

Архивная копия публикации SibEnzyme

Источник: https://web.archive.org/web/20090107044844id_/http://sciencerussian.sibenzyme.com/article9_article_45_1.phtml

Сохранено из Wayback Machine для восстановления материалов принадлежавшего SibEnzyme сайта.

Сравнительный анализ гомологичных систем рестрикции-модификации SfeI и LlaBI

С. С. Охапкина*, Н. А. Нетесова, Л. Н. Голикова, Е. В. Серегина, С. В. Сосновцев, М. А. Абдурашитов, С. Х. Дегтярев
* - автор для переписки

Клонирован фрагмент плазмидной ДНК *Streptococcus faecalis* SE72, содержащий гены системы рестрикции-модификации SfeI. Анализ нуклеотидной последовательности фрагмента выявил высокую гомологию между оперонами систем SfeI и LlaBI из *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* W56 (99.2%) с тем же участком узнавания 5'-CTRYAG-3'. Существенными отличиями системы SfeI от LlaBI являются дополнительный фрагмент длиной 198 п.н. в гене ДНК-метилтрансферазы и большая длина гена предполагаемого контрольного белка. Отсутствие гомологии между нуклеотидными последовательностями, прилегающими к оперонам двух систем, свидетельствует о горизонтальном переносе оперонов между двумя близкими родами бактерий.

Системы рестрикции-модификации (PM) широко распространены у прокариотических организмов. Основными компонентами этих систем являются ДНК-метилтрансферазы (метилазы, М.) и эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы, R.), узнающие одинаковые нуклеотидные последовательности длиной 4-8 п.н. (участки узнавания). Роль ДНК-метилазы заключается в модификации одного из адениновых или цитозиновых остатков в участке узнавания, что предотвращает расщепление ДНК хозяйской клетки эндонуклеазой рестрикции той же системы [1, 2]. В ряде случаев в систему PM входит также контрольный белок (С-белок), служащий активатором транскрипции гена эндонуклеазы. Ген С-белка обычно располагается перед геном рестриктазы и имеет такое же направление транскрипции [3,4]. Некоторые опероны систем PM находятся не на хромосомах, а на плаزمидах [5,6].

Ранее мы идентифицировали рестриктазу SfeI грамположительной аэробной бактерии *Streptococcus faecalis* SE72, установили ее участок узнавания и позиции расщепления ДНК (5'-C↓TRY-AG-3') [7]. В дальнейшем были обнаружены восемь изоизомеров этого фермента [8], причем оперон одной из систем PM был клонирован (LlaBI, GenBank accession no. X97263 [9]). Гены системы LlaBI локализованы на плазмиде pJW563 из близкородственного стрептококка вида *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* W56.

Настоящая работа посвящена клонированию генов и определению первичной структуры белков системы PM SfeI, а также сравнительному анализу систем SfeI и LlaBI.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигазу фага Т4, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *Escherichia coli*, dATP, dTTP, dGTP, dCTP производства ООО "СибЭнзим" (Новосибирск). Генно-инженерные манипуляции проводили согласно [10]. Плазмидную ДНК *S. faecalis* SE72 выделяли с помощью щелочного метода [10]. ДНК секвенировали по методу Сэнгера на приборе ABI 310 [11]. Аминокислотные последовательности выравнивали с

использованием программы "ALIGN" из пакета "FASTA 2.0" [12], праймеры для полимеразной цепной реакции (ПЦР) выбирали с помощью программы "OLIGO" [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование гена *sfelM* и анализ нуклеотидных последовательностей

Плазмидную ДНК *S. faecalis* SE72 гидролизovali рестриктазами BamHI, BclI, BglII. Липкие концы частично достраивали с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* в присутствии dATP и dGTP. Полученные фрагменты клонировали в плазмидном векторе pUC19 по участку рестрикции Sall, частично достроенному фрагментом Кленова в присутствии dTTP и dCTP [14]. Клетки *E. coli* RRI трансформировали лигированными ДНК, выделяли плазмиды и обрабатывали их рестриктазой SfeI. После повторной трансформации клеток получили три клона. Плазмидные ДНК всех этих клонов обладали устойчивостью к действию рестриктазы SfeI и содержали вставку длиной 6.1 т.п.н. Плазмида названа pMSfeI-1. Из плазмиды удалили фрагмент HindIII длиной 3.4 т.п.н. и получили плазмиду pMSfeI-2 размером 5.4 т.п.н. Эта плазмида также устойчива к действию SfeI и содержит вставку длиной 2.7 т.п.н.

После секвенирования pMSfeI-2 и анализа аминокислотных последовательностей, соответствующих обнаруженным открытым рамкам трансляции (ОПТ), оказалось, что вставка содержит гены *sfelM*, *sfelC* и начало гена *sfelR*, потенциально кодирующего рестриктазу SfeI.

Полную нуклеотидную последовательность ОПТ3 удалось определить с помощью метода селективной супрессии ПЦР [15]. Плазмидную ДНК *S. faecalis* SE72 гидролизovali рестриктазой SspI и лигировали со специфическим псевдодвухцепочечным адаптором (супрессионным адаптером). Лигазную смесь амплифицировали с праймером, соответствующим внешней части адаптора, и праймером, сконструированным на основе уже известной последовательности гена *sfelR*. В результате всех манипуляций получили ПЦР продукт длиной 900 п.н. Полученный фрагмент и вставку плазмиды pMSfeI-2 секвенировали на приборе ABI-310[11].

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 1. Гомологичные участки во фрагментах ДНК *S. faecalis* SE72, *L. lactis* W56 и *E. faecalis* V583.

Стрелками обозначены выявленные ОПТ.

Всего нами определена последовательность нуклеотидов фрагмента плазмидной ДНК *S. faecalis* SE72 длиной 3584 п.н., содержащего полный оперон системы PM SfeI (Gen Bank accession no. AY151403). Расположение генов в этом фрагменте соответствует их расположению в опероне системы PM LlaBI (рис. 1).

Сравнение нуклеотидных последовательностей клонированных фрагментов плазмидных ДНК из *S. faecalis* SE72 и *L. lactis* subsp. *cremoris* W56 выявило высокий уровень гомологии на участке длиной 3047 п.н. Существенным отличием оперона системы PM SfeI от оперона PM LlaBI является присутствие в нем дополнительного фрагмента длиной 198 п.н. Без учета этого фрагмента плазмидные ДНК двух бактерий на гомологичных участках отличаются лишь 25 п.н. (99.2% идентичности). Область гомологии включает гены ДНК-метилтрансфераз с участком из 153 п.н., прилегающим к их концу, гены предполагаемых С-белков и гены эндонуклеаз рестрикции (за исключением коротких концевых участков). Между генами С-белков и ДНК-метиляз в обеих цепях ДНК находятся участки начала транскрипции, содержащие потенциальные промоторы генов двух систем. После генов ДНК-метиляз расположены инвертированные повторы с длиной

звена 20 п.н., выполняющие, очевидно, роль терминаторов транскрипции.

Анализ различающихся участков фрагментов выявил также неполную OPT на 5'-конце ДНК *S. faecalis* SE72. Белковый продукт этой OPT обладает высоким уровнем гомологии с белками MobC грамположительных кокков, компонентами систем конъюгативного переноса плазмид. Участок, предшествующий данному гену, содержит инвертированные повторы с длинами звеньев 7 и 14 п.н. и является, по-видимому, областью начала переноса плазмиды (oriT) [16]. Таким образом, плазида с системой PM SfeI содержит предполагаемый ген белка MobC и, вероятно, является конъюгативной, т.е. может легко передаваться от штамма к штамму посредством конъюгативного переноса, широко распространенного у *Streptococcus* и родственных родов [17-19].

Нами также выявлен высокий уровень гомологии между 3'-концевой частью фрагмента ДНК *L. lactis* W56 и участком ДНК *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* V583 (Contig 1056 от 26.04.2001, предварительные данные получены из сайта Института геномных исследований <http://www.tigr.org>). Этот участок включает последние 40 п.н. гена эндонуклеазы рестрикции, IlaBIR, и прилегающие к нему 298 п.н. Интересно, что у *E. faecalis* V583 данная последовательность кодирует белок с явно выраженным сходством с транспозазами. В то же время у *L. lactis* W56 этот ген, очевидно, является дефектным, поскольку он короче, чем его гомологи, и содержит сдвиги рамки считывания.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 2. Сравнение нуклеотидных последовательностей, кодирующих ДНК-метилтрансферазы M.SfeI и M.LlaBI (двойными линиями подчеркнуты участки, узнаваемые эндонуклеазой рестрикции ClaI) (а) и сравнение аминокислотных последовательностей ДНК-метилтрансфераз класса N₁₂ с гомологичной областью, кодируемой sfelM.

Одиночными линиями подчеркнуты консервативные мотивы (CM) ДНК-метилтрансфераз.

Наиболее консервативные аминокислотные остатки выделены жирным.

Сравнение генов ДНК-метилтрансфераз

Анализ аминокислотной последовательности, кодируемой sfelM, выявил в ней все консервативные участки, характерные для ДНК-метилтрансфераз класса γ по классификации Уилсона [20] или N₁₂ по классификации [21]. Наиболее существенным отличием двух нуклеотидных последовательностей является дополнительный фрагмент длиной 198 п.н. в гене sfelM (рис. 2а). Данный фрагмент разделяет участки, кодирующие консервативные мотивы I и IV ДНК-метилтрансфераз [22]. Выравнивание аминокислотных последовательностей наиболее сходных метилаз класса N₁₂ показывает, что у всех представителей данного класса, за исключением M. LlaBI, между этими мотивами расположен участок длиной 30-70 аминокислотных остатков, содержащий консервативные мотивы II и III (рис. 2б). По всей видимости, соответствующий фрагмент гена IlaBIM был утрачен при встраивании кассеты генов устойчивости к хлорамфениколу по ClaI-сайту в плазмиду pJW563 [9], хотя по данным авторов в штамме-реципиенте, трансформированном полученной плазмидой pJWC1, сохранена метилазная активность. На возможную потерю фрагмента ДНК указывает и присутствие на концах избыточного фрагмента гена sfelM ClaI-сайтов 5' -ATCGAT-3' (рис. 2а). В остальной части генов двух метилаз длиной 1740 п.н. обнаружены только 9 различий, которые приводят к замене пяти аминокислотных остатков в соответствующих белках.

Контрольный белок системы PM SfeI и OPT X системы LlaBI

Существует предположение, что короткая OPT, лежащая между генами метилазы и эндонуклеазы

рестрикции системы PM LlaBI (названа OPT X [9]) кодирует регуляторный белок. Ген из системы PM SfeI, соответствующий данной OPT (рис. 1), имеет большую длину (225 п.н. в *sfeIC* против 93 п.н. в OPT X). Это различие вызвано делецией в OPT X 1 п.н. в положении 86 от инициаторного кодона по сравнению с геном *sfeIC*. Множественное выравнивание известных аминокислотных последовательностей функционально активных С-белков систем PM показывает, что они по своей длине сходны с С.SfeI (рис. 3). Поэтому делеция 1 п.н. в OPT X системы PM LlaBI привела, вероятно, к потере функции регуляторного белка. С другой стороны, вполне возможно, что при определении нуклеотидной последовательности оперона PM LlaBI допущена ошибка.

Гены эндонуклеаз рестрикции

Сравниваемые гены существенно различаются лишь 3'-концевыми участками, кодирующими последние семь аминокислотных остатков у R.SfeI и 13 - у R.LlaBI. В остальных 858 п.н. найдены лишь 10 отличий, которые приводит к замене пяти аминокислотных остатков в белках.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей С-белков различных систем PM и C. SfeI.

Наиболее консервативные аминокислотные остатки выделены жирным.

Свидетельства горизонтального переноса генов систем PM у грамположительных кокков

Нуклеотидные последовательности, окружающие зону высокой гомологии двух сравниваемых фрагментов, совершенно различны, поэтому с большой долей уверенности можно утверждать, что сходство двух систем PM бактерий двух родов объясняется горизонтальным переносом генетического материала, произошедшим относительно недавно по эволюционным меркам. Об этом свидетельствует и то, что в обоих случаях содержание GC-пар в оперонах систем PM значительно отличается от GC-состава окружающих областей (таблица).

Вид	Весь геном [23]	Участок, прилегающий к гену метилазы	Оперон системы PM	Различающиеся 3'-концевые участки
<i>Streptococcus faecalis</i>	34-38	47 (~150 п.н.)	27 (-3000 п.н.)	19 (98 п.н.)
<i>Lactococcus lactis</i>	39			40 (384 п.н.)

Таблица. Содержание CG-пар (%) во фрагментах плазмидных ДНК, несущих системы PM

Примечание. В скобках указаны длины нуклеотидных участков.

Так как GC-состав оперонов систем SfeI и LlaBI не соответствует видовым и родовым характеристикам *S. faecalis* и *L. lactis*, можно предположить, что общая для них система-предшественник возникла не в этих видах, а в какой-то другой бактерии, после чего была перенесена и распространилась среди грамположительных кокков. Видимо, в дальнейшем акты переноса происходили неоднократно среди микроорганизмов с различным GC-содержанием (и, следовательно, относящимся к совершенно неродственным группам), при этом иногда наблюдался захват соседних с оперонами участков ДНК. Это могло бы объяснить присутствие в клонированных фрагментах областей, содержащих 47 и 19% GC-пар.

Поскольку фрагмент ДНК, прилегающий к 3'-концу оперона *llaBI*, обладает высокой гомологией с ДНК из *E. faecalis* V583 и является, видимо, дефектным геном транспозазы, можно с большей вероятностью предположить, что система PM была перенесена из плазмиды *S. faecalis* SE72 в плазмиду из *L. lactis* W56. Это согласуется и с тем, что система PM Sfel [7] открыта на 8 лет раньше, чем *llaBI* [9].

Таким образом, результаты сравнительного изучения гомологичных систем PM двух штаммов близкородственных родов бактерий служат еще одним подтверждением того, что горизонтальный перенос генов не является исключительным явлением у прокариотических организмов.

Секвенирование генома *E. faecalis* V583 проведено при поддержке Национального института аллергии и инфекционных болезней (NIAID, США).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wilson G., Murray N. // Annu. Rev. Genet. 1991. V. 25. P. 585-627.
2. Heitman J. // Genetic Engineering / Ed. Setlow J.K. N.Y.: Plenum Press, 1993. V. 15. P. 57-108.
3. Tao T., Bourne J.C., Blumenthal R.M. // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 1367-1375.
4. Vijesurier R.M., Carlock L., Blumenthal R.M., Dunbar J.C. // Bacteriol. 2000. V. 182. P. 477-487.
5. Chopin A., Chopin M.-C., Moillo-Batt A., Langella P. // Plasmid. 1984. V. 11. P. 260-263.
6. Calvin-Koons M.D., Blumenthal R.M. // Gene. 1995. V. 157. P. 73-79.
7. Дегтярев С.Х., Приходько Г.Г., Речкунова И.И. // Биоорган, химия. 1988. Т. 14. С. 848-849.
8. Roberts R.J., Macelis D. // Nucleic Acids Res. 2001. V. 29. P. 268-269.
9. Nyengaard N.R., Falkenberg-Klok J., Josephsen J. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 3494-3498.
10. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
11. Сайки Р., Гиленстен У., Эрлих Г. // Анализ генома. Методы / Под ред. Дейвиса К. М.: Мир, 1990. С. 184-190.
12. Maxam J.M., Gilbert W.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 74. P. 7191-7203.
13. Pearson W.R., Lipman D.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 2444-2448.
14. Zabarovsky E.R., Allikmets R.L. // Gene. 1986. V. 42. P. 119.
15. Siebert P.D., Chenchik A., Kellogg D.E., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. // Nucleic Acids Res. 1995. V. 23. P. 1087-1088.
16. Lanka E., Wilkins B.M. // Annu. Rev. Biochem. 1995. V. 64. P. 141-169.
17. Wang A., Macrina F.L. // J. Bacteriol. 1995. V. 177. P. 4199-4206.
18. Mills D.A., Phister T.G., Dunny G.M., McKay L.L. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. P. 1541-1544.
19. Berg T., Firth N., Apisiridej S., Hettiaratchi A.A., Lee-laporn A., Skurray R.A. // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 4350-4359.
20. Wilson G.G. // Methods Enzymol. 1992. V. 216. P. 259-279.
21. Timinskas A., Butkus V., Janulaitis A. // Gene. 1995. V. 157. P. 3-11.
22. Malone T., Blumenthal R.M., Cheng X. // J. Mol. Biol. 1995. V. 253. P. 618-632.
23. Bergey's manual of systematic bacteriology. // Ed. Holt J.G. Baltimore: Williams and Wilkins Press, 1986. V. 2. P. 1043-1066.