



УДК 577.21:577.152.211*72.04

М.*BstF5I*-4 – ЧЕТВЕРТАЯ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗА СИСТЕМЫ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ *BstF5I* ИЗ *Bacillus stearothermophilus* F5

© 2002 г. Л. Н. Голикова^{##}, В. В. Гуторов^{*}, А. А. Евдокимов^{*}, С. Н. Шелкунов^{*},
Д. А. Гончар^{**}, С. С. Охупкина^{***}, С. Х. Дегтярев^{**}, Н. А. Нетесова^{*}

^{*} Институт молекулярной биологии Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии "Вектор", 630559, Кольцово, Новосибирская обл.;

^{**} Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, Новосибирск;

^{***} ООО "СибЭнзим", Новосибирск

Поступило в редакцию 03.09.2001 г. Принято к печати 01.10.2001 г.

В системе рестрикции-модификации (PM) *BstF5I* обнаружена четвертая сайт-специфическая ДНК-метилтрансфераза *BstF5I*-4, модифицирующая верхнюю цепь узнаваемой последовательности (5') GGATG/(5')CATCC. Таким образом, в отличие от всех известных в настоящее время систем рестрикции-модификации (PM), PM-система *BstF5I* включает четыре гена, кодирующих ДНК-метилтрансферазы, причем три из них обладают одинаковой субстратной специфичностью и метилируют аденин в последовательности (5')GGATG.

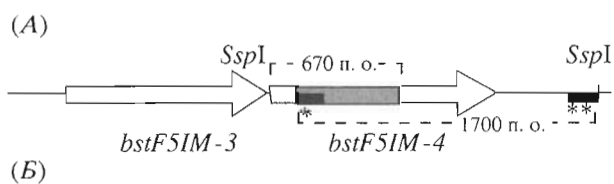
Ключевые слова: *Bacillus stearothermophilus*; ДНК-метилтрансфераза; системы рестрикции-модификации.

ДНК-метилтрансферазы катализируют перенос метильной группы от донора *S*-аденозил-*L*-метионина в определенное положение нуклеотида в специфической узнаваемой последовательности ДНК с образованием *N*⁶-метиладенина, *C*5-метилцитозина или *N*⁴-метилцитозина [1]. В случае адениновых ДНК-метиляз (КФ 2.1.172) сравнительный анализ их первичных структур выявил девять консервативных мотивов, согласно составу и взаимному расположению которых выделяют три класса этих ферментов: D₁₂, D₂₁ и N₁₂ [2].

Для систем PM с непалиндромным сайтом узнавания характерно наличие двух ДНК-метилтрансфераз, каждая из которых модифицирует лишь одну из цепей ДНК в узнаваемой последовательности [3]. Исключениями являются гомологичные системы PM *FokI* [4] и *StsI* [5], которые содержат по одной метилазе, состоящей из двух доменов, каждый из которых содержит полный набор ДНК-метилтрансферазных консервативных мотивов класса D₁₂. Размер такого домена (300–350 а.о.) примерно совпадает со средним размером обычных ДНК-метиляз [6].

Ранее нами был обнаружен штамм *Bacillus stearothermophilus* F5, продуцирующий эндонуклеазу рестрикции *BstF5I*, узнающую ту же специфическую последовательность (5')GGATG/(5')CATCC, что и эндонуклеазы рестрикции *FokI* и *StsI*, но расщепляющую ДНК в положении 2/0, что отличается от положений гидролиза ДНК-рестрикта-

зами *FokI* (9/13) и *StsI* (10/14) [7]. В ходе изучения системы PM *BstF5I* нами были клонированы и определены нуклеотидные последовательности трех ДНК-метилтрансфераз этого штамма: М.*BstF5I*-1 [8], М.*BstF5I*-2 [9] и М.*BstF5I*-3 [10]. Было показано, что М.*BstF5I*-1 и М.*BstF5I*-3 метилируют аденин в верхней цепи узнаваемого сайта, а М.*BstF5I*-2 модифицирует нижнюю цепь. М.*BstF5I*-1 не обнаруживает значительной гомологии с метилазами *FokI* и *StsI* (D₁₂) и относится к другому классу ДНК-метилтрансфераз (D₂₁). М.*BstF5I*-2 и М.*BstF5I*-3 относятся к D₁₂-классу и гомологичны *C*- и *N*-концевым



(Б) Аминокислотная последовательность М.*BstF5I*-4.

```

MKFLNEBELKKVIEKKKLSDYSEILNQLNEVIKQNLNLIKSYKNKEKLAKSNSEKD
SIPFLDAYPDYINLSQLPSWVRENINEAIVVGSKKVQVQINDGRKYHLNLSLNDLSGQE
WTFFTCSVINTRYPTQKGEYAHNIRKVNHPSPKPPQLTKEISFFTKENEVVLDYFM
GVGGTLLGASLCNRRRAI GIDLNGFYIEKYKEAARALNLDLQHTIQGDAIEILANKQS
LISDILKGEKFSVLVLDPPYGDMMSRKKTGEAIKKKQDSSATPFTDSPKDLGNMEEA
DFYKNLKNVQNSLKLKGGHVVFIFKDIQPKGQNLNLLHADLIYLINEIDELYYL
GTKIWAHDSVNLFPYGYPFYSVSNQIHQYILIFKFKT
    
```

(А) Расположение гена *bstF5IM*-4 системы рестрикции-модификации *BstF5I* на прочитанной части генома *B. stearothermophilus* F5. Черными прямоугольниками обозначены праймеры: * генспецифический, ** адаптерный; серым цветом обозначена область перекрывания ранее прочитанной структуры и структуры ПЦР-фрагмента. (Б) Аминокислотная последовательность М.*BstF5I*-4.

[#] Автор для переписки (эл. почта: golikova@vector.nsc.ru).

доменам ферментов-изоизомеров *FokI* и *StsI* (около 80% гомологии) [9, 10].

При анализе первичной структуры прочитанной области ДНК, лежащей за геном *bstF5IM-3* (670 п.о.) была обнаружена неполная рамка трансляции, содержащая консервативные мотивы X, I, II, характерные для адениновых ДНК-метилтранс-

фераз [10]. Полную нуклеотидную последовательность четвертой рамки удалось определить с помощью метода селективной супрессии полимеразной цепной реакции [11]. Геномную ДНК *B. stearothermophilus* F5 гидролизировали рестриктазой *SspI* и лигировали со специфическим псевдодвуцепочечным адаптером (супрессионным адаптером):

(5')GCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGT
(5')ACCGCCCTCCGC

Далее этот продукт сшивки подвергали ПЦР-амплификации с праймером, соответствующим внешней части адаптера (5')TGTAGCGTGAAGACGACAGAA, и специфическим праймером, сконструированным на основе уже известной последовательности изучаемого гена (5')CATTTCTTGACGCTTATCCTGA (олигонуклеотид, идентичный участку ДНК OPT-4). При этом селективно амплифицируются только те молекулы, которые содержат комплементарную нуклеотидную последовательность для отжига генспецифического праймера. Амплификация молекул, не содержащих такую последовательность, подавляется благодаря эффекту селективной супрессии полиме-

разной цепной реакции. В результате был получен продукт полимеразной цепной реакции длиной 1700 п.о. Сопоставление нуклеотидной последовательности прочитанной ранее области в 670 п.о. [10] и прочитанного ПЦР-фрагмента в 1700 п.о. позволило выявить полную OPT-4, длиной 1143 п.о. (рисунок). Все четыре рамки лежат в геноме *BstF5I* друг за другом в одном направлении.

Ген, названный нами *bstF5IM-4*, получен методом ПЦР, где в качестве матрицы использовали геномную ДНК *B. stearothermophilus* F5 и праймеры, рассчитанные при помощи программы "OLIGO" [12], следующего состава (5' → 3'):

►Start OPT-4
CCCCATATGAAATTTCTTAAATGAAGAAGAGTTAA
CCCGGATCCGGTTAGCTTTTAAAGTTTCTTT
Stop◀

Ген клонирован в экспрессирующий вектор рJW [13] по сайтам рестрикции *NdeI* и *BamHI* под термоиндуцибельный промотор фага λ. Белок был очищен до гомогенного состояния, его молекулярная масса составила 44 кДа. Защита ДНК плазмиды рJWM-4 (несущей ген *bstF5IM-4*) от гидролиза рестриктазой *BstF5I* однозначно свиде-

тельствует, что данная OPT кодирует четвертую сайт-специфическую ДНК-метилтрансферазу этой же системы рестрикции-модификации *BstF5I*. Субстратную специфичность *M.BstF5I-4* определяли с использованием олигонуклеотидного дуплекса (подчеркнут сайт узнавания эндонуклеазой *BstF5I*):

(5')CAAGGATGCATATGACCAGGTCCAGCTAGCGGGTA
(3')GTTCCCTACGTATACTGGTCCAG

и ³H-меченого S-аденозил-L-метионина как описано ранее [8, 10]. Оказалось, что *M.BstF5I-4*, также как *M.BstF5I-1* [8] и *M.BstF5I-3* [10], метилирует верхнюю цепь сайта узнавания (5')GGATG (таблица). Таким образом, система PM *BstF5I* включает три ДНК-метилазы с одинаковой субстратной специфичностью, при этом данные ферменты не являются гомологичными белками.

То, что каждый из четырех ДНК-метилтрансферазных генов, клонированных по отдельности, способен защитить ДНК несущей его плазмиды от

расщепления эндонуклеазой рестрикции *BstF5I*, говорит о том, что все эти гены могут быть функционально активными *in vivo*. Изучаемая система PM *BstF5I* является уникальной среди известных систем PM, так как включает более двух, а именно четыре, активных ДНК-метилтрансферазных гена, причем продукты трех из них модифицируют верхнюю цепь сайта узнавания. Причина избыточности ДНК-метилтрансфераз в геноме *BstF5I* остается открытой и требует дальнейшего изучения.

Результаты определения субстратной специфичности *M.BstF5I-4* по количеству включенного [³H] S-аденозил-L-метионина

Длина цепи	Количество включенного ³ H, имп./мин
Фон	416
35	30218
22	3828

Работа выполнена при поддержке фонда РФФИ (проект № 00-04-49153).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cheng X. // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1995. V. 24. P. 293–318.
2. Timinskas A., Butkus V., Janulaitis A. // Gene. 1995. V. 157. P. 3–11.
3. Szybalski W., Kim S.C., Hasan N., Podhajski A.J. // Gene. 1991. V. 100. P. 13–26.
4. Sugisaki H., Kita K., Takanami M. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 5757–5761.
5. Kita K., Suisha M., Kotani H., Yanase H., Kato N. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 4167–4172.
6. Leismann O., Roth M., Friedrich T., Wende W., Jeltsch A. // Eur. J. Biochem. 1998. V. 251. P. 899–906.
7. Abdurashitov M.A., Kileva E.V., Shinkarenko N.M., Shevchenko A.V., Dedkov V.S., Degtyarev S.K. // Gene. 1996. V. 172. P. 49–51.
8. Degtyarev S.Kh., Netesova N.A., Abdurashitov M.A., Shevchenko A.V. // Gene. 1997. V. 187. P. 217–219.
9. Абдурашитов М.А., Нетесова Н.А., Голикова Л.Н., Гуторов В.В., Белавин П.А., Дегтярев С.Х. // Молекулярн. биология. 2000. Т. 34. С. 87–94.
10. Голикова Л.Н., Нетесова Н.А., Гуторов В.В., Белавин П.А., Абдурашитов М.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. // Молекулярн. биология. 2000. Т. 34. С. 443–447.
11. Siebert P.D., Chenchik A., Kellogg D.E., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 1087–1088.
12. Rychlik W., Rhoads R.E. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. P. 8543.
13. Kossykh V.G., Schlagman S.L., Hattman S.M. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 14389–14393.

***M.BstF5I-4*, the Forth DNA-Methyltransferase of the *BstF5I* Restriction–Modification System from *Bacillus stearothermophilus* F5**

L. N. Golikova^{*,#}, V. V. Gutorov^{*}, A. A. Evdokimov^{*}, S. N. Shchelkunov^{*}, D. A. Gonchar^{**}, S. S. Okhapkina^{***}, S. Kh. Degtyarev^{**}, and N. A. Netesova^{*}

E-mail: golikova@vector.nsc.ru

^{*}Institute of Molecular Biology, Vector State Research Center of Virology and Biotechnology, Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, Novosibirsk, 630559 Russia

^{**}Institute of Molecular Biology and Biophysics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630117 Russia

^{***}SibEnzyme, Novosibirsk, 630117 Russia

The fourth DNA-methyltransferase of the *BstF5I* restriction–modification (RM) system from *Bacillus stearothermophilus* F5 (*M.BstF5I-4*) was discovered, which modifies the adenine residue within the upper strand of the recognition site 5'-GGATG-3'/5'-CATCC-3'. Thus, unlike other known RM systems, the *BstF5I* RM system comprises four genes encoding DNA-methyltransferases, three of which possess the same substrate specificity and methylate adenine within the 5'-GGATG sequence. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: *Bacillus stearothermophilus*, DNA-methyltransferase, restriction–modification systems