

**Механизм действия ДНК-метилтрансфераз M•SssI и Dnmt3a-CD:
образуются ли конъюгаты с ДНК?**

Черепанова Н.А.

студентка

Субач О.М.

ассистент, к.х.н.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: gromova@genebee.msu.ru

Метилирование ДНК играет важную роль в регуляции различных процессов, протекающих в клетках млекопитающих. ДНК-метилтрансферазы (МТазы) млекопитающих специфически узнают CpG-участки в ДНК. Каталитический механизм детально изучен лишь для прокариотической МТазы M•HhaI. В процессе реакции метилирования M•HhaI образует конъюгат с ДНК, в котором фермент ковалентно связан с цитозином-мишенью. Для CpG-узнающих МТаз вопрос о формировании таких конъюгатов пока не решен. Целью настоящей работы явилось изучение возможности образования конъюгатов прокариотической МТазой M•SssI и каталитическим доменом МТазы мыши Dnmt3a-CD с помощью пиримидинон-2-содержащей ДНК.

Пиримидинон-2 – это аналог цитозина, в котором отсутствует экзоциклическая аминогруппа. Такая модификация цитозина-мишени позволяет продлить время жизни возможного конъюгата. Пиримидинон-2 вводили в CpG-участок или рядом с ним. В первом случае наблюдалось образование конъюгатов M•SssI и Dnmt3a-CD с ДНК в присутствии S-аденозил-L-метионина или S-аденозил-L-гомоцистеина. Однако они оказались неустойчивыми при нагревании в 0.1%-ном растворе SDS при 65°C в течение 5 минут в отличие от конъюгатов модельной МТазы M•HhaI с ДНК. Модификация остатков Cys в SssI и Dnmt3a-CD N-этилмалеимидом блокировала их образование. По-видимому, остатки Cys формируют ковалентные связи с цитозином-мишенью. Мутантная форма M•SssI Cys141Ser, в которой консервативный остаток Cys в каталитической петле заменен на остаток Ser, также образует конъюгаты с ДНК, содержащими пиримидинон-2 вместо цитозина-мишени. Модификация Cys141Ser N-этилмалеимидом не влияет на образование конъюгата, поскольку остаток Ser не модифицируется этим реагентом. Таким образом, Cys141 принимает участие в образовании конъюгата при метилировании ДНК МТазой SssI.

Полученные результаты означают, что для CpG-узнающих МТаз M•SssI и Dnmt3a-CD в процессе реакции метилирования возможно образование конъюгатов, однако расположение консервативного остатка Cys141 в случае M•SssI не является идеальным для нуклеофильной атаки цитозина-мишени.