

BlsI- и GluI-ПЦР АНАЛИЗ – НОВЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТИЛИРОВАННЫХ УЧАСТКОВ ДНК

Д.А. ГОНЧАР*, А.Г. АКИШЕВ, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

На основе уникальных метилзависимых сайт-специфических ДНК эндонуклеаз предложен новый метод BlsI- и GluI-ПЦР-анализа метилированных участков ДНК. Метод включает в себя обработку ДНК ферментами BlsI или GluI соответственно, с последующим ПЦР-анализом полученных гидролизатов. На примере изучения метилирования регуляторных областей ряда генов-онкосупрессоров человека показана эффективность нового метода и соответствие получаемых с его помощью результатов данным бисульфитного секвенирования ДНК. Исследование метилирования промоторной области гена *DAPK1*, района промотора и первого экзона гена *RARB* и области первого экзона гена *RASSF1A* новым методом выявило различные картины метилирования этих участков ДНК в клеточных линиях HeLa, Raji, U-937, Jurkat и контрольных клетках L-68. GluI-ПЦР-анализ определил метилирование регуляторной области гена *RARB* в ДНК всех малигнанных клеточных линий и отсутствие этой модификации в ДНК клеток L-68. BlsI- и GluI-ПЦР-анализ района первого экзона гена *RASSF1A* показал наличие метилированных участков ДНК только в клетках Raji и Jurkat. BlsI-ПЦР-анализ промоторной области гена *DAPK1* продемонстрировал дополнительное метилирование этого участка ДНК только в клетках Raji. Обсуждаются возможности использования BlsI- и GluI-ПЦР-анализа для выявления малигнанных клеток и определения типа онкопатологии.

Ключевые слова: метилирование ДНК, эндонуклеаза, онкосупрессор.

Введение

Одним из основных методов регуляции активности генов млекопитающих является метилирование ДНК, в результате которого модификации подвергаются только CG динуклеотиды с образованием 5-метилцитозинов в обеих цепях ДНК.

Метилирование ДНК осуществляется специальными ферментами ДНК-метилтрансферазами Dnmt1, Dnmt3a и Dnmt3b, которые присутствуют в клетках человека и млекопитающих [1].

Dnmt1 обеспечивает поддерживающее метилирование *in vivo*, то есть, после репликации ДНК этот фермент метилирует цитозин CG динуклеотида во вновь образованной цепи. Dnmt3a и Dnmt3b необходимы для метилирования *de novo*, и они, видимо, различаются по своим функциям и используемым субстратам [1]. Исследование субстратной специфичности ферментов Dnmt3a и Dnmt3b показало, что они метилируют CG

динуклеотид преимущественно в последовательности PuCGPu [2].

На сегодня основным способом определения метилированных цитозинов является метод бисульфитной конверсии, в результате которой цитозиновые основания в ДНК превращаются в урацил, тогда как 5-метилцитозин устойчив к этой реакции. Последующий анализ исходной и модифицированной ДНК различными методами позволяет определить положение метилированных цитозинов в исследуемой ДНК [3–6]. Следует отметить, что метод бисульфитной обработки имеет существенные недостатки. Он является довольно дорогим, сложным в исполнении, дает неоднозначные и трудновоспроизводимые результаты вследствие неполной конверсии ДНК. Помимо этого, из-за значительной деградации ДНК в ходе бисульфитной обработки данный метод применим только к небольшим фрагментам (100–150 пар оснований).

Кроме бисульфитной конверсии, существует также ферментативный метод определения метилированных участков ДНК, так называемый метод метилчувствительной ПЦР, который основывается на неспособности ряда рестриктаз расщеплять сайт узнавания при наличии в нем 5-метилцитозинов [7]. В этом случае ПЦР с праймеров, соответствующих участкам ДНК вокруг

© 2010 г. Гончар Д.А., Акишев А.Г., Дегтярев С.Х.

* Автор для переписки:

Гончар Данила Александрович

НПО «СибЭнзим»

630117 Новосибирск, ул. Академика Тимакова 2/12,

E-mail: gonchar@sibenzyme.ru

сайта узнавания, приводит к образованию расчетного фрагмента ДНК, тогда как неметилированный сайт будет расщепляться и продукт ПЦР не образуется. Применение метилчувствительной ПЦР ограничено малым набором сайтов узнавания подобных рестриктаз.

В последние годы в НПО «СибЭнзим» были открыты и охарактеризованы совершенно новые ферменты *BlsI* и *GlaI*, относящиеся к классу метилзависимых сайт-специфических ДНК эндонуклеаз и расщепляющие только метилированную ДНК.

GlaI гидролизует последовательность ДНК 5'-Pu(5mC)GPy-3'/3'-PyG(5mC)Pu-5' [8, 9], тогда как *BlsI* узнает последовательность 5'-GCNGC-3', если в обеих цепях этого сайта присутствуют, как минимум, по одному 5-метилцитозину (N не учитывается) [10, 11].

В данной работе на основе ферментов *BlsI* и *GlaI* мы предложили новый ферментативный метод анализа метилированной ДНК и с его помощью исследовали метилирование регуляторных участков ряда генов в ДНК человека.

Материалы и методы

В работе использовали геномную ДНК из клеточных линий человека HeLa, Jurkat, L-68, Raji, U-937, эндонуклеазы рестрикции (в скобках указан сайт узнавания соответствующего фермента): 1) *FatI* (5'-CATG-3'), 2) *HaeIII* (5'-GGCC-3'), 3) *TaqI* (5'-TCGA-3'); метил-зависимые эндонуклеазы *BlsI* (5'-G(5mC)NGC-3'/3'-(5mC)GN(5mC)G-5') и *GlaI* (5'-G(5mC)G(5mC)-3') производства НПО «СибЭнзим». ДНК *Drosophila melanogaster* была любезно предоставлена Л.П. Захаренко (Институт цитологии и генетики СО РАН).

Гидролиз геномной ДНК. ДНК в количестве 5 мкг расщепляли 100 ед. акт. *TaqI* в 100 мкл реакционной смеси в буфере, указанном производителем, при 65 °С в течение 2 ч. Затем ДНК очищали методом фенольной экстракции и высаживали этанолом, как описано ранее [12]. Далее осадок ДНК растворяли в необходимом количестве буфера TE (10 мМ Трис-НСl рН 8,0; 1 мМ ЭДТА) так, чтобы ее концентрация составляла 0,1 мкг/мкл.

Каждый из образцов *Taq*-обработанной ДНК в количестве 0,1 мкг затем расщепляли в 20 мкл реакционной смеси, содержащей либо 100 ед. акт. *HaeIII*, либо 10 ед. акт. *FatI*, либо 16 ед. акт. *BlsI*, либо 16 ед. акт. *GlaI* в реакционном буфере, рекомендованном производителем,

при температуре 37 °С (для *HaeIII*), 55 °С (для *FatI*), и 30 °С (для *BlsI* и *GlaI*) в течение 2 ч.

По окончании инкубации 1 мкл каждой реакционной смеси использовали для амплификации с соответствующими праймерами.

Полимеразная цепная реакция. Амплификацию проводили в 25 мкл в приборе «Терцик» (ДНК-Технология) с использованием набора для GC-ПЦР и HotStart *Taq* ДНК-полимеразы и праймеров производства НПО «СибЭнзим»:

PK51 5' GAA CCG TGT TTC CCT AGA ACC CAG TC 3' и PK387 5' CGG TCC GGC TGT CCT CCT CAC 3' для *DAPK1*;

AR118 5' CCG GGT AGG GTT CAC CGA AAG TTC ACT CGC 3' и AR941 5' TCA GCA AAG GGA ATC AAT ATG CAT GCC AGC 3' для *RARB*;

SF458 5' GCC ATG TCG GGG GAG CCT GAG CTC A 3' и SF879 5' CTG TGG CCC AGA TAC GAG TGG AGT GCG AC для *RASSF1A*.

Условия термоциклирования были оптимизированы для каждого из амплифицируемых фрагментов.

Электрофорез. Для выявления фрагментов в диапазоне 100–1000 п.о. использовали электрофорез в 1,2–2,0% агарозе «Low EEO, Type 1-A» («Sigma», США). На гель наносили по 10 мкл ПЦР-смеси на дорожку. Во всех случаях для электрофореза применяли трис-ацетатный буфер (40 мМ Трис-ацетат, рН 8,0; 1 мМ ЭДТА). После проведения электрофореза ДНК визуализировали бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете.

Результаты и обсуждение

Определение метилированных участков ДНК методом *BlsI*- и *GlaI*-ПЦР-анализа. Хорошо известным вариантом метилчувствительной ПЦР для анализа метилирования CG динуклеотидов в том или ином районе генома является метод *HpaII*-ПЦР-анализа, который был предложен более 30 лет назад [13]. Метод *HpaII*-ПЦР-анализа заключается в гидролизе ДНК ферментом *HpaII* с последующей ПЦР с праймеров, лежащих справа и слева от сайта узнавания фермента 5'-CCGG-3' в исследуемом районе ДНК. Метод основывается на неспособности *HpaII* расщеплять сайт 5'-C(5mC)GG-3', тогда как этот неметилированный сайт полностью расщепляется ферментом [7]. Соответственно в результате ПЦР будет появляться фрагмент ДНК определенной длины в первом случае, тогда как во втором случае этот фрагмент образовываться не будет. Основным недостатком

ком HpaII-ПЦР-анализа является его ограниченность только одним сайтом 5'-CCGG-3', в то время как ДНК-метилтрансферазы млекопитающих Dnmt3a и Dnmt3b узнают и метилируют CG динуклеотид преимущественно в последовательности 5'-PuCGPu-3' [2].

В противоположность HpaII ферменты GlaI и BslI гидролизуют только метилированную ДНК. При этом последовательность 5'-PuCGPu-3'/3'-PyGCPu-5', являющаяся субстратом ферментов Dnmt3a и Dnmt3b, после метилирования ими превращается в последовательность 5'-Pu(5mC)GPu-3'/3'-PyG(5mC)Pu-5', которая, в свою очередь, узнается и расщепляется ферментом GlaI. В то же время BslI будет гидролизовать последовательность из двух таких сайтов, разделенных произвольным нуклеотидом (5'-Pu(5mC)GCNG(5mC)GPu-3'/3'-PyG(5mC)GNCG(5mC)Pu-5'). Метилзависимые эндонуклеазы GlaI и BslI были открыты недавно, но уже нашли применение в изучении метилирования геномной и сателлитной ДНК [14, 15].

Таким образом, метод BslI- и GlaI-ПЦР-анализа включает в себя гидролиз изучаемой ДНК ферментом BslI или GlaI, соответственно, с последующей ПЦР с праймеров, окаймляющих изучаемый район. При этом, в отличие от HpaII-ПЦР-анализа, положительным результатом BslI- и GlaI-ПЦР-анализа является расщепление метилированной ДНК и отсутствие продукта ПЦР, а не наоборот.

Структура регуляторных областей генов-онкосупрессоров. С помощью предложенного метода BslI- и GlaI-ПЦР-анализа мы исследовали метилирование регуляторных областей трех генов-онкосупрессоров

человека. В качестве объектов были выбраны промоторная область гена *DAPK*, район промотора и первого экзона гена *RARB* и район первого экзона гена *RASSF1A*. Недавно полученные данные по бисульфитному секвенированию регуляторных областей некоторых генов-онкосупрессоров человека показали, что метилированные CG динуклеотиды в них преимущественно локализованы в сайтах 5'-PuCGC-3' [16], что согласуется с субстратной специфичностью ферментов Dnmt3a и Dnmt3b.

Согласно базе данных GenBank [17], локализация гена *DAPK1* (death-associated protein kinase 1) – 9q34.1, гена *RARB* (retinoic acid receptor beta) – 3p24 и гена *RASSF1A* (Ras association domain family 1A) – 3p21.3.

Схемы регуляторных областей генов *DAPK1* (позиция 19276988-19277344 в 9-й хромосоме), *RARB* (позиция 25409693-25410545 в 3-й хромосоме) и *RASSF1A* (позиция 50318239 – 50317790 в 3-й хромосоме), изучаемых в данной работе, представлены на рисунке 1 (части А–В, соответственно).

Мы исследовали промоторную область гена *DAPK1*, содержащую 12 сайтов 5'-PuCGPu-3', которые являются последовательностями узнавания GlaI в случае метилирования центрального CG динуклеотида (рис. 1А). Два этих сайта в позициях 19277174 и 19277179 образуют последовательность 5'-GCGCCGCGC-3' (вынесена на рис. 1А), которая является сайтом узнавания BslI в случае метилирования внутренних CG динуклеотидов в обеих последовательностях 5'-GCCG-3'.

Выбранный нами участок регуляторной области гена-онкосупрессора *RARB* включает в себя четыре сайта 5'-PuCGPu-3', которые могут быть метилированы.

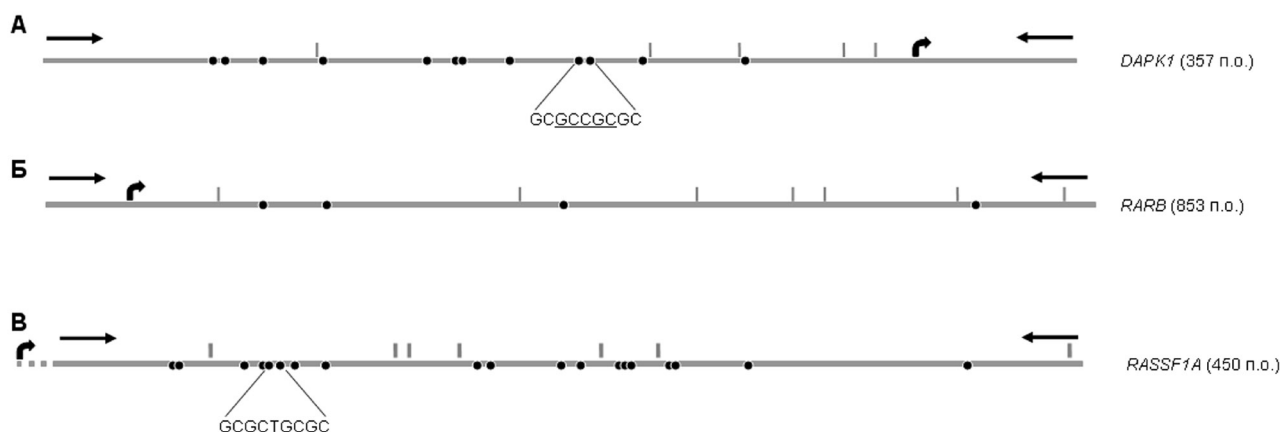


Рис. 1. Схема регуляторной области генов *DAPK1* (А), *RARB* (Б) и *RASSF1A* (В).

Расположение сайтов контрольного фермента (HaeIII для А и В и FatI для Б) показано вертикальными черточками. Сайты 5'-PuCGPu-3' обозначены кружками. Вынесены пары сайтов 5'-PuCGPu-3', которые образуют последовательности узнавания BslI (подчеркнуты на А и В). Старт транскрипции обозначен изогнутой стрелкой. Размеры фрагмента ПЦР указаны справа от схемы

При этом здесь не встречается такой комбинации этих сайтов, когда две последовательности 5'-PuCGPy-3' разделены одним нуклеотидом и соответственно BslI не может гидролизовать данный участок ДНК (рис. 1Б).

Более сложной является структура регуляторной области гена *RASSF1A*. В нашей работе мы изучали метилирование участка первого экзона этого гена, включающего в себя 19 сайтов 5'-PuCGPy-3' и схематично представленного на рисунке 1В. Два таких сайта, находящиеся в позициях 50318146 и 50318141 и разделенные остатком Т, образуют последовательность 5'-GCGCTGCGC-3' (вынесена на рисунке 1В). Данная последовательность является сайтом узнавания BslI, если метилированы внутренние СС динуклеотиды в обеих последовательностях 5'-GCGC-3'.

Препараты ДНК клеточных линий человека.

Метилирование ДНК в области генов-онкосупрессоров изучалось в пяти клеточных линиях человека. Для исследования были выбраны хорошо известные малигнанные клеточные линии HeLa (аденокарцинома шейки матки), Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия), Raji (лимфома Беркитта) и U-937 (гистиоцитарная лимфома), а в качестве контроля была взята клеточная линия L-68 (здоровый эмбрион, легкое, штамм диплоидных клеток). ДНК этих клеточных линий подвергалась предварительной фрагментации ферментом TaqI, сайты узнавания которого отсутствуют в исследуемых участках регуляторных областей генов-онкосупрессоров *DAPK1*, *RARB* и *RASSF1A*.

Полученные препараты фрагментированной ДНК в дальнейшем обрабатывали: а) контрольным ферментом рестрикции, который имеет сайты узнавания в изучаемом районе ДНК, б) *GlaI*, в) *BslI* и г) без добавления

эндонуклеазы. После проведения гидролиза ДНК аликвоты четырех инкубационных смесей добавлялись в соответствующую реакционную смесь ПЦР. ДНК *Drosophila melanogaster* с такой же концентрацией была использована как негативный контроль ПЦР.

Изучение метилирования регуляторных областей генов-онкосупрессоров человека. На рисунке 2 представлены результаты исследования метилирования промоторной области гена *DAPK1* методом *BslI*- и *GlaI*-ПЦР-анализа. Как видно из этого рисунка, после проведения ПЦР образуется фрагмент, соответствующий расчетной длине 357 пар оснований. Мы наблюдаем появление этого фрагмента во всех отрицательных контролях, где эндонуклеазы не добавлялись (дорожки 5, 9, 13, 19, 23) и как результат *BslI*-ПЦР-анализа четырех препаратов ДНК (дорожки 4, 8, 18, 22). *BslI*-ПЦР-анализ ДНК из клеток Raji (дорожка 12) и ПЦР препаратов ДНК после обработки *HaeIII* (дорожки 2, 6, 10, 16, 20) дают положительный результат, то есть, не обнаруживают образования искомого фрагмента ДНК вследствие его расщепления. *GlaI*-ПЦР-анализ демонстрирует либо отсутствие целевого фрагмента (дорожка 11), либо образование полосы со слабой интенсивностью (дорожки 3, 7, 17, 21). Таким образом, *GlaI*-ПЦР-анализ дает положительный результат и показывает наличие существенно метилированных сайтов 5'-PuCGPy-3' в промоторной области гена *DAPK1* в ДНК из всех исследуемых клеточных линий. В то же время *BslI*-ПЦР-анализ выявил, что только в клетках Raji наблюдается метилирование двух сайтов, расположенных в позициях 19277174 и 19277179, с образованием последовательности 5'-G(5mC)GCGG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GGCG(5mC)G-5'. В остальных клеточных линиях эта

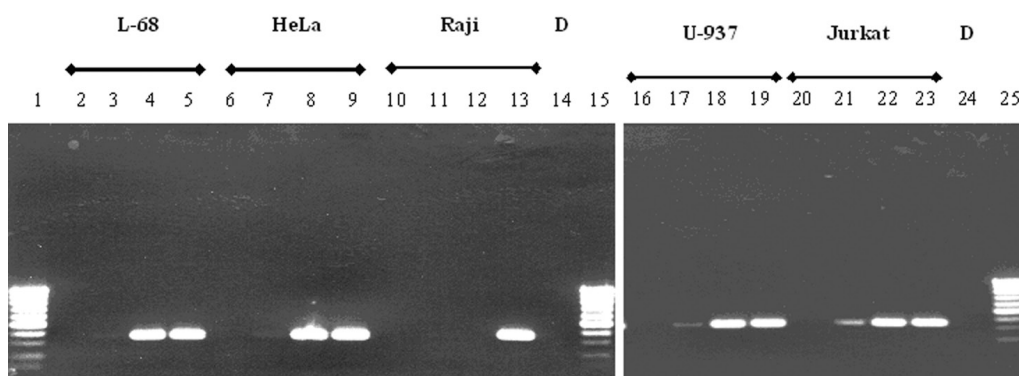


Рис. 2. Определение метилирования промоторной области гена *DAPK1* методом *BslI*- и *GlaI*-ПЦР-анализа (ПЦР-фрагмент длиной 357 п.о.).

Фрагментированная ДНК из клеток L-68 (2–5); HeLa (6–9); Raji (10–13); U-937 (16–19); Jurkat (20–23). ДНК из *Drosophila melanogaster* (14 и 24). *HaeIII* (2, 6, 10, 16, 20), *GlaI* (3, 7, 11, 17, 21), *BslI* (4, 8, 12, 18, 22). 100 бп ДНК маркер молекулярной массы (1, 15, 25)

последовательность либо метилирована только по одному сайту, либо не метилирована вообще.

Метилирование регуляторной области гена *DAPK1* в образцах ДНК, выделенных из тканей больных, исследовалось во множестве публикаций [18, 19, 20 и ссылки в них]. С помощью метода бисульфитной конверсии Raval A. et al. [21] детально изучили статус метилирования регуляторной области гена *DAPK1* в ДНК из клеточных линий Jurkat and Raji. Они наблюдали существенное (более 80%) метилирование промоторной области в ДНК из клеток Raji, тогда как ДНК из клеток Jurkat в изучаемом районе была метилирована не более чем на 20% [21].

Таким образом, полученные нами данные BslI- и GlalI-ПЦР-анализа соответствуют литературным данным. должен расщеплять данный участок ДНК, что согласуется с данными.

На рисунке 3 представлены результаты определения метилирования регуляторной области гена *RARB* с помощью BslI- и GlalI-ПЦР-анализа. В соответствии с данными рисунка 1Б результатом ПЦР должно быть образование фрагмента ДНК длиной 853 п.о. Фрагмент такой длины образуется во всех контрольных экспериментах (дорожки 5, 9, 13, 19, 23), в BslI-ПЦР-анализе (дорожки 4, 8, 12, 18, 22) и GlalI-ПЦР-анализе ДНК из клеток L-68 (дорожка 3). В то же время GlalI-ПЦР-

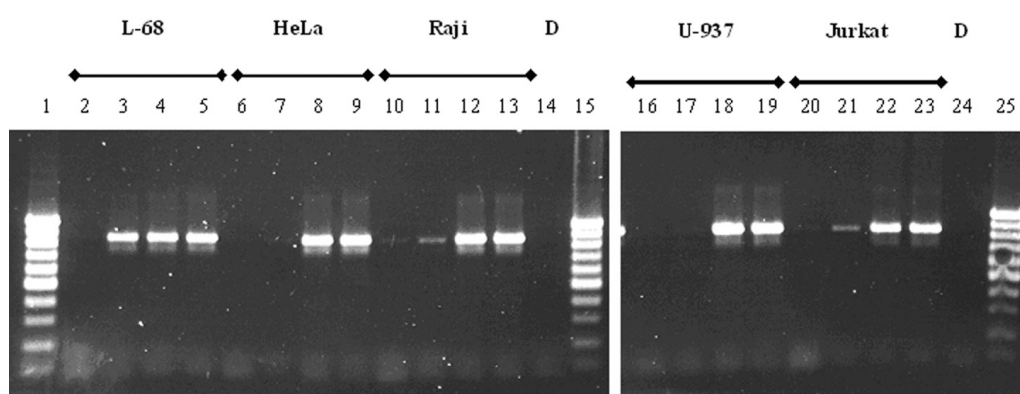


Рис. 3. Определение метилирования области промотора и первого экзона гена *RARB* методом BslI- и GlalI-ПЦР-анализа (ПЦР-фрагмент длиной 853 п.о.).

Фрагментированная ДНК из клеток L-68 (2–5); HeLa (6–9); Raji (10–13); U-937 (16–19); Jurkat (20–23). ДНК из *Drosophila melanogaster* (14 и 24). FatI (2, 6, 10, 16, 20), GlalI (3, 7, 11, 17, 21), BslI (4, 8, 12, 18, 22). 100 bp ДНК маркер молекулярной массы (1, 15, 25)

анализ ДНК из клеток Raji and Jurkat дает слабую полосу данного фрагмента, а в случае ДНК из клеток HeLa и U-937 искомого фрагмента на фотографии геля не видно. Как ясно показывается на рисунке 1Б, BslI не должен расщеплять данный участок ДНК, что согласуется с данными BslI-ПЦР-анализа. Из полученных результатов следует, что GlalI в значительной степени расщепляет регуляторную область гена *RARB* в ДНК всех малигнанных клеточных линий (дорожки 7, 11, 17, 21). В то же время сравнение дорожек 3 и 5 свидетельствует, что GlalI не расщепляет данный участок в ДНК контрольной клеточной линии L-68. Следовательно, GlalI-ПЦР-анализ показал существенное метилирование регуляторной области гена-онкосупрессора *RARB* в ДНК клеточных линий HeLa, Jurkat, Raji и U-937 и отсутствие метилирования этого района в ДНК клеток L-68.

Метилирование области промотора и первого экзона гена *RARB* в ДНК из опухолевых тканей наблюдалось во множестве работ [18, 19 и ссылки в них]. Более

того, было показано, что метилирование регуляторной области гена *RARB* является маркером ранних стадий развития опухоли [22]. Это, вероятно, связано с тем, что онкосупрессор *RARB* вовлечен в регуляцию клеточного цикла и размножения клеток ткани [3]. В этом случае определение факта метилирования регуляторной области данного гена может оказаться одним из наиболее значимых маркеров образования опухолей на ранних стадиях. Полученные нами результаты по метилированию области промотора и первого экзона гена-онкосупрессора *RARB* только в ДНК из малигнанных клеточных линий согласуются с этими литературными данными и подтверждают, что определение статуса метилирования этого района может являться методом ранней диагностики онкологических заболеваний.

На рисунке 4 представлены результаты BslI- и GlalI-ПЦР-анализа участка ДНК размерами 450 п.о. в области первого экзона гена-онкосупрессора *RASSF1A*. Мы наблюдаем образование такого фрагмента во всех

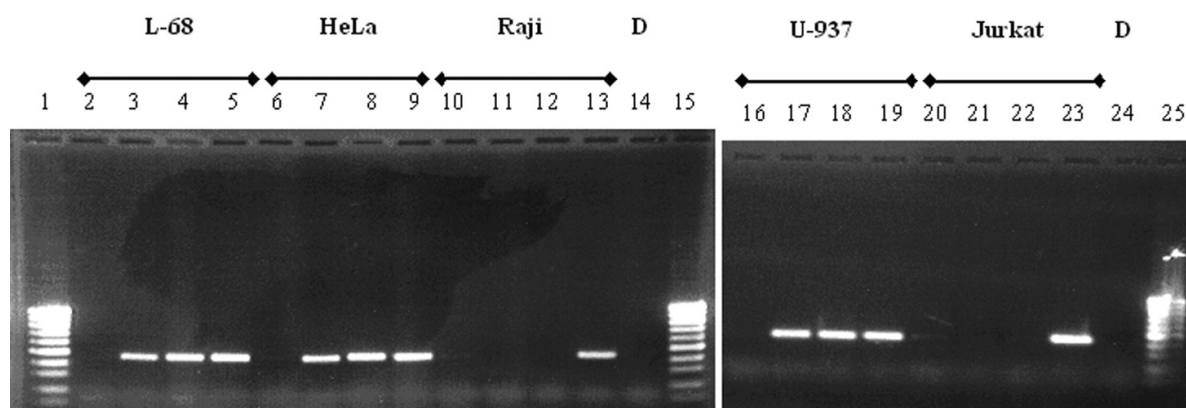


Рис. 4. Определение метилирования области первого экзона гена *RASSF1A* методом BslI- и GluI-ПЦР-анализа (ПЦР-фрагмент длиной 450 п.о.).

Фрагментированная ДНК из клеток L-68 (2–5); HeLa (6–9); Raji (10–13); U-937 (16–19); Jurkat (20–23). ДНК из *Drosophila melanogaster* (14 и 24). HaeIII (2, 6, 10, 16, 20), GluI (3, 7, 11, 17, 21), BslI (4, 8, 12, 18, 22). 100 bp ДНК маркер молекулярной массы (1, 15, 25)

контрольных экспериментах (дорожки 5, 9, 13, 19, 23), а также в GluI-ПЦР-анализе (дорожки 3, 7, 17) и BslI-ПЦР-анализе (дорожки 4, 8, 18) препаратов ДНК из клеточных линий L-68, HeLa и U-937. В случае клеточных линий Raji и Jurkat оба анализа дают положительный результат, при этом как GluI, так и BslI полностью расщепляют ДНК и ПЦР-фрагмент не образуется (дорожки 11, 12, 21, 22).

Полученные результаты BslI-ПЦР-анализа свидетельствуют, что метилированная последовательность 5'-G(5mC)GCTG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GACG(5mC)G-5' (подчеркнута на рисунке 1С) присутствует только в ДНК клеток Raji и Jurkat. В других клеточных линиях эта последовательность либо не метилирована, либо содержит только один метилированный сайт 5'-GCCG-3'.

Метилирование регуляторной области гена *RASSF1A* в препаратах ДНК, выделенных из клинических изолятов, изучалось целым рядом авторов [23–25]. Yan P.S. et al. [26] предприняли детальное изучение метилирования промотора и первого экзона гена *RASSF1A* в ДНК малигнанных клеточных линий, полученных от больных раком молочной железы. Методом бисульфитной конверсии авторы показали, что в этих клеточных линиях район ДНК в непосредственной близости от последовательности 5'-GCCGCTGCCG-3' метилирован в значительной степени. Исходя из этих данных и полученных нами результатов, можно предположить, что существенное метилирование первого экзона гена *RASSF1A* действительно имеет место в ряде малигнанных клеточных линий, тогда как в других клеточных линиях такой модификации не наблюдается.

Суммируя полученные результаты, следует отметить, что BslI- и GluI-ПЦР-анализ показал отсутствие метилирования исследованных участков регуляторных областей генов-онкосупрессоров *RARB* и *RASSF1A* в ДНК из контрольной клеточной линии L-68. В то же время регуляторная область гена *RARB* оказалась метилированной во всех малигнанных клеточных линиях, изучаемых в настоящей работе. Интересно отметить, что первый экзон гена *RASSF1A* совершенно не метилирован в двух малигнанных клеточных линиях (U-937 и HeLa) и полностью метилирован в двух других малигнанных линиях (Raji и Jurkat). В случае промоторной области гена *DAPK1* BslI-ПЦР-анализ выявил дополнительное метилирование этого участка ДНК только в малигнантной клеточной линии Raji. Поразительно, что изучение метилирования участка регуляторных областей только трех генов-онкосупрессоров выявило различные картины метилирования во всех трех изучаемых лейкозных клеточных линиях U-937, Raji и Jurkat. Однако при этом наблюдаются совпадающие картины метилирования в препаратах ДНК из клеток аденокарциномы (HeLa) и гистиоцитарной лимфомы (U-937).

Мы полагаем, что метилирование регуляторных областей генов-онкосупрессоров *RARB* и *RASSF1A*, а также дополнительное метилирование промоторной области гена-онкосупрессора *DAPK1*, которые выявляются в различных комбинациях в изучаемых малигнанных клеточных линиях, по-видимому, приводят к инактивации соответствующих генов-онкосупрессоров и развитию разных онкопатологий. Очевидно, различие в картинах метилирования регуляторных областей в ДНК из клеток

HeLa и U-937 может быть найдено при изучении других генов-онкосупрессоров, которые не исследовались в нашей работе. Таким образом, по мере накопления экспериментальных данных результаты BslI- и GlalI-ПЦР-анализа могут быть использованы как для выявления малигнанных клеток, так и для их идентификации.

Заключение

Предлагаемый метод BslI- и GlalI-ПЦР-анализа по сути является вариантом широко используемого ПЦР-анализа и требует лишь предобработки изучаемой ДНК эндонуклеазами. Такой анализ не требует сложного оборудования и может проводиться в стандартных медико-генетических лабораториях, а его простота позволяет проводить массовый скрининг образцов ДНК клинических изолятов.

Патент по данной работе находится в стадии оформления (РСТ/RU2009/127467).

Литература

1. Киселева Н.П., Лихтенштейн А.В. Эпигенетические изменения в опухолевых клетках. Роль метилирования ДНК в канцерогенезе / В кн.: Канцерогенез. Под ред. Д.Г. Заридзе. — М.: Медицина, 2004. — С. 191–203.
2. Handa V., Jeltsch A. Profound flanking sequence preference of Dnmt3a and Dnmt3b mammalian DNA methyltransferases shape the human epigenome // J. Mol. Biol. — 2005. — Vol. 348. — N 5. — P. 1103–1112.
3. De Cáseres I.I. and Cairns P. Methylated DNA sequences for early cancer detection, molecular classification and chemotherapy response prediction // Clin. Transl. Oncol. — 2007. — Vol. 9. — P. 429–437.
4. Frommer M., McDonald L.E., Millar D.S., Collis C.M., Watt F., Grigg G.W., Molloy P.L., Paul C.L. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1992. — Vol. 89(5). — P. 1827–1831.
5. Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S., Nellin 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.
6. Xiong Z., Laird P.W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay // Nucleic Acids Res. — 1997. — Vol. 25(12). — P. 2532–2534.
7. Bird A.P., Southern E.M. Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis* // J. Mol. Biol. — 1978. — Vol. 118. — P. 27–47.
8. Tarasova G.V., Nayakshina T.N., Degtyarev S.K. Substrate specificity of new methyl-directed DNA endonuclease GlalI // BMC Molecular Biology — 2008. — Vol. 9. — P. 7.
9. Томилова Ю.Э., Чернухин В.А., Дегтярев С.Х. Зависимость активности сайт-специфической эндонуклеазы GlalI от количества и положения метилированных цитозинов в узнаваемой последовательности 5'-GCGC-3' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2006. — Т. 2. — № 1. — С. 30–39.
10. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э., Чмуж Е.В., Соколова О.О., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Сайт-специфическая эндонуклеаза BslI узнает последовательность ДНК 5'-G(5mC)N^GC-3' и расщепляет ее с образованием 3'-выступающих концов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 1. — С. 28–33.
11. BslI product information [Электронный ресурс] — Режим доступа: <http://www.sibenzyme.com/info641.php>.
12. Sambrook J, Russell D. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed. — New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. — V. 1–3. — 2222 p.
13. Singer-Sam J., Grant M., LeBon J.M., Okuyama K., Chapman V., Monk M., Riggs A.D. Use of a HpaII-polymerase chain reaction assay to study DNA methylation in the Pcg-1 CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation // Mol. Cell Biol. — 1990. — Vol. 10(9). — P. 4987–4989.
14. Чернухин В.А., Абдурашитов М.А., Томилов В.Н., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. Сравнительный рестрикционный анализ хромосомной ДНК мыши in vitro и in silico // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3 — № 4. — С. 19–27.
15. Abdurashitov M.A., Chernukhin V.A., Gonchar D.A., Degtyarev S.K. GlalI digestion of mouse γ -satellite DNA: study of primary structure and ACGT sites methylation // BMC Genomics. — 2009. — Vol. 10 — P. 322–331.
16. Kim S., Li M., Paik H., Nephew K., Shi H., Kramer R., Xu D., Huang T-H. Predicting DNA methylation susceptibility using CpG flanking sequences // Pacific Symposium on Biocomputing. — 2008. — Vol. 13. — P. 315–326.
17. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Wheeler D.L. GenBank // Nucleic Acids Res. — 2008. — Vol. 36 (Database issue). — D25–D30.
18. Kristensen L.S., Mikeska T., Krypuy M., Dobrovic A. Sensitive Melting Analysis after Real Time-Methylation Specific PCR (SMART-MSP): high-throughput and probe-free quantitative DNA methylation detection // Nucleic Acids Res. — 2008. — Vol. 36(7). — e42.
19. Zochbauer-Muller S., Fong K.M., Virmaný N., Geradts J., Gazdar A., Minna J.D. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancer // Cancer Res. — 2001. — Vol. 61(1). — P. 249–255.

20. Herman J.G., Baylin S.B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation // *New England J. Med.* — 2003. — Vol. 349. — P. 2042–2054.
21. Raval A., Tanner S.M., Byrd J.C., Angerman E.B., Perko J.D., Chen S.S., Hackanson B., Grever M.R., Lucas D.M., Matkovic J.J., Lin T.S., Kipps T.J., Murray F., Weisenburger D., Sanger W., Lynch J., Watson P., Jansen M., Yoshinaga Y., Rosenquist R., de Jong P.J., Coggill P., Beck S., Lynch H., de la Chapelle A., Plass C. Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia // *Cell.* — 2007. — Vol. 129(5). — P. 879–890.
22. Evron E., Dooley W.C., Umbricht C.B., Rosenthal D., Sacchi N., Gabrielson E., Soito A.B., Hung D.T., Ljung B., Davidson N.E., Sukumar S. Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR // *Lancet* — 2001. — Vol. 357(9265). — P. 1335–1336.
23. Hesson L.B., Cooper W.N., Latif F. The role of RASSF1A methylation in cancer // *Disease Markers* — 2007. — Vol. 23. — P. 73–87.
24. Feng Q., Hawes S.E., Stern J.E., Wiens L., Lu H., Dong Z.M., Jordan D.C., Kiviat N.B., Vesselle H. DNA methylation in tumor and matched normal tissues from non-small cell lung cancer patients // *Cancer Epid. Biom. Prev.* — 2008. — Vol. 17. — P. 645–654.
25. Peters I., Rehmet K., Wilke N., Kuczyk M.A., Hennenlotter J., Eilers T., Machtens S., Jonas U., Serth J. RASSF1A promoter methylation and expression analysis in normal and neoplastic kidney indicates a role in early tumorigenesis // *Mol. Cancer.* — 2007. — Vol. 6(1). — P. 49.
26. Yan P.S., Shi H., Rahmatpanah F., Hsiau T.H., Hsiau A.H., Leu Y.W., Liu J.C., Huang T.H. Differential distribution of DNA methylation within the RASSF1A CpG island in breast cancer // *Cancer Research.* — 2003. — Vol. 63(19). — P. 6178–6186.

Список сокращений

5mC — 5-метилцитозин;

Трис — трис-(оксиметил)-аминометан;

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота;

п.о., бр — пары оснований;

ПЦР — полимеразная цепная реакция.

BLSI- AND GLAI-PCR ASSAY — NEW METHOD OF DNA METHYLATION STUDY

D.A. GONCHAR, A.G. AKISHEV, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd., Novosibirsk

New BslI- and GlaiI-PCR assays have been developed to study DNA methylation. A new method includes DNA hydrolysis by methyl-directed site-specific DNA endonucleases GlaiI or BslI with subsequent routine PCR. Study of DNA methylation in regulation region of human tumor suppressor genes has been used as a model for evaluation of new method application. BslI- and GlaiI-PCR assays have revealed different methylation patterns of promoter region of *DAPK1*, promoter and first exon region of *RARB* and first exon region of *RASSF1A* tumor suppressor genes in malignant cell lines HeLa, Raji, U-937, Jurkat and control L-68 cells. GlaiI-PCR assay has shown methylation of *RARB* promoter and first exon region in DNA from all malignant cell lines, but not in control L-68 cells. GlaiI- and BslI-PCR assays have displayed DNA methylation of *RASSF1A* first exon region in Raji and Jurkat cells only. BslI-PCR assay of *DAPK1* promoter region has demonstrated an additional DNA methylation in Raji cells only. GlaiI- and BslI-PCR assays may be useful both in determination of malignant cells and their discrimination.

Keywords: DNA methylation, endonuclease, tumor suppressor.