

Зависимость активности сайт-специфической эндонуклеазы Glal от количества и положения метилированных цитозинов в узнаваемой последовательности 5'-GCGC-3'.

Категория: [Исследование свойств ферментов](#)

Просмотров: 7292

[Томилова Ю.Э.](#), Чернухин В.А., Дегтярев С.Х.

Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А.Овчинникова, 2006, т.2, №1, с. 30-39.

Изучена зависимость активности сайт-специфической эндонуклеазы Glal, узнающей и гидролизующей метилированную последовательность ДНК 5'-GCGC-3'/3'-CGCG-5', от количества и положения метилированных по 5-ому 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. Glal расщепляет сайты, содержащие 5-метилцитозины, но не N4-метилцитозины.

Большинство известных до сих пор сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз микроорганизмов являются эндонуклеазами рестрикции, т.е. 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-го типа, к подгруппе IIM, т.е. 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(6mA)^TC-3'[5]. Две других эндонуклеазы не имеют изошизомеров и гидролизуют ДНК, метилированную по цитозиновому основанию в положении C5: BslI узнает и гидролизует последовательность 5'-G(5mC)^NGC-3' [2], Glal – последовательность 5'- G(5mC)^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 Glal в зависимости от метилирования цитозинов в сайте узнавания 5'-GCGC-3'.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экспериментов брали эндонуклеазы рестрикции, T4 полинуклеотидкиназу, и буферные растворы производства НПО «СибЭнзим» (Россия). Олигодезоксирибонуклеотиды следующего состава, служившие субстратом для эндонуклеазы Glal, были синтезированы в НПО «СибЭнзим» (Россия):

G1: 5'-CTATGAACGTTTTTCGCGCTGACGGACCGTATC-3'

G2: 5'-GATACGGTCCGTCAGGCGCGAAAACGTTTCATAG-3'

G3: 5'-CTATGAACGTTTTTCG(5mC)GCTGACGGACCGTATC-3'

G4: 5'-GATACGGTCCGTCAGG(5mC)GCGAAAACGTTTCATAG-3'

G5: 5'-CTATGAACGTTTTTCGCG(5mC)_TGACGGACCGTATC-3'

G6: 5'-GATACGGTCCGTCAGGCG(5mC)_GAAAACGTTTCATAG-3'

G7: 5'-CTATGAACGTTTTTCG(5mC)G(5mC)_TGACGGACCGTATC-3'

G8: 5'-GATACGGTCCGTCAGG(5mC)G(5mC)_GAAAACGTTTCATAG-3'

G9: 5'-CTATGAACGTTTTTCG(m4C)G(m4C)_TGACGGACCGTATC-3'

G10: 5'-GATACGGTCCGTCAGG(m4C)G(m4C)_GAAAACGTTTCATAG-3'

Олигонуклеотиды с чётным номером комплементарны олигонуклеотидам с нечётным номером. Все олигонуклеотидные дуплексы имеют одинаковую первичную структуру и отличаются друг от друга наличием или отсутствием метилцитозина в последовательности GCGC (сайт GCGC, узнаваемый Glal, подчеркнут). Выделение плазмидной ДНК pHspAI осуществляли с использованием набора «QIAGEN GmbH» (Германия) согласно протоколу производителя.

Приготовление субстрата для эндонуклеазы Glal

Одну из цепей олигонуклеотидного дуплекса модифицировали по 5'-концу с помощью T4-полинуклеотидкиназы и γ [³²P]АТФ. После очистки олигонуклеотида от побочных продуктов реакции к нему добавляли комплементарный немеченый олигонуклеотид и пробирку прогревали 5 минут при 95°C с последующим охлаждением до комнатной температуры на рабочем столе.

Гидролиз олигонуклеотидных дуплексов эндонуклеазой Glal

Реакцию гидролиза проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфер «Y» (33 mM Tris ацетат pH 7.9 (при температуре 25°C), 10 mM Mg(CH₃COO)₂, 66mM KCH₃COO, 1mM DTT) и олигонуклеотидный дуплекс в концентрации 62.5 нМ при температура 37°C в течение 1 часа. Эксперименты на рис 6 проводились в Glal-буфере (10 mM Tris-HCl pH 8.5 (при температуре 25°C), 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 1.5 mM β-меркаптоэтанол) при температуре 30°C).

За единицу активности фермента принимали такое его минимальное количество, которого достаточно для полного гидролиза олигонуклеотидного дуплекса G7*/G8 в Glal-буфере при температуре 30°C.

Определение степени гидролиза олигонуклеотидных дуплексов

Электрофорез продуктов гидролиза проводили в денатурирующем 20%-ном 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 [³²P], за вычетом фона. Процент гидролиза определяли как отношение DLU для полученного продукта реакции к сумме DLU, приходящихся на оставшуюся 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 Glal

Реакцию проводили в 80 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфер «Y» (33 mM Tris ацетат pH 7.9 (при 25°C), 10 mM Mg(Ac)₂, 66mM KAc, 1mM DTT) и 0.8 мкг ДНК плазмиды pHspAI [3] при температуре 37°C 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 Glal, которая не расщепляет ДНК ни одного из широко используемых субстратов (ДНК фага лямбда и T7, аденовирусную ДНК, плазмиды pUC19, pBR322) 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 *GlaI* расщепляет последовательность 5'-G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G-5'. Однако неясным оставался вопрос о влиянии метилирования остальных цитозинов в узнаваемой последовательности 5'-GCGC-3' на активность фермента *GlaI*. В данной работе проводилось изучение эффективности действия эндонуклеазы *GlaI* в зависимости от количества и положения метилированных цитозинов в сайте узнавания фермента 5'-GCGC-3'. В отличие от всех известных эндонуклеаз рестрикции, получение ДНК-субстратов для *GlaI* в виде плазмидных, фаговых или других природных 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'-GCGC-3'/3'-CGCG-5'.

На рис.1 приведены результаты расщепления олигонуклеотидного дуплекса (одна из цепей которого мечена ^{32}P) с полностью метилированной последовательностью узнавания 5'-G(5mC)G(5mC)-3'/3'-(5mC)G(5mC)G-5' различными эндонуклеазами. Как видно из рисунка, данный олигонуклеотид гидролизуются эндонуклеазами рестрикции *AclI* (дор.3) и *Rsr2I* (дор.4), имеющими сайты узнавания 5'-AA[^]CGTT-3' и 5'-CG[^]GWCCG-3', 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'-GCGC-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'-GCGC-3'/3'-CGCG-5'.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

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'-GCGC-3'/3'-CGCG-5' обладает палиндромной симметрией, т.е. 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 Glal в олигонуклеотидных дуплексах, используемых в данной работе, и дано их краткое обозначение.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Таблица 1. Структура олигонуклеотидных дуплексов

На рис. 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 Glal.

Рис. 2. Расщепление олигонуклеотидных дуплексов эндонуклеазой Glal. 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 . Glal, 8 ед.акт. – 2, 7, 12, 18, 23, 30. Glal, 4 ед.акт. – 3, 8, 13, 19, 24, 31. Glal, 2 ед.акт. - 4, 9, 14, 20, 25, 32. Glal, 1 ед.акт. – 5, 10, 15, 21, 26, 33. Glal, 0.5 ед.акт. – 6, 11, 16, 22, 27.

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 рис.3, а для дуплексов G7*/G6, G6*/G7, G8*/G5 и G5*/G8 на рис.4, в виде зависимости доли гидролизированных олигонуклеотидных дуплексов (в процентах) от количества добавленного фермента Glal. Аналогичные результаты для дуплексов G3*/G4, G4*/G3 и G7*/G2 представлены на рисунке 5. На рис.4 также, для удобства сравнительного анализа, представлены данные по расщеплению олигонуклеотидов G3*/G8 и G4*/G7.

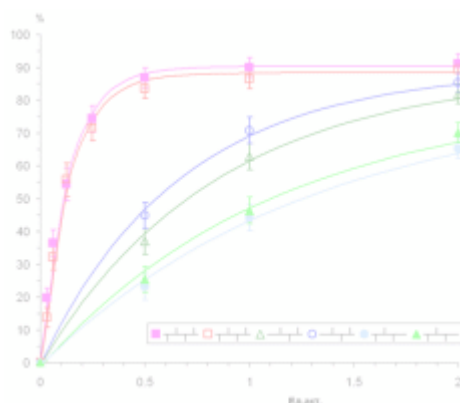


Рис. 3. Зависимость доли гидролизированных дуплексов в % (ось Y) от количества добавленной в реакцию смесь эндонуклеазы Glal в Ед. акт. (ось X). ϕ - дуплекс G7*/G8, £ - дуплекс G8*/G7, ~ - дуплекс G3*/G8, тм - дуплекс G8*/G3, р - дуплекс G4*/G7, r - дуплекс G7*/G4.

Как видно из рисунка 3, наибольшая активность фермента наблюдается при наличии в сайте узнавания четырех 5-метилцитозинов (полностью симметричный дуплекс G7*/G8). Несимметричные сайты с тремя метилированными цитозинами, из которых два являются внутренними, гидролизуются менее эффективно. В этих дуплексах (G3*/G8 и G4*/G7) скорости расщепления цепей ДНК с двумя метильными группами отличаются незначительно. При этом, для обоих дуплексов гидролиз ферментом Glal комплементарной цепи ДНК с одной метильной группой происходит с несколько меньшей и также практически равной активностью.

Рис. 4. Зависимость доли гидролизированных дуплексов в % (ось Y) от количества добавленной в реакцию смесь эндонуклеазы Glal в Ед. акт. (ось X). р - дуплекс G4*/G7, r - дуплекс G3*/G8, ϕ -

дуплекс G5*/G8, £ - дуплекс G8*/G5, ~ - дуплекс G7*/G6, тм - дуплекс G6*/G7.

Из данных, приведенных на рис.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 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 олигонуклеотидного дуплекса, содержащего два внутренних метилированных цитозина - дуплекс G3*/G4 (рис 5). Олигонуклеотид с двумя метилцитозинами в одной цепи является плохим субстратом и расщепляется только при очень высоких концентрациях Glal (G7*/G2 на рис.5 и рис.8). 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).

Рис. 5. Зависимость доли гидролизированных дуплексов в % (ось Y) от количества добавленной в реакционную смесь эндонуклеазы Glal в Ед.акт.(ось X). ¿ - дуплекс G3*/G4, ¯ - дуплекс G4*/G3, p - дуплекс G7*/G2.

На рис. 6а приведены данные по зависимости гидролиза дуплексов G7*/G8 и G4*/G7 от времени в буфере «Y» (СибЭнзим) и Glal буфере при 30°C. Как видно из рисунка активности фермента на этих субстратах в данных буферах не отличаются. На рисунке 6b приведены данные по активности фермента в Glal-буфере на различных субстратах. Как видно из рисунков 6а и 6b, активность фермента при гидролизе дуплекса с четырьмя метилцитозинами в сайте узнавания (дуплекс G7*/G8) в 2 - 3 раза выше активности фермента при расщеплении олигонуклеотидов с

одним внешним неметилованным цитозином. (дуплекс G4*/G7). Расщепление дуплекса G7*/G6, в котором метилированы два внешних и один внутренний цитозин, происходит с активностью, в 6 - 7 раз меньшей активности на субстрате G7*/G4. Данные, приведенные на рис. 5 (в сравнении с рис. 4) и 6b, показывают, что активность фермента на дуплексе G3*/G4 приблизительно в 2 раза меньше активности на субстрате G7*/G6. Активность фермента на дуплексе G7*/G2 наблюдается только при очень высоких концентрациях фермента (рис.5 и рис.6B) и составляет менее 0.1% от активности фермента на дуплексе G7*/G8.

Рис. 6а. Зависимость доли гидролизированных олигонуклеотидных дуплексов с различной степенью метилирования сайта узнавания от времени: Зависимость доли гидролизированных дуплексов G7*/G8 (j и ¯), G7*/G4 (p и r) и G4*/G7 (¢ и £) в % в буфере «Y» (СибЭнзим) и Glal-буфере при 30°C



Рис. 6b. Зависимость доли гидролизированных олигонуклеотидных дуплексов с различной степенью метилирования сайта узнавания от времени: Зависимость доли гидролизированных

дуплексов G7*/G6 - ϕ , G7*/G4 - ρ , G7*/G2 - $\hat{U}$, G4*/G7 - τ и G4*/G3 - $\sim$ в % в Glal-буфере при 30°C.

В таблице 2 суммированы полученные данные по активности фермента на различных метилированных субстратах. Из таблицы видно, что Glal эффективно расщепляет последовательность ДНК 5'-GCGC-3'/3'-CGCG-5', содержащую 4 или 3 модифицированных основания, при условии метилирования обоих внутренних цитозинов. Существенно хуже расщепляются сайты с двумя внешними и одним внутренним цитозином, а также с двумя внутренними модифицированными цитозинами. Дуплекс с двумя модифицированными основаниями на одной цепи расщепляется незначительно и только при больших концентрациях фермента.

Таблица 2. Относительная активность Glal на метилированных олигонуклеотидных дуплексах

Поскольку в бактериальных штаммах обнаружена ДНК-метилтрансфераза, способная метилировать внутренние цитозины в положении C5 в последовательности 5'-GCGC-3', особый интерес представляет сравнение эффективности гидролиза симметрично метилированных олигонуклеотидных дуплексов G3*/G4 и G7*/G8. Из таблицы 2 видно, что активность фермента при гидролизе дуплекса, содержащего все четыре метилированных цитозина (G7*/G8), приблизительно в 45 раз больше, чем для дуплекса, содержащем только два внутренних метилированных цитозина (G3*/G4).

При этом, как видно из результатов расщепления различных субстратов на рис.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 дуплексах 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 2-х 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 свидетельствует тот факт, что при одном и том же количестве метильных групп, сайт, в котором модифицированы два внутренних цитозина и один внешний, гидролизуетсся существенно 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.

Ранее мы изучали расщепление ферментом Glal плазмиды pHspAI, содержащей ген ДНК-метиلاзы HspAI, узнающей и модифицирующей последовательность 5'-GCGC-3'/3'-CGCG-5' с образованием двух внутренних метилированных цитозинов [3]. Представляет интерес сравнить активность фермента Glal при расщеплении плазмидной ДНК и олигонуклеотидных субстратов. На рис. 7 показана зависимость расщепления плазмиды pHspAI различными количествами фермента. Сравнение полученных экспериментальных данных с расчетной картиной гидролиза [3], показывает, что практически полный гидролиз 0.29 пикомолей плазмидной ДНК (4.72 пикомоля сайтов узнавания) наблюдается при добавлении в реакционную смесь 120 единиц активности фермента.

Рис. 7. Гидролиз плазмиды pHspAI различными количествами Glal. Концентрация сайтов 5'-G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G-5' – 59 нМ. Дорожки: 1, 10 – маркёр 1 kb, 2-8 – плазида pHspAI, обработанная Glal (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 – 1.9 ед.акт.), 9 – исходная плазида pHspAI;

Как видно из данных, приведенных на рис.5, для случая олигонуклеотидного дуплекса G3*/G4 существенный гидролиз 0.62 пикомоля сайтов 5'-G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G-5' достигается при добавлении 120 и более единиц активности фермента. Из сравнения этих результатов следует, что в условиях наших экспериментов, эффективность гидролиза ферментом Glal сайтов 5'-G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G-5', расположенных на олигонуклеотидном дуплексе, приблизительно в 8 раза ниже, чем в плазмидной ДНК.

Ранее было показано, что модификация цитозинов 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'-GCGC-3' метилирована в положении NC4. Для этой цели мы использовали дуплекс G9*/G10, который отличается от дуплекса G7*/G8 только тем, что в сайте 5'-GCGC-3' все четыре цитозина метилированы по положению NC4, а не C5.

Как видно из рисунка 8, Glal не гидролизует дуплекс G9*/G10, содержащий сайт 5'-G(m4C)G(m4C)-3'/3'-(m4C)G(m4C)G-5'. При этом, присутствие цитозинов, метилированных в положении NC4, по-видимому, не влияет на эффективность расщепления ДНК. Скорость гидролиза дуплекса G7*/G10, в котором два цитозина в одной цепи ДНК метилированы в положении C5, 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.

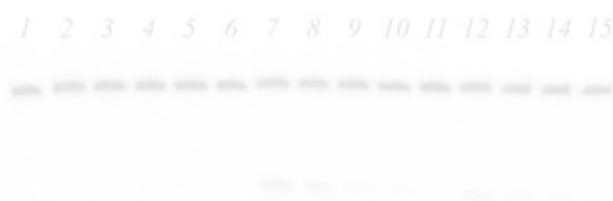


Рис. 8. Влияние C4-модификации сайта 5'-GCGC-3' на способность Glal гидролизовать ДНК. Дорожки: 1 – дуплекс G9*/G10; 2-5 – дуплекс G9*/G10, обработанный Glal (120, 60, 30, 15 ед. акт. соответственно); 6 – дуплекс G7*/G10; 7-10 – дуплекс G7*/G10, обработанный Glal (120, 60, 30, 15 ед. акт. соответственно); 11 - дуплекс G7*/G2; 12-15 - дуплекс G7*/G2, обработанный Glal (120, 60, 30, 15 ед. акт. соответственно)

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 BslI такая роль вполне возможна, то в случае Glal функция защиты от такой ДНК представляется маловероятной. Известные на сегодня бактериальные и фаговые метилазы, которые модифицируют последовательность 5'-GCGC-3', метилируют только внутренний цитозин в сайте узнавания [8]. В результате этой модификации образуется сайт 5'-G(5mC)GC-3'/3-GCG(5mC)G-5', скорость гидролиза которого ферментом Glal значительно ниже, чем сайта с четырьмя метильными группами. Поэтому остаются открытыми два следующих вопроса:

1. Играет ли какую-то биологическую роль высокая эффективность гидролиза рестриктазой Glal 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?

Как известно, во многих эукариотах найдены ДНК-метилтрансферазы, модифицирующие цитозин в положение С5 в динуклеотидах 5'-CG-3'. В настоящее время в рамках программы "Эпигеном человека" во многих лабораториях проводятся работы по изучению CG-метилирования хромосомной ДНК [9]. Основным инструментом таких исследований является метод метилспецифичной ПЦР [10]. Как следует из результатов этой работы, на основе фермента Glal могут быть разработаны новые методы определения статуса метилирования как небольших фрагментов хромосомной ДНК, так и целого генома.

В заключение следует отметить, что как правило, эндонуклеазы рестрикции характеризуются двумя параметрами: сайтом узнавания и местом расщепления ДНК. Как показано выше, в случае IIM 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 IIM 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 узнаёт метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)↑NGC-3' // Биотехнология. - 2005. - 3. - С.22-26. ([интернет-версия](#))
3. Чернухин В.А., Наякшина 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 *Glal*

- узнает метилированную последовательность 5'-G(5mC)⁶GC-3' // Биотехнология. - 2006. - 4. - С.31-35. ([интернет-версия](#))
4. Pingoud A., Jeltsch A. Structure and function of type II restriction endonucleases // Nucleic Acids Research. - 2001. - Vol.29. - P.3705-3727.
 5. Lack S., Greenberg B. A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA // J. Biol. Chem. – 1975. - Vol.250. - P.4060-4066.
 6. 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.
 7. 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.
 8. Roberts R.J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. REBASE: restriction enzymes and methyltransferases // Nucleic Acids Res. - 2003. - Vol. 31. - P. 418–420.
 9. Eckhardt F., Beck S., Gut I.G., Berlin K. Future potential of the Human Epigenome Project // Expert. Rev. Mol. Diagn.- 2004 - Vol. 4 -. P. 609-618
 10. 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

* - меченый ³²P олигонуклеотид, ед.акт. – единица активности.