D₁₂. На рис. 3 приведены результаты выравнивания аминокислотных последовательностей M.BstF5I-2 и С-концевых областей метилаз FokI и StsI. Уровень гомологии составляет 54.0% идентичности и 79.8% сходства с M.FokIC, 49.7% идентичности и 80.7% сходства с M.StsIC. Наличие у M.BstF5I-2 ДНК-метилазной активности, а также данные о гомологии между M.BstF5I-2 и M.FokIC и M.StsIC позволяют утверждать, что M.BstF5I-2 модифицирует адениновое основание в нижней цепи участка узнавания.

Сопоставление аминокислотных последовательностей ДНК-метилаз с пространственной структурой M.DpnM

Недавно была опубликована первая пространственная структура ДНК-метилазы, относящейся к классу D₁₂ ДНК-метилтрансфераз. Этой метилазой является DpnM, узнающая последовательность 5'-GATC-3' и метилирующая адениновое основание в участке узнавания [1]. Молекула M.DpnM имеет С-образную форму, приспособленную для охвата двунитевой ДНК. Два домена M.DpnM, больший из которых содержит полость для размещения кофактора метилаз S-аденозилметионина и реакционный центр, соединены двумя α-спиральными мостиками.

На рис. 3 приведены результаты выравнивания аминокислотной последовательности метилазы M.BstF5I-2, ее изоизомеров M.FokIC и M.StsIC, а также M.DpnM. Как видно из рис. 3, размеры белков и взаимное расположение всех консервативных мотивов у M.BstF5I-2, M.FokIC, M.StsIC и M.DpnM сходны, что должно указывать на сходство их третичных структур, т.е. на аналогичное расположение структурных элементов этих ферментов в пространстве. На рис. 3 отмечены элементы вторичной структуры (α-спирали и β-слои), выявленные в M.DpnM, а также

консервативные мотивы, общие у всех метилаз этого типа. Далее в ходе сравнительного изучения всех ДНК-метилаз мы будем использовать названия структурных элементов, принятые для M.DpnM.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей M.BstF5I-2, C-концевых областей метилаз FokI и StsI и сопоставление их с первичной и вторичной структурами M.DpnM.

Сверху одиночными линиями отмечены консервативные мотивы ДНК-метилтрансфераз (нумерация по [1]), двойной линией указан участок, предположительно отвечающий за узнавание специфической нуклеотидной последовательности TRD.

Полужирным выделены аминокислотные остатки M.DpnM, взаимодействующие с кофактором и метилируемым адениновым остатком ДНК.

Аминокислотные остатки M.DpnM, пространственное расположение которых не установлено, обозначены прописными буквами.

Элементы вторичной структуры M.DpnM отмечены затененными прямоугольниками (α -спирали) и стрелками (β -слои).

Показана степень гомологии аминокислотных остатков трех первых (строка 4) и всех метилаз (строка 6).

* - Означает идентичность,

: - функциональное сходство,

о - функциональную совместимость.

Сравнение первичной структуры четырех белков показывает, что, в соответствии с литературными данными, кроме установленных ранее консервативных мотивов и участка TRD (Target Recognition Domain, мишень-узнающий домен) другие достаточно протяженные гомологичные участки, общие у всех четырех белков, отсутствуют. Более высокую степень гомологии имеют участки метилаз, которые соответствуют структурам, образующим ядро большого домена (с полостью для расположения кофактора) и окружающим реакционный центр фермента (αA , $\beta 1$, αB , $\beta 2$, $\beta 4$, αI , $\beta 5$ и $\beta 7$).

Помимо отмеченных структурных элементов, формирующих реакционный центр M.DpnM, должны существовать также элементы, обеспечивающие сайт-специфичное взаимодействие с ДНК. Одним из таких элементов является TRD, расположенный в малом домене между αF и αG , и представляющий собой петлю, выступающую из этого домена. Предполагается, что в сайт-специфичном связывании молекулы ДНК участвуют и две неструктурированные гибкие петли большого домена, обогащенные остатками серина, треонина, аргинина и лизина и расположенные между $\beta 4$ и αI и между $\beta 6$ и $\beta 7$ [1]. Представляет интерес сравнение первичных структур этих петель M.DpnM с соответствующими им участками в молекулах трех других метилаз.

Ведь если эти или какие-либо другие элементы участвуют в сайт-специфическом взаимодействии с ДНК, эти участки, видимо, должны быть гомологичны у M.BstF5I-2, M.FokIC и M.StsIC и отличаться в случае M.DpnM, так как первые три фермента-изоизомера катализируют одну и ту же реакцию - модифицируют аденин в участке 5'-CATCC-3'. В таком случае анализ аминокислотных последовательностей M.BstF5I-2, M.FokIC и M.StsIC, с одной стороны, и M.DpnM, с другой, должен выявить гомологию между такими участками у первых трех ферментов и отсутствие гомологии при сравнении с M.DpnM. Действительно, выявлена практически полная гомология аминокислотных остатков 198-208 M.BstF5I-2 (петля между $\beta 4$ и αI) изоизомеров FokI

и отсутствие гомологии у M.DpnM. В значительно меньшей степени этот феномен выражен у районов TRD и аминокислотной последовательности 276-281 (петля между $\beta 6$ и $\beta 7$). Неожиданно высокий уровень гомологии между изошизомерами FokI обнаружен и в положении 8-13 аминокислотной последовательности. Все эти участки не относятся к классическим районам консервативных доменов и, следовательно, гомология аминокислотных последовательностей и пространственное расположение этих участков могут отражать их участие в сайт-специфическом взаимодействии с ДНК.

B. stearothermophilus F5 является термофильной бактерией и, следовательно, ферменты, продуцируемые этим микроорганизмом, обладают термостабильностью, что должно найти отражение в структуре M.BstF5I-2. Из различий в аминокислотном составе можно выделить повышенное содержание остатков цистеина в метилазе M.BstF5I-2 (шесть против трех в M.FokIC и отсутствие в M.StsIC). При сопоставлении аминокислотной последовательности M.BstF5I-2 с пространственной структурой метилазы DpnM видно, что четыре из шести остатков Cys в M.BstF5I-2 (Cys-42, Cys-45, Cys-58 и Cys-190) должны лежать на сближенных участках белковой цепи, образующих полость для S-аденозилметионина. Поэтому вполне вероятно, что образование цистеиновых мостиков является одним из факторов, повышающих термостабильность метилазы BstF5I-2 по сравнению с ее гомологами.

Сравнение аминокислотных последовательностей метилаз группы DpnM, предположительно взаимодействующих с ДНК

На рис. 4 приведены первичные структуры участков метилаз группы DpnM, которые, как отмечено выше, могут принимать участие в специфическом взаимодействии с ДНК. Отдельная колонка справа показывает узнаваемую ДНК-метилазой нуклеотидную последовательность. На рис. 4 учтены данные, появившиеся в последнее время, а также исправлены неверно указанные [1,2] нуклеотидные последовательности, модифицируемые M.FokIC и M.StsIC.

Наибольший уровень гомологии выявлен в участке TRD (рис. 4а). По-видимому, этот район отвечает за взаимодействие с общим ядром узнаваемых последовательностей 5'-(G/C)AT-3'. Положительно заряженные аминокислотные остатки TRD могут взаимодействовать с фосфатными группами остова ДНК, обеспечивая связывание субстрата [1].

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 4. Аминокислотные последовательности метилаз группы DpnM подкласса D₁₂, предположительно отвечающие за взаимодействие с ДНК. Справа приведены узнаваемые ферментом нуклеотидные последовательности, модифицируемые основания в них выделены заглавным шрифтом. Полужирным выделены наиболее консервативные аминокислотные остатки. Затенены участки, соответствующие элементам вторичной структуры M.DpnM. Обозначение консервативных мотивов и степени гомологии аминокислотных остатков как на рис. 3.

На рис. 4. приведены структуры N-концевого участка ДНК-метилаз. Лежащий в начале всех метилаз-изошизомеров FokI гомологичный пептидный "хвостик" YIKSPLNY по своему составу заметно отличается у CATCC-узнающих ферментов. В опытах по субклонированию C-домена метилазы FokI показано, что более короткий вариант этого пептида, включающий аминокислотные остатки 369-647, не проявляет ферментативной активности, в то время как больший фрагмент (335-647) способен метилировать ДНК [7]. M.BstF5I-2 всего лишь на 12 аминокислотных остатков длиннее неактивного гомологичного пептида, но обладает ферментативной активностью. По-видимому, этот короткий фрагмент и, прежде всего, полностью идентичная у трех белков последовательность аминокислот YIKSP, играет существенную роль в

проявлении у белков модифицирующей ДНК активности, хотя и не входит в консервативный мотив X [1, 2]. Судя по пространственной модели, гомологичный данной последовательности участок метилазы DpnM выполняет структурную роль и не участвует в ДНК-белковом взаимодействии и каталитическом процессе. Но поскольку при взаимодействии с ДНК конформация отдельных участков белков часто существенно изменяется, мы предполагаем, что данная последовательность M.BstF5I-2, M.FokI и M.StsI все же может образовывать связи с субстратом. Возможно, что при сближении с ДНК этот элемент входит в соседнюю бороздку двойной спирали и способствует тем самым расширению узнаваемой ферментами нуклеотидной последовательности.

Интересен аминокислотный состав участков метилаз, соответствующих петлям M.DpnM, расположенным между $\beta 4$ и $\alpha 1$ и между $\beta 6$ и $\beta 7$ (рис. 4в-г). У M.DpnM не удалось определить пространственное расположение атомов аминокислотных остатков, входящих в эти петли, что свидетельствует об их высокой гибкости. Действительно, данные последовательности содержат в основном аминокислотные остатки с большим коэффициентом локальной гибкости (G, D, S, P, T, K, A). Уровень гомологии между аминокислотным составом этих участков в значительной степени коррелирует с различиями в узнаваемых последовательностях (за исключением метилазы M.T4Dam фага T4, выпадающей из ряда ферментов, узнающих 5'-GATC-3'). На наш взгляд, данные, приведенные на рис. 4в-4г, свидетельствуют о том, что именно эти участки ответственны за узнавание пар нуклеотидов, прилегающих к центральной последовательности 5'-AT-3'.

Выявленный тандем ДНК-метилаз M.BstF5I-1 и M.BstF5I-2 модифицирует обе цепи ДНК в последовательности 5'-GGATG-3' и обеспечивает, таким образом, функционирование системы рестрикции-модификации *B. stearothermophilus*. При этом ДНК-метилазы системы рестрикции-модификации BstF5I принадлежат к разным классам ДНК-метилтрансфераз: M.BstF5I-1 - к классу D₂₁, а M.BstF5I-2 - к классу D₁₂. Ранее [9] мы показали, что рестриктаза BstF5I эволюционно связана с рестриктазами из других штаммов *B. stearothermophilus*, а не с ферментами систем рестрикции-модификации FokI или StsI. Структура ДНК-метилазы BstF5I-I, не имеющей гомологии с метилазами M.FokI и M.StsI, казалось бы подтверждает положение об отсутствии эволюционной связи между этими системами рестрикции-модификации. Однако установленная в данной работе высокая степень гомологии между M.BstF5I-2 и M.FokI (M.StsI) ставит вопрос о происхождении системы рестрикции-модификации BstF5I и ее эволюционной связи с системами рестрикции-модификации FokI и StsI. В самом деле, каким образом в ходе эволюции возникли две столь разные метилазы? Является ли C-домен M.FokI предшественником M.BstF5I-2 или последний возник независимо? Дальнейшее изучение ферментативных свойств M.BstF5I-2 позволит ответить на эти вопросы.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (98-04-49514).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tran P.H., Korszun Z.R., Cerritelli S., Springhorn S.S., Lacks S.A. // Structure. 1998. V. 6. P.1563-1575.
2. Malone T., Blumenthal R.M., Cheng X. // J. Mol. Biol. 1995. V. 253. P. 618-632.
3. Klimasauskas S., Timinskas A., Menkevicius S., Butk-iene D., Butkus V., Janulaitis A. // Exp. Biol. 1990. V. 1. P. 4-12.
4. Landry D., Looney M.C., Feehery G.R., Slatko B.E., Jack W.E., Schildkraut I., Wilson G.G. // Gene. 1989. V. 77. P. 1-10.
5. Kita K., Suisha M., Kotani H., Yanase H., Kato N. // Nucleic Acids Res. 1992. V. 20. P. 4167-4172.
6. Sugisaki H., Kita K., Takanami M. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 5757-5761.
7. Leisman O., Roth M., Friedrich T., Wende W., Jeltsch A. // Eur. J. Biochem. 1997. V. 251. P. 899-906.

8. Looney M.C., Moran L.S., Jack W.E., Fehery G.R., Ben-nerJ.S., Slatko B.E., Wilson G.G. // Gene. 1989. V. 80. P. 193-208.
9. Abdurashitov M.A., Kileva E.V., Shinkarenko N.M., Shevchenko A.V., Dedkov VS., Degtyarev S.Kh. // Gene. 1996. V. 172. P. 49-51.
10. Degtyarev S.Kh., Netesova N.A., Abdurashitov M.A., Shevchenko A.V. //Gene. 1997. V. 187. P. 217-219.
11. Pearson W.R., Lipman D.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1988. V. 85. P. 2444-2448.
12. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. P. 4673-4680.
13. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1982.

pages : 1