

УДК 577.113.4

Особенности регуляции экспрессии генов в системе рестрикции–модификации Ecl18kI

О. Ю. Буренина¹, Е. А. Федотова¹, А. Ю. Рязанова², А. С. Проценко³, М. В. Захарова³,
А. С. Карягина^{2,4,5}, А. С. Солонин³, Т. С. Орецкая^{1,2}, Е. А. Кубарева^{2*}

¹Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

³Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, 142290, Пущино, просп. Науки, 5

⁴НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

⁵ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42

*E-mail: kubareva@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 29.11.2012

РЕФЕРАТ Регуляция транскрипции в бактериальных системах рестрикции–модификации (Р–М) является важным процессом, обеспечивающим согласованную экспрессию тандема ферментов – ДНК-метилтрансферазы (МТазы) и эндонуклеазы рестрикции (ЭР), защищающих клетку от проникновения чужеродной ДНК. В данной работе исследовали С5-цитозиновою МТазу Ecl18kI (M.Ecl18kI), по структуре и свойствам практически идентичную МТазе SsoII (M.SsoII). Обе МТазы ингибируют экспрессию собственного гена и активируют экспрессию гена сопряженной ЭР, связываясь с регуляторным участком в промоторной области этих генов. Нами изучено комплексообразование M.Ecl18kI и РНК-полимеразы *Escherichia coli* с промоторными областями генов МТазы и ЭР, детализирован механизм регуляции экспрессии генов в системе Р–М Ecl18kI. Показано, что M.Ecl18kI конкурирует с РНК-полимеразой за связывание с промоторным участком, однако непосредственных контактов между M.Ecl18kI и РНК-полимеразой не выявлено. Изучены свойства мутантных форм M.Ecl18kI и M.SsoII. Установлено, что аминокислотные замены в N-концевой области M.Ecl18kI, выполняющей регуляторную функцию, влияют не только на способность этого белка взаимодействовать с регуляторным участком и выступать в роли фактора транскрипции, но и на его способность связывать и метилировать ДНК-субстрат. Потеря МТазой метилирующей активности не препятствует регуляции этим белком транскрипции генов в системе Р–М Ecl18kI и даже усиливает сродство к регуляторному участку. Однако наличие в молекуле M.Ecl18kI домена, ответственного за метилирование, необходимо для выполнения регуляторной функции M.Ecl18kI.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА системы рестрикции–модификации, С5-цитозиновая ДНК-метилтрансфераза, ДНК-белковые взаимодействия, регуляция транскрипции.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МТазы – ДНК-метилтрансфераза; ПААГ – полиакриламидный гель; РНКП – РНК-полимераза; система Р–М – система рестрикции–модификации; ЭР – эндонуклеаза рестрикции; AdoMet – S-аденозил-L-метионин; M.Ecl18kI – ДНК-метилтрансфераза Ecl18kI; M.SsoII – ДНК-метилтрансфераза SsoII; R.Ecl18kI – эндонуклеаза рестрикции Ecl18kI. Префикс «d» при обозначении дезоксирибонуклеозидов, олигодезоксирибонуклеотидов и ДНК-дуплексов опущен.

ВВЕДЕНИЕ

Системы рестрикции–модификации (Р–М) широко распространены в бактериальных клетках, они содержат гены, кодирующие эндонуклеазы рестрикции (ЭР) и ДНК-метилтрансферазы (МТазы). ЭР гидролизует определенную последовательность

в двухцепочечной ДНК (дцДНК), в то время как МТазы метилирует эту же последовательность в строго определенном месте, предотвращая тем самым ее расщепление ЭР. Система Р–М выполняет функцию примитивной иммунной системы, защищающей бактерию-хозяина от проникновения чужеродной

ДНК: ЭР гидролизует вторгающуюся ДНК, не метилированную должным образом соответствующей МТазой [1]. Уровень активности ЭР и МТазы в клетке должен быть строго скоординирован. Слишком низкий уровень экспрессии гена МТазы по сравнению с геном ЭР приводит к гибели клетки в результате гидролиза клеточной ДНК, а слишком высокий не может обеспечить клетке защиту при проникновении чужеродной ДНК.

Хотя наличие регуляции экспрессии генов в системах Р–М очевидно, механизмы этого процесса практически не изучены. Проведенные в последнее время исследования показали, что скоординированная экспрессия генов в системах Р–М определяется, по-видимому, регуляцией на уровне транскрипции. Выделяют три основных типа подобной регуляции: посредством С-белков (от англ. «control»), метилированием промоторной области системы Р–М МТазой, а также посредством взаимодействия МТазы с регуляторными участками ДНК, отличными от участка метилирования [2]. Последний тип регуляции характерен для С5-цитозинового МТаз (ферментов, метилирующих остаток цитозина в 5-м положении) из систем Р–М типа II и является предметом нашего исследования. На настоящий момент охарактеризовано более 300 С5-цитозинового МТаз (С5-МТаз), но существование регуляторной функции экспериментально подтверждено только у шести из них (М.МspI, М.ЕcoRII, М.ScrFIA, М1.LlaJI, М.SsoII и М.Еcl18kI) [2].

Наиболее хорошо изучена система Р–М типа II SsoII. Гены этой системы расположены в природной плазмиде Р4 (4250 п.н.) штамма *Shigella sonnei* 47, они направлены дивергентно, межгенная область составляет 109 п.н. [3]. Описаны еще четыре SsoII-подобные системы Р–М, выделенные из различных бактериальных штаммов, МТазы которых либо идентичны М.SsoII по аминокислотной последовательности (М.Kpn2kI из *Klebsiella pneumoniae* 2k), либо имеют незначительные отличия. Так, МТазы Ecl18kI из *Enterobacter cloacae* 18k и StyD4I из *Salmonella typhi* D4 содержат в позиции 56 Met вместо Ile, а МТаза SenPI из *Salmonella enteritidis* P1 содержит не только Ile56, но и Gly в позиции 11 вместо Glu [4–7]. Нуклеотидные последовательности соответствующих генов идентичны на 99–100%, а межгенных областей – на 100%. Поэтому данные о функционировании ферментов одной из этих систем могут быть распространены на остальные.

Все SsoII-подобные системы Р–М узнают в дцДНК последовательность 5'-CCNGG-3'/3'-GGNCC-5' (N = A, G, C или T) и в присутствии кофактора S-аденозил-L-метионина (AdoMet) метилируют внутренний остаток C в этой последовательности

с образованием 5-метил-2'-дезоксцитидина [4]. На примере системы Ecl18kI определены промоторные элементы генов, кодирующих ЭР и МТазу SsoII-подобных систем Р–М [8], а также показана *in vitro* регуляция транскрипции этих генов посредством М.Ecl18kI. Для регуляции транскрипции М.Ecl18kI связывается с так называемым регуляторным участком – 15-звенным инвертированным повтором 5'-GGACAAATTGTCCT-3'/3'-CCTGTTTAACAGGA-5', локализованным внутри промоторной области генов системы Р–М Ecl18kI [9]. В регуляторном участке расположены нуклеотиды, участвующие в формировании специфических ДНК-белковых контактов с МТазой (рис. 1) [10, 11]. Все SsoII-подобные МТазы являются двухдоменными белками, N-концевая область (1–71 а.о.) которых обеспечивает регуляцию транскрипции, а участок 72–379 а.о. отвечает за функцию метилирования ДНК. Показано, что у М.SsoII N-концевая область имеет ярко выраженную вторичную структуру [12], в которой с высокой степенью вероятности предсказывается структурный модуль «спираль–поворот–спираль» (СПС). С регуляторным участком взаимодействуют две молекулы М.SsoII, мономерной в апо-форме [12]. На рис. 1 обобщены данные из работы [13] о предполагаемых контактах в комплексе N-концевой области М.SsoII с регуляторным участком ДНК.

Для детализации механизма регуляции транскрипции генов в SsoII-подобных системах Р–М в данной работе оценена эффективность комплексообразования

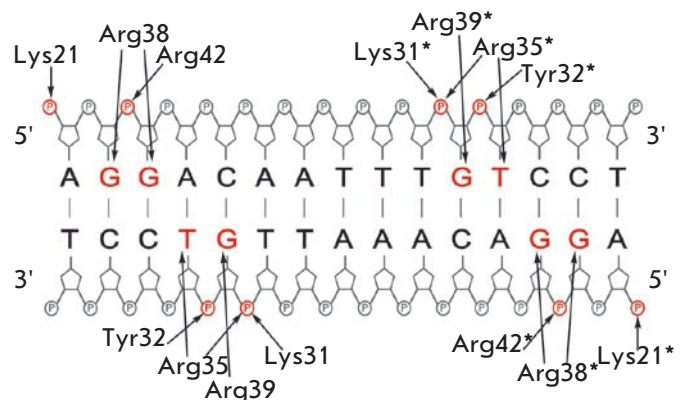


Рис. 1. Схема контактов аминокислотных остатков димера N-концевой области М.SsoII с регуляторным участком ДНК. Гетероциклические основания и фосфатные группы, идентифицированные методом футпринтинга как вовлеченные во взаимодействие с М.SsoII, выделены красным цветом. Аминокислотные остатки второй субъединицы М.SsoII отмечены звездочкой

зования M.Ecl18kI и РНК-полимеразы (РНКП) *E. coli* с фрагментами ДНК, содержащими регуляторные элементы генов системы Р-М Ecl18kI. Все известные SsoII-подобные системы Р-М выделены из различных штаммов энтеробактерий, к которым относится и *E. coli*, поэтому использование РНКП *E. coli* вполне оправдано. Впервые изучено значение остатков Lys21, Lys31, Lys46 и Lys53 в N-концевой области M.Ecl18kI для связывания этого белка с регуляторным участком, а также их влияние на способность МТазы действовать в качестве фактора транскрипции и на взаимодействие фермента с участком метилирования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение белков

МТазу Ecl18kI и ее мутантные формы выделяли с помощью аффинной хроматографии на Ni-НТА-агарозе [4]. РНК-полимеразу *E. coli* выделяли последовательно аффинной хроматографией на Ni-НТА-агарозе и гепарин-сефарозе, а затем ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе [14].

Синтез ДНК-фрагментов I–III

Фрагменты I–III синтезировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на приборе Eppendorf Mastercycler personal (Eppendorf North America, США). ДНК-фрагмент I получали с использованием праймеров 5'-TTGAGTCAATGAAGTCTTTCTC-3' и 5'-AGCAAATGGCGTAATAAAATGC-3'; ДНК-фрагмент II – 5'-TCATGCATGTCTACCAGAA-3' и 5'-САТААААААТАААССТТТТАТАСТ-3', ДНК-фрагмент III – 5'-TTGAGTCAATGAAGTC-3' и 5'-ССААСАСТТААТТСТGG-3'. Температура гибридизации («отжига») для каждой пары праймеров составляла 62, 54 и 46°C соответственно. Цикл ПЦР (90°C – 60 с, отжиг праймеров – 60 с, 72°C – 40 с) повторяли 25 раз. После ПЦР ДНК осаждали этанолом (2.5 объема) в присутствии 1 М NaCl. Целевые ДНК выделяли из агарозного геля с использованием микроцентрифужных пробирок Spin-X Centrifuge Tube Filters (Costar, США).

Равновесное связывание белков с ДНК-лигандами

Радиоактивную метку вводили на 5'-конец олигонуклеотидов с помощью Т4-полинуклеотидкиназы (10 ед. акт., Fermentas, Литва) и [γ -³²P]АТР. Комплексообразование M.Ecl18kI с фрагментами ДНК I–II и РНКП с фрагментами ДНК I–III проводили в 10 мкл буфера для связывания (50 мМ Трис-НСl (рН 7.6), 150 мМ NaCl, 5 мМ β -меркаптоэтанол) в присутствии эквимольного белка количества гепарина в течение 40 мин при 37°C. В случае M.Ecl18kI реакционная

смесь содержала 1 мМ AdoMet. ДНК-белковый комплекс и свободный ДНК-дуплекс разделяли методом гель-электрофореза в 1% агарозном геле. После электрофореза агарозные гели высушивали на подложке при температуре 90°C в токе горячего воздуха. Константы диссоциации (K_d) ДНК-белковых комплексов определяли методом Скэтчарда [15]. Концентрации M.Ecl18kI и РНКП составляли 60 и 30 нМ соответственно. Концентрации ДНК-дуплекса II варьировали в интервале от 5 до 120 нМ. Комплексообразование мутантных форм M.Ecl18kI(K46A), M.Ecl18kI(K53A) и M.Ecl18kI(K21A) с ДНК-фрагментами IV и V проводили в 20 мкл буфера для связывания (50 мМ Трис-НСl (рН 7.6), 150 мМ NaCl, 5 мМ ДТТ, 50 нг/мкл poly(dI-dC)) в течение 20 мин при 37°C. Концентрации ДНК-дуплексов IV и V варьировали в интервале от 20 до 100 нМ. Концентрации M.Ecl18kI(K46A), M.Ecl18kI(K53A) и M.Ecl18kI(K21A) при связывании с ДНК-фрагментом IV составляли 560, 400 и 400 нМ соответственно, а при связывании с ДНК-фрагментом V – 200, 1600 и 5600 нМ соответственно.

Определение начальной скорости метилирования ДНК-субстрата

Начальную скорость метилирования ДНК-субстрата МТазами Ecl18kI, SsoII и их мутантными формами определяли как описано ранее [9], исходя из степени «защиты» дуплекса V от гидролиза ЭР Ecl18kI. С этой целью 350 нМ радиоактивно меченного ДНК-дуплекса V инкубировали с МТазой в буфере для связывания, содержащем 1 мМ AdoMet, в течение 0.5–60 мин при 37°C. Затем реакционную смесь выдерживали 10 мин при 65°C для инактивации фермента, охлаждали до 25°C, добавляли MgCl₂ (концентрация в реакционной смеси 10 мМ) и ЭР Ecl18kI (240 нМ) и инкубировали 1 ч при 37°C. Использовали одинаковую начальную активную концентрацию МТаз, равную 14 нМ. Степень гидролиза неметилированного ДНК-дуплекса V эндонуклеазой рестрикции Ecl18kI принимали за 100%. Степень метилирования ДНК-дуплекса V исследуемыми белками рассчитывали относительно этого значения и строили кинетические кривые. Начальные скорости метилирования (v_0) ДНК-дуплекса V МТазами рассчитывали как угловой коэффициент (тангенс угла наклона) начального прямолинейного участка кинетической кривой.

Транскрипция *in vitro*

Очищенный ДНК-фрагмент I (0.25 мкг) инкубировали с РНКП (3 пмоль) в буфере для транскрипции (40 мМ Трис-НСl (рН 7.9), 6 мМ MgCl₂, 10 мМ ДТТ, 10 мМ NaCl, 2 мМ спермидин) в объеме 8 мкл в течение 10 мин при температуре 37°C, добавляли 2 мкл

водного раствора гепарина (0.25 мкг/мкл) и инкубировали еще 10 мин при температуре 37°C. Затем добавляли 10 мкл смеси из четырех рибонуклеозидтрифосфатов: УТР (12 мкМ), АТР, ГТР, СТР (500 мкМ каждого), содержащей 0.5 мкКи [α -³²P]УТР и 24 ед. акт. ингибитора РНКаз RiboLock (Fermentas, Литва) и инкубировали 1 ч при 37°C. Реакцию останавливали, добавляя 10 мкл раствора для нанесения на гель RNA Loading Dye (Fermentas, Литва).

Характеристика регуляторной активности метилтрансфераз

Регуляторную активность мутантных форм M.Ecl18kI и M.SsoII оценивали, проводя транскрипцию *in vitro* с ДНК-фрагмента I в присутствии этих белков. В контрольных экспериментах использовали M.Ecl18kI или M.SsoII дикого типа. Реакционные смеси анализировали методом электрофореза в 5% полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 7 М мочевины, при напряженности поля 5 В/см в ТВЕ-буфере. Радиоактивную метку содержали только полученные РНК-транскрипты. В присутствии SsoII-подобных МТаз, способных выступать в роли регуляторных белков, наблюдалось увеличение радиоактивности зоны, соответствующей РНК-транскрипту, синтезируемому с промотора гена ЭР, и уменьшение радиоактивности зоны РНК-транскрипта, синтезируемого с промотора гена МТазы. Определяли долю (%) транскрипта гена ЭР в суммарной радиоактивности полученных транскриптов (принятой за 100%) при различных концентрациях МТазы. Для корректного сравнения выхода продуктов транскрипции при проведении реакции использовали одинаковые активные концентрации МТаз. Их определяли из графиков для расчета K_d комплексов белков с дуплексом IV, содержащим регуляторный участок, методом Скэтчарда [15]. Строили кривые зависимости доли транскрипта, полученного с промотора гена ЭР, от активной концентрации МТазы. Затем определяли относительный выход этого транскрипта на единицу активной концентрации каждой из МТаз. Для этого рассчитывали соотношение значений углового коэффициента (тангенса угла наклона) начального прямолинейного участка кривой для мутантной МТазы и M.Ecl18kI (или M.SsoII) дикого типа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексообразование РНК-полимеразы и M.Ecl18kI с фрагментами ДНК, содержащими межгенную область системы Р-М Ecl18kI

Генетическая организация системы Р-М Ecl18kI (на основании данных [8, 11]) представлена на рис. 2 на примере 247-звенного ДНК-фрагмента I. Промо-

тор гена МТазы расположен непосредственно перед ее регуляторным участком и частично перекрывается с местом посадки M.Ecl18kI. Мы предположили, что механизм негативной регуляции экспрессии собственного гена M.Ecl18kI может заключаться в физическом блокировании доступа РНКП к промотору гена МТазы при связывании M.Ecl18kI с регуляторным участком.

Для проверки этого предположения изучено комплексообразование обоих белков с 116-звенным ДНК-фрагментом II, содержащим межгенную область системы Р-М Ecl18kI (регуляторный участок, точку инициации транскрипции и промоторные области гена МТазы – *ecl18kIM*), но не содержащим промоторные элементы гена ЭР – *ecl18kIR* (рис. 3А). При добавлении РНКП к смеси МТазы и ДНК в реакционной смеси не наблюдалось появления других комплексов, кроме комплексов МТазы-ДНК и РНКП-ДНК. Этот факт исключает возможность непосредственного контакта M.Ecl18kI с РНКП. Более того, при добавлении 5-кратного избытка M.Ecl18kI (относительно РНКП) комплекс РНКП-ДНК практически исчезал. Следовательно, связывание МТазы с регуляторным участком действительно препятствует взаимодействию РНКП с промоторной областью генов системы Р-М SsoII (рис. 3Б).

Эффективность связывания РНКП и M.Ecl18kI с промотором МТазы и с регуляторным участком оценивали, определяя значения K_d ДНК-белковых комплексов. Для комплекса M.Ecl18kI с ДНК-фрагментом II $K_d = 12 \pm 1$ нМ, а для комплекса РНКП с тем же фрагментом $K_d = 25 \pm 1$ нМ. Таким образом, контроль уровня экспрессии МТазы обусловлен конкуренцией РНКП и M.Ecl18kI за место связывания. По-видимому, незначительное (лишь в 2 раза) отличие в сродстве МТазы и РНКП к данному участку ДНК позволяет предотвратить преждевременное ингибирование собственного синтеза M.Ecl18kI, т.е. более тонко контролировать уровень экспрессии гена МТазы. Таким образом, уровень синтеза M.Ecl18kI не понижается ниже минимального, обеспечивающего поддержание специфического метилирования клеточной ДНК.

МТазы располагаются достаточно близко к точке инициации транскрипции гена ЭР (рис. 2), и потому наиболее вероятным было бы негативное влияние M.Ecl18kI на транскрипцию гена *ecl18kIR*. Однако наблюдается противоположный эффект. Мы предположили, что возможна одновременная посадка РНКП и M.Ecl18kI на один ДНК-фрагмент, когда РНКП взаимодействует с промотором гена ЭР, а МТазы – со своим регуляторным участком. Данное предположение подтверждено экспериментально (рис. 3В,Г): при последовательном добавлении РНКП и M.Ecl18kI

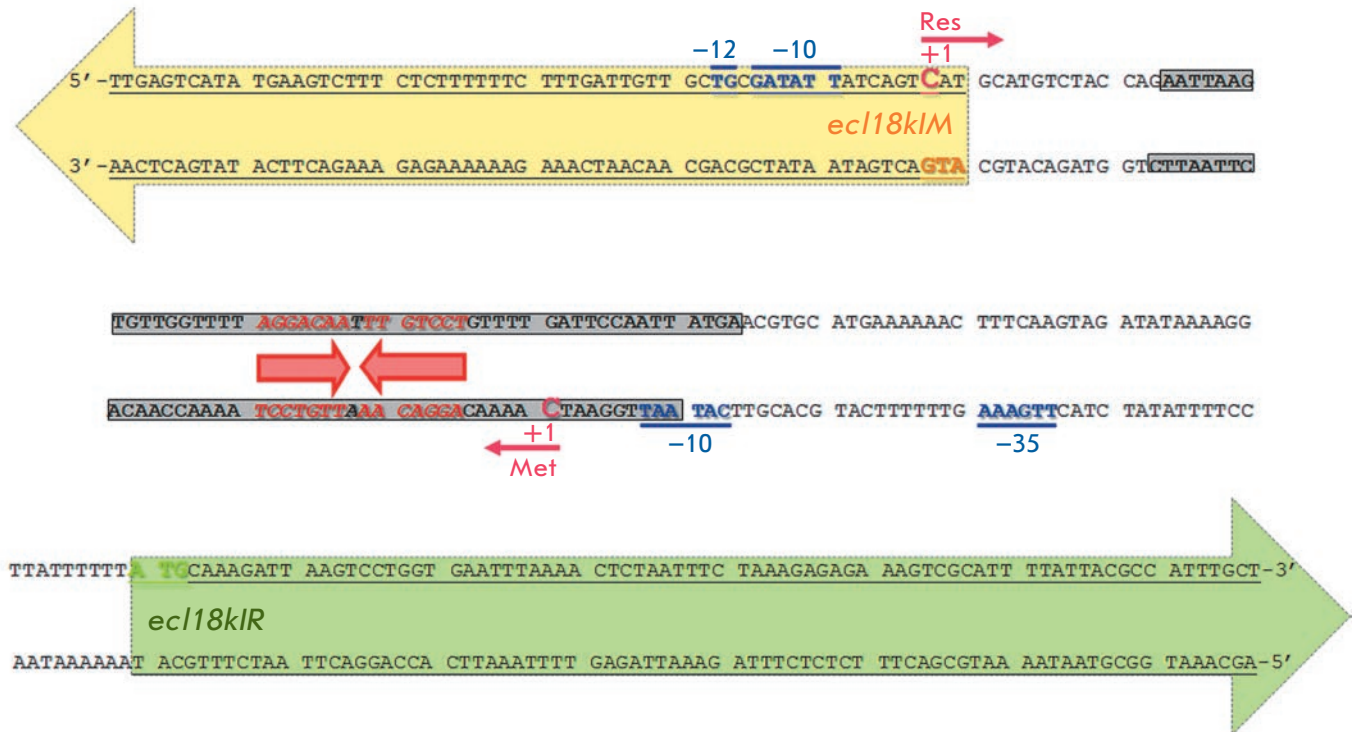


Рис. 2. Генетическая организация промоторной области генов системы P–M Ecl18kI, ДНК-фрагмент I. Направления генов МТазы и ЭР показаны желтыми и зелеными стрелками соответственно. Инициаторные кодоны также выделены желтым или зеленым цветом. Участок, защищаемый МТазой от гидролиза ДНКазой I, выделен серым цветом. Красным шрифтом и красными стрелками отмечен регуляторный участок M.Ecl18kI, представляющий собой инвертированный повтор. Точки инициации транскрипции выделены розовым цветом, промоторные элементы – синим

к 247-звенному ДНК-фрагменту I наблюдается появление «тройного» комплекса (предположительно РНКП–M.Ecl18kI–ДНК) с меньшей подвижностью в геле по сравнению с комплексами РНКП–ДНК и M.Ecl18kI–ДНК. Поскольку с одним регуляторным участком связываются две молекулы M.SsoII [12], наиболее вероятно, что в состав каждого из комплексов: РНКП–M.Ecl18kI–ДНК и M.Ecl18kI–ДНК, входят две молекулы M.Ecl18kI.

Сравнение комплексообразования РНКП с двумя разными промоторами показало, что степень связывания РНКП с ДНК-фрагментом III (рис. 3Д,Е), содержащим точку инициации транскрипции и промоторные области только гена *ecl18kIR*, в 4 раза меньше степени связывания с ДНК-фрагментом II, содержащим точку инициации транскрипции и промоторные области только гена *ecl18kIM*. Таким образом, промотор гена *ecl18kIM* сильнее промотора гена *ecl18kIR*, и в отсутствие M.Ecl18kI транскрипция происходит в первую очередь с промотора гена МТазы. Данное явление также может быть обусловлено транскрипционной интерференцией по механизму «сидячей утки» [16], когда скорости перехода открытого

комплекса РНКП в элонгационный для двух близко расположенных промоторов сильно отличаются, и активность слабого промотора подавляется из-за интенсивной транскрипции более сильного.

Анализ способности N-концевой области M.Ecl18kI регулировать транскрипцию генов в системе рестрикции–модификации *in vitro*

Опыты с делеционными мутантами показали, что способность M.SsoII выступать в роли фактора транскрипции обусловлена именно N-концевой областью этого белка, состоящей из 71 а.о. [3]. Аминокислотные последовательности N-концевых областей M.Ecl18kI и M.SsoII имеют значительное сходство с С-белками. Сравнение регуляторного участка M.SsoII с идеализированной последовательностью С-боксов 5'-GACT...AGTC-3' [17] показало совпадение 6 из 8 нуклеотидов. Учитывая значительную вариабельность последовательностей самих участков связывания С-белков, регуляторный участок, узнаваемый M.Ecl18kI, также можно отнести к С-боксам. Делеционный мутант Δ(72–379)M.Ecl18kI, представляющий собой N-концевую область M.Ecl18kI, сохра-

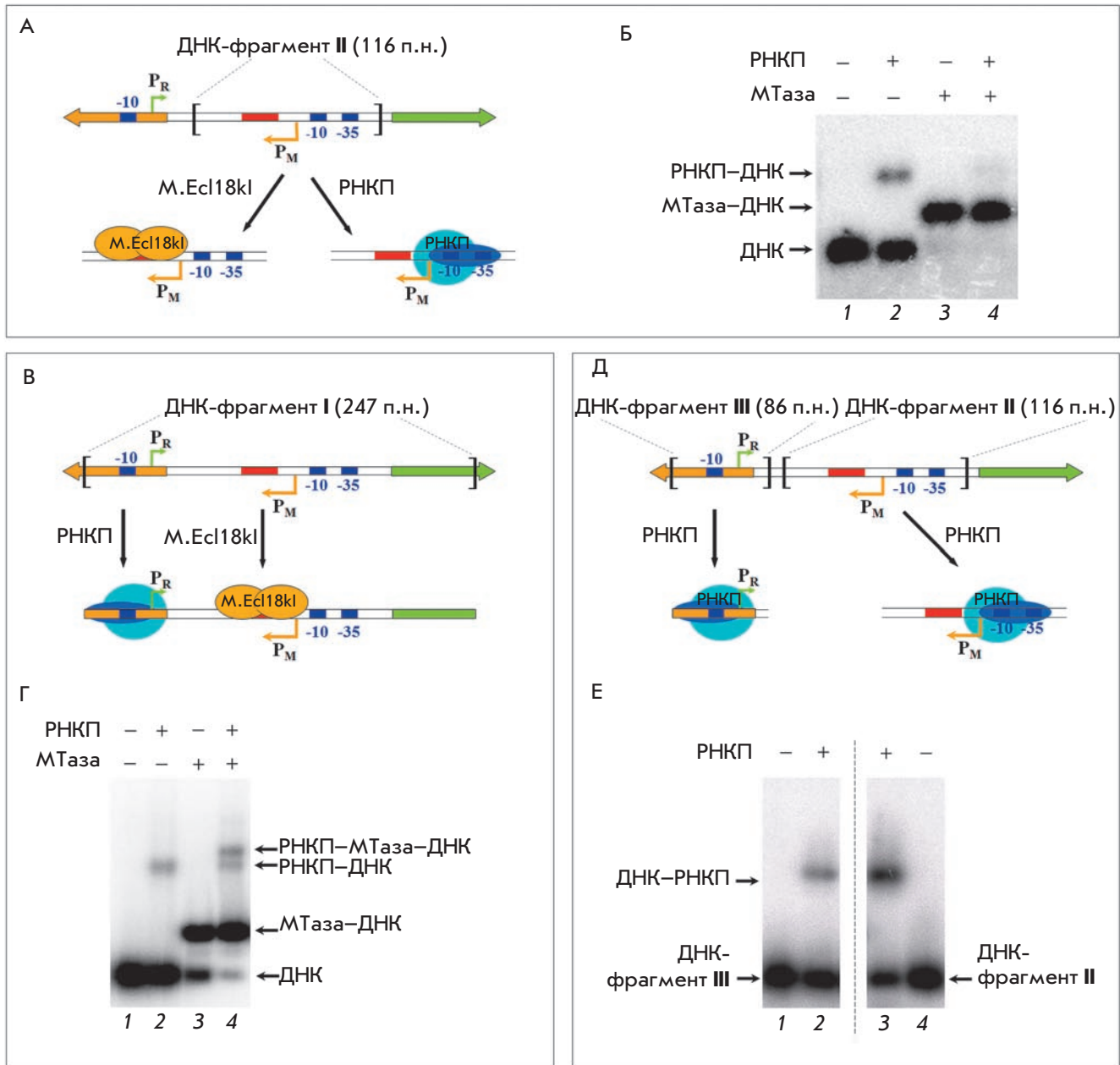


Рис. 3. Комплексообразование М.Еcl18kI и РНКП с фрагментами ДНК, содержащими различные элементы межгенной области системы Р-М Ecl18kI. **А, В, Д** – схемы образования ДНК-белковых комплексов. Направления генов МТаза и ЭР показаны желтыми и зелеными стрелками соответственно. P_R , P_M – точки инициации транскрипции генов ЭР и МТаза соответственно (отмечены также тонкими стрелками). Промоторные элементы выделены синим цветом, регуляторный участок МТаза – красным. **Б, Г** – комплексообразование РНКП (30 нМ) с ДНК-фрагментами II или I соответственно (15 нМ) в присутствии (4) или в отсутствие (2) избытка М.Еcl18kI (150 нМ) в условиях специфического связывания (в присутствии 300 нМ гепарина). 1 – исходный ДНК-фрагмент, 3 – комплексообразование М.Еcl18kI с ДНК-фрагментами II и I в отсутствие РНКП. **Е** – комплексообразование РНКП (190 нМ) с ДНК-фрагментами III (30 нМ, дорожка 2) и II (30 нМ, дорожка 3). Дорожки 1 и 4 – исходные ДНК-фрагменты III и II соответственно. Радиоавтографы 1% агарозного геля

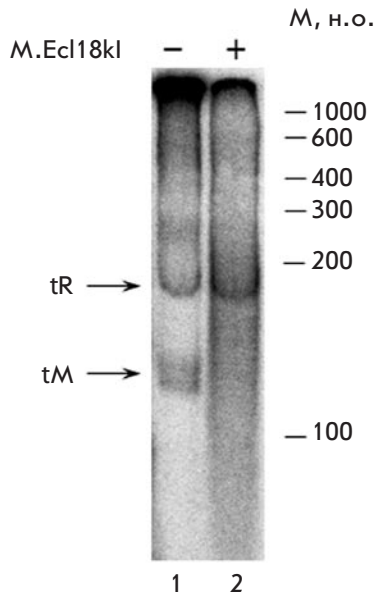


Рис. 4. Анализ РНК-транскриптов, синтезируемых с ДНК-фрагмента I, методом электрофореза в 5% ПААГ в денатурирующих условиях. Радиоавтограф: 1 – продукты транскрипции в отсутствие M.Ecl18kI; 2 – продукты транскрипции в присутствии 4-кратного избытка M.Ecl18kI (в расчете на активные концентрации ферментов). Справа указано расположение маркера (M) фрагментов РНК разной длины. tR – РНК-транскрипт, полученный с промотора гена *ec118kIR*, tM – РНК-транскрипт с промотора гена *ec118kIM*

няет ярко выраженную вторичную структуру и способен специфически связывать ДНК, содержащую регуляторный участок, хотя эффективность этого связывания на порядок ниже, чем у полноразмерного белка [12].

Нами изучено влияние $\Delta(72-379)$ M.Ecl18kI на транскрипцию генов *ec118kIR* и *ec118kIM* *in vitro*. В контрольном опыте использовали полноразмерную M.Ecl18kI (рис. 4). В результате транскрипции с 247-звенного ДНК-фрагмента I образуются два продукта, соответствующие транскриптам с промотора гена ЭР (~190 нуклеотидов) и с промотора гена МТазы (~110 нуклеотидов). При титровании реакционной смеси возрастающими количествами M.Ecl18kI доля транскрипта гена МТазы существенно снижается, а доля транскрипта гена ЭР увеличивается (рис. 4, 5). В то же время добавление в реакционную смесь $\Delta(72-379)$ M.Ecl18kI не вызывает изменений в соотношении выходов двух транскриптов, т.е. данный делеционный мутант не способен выступать в роли транскрипционного фактора (рис. 5). Возможно, это объясняется низким сродством $\Delta(72-379)$ M.Ecl18kI к ДНК, содержащей регуляторный участок [12]: такой белок не может эффективно

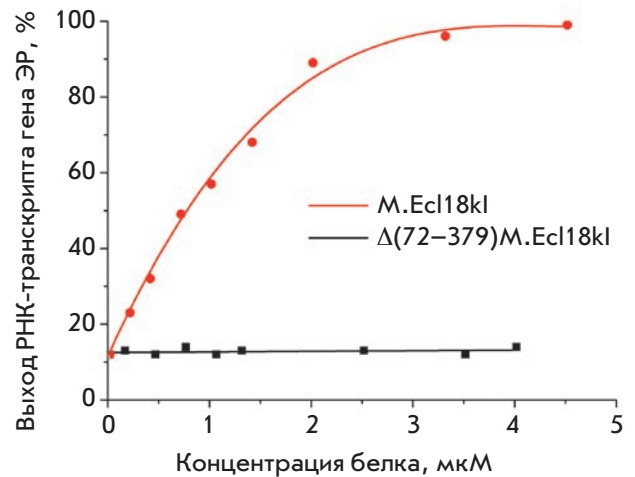


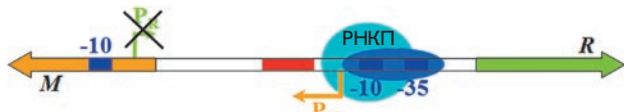
Рис. 5. Зависимость выхода РНК-транскрипта с промотора гена *ec118kIR* от концентрации M.Ecl18kI или ее делеционной мутантной формы $\Delta(72-379)$ M.Ecl18kI

конкурировать с РНКП за связывание с промоторной областью. Возможно также, что делеционный мутант закрывает собой значительно меньший участок ДНК, чем полноразмерная M.Ecl18kI, потому он не является стерическим препятствием для РНКП. Таким образом, наличие области, ответственной за метилирование, необходимо для поддержания регуляторной функции M.Ecl18kI. Этот результат соответствует недавно предложенной нами структурной модели комплекса SsoII-подобных МТаз с регуляторным участком в составе межгенной области системы Р-М: N-концевые области двух молекул МТазы специфически взаимодействуют с регуляторным участком, а области, ответственные за метилирование, неспецифическим образом связаны с ДНК, фланкирующей регуляторный участок [18].

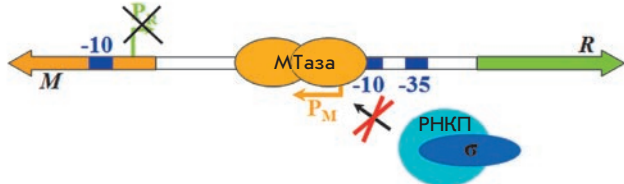
Модель регуляции транскрипции генов в системе Р-М Ecl18kI

После проникновения системы Р-М в клетку происходит активный синтез МТазы с более сильного промотора, что необходимо для защиты клеточной ДНК от гидролиза ЭР. Со временем нарабатывается определенное количество МТазы, обеспечивающее эффективную защиту клетки от инфекции бактериофагом, после чего две молекулы МТазы связываются с регуляторным участком и блокируют доступ РНКП к промотору собственного гена (рис. 6). Непосредственного образования комплекса между МТазой и РНКП в таком случае не происходит, т.е. механизм подавления транскрипции гена МТазы основан только на конкуренции между МТазой и РНКП за связывание с межгенной областью системы Р-М

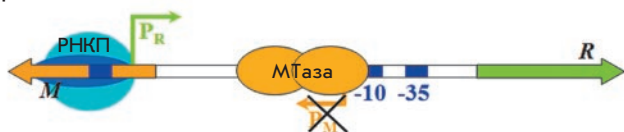
1. Стадия проникновения в клетку. Активный синтез МТазы для защиты ДНК клетки-хозяина



2. Накопление МТазы. Взаимодействие МТазы с регуляторным участком



3. Стадия защиты клетки от инфекции бактериофагом. Ингибирование синтеза МТазы. Активация транскрипции гена ЭР



4. Элонгация транскрипции → диссоциация МТазы из комплекса с ДНК

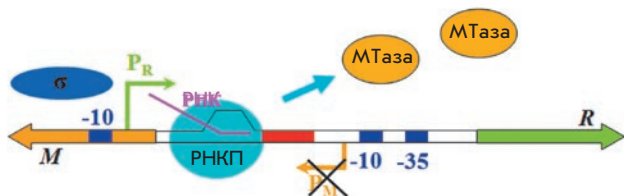


Рис. 6. Предполагаемый механизм регуляции транскрипции генов в SsoII-подобных системах P–M. Обозначения аналогичны приведенным в подписи к рис. 2 и 3

Ecl18kI. Близкие значения K_d свидетельствуют о том, что даже небольшие изменения концентрации МТазы должны отражаться на эффективности транскрипции гена МТазы.

Описанное в работе [18] взаимодействие области M.SsoII, ответственной за метилирование, с ДНК, фланкирующей регуляторный участок, по-видимому, обеспечивает дополнительную прочность ДНК-белкового комплекса. Это обстоятельство позволяет SsoII-подобной МТазе успешно конкурировать с РНКП за связывание с промоторной областью, что приводит к подавлению транскрипции гена МТазы и стабилизации ее концентрации в клетке. Можно предположить, что связывание области фермента, ответственной за метилирование, с ДНК, фланкирующей регуляторный участок, яв-

ляется компенсаторным механизмом, необходимым для того, чтобы димер МТазы, связанный с регуляторным участком ДНК, мог влиять на транскрипцию не менее эффективно, чем два димера С-белка, связанные с двумя палиндромными участками ДНК. Отсутствие такого «дополнительного» взаимодействия в случае делеционного мутанта, представляющего собой N-концевую область M.Ecl18kI, объясняет малую стабильность его комплекса с ДНК и неспособность регулировать транскрипцию в системе P–M Ecl18kI.

Связывание M.Ecl18kI с регуляторным участком приводит к активации промотора гена ЭР косвенным образом – за счет предотвращения связывания РНКП с промотором гена МТазы. В процессе транскрипции с промотора гена ЭР РНКП «наталкивается» на область МТазы, отвечающую за метилирование, которая неспецифически взаимодействует с областью ДНК, фланкирующей регуляторный участок [18]. Такие неспецифические ДНК-белковые контакты сравнительно легко разрушаются РНКП, «расплетающей» ДНК в элонгационном комплексе. Вероятно, при этом происходит «сталкивание» с ДНК обеих субъединиц МТазы, что может быть связано с понижением сродства фермента к ДНК, «расплетенной» в процессе элонгации.

Влияние единичных аминокислотных замен на регуляторную активность SsoII-подобных метилтрансфераз

Мутантная форма M.SsoII, содержащая замену в области, ответственной за метилирование. Cys142 в молекуле M.Ecl18kI (M.SsoII) играет ключевую роль в катализе переноса метильной группы с кофактора реакции AdoMet на ДНК-субстрат [19]. Замена Cys142 на Ala приводит к потере M.SsoII ферментативной активности. Мутантный белок менее эффективно связывается с участком метилирования, но имеет значительно большее сродство к регуляторному участку (таблица) [9]. В данной работе проверена способность M.SsoII(C142A) регулировать транскрипцию генов системы P–M Ecl18kI *in vitro*.

Выход транскриптов гена *ecl18kIR* в присутствии M.SsoII, M.Ecl18kI или мутантного белка M.SsoII(C142A) практически одинаков (рис. 7 и таблица). Следовательно, потеря метилирующей функции не влияет на способность МТазы действовать как фактор транскрипции.

Мутантные формы M.Ecl18kI, содержащие замены в области, ответственной за регуляторную функцию. На основании модели комплекса N-концевой области M.SsoII с регуляторным

Характеристика ДНК-связывающей, регуляторной и метилирующей активностей МТазы *M.Ecl18kI*, *M.SsoII* и их мутантных форм¹

МТазы	Относительный выход транскрипта гена ЭР на ед. акт. концентрации МТазы	K_d комплекса МТазы с регуляторным участком, нМ ^{1,2}	K_d комплекса МТазы с метилируемым участком, нМ ^{1,3}	Относительная начальная скорость метилирования ^{1,3}
<i>Ecl18kI</i>	1.0	224 ± 24	87 ± 12	1
<i>SsoII</i>	1.0	248 ± 33	144 ± 14	1
<i>SsoII(C142A)</i>	1.0	35 ± 3	172 ± 10	нет
<i>Ecl18kI(R15A)</i>	0.4	56 ± 13	103 ± 24	< 1
<i>Ecl18kI(K21A)</i>	3.9	48 ± 9	87 ± 3	38
<i>Ecl18kI(K31A)</i>	1.0	198 ± 29	26 ± 3	29
<i>Ecl18kI(R35A)</i>	нет	> 4000	140 ± 12	2
<i>Ecl18kI(R38A)</i>	нет	> 4000	96 ± 13	11
<i>Ecl18kI(R39A)</i>	0.4	93 ± 14	266 ± 4	22
<i>Ecl18kI(R42A)</i>	2.5	32 ± 2	256 ± 4	< 1
<i>Ecl18kI(K46A)</i>	13.5	250 ± 32	> 4000	нет
<i>Ecl18kI(K53A)</i>	1.8	206 ± 7	> 4000	нет

¹Данные для *M.Ecl18kI*, *M.SsoII*, *M.SsoII(C142A)*, *M.Ecl18kI(R15A)*, *M.Ecl18kI(R35A)*, *M.Ecl18kI(R38A)*, *M.Ecl18kI(R39A)* и *M.Ecl18kI(R42A)* опубликованы ранее [9].

²Изучение комплексообразования проводили с 31-звенным ДНК-дуплексом **IV**, содержащим регуляторный участок: 5' -ТТGGТТТТ**AGGACAATTGTCCTG**ТТТТGAT-3'

3' -ААССАААА**ТССТGTTTAAACAGGA**СААААСТА-5' (ДНК-дуплекс **IV**).

³Изучение комплексообразования и метилирующей активности проводили с 30-звенным ДНК-дуплексом **V**, содержащим участок метилирования:

5' -GATGCTGCCAA**CCTGG**СТСТАGCTTCАТАС-3'

3' -СТАСGACGGТТ**GGACC**GGAGATCGAAGTATG-5' (ДНК-дуплекс **V**).

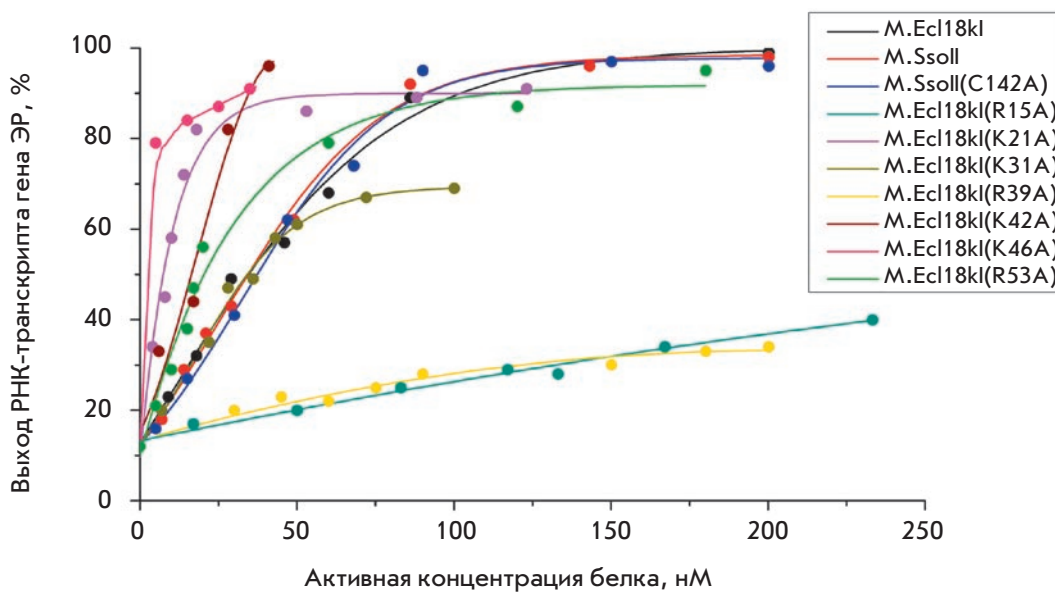


Рис. 7. Зависимость выхода РНК-транскрипта с промотора гена *ecl18kIR* от активной концентрации *M.Ecl18kI*, *M.SsoII* или их мутантных форм: *M.SsoII(C142A)*, *M.Ecl18kI(R15A)*, *M.Ecl18kI(R21A)*, *M.Ecl18kI(R31A)*, *M.Ecl18kI(R39A)*, *M.Ecl18kI(R42A)*, *M.Ecl18kI(R46A)* или *M.Ecl18kI(R53A)*

участком [13] было высказано предположение о взаимодействии остатков Lys21, Lys31, Arg35, Arg38, Arg39 и Arg42 с ДНК (рис. 1). Мы изучили регуляторные свойства мутантных форм M.Ecl18kI, в каждой из которых один из перечисленных остатков заменен на Ala (таблица). В качестве контроля использовали мутантные формы M.Ecl18kI, где один из остатков – Arg15, Lys46 и Lys53 – был заменен на Ala. Регуляторную активность всех мутантных форм M.Ecl18kI проверяли, проводя транскрипцию *in vitro* в присутствии этих белков. В контрольном опыте использовали M.Ecl18kI дикого типа.

Впервые показано, что аминокислотные замены в N-концевой области влияют на способность MТазы регулировать транскрипцию в системе Р–М (таблица). Различная динамика изменения выхода РНК–транскриптов с промотора гена ЭР в условиях одинаковой активной концентрации мутантных форм M.Ecl18kI стала интересным и неожиданным результатом. Мы полагали, что мутантные формы, обладающие высоким сродством к регуляторному участку, должны регулировать транскрипцию более эффективно, в то время как регуляция транскрипции для MТаз с более низким сродством должна ослабевать. Действительно, в присутствии M.Ecl18kI(R35A) и M.Ecl18kI(R38A), которые практически не взаимодействуют с регуляторным участком ДНК (таблица, [9]), результат был таким же, как и при полном отсутствии белка: преобладание в реакционной смеси РНК–транскрипта с промотора гена MТазы. Очевидно, что данные мутантные формы MТазы не способны регулировать транскрипцию генов в системе Р–M Ecl18kI.

В присутствии остальных мутантных форм M.Ecl18kI, которые эффективно связывались с регуляторным участком, наблюдалось изменение количества РНК–транскрипта, синтезируемого с промотора гена ЭР (рис. 7, таблица). Однако определенная корреляция между сродством белков к регуляторному участку ДНК и выходом продукта транскрипции на единицу активной концентрации MТаз, помимо M.Ecl18kI(R35A) и M.Ecl18kI(R38A), обнаружена еще только у трех мутантных форм: M.Ecl18kI(K21A), M.Ecl18kI(K31A) и M.Ecl18kI(R42A). У M.Ecl18kI(K21A) и M.Ecl18kI(R42A) сродство к регуляторному участку ДНК и эффективность регуляции транскрипции на единицу активной концентрации MТаз больше, чем у M.Ecl18kI дикого типа. Сродство M.Ecl18kI(K31A) к регуляторному участку и выход РНК–транскрипта на единицу активной концентрации MТаз сравнимы со значениями для M.Ecl18kI дикого типа.

Вместе с тем мутантные белки M.Ecl18kI(R39A) и M.Ecl18kI(R15A), имеющие более высокое сродство

к регуляторному участку ДНК (в 2.5 и 4 раза соответственно), чем M.Ecl18kI дикого типа, менее эффективно регулируют транскрипцию в системе Р–M Ecl18kI. Выход РНК–транскрипта на единицу активной концентрации M.Ecl18kI(K46A) и M.Ecl18kI(K53A) выше, чем у M.Ecl18kI дикого типа (в 13 и 1.8 раза соответственно), несмотря на то, что константы диссоциации их комплексов с 31-звенным дуплексом IV, содержащим регуляторный участок, имеют сравнимые значения.

Отсутствие корреляции между сродством к регуляторному участку и выходом РНК–транскриптов может быть связано с тем, что величина K_d отражает термодинамическую стабильность комплекса MТазы с ДНК, а относительный выход продукта транскрипции на единицу активной концентрации MТазы косвенным образом характеризует скорость образования комплекса MТазы с ДНК.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК-СУБСТРАТА

Нами изучено влияние замены остатка Lys21, Lys31, Lys46 или Lys53 на Ala в регуляторной области M.Ecl18kI на выполнение этим белком функции метилирования. С этой целью определяли K_d комплексов мутантных форм MТазы с 30-звенным дуплексом V, содержащим участок метилирования, и скорость метилирования данного субстрата (таблица). Мутантные формы M.Ecl18kI(K21A) и M.Ecl18kI(K31A) эффективно связываются с субстратом V. Скорость метилирования ДНК этими белками была в 30–40 раз выше по сравнению с исходным ферментом. Мутантные формы M.Ecl18kI(K46A) и M.Ecl18kI(K53A), напротив, характеризуются низким сродством к дуплексу V и не способны его метилировать.

Аналогичные исследования выполнены нами ранее для мутантных белков, в которых на Ala заменили один из остатков Arg (R15, R35, R38, R39 или R42), также расположенных в регуляторной области M.Ecl18kI (таблица) [9]. Сопоставление полученных данных позволяет сделать следующие заключения. В целом сродство мутантных форм M.Ecl18kI к ДНК–субстрату V снижается по мере приближения аминокислотной замены к области белка, ответственной за метилирование (таблица). Так, значения K_d комплекса M.Ecl18kI(R15A), M.Ecl18kI(K21A) и M.Ecl18kI(R38A) с дуплексом V совпадают в пределах ошибки с значениями для M.Ecl18kI дикого типа, а в случае M.Ecl18kI(K31A) сродство к ДНК–дуплексу V даже в 3 раза выше. У M.Ecl18kI(R35A) сродство к участку метилирования уже в 1.6 раза ниже, чем у MТазы дикого типа, у M.Ecl18kI(R39A) и M.Ecl18kI(R42A) – в 3 раза ниже, а M.Ecl18kI(K46A) и M.Ecl18kI(K53A) практически не связываются с дуплексом V.

М.Ecl18kI(K21A), М.Ecl18kI(K31A) и М.Ecl18kI(R39A) очень эффективно метилируют ДНК-субстрат **V**, однако между этими мутантными формами не наблюдается корреляции ни по сродству к участку метилирования, ни по способности к регуляции (таблица). Большая по сравнению с М.Ecl18kI степень метилирования дуплекса **V** отмечена и в случае М.Ecl18kI(R38A) с «выключенной» регуляторной функцией. Эффективность метилирования М.Ecl18kI(R35A) практически не меняется, хотя его сродство к участку метилирования снижается в 1.6 раза, а регуляторная функция «выключена». Замена Arg15 и Arg42 на Ala приводит к снижению способности фермента к метилированию субстрата в 2.5–3 раза. Мутантные формы М.Ecl18kI(K46A) и М.Ecl18kI(K53A) не способны метилировать дуплекс **V** из-за чрезвычайно низкого сродства к нему.

Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что аминокислотные замены в области М.Ecl18kI, ответственной за регуляцию, влияют на способность этого белка связывать и метилировать ДНК-субстрат, хотя единой для всех мутантных форм закономерности не наблюдается.

ВЫВОДЫ

Фермент модификации – С5-цитозиновая МТаза Ecl18kI – регулирует транскрипцию генов системы рестрикции-модификации Ecl18kI *in vitro*. Ингибирование транскрипции собственного гена обусловлено конкуренцией РНКП и фермента модификации за участок связывания вблизи промотора гена МТазы. Активация транскрипции гена эндонуклеазы

рестрикции Ecl18kI происходит за счет исчезновения транскрипционной интерференции в результате связывания фермента модификации с регуляторным участком. Впервые показано, что наличие области белка, ответственной за метилирование, необходимо для выполнения этим ферментом функции фактора транскрипции. Точечная мутация, «выключающая» каталитическую функцию МТазы, приводит к увеличению сродства мутантной формы к регуляторной последовательности и не влияет на его способность играть роль фактора транскрипции. С другой стороны, мутантные формы М.Ecl18kI(K46A) и М.Ecl18kI(K53A), эффективно регулирующие транскрипцию в системе Р-М Ecl18kI, не модифицируют ДНК-субстрат из-за чрезвычайно низкого сродства к участку метилирования. Замена остатков Arg35 или Arg38 МТазы Ecl18kI на Ala не только приводит к существенному ухудшению связывания белка с регуляторным участком, но и препятствует выполнению белком регуляторной функции, однако эффективность метилирования ДНК в этом случае значительно повышается. Очевидна взаимосвязь между функционированием двух ДНК-узнающих центров SsoII-подобных МТаз. ●

*Работа поддержана РФФИ
(гранты № 12-04-01399 и № 12-04-32103),
а также ФЦП «Научные и научно-педагогические
кадры инновационной России» на 2009–2013 годы
(Государственный контракт П1045).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kobayashi I. // Nucl. Acids Res. 2001. V. 29. P. 3742–3756.
- Нагорных М.О., Богданова Е.С., Проценко А.С., Захарова М.В., Северинов К.В. // Генетика. 2008. Т. 44. С. 1–10.
- 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.
- Denjmukhametov M.M., Brevnov M.G., Zakharova M.V., Repyk A.V., Solonin A.S., Petrauskene O.V., Gromova E.S. // FEBS Lett. 1998. V. 433. P. 233–236.
- Zakharova M.V., Beletskaya I.V., Denjmukhametov M.M., Yurkova T.V., Semenova L.M., Shlyapnikov M.G., Solonin A.S. // Mol. Genet. Genomics. 2002. V. 267. P. 171–178.
- Miyahara M., Ishiwata N., Yoshida Y. // Biol. Pharm. Bull. 1997. V. 20. P. 201–203.
- Ibáñez M., Alvarez I., Rodríguez-Peña J.M., Rotger R. // Gene. 1997. V. 196. P. 145–158.
- Protsenko A., Zakharova M., Nagornykh M., Solonin A., Severinov K. // Nucl. Acids Res. 2009. V. 37. P. 5322–5330.
- Федотова Е.А., Проценко А.С., Захарова М.В., Лаврова Н.В., Алексеевский А.В., Орецкая Т.С., Карягина А.С., Солонин А.С., Кубарева Е.А. // Биохимия. 2009. Т. 74. С. 108–116.
- Воробьева О.В., Васильев С.А., Карягина А.С., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. // Молекуляр. биология. 2000. Т. 34. С. 1074–1080.
- Shilov I., Tashlitsky V., Khodoun M., Vasil'ev S., Alekseev Y., Kuzubov A., Kubareva E., Karyagina A. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 2659–2664.
- Рязанова А.Ю., Молочков Н.В., Абросимова Л.А., Алексеевский А.В., Карягина А.С., Проценко А.С., Friedhoff P., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. // Молекуляр. биология. 2010. Т. 44. С. 911–921.
- Karyagina A.S., Alexeevski A.V., Golovin A.V., Spirin S.A., Vorob'eva O.V., Kubareva E.A. // Biophysics. 2003. V. 48. Suppl. 1. P. S45–S55.
- Severinov K., Darst S.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 13481–13486.
- Scatchard G. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1949. V. 51. P. 660–672.
- Callen B.P., Shearwin K.E., Egan J.B. // Trends Genet. 2005. V. 21. P. 339–345.
- Vijesurier R.M., Carlock L., Blumenthal R.M., Dunbar J.C. // J. Bacteriol. 2000. V. 182. P. 477–487.
- Ryazanova A.Yu., Winkler I., Friedhoff P., Viryasov M.B., Oretskaya T.S., Kubareva E.A. // Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 2011. V. 30. P. 632–650.
- Cheng X., Kumar S., Posfai J., Pflugrath J.W., Roberts R.J. // Cell. 1993. V. 74. P. 299–307.