



УДК 577.323

ВЛИЯНИЕ S-АДЕНОЗИЛ-L-МЕТИОНИНА И ЕГО АНАЛОГОВ НА САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ДНК-(АДЕНИН-N⁶)-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ ФАГА T4 С ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫМ СУБСТРАТОМ

© 2000 г. А. А. Евдокимов, В. В. Зиновьев, Э. Г. Малыгин[#]

Институт молекулярной биологии Государственного научного центра вирусологии
и биотехнологии "Вектор", 630559, Кольцово, Новосибирская обл.

Поступило в редакцию 09.06.2000 г. Принято к печати 22.06.2000 г.

С использованием флуоресценции 2-аминопуринзамещенных олигонуклеотидных дуплексов установлено выворачивание основания-мишени в процессе взаимодействия ДНК-(аденин-N⁶)-метилтрансферазы фага T4 (КФ 2.1.1.72) с субстратной двуспиральной ДНК. Показано, что донор метильной группы S-аденозил-L-метионин индуцирует переориентацию фермента относительно несимметрично модифицированного сайта узнавания.

Ключевые слова: ДНК-метилтрансфераза; модифицированные олигонуклеотиды.

ДНК-метилтрансферазы типа II главным образом узнают палиндромные последовательности длиной 4–6 п.о. и катализируют перенос метильной группы от донора S-аденозил-L-метионина (Met(Ado)) в определенное положение метилируемого нуклеотида, модифицируя положение С5 цитидина либо экзоциклические N⁶- или N⁴-аминогруппы аденозина или цитидина соответственно [1]. Сравнительная простота организации этих ферментов делают их одними из наиболее привлекательных объектов исследований, направленных на детальное изучение сайт-специфического взаимодействия ДНК–белок. В частности, на примере метилтрансфераз *HhaI* [2] и *HaeIII* [3] был впервые обнаружен интересный и функционально важный механизм выворачивания (flipping) ферментом основания из двойной спирали ДНК, присущий, по-видимому, многим ферментам модификации и репарации ДНК [4].

ДНК-(аденин-N⁶)-метилтрансфераза фага T4 узнает палиндром GATC, катализируя метилирование остатков аденозина. В настоящей работе мы исследовали взаимодействие этого фермента с 20-мерными олигонуклеотидными дуплексами (таблица), содержащими вместо одного из модифицируемых остатков аденина сайта узнавания флуоресцирующий изомер – 2-аминопурин. Интенсивность флуоресценции 2-аминопурина, включенного в двуспиральную ДНК, низка, но резко возрастает при выводе флуорофора из стэкинг-взаимодействия, позволяя изучать процесс выворачивания ферментом основания [5, 6].

Для измерений использовали двулучевой спектрофлуориметр Shimadzu-560 (Япония). Флуоресценцию возбуждали и регистрировали на длинах волн 320 и 370 нм, соответствующих максимумам спектров возбуждения и флуоресценции 2-аминопурина. Измерения проводили в буфере, содержащем 100 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 0.2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 5% глицерина [7], при 25°C в присутствии возрастающих концентраций фермента. Исходный сигнал флуоресценции дуплекса вычитали. Не содержащую ДНК контрольную кювету использовали для учета светорассеяния и собственной флуоресценции метилтрансферазы. В другом эксперименте метилтрансферазу фага T4 титровали 2-аминопуринсодержащим олигонуклеотидным дуплексом с возрастающей концентрацией. В этом случае в контрольной кювете отсутствовал фермент.

Синтетические олигодезоксирибонуклеотидные дуплексы

Обозначение	Структура*
N/M	5' CAGTTT TAGGNTCCATTTT CAC GTCAAATCCTMGGTAAAGTCS'
N/A	5' CAGTTT TAGGNTCCATTTT CAC GTCAAATCCTAGGTAAGTCS'
N/N	5' CAGTTT TAGGNTCCATTTT CAC GTCAAATCCTNGGTAAGTCS'

* Подчеркнут участок узнавания (GATC). N – 2-аминопурин; M – N⁶-метиладенин.

[#] Автор для переписки (e-mail: malygin@vector.nsc.ru).

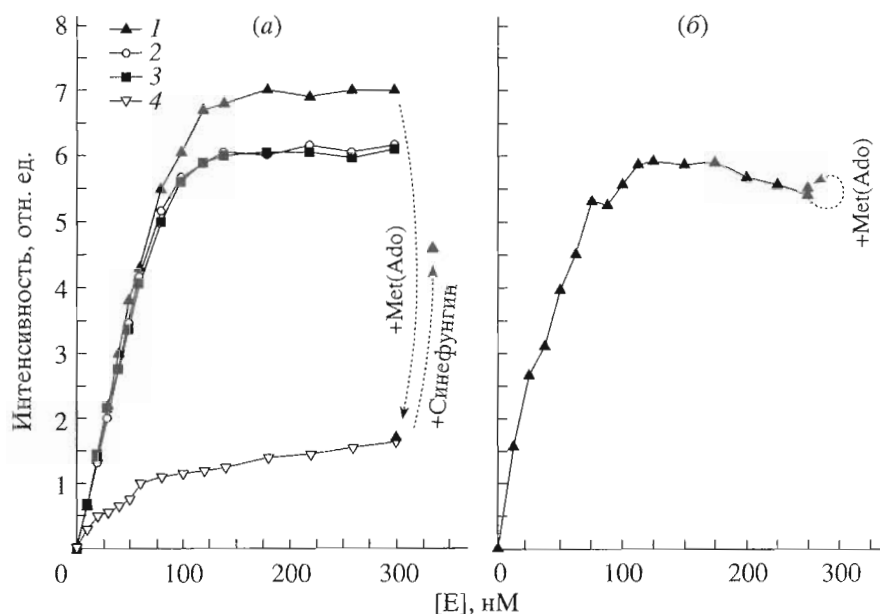


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции N/M- и N/N-дуплексов от концентрации ДНК-(аденин- N^6)-метилтрансферазы фага T4. (а) Зависимость интенсивности флуоресценции N/M-дуплекса (50 нМ) от концентрации фермента (кривая 1) и в присутствии насыщающих концентраций синефунгина (5 мкМ) (кривая 2), Нсу(Ado) (20 мкМ) (кривая 3) и Met(Ado) (8 мкМ) (кривая 4). В последней точке титрования N/M-дуплекса метилтрансферазой был добавлен Met(Ado) до концентрации 8 мкМ, затем синефунгин до концентрации 100 мкМ. (б) Зависимость интенсивности флуоресценции N/N-дуплекса (200 нМ) от концентрации метилтрансферазы. В последней точке титрования был добавлен Met(Ado) до концентрации 8 мкМ.

Добавление метилтрансферазы к N/M-дуплексу приводило к увеличению интенсивности флуоресценции 2-аминопурина (рис. 1а). Интенсивность достигала 50-кратного увеличения при насыщающих концентрациях фермента. Данный результат аналогичен полученным для нескольких других метилтрансфераз [5, 6] и согласуется с предположением о выворачивании 2-аминопурина из двойной спирали при взаимодействии с метилтрансферазой фага T4.

Далее были проведены эксперименты в присутствии насыщающих концентраций Met(Ado) и ингибиторов реакции метилирования, *S*-аденозил-*L*-гомоцистеина (Нсу(Ado)) и синефунгина, конкурентных по отношению к донору. Как видно на рис. 1а, аналоги Met(Ado) незначительно (10–15%) снижали интенсивность флуоресценции при насыщающих концентрациях фермента, тогда как Met(Ado) вызывал резкое (80%) падение интенсивности флуоресценции 2-аминопурина независимо от порядка добавления субстратов. Значительный рост сигнала при последующем добавлении синефунгина доказывает специфичность и обратимость эффекта, вызываемого Met(Ado) (рис. 1а).

С целью прояснения механизма действия Met(Ado) было проведено титрование ферментом симметричного N/N-дуплекса. В отличие от дуплекса N/M исходная флуоресценция 2-аминопури-

нов в N/N-дуплексе была значительно интенсивней, что указывает на частичную дестабилизацию стэкинга в сайте с двойным замещением. Тем не менее и в этом случае наблюдался 2.5-кратный рост сигнала при насыщающих концентрациях фермента, тогда как добавление Met(Ado) не влияло на интенсивность флуоресценции (рис. 1б). Такой результат противоречит возможным предположениям о том, что Met(Ado) может препятствовать выворачиванию 2-аминопурина, либо вызывать тушение его флуоресценции. Учитывая общепринятое представление о возможности двух альтернативных ориентаций метилтрансферазы относительно палиндромного сайта узнавания [8] и отсутствие влияния Met(Ado) на флуоресценцию симметричного N/N-дуплекса, значительное снижение интенсивности флуоресценции несимметричного N/M-дуплекса при добавлении донора может быть объяснено преимущественной перориентацией фермента в альтернативное положение с выворачиванием остатка N^6 -метиладенозина. Аналогичные результаты, включая влияние аналогов Met(Ado), были получены в случае N/A-дуплекса (данные не приведены).

Метилтрансфераза фага T4 способна образовывать олигомерные формы в условиях избытка фермента над субстратной ДНК, тогда как при избытке ДНК регистрируются комплексы с участием мономера фермента [9]. По этой причине было дополнительно проведено обратное титро-

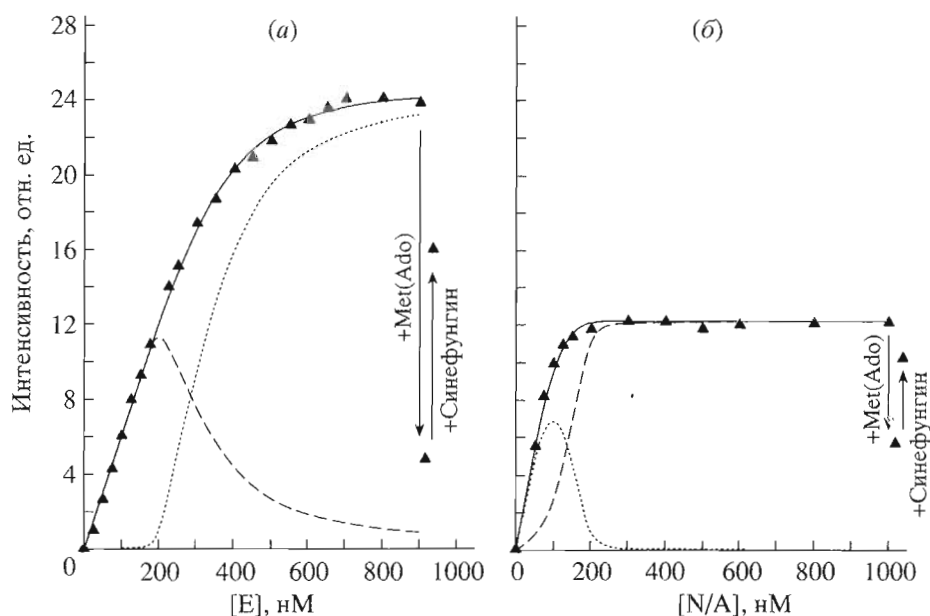


Рис. 2. Изменение интенсивности флуоресценции при титровании N/A-дуплекса (200 нМ) ДНК-(аденин- N^6)-метилтрансферазой фага T4 (а) и фермента (200 нМ) N/A-дуплексом (б). Сплошная линия рассчитана согласно предложенной модели связывания. Пунктирная и точечная линии отражают вклад в интенсивность флуоресценции комплексов с мономерной и димерной формой фермента соответственно. В последних точках титрований был добавлен Met(Ado) до концентрации 8 мкМ, затем синефунгин до концентрации 100 мкМ.

вание метилтрансферазы N/A-дуплексом. Добавление дуплекса к раствору с фиксированной концентрацией фермента (200 нМ) также приводило к резкому увеличению сигнала флуоресценции (рис. 2б), однако вид кривой флуоресценции существенно отличался от вида кривой, полученной при титровании ферментом раствора дуплекса с той же фиксированной концентрацией (200 нМ) (рис. 2а). При титровании фермента дуплексом интенсивность флуоресценции быстро достигает максимума, тогда как при титровании дуплекса ферментом рост интенсивности продолжается, достигая при насыщении вдвое большего уровня по сравнению с максимумом на рис. 2б. Следовательно, в обоих случаях на поздних стадиях титрования образуются фермент-субстратные комплексы с различной степенью деформации структуры ДНК.

Обе кривые титрования хорошо описываются моделью последовательного взаимодействия лигандов (рис. 3). Согласно данной модели, увеличение концентрации дуплекса приводит к двойному комплексу, содержащему мономер фермента (рис. 2б), в то время как увеличение концентрации метилтрансферазы приводит к образованию тройного комплекса, содержащего две субъединицы фермента (рис. 2а). Двукратное различие в интенсивности флуоресценции двойного и тройного комплексов с дуплексом N/A означает, что в последнем две субъединицы фермента выворачивают оба основания в модифицируемых позициях

сайта, так что все остатки 2-аминопурина оказываются вне двойной спирали ДНК. Следовательно, в отсутствие второго субстрата, Met(Ado), нет избирательности в ориентации относительно цепей несимметричного N/A-дуплекса как для мономерной, так и для димерной формы фермента. В то же время добавление в конце обоих титрований Met(Ado) (рис. 2а, б) ведет к метилированию аденозина, при этом в обоих случаях интенсивность флуоресценции резко снижается. Это указывает на избирательное взаимодействие фермента с дуплексом, при котором вероятность

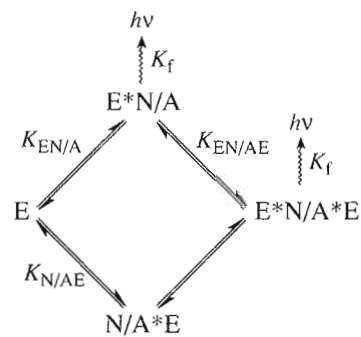


Рис. 3. Схема связывания фермента с N/A-дуплексом, где E – ДНК-(аденин- N^6)-метилтрансфераза фага T4; K_f – интенсивность флуоресценции комплексов с вывернутым 2-аминопурином (отн. ед./нМ); $K_{E/N/A}$, $K_{N/A/E}$ и $K_{E/N/AE}$ (нМ) – константы диссоциации соответствующих комплексов.

выворачивания N^6 -метиладенина в 4–5 раз выше по сравнению с 2-аминопурином. Такая избирательность в значительной мере уменьшается при последующем добавлении синефунгина, конкурирующего с Met(Ado) за связывание с ферментом (рис. 2а, б).

Таким образом, функции Met(Ado) далеко не ограничиваются ролью донора метильной группы. Met(Ado) индуцирует конформационную перестройку метилтрансферазы [10], результатом которой является не только наблюдавшееся ранее увеличение сродства фермента к последовательности узнавания в целом [9, 11], но и, как показано в настоящей работе, более избирательная специфичность относительно модифицируемых позиций сайта. Следствием такой индуцируемой Met(Ado) специфичности является способность метилтрансферазы к быстрой переориентации относительно несимметрично модифицированного сайта узнавания. Последнее должно быть важным, в частности, для эффективного метилирования пострепликативной полуметилированной ДНК *in vivo*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность С. Хаттману, С. Шлагману (Университет Рочестера, Нью-Йорк, США), У. Линдстрему и Н. Рейху (Университет Калифорнии, Санта-Барбара, США), любезно предоставившим препараты гомогенной метилтрансферазы фага Т4 и синтетических олигонуклеотидов; С.Е. Олькину (ГНЦ вирусологии и биотехнологии “Вектор”) за предоставленную возможность использовать спектрофлуориметр

Shimadzu-560; А.И. Закабунину (ГНЦ вирусологии и биотехнологии “Вектор”) за ценное обсуждение рукописи. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 99-04-49868) и Международного фонда Джона Е. Фогарти (TW00529).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cheng X. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1995. V. 24. P. 293–318.
2. Klimasauskas S., Kumar S., Roberts R.J., Cheng X. // *Cell*. 1994. V. 76. P. 357–369.
3. Reinisch K.M., Chen L., Verdine G.L., Lipscomb N. // *Cell*. 1995. V. 82. P. 143–153.
4. Roberts R.J., Cheng X. // *Annu. Rev. Biochem.* 1998. V. 67. P. 181–198.
5. Allan B.W., Reich N.O. // *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 14757–14762.
6. Holz B., Klimasauskas S., Serva S., Weinhold E. // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. P. 1076–1083.
7. Kossykh V.G., Schlagman S.L., Hattman S. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 14389–14393.
8. Reich N.O., Mashhoon N. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 9191–9193.
9. Malygin E.G., Zinoviev V.V., Petrov N.A., Evdokimov A.A., Jen-Jacobson L., Kossykh V.G., Hattman S. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. P. 1135–1144.
10. Тузиков Ф.В., Тузикова Н.А., Наумочкин А.Н., Зиновьев В.В., Малыгин Э.Г. // *Молекуляр. биология*. 1997. Т. 31. С. 86–90.
11. Malygin E.G., Petrov N.A., Gorbunov Yu.A., Kossykh V.G., Hattman S. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4393–4399.

Effect of *S*-Adenosyl-*L*-methionine and Its Analogues on Site-specific Binding of DNA-(adenine- N^6)-methyltransferase of T4 Phage with the Oligonucleotide Substrate

A. A. Evdokimov, V. V. Zinoviev, and E. G. Malygin[#]

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

Using fluorescence of 2-aminopurine-substituted oligonucleotide duplexes, “flipping” of the target base in the process of interaction of T4 DNA-(adenine- N^6)-methyltransferase (EC 2.1.1.72) with the substrate double-stranded DNA was revealed. It was shown that *S*-adenosyl-*L*-methionine, the methyl group donor, induces the reorientation of the enzyme relative to the asymmetrically modified recognition site.

Key words: DNA methyltransferase, modified oligonucleotides

[#] 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. 10. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.