



УДК 577.113.4:577.152.314'14

АНАЛИЗ КОНТАКТОВ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ *SsoII* С ДНК В ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНОМ КОМПЛЕКСЕ

© 2002 г. О. В. Воробьева*, А. С. Карягина**,
Е. М. Волков*, М. Б. Вирясов*, Т. С. Орецкая*, Е. А. Кубарева**

* Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Воробьевы горы;

** Всесоюзный научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Москва

Поступила в редакцию 17.09.2001 г. Принята к печати 13.11.2001 г.

Идентифицированы группы атомов участка метилирования в ДНК, вовлеченные на стадии узнавания во взаимодействие с ДНК-метилтрансферазой *SsoII*. Анализ контактов в фермент-субстратном комплексе проводили в присутствии *S*-аденозил-*L*-гомоцистеина методом “отпечатков” с муравьиной кислотой, гидразином, диметилсульфатом и *N*-этил-*N*-нитрозомочевинной в качестве модифицирующих реагентов. Показано, что замена центральной А · Т-пары участка метилирования на G · С-пару не влияет на характер взаимодействия фермента с ДНК, в то время как переход от неметилированного к метилированному по одной цепи (монометилированному) субстрату принципиальным образом изменяет картину распределения контактов в ДНК. Рассчитаны константы связывания неметилированного и монометилированного субстратов с ДНК-метилтрансферазой *SsoII* в присутствии *S*-аденозил-*L*-гомоцистеина.

Ключевые слова: ДНК-белковые взаимодействия; 5-цитозиновые ДНК-метилтрансферазы; ДНК-метилтрансфераза *SsoII*; метод “отпечатков”.

ВВЕДЕНИЕ

5-Цитозиновые ДНК-метилтрансферазы (ДНК(цитозин-5-)-метилтрансферазы, КФ 2.1.1.37) катализируют перенос метильной группы с *S*-аденозил-*L*-метионина (Met(Ado)) на C5-атом остатка цитозина определенного фрагмента ДНК, называемого участком метилирования [1]. Большинство ферментов этого класса имеют сходную первичную структуру. Они включают пять высоко- и пять низкоконсервативных аминокислотных мотивов и переменный район, расположенные в строго определенной последовательности по длине пептидной цепи. Переменный район отвечает за узнавание ферментом участка метилирования, определяет положение метилируемого цитозина и не имеет заметной гомологии в ряду 5-цитозиновых ДНК-метилтрансфераз, узнающих различные последовательности [1–3].

Понимание специфики взаимодействия ферментов данного класса с ДНК базируется на данных рентгеноструктурного анализа (РСА), полу-

ченных для комплексов метилтрансфераз *HhaI* и *HaeIII* (*M.HhaI* и *M.HaeIII*) с олигонуклеотидными субстратами [4–7]. Структуры комплексов этих ферментов с ДНК очень близки. Обе метилтрансферазы состоят из двух доменов, причем в специфическом узнавании (связывании) ДНК в основном принимает участие малый домен, включающий в себя переменный район. Во взаимодействии с ДНК происходит, главным образом, со стороны большой бороздки. Обе метилтрансферазы выворачивают метилируемый цитозин из двойной спирали ДНК для того, чтобы осуществить реакцию метилирования, в которой важную роль играет консервативный дипептид – Pro-Cys. В присутствии Met(Ado) образуется ковалентная связь между метилируемым цитозином и остатком Cys дипептида [8]. Для изучения особенностей взаимодействия 5-цитозиновых ДНК-метилтрансфераз с субстратами широко используется метод “отпечатков” [9, 10]. Причем, как было показано в случае *M.HhaI*, результаты, получаемые этим методом, хорошо согласуются с данными РСА [9].

Объектом настоящего исследования является 5-цитозиновая ДНК-метилтрансфераза *SsoII* (*M.SsoII*), входящая в состав системы рестрикции-модификации *SsoII*. Данная метилтрансфераза узнает в двутяжевой ДНК пентануклеотидную последовательность CCNGG (где N – A, G, T или C)

Сокращения: Met(Ado) – *S*-аденозил-*L*-метионин; Hcy(Ado) – *S*-аденозил-*L*-гомоцистеин; *M.SsoII* – ДНК-метилтрансфераза *SsoII*; m⁵C – 5-метил-2'-дезокситидин; РСА – рентгеноструктурный анализ. Префикс “d” (дезокс) при обозначении нуклеозидных остатков, олигодезоксирибонуклеотидов и ДНК-дуплексов опущен.

Автор для переписки (эл. почта: kubareva@belozersky.msu.ru; тел.: (095) 939-31-48).

ДНК-дуплексы и их константы диссоциации*

Номер	ДНК-дуплекс		K_d , нМ
(I)	(5) GATGCTGCCAACCTTGGCTCTAGCTTTCATAC	Т-цепь	5.3 ± 0.6
	(3) CTACGACGGTTGGAAACCGAGATCGAAGTATG	А-цепь	
(II)	(5) GATGCTGCCAACCCCGGCTCTAGCTTTCATAC	С-цепь	4.9 ± 0.3
	(3) CTACGACGGTTGGGGCCGAGATCGAAGTATG	Г-цепь	
(III)	(5) GATGCTGCCAACm ⁵ C TGGCTCTAGCTTTCATAC	Т-цепь	2.6 ± 0.3
	(3) CTACGACGGTTG—G A CCGAGATCGAAGTATG	А-цепь	
(IV)	(5) GATGCTGCCAACCT—G GCTCTAGCTTTCATAC	Т-цепь	2.3 ± 0.2
	(3) CTACGACGGTTGG Am ⁵ CCGAGATCGAAGTATG	А-цепь	

* Жирным шрифтом выделен участок метилирования.

и метилирует внутренний цитозин [11]. Интересной особенностью *M.SsoII* является наличие протяженного *N*-концевого участка, структура которого обуславливает способность метилтрансферазы выступать в роли фактора транскрипции и регулировать экспрессию собственного гена, а также гена, кодирующего эндонуклеазу рестрикции *SsoII*. Регуляция осуществляется благодаря специфическому взаимодействию *M.SsoII* с промоторной областью генов системы рестрикции-модификации *SsoII* [12]. Основное число контактов *M.SsoII* с промоторной областью обеспечивает локализованный внутри нее 15-звенный участок (регуляторный участок) [13]. Таким образом, *M.SsoII* представляет собой уникальный бифункциональный белок: с одной стороны – это фактор транскрипции, а с другой – фермент, катализирующий реакцию метилирования. Ранее методом “отпечатков” нами был исследован специфический комплекс *M.SsoII* с регуляторным участком и построены теоретические модели, описывающие контакты в данном комплексе [14].

В настоящей работе с использованием метода “отпечатков” проанализированы комплексы *M.SsoII* с неметилированными и метилированными по одной цепи (монометилированными) субстратами в присутствии *S*-аденозил-*L*-гомоцистеина (Hcy(Ado)). Использование этого нереакционно-способного аналога Met(Ado) позволяет фиксировать комплекс метилтрансферазы с ДНК на стадии узнавания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие ДНК-метилтрансферазы SsoII с неметилированными ДНК-дуплексами

Для выяснения особенностей взаимодействия *M.SsoII* с ДНК были сконструированы 30-звенные ДНК-дуплексы (I) и (II), содержащие канонический участок узнавания *M.SsoII* (таблица). Дуплекс (II) является аналогом дуплекса (I) за ис-

ключением центральной нуклеотидной пары участка узнавания, где остатки аденозина и тимидина заменены на остатки гуанозина и цитидина соответственно. В дальнейшем цепь ДНК-дуплекса (I) или (II), содержащая в центре участка метилирования остаток Т или С, будет называться Т- или С-цепью; цепь ДНК-дуплекса, содержащая остаток А или Г, – А- или Г-цепью.

Для идентификации групп атомов участка метилирования, вовлеченных во взаимодействие с *M.SsoII* на стадии узнавания, был применен метод “отпечатков”, основанный на обработке ДНК модифицирующим агентом и последующем связывании модифицированного субстрата с исследуемым белком (в англоязычной литературе – *interference footprinting*). В качестве модифицирующего агента использовали муравьиную кислоту, гидразин, диметилсульфат и *N*-этил-*N*-нитрозомочевину. Известно, что при формировании специфического ДНК-белкового комплекса 5-цитозиновые ДНК-метилтрансферазы контактируют с обеими цепями ДНК. Если участок узнавания неметилирован, возможно образование двух различных комплексов, так как внутренний цитозин может быть вывернут как из верхней, так и из нижней цепи ДНК [4–9]. Таким образом, идентифицированные методом “отпечатков” группы атомов ДНК будут представлять собой сумму контактов по двум возможным комплексам.

Для идентификации методом “отпечатков” гетероциклических оснований участка метилирования, вовлеченных во взаимодействие с *M.SsoII*, были использованы муравьиная кислота, обработка которой приводит к апуринизации ДНК, или гидразин. Присоединение последнего по двойной связи C5=C6 в пиримидинах приводит к расщеплению гетероциклического кольца и апириминизации ДНК. Предварительно были подобраны условия специфического связывания *M.SsoII* с ДНК. Связывание наблюдалось только в присутствии Hcy(Ado) и только с ДНК, содержа-

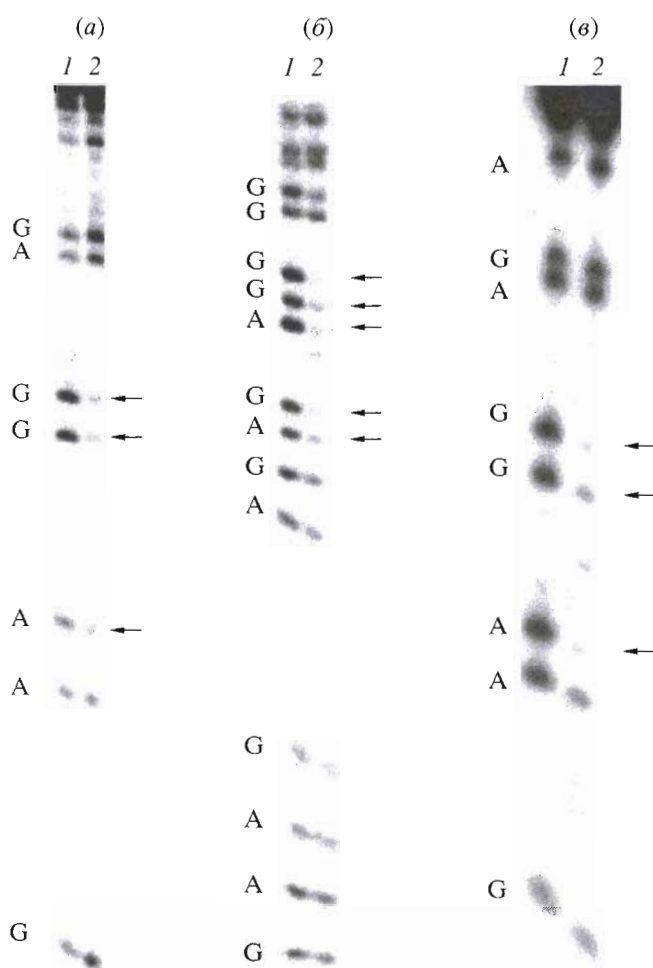


Рис. 1. Радиоавтограф фрагментов Т- и А-цепей ДНК-дуплекса (I) (а, б) и С-цепи ДНК-дуплекса (II) (в), полученных методом "отпечатков" (реагент для модификации муравьиная кислота). Показаны продукты гидролиза фракций, содержащих молекулы ДНК, не связавшиеся с *M.SsoII* (1) и связавшиеся с *M.SsoII* (2). Стрелками отмечены пурины, взаимодействующие с *M.SsoII*.

щей канонический участок узнавания (результаты не приведены).

30-Звенный ДНК-дуплекс (I) или (II), меченый ^{32}P по 5'-концу Т/С- или А/Г-цепи, обрабатывали модифицирующим агентом (муравьиной кислотой или гидразином) в условиях статистической модификации [15] и инкубировали с *M.SsoII* в подобранных условиях специфического связывания. Методом "торможения" в геле [16] связавшийся с белком субстрат отделяли от ДНК-дуплекса, не связавшегося с белком. После расщепления 10% водным раствором пиперидина по месту модификации фрагменты ДНК-дуплекса анализировали методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях (рис. 1). Схематически фрагменты ДНК-дуплексов (I) и (II) приведены на рис. 2а, б.

Можно видеть, что во взаимодействии с *M.SsoII* на стадии узнавания участвуют все пурины участка метилирования ДНК-дуплексов (I) и (II), включая и центральный, вырожденный пурин (аденин в случае А-цепи ДНК-дуплекса (I) и гуанин в случае Г-цепи ДНК-дуплекса (II)). Однако, помимо пуринов участка узнавания, во взаимодействии также участвуют пурины, непосредственно примыкающие к нему с 5'-конца, один (А) в Т-цепи и два (АГ) в А-цепи ДНК-дуплекса (I) (рис. 1, 2а). Аналогичная картина наблюдается и в случае ДНК-дуплекса (II): во взаимодействии участвуют те же пурины фланкирующих областей (рис. 1, 2б).

Из цитозинов участка метилирования с *M.SsoII* на стадии узнавания взаимодействует только крайний остаток в обеих цепях ДНК-дуплексов (I) и (II) (рис. 2). Центральный метилируемый остаток цитозина для узнавания ферментом субстрата не важен. Данный факт хорошо согласуется с результатами РСА для *M.HhaI*, согласно которым образование фермент-субстратного комплекса наблюдается также и при замене метилируемого остатка цитозина на остатки аденина, урацила или структурного аналога дезоксирибозы – (2R, 3S)-2-гидроксиметилтетрагидрофуранола-3 [17]. Кроме того, из литературных данных известно, что сродство 5-цитозиновых метилтрансфераз к ДНК, содержащей аналоги остатка дезоксирибозы вместо метилируемого цитозина, в десять раз выше, чем к канонической, немодифицированной ДНК [18]. Наблюдаемая нами (рис. 3) гиперактивность обработанной гидразином ДНК, то есть повышение интенсивности полосы, соответствующей по местоположению метилируемому остатку цитозина в дорожке 2 по сравнению с дорожкой 1, косвенным образом подтверждает данный факт. Центральный, вырожденный пиримидин, а также пиримидины фланкирующих областей участка узнавания в обеих цепях ДНК-дуплексов (I) и (II) не принимают участия в формировании комплекса с *M.SsoII*.

Согласно данным, полученным методом "отпечатков" и РСА для ряда 5-цитозиновых метилтрансфераз, их контакты с ДНК локализованы, главным образом, в большой бороздке последней [4–7, 9, 10]. Для того чтобы проверить, характерен ли подобный способ узнавания для *M.SsoII*, был использован метод "отпечатков" с диметилсульфатом. Данный модифицирующий агент метилирует остатки гуанина по атому N7, экспонированному в большую бороздку ДНК [16]. Схема эксперимента аналогична описанной выше. Выявленные с помощью этого эксперимента остатки гуанина, атомы N7 которых участвуют в узнавании, показаны на рис. 2а, б. Метод "отпечатков" с диметилсульфатом продемонстрировал, что *M.SsoII*, как и другие 5-цитозиновые метилтрансферазы, образует контакты с большой бо-

роздкой ДНК. В формировании специфических контактов участвуют N7-атомы всех остатков гуанина, определенных методом "отпечатков" с муравьиной кислотой (см. выше), кроме гуанина, примыкающего к участку узнавания в А/Г-цепи ДНК-дуплекса (I)/(II). То есть во взаимодействии с *M.SsoII* участвуют только N7-атомы остатков гуанина участка метилирования.

Для того чтобы идентифицировать фосфатные группы участка узнавания, вовлеченные во взаимодействие с *M.SsoII*, был применен метод "отпечатков", в котором в качестве модифицирующего агента использовалась *N*-этил-*N*-нитрозомочевина (рис. 4). Обработка данным химическим реагентом приводит к этилированию межнуклеотидных фосфатов [16]. Схема эксперимента аналогична описанной выше. Исключение составляет стадия гидролиза фосфодиэфирных связей по месту модификации, которую проводили 1 М NaOH, для того чтобы избежать гидролиза по гуаниновым звеньям (последние при обработке ДНК *N*-этил-*N*-нитрозомочевинной этилируются по атому N7). Вовлеченные во взаимодействие с ферментом фосфатные группы ДНК показаны на рис. 2а, б. *M.SsoII* формирует контакты с 5'-фосфатными группами всех нуклеозидов участка узнавания в обеих цепях ДНК-дуплексов (I) и (II), причем контакт с 5'-фосфатом крайнего цитидина участка узнавания выражен "слабее" (укороченные стрелки на рис. 2) остальных четырех контактов, которые примерно одинаковы (рис. 4, 2).

Для оценки сродства ДНК-дуплексов (I) и (II) к *M.SsoII* были рассчитаны равновесные константы диссоциации соответствующих ДНК-белковых комплексов по методу Скетчарда [19] (таблица). Константа диссоциации комплекса *M.SsoII* с ДНК-дуплексом (I) (5.3 ± 0.6 нМ) в пределах ошибки совпадает с величиной константы диссоциации комплекса *M.SsoII* с ДНК-дуплексом (II) (4.9 ± 0.3 нМ), что свидетельствует об одинаковом сродстве ДНК-дуплексов (I) и (II) к *M.SsoII*.

Таким образом, было проанализировано взаимодействие *M.SsoII* с ДНК-дуплексами (I) и (II), содержащими канонический участок узнавания *M.SsoII* и отличающимися центральной нуклеотидной парой, на стадии узнавания. Показано, что замена центральной А · Т-пары участка узнавания на G · С-пару не влияет на характер взаимодействия *M.SsoII* с ДНК. Данный фермент контактирует с субстратом со стороны большой бороздки ДНК, причем для узнавания существенны все гетероциклические основания участка метилирования, за исключением центрального, выроджденного пиримидина и внутреннего цитозина. Также для взаимодействия важны 5'-фосфатные группы всех пяти нуклеозидов участка узнавания и гетероциклические основания, примыкающие к участку метилирования с 5'-конца. Взаимодейст-

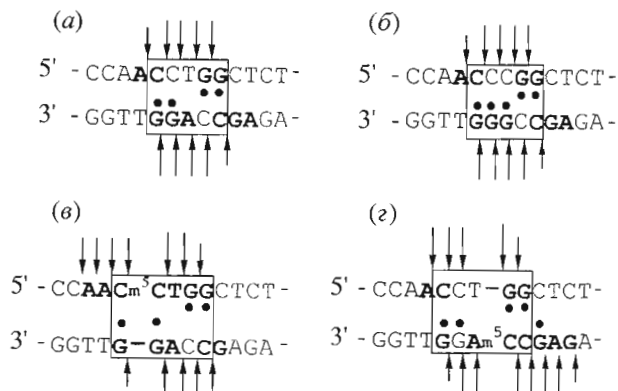


Рис. 2. Идентифицированные с помощью метода "отпечатков" группы атомов ДНК-дуплексов (I) (а), (II) (б), (III) (в) и (IV) (г), вовлеченные во взаимодействие с *M.SsoII*. Обозначены участвующие в узнавании ферментом гетероциклические основания (жирным шрифтом), фосфатные группы (стрелками), N7-атомы остатков гуанина (кружками). Участок метилирования выделен рамкой.

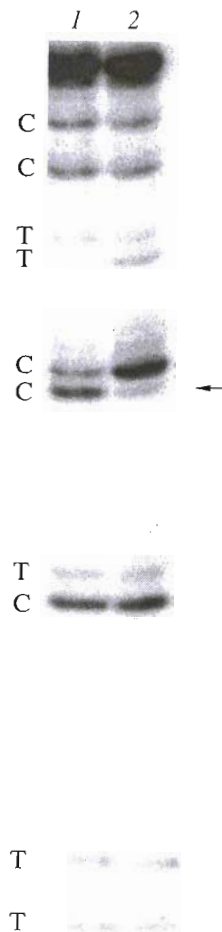


Рис. 3. Радиоавтограф фрагментов А-цепи ДНК-дуплекса (I), полученных методом "отпечатков" (реагент для модификации гидразин). Показаны продукты гидролиза фракций, содержащих молекулы ДНК, не связавшиеся (1) и связавшиеся (2) с *M.SsoII*. Стрелкой указан остаток цитидина, взаимодействующий с *M.SsoII*.

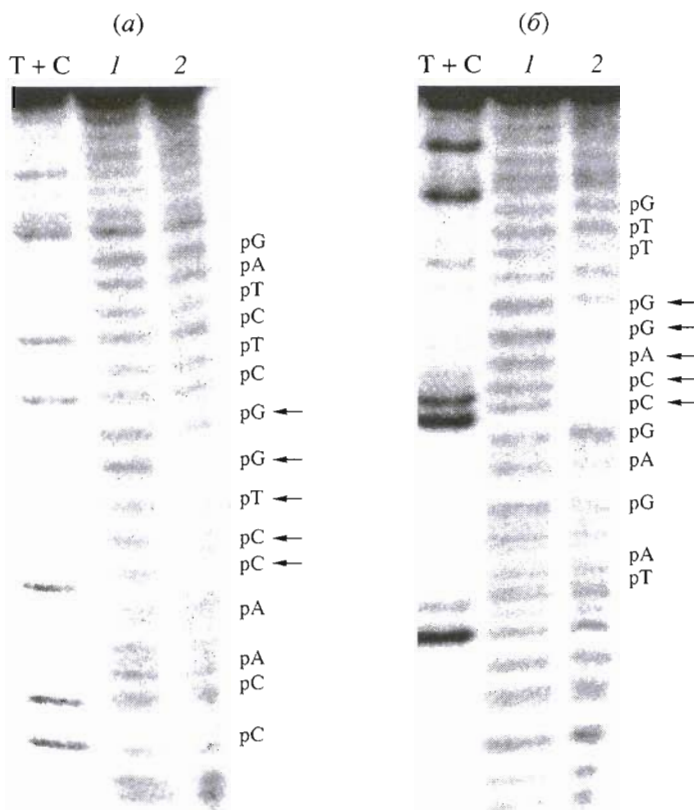


Рис. 4. Радиоавтограф фрагментов Т-цепи (а) и А-цепи (б) ДНК-дуплекса (I), полученных методом “отпечатков” (реагент для модификации *N*-этил-*N*-нитрозомочевина). Показаны продукты гидролиза фракций, содержащих молекулы ДНК, не связавшиеся (1) и связавшиеся (2) с *M.SsoII*; дорожки С + Т – разделение продуктов химической модификации ДНК методом Максама–Гилберта по звеньям С и Т. Стрелками отмечены фосфатные группы, взаимодействующие с *M.SsoII*.

вие в пределах участка метилирования носит симметричный характер.

Взаимодействие ДНК-метилтрансферазы SsoII с монометилированными ДНК-дуплексами

Как отмечалось выше, описанные в предыдущем разделе результаты по взаимодействию *M.SsoII* с ДНК, по существу, отражают сумму двух вариантов взаимодействий, так как использование неметилированной ДНК предполагает возможность формирования двух разных комплексов. Для того чтобы иметь более полную информацию о взаимодействии *M.SsoII* с участком метилирования были проанализированы комплексы фермента с ДНК-субстратом, в котором одна из цепей содержала остаток 5-метил-2'-дезоксцитидина (m^5C) на месте внутреннего цитидина (полуметилированные ДНК). С полуметилированной ДНК *M.SsoII* может образовать лишь единственный комплекс: из двойной спирали будет выворачиваться неметилированный остаток цитозина.

Для выяснения особенностей взаимодействия *M.SsoII* с полуметилированными субстратами бы-

ли сконструированы 30-звенные ДНК-дуплексы (III) и (IV) (таблица). ДНК-дуплексы (III) и (IV) являются аналогами ДНК-дуплекса (I), в которых внутренний остаток цитозина участка узнавания заменен на остаток 5-метилцитозина в верхней или нижней цепи соответственно. Аналогично дуплексу (I) верхняя цепь ДНК-дуплексов (III) и (IV), содержащая в центре участка метилирования остаток Т, будет называться Т-цепью, а нижняя цепь ДНК-дуплексов (III) и (IV), содержащая остаток А, – А-цепью.

Для идентификации групп атомов участка узнавания, вовлеченных во взаимодействие с *M.SsoII*, как и в случае неметилированной ДНК, был использован метод “отпечатков” (реагенты для модификации: муравьиная кислота, гидразин, *N*-этил-*N*-нитрозомочевина и диметилсульфат). Были подобраны условия образования специфического фермент-субстратного комплекса (результаты не приведены). Схемы экспериментов аналогичны описанным выше. Вовлеченные во взаимодействие с *M.SsoII* группы атомов ДНК показаны на рис. 2в, г.

Схема распределения контактов с *M.SsoII* в неметилированных цепях ДНК-дуплексов (III) и

(IV) (А- и Т-цепи соответственно) практически идентична схеме контактов в соответствующих цепях неметилованного ДНК-дуплекса (I) (рис. 2а, в, г). Единственное исключение составляет остаток аденина, фланкирующий участок метилирования в А-цепи и участвующий в узнавании ферментом ДНК-дуплекса (I). В полуметилованном ДНК-дуплексе (III) этот остаток не участвует во взаимодействии с *M.SsoII*.

Сравнение метилированных цепей ДНК-дуплексов (III) и (IV) с соответствующими неметилованными цепями ДНК-дуплекса (I) показывает, что замена внутреннего остатка цитидина участка узнавания на m^5C приводит к существенному изменению картины распределения контактов (рис. 2а, в, г). Так, во взаимодействии с *M.SsoII* участвуют N7-атомы всех остатков гуанина участка узнавания Т- и А-цепей ДНК-дуплексов (III) и (IV) соответственно, а также N7-атом гуанина, примыкающего к участку узнавания А-цепи ДНК-дуплекса (IV) с 5'-конца. В неметилованном субстрате в узнавании принимали участие только N7-атомы остатков гуанина участка узнавания.

Расширяется область взаимодействия *M.SsoII* и с нуклеозидами. На рис. 5 представлены радиоавтограммы электрофоретического разделения в денатурирующем ПААГ продуктов гидролиза полуметилованных ДНК-дуплексов (III) и (IV), полученные методом "отпечатков" с муравьиной кислотой. В Т-цепи ДНК-дуплекса (III) в узнавании ферментом участвуют все пурины и пиримидины участка метилирования, включая 5-метилцитозин и центральный остаток тимина. Кроме того, во взаимодействие с ферментом вовлечены два остатка аденина, примыкающие к участку узнавания с 5'-конца. В А-цепи ДНК-дуплекса (IV) в узнавании участвуют три 5'-фланкирующих пуриновых нуклеозида, а также все гетероциклические основания участка узнавания, кроме внутреннего остатка гуанина. Можно предположить, что удаление внутреннего остатка гуанина, расположенного напротив метилируемого цитозина, происходящее в результате обработки муравьиной кислотой, способствует выпетливанию метилируемого цитозина из ДНК и таким образом облегчает образование ДНК-белкового комплекса. В Т-цепи ДНК-дуплекса (III) внутренний остаток гуанина вовлечен во взаимодействие с *M.SsoII*. Возможно, данное явление объясняется различиями в нуклеотидных последовательностях, фланкирующих участок метилирования А- и Т-цепей.

В метилированных цепях ДНК-дуплексов (III) и (IV) по сравнению с соответствующими неметилованными цепями ДНК-дуплекса (I) увеличивается число фосфатных групп, функционально важных для взаимодействия с *M.SsoII*. В узнавании принимают участие семь/восемь фосфатных

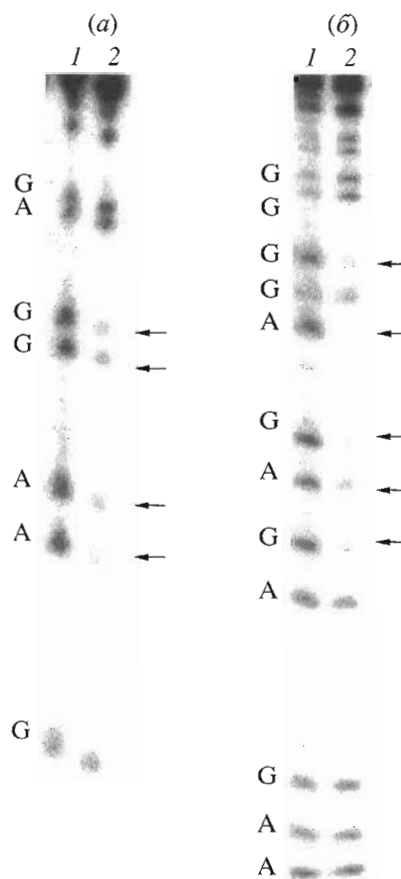


Рис. 5. Радиоавтограф фрагментов Т-цепи ДНК-дуплекса (III) (а) и А-цепи ДНК-дуплекса (IV) (б), полученных методом "отпечатков" (реагент для модификации муравьиная кислота). Показаны продукты гидролиза фракций, содержащих молекулы ДНК, не связавшиеся (1) и связавшиеся (2) с *M.SsoII*. Стрелками указаны пурины, взаимодействующие с *M.SsoII*.

групп Т/А-цепи ДНК-дуплекса (III)/(IV): пять в участке метилирования и две/три, примыкающие к нему с 5'-конца (рис. 2в, г).

Как и в случае неметилованных субстратов, для оценки сродства ДНК-дуплексов (III) и (IV) к *M.SsoII* были рассчитаны равновесные константы диссоциации по методу Скетчарда [19] (таблица). Константы диссоциации комплексов *M.SsoII* с монометилованными субстратами в пределах ошибки совпадают между собой и в 2.1 раза меньше, чем константы диссоциации комплексов с неметилованными субстратами.

Обобщая полученные результаты о взаимодействии *M.SsoII* с моно- и неметилованными субстратами на стадии узнавания, можно сделать вывод о том, что сродство *M.SsoII* к монометилованным субстратам выше, чем к неметилованным. Подобное различие в сродстве к субстратам показано и для других 5-цитозиновых ДНК-метилтрансфераз [7, 20]. Изменение степени

сродства происходит, согласно полученным нами данным, за счет увеличения числа контактов между ферментом и цепью, содержащей остаток m^5C . *M.SsoII* взаимодействует с субстратами со стороны большой бороздки ДНК, причем в узнавание вовлечены как группы атомов участка метилирования, так и группы атомов, примыкающие к нему с 5'-конца.

Результаты, полученные в настоящем исследовании и в работе [14], позволяют сравнить специфические комплексы, которые *M.SsoII* формирует с участками узнавания в ДНК: регуляторным участком и участком метилирования. Следует отметить, что этим комплексам присущи общие черты. Регуляторный участок, как и участок метилирования, представляет собой палиндромную последовательность, симметричную относительно центральной нуклеотидной пары [12, 13]. Узнавание *M.SsoII* обоих участков идет со стороны большой бороздки ДНК. Однако картины распределения контактов в комплексах *M.SsoII* с регуляторным участком и участком метилирования различны. В случае 5-звенного участка метилирования выше "плотность" распределения контактов по нуклеотидной последовательности. Во взаимодействии с *M.SsoII* вовлечены практически все гетероциклические основания и все фосфатные группы участка метилирования (рис. 2) и, кроме того, гетероциклические основания и фосфатные группы за пределами участка. В 15-звенном регуляторном участке только шесть гетероциклических оснований и три фосфатные группы существенны для формирования комплекса с *M.SsoII* [14]. Все вовлеченные во взаимодействие с *M.SsoII* группы атомов участка метилирования образуют единый кластер, а в случае регуляторного участка – два симметрично расположенных кластера. Эти данные, в частности, соответствуют предположению о том, что при метилировании *M.SsoII* действует как мономер, что характерно для ряда других 5-цитозинового ДНК-метилтрансфераз [4–7], а при регуляции – как димер [13]. Последний тип взаимодействия, при котором каждый мономер белка связывается с соответствующей половиной участка узнавания, характерен для транскрипционных факторов [21].

Наличие нескольких функций, в том числе и регуляторной, наблюдается у ряда эукариотических метилтрансфераз [22]. Они узнают в ДНК CpG-динуклеотиды и метилируют остатки цитозина с образованием 5-метилцитозина. Таким образом, бифункциональная прокариотическая ДНК-метилтрансфераза *SsoII* может быть интересна и с эволюционной точки зрения как переходное звено между прокариотическими и эукариотическими метилтрансферазами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Ферменты и химические реагенты: T4-поли-нуклеотидкиназа – коммерческий препарат производства ООО "СибЭнзим" (Новосибирск, Россия). Рекомбинантную форму *M.SsoII*, содержащую шесть остатков гистидина на N-конце белковой молекулы, выделяли по двухстадийной схеме, включающей хроматографию на гепарин-сефарозе и Ni-NTA-агарозе [23].

В работе использовали [^{32}P]АТФ (1000 Ки/моль) производства ВО "Изотоп" (Обнинск, Россия), *S*-аденозил-*L*-гомоцистеин фирмы "Sigma" (США) и poly(dI · dC) фирмы "ICN" (США). Все остальные химические реагенты – коммерческие препараты отечественного или зарубежного производства.

Олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали амидофосфитным методом в автоматическом режиме на синтезаторе фирмы "Applied Biosystems" (США) с использованием коммерческих реагентов и растворителей по стандартному регламенту. Амидофосфит 5-метил-2'-дезоксидитидина был получен по методике, описанной в работе [24].

$5'$ - ^{32}P -Фосфорилирование ($5'$ -мечение) олигонуклеотидов проводили по методике, описанной в работе [25]. Нуклеотидные последовательности определяли по методу Максама-Гилберта [26]. Реакционные смеси анализировали методом электрофореза в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

Комплексообразование *M.SsoII* с неметилированными и полуметилированными ДНК-дуплексами осуществляли в течение 20 мин при 37°C в 20 мкл буфера, содержащего 50 мМ Трис-НСl, рН 7.6, 150 мМ NaCl, 5 мМ β -меркаптоэтанол, 500 мкМ Hcy(Ado), 50 нг/мкл poly(dI · dC) и 10% глицерин.

Белково-нуклеиновый комплекс и свободный ДНК-дуплекс разделяли методом гель-электрофореза в 7% неденатурирующем ПААГ в ТВЕ-буфере (50 мМ Трис-борат, рН 8.2, 1 мМ EDTA) при 10 В/см и 4°C (метод "торможения" в геле) [16].

Константы связывания *M.SsoII* с ДНК-дуплексами определяли методом Скетчарда [19]: для неметилированных ДНК-дуплексов (I) и (II) концентрация *M.SsoII* составляла 20 нМ, а концентрацию субстрата изменяли от 5 до 20 нМ; для полуметилированных ДНК-дуплексов (III), (IV) концентрация *M.SsoII* составляла 6 нМ, а концентрацию субстрата варьировали от 2 до 8 нМ.

Метод "отпечатков" с *N*-этил-*N*-нитрозомочевинной [16]. Непосредственно перед опытом готовили насыщенный при 50°C раствор *N*-этил-*N*-нитрозомочевинной в этаноле; 100 мкл этого раствора прибавляли к 50 нмоль ДНК-субстрата, содержащего ^{32}P -метку на 5'-конце верхней или нижней цепи и растворенного в 100 мкл Na-какодилатного буфера (50 мМ какодилат натрия, 1 мМ EDTA, рН 8.0). Реакционную смесь инкубировали в течение

ние 60 мин при 50°C. ДНК-дуплекс осаждали этанолом в присутствии соосадиителя (4 мкг тРНК). Осадок отделяли центрифугированием, промывали 80% водным этанолом и высушивали в вакууме. Формировали комплекс между ДНК-субстратом и 500 нМ M.SsoII. ДНК, связавшуюся с белком, отделяли от непрореагировавшего субстрата методом "торможения" в геле. Обе фракции ДНК (связавшуюся и несвязавшуюся с белком) обрабатывали 1 М водным раствором NaOH при 90°C в течение 30 мин. Образовавшиеся фрагменты ДНК осаждали этанолом в присутствии 4 мкг тРНК. Осадок отделяли центрифугированием, промывали 80% этанолом, высушивали в вакууме и растворяли в 4 мкл 80% водного раствора формамида, содержащего 1 мМ EDTA, 10 мМ NaOH и красители-маркеры ксиленианол (0.1%) и бромфеноловый синий (0.1%). Фрагменты ДНК разделяли в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

Метод "отпечатков" с диметилсульфатом [16]. К 50 нмоль ДНК-субстрата, содержащего ³²P-метку на 5'-конце верхней или нижней цепи и растворенного в 200 мкл Na-какодилатного буфера (см. выше), добавляли 2 мкл диметилсульфата. После 4 мин инкубации при 20°C реакцию останавливали добавлением 50 мкл "стоп"-раствора (1.5 М ацетат натрия, 1 М β-меркаптоэтанол). ДНК-дуплекс дважды осаждали этанолом в присутствии 4 мкг тРНК. Осадок отделяли центрифугированием, промывали 80% водным этанолом и высушивали в вакууме. Формировали комплекс между ДНК-субстратом и 500 нМ M.SsoII. ДНК, связавшуюся с белком, отделяли от непрореагировавшего субстрата методом "торможения" в геле. Обе фракции ДНК (связавшуюся и несвязавшуюся с белком) обрабатывали 10% водным раствором пиперидина при 90°C в течение 30 мин. Раствор упаривали в вакууме и дважды переупаривали с водой. Фрагменты ДНК растворяли в 4 мкл 80% водного раствора формамида (см. выше). Фрагменты ДНК разделяли в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

Метод "отпечатков" с муравьиной кислотой [15]. К 50 нмоль ДНК-субстрата, содержащего ³²P-метку на 5'-конце верхней или нижней цепи и растворенного в 15 мкл TE-буфера (10 мМ Трис-HCl, 1 мМ EDTA, pH 8.0), добавляли 2.5 мкл 6% водного раствора муравьиной кислоты и инкубировали 60 мин при 37°C. ДНК-дуплекс дважды осаждали этанолом в присутствии 4 мкг тРНК. Далее последовательность процедур такая же, как в разделе "Метод "отпечатков" с диметилсульфатом".

Метод "отпечатков" с гидразином [15]. К 50 нмоль ДНК-субстрата, содержащего ³²P-метку на 5'-конце верхней или нижней цепи и растворенного в 10 мкл воды, добавляли 30 мкл 50% водного раствора гидразина и инкубировали 30 мин при

20°C. ДНК-дуплекс дважды осаждали этанолом в присутствии 4 мкг тРНК. Далее последовательность процедур такая же, как в разделе "Метод "отпечатков" с диметилсульфатом".

Визуализацию радиоактивных полос в геле и обсчет данных при определении констант проводили при помощи прибора "Molecular Dynamics PhosphorImager SI" (США), используя компьютерную программу Image Quantum, версия 5.0 (Центр коллективного пользования МГУ, грант № 96-04-55009).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Е.А. Романовой (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского) за синтез олигодезоксирибонуклеотидов. Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 01-04-48605а и 02-04-06783, программа МАС) и программы "Университеты России" (грант № 07.03.007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kumar S., Cheng X., Klimasauskas S., Mi S., Posfai J., Roberts R.J., Wilson G.G. // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 1–10.
2. Posfai J., Bhagwat A.S., Posfai G., Roberts R.J. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. P. 2421–2435.
3. Klimasauskas S., Nelson J.L., Roberts R.J. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 6183–1690.
4. Klimasauskas S., Kumar S., Roberts R.J., Cheng X. // Cell. 1994. V. 76. P. 357–369.
5. Reinisch K.M., Chen L., Verdine G.L., Lipscomb W.N. // Cell. 1995. V. 82. P. 143–153.
6. O'Gara M., Klimasauskas S., Roberts R.J., Cheng X. // J. Mol. Biol. 1996. V. 261. P. 634–645.
7. O'Gara M., Roberts R.J., Cheng X. // J. Mol. Biol. 1996. V. 263. P. 597–606.
8. Wu J., Santi D.V. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 4778–4786.
9. Renbaum P., Razin A. // J. Mol. Biol. 1995. V. 248. P. 19–26.
10. Finta C., Kiss A. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 2841–2846.
11. Никольская И.И., Лопатина Н.Г., Шишков С.В., Дебов С.С. // Биохимия. 1985. Т. 50. С. 1694–1700.
12. Karyagina A., Shilov I., Tashlitskii V., Khodoun M., Vasil'ev S., Lau P.C.K., Nikolskaya I. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 2114–2120.
13. Shilov I., Tashlitskii V., Khodoun M., Vasil'ev S., Alekseev Y., Kuzubov A., Kubareva E., Karyagina A. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 2659–2664.
14. Воробьева О.В., Васильев С.А., Карягина А.С., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. // Молекулярн. биология. 2000. Т. 34. С. 1074–1080.
15. Brunelle A., Schleif R.F. // Biochemistry. 1987. V. 84. P. 6673–6676.

16. DNA-Protein Interaction. Methods in Molecular Biology / Ed. Kneale G.G. New Jersey: Humana Press, 1994. V. 30. P. 125–138, 263–281.
17. O'Gara M., Horton J.R., Roberts R.J., Cheng X. // Nature Struct. Biol. 1998. V. 5. P. 872–877.
18. Yang A.S., Shen J.-C., Zingg J.-M., Mi S., Jones P.A. // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 1380–1387.
19. Варфаломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика. М.: Фаир-пресс, 1998. 720 с.
20. Szczelkun M.D., Connolly B.A. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 10724–10733.
21. Пташине М. Переключение генов. Регуляция генной активности и фаг λ . М.: Мир, 1988. 160 с.
22. S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structures and Functions / Eds Cheng X., Blumenthal R.M. Singapore; New Jersey; London; Hong Kong: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1999. P. 341–372.
23. Karyagina A., Lunin V., Levchenko I., Labbe D., Brouseau R., Lau P.C.K., Nikolskaya I. // Gene. 1995. V. 157. P. 93–96.
24. Tanaka T., Tamatsukuri S., Ikehara M. // Chem. Pharm. Bull. 1986. V. 34. P. 2044–2048.
25. Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001.
26. Maxam A., Gilbert W. // Methods Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.

An Analysis of Methyltransferase *SsoII*–DNA Contacts in the Enzyme–Substrate Complex

O. V. Vorob'eva*, **A. S. Karyagina****, **E. M. Volkov***,
M. B. Viryasov*, **T. S. Oretskaya***, and **E. A. Kubareva****

Phone: +7 (095) 939-3148; e-mail: kubareva@belozersky.msu.ru

* Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

** All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology,
Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow, 127550 Russia

The functional groups of the DNA methylation site that are involved in the DNA interaction with methyltransferase *SsoII* at the recognition stage were identified. The contacts in the enzyme–substrate complex were analyzed in the presence of *S*-adenosyl-*L*-homocysteine using the interference footprinting assay with formic acid, hydrazine, dimethyl sulfate, or *N*-ethyl-*N*-nitrosourea as a modifying reagent. It was shown that the replacement of the central A · T by the G · C pair in the methylation site did not affect the enzyme–DNA interaction, whereas the use of a substrate with one chain methylated (monomethylated substrate) instead of the unmethylated substrate dramatically changes the DNA contacts. The binding constants of unmethylated and monomethylated substrates with methyltransferase *SsoII* in the presence of *S*-adenosyl-*L*-homocysteine were calculated. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: 5-cytosine DNA methyltransferases, DNA methyltransferase *SsoII*, DNA–protein interactions, interference footprinting assay