

ЗАВИСИМОСТЬ АКТИВНОСТИ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ *GlaI* ОТ КОЛИЧЕСТВА И ПОЛОЖЕНИЯ МЕТИЛИРОВАННЫХ ЦИТОЗИНОВ В УЗНАВАЕМОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ 5'-GCGC-3'

Ю.Э. ТОМИЛОВА*, В.А. ЧЕРНУХИН, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Изучена зависимость активности сайт-специфической эндонуклеазы *GlaI*, узнающей и гидролизующей только метилированную последовательность ДНК 5'-GCGC-3'/3'-CGCG-5', от количества и положения метилированных по 5-му положению цитозиновых остатков в последовательности узнавания. Существенный гидролиз ДНК происходит только в том случае, если в сайте узнавания модифицировано от двух до четырех оснований, причем в первом случае оба метилцитозина должны быть внутренними. Эффективность расщепления субстрата возрастает с увеличением количества метилированных оснований и максимальна, когда в сайте узнавания модифицированы все четыре цитозина.

Ключевые слова: сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза, метилирование ДНК.

Большинство известных до сих пор сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз микроорганизмов являются эндонуклеазами рестрикции, то есть входят в состав так называемых систем рестрикции-модификации (Р-М) и дополняются в бактериальной клетке ДНК-метилтрансферазой той же специфичности. Предполагается, что эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) защищают клетку от проникновения чужеродной (например, фаговой) ДНК, а метилазы, модифицируя тот же сайт узнавания, защищают хозяйскую ДНК от расщепления собственной рестриктазой. При этом само название этих ферментов «эндонуклеаза рестрикции» («рестриктаза») произошло от наблюдаемого экспериментально явления ограничения («рестрикции») размножения фага в бактериальной клетке [1]. Однако обнаруженные в последнее время сайт-специфические эндонуклеазы, гидролизующие только метилированную ДНК [2, 3], не входят в состав Р-М систем, хотя в предложенной недавно классификации они отнесены к эндонуклеазам рестрикции II типа, к подгруппе IIM, то есть узнающим только метилированную ДНК [4].

В настоящее время описаны эндонуклеазы подтипа IIM только трех специфичностей. Первыми были описаны фермент *DpnI* и его изошизомеры, узнающие последовательность ДНК, в которой метилирован аденин — 5'-G(m6A)^TC-3'[5]. Две других эндонуклеазы не имеют изошизомеров и гидролизуют ДНК, метилированную по цитозиновому основанию в положении C5: *BisI* узнает и гидролизует последовательность 5'-G(m5C)^NGC-3' [2], *GlaI* — последовательность 5'-G(m5C)^GC-3' [3]. Нетрудно видеть, что в отличие от классических рестриктаз, последовательность узнавания у двух последних IIM эндонуклеаз содержит сразу несколько цитозинов и активность этих ферментов может зависеть от количества и положения модифицированных оснований в сайте.

Целью данной работы явилось изучение эффективности расщепления ДНК эндонуклеазой *GlaI* в зависимости от метилирования цитозинов в сайте узнавания 5'-GCGC-3'.

Материалы и методы

В работе использовались реактивы производства «Хеликон» (Россия). Для экспериментов брали эндонуклеазы рестрикции, T4 полинуклеотидкиназу, и буферные растворы производства «СибЭнзим» (Россия). Олигодезоксирибонуклеотиды следующего состава, служившие субстратом для эндонуклеазы *GlaI*, были синтезированы в НПО «СибЭнзим» (Россия):

* Автор для переписки:

© 2006 г. Томилова Юлия Эдуардовна, мл.н.с.

НПО «СибЭнзим»

630117 Новосибирск, ул. Акад. Тимакова, 2/12

Тел./факс: 8-383-333-6853

E-mail: JTom@sibenzyme.ru

G1: 5'-CTATGAACGTTTTTCGCGCTGACGGACCGTATC-3'
 G2: 5'-GATACGGTCCGTCAGCGCGAAAACGTTTCATAG-3'
 G3: 5'-CTATGAACGTTTTTCG(m5C)GCTGACGGACCGTATC-3'
 G4: 5'-GATACGGTCCGTCAG(m5C)GCGAAAACGTTTCATAG-3'
 G5: 5'-CTATGAACGTTTTTCGCG(m5C)TGACGGACCGTATC-3'
 G6: 5'-GATACGGTCCGTCAGCG(m5C)GAAAACGTTTCATAG-3'
 G7: 5'-CTATGAACGTTTTTCG(m5C)G(m5C)TGACGGACCGTATC-3'
 G8: 5'-GATACGGTCCGTCAG(m5C)G(m5C)GAAAACGTTTCATAG-3'
 G9: 5'-CTATGAACGTTTTTCG(m4C)G(m4C)TGACGGACCGTATC-3'
 G10: 5'-GATACGGTCCGTCAG(m4C)G(m4C)GAAAACGTTTCATAG-3'

Олигонуклеотиды с четным номером комплементарны олигонуклеотидам с нечетным номером. Все олигонуклеотидные дуплексы имеют одинаковую первичную структуру и отличаются друг от друга наличием или отсутствием метилцитозина в последовательности GCGC (сайт GCGC, узнаваемый GluI, подчеркнут).

Выделение плазмидной ДНК рHspAI осуществляли с использованием набора «QIAGEN GmbH» (Германия) согласно протоколу производителя.

Приготовление субстрата для эндонуклеазы GluI. Для регистрации гидролиза одну из цепей олигонуклеотидного дуплекса модифицировали по 5'-концу с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и γ [32 P]АТР. После очистки олигонуклеотида от побочных продуктов реакции к нему добавляли комплементарный немеченый олигонуклеотид и пробирку прогревали 5 минут при 95 °С с последующим охлаждением до комнатной температуры на рабочем столе.

Гидролиз олигонуклеотидных дуплексов эндонуклеазой GluI. Реакцию гидролиза проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфер «Y» (33 mM Tris ацетат pH 7,9 (при 25 °С), 10 mM MgAc, 66 mM KAc, 1 mM DTT) и олигонуклеотидный дуплекс в концентрации 62,5 нМ при температура 37 °С в течение 1 часа. За единицу активности фермента принимали такое его минимальное количество, которого достаточно для полного гидролиза олигонуклеотидного дуплекса G7*/G8.

Определение степени гидролиза олигонуклеотидных дуплексов. Электрофорез продуктов гидролиза проводили в денатурирующем 20%-ном растворе ПААГ с 7 М мочевиной в трис-боратном буфере. Радиоавтографию геля проводили с помощью прибора Cyclone Storage System (Packard Instrument Co., USA). Для каждого меченого продукта определялась величина DLU (Digital Light Units), которая пропорциональна интенсивности излучения изотопом [32 P], за вычетом фона. Процент гидролиза определяли как отношение DLU для полу-

ченного продукта реакции к сумме DLU, приходящихся на исходную ДНК и полученный фрагмент ДНК. Обработку данных осуществляли с помощью программы OptiQuant V. 0.3.00 (Packard Instrument Co., USA).

Гидролиз плазмидной ДНК эндонуклеазой GluI. Реакцию проводили в 80 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфер «Y» (33 mM Tris ацетат pH 7,9 (при 25 °С), 10 mM MgAc, 66 mM KAc, 1 mM DTT) и 0,8 мкг ДНК плазмиды рHspAI [3] при температуре 37 °С в течение 1 часа. Продукты гидролиза разделяли в 1,2% агарозном геле в трис-боратном буфере.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Origin 7.0. Для графического отображения результатов применяли Microsoft Office Excel 2003.

Результаты и обсуждение

Ранее [3] нами была обнаружена новая сайт-специфическая эндонуклеаза GluI, которая не расщепляет ДНК ни одного из широко используемых субстратов (ДНК фага лямбда и Т7, аденовирусную ДНК, плазмиды рUC19, рBR322) и гидролизует только плазмидную ДНК, содержащую ген ДНК-метилазы HspAI. Фермент M.HspAI метилирует по 5-му положению внутренние цитозины в последовательности GCGC [3], что позволило предположить, а затем и доказать, что сайт-специфическая эндонуклеаза GluI расщепляет последовательность 5'-G(m5C)GC-3'/3'-CG(m5C)G-5'. Однако неясным оставался вопрос о влиянии метилирования остальных цитозinov в узнаваемой последовательности 5'-GCGC-3' на активность фермента GluI. В данной работе проводилось изучение эффективности действия эндонуклеазы GluI в зависимости от количества и положения метилированных цитозinov в сайте узнавания фермента 5'-GCGC-3'. В отличие от всех известных эндонуклеаз рестрикции, получение ДНК-субстратов для GluI в виде плазмидных, фаговых или других при-

родных ДНК, имеющих в разной степени метилированные сайты узнавания, не представляется возможным. В связи с этим для изучения свойств эндонуклеазы *GlaI* мы использовали химически синтезированные олигонуклеотидные дуплексы, содержащие метилцитозин в различных положениях узнаваемой последовательности 5'-GCCG-3'/3'-CGCG-5'.

На рисунке 1 приведены результаты расщепления олигонуклеотидного дуплекса (одна из цепей которого мечена ^{32}P) с полностью метилированной последовательностью узнавания 5'-G(m5C)G(m5C)-3'/3'-(m5C)G(m5C)G-5' различными эндонуклеазами. Как видно из рисунка, данный олигонуклеотид гидролизуется эндонуклеазами рестрикции *AclI* (дор. 3) и *Rsr2I* (дор. 4), имеющими сайты узнавания AA[^]CGTT и CG[^]GWCCG, соответственно, а также ферментом *GlaI* (дор. 5,6), и не расщепляется рестриктазой *HspAI* (дор. 2), которая не активна по отношению к собственному сайту узнавания 5'-GCCG-3' при его полном метилировании. Эти данные показывают, что помимо субстратов с двумя C5-метилированными цитозинами [3], фермент *GlaI* способен расщеплять олигонуклеотид, содержащий все четыре метилированных цитозина в сайте узнавания 5'-GCCG-3'/3'-CGCG-5'.

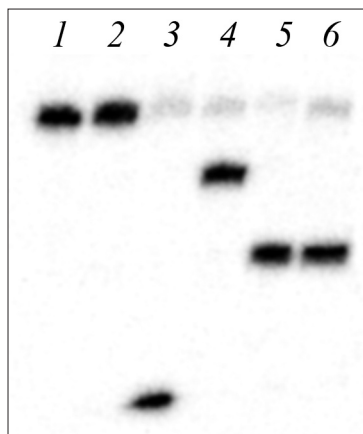


Рис. 1. Расщепление олигонуклеотидного дуплекса G7*/G8 различными эндонуклеазами. Дорожки: 1 — ДНК-дуплекс без фермента, 2 — гидролиз рестриктазой *HspAI*; 3 — гидролиз рестриктазой *AclI*; 4 — гидролиз рестриктазой *Rsr2I*, 5,6 — гидролиз эндонуклеазой *GlaI* (10 и 2 ед. акт., соответственно).

Для изучения зависимости активности фермента *GlaI* от количества и положения модифицированных цитозинов в последовательности узнавания мы проводили сравнительное изучение эффективности гидролиза различных метилированных олигонуклеотидов. Всего

в обеих цепях сайта узнавания эндонуклеазы *GlaI* находится четыре цитозина, каждый из которых может быть метилирован. Два из них являются внутренними, образующими центральный динуклеотид CG, и два внешних. Как известно, последовательность узнавания 5'-GCCG-3'/3'-CGCG-5' обладает палиндромной симметрией, то есть повторяет себя при повороте на 180 градусов вокруг центральной оси. Расположение метилированных цитозинов в сайте узнавания также может образовывать палиндром и быть симметричным. В таблице 1 представлена структура сайта узнавания *GlaI* в олигонуклеотидных дуплексах, используемых в данной работе, и дано их краткое обозначение.

На рисунке 2 приведен радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов гидролиза олигонуклеотидных дуплексов G7*/G8, G7*/G4, G7*/G6, G3*/G8, G5*/G8, G3*/G4 различными количествами эндонуклеазы *GlaI*.

Экспериментальные данные обрабатывались, как указано в «Материалах и методах», и полученные численные значения для дуплексов G7*/G8, G3*/G8, G7*/G4, G8*/G7, G8*/G3 и G4*/G7 представлены на рисунке 3, а для дуплексов G7*/G6, G6*/G7, G8*/G5 и G5*/G8 — на рисунке 4, в виде зависимости доли гидролизированных олигонуклеотидных дуплексов (в процентах) от количества добавленного фермента *GlaI*. Аналогичные результаты для дуплексов G3*/G4, G4*/G3 и G7*/G2 представлены на рисунке 5. На рисунке 4 также, для удобства сравнительного анализа, представлены данные по расщеплению олигонуклеотидов G3*/G8 и G4*/G7.

Как видно из рисунка 3, наибольшая активность фермента наблюдается при наличии в сайте узнавания четырех 5-метилцитозинов (полностью симметричный дуплекс G7*/G8). Существенно меньшая эффективность гидролиза наблюдается для несимметричного сайта с тремя метилированными цитозинами, из которых два являются внутренними. В этих дуплексах (G3*/G8 и G4*/G7) скорости расщепления цепи ДНК с двумя метильными группами отличаются незначительно. При этом гидролиз комплементарной цепи ДНК с одной метильной группой ферментом *GlaI* происходит с меньшей, но также практически равной активностью для обоих олигонуклеотидов.

Из данных, приведенных на рисунке 4, видно, что значительно более низкая эффективность гидролиза наблюдается для несимметричных олигонуклеотидных дуплексов с тремя метилцитозинами, из которых два являются внешними (G7*/G6, G6*/G7, G8*/G5 и

Структура олигонуклеотидных дуплексов

Олигонуклеотидные дуплексы	Расположение С5-метилированных цитозинов в сайте узнавания Glal	Обозначение дуплекса
G1*/G2, G2*/G1	5'-GCGC-3' 3'-CGCG-5'	—
G1*/G4, G2*/G3	5'-GC G C-3' 3'-CG(m5C)G-5'	—┐
G3*/G2, G4*/G1	5'-G(m5C)GC-3' 3'-C G CG-5'	┐—
G1*/G6, G2*/G5	5'- G CGC-3' 3'-(m5C)GCG-5'	┐—
G5*/G2, G6*/G1	5'-GCG(m5C)-3' 3'-CGC G -5'	—┐
G1*/G8, G2*/G7	5'- G C G C-3' 3'-(m5C)G(m5C)G-5'	┐┐
G7*/G2, G8*/G1	5'-G(m5C)G(m5C)-3' 3'-C G C G -5'	┐┐
G3*/G4, G4*/G3	5'-G(m5C) G C-3' 3'-C G (m5C)G-5'	┐┐
G5*/G6, G6*/G5	5'- G CG(m5C)-3' 3'-(m5C)GC G -5'	┐┐
G3*/G6, G4*/G5	5'- G (m5C)GC-3' 3'-(m5C) G CG-5'	┐┐
G5*/G4, G6*/G3	5'-GC G (m5C)-3' 3'-CG(m5C) G -5'	—┐┐
G3*/G8, G4*/G7	5'- G (m5C) G C-3' 3'-(m5C) G (m5C)G-5'	┐┐┐
G7*/G4, G8*/G3	5'-G(m5C) G (m5C)-3' 3'-C G (m5C) G -5'	┐┐┐
G5*/G8, G6*/G7	5'- G C G (m5C)-3' 3'-(m5C)G(m5C) G -5'	┐┐┐
G7*/G6, G8*/G5	5'- G (m5C)G(m5C)-3' 3'-(m5C) G C G -5'	┐┐┐
G7*/G8, G8*/G7	5'- G (m5C) G (m5C)-3' 3'-(m5C) G (m5C) G -5'	┐┐┐┐

G5*/G8). Однако в этом случае скорости расщепления всех цепей ДНК в этих дуплексах близки между собой. И, наконец, еще меньшая активность фермента наблюдается при расщеплении симметричного олиго-

нуклеотидного дуплекса, содержащего два внутренних метилированных цитозина — дуплекс G3*/G4 (рис. 5). Олигонуклеотиды с двумя метилцитозинами в одной цепи являются плохими субстратами и расщепляются

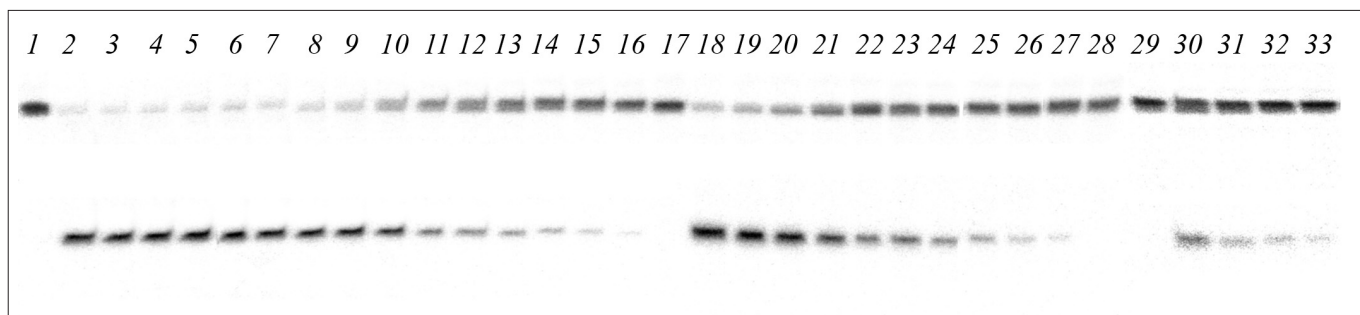


Рис.2. Расщепление олигонуклеотидных дуплексов эндонуклеазой GlaI.

Дорожки: 1–6 – дуплекс G7*/G8, 7–11 – дуплекс G7*/G4, 12–16 – дуплекс G7*/G6, 17–22 – дуплекс G3*/G8, 23–28 – дуплекс G5*/G8, 29–33 – дуплекс G3*/G4. GlaI, 8 ед. акт. – 2, 7, 12, 18, 23, 30. GlaI, 4 ед. акт. – 3, 8, 13, 19, 24, 31. GlaI, 2 ед. акт. – 4, 9, 14, 20, 25, 32. GlaI, 1 ед. акт. – 5, 10, 15, 21, 26, 33. GlaI, 0,5 ед. акт. – 6, 11, 16, 22, 27

только при очень высоких концентрациях GlaI (G7*/G2 на рис. 5С и рис. 7). Для дуплексов с двумя внешними 5-метилцитозинами, одним внешним и один внутренним 5-метилцитозинами в разных цепях и дуплексов с одним 5-метилцитозином сколько-нибудь заметного гидролиза мы не наблюдали (данные не приводятся).

Для сравнения эффективности расщепления различных олигонуклеотидов мы определяли количество

единиц активности фермента, необходимое для достижения гидролиза половины исходного дуплекса (уровень гидролиза 1) и его четверти (уровень гидролиза 2). В первом случае для проведения сравнения использовался рисунок 3. Во втором случае использовались данные, представленные на рисунках 4 и 5. В таблице 2 собраны полученные таким образом результаты.

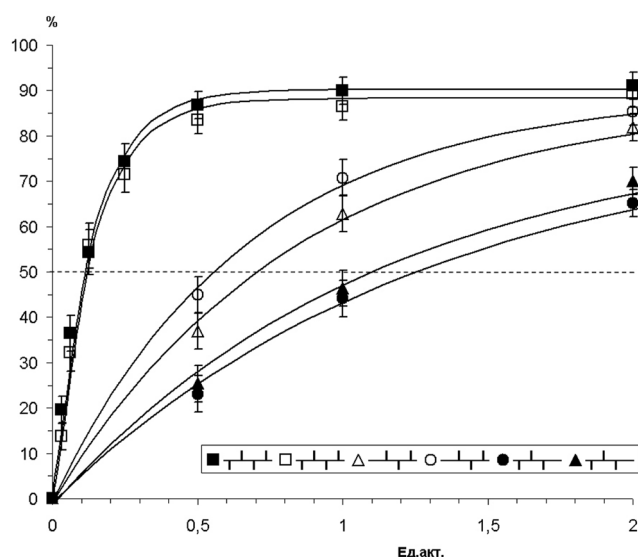


Рис. 3. Зависимость доли гидролизированных дуплексов в % (ось Y) от количества добавленной в реакцию смесь эндонуклеазы GlaI в ед. акт.(ось X). ■ – дуплекс G7*/G8, □ – дуплекс G8*/G7, ● – дуплекс G3*/G8, ○ – дуплекс G8*/G3, ▲ – дуплекс G4*/G7, △ – дуплекс G7*/G4

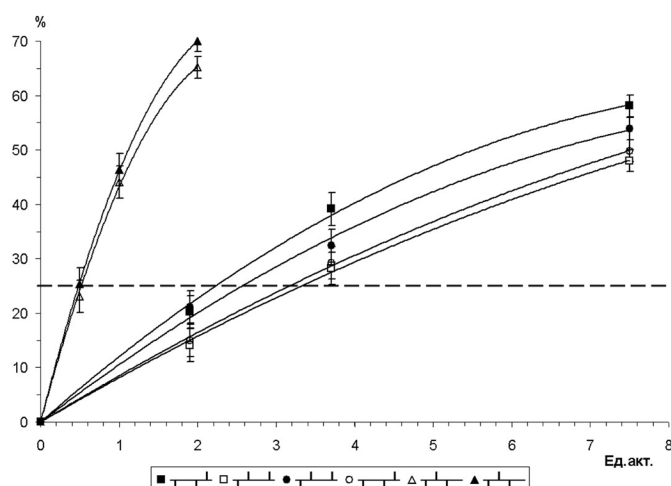


Рис. 4. Зависимость доли гидролизированных дуплексов в % (ось Y) от количества добавленной в реакцию смесь эндонуклеазы GlaI в ед. акт.(ось X). ▲ – дуплекс G4*/G7, △ – дуплекс G3*/G8, ■ – дуплекс G5*/G8, □ – дуплекс G8*/G5, ● – дуплекс G7*/G6, ○ – дуплекс G6*/G7

Таблица 2

Количество единиц активности фермента, необходимых для достижения 25%- и 50%-ного уровней гидролиза олигонуклеотидного дуплекса концентрацией 62,5 нМ в 10 микролитрах реакционной смеси

Олигонуклеотидный дуплекс	Обозначение дуплекса	Количество единиц активности фермента, необходимых для 25%-ного гидролиза	Количество единиц активности фермента, необходимых для 50%-ного гидролиза
G7*/G8 G8*/G7			0,12 0,12
G3*/G8 G8*/G3		0,43	1,25 0,57
G4*/G7 G7*/G4		0,41	1,11 0,72
G5*/G8 G8*/G5		2,2 3,3	
G7*/G6 G6*/G7		2,5 3,1	
G4*/G3 G3*/G4		11,2 10,3	

Из таблицы 2 видно, что минимальное количество фермента, необходимое для расщепления половины олигонуклеотидного субстрата, требуется при гидролизе дуплекса с четырьмя метилцитозинами (G7*/G8). Если в сайте 5'-GCGC-3'/3'-CGCG-5' остается неметилированным один внешний цитозин (G3*/G8, G4*/G7), то, по сравнению с гидролизом дуплекса G7*/G8, требуется в 5 раз больше фермента для расщепления полностью метилированной цепи и в 10 раз больше для гидролиза второй цепи дуплекса. Таким образом, несимметричные дуплексы G3*/G8 и G4*/G7 в целом расщепляются в 10 раз хуже дуплекса G7*/G8. Эффективность расщепления дуплексов G6*/G7, G5*/G8, в которых метилированы два внешних и один внутренний цитозин, еще в 6–8 раз меньше.

Поскольку в бактериальных штаммах обнаружена ДНК-метилтрансфераза, способная метилировать внутренние цитозины в положении С5 в последовательности GCGC, особый интерес представляет сравнение эффективности гидролиза симметрично метилированных олигонуклеотидных дуплексов G3*/G4 и G7*/G8. Из рисунка 5 видно, что количество фермента, необходимого для достижения 50%-ного гидролиза в дуплексе, содержащем все четыре метилированных цитозина (G7*/G8),

приблизительно в 200 раз меньше, чем для дуплекса, содержащем только два внутренних метилированных цитозина (G3*/G4).

При этом, как видно из результатов расщепления различных субстратов на рисунках 3–5, практически отсутствует влияние окружения сайта на эффективность расщепления олигонуклеотидного дуплекса. В самом деле, хотя в G3 и других нечетных номерах олигонуклеотидов, последовательности узнавания предшествует кластер пиримидинов, тогда как в G4 и других четных номерах олигонуклеотидов перед узнаваемой последовательностью находится блок пуринов, различий в активности фермента по расщеплению четных и нечетных цепей в одинаково метилированных олигонуклеотидах не обнаруживается.

Как следует из полученных результатов, эффективность расщепления олигонуклеотидных дуплексов ферментом Glal зависит от следующих факторов:

1. Количество метильных групп в сайте узнавания. Чем больше метильных групп в сайте узнавания, тем выше скорость гидролиза. Из приведенных выше данных видно, что гидролизуются только те сайты, которые содержат от двух до четырех метилированных цитозинов. Причем, в первом случае,

заметный уровень гидролиза наблюдается только в случае метилирования внутренних цитозинов. Максимальная же скорость гидролиза наблюдается при наличии четырех 5-метилцитозинов в сайте узнавания.

2. Метилирование внутренних цитозинов в сайте является более важным для эффективности гидролиза, чем метилирование внешних. В пользу этого утверждения говорит, во-первых, тот факт, что

при одном и том же количестве метильных групп сайт, в котором модифицированы два внутренних цитозина и один внешний, гидролизует лучше сайта, в котором метилированы два внешних и один внутренний цитозин. Кроме того, если в сайте метилированы два внешних цитозина, то гидролиз отсутствует, тогда как, если метилированы два внутренних основания, то гидролиз происходит.

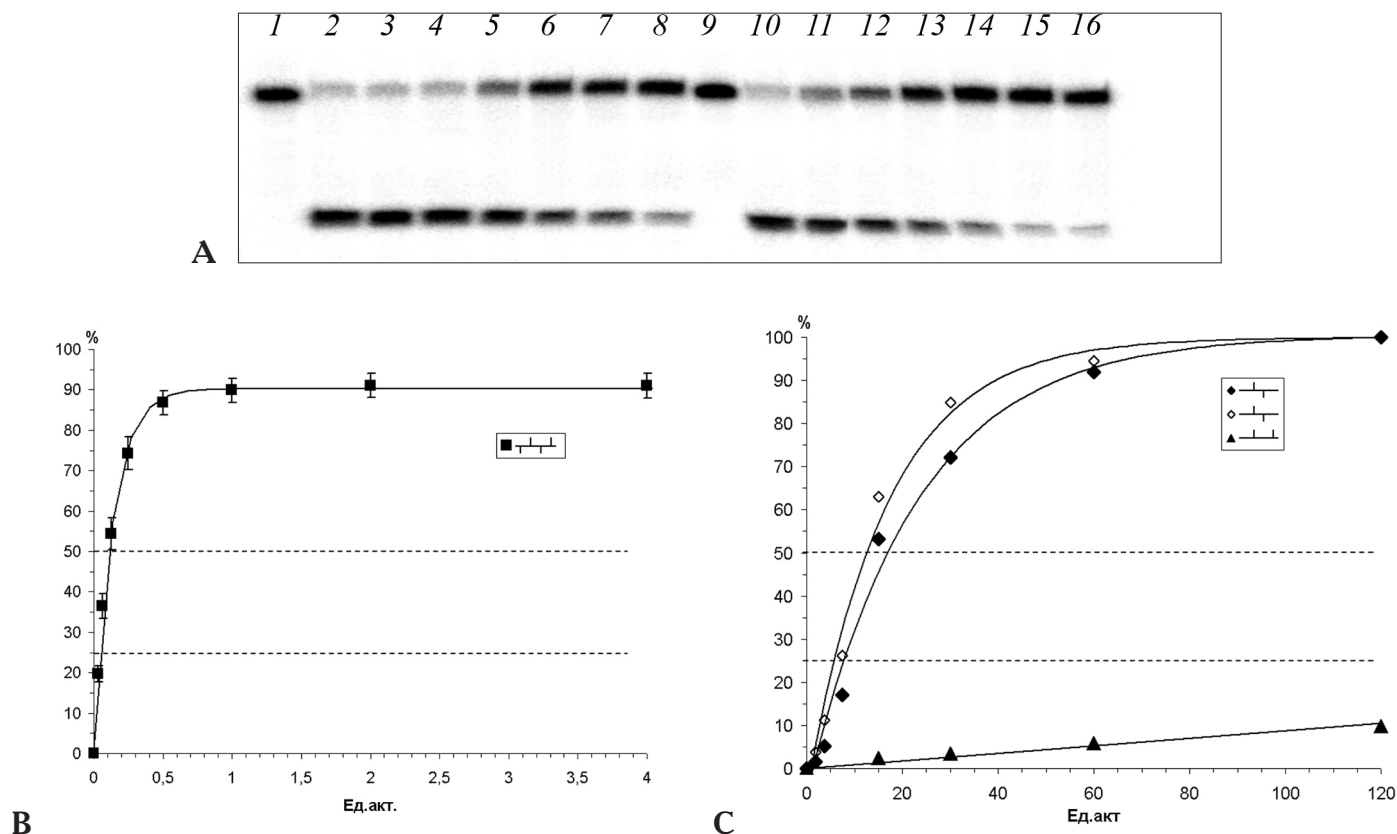


Рис. 5. Сравнение скоростей гидролиза олигонуклеотидных дуплексов с метилированием всех четырех цитозинов (дуплекс G7*/G8) и двух внутренних цитозинов (дуплекс G3*/G4) в сайте GCGC.

А: Электрофореграмма. Дорожки: 1–8 – дуплекс G7*/G8 (контроль, 2,5, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,06, 0,03 ед. акт. GluI, соответственно), 9–16 – дуплекс G3*/G4 (контроль в 120, 60, 30, 15, 7,5, 3,75, 2 ед. акт. GluI, соответственно).

В, С: Зависимость доли гидролизированных дуплексов в % (ось Y) от количества добавленной в реакционную смесь эндонуклеазы GluI в ед. акт. (ось X). ♦ – дуплекс G3*/G4, ◇ – дуплекс G4*/G3, ▲ – дуплекс G7*/G2, ■ – дуплекс G7*/G8

Ранее мы изучали расщепление ферментом GluI плазмиды pHspAI, содержащей ген ДНК-метилазы HspAI, узнающей и модифицирующей последовательность 5'-GCGC-3'/3'-CGCG-5' с образованием двух внутренних метилированных цитозинов [3]. Представляет интерес сравнить активность фермента GluI при расщеплении плазмидной ДНК и олигонуклеотидных субстратов. На рисунке 6 показана зависимость рас-

щепления плазмиды pHspAI различными количествами фермента. Сравнение полученных экспериментальных данных с расчетной картиной гидролиза [3] показывает, что практически полный гидролиз наблюдается при добавлении в реакционную смесь 120 единиц активности фермента.

Как видно из данных, приведенных на рисунке 5, для случая олигонуклеотидного дуплекса G3*/G4, при концен-

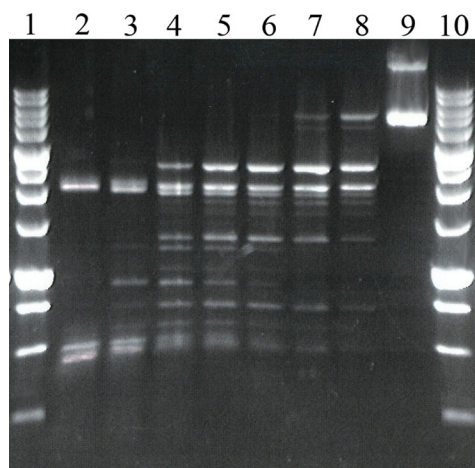


Рис. 6. Гидролиз плазмиды рHspAI различными количествами GluI. Концентрация сайтов 5'-G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G-5' — 58,7 нМ. Дорожки: 1, 10 — маркер 1 kb, 2–8 — плазида рHspAI, обработанная GluI (2 — 120 ед. акт., 3 — 60 ед. акт., 4 — 30 ед. акт., 5 — 15 ед. акт., 6 — 7,5 ед. акт., 7 — 3,75 ед. акт., 8 — 1,875 ед. акт.), 9 — исходная плазида рHspAI

трации сайтов 5'-G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G-5' 62,5 нМ, существенный гидролиз субстрата достигается также при добавлении 120 и более единиц активности фермента. Из сравнения этих результатов следует, что эффективности гидролиза ферментом GluI сайтов 5'-G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G-5', расположенных на олигонуклеотидном дуплексе и в плазмидной ДНК, практически совпадают.

Как известно, модификация цитозина в составе ДНК в бактериальных клетках происходит с образованием как 5-метилцитозина, так и N4-метилцитозина [6, 7]. Нами была проверена возможность гидролиза ДНК, у которой последовательность 5'-GCCG-3' метилирована в положении С4. Для этой цели мы использовали дуплекс G9*/G10, который отличается от дуплекса G7*/G8 только тем, что в сайте 5'-GCCG-3' все четыре цитозина метилированы по положению NC4, а не С5.

Как видно из рисунка 7, GluI не гидролизует дуплекс G9*/G10, содержащий сайт 5'-G(m4C)G(m4C)-3'/3'-(m4C)G(m4C)G-5'. При этом присутствие цитозина, метилированного в положении NC4 наряду с С5, по-видимому, не влияет на расщепление ДНК: скорость гидролиза дуплекса G7*/G10, в котором два цитозина в одной цепи ДНК метилированы в положении С5, а два цитозина в другой цепи — в положении NC4, не отличается от скорости расщепления дуплекса G7*/G2, в котором присутствуют лишь два 5-метилцитозина в одной из цепей.

Остается неясным вопрос о роли эндонуклеаз IIM в функционировании бактериальной клетки. Одна из возможных функций ферментов этого типа — защита от вторжения чужеродной метилированной фаговой ДНК [2, 3]. И если для ферментов DpnI и BisI такая роль вполне возможна, то в случае GluI функция защиты от такой ДНК представляется маловероятной. Известные на сегодня бактериальные и фаговые метилазы, которые модифицируют последовательность 5'-GCCG-3', мети-

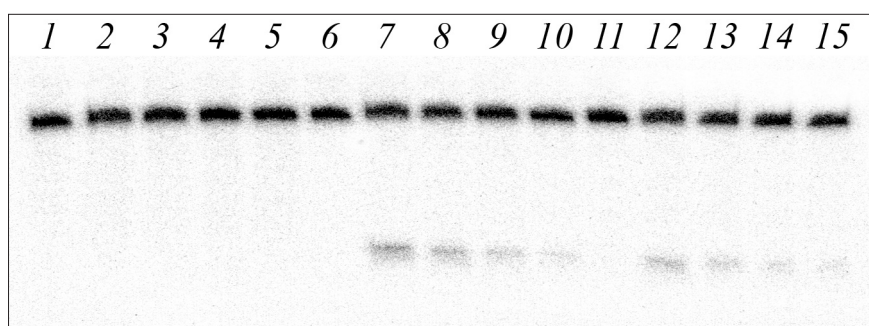


Рис. 7. Влияние С4-модификации сайта 5'-GCCG-3' на способность GluI гидролизовать ДНК.

Дорожки:

1 — дуплекс G9*/G10;

2–5 — дуплекс G9*/G10, обработанный GluI (120, 60, 30, 15 ед. акт., соответственно);

6 — дуплекс G7*/G10;

7–10 — дуплекс G7*/G10, обработанный GluI (120, 60, 30, 15 ед. акт., соответственно);

11 — дуплекс G7*/G2;

12–15 — дуплекс G7*/G2, обработанный GluI (120, 60, 30, 15 ед. акт., соответственно)

лируют только внутренний цитозин в сайте узнавания [8]. В результате этой модификации образуется сайт 5'-G(m5C)GC-3' / 3-GCG(m5C)G-5', скорость гидролиза которого ферментом *GlaI* более чем на два порядка хуже, чем сайта с четырьмя метильными группами. Поэтому остаются открытыми два следующих вопроса:

1. Играет ли какую-то биологическую роль высокая эффективность гидролиза рестриктазой *GlaI* сайтов GCGC с тремя или четырьмя метильными группами?
2. Возможна ли в бактериальной клетке модификация сайта GCGC, при которой метилируются три или четыре цитозина в сайте узнавания?

Следует отметить, что в эукариотических организмах выявлены метилазы, модифицирующие цитозин в положении C5 в сайте 5'-CG-3'. Как показано выше, *GlaI* способен гидролизовать ДНК, модифицированную такими ДНК-метилтрансферазами, что может сделать его важным инструментом в определении статуса метилирования эукариотической ДНК.

В настоящее время основным методом определения статуса метилирования небольших участков эукариотической ДНК (не больше нескольких десятков нуклеотидов) является метод метилспецифического ПЦР [9]. Несомненными достоинствами этого метода являются, во-первых, возможность выявить метилирование в очень небольшом участке эукариотической хромосомной ДНК, а, во-вторых, возможность использования для анализа статуса метилирования очень небольших количеств ДНК. По сравнению с методом метилспецифичного ПЦР применение эндонуклеазы *GlaI* позволяет оценивать статус метилирования сразу всей хромосомной ДНК той или иной ткани.

Специфичность эндонуклеаз рестрикции характеризуется двумя параметрами — сайтом узнавания и местом расщепления ДНК. Как показано выше, в случае ИМ эндонуклеаз существенную роль при определении специфичности и активности фермента играют также количество и распределение 5-метилцитозинов в сайте узнавания. Таким образом, при описании последовательности узнавания сайт-специфических эндонуклеаз ИМ типа необходимо указывать три параметра, ее определяющие: собственно нуклеотидная последовательность, место расщепления ДНК и положение 5-метилцитозинов в сайте узнавания.

Литература

1. Arber W., Linn S. DNA modification and restriction // Annual Review of Biochemistry. — 1969. — Vol. 38. — P. 467–500.
2. Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Гончар Д.А., Абдурашитов М.М., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции *Bis I* из *Bacillus subtilis* T30 узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(m5C)NGC-3' // Биотехнология. — 2005. — 3. — С. 22–26.
3. Чернухин В.А., Наякишина Т.Н., Абдурашитов М.А., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Михненко Н.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции *GlaI* узнает метилированную последовательность 5'-G(5mC)^GC-3' // Биотехнология. — 2006. — № 4. — С. 23–28.
3. Pingoud A., Jeltsch A. Structure and function of type II restriction endonucleases // Nucleic Acids Research. — 2001. — Vol. 29. — P. 3705–3727.
4. Lack S., Greenberg B. A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA // J. Biol. Chem. — 1975. — Vol. 250. — P. 4060–4066.
5. Malone T., Blumenthal R.M., Cheng X. Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes // J. Mol. Biol. — 1995. — Vol. 253. — P. 618–632.
6. Dryden D.T. Bacterial DNA Methyltransferases // In: S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases: structures and functions / Eds. Cheng X., Blumenthal R.M. — Singapore: World Scientific, 1999. — P. 283–340.
7. Roberts R.J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. REBASE: restriction enzymes and methyltransferases // Nucleic Acids Res. — 2003. — Vol. 31. — P. 418–420.
8. Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S., Nelkin B.D., Baylin S.B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1996. — Vol. 93. — P. 9821–9826.

Принятые сокращения:

* — меченный ³²P олигонуклеотид,
ед. акт. — единица активности.

DEPENDENCE OF SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE *GlaI* ACTIVITY ON QUANTITY AND LOCATION OF METHYLCYTOSINES IN RECOGNITION SEQUENCE 5'-GCGC-3'.

J.E. TOMILOVA, V.A. CHERNUKHIN, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd., Novosibirsk

The activity dependence of site-specific endonuclease *GlaI* that hydrolyzes only methylated DNA sequence 5'-GCGC-3' on quantity and location of 5-methylcytosines in enzyme's recognition sequence have been studied. A significant DNA cleavage has been observed for oligonucleotides duplexes containing four and three 5-methylcytosines or two internal modified bases. The cleavage efficiency is maximal for DNA duplex with four 5-methylcytosine and decreases when a number of methylated bases are lower.

Keywords: site-specific DNA-endonuclease, DNA metylation.