



УДК 577.323

## ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ ДНК-(АДЕНИН- $N^6$ )-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ ФАГА T4 И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФЕРМЕНТА

© 2000 г. Л. Г. Овечкина, В. В. Зиновьев, Ю. А. Горбунов, Э. Г. Малыгин<sup>#</sup>*Институт молекулярной биологии Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии  
"Вектор", 630559, Кольцово, Новосибирская обл.*

Поступило в редакцию 05.06.2000 г. Принято к печати 22.08.2000 г.

С помощью химической сшивки белковых субъединиц и измерений предстационарной кинетики реакций изучены структурные и каталитические свойства ДНК-(аденин- $N^6$ )-метилтрансферазы фага T4 (КФ 2.1.1.72) при различных соотношениях концентраций фермента и субстратов. Разные структурные состояния метилтрансферазы сопоставлены с ее каталитической активностью и показано, что олигомерные формы фермента каталитически активны, но характеризуются другими параметрами реакции по сравнению с мономером.

*Ключевые слова:* ДНК-метилтрансфераза; один оборот метилирования; сшивка белковых субъединиц.

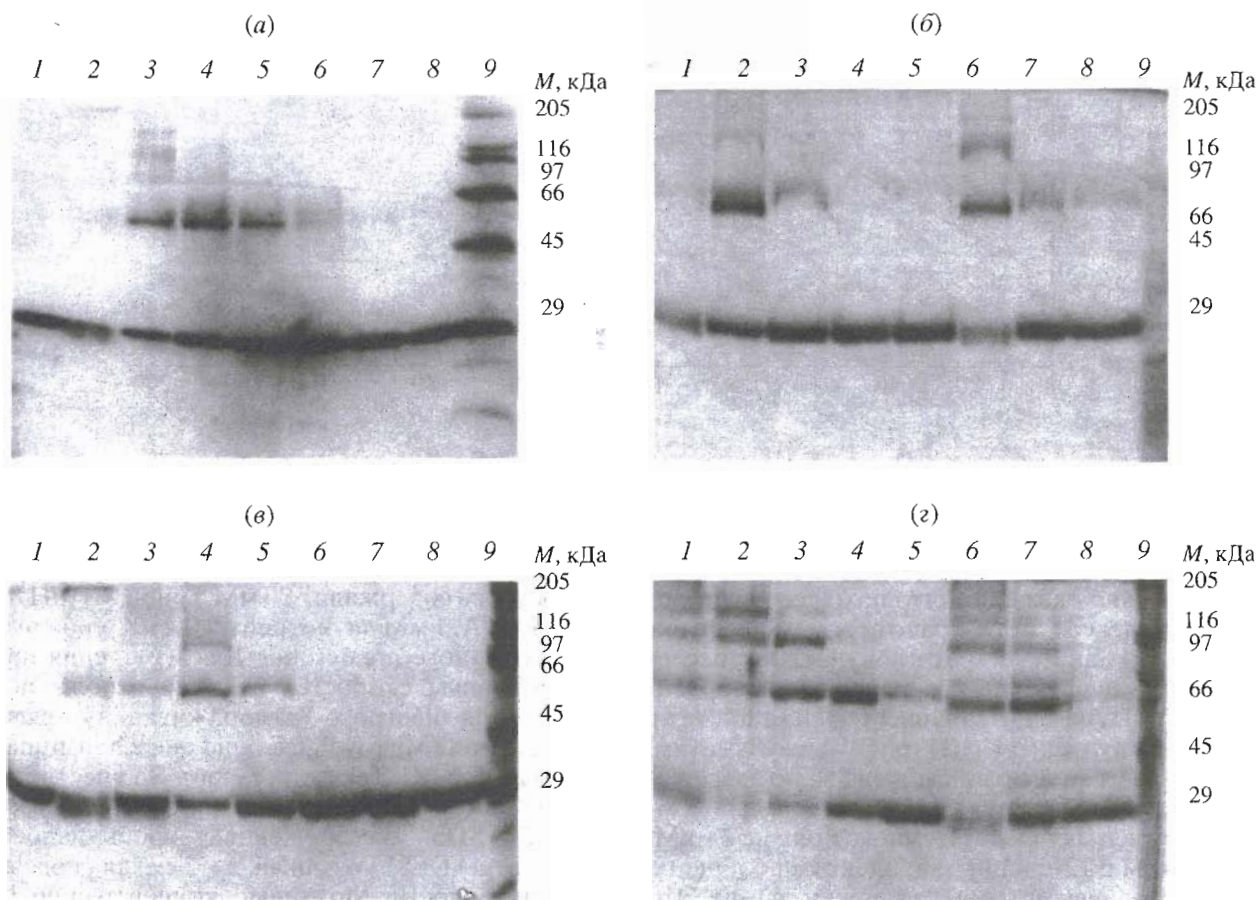
Большинство ДНК-метилтрансфераз типа II узнает короткие палиндромные последовательности и катализирует перенос метильной группы от донора *S*-аденозил-*L*-метионина в положение  $N^6$  аденина либо  $C^5$  или  $N^4$  цитидиновых остатков, содержащихся в специфическом сайте [1]. Выяснение механизма действия этих ферментов остается важной задачей в области биологического метилирования ДНК. Предполагается, что метилтрансферазы действуют в виде мономеров, поскольку почти все ДНК-метилтрансферазы типа II, очищенные до гомогенного состояния, состоят из одной полипептидной цепи с мол. массой 30–50 кДа, причем в растворе мономер является их стабильной формой [2]. В клетках типичным субстратом метилтрансфераз служит асимметричная полуметилированная ДНК, возникающая в ходе репликации, так что для достижения полностью метилированного состояния сайта узнавания достаточен перенос одной метильной группы. Однако ранее с помощью гель-фильтрации и ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы нами было показано, что в комплексах с 20- и 32-членными олигонуклеотидными дуплексами присутствуют две молекулы ДНК-(аденин- $N^6$ )-метилтрансферазы фага T4 [3]. Выявленная агрегация показывает, что форма  $E_2S$  может присутствовать в реакционной смеси наряду с другими фермент-субстратными комплексами, однако проведенные эксперименты не доказывали прямого участия комплекса этого типа в переносе метильной груп-

пы от донора к остатку аденозина в сайте узнавания GATC.

В настоящей работе мы сопоставили различные структурные состояния метилтрансферазы фага T4 с ее каталитической активностью и показали, что олигомерные формы фермента каталитически активны, но характеризуются другими параметрами реакции в сравнении с мономером.

Для более подробного изучения условий образования олигомерных форм метилтрансферазы фага T4 использовали способность глутарового альдегида сшивать субъединицы белков с образованием ковалентных связей между близко расположенными остатками лизина [4]. Такая сшивка позволяет стабилизировать предсуществующие олигомерные формы белка и визуализировать их с помощью SDS-электрофореза в ПААГ. Чтобы снизить уровень неспецифических сшивок, мы выбрали концентрации 1 мкМ для метилтрансферазы и 0.0025% (v/v) для глутарового альдегида; эти концентрации существенно ниже, чем обычно используемые в таких экспериментах [4]. Пробы фермента инкубировали в присутствии глутарового альдегида в буфере, содержащем 10 мМ фосфат натрия (рН 7.8), 7 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ EDTA, в течение 40 мин при 25°C. Затем в пробы добавляли боргидрид натрия до концентрации 0.05% и инкубировали 10 мин. Образцы разбавляли буфером Лэммли, кипятили и анализировали с помощью электрофореза в 12% ПААГ, содержащем 0.1 % SDS. Также сшивки проводили в присутствии следующих олигонуклеотидных дуплексов:

<sup>#</sup>Автор для переписки (e-mail: malygin@vector.nsc.ru).



**Рис. 1.** Сшивка метилтрансферазы (1 мкМ) глутаровым альдегидом в присутствии 20-членного специфического дуплекса (I) (панели (a), (б)), а также дуплексов (II) и (III) (панели (в), (z)). Панели (a) и (б). Дорожка 1: необработанная метилтрансфераза; дорожка 2: метилтрансфераза, обработанная 0.0025% (v/v) глутаровым альдегидом; дорожки 3–8: метилтрансфераза, обработанная в присутствии дуплекса с концентрациями 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 и 8.0 мкМ, соответственно. На панели (б) сшивку проводили в присутствии 5 мкМ *S*-аденозил-*L*-метионина. Панели (в) и (z). Дорожка 1: метилтрансфераза, обработанная глутаровым альдегидом в отсутствие дуплекса; дорожки 2–5: метилтрансфераза, обработанная в присутствии неспецифического дуплекса (II) с концентрациями 0.25, 0.5, 1.0 и 2.0 мкМ, соответственно; дорожки 6–8: метилтрансфераза, обработанная в присутствии 12-членного специфического дуплекса (III) с концентрациями 0.25, 1.0 и 2.0 мкМ, соответственно. На панели (z) сшивку проводили в присутствии 5 мкМ *S*-аденозил-*L*-метионина. Дорожки 9 во всех гелях – стандарты молекулярных весов.



и/или *S*-аденозил-*L*-метионина. В этом случае пробы фермента преинкубировали с олигонуклеотидными дуплексами при 0°C в течение 20 мин и далее обрабатывали глутаровым альдегидом и боргидридом натрия как описано выше.

Как видно на рис. 1а, обработка глутаровым альдегидом свободной метилтрансферазы приводила к частичному формированию диффузного спектра олигомеров, устойчивых к действию SDS

(дорожка 2). Однако в присутствии специфического 20-членного дуплекса (I) и при низком соотношении концентраций [дуплекс]/[фермент] = 0.25 димеры метилтрансферазы становились преобладающей формой олигомерной фракции фермента (дорожка 3). Преимущественное образование димеров в этих условиях подтверждает наши ранние данные о комплексообразовании со специфическими олигонуклеотидами дуплексами двух субъединиц фермента [3]. Последовательное увеличение соотношения концентраций [дуплекс]/[фермент] снижает образование олигомерных форм вплоть до их полного исчезновения при высоких концентрациях дуплекса. Сходная картина наблюдается, если фермент преинкубировать с *S*-аденозил-*L*-метионином перед добавлением дуплекса (рис. 1б).

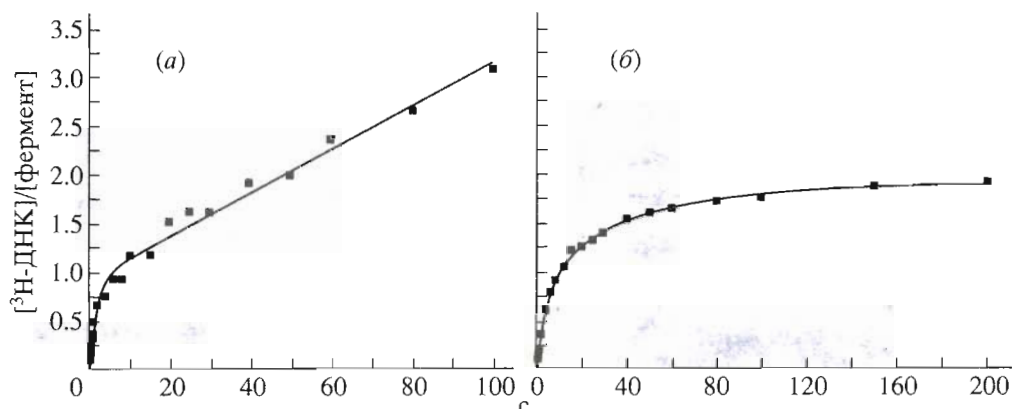


Рис. 2. Предстадионарная кинетика (а) и кинетика одного оборота метилирования (б) специфического дуплекса (I) метилтрансферазой. Концентрации в реакционной смеси: (а) 0.158 мкМ метилтрансфераза, 8 мкМ *S*-аденозил-*L*-метионин и 1.0 мкМ ДНК; (б) 2.7 мкМ метилтрансфераза, 8 мкМ *S*-аденозил-*L*-метионин и 0.2 мкМ ДНК.

Неожиданно оказалось, что похожее распределение комплексов метилтрансферазы как функции концентрации субстрата получается с неспецифическим дуплексом, содержащим “испорченный” сайт GTAC/GTAC (дуплекс (II)), а также с 12-членным дуплексом (III) (рис. 1в, г). Заметим, что, согласно нашим ранним данным по “задержке” в геле (gel shift assay) [5], величина  $K_d$  для комплекса фермент-дуплекс (II) много больше 2 мкМ, а комплексы с 12-членным дуплексом вообще не регистрировались методом “задержки” в геле. Это показывает более высокую эффективность метода ковалентных сшивок для регистрации нестабильных комплексов по сравнению с методом “задержки” в геле. Присутствие *S*-аденозил-*L*-метионина сказывается иначе на олигомеризации фермента, индуцированной неспецифическим дуплексом. В этом случае *S*-аденозил-*L*-метионин существенно стабилизирует димерную форму фермента вплоть до соотношения концентраций [дуплекс]/[фермент]  $\geq 1$  (рис. 1з). Из полученных данных следует, что метилтрансфераза способна (по крайней мере при высоких концентрациях) взаимодействовать с относительно высоким сродством с неспецифическими последовательностями субстратной ДНК. Возможно, это первая стадия взаимодействия метилтрансферазы с полимерной ДНК, которая сопровождается линейной диффузией фермента к специфическому участку узнавания. Присутствие NaCl, вплоть до концентрации 100 мМ, заметно не влияет на образование олигомеров (данные не приведены).

Ввиду того, что проведенные эксперименты позволяют определить условия, при которых фермент является мономером ( $[\text{фермент}] \ll [\text{дуплекс}]$ ) или олигомером, преимущественно димером, ( $[\text{фермент}] \gg [\text{дуплекс}]$ ), представляло интерес сопоставить каталитическую активность этих ферментных форм. Реакции метилирования проводили при 25°C как описано в работе [6]. Реакци-

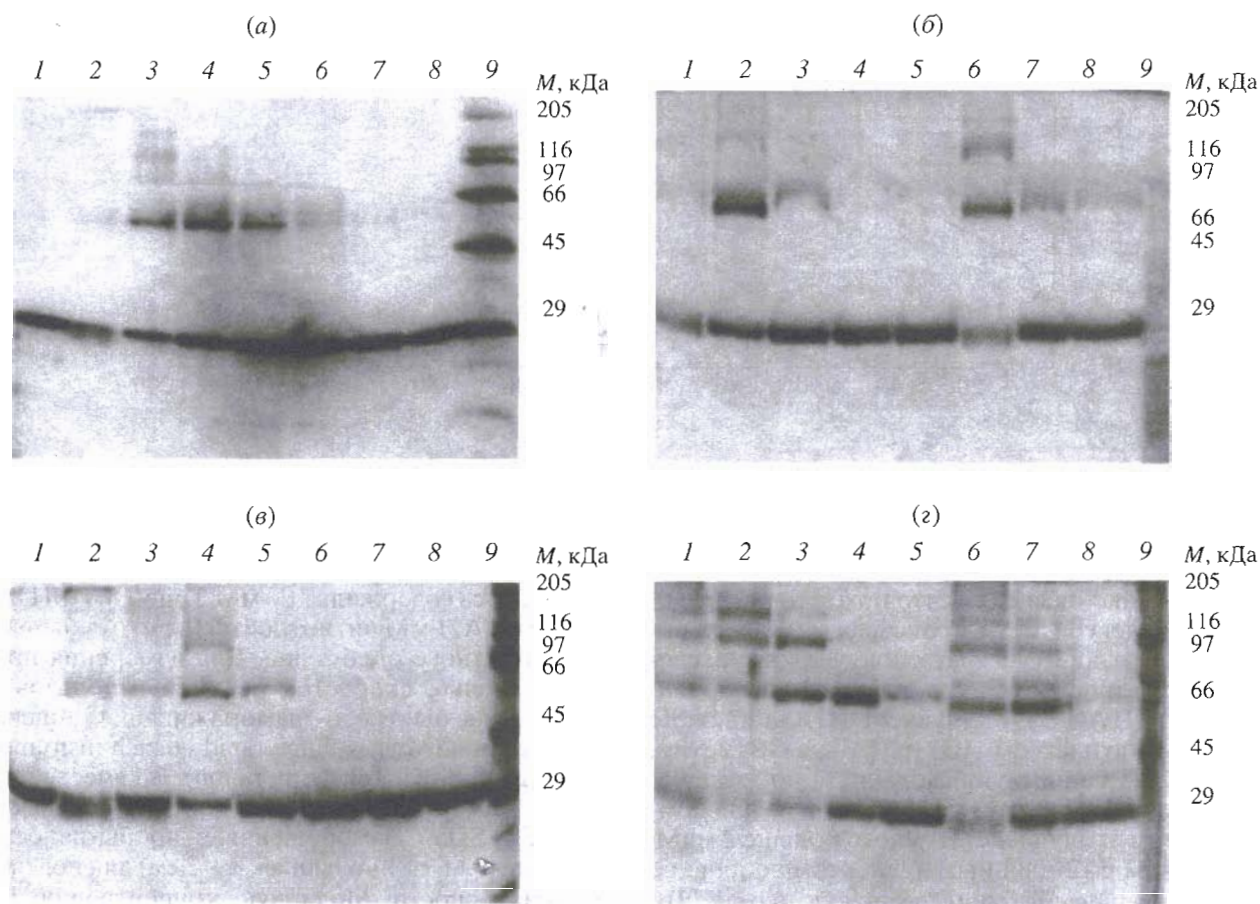
онная смесь содержала 100 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит и 0.2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Для измерения предстадионарных скоростей реакции использовали прибор для быстрого “замораживания” (quenching) реакции (Microvolume rapid quench instrument, Model RQF-3, KinTek Corporation). В качестве раствора, “замораживающего” реакцию, использовали 0.05% SDS. “Замороженные” пробы наносили на фильтры DE81 (Whatman, 2 × 2 см) для подсчета радиоактивности. Молярную концентрацию [ $^3\text{H}$ -CH<sub>2</sub>]-групп, включенных в ДНК, рассчитывали как описано ранее в работе [6]. Кинетические параметры определяли экстраполяцией экспериментальных данных к различным моделям, используя программу Scientist (MicroMath Inc., 1996) для нелинейного регрессионного анализа.

На рис. 2а представлена кинетическая кривая метилирования специфического дуплекса (I) мономерной формой фермента при насыщающих концентрациях обоих субстратов. Видно, что добавление метилтрансферазы к полной реакционной смеси приводит к первоначальному всплеску (burst) реакции с последующей более медленной стационарной фазой метилирования. Кинетическая кривая хорошо описывается уравнением:

$$[^3\text{H-ДНК}]/[\text{фермент}] = B(1 - e^{-k_{\text{мет}}t}) + k_{\text{кат}}t, \quad (1)$$

в котором константа  $B$ , равная  $0.92 \pm 0.05$ , отражает всплеск реакции;  $k_{\text{мет}} = 0.56 \pm 0.10 \text{ с}^{-1}$  – константа скорости химической стадии переноса метильной группы;  $k_{\text{кат}} = 0.023 \pm 0.002 \text{ с}^{-1}$  характеризует скорость стационарной стадии реакции. Величина  $B$ , близкая к 1, показывает, что мономер фермента катализирует перенос метильной группы только в одну из цепей связанного дуплекса.

На рис. 2б представлена кинетическая кривая метилирования в условиях измерения одного оборота реакции (single turnover), когда концентрация



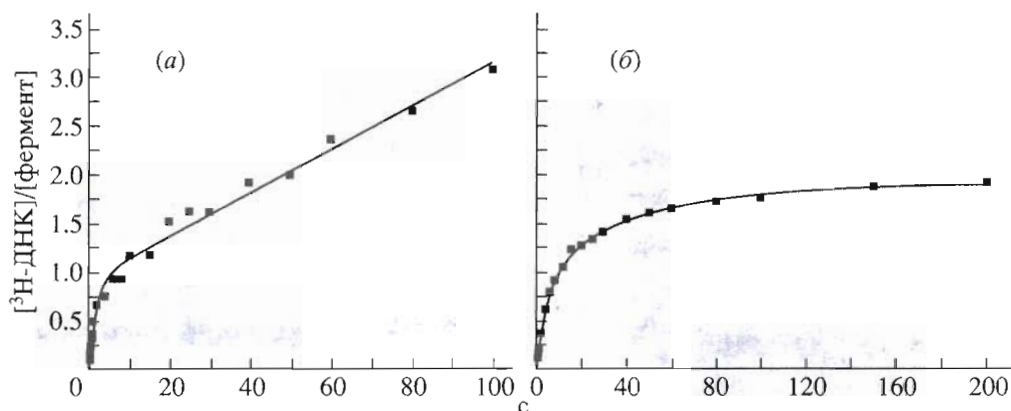
**Рис. 1.** Сшивка метилтрансферазы (1 мкМ) глутаровым альдегидом в присутствии 20-членного специфического дуплекса (I) (панели (а), (б)), а также дуплексов (II) и (III) (панели (в), (г)). Панели (а) и (б). Дорожка 1: необработанная метилтрансфераза; дорожка 2: метилтрансфераза, обработанная 0.0025% (v/v) глутаровым альдегидом; дорожки 3–8: метилтрансфераза, обработанная в присутствии дуплекса с концентрациями 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 и 8.0 мкМ, соответственно. На панели (б) сшивку проводили в присутствии 5 мкМ *S*-аденозил-*L*-метионина. Панели (в) и (г). Дорожка 1: метилтрансфераза, обработанная глутаровым альдегидом в отсутствие дуплекса; дорожки 2–5: метилтрансфераза, обработанная в присутствии неспецифического дуплекса (II) с концентрациями 0.25, 0.5, 1.0 и 2.0 мкМ, соответственно; дорожки 6–8: метилтрансфераза, обработанная в присутствии 12-членного специфического дуплекса (III) с концентрациями 0.25, 1.0 и 2.0 мкМ, соответственно. На панели (г) сшивку проводили в присутствии 5 мкМ *S*-аденозил-*L*-метионина. Дорожки 9 во всех гелях – стандарты молекулярных весов.



и/или *S*-аденозил-*L*-метионина. В этом случае пробы фермента преинкубировали с олигонуклеотидными дуплексами при 0°C в течение 20 мин и далее обрабатывали глутаровым альдегидом и боргидридом натрия как описано выше.

Как видно на рис. 1а, обработка глутаровым альдегидом свободной метилтрансферазы приводила к частичному формированию диффузного спектра олигомеров, устойчивых к действию SDS

(дорожка 2). Однако в присутствии специфического 20-членного дуплекса (I) и при низком соотношении концентраций [дуплекс]/[фермент] = 0.25 димеры метилтрансферазы становились преобладающей формой олигомерной фракции фермента (дорожка 3). Преимущественное образование димеров в этих условиях подтверждает наши ранние данные о комплексообразовании со специфическими олигонуклеотидными дуплексами двух субъединиц фермента [3]. Последовательное увеличение соотношения концентраций [дуплекс]/[фермент] снижает образование олигомерных форм вплоть до их полного исчезновения при высоких концентрациях дуплекса. Сходная картина наблюдается, если фермент преинкубировать с *S*-аденозил-*L*-метионином перед добавлением дуплекса (рис. 1б).



**Рис. 2.** Предстадионарная кинетика (а) и кинетика одного оборота метилирования (б) специфического дуплекса (I) метилтрансферазой. Концентрации в реакционной смеси: (а) 0.158 мкМ метилтрансфераза, 8 мкМ *S*-аденозил-*L*-метионин и 1.0 мкМ ДНК; (б) 2.7 мкМ метилтрансфераза, 8 мкМ *S*-аденозил-*L*-метионин и 0.2 мкМ ДНК.

Неожиданно оказалось, что похожее распределение комплексов метилтрансферазы как функции концентрации субстрата получается с неспецифическим дуплексом, содержащим “испорченный” сайт GTAC/GTAC (дуплекс (II)), а также с 12-членным дуплексом (III) (рис. 1в, г). Заметим, что, согласно нашим ранним данным по “задержке” в геле (gel shift assay) [5], величина  $K_d$  для комплекса фермент-дуплекс (II) много больше 2 мкМ, а комплексы с 12-членным дуплексом вообще не регистрировались методом “задержки” в геле. Это показывает более высокую эффективность метода ковалентных сшивок для регистрации нестабильных комплексов по сравнению с методом “задержки” в геле. Присутствие *S*-аденозил-*L*-метионина сказывается иначе на олигомеризации фермента, индуцированной неспецифическим дуплексом. В этом случае *S*-аденозил-*L*-метионин существенно стабилизирует димерную форму фермента вплоть до соотношения концентраций [дуплекс]/[фермент]  $\geq 1$  (рис. 1г). Из полученных данных следует, что метилтрансфераза способна (по крайней мере при высоких концентрациях) взаимодействовать с относительно высоким сродством с неспецифическими последовательностями субстратной ДНК. Возможно, это первая стадия взаимодействия метилтрансферазы с полимерной ДНК, которая сопровождается линейной диффузией фермента к специфическому участку узнавания. Присутствие NaCl, вплоть до концентрации 100 мМ, заметно не влияет на образование олигомеров (данные не приведены).

Ввиду того, что проведенные эксперименты позволяют определить условия, при которых фермент является мономером ([фермент]  $\ll$  [дуплекс]) или олигомером, преимущественно димером, ([фермент]  $\gg$  [дуплекс]), представляло интерес сопоставить каталитическую активность этих ферментных форм. Реакции метилирования проводили при 25°C как описано в работе [6]. Реакци-

онная смесь содержала 100 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит и 0.2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Для измерения предстадионарных скоростей реакции использовали прибор для быстрого “замораживания” (quenching) реакции (Microvolume rapid quench instrument, Model RQF-3, KinTek Corporation). В качестве раствора, “замораживающего” реакцию, использовали 0.05% SDS. “Замороженные” пробы наносили на фильтры DE81 (Whatman, 2 × 2 см) для подсчета радиоактивности. Молярную концентрацию [ $^3\text{H}$ -CH<sub>2</sub>]-групп, включенных в ДНК, рассчитывали как описано ранее в работе [6]. Кинетические параметры определяли экстраполяцией экспериментальных данных к различным моделям, используя программу Scientist (MicroMath Inc., 1996) для нелинейного регрессионного анализа.

На рис. 2а представлена кинетическая кривая метилирования специфического дуплекса (I) мономерной формой фермента при насыщающих концентрациях обоих субстратов. Видно, что добавление метилтрансферазы к полной реакционной смеси приводит к первоначальному всплеску (burst) реакции с последующей более медленной стационарной фазой метилирования. Кинетическая кривая хорошо описывается уравнением:

$$[^3\text{H-ДНК}]/[\text{фермент}] = B(1 - e^{-k_{\text{мет}}t}) + k_{\text{кат}} t, \quad (1)$$

в котором константа  $B$ , равная  $0.92 \pm 0.05$ , отражает всплеск реакции;  $k_{\text{мет}} = 0.56 \pm 0.10 \text{ с}^{-1}$  – константа скорости химической стадии переноса метильной группы;  $k_{\text{кат}} = 0.023 \pm 0.002 \text{ с}^{-1}$  характеризует скорость стационарной стадии реакции. Величина  $B$ , близкая к 1, показывает, что мономер фермента катализирует перенос метильной группы только в одну из цепей связанного дуплекса.

На рис. 2б представлена кинетическая кривая метилирования в условиях измерения одного оборота реакции (single turnover), когда концентрация

фермента и второго субстрата, *S*-аденозил-*L*-метионина, значительно превышает концентрацию ДНК. В отличие от эксперимента по измерению всплеска реакции остатка аденозина в обеих цепях связанного дуплекса метилируются практически полностью. Кинетическая кривая хорошо описывается уравнением для двустадийного необратимого превращения исходного субстрата [7]:

$$\begin{aligned} \frac{[{}^3\text{H-ДНК}]/[\text{дуплекс}] = P_2 -}{-(P_1 k_1 - P_2 k_2)e^{-k_1 t} / (k_1 - k_2)(P_1 - P_2)e^{-k_2 t} k_1 / (k_1 - k_2)}, \end{aligned} \quad (2)$$

где  $P_1 = 1.03 \pm 0.05$  – степень метилирования дуплекса в ходе первой стадии реакции (с константой скорости  $k_1 = 0.21 \pm 0.02 \text{ с}^{-1}$ );  $P_2 = 1.90 \pm 0.03$  – степень метилирования конечного продукта реакции; при этом константа скорости метилирования на второй стадии  $k_2 = 0.023 \pm 0.003 \text{ с}^{-1}$  существенно ниже, чем на первой. По данным шивки белковых субъединиц глутаровым альдегидом (рис. 1), фермент имеет мономерную структуру в условиях измерения всплеска реакции, тогда как в условиях измерения одного оборота реакции доминантной ферментной формой служит димер. Тем не менее основным доказательством того, что в тех и других условиях реакция катализируется разными ферментными формами, является высокое (в 2.5 раза) различие констант скорости первых стадий метилирования дуплекса.

Таким образом, в условиях измерения одного оборота реакции, когда концентрация метилтрансферазы на порядок выше концентрации дуплекса, фермент может функционировать в виде димера/олигомера. Эти результаты позволяют включить ДНК-(аденин- $N^6$ )-метилтрансферазу фага Т4 в обширный список диссоциирующих ферментных

систем, особенности кинетического поведения которых были ранее рассмотрены Кургановым [8].

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 99-04-49868) и Международного фонда Джона Е. Фогарти (ТW00529). Авторы благодарны С. Хаттману, С. Шлагману (Университет Рочестера, Нью-Йорк, США) и У. Линдстрему (Университет Калифорнии, Санта-Барбара, США) за предоставленные препараты метилтрансферазы и синтетических олигонуклеотидов; Н. Рейху (Университет Калифорнии, Санта-Барбара, США) за предоставленную возможность использовать прибор для быстрого “замораживания” реакции и ценное обсуждение результатов работы; А.И. Закабунину (ГНЦ вирусологии и биотехнологии “Вектор”) за полезное обсуждение рукописи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cheng X. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1995. V. 24. P. 293–318.
2. Modrich P., Roberts R.Y. // *Nucleases*. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1982. P. 109–153.
3. Зиновьев В.В., Овечкина Л.Г., Малыгин Э.Г. // *Молекул. биология*. 1996. Т. 30. С. 724–726.
4. Phillips C.A., Gordon J., Spicer E.K. // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 4319–4326.
5. Malygin E.G., Petrov N.A., Gorbunov Yu.A., Kossykh V.G., Hattman S. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4393–4399.
6. Zinoviev V.V., Evdokimov A.A., Gorbunov Yu.A., Malygin E.G., Kossykh V.G., Hattman S. // *Biol. Chem.* 1998. V. 379. P. 481–488.
7. Эмануэль Н.М., Кнорре Д.Г. // *Курс химической кинетики*. М.: Высшая школа, 1962. С. 192–202.
8. Курганов Б.И. *Алlostерические ферменты*. М.: Наука, 1978. С. 117–174.

## The Oligomerization of Phage T4 DNA-(Adenine- $N^6$ )-Methyltransferase and Its Effect on the Catalytic Characteristics of the Enzyme

L. G. Ovechkina, V. V. Zinoviev, Yu. A. Gorbunov, and E. G. Malygin<sup>#</sup>

*Institute of Molecular Biology, Vektor State Research Center of Virology and Biotechnology, Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, 630559 Russia*

The structural and catalytic properties of the phage T4 DNA-(adenine- $N^6$ )-methyltransferase (EC 2.1.1.72) were studied at different enzyme–substrate concentration ratios by chemical cross-linking of the protein subunits and by measuring the presteady state kinetics of the reactions. Various structural states of the methyltransferase were correlated with its catalytic activity, and it was shown that the oligomeric forms of the enzyme are catalytically active but are characterized by the reaction parameters different from those of the monomer.

*Key words:* DNA methyltransferase, methylation single turnover, cross-linking of protein subunits

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; e-mail: malygin@vector.nsc.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 12. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.