

Архивная копия публикации SibEnzyme

Источник: https://web.archive.org/web/20090107031809id_/http://sciencerussian.sibenzyme.com/article9_article_5_1.phtml

Сохранено из Wayback Machine для восстановления материалов принадлежавшего SibEnzyme сайта.

Множественность сайт-специфических ДНК-метилтрансфераз системы рестрикции-модификации BstF5I из *Bacillus stearothermophilus* F5

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

Определена нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК *Bacillus stearothermophilus* F5, прилегающего к 3'-концу области, содержащей гены ДНК-метилтрансфераз M.BstF5I-1 и M.BstF5I-2 из системы рестрикции-модификации BstF5I. Выявлен ген, кодирующий белок M.BstF5I-3, структурно и функционально гомологичный N-концевому домену метилазы M.FokI. Таким образом, в отличие от всех известных систем рестрикции-модификации, система BstF5I включает три гена, кодирующих ДНК-метилтрансферазы, две из которых гомологичны двум различным доменам M.FokI.

Ферментные системы рестрикции-модификации широко распространены среди микроорганизмов. Для защиты бактериальной ДНК от гидролиза клеточной эндонуклеазой достаточно одной ДНК-метилтрансферазы в случае, если оба фермента образуют систему рестрикции-модификации с палиндромным сайтом узнавания. Это связано со способностью такой ДНК-метилтрансферазы метилировать обе цепи узнаваемой нуклеотидной последовательности. Системы рестрикции-модификации с непалиндромным сайтом узнавания (тип IIS) содержат две ДНК-метилтрансферазы, каждая из которых модифицирует лишь одну из цепей ДНК. Исключениями являются система рестрикции-модификации FokI [1] и гомологичная ей система StsI [2], которые содержат по одной метилазе, однако данные белки состоят из двух доменов класса D₁₂, каждый из которых обладает ДНК-метилтрансферазной активностью и модифицирует разные цепи ДНК в сайте узнавания [3]. Размер доменов (300-350 аминокислотных остатков) примерно совпадает со средним размером полипептидной цепи обычных ДНК-метилаз [4]. Таким образом, ген метилазы FokI можно рассматривать как продукт слияния двух генов ДНК-метилтрансфераз [5].

Ранее нами был обнаружен штамм *Bacillus stearothermophilus* F5, продуцирующий эндонуклеазу рестрикции BstF5I, которая узнает ту же последовательность нуклеотидов 5'-GGATG-3' что и эндонуклеаза FokI и StsI, но расщепляет ДНК в положении 2/0, что существенно отличается от положения гидролиза ДНК рестриктазами FokI (9/13) и StsI (10/14) [6].

В ходе изучения системы рестрикции-модификации BstF5I клонирован ген одной из ДНК-метилтрансфераз *B. stearothermophilus* F5 [7] и показано, что данный фермент (M.BstF5I-1) метилирует адениновое основание в верхней цепи узнаваемого сайта и относится к классу D₂₁. Анализ первичной структуры M.BstF5I-1 не выявил значительного сходства с метилазами FokI и StsI.

Клонирован также ген второй ДНК-метилтрансферазы системы рестрикции-модификации BstF5I, определена его первичная структура и показано, что на бактериальной хромосоме ген bstF5IM-2 расположен сразу за геном метилазы M.BstF5I-1 [8]. Кодированный геном bstF5IM-2 белок содержит консервативные участки, специфичные для ДНК-метилтрансфераз класса D₁₂. Выявленная ДНК-метилаза гомологична также С — концевому домену ДНК-метилазы FokI, имеющей ту же узнаваемую последовательность. Таким образом, показано, что система рестрикции-

модификации BstF5I содержит уникальный фермент M.BstF5I-1, модифицирующий верхнюю цепь узнаваемого сайта, и M.BstF5I-2, гомологичный C — концевой части изоизомера M.FokI, модифицирующий нижнюю цепь в узнаваемой нуклеотидной последовательности [8].

В настоящей работе в системе рестрикции-модификации BstF5I обнаружена третья ДНК-метилтрансфераза M.BstF5I-3, которая также модифицирует адениновое основание в последовательности 5'-GGATG-3'. Проведено сравнительное изучение первичной структуры M.BstF5I-3.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали штамм *E. coli* RRI ("New England Biolabs", США), эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигазу T4, щелочную фосфатазу из кишечника телят производства "СибЭнзим" (Новосибирск), [³H]S-аденозилметионин фирмы "Amersham". Генно-инженерные манипуляции проводили по общепринятым методикам [9]. Геномную ДНК *B. stearothermophilus* F5 выделяли из легкоплавкой агарозы методом блок-вставок [10]. Первичную структуру ДНК определяли по методу Максама-Гилберта [11]. Выравнивание аминокислотных последовательностей выполняли с использованием программы "ALIGN" из пакета "FASTA 2.0" [12], а выбор праймеров для ПЦР - при помощи программы "OLIGO" [13].

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 1. Расположение генов системы рестрикции-модификации BstF5-1 на клонированной части генома *B. stearothermophilus* F5 (а) и выравнивание аминокислотных последовательностей M.BstF5I-3 и N-концевого домена M.FokI (б).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование, экспрессия гена, выделение и анализ белка

Геномную клонотексту получали с использованием частичного перевара ДНК *B. stearothermophilus* F5 рестриктазой BstX2I (изоизомер XhoI). Фрагменты геномной ДНК клонировали в плазмидном векторе pMTL22 [14] по сайту рестрикции BamHI. Клетки *E. coli* RRI трансформировали лигированными ДНК, выделяли суммарный пул плазмид и обрабатывали их рестриктазой BstF5I. После проведения повторной трансформации получили 120 клонов. Проанализировали 48 из них и показали, что восемь выделенных плазмидных ДНК устойчивы к действию рестриктазы BstF5I и содержат вставку 2.2 т.п.н. Плазмида названа pF5-32.

Анализ первичной структуры показал, что фрагмент BstX2I-BstX2I на 822 п.н. перекрывается с клонированным ранее AluI-AluI-фрагментом той же ДНК, содержащим ген метилазы M.BstF5I-2 [8] (рис. 1а). Фрагмент BstX2I-BstX2I содержит открытую рамку трансляции (ОРТ) длиной 1038 п.н. и каноническую последовательность Шайна-Дальгарно (AGGAG), расположенную за 10 п.н. до стартового кодона этой ОРТ.

Защита ДНК плазмиды pF5-32 от гидролиза P.BstF5I свидетельствует, что данная ОРТ, названная нами геном bstF5IM-3, кодирует сайт-специфичную ДНК-метилтрансферазу.

Ген bstF5IM-3 получен с использованием ПЦР (в качестве матрицы использовали геномную ДНК

B. stearothermophilus F5 и праймеры 5'-CCCCATATGAGATATATCGGCAGCAA и 5'-CCCGGATCCTTCTTCTTCAATTAGAAAATTT) и клонирован в экспрессионный вектор pJW [15] по сайтам рестрикции BamHI и NdeI. После термоиндукции синтеза рекомбинантного белка получали лизаты трансформированных клеток *E. coli*, которые анализировали методом диск-электрофореза. Показано, что помимо клеточных белков в *E. coli* синтезируется рекомбинантный белок с ожидаемой молекулярной массой (41.1 кДа), который был очищен до гомогенного состояния с помощью хроматографии на гепарин-сефарозе, гидроксипатите и фосфоцеллюлозе P-11.

Анализ аминокислотной последовательности, кодируемой данной ОРТ (bstF5IM-3), выявил наличие всех консервативных мотивов, характерных для ДНК-метилтрансфераз класса D12. Выравнивание аминокислотных последовательностей показало высокую степень сходства (81.1% гомологии и 57.6% идентичности) M.BstF5I-3 и N-концевого домена ДНК-метилтрансферазы FokI (рис. 16). Известно, что этот домен отвечает за модификацию аденинового основания в верхней цепи сайта узнавания 5'-GGATG-3' [3]. Таким образом, M.BstF5I-3 является, вероятно, функциональным аналогом описанной ранее ДНК-метилтрансферазы M.BstF5I-I [7].

19 н.	16 н.
5'-CAAGGATGCATATGACCAG↓GTCCAGCTAGCGGGTA-3'	
3'-GTTCTCTACGTATACTGGTCCAG↑GTCGATCGCCCAT-5'	
22 н.	13 н.

С целью проверки этого предположения проводили метилирование двухцепочечного олигонуклеотида, содержащего сайт узнавания рестриктазы BstF5I. Использовали синтетический 35-членный олигонуклеотидный дуплекс и S-аденозилметионин с меченной ³H метильной группой (таблица) [7]. На приведенной выше схеме олигонуклеотида жирным шрифтом выделен сайт узнавания рестриктазы Bme18I (G↑GWCC), стрелками показаны места гидролиза дуплекса данным ферментом, сверху и снизу указаны длины рестриктазных фрагментов. Подчеркнут сайт узнавания M.BstF5I-3.

Реакцию метилирования 35-членного олигонуклеотида проводили в течение 2 ч при 50°C. Концентрации M.BstF5I-3, 35-членного олигонуклеотида и [³H]S-аденозилметионина составляли 0.5, 2.0 и 3.3 мкМ соответственно. Метилированный продукт реакции обрабатывали рестриктазой Bme18I (изошизомер Avail). Полученные четыре фрагмента разделяли электрофоретически в 20%-ном денатурирующем полиакриламидном геле.

Из данных, приведенных в таблице, видно, что метка включается только в верхнюю цепь ДНК. Таким образом, M.BstF5I-3, согласно ожиданиям, модифицирует цепь ДНК, содержащую последовательность 5'-GGATG-3', т.е. данный фермент является не только структурным, но и функциональным аналогом N-концевого домена метилазы M.FokI.

Ранее мы клонировали ген bstF5IM-1 и показали, что M.BstF5I-1 также метилирует адениновое основание в верхней цепи сайта узнавания [7].

Согласно полученным данным, в систему рестрикции-модификации BstF5I входят две функционально активные ДНК-метилтрансферазы M.BstF5I-1 и M.BstF5I-3, модифицирующие адениновое основание в одной и той же последовательности 5'-GGATG-3' При этом M.BstF5I-1 и M.BstF5I-3 не являются гомологичными белками, более того, они относятся к разным классам ДНК-метилтрансфераз (D₂₁ и D₁₂ соответственно). Нами клонирован также ген еще одной ДНК-метилтрансферазы системы рестрикции-модификации BstF5I - M.BstF5I-2 [8] и показано, что M.BstF5I-2 высокоомологична C-концевому домену ДНК-метилазы FokI, ответственному за

модификацию нижней цепи сайта узнавания. На рис. 1а показано относительное расположение трех генов ДНК-метилтрансфераз BstF5I в геноме *B. stearotherophilus* F5.

С целью исключения возможности рекомбинации хромосомной ДНК при получении геномных клонотек проводили контрольную ПЦР с использованием геномной ДНК *B. stearotherophilus* F5 в качестве матрицы и праймеров 5'-CCCAAAGC-CTGTAAAGCT, идентичного центральному участку гена *bstF5IM-1*, и 5'-ATCGCCTTCAAGTTCCC-TA, комплементарного центральному участку гена *bstF5IM-3*. Получили ПЦР-фрагмент длиной около 1950 п.н., что близко к расчетной величине 1941 п.н. Правильность расположения генов *bstF5IM-1*, *bstF5IM-2*, *bstF5IM-3* (рис. 1а) подтверждена рестриктазным анализом полученного фрагмента.

Длина фрагмента, н.	Количество включенного ^3H , имп./мин
11	210
19	2590
16	91
13	63

	Результаты определения цепи ДНК, метилируемой ДНК-метилтрансферазой M.BstF5I-3	
--	--	--

Анализ структуры фрагмента ДНК, содержащего все три гена метилаз, показал, что перед геном *bstF5IM-1* имеется промоторный участок [7] и сигнальные последовательности Шайна-Дальгарно предшествуют всем генам. Данный фрагмент не содержит терминаторов транскрипции. Таким образом, все клонированные гены входят, видимо, в один оперон и транскрибируются в составе единой мРНК, а присутствие последовательностей Шайна-Дальгарно приводит к эффективной трансляции генов всех белков *in vivo*.

Об этом свидетельствует и способность каждого из трех генов ДНК-метилтрансфераз, клонированных по отдельности, полностью защитить ДНК несущей его плазмиды от расщепления эндонуклеазой рестрикции BstF5I, хотя в каждом случае метилируется только одна цепь ДНК в составе сайта узнавания. Таким образом, система рестрикции-модификации BstF5I содержит по крайней мере три функционально активные сайт-специфичные ДНК-метилазы, модифицирующие адениновое основание в верхней или нижней цепи узнаваемой последовательности 5'-GGATG-3'.

Предварительный анализ неполной ОПТ

Очень интересным и неожиданным является тот факт, что в клонированном BstX2I-BstX2I-фрагменте сразу же за геном третьей ДНК-метилтрансферазы расположена неполная ОПТ (ОПТ4, рис. 1а), которая кодирует участок, гомологичный ДНК-метилазам. Этот участок (аминокислотные остатки 145-212) содержит метилазные консервативные мотивы X, I и II и по своему аминокислотному составу наиболее близок к С-концевым частям ДНК-метилаз класса D₂₁ (рис. 2). В то же время начало данной ОПТ (аминокислотные остатки 1-144) не имеет значительного сходства ни с одним из известных белков.

Вероятно, транскрируемый с ОПТ4 белок является химерным, т.е. его ген образовался в результате слияния неизвестного гена с концом гена метилазы класса D₂₁. Более точное

установление функции этого белка станет возможным после клонирования и секвенирования полной OPT4.

Возможные причины возникновения множественности

Изучаемая система отличается от всех клонированных ранее систем рестрикции-модификации, которые содержат не более двух генов ДНК-метилаз. Две из трех метилаз системы рестрикции-модификации BstF5I (M.BstF5I-2 и M.BstF5I-3) высокоомологичны различным доменам метилазы FokI, но порядок их расположения противоположен порядку расположения соответствующих доменов в M.FokI. По-видимому, фрагмент ДНК, кодирующий данные ферменты, был захвачен и вставлен в геном *B. stearothermophilus* F5 из ДНК другого микроорганизма. В пользу такого рекомбинационного события свидетельствуют две особенности организации генов на клонированном участке ДНК: наличие спейсера с протяженным тандемным повтором между генами bstF5IM-1 и bstF5IM-2 [8] и присутствие химерного гена (OPT4) за геном bstF5IM-3. Таким образом, оперон системы-предшественника включал в себя два гена метилаз класса D21, первый из которых сохранился в виде гена bstF5IM-1, в то время как начало второго гена было deletировано, а его конец слился с частью неизвестного гена, расположенного на встроенном фрагменте, и образовал OPT4.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 2. Сравнение С-концевых аминокислотных последовательностей ДНК-метилтрансфераз класса D21 с гомологичной областью, кодируемой OPT4 (аминокислотные остатки 133-212). Сверху одиночными линиями отмечены консервативные мотивы (СМ) ДНК-метилтрансфераз. Наиболее консервативные аминокислотные остатки выделены полужирным шрифтом. Нижняя строка показывает степень гомологии аминокислотных остатков. * - Идентичность, : - функциональное сходство, • - функциональная совместимость.

Причины, по которым в опероне сохранились гены двух ферментов, метилирующих одну и ту же цепь ДНК в участке узнавания (M.BstF5I-1 и M.BstF5I-3), пока еще не ясны. Возможно, акт рекомбинации произошел относительно недавно и эволюционный процесс не успел элиминировать избыточный ген. Причиной сохранения обоих ферментов может быть также необычно высокое содержание рестриктазы BstF5I в штамме-продуcente. Уровень активности P.BstF5I в клетках *B. stearothermophilus* F5 приблизительно на два порядка превышает уровень активности P.FokI в клетках *Flavibacterium okeanoikoites* (< 100 000 и > 1000 ед.акт./г биомассы соответственно). Если в силу своих биохимических свойств каждая из метилаз по отдельности не способна обеспечить полную защиту модифицируемой ими цепи ДНК от гидролиза высокоактивной рестриктазой, то сохранение обоих генов было необходимо. Не исключено также, что M.BstF5I-1 или M.BstF5I-3 помимо метилирования участвуют и в каких-то других клеточных процессах.

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что система рестрикции-модификации BstF5I является уникальной среди известных систем рестрикции-модификации.

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

СОКРАЩЕНИЯ

Р. - эндонуклеаза рестрикции

М. - ДНК-метилтрансфераза при названии фермента соответственно

ОРТ - открытая рамка трансляции

ПЦР - полимеразная цепная реакция

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Landry D. //Gene, 1989, V. 77, P. 1-10.
2. Kita K., Suisha M., Kotani H., Yanase H., Kato N. // Nucleic Acids Res., 1992, V. 20, P. 4167-4172.
3. Sugisaki H. // J. Biol. Chem., 1989, V. 264, P. 5757-5761.
4. Leisman O. // Eur. J. Biochem., 1997, V. 251, P. 899-906.
5. Looney M.C., Moran L.S., Jack W.E., Feehery G.R., Benner J.S., Slatko B.E., Wilson G.G. // Gene, 1989, V. 80, P. 193-208.
6. Abdurashitov M.A., Kileva E.V., Shinkarenko N.M., Shevchenko A.V., Dedkov V.S., Degtyarev S.Kh. // Gene, 1996, V. 172, P. 49-51.
7. Degtyarev S.Kh., Netesova N.A., Abdurashitov M.A., Shevchenko A.V. // Gene, 1997, V. 187, P. 217-219.
8. Абдурашитов М.А., Нетесова Н.А., Голикова Л.Н., Гуторов В.В., Белавин П.А., Дегтярев С.Х. // Молекуляр. биология, 2000, Т. 33, С. 1-8.
9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
10. Дейвис К. Анализ генома. М.: Мир, 1990.
11. Maxam J.M., Gilbert W.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987, V. 74, P. 7191-7203.
12. Pearson W.R., Lipman D.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988, V. 85, P. 2444-2448.
13. Rychlik W., Rhoads R.E. // Nucleic Acids Res., 1989, V. 17, P. 8543.
14. Chamberts S.P., Prior S.E., Barstow D.A., Minton N.P. // Gene, 1988, V. 68, P. 139-149.
15. Kossykh V.G., Schlagman S.L., Hattman S. // J. Biol. Chem., 1995, V. 270, P. 14389-14393.