

УДК 547.963+577.157

©Лебенка, Мелвидас

СПОСОБНОСТЬ ДНК МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ БАКТЕРИЙ ИСПОЛЬЗОВАТЬ МЕТИЛКОБАЛАМИН (CH_3B_{12}) В КАЧЕСТВЕ КОФАКТОРА В РЕАКЦИЯХ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

А.Ю. Лебенка, В.И. Мелвидас*

Лаборатория генетики института ботаники, г. Вильнюс, Литовская Республика,
Жалюю Ежеру 49, LT-08406 Вильнюс; тел.: +370 5 271 1618;
факс: +370 5 272 9950; эл.почта: SKS@erdves.lt

Исследована способность ДНК метилтрансфераз бактерий *Alu I*, *Cfr I*, *Cfr 6*, *Cfr 10*, *Eco RI*, *Eco RII*, *Msp I*, *Mva I*, *Pvu I*, *Pvu II*, *Sau 3A* использовать метилкобаламин и метилметионин в качестве кофакторов в реакции метилирования ДНК *in vitro*. Установлено, что метилкобаламин может служить донором метильных групп для бактериальных ДНК метилтрансфераз в реакции метилирования ДНК.

Ключевые слова: метилкобаламин, метилметионин, ДНК метилтрансферазы.

ВВЕДЕНИЕ. Активированная форма витамина B_{12} – метилкобаламин (MeCbl) и витамин U S-метилметионин (SMM) являются донорами метильных групп в ряде реакций метилирования. MeCbl как кофермент участвует в реакциях трансметилирования при образовании метионина из гомоцистеина, метана и ацетата из двуокиси углерода [1], а SMM при образовании метионина, пектина, белладина, тетрапирольного кольца структуры витамина B_{12} [2]. Зависимое от MeCbl энзиматическое метилирование ДНК было отмечено в бесклеточном экстракте *Propionibacterium shermanii* [3]. Ранее нами было установлено, что SMM оказывает значительное влияние на биосинтез и процессы метилирования ДНК и РНК [4-5].

Доказательств того, что MeCbl и SMM могут служить донорами метильных групп для очищенных ДНК метилтрансфераз бактерий, входящих в комплексы рестрикции-модификации ДНК, нет.

Целью настоящей работы было определение способности сайт-специфичных ДНК метилтрансфераз использовать MeCbl и SMM в качестве доноров метильных групп наряду с кофактором реакций метилирования ДНК S-аденозинметионином.

МЕТОДИКА: При выделении ДНК метилтрансфераз *Pvu I*, *Pvu II*, *Msp I*, *Alu I*, *Eco RI*, *Eco RII*, *Sau 3A* клетки бактерий разрушали ультразвуком, очистку проводили на колонках фосфоцеллюлозы P11 ("Whatman", Англия), гепарин-сефарозе, синей-сефарозе или ДЭАЭ-сефацелле ("Pharmacia", Швеция) в 10 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 5 мМ 2-меркаптоэтанол и 5 мМ ЭДТА (буфер А), как описано ранее [6-9].

*Адресат для переписки

МЕТИЛКОБАЛАМИН - КОФАКТОР ПРИ МЕТИЛИРОВАНИИ ДНК

Метилазы Cfr I, Cfr 6, Cfr 10, Mva I были любезно предоставлены П. Стакенасом (Ин-т биотехнологии, Вильнюс). Критерием функциональной чистоты ДНК метилтрансфераз было отсутствие включения метильных групп [^3H]Адомет в ДНК фага λdcm^- , расщепленную соответствующими рестриктазами.

В работе использовали [^3H]Адомет (уд. активность 555 ГБк/ммоль – “Amersham” (Англия). [$^3\text{H}_3$]Cbl и [$^3\text{H}_3$]SMM синтезировали по методам, описанным ранее [8, 9]. Удельная активность [$^3\text{H}_3$]Cbl составляла 1,636 ГБк/ммоль, [$^3\text{H}_3$]SMM – 4,153 МБк/ммоль. Синтезированные препараты были хроматографически гомогенны.

Активность ДНК метилтрансфераз определяли в 20 мкл инкубационной смеси, содержащей 50 mM трис-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM ЭДТА, 1 mM ДТТ, 2 мкг ДНК фага λdcm^- , 2-5 мкл фермента и донор метильных групп: 2 мкл [^3H]Адомет, [$^3\text{H}_3$]Cbl или [$^3\text{H}_3$]SMM. При использовании [$^3\text{H}_3$]SMM добавляли 29,72 кБк (7,16 пМ), а [$^3\text{H}_3$]Cbl – 18 кБк (11 пМ). Образцы инкубировали 1 ч при 37°C. Контрольные образцы перед добавлением донора метильных групп прогревали 10 мин при 70°C. Метилированную *in vitro* ДНК наносили на бумагу ДЕ 81 (“Whatman”), отмывали 7,5%-ным раствором Na_2HPO_4 , водой, ацетоном [9]. Радиоактивность измеряли на спектрометре LS-1801 фирмы “Beckman” (США) в стандартном сцинтиляторе (РОРОР-РРО-толуол).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В таблицах 1 и 2 представлены результаты определения активности бактериальных ДНК метилтрансфераз Alu I, Cfr I, Cfr 6, Cfr 10, Eco RI, Eco RII, Mva I, Pvu I, Pvu II, Msp I, Sau 3A *in vitro* при использовании доноров метильных групп [$^3\text{H}_3$]Cbl и [$^3\text{H}_3$]SMM. ДНК метилтрансферазы были выделены из штаммов бактерий *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Arthrobacter luteus*, *Micrococcus varians*, *Moraxella sp.*, *Staphylococcus aureus*. Они метилируют различные основания ДНК и различные ее последовательности (см.табл). Результаты эксперимента показывают, что в присутствии [$^3\text{H}_3$]Cbl и [$^3\text{H}_3$]SMM метка включается в ДНК. Включение метки [$^3\text{H}_3$]Cbl и [$^3\text{H}_3$]SMM в ДНК фага λ совмещает в себе два процесса: неэнзиматическое метилирование ДНК и метилаз и энзиматическое метилирование ДНК (см. табл. 1). По наблюдению автора, [$^3\text{H}_3$]Cbl, а также [$^3\text{H}_3$]SMM и [^3H]Адомет способны неэнзиматически метилировать белки, РНК и ДНК. По этой причине, чтобы отделить долю включения метки в ДНК приходящуюся на процесс энзиматического метилирования от неэнзиматического метилирования биополимеров входящих в состав реакционной смеси, образцы предварительно прогревали 10 мин при 70°C. Этим достигалось полное инактивирование ДНК метилтрансфераз. Такая термическая обработка была вполне достаточной. Контроль полного инактивирования проводили в аналогичных условиях с той разницей, что донором метильных групп в этом случае был [^3H]Адомет. Еще одним контролем инактивирования метилаз было проведение реакции с инактивированными ферментами в присутствии Адомет и последующая инкубация с соответствующими рестриктазами [8]. О полной инактивации ферментов свидетельствовала их неспособность защитить ДНК от рестриктазы того же комплекса ферментов рестрикции-модификации. В работе мы использовали функционально чистые ДНК метилтрансферазы, метилирующие только ими узнаваемые последовательности и не имеющие примесей других метилаз. Энзиматическое метилирование ДНК нами отмечено со всеми использованными ДНК-метилазами при использовании в качестве донора метильных групп [$^3\text{H}_3$]Cbl (см.табл. 1). Метилирование ДНК метилазами Pvu I и Pvu II превышало неэнзиматическое метилирование более чем в 2 раза ($p < 0,001$).

Определение активности бактериальных ДНК метилтрансфераз с использованием [$^3\text{H}_3$]SMM представлены в таблице 2. Эксперимент показал, что включение метки в ДНК как в контрольных так и экспериментальных образцах было практически одинаковым т.е. ферменты не проявляли активности в присутствии SMM (см. табл. 2).

Таблица 1. Активность ДНК-метилтрансфераз бактерий *in vitro* при использовании донора метильных групп $[C^3H_3]Cbl$.

ДНК-метилаза	Источник фермента	Метилируемая последовательность	Включение радиоактивности в ДНК фага λ , имп/мин; $p \leq 0,001$		
			Активный фермент (А)	Инактивированный фермент (К)	А-К
Alu I	<i>Arthrobacter luteus</i> ATCC 21606	AGm ³ CT	901	610	291
Cfr I	<i>Citrobacter freundii</i> RFL 1	PyGGm ³ CCPu	1629	835	794
Cfr 6	<i>Citrobacter freundii</i> RFL 6	CAGm ⁴ CTG	1241	740	501
Cfr 10	<i>Citrobacter freundii</i> RFL 10	Pum ⁵ CCGGPy	1558	575	983
Eco RI	<i>Escherichia coli</i> RY 13	GAm ⁶ ATTC	894	515	379
Eco RII	<i>Escherichia coli</i> R245	Cm ³ C(A/T)GG	888	510	378
Msp I	<i>Moraxella</i> sp. (R.J.Roberts)	m ⁵ CCGG	1161	735	426
Mva I	<i>Micrococcus varians</i> RFL 19	Cm ⁴ C(A/T)GG	983	515	468
Pvu I	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	CGATm ⁴ CG	1148	598	550
Pvu II	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	CAGm ⁴ CTG	1221	501	720
Sau 3A	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A	GATm ³ C	993	567	426

МЕТИЛКОБАЛАМИН - КОФАКТОР ПРИ МЕТИЛИРОВАНИИ ДНК

Таблица 2. Активность ДНК-метилтрансфераз бактерий *in vitro* при использовании донора метильных групп [C³H₃]SMM.

ДНК-метилаза	Источник фермента	Метилируемая последовательность	Включение радиоактивности в ДНК фага λ, имп/мин	
			Активный фермент	Инактивированный фермент
Alu I	<i>Arthrobacter luteus</i> <i>ATCC 21606</i>	AGm ⁵ CT	1392	1314
Cfr I	<i>Citrobacter freundii</i> <i>RFL 1</i>	PyGGm ³ CCPu	1621	1562
Cfr 6	<i>Citrobacter freundii</i> <i>RFL 6</i>	CAGm ⁴ CTG	1533	1515
Cfr 10	<i>Citrobacter freundii</i> <i>RFL 10</i>	Pum ³ CCGGPy	2540	2610
Eco RI	<i>Escherichia coli</i> <i>RY 13</i>	GAm ⁶ ATTC	1327	1262
Eco RII	<i>Escherichia coli</i> <i>R245</i>	Cm ⁵ C(A/T)GG	1941	1993
Msp I	<i>Moraxella sp.</i> (<i>R.J.Roberts</i>)	m ⁵ CCGG	1099	1019
Mva I	<i>Micrococcus varians</i> <i>RFL 19</i>	Cm ⁴ C (A/T)GG	1364	1465
Pvu I	<i>Proteus vulgaris</i> <i>ATCC 13315</i>	CGATm ⁴ CG	1709	1681
Pvu II	<i>Proteus vulgaris</i> <i>ATCC 13315</i>	CAGm ⁴ CTG	1510	1463
Sau 3A	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>3A</i>	GATm ³ C	1260	1222

Метилирование ДНК, выполняемое ДНК-метилтрансферазами в присутствии кофермента S-аденозилметионина, является важным процессом для реализации наследственной информации. У млекопитающих метилирование ДНК участвует в регулировании транскрипции, импринтинга генома, регулировании развития, мутагенеза, репарации ДНК, организации хроматина [10]. Участие ДНК метилтрансфераз в защите хозяйской ДНК от расщепления соответствующими рестриктазами было первым доказанным проявлением их функции в бактериальной клетке [11]. Все нами использовавшиеся ДНК метилтрансферазы входят в комплексы Р-М. Метилирование ДНК бактерий также участвует в регулировании репликации хромосом, транскрипции, репарации, регулировании клеточного цикла и возможно других жизненно важных механизмах [12]. Способность сайт-специфичных ДНК метилтрансфераз использовать в качестве донора метильных групп MeCbl наряду с кофактором реакций метилирования ДНК S-аденозилметионином несомненно имеет важное значение в понимании функции MeCbl и требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zagalak B. (1982) *Naturwissenschaften*, **69**(2), 63-74.
2. Букин В.Н., Хучуа Г.Н. (1973), В кн.: Витамин U (S-метилметионин) Природа, свойства, применение, М., "Наука", с. 7-22.
3. Антошкина Н.В., Воробьева Л.И., Бурьянов Я.И. (1981) *Микробиология*, **50**, 631-635.
4. Лебенка А.Ю., Рачкус Ю.А., Канопкайте С.И. (1981) *Вопр. мед. химии*, **27**, 207-210.
5. Лебенка А.Ю., Канопкайте С.И., Бурьянов Я.И. (1981) *Биохимия*, **46**, 2160-2163.
6. Butkus V., Klimašauskas S., Keršulytė D., Vaitkevičius D., Lebionka A., Janulaitis A. (1985) *Nucl. Acids Res.*, **13**, 5727-5746.
7. Butkus V., Klimašauskas S., Petrauskienė, Manelienė D., Lebionka A., Janulaitis A. (1987) *Biochim Biophys. Acta*, **909**, 201-207.
8. Лебенка А.Ю. (1988) *Генетика*, **24**, 1935-1939.
9. Лебенка А.Ю., Рачкус Ю.А. (1989) *Биохимия*, **54**, 1009-1014.
10. Bestor T.H. (2000) *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 2395-2402.
11. Bickle T.A., Kruger D.H. (1993) *Microbiol. Rev.*, **57**, 434-450.
12. Kossykh V.G., Lloyd R.S. (2004) *J. Bacteriol.*, **186**, 2061-2067.

Поступила: 12. 12. 2005.

THE ABILITY OF BACTERIAL DNA METHYLTRANSFERASES TO USE METHYLCOBALAMINE AS A COFACTOR IN DNA METHYLATION REACTIONS

A.Yu. Lebionka, V.I. Melvidas

Laboratory of Genetics, Institute of Botany, Zaliuju ezeru, 49, Vilnius, Lithuania; tel.: +370 5 271 1618; fax: +370 5 272 9950; e-mail: SKS@erdves.lt

The ability of bacterial DNA methyltransferases Alu I, Cfr I, Cfr 6, Cfr 10, Eco RI, Eco RII, Msp I, Mva I, Pvu I, Pvu II, and Sau 3A to use methyl-cobalamine and methyl-methionine as cofactors of DNA methylation *in vitro*. These bacterial DNA methyl transferase used methyl-cobalamine, but not methyl-methionine for DNA methylation.

Key words: methylcobalamine, methylmethionine, DNA methylation.