

УДК 577.152

В.С. ДЕДКОВ*, Н.А. МИХНЕНКОВА, З.К. ДЖАНОБИЛОВА, М.В. ТАРАСОВА

НПО «СибЭнзим», Новосибирск, 630117

e-mail: dedkov@sibenzyme.ru

ДНК-метилтрансфераза *M.BssECI* образует 5'-m4CCNNGG-3'. Чувствительность эндонуклеаз рестрикции к новому метилированию

Из клеток *Bacillus stearothermophilus* ЕС выделена и очищена ДНК-метилтрансфераза *M.BssECI*, которая метилирует наружный цитозиновый остаток в последовательности ДНК 5'-CCNNGG-3' с образованием остатка N4-метилцитозина (5'-m4CCNNGG-3'). Описаны способы выделения, очистки фермента (гель-фильтрация с использованием биогеля А-0,5м с последующей хроматографией на бензил-ДЭАЭ-целлюлозе и гепарин-сефарозе) и идентификации метилируемой ДНК-последовательности. Оптимальные условия и активность ДНК-метилтрансферазы определяли с использованием ДНК фага λ по блокированию рестриктазы *BssECI*. Основание, метилируемое в узнаваемой последовательности, выявляли путем введения [^3H]-метки в олигонуклеотидный дуплекс. Специфичность *M. BssECI* изучали с применением «самометилированной» ДНК фага Адено-2 с учетом чувствительности эндонуклеаз рестрикции *BssECI*, *MvaI* и *MspI* к метилированной ДНК, а также путем компьютерного моделирования. Выделенный фермент может быть использован для изучения характера метилирования ДНК; в частности, данный метод позволил отличить m4C-метилированный цитозин от m5C. ДНК фагов λ и T7, метилированную *M.BssECI*, использовали для изучения чувствительности ряда рестриктаз к метилированию их сайтов узнавания.

Ключевые слова: ДНК-метилтрансфераза, компьютерное моделирование, определение специфичности.

ДНК-метилтрансферазы переносят метильную группу с S-аденозилметионина (SAM) на основания ДНК. К таким основаниям относятся цитозин C5((C5)-ДНК-метилтрансферазы эукариотические, КФ 2.1.1.37, и прокариотические, КФ 2.1.1.73), цитозин N4 ((N4)-ДНК-метилтрансферазы, КФ 2.1.1.113) и аденин N6 ((N6)-ДНК-метилтрансферазы, КФ 2.1.1.72) [1]. Метилированные основания обозначают соответственно

m5C, m4C и m6A. ДНК-метилтрансферазы отличаются специфичностью к нуклеотидной последовательности ДНК, к основанию в ней, а также к атому основания (углероду или азоту). В системах рестрикции—модификации (РМ) бактерий ДНК-метилтрансферазы, метилируя узнаваемую последовательность ДНК, защищают ее от сопряженных эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз) [2].

Дедков Владимир Сергеевич, Михненко Наталья Александровна, Джанобилова Зебо Курбоновна, Тарасова Маргарита Владимировна.

Список сокращений: ДМТ — ДНК-метилтрансфераза; ДТТ — дитиотреитол; ДЭАЭ — диэтиламиноэтил; КЖ — культуральная жидкость; ОП — оптическая плотность; рестриктаза — эндонуклеаза рестрикции; система РМ — система рестрикции—модификации; трис — трис (оксиметил)-аминометан; ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота; BSA-Ас — бычий сывороточный альбумин ацетилированный; m4C — N4-метилцитозин; m5C — 5-метилцитозин; N — любой нуклеотид; PMSF — параметилсульфонилфторид; S — нуклеотид G или C; SAM — S-аденозилметионин; W — нуклеотид A или T.

* Автор для переписки.

Термофильная рестриктаза *BssECI* из *Bacillus stearothermophilus* ЕС узнает последовательность 5'-C[^]CNNGG-3'. Прототипом данной рестриктазы является фермент *SecI* из цианобактерии *Synechocystis* 6701 [3]. В базе данных REBASE (<http://www.rebase.neb.com>) приведен ряд изоэломеров *SecI*; из них *BsaII*, *BseDI* и *BssECI* являются коммерчески доступными препаратами. Указаны также и сопряженные ДНК-метилтрансферазы, гены которых клонированы и секвенированы, например *M.BsaII*, *M.BseDI*, *M.Hpy99IV* и др. Эти ферменты метилируют в ДНК последовательность 5'-CCNNGG-3'. *M.BsaII* и *M.Hpy99IV* образуют m4C, однако место метилирования не определено. Поэтому вполне актуально изучение специфичности ДНК-метилтрансферазы, сопряженной с рестриктазой *BssECI*.

Для определения специфичности ДНК-метилтрансферазы *M.BssECI* мы использовали принцип изменения видимой специфичности рестриктаз при метилировании ДНК [4], дополнив его компьютерным моделированием метилирования ДНК [5, 6]. Метилируемое основание определяли также путем его [³H]-мечения в олигонуклеотидном дуплексе. Целью работы являлось также изучение чувствительности рестриктаз к новому метилированию их сайтов узнавания.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материалы. В работе использовали следующие рестриктазы: *MvaI* (гидролизует ДНК по 5'-CC[^]WGG-3') производства Fermentas (Литва), а также *AccBII* (5'-G[^]GYRCC-3'), *AccB7I* (5'-CCANNNN[^]NTGG-3'), *AjnI* (5'-[^]CCWGG-3'), *AcIWI* (5'-GGATCN4/5-3'), *Ama87I* (5'-C[^]YCGRG-3'), *AspA2I* (5'-C[^]CTAGG-3'), *AsuC2I* (5'-CC[^]SGG-3'), *AsuHPI* (5'-GGTGAN8/7-3'), *BglI* (5'-GCCNNNN[^]NGGC-3'), *BmeI8I* (5'-G[^]GWCC-3'), *Bsc4I* (5'-CCNNNNN[^]NNGG-3'), *BsIFI* (5'-GGGACN10/14-3'), *Bsp19I* (5'-C[^]CATGG-3'), *BssECI* (5'-C[^]CNNGG-3'), *BssTII* (5'-C[^]CWWGG-3'), *Bst4CI* (5'-CAN[^]GT-3'), *BstDSI* (5'-C[^]CRYGG-3'), *BstH2I* (5'-RGCGC[^]Y-3'), *BstMAI* (5'-GTCTCN1/5-3'), *BstV2I* (5'-GCAGCN2/6-3'), *BstXI* (5'-CCANNNNN[^]NTGG-3'), *BsuRI* (5'-GG[^]CC-3'), *DriI* (5'-GACNNNNN[^]GTC-3'), *HpaI* (5'-GTT[^]AAC-3'), *MspI* (5'-C[^]CGG-3'), *MspR9I* (5'-CC[^]NGG-3'), *RsaI* (5'-GT[^]AC-3'), *Sfi303I* (5'-CCGC[^]GG-3') и *SmaI* (5'-CCC[^]GGG-3') производства НПО "СибЭнзим" (Новосибирск). Использовали ДНК бактериофага λ (dam-, dcm-) [7], ДНК бактериофага T7 [8], ДНК вируса Адено-2 [9], ДНК плазмиды pBR322 (dcm+) [10], а так-

же маркер длины ДНК (λ ДНК+*BssTII*) — того же производителя. Были также использованы ацелированный бычий сывороточный альбумин (BSA-Ac) (Biotechnic GmbH, Германия); лизоцим (Helicon, Россия); триптон и дрожжевой экстракт (Organotechnie, Франция); хроматографические смолы: Bio-Gel A-0,5m (Bio-Rad, США), бензил-ДЭАЭ-целлюлоза и гепарин-сефароза (Sigma, США); агароза LE (Segetetic, Германия); S-аденозилметионин (SAM) — «ГЕПТРАЛ для инъекций» (Hospira, Италия); [³H]-SAM 15 Кю/мМ (Amersham, Англия), а также соли и химикаты отечественного производства квалификации «х.ч.».

Штамм *B. stearothermophilus* ЕС, продуцент рестриктазы *BssECI*, получен из коллекции культур микроорганизмов НПО "СибЭнзим", где хранится под номером 3М53.

B. stearothermophilus ЕС выращивали при 55° в бульоне, содержащем 1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 0,5% NaCl, 0,05% MgCl₂ и 0,001% тиамин, pH 7,5. Перед посевом культуру инкубировали 18 ч без встряхивания в 6 колбах объемом 500 мл, содержащих по 300 мл бульона. Выращивание проводили в 20 л среды в ферментере (New Brunswick, США) при аэрации 15 л/мин и перемешивании с частотой 200 об/мин в течение 4 ч до ОП 2,2 ед. (1 см) при λ 550 нм. Клетки осаждали при 4° центрифугированием в J2-21 (Beckman, США) в течение 30 мин в роторе JA-10 при 8000 g и замораживали. Из 20 л КЖ получали 83 г биомассы.

Выделение ДНК-метилтрансферазы *M.BssECI* проводили при 4°. Все растворы содержали буфер следующего состава: 10 мМ трис-HCl (pH 7,5), 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ ЭДТА и 5% глицерина. 10 г клеток суспензировали в 50 мл буфера с 0,05 М NaCl, 0,03% лизоцима, 0,1 мМ PMSF и инкубировали 1 ч. Затем клетки разрушали ультразвуком на приборе Soniprep 150 (MSE, Англия) двумя импульсами по 1 мин с интервалом 1 мин. Смесь инкубировали еще 1 ч и обработку повторяли. Экстракт осветляли на центрифуге J2-21 в течение 30 мин в роторе JA-20 при 20000 g и наносили на колонку (100×2,6 см), содержащую Bio-Gel A-0,5m. Колонку промывали 500 мл буфера с 0,8 М NaCl, 0,1% Triton X-100 и 1 мМ ЭДТА со скоростью 30 мл/ч. Собирали 50 фракций, из которых фракции 23—27 содержали активную *M.BssECI*. Их объединяли, диализовали против 20 объемов буфера и наносили на колонку бензил-ДЭАЭ-целлюлозы (10×4 см). Фермент элюировали 200 мл градиента NaCl от 0,05 до 0,8 М и элюат собирали в 40 пробирок. Фракции 18—22 разбавляли равным объемом буфера и наносили на ко-

лонку гепарин-сефарозы (10×2 см). Фермент элюировали 80 мл градиента NaCl от 0,05 до 1 М. Из 40 фракций объединяли фракции 26—30 и диализовали против буфера с 50%-ным глицерином. Получали 2,5 мл препарата *M.Bss*ECI, который хранили при –18°.

Оптимальные условия активности *M.Bss*ECI определяли в присутствии SAM при 37° и 55° в одном из буферов М: буфер В' — 10 мМ трис-HCl (pH 7,6 при 25°), 1 мМ ЭДТА и 1 мМ ДТТ; буфер G' — 10 мМ трис-HCl (pH 7,6), 1 мМ ЭДТА, 50 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ; буфер O' — 50 мМ трис-HCl (pH 7,6), 1 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ; буфер W' — 10 мМ трис-HCl (pH 8,5), 1 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ; буфер Y' — 33 мМ трис-ацетат (pH 7,9), 1 мМ ЭДТА, 66 мМ калий ацетат и 1 мМ ДТТ. Пробы по 50 мкл, содержащие буфер М, 50 мкг/мл λ ДНК (dam-, dcm-), 10 мМ SAM, 0,1 мг/мл BSA-Ас и 2,5 мкл препарата *M.Bss*ECI, инкубировали в течение 2 ч при 55° или 37°. Затем добавляли по 5 мкл концентрата рестрикционного буфера Y (330 мМ трис-ацетат (pH 7,9), 100 мМ ацетат магния, 660 мМ ацетат калия и 10 мМ ДТТ) вместе с 0,5 мг/мл BSA-Ас и 5000 ед/мл рестриктазы *Bss*ECI (10-кратный избыток). ДНК гидролизовали 1 ч при 60°. Затем добавляли по 10 мкл стоп-буфера для блокирования рестриктаз: 0,25 М Na-ЭДТА (pH 8,5), 50% сахарозы, 0,01% бромфенолового синего и 0,01% рибонуклеазы.

Пробы анализировали путем электрофореза в 1%-ной агарозе в трис-ацетатном буфере (pH 8,1) с 0,5 мг/л этидийбромидом при напряжении 5 В/см в течение 70 мин по методике [11]. При этом использовали маркер длины ДНК (λ ДНК+*Bss*TI), состоящий из фрагментов длиной 19329 п.н., 7743, 6223, 4254, 3472, 2690, 1882, 1489, 925, 421 и 74 п.н.

За единицу активности *M.Bss*ECI принимали количество фермента, достаточное для полного блокирования расщепления 1 мкг ДНК фага λ за 1 ч инкубации при оптимальных условиях.

Таким же образом сравнивали активность ДМТ при 40°, 50°, 60°, 70° и 80° в оптимальном буфере, используя по 1 мкл фермента на 50 мкл реакционной смеси.

Полное *M.Bss*ECI-метилирование ДНК проводили в 1,5 мл реакционной смеси, содержащей 100 мкг/мл ДНК, 10 мМ SAM, буфер G', 0,1 мг/мл BSA-Ас и 70 мкл препарата *M.Bss*ECI в течение 5 ч при 55°. Полноту метилирования контролировали при помощи рестриктазы *Bss*ECI, как описано выше. ДНК очищали хлороформом, осаждали этанолом и растворяли в 1 мл 10 мМ трис-HCl (pH 7,6), содержащем 1 мМ ЭДТА.

Блокирование рестриктаз при гидролизе сайтов узнавания, метилированных *M.Bss*ECI, определяли путем гидролиза исходной и метилированной ДНК при активности рестриктаз, достаточной для расщепления 10-кратного избытка ДНК, в условиях, рекомендованных производителями. В пробы по 50 мкл, содержащие 50 мкг/мл ДНК в рестрикционном буфере с 0,1 мг/мл BSA-Ас, добавляли 12 ед. рестриктазы и инкубировали 2 ч при оптимальной температуре. Затем добавляли 10 мкл стоп-буфера и проводили электрофорез в 1%-ной агарозе при напряженности 5 В/см в течение 2,5 ч по методике [11].

Моделирование метилирования ДНК, блокирующее узнавание сайтов рестриктазами, проводили как описано ранее [5, 6]. Предположив, что действие *M.Bss*ECI состоит в метилировании 5'-mCCNNGG-3', его моделировали заменяя в записях нуклеотидных последовательностей ДНК все CCNNGG на NCNNGN. Это редактирование в дальнейшем обозначали как (C=>N)CNNG(G=>N). В сайтах, узнаваемых некоторыми рестриктазами, *M.Bss*ECI могла метилировать различные цитозины. В этих случаях моделировали метилирование каждого цитозина отдельно. Например, блокирование узнавания рестриктазой *Dra*I сайтов, в которых *M.Bss*ECI метилировала только внутренний цитозин (5'-GAmCNNNNNGTC-3'), моделировали соответственно как GA(C=>N)CNNGGGTC и GACCCNNG(G=>N)TC. Затем моделировали расщепление рестриктазой исходной и редактированной ДНК и их электрофорез в 1%-ном агарозном геле. Модели использовали для определения специфичности ДНК-метилтрансферазы *M.Bss*ECI, а также для изучения чувствительности рестриктаз к метилированию их сайтов узнавания.

[³H]-Метилирование и определение меченого основания проводили с использованием дезоксиолигонуклеотидного дуплекса ("СибЭнзим"), в котором на сайт метилирования *M.Bss*ECI приходились точки гидролиза рестриктазы *Pst*I-типа *Acl*WI, как описано в [12]. Дуплекс метилировали с помощью *M.Bss*ECI, используя меченный тритием SAM (15 Кю/мМ, Amersham). Для этого к 80 мкл реакционной смеси, содержащей 30 мМ ДНК-дуплекс в буфере G' и 6,7 мМ [³H]SAM, добавляли 8 мкл препарата ДМТ и инкубировали 3 ч при 55°. Меченный таким образом дуплекс осаждали этиловым спиртом, растворяли в 50 мкл SE-буфера Y (33 мМ трис-ацетат (pH 7,9 при 25°), 10 мМ магнийацетат, 66 мМ калийацетат, 1 мМ ДТТ) и обрабатывали рестриктазой *Acl*WI (8 ед.) в течение 4 ч при 37°. Продукты расщепления разделяли с помощью электрофореза в 40%-ном полиак-

риламидном геле (17×17 см) с 7,5 М мочевиной в течение 2 ч при напряжении 500 В. Гель окрашивали красителем “Stains-all” (Sigma, Германия) и выявленные одноцепочечные продукты гидролиза элюировали из геля путем пассивной диффузии, а затем переносили на фильтры DE-81. Количество включенной метки определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике Beckman Coulter LS 6500 (США).

Специфичность *M.BssECI* определяли с использованием метилированной ею ДНК вируса Адено-2 с учетом чувствительности к метилированной ДНК рестриктаз *BssECI*, *MvaI* и *MspI*, а также методом компьютерного моделирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате выращивания *B. stearothermophilus* ЕС при аэрации и 55° (см. «Условия эксперимента») получили 83 г клеток из 20 л бульона. ДМТ выделяли из 10 г клеток после разрушения их ультразвуком и последующей хроматографии экстракта на колонках Bio-Gel A-0,5m, бензил-ДЭ-АЭ-целлюлозы и гепарин-сефарозы. Фермент диализовали против буфера с 50%-ным глицерином и хранили при –18°; выход препарата фермента составил 2,5 мл раствора с активностью 500 ед/мл. ДМТ назвали *M.BssECI* в соответствии с номенклатурой [13].

При определении оптимальных условий активности *M.BssECI* за основу были приняты SE-буферы: В, G, О, W и Y (<http://russia.sibenzyme.com>). Они отличаются величиной ионной силы и pH, а также содержат ионы Mg²⁺, необходимые для активности рестриктаз. Поскольку эти ионы не требуются для проявления активности ДМТ [14], мы заменили их на 1 мМ ЭДТА для блокирования нуклеаз и рестриктаз. Новые буферы М обозначили соответственно В', G', О', W' и Y'. В них и определяли активность *M.BssECI*, как описано в «Условиях эксперимента».

На рис. 1 видно, что после инкубации ДНК фага λ и SAM с ДМТ эта ДНК становится устойчивой к расщеплению избытком *BssECI* при оптимальной температуре (50°, 60°). Среди использованных оптимальным для активности *M.BssECI* был буфер G'.

Основание, метилируемое *M.BssECI*, определяли путем его мечения с использованием [³H]-SAM, как описано в “Условиях эксперимента”. Для этого синтезировали олигонуклеотидный дуплекс, в котором имелся сайт, метилируемый ДМТ *M.BssECI* (на схеме выделен жирным шрифтом), а также отделенный от него тремя нуклеоти-

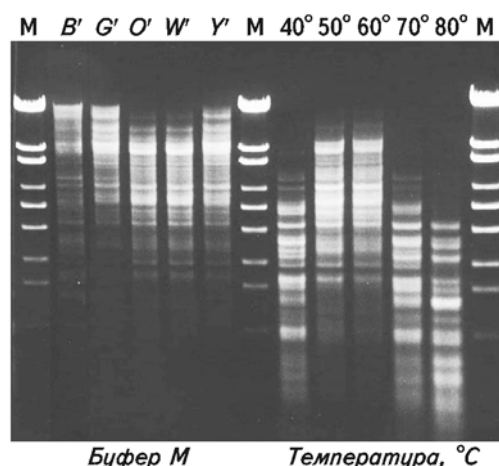


Рис. 1. Активность ДМТ *M.BssECI*, ограничивающая гидролиз ДНК фага λ избытком рестриктазы *BssECI*, при использовании для метилирования различных буферов (55°) и различных значений температуры (буфере G'): М — маркер длины фрагментов ДНК (λ ДНК + *BssTII*)

дами сайт, узнаваемый рестриктазой IIС-типа *AcIWI* (выделен рамкой). При этом точки гидролиза *AcIWI* (показаны стрелками) приходились на метилируемый сайт.



После гидролиза меченого дуплекса рестриктазой *AcIWI* одноцепочечные фрагменты разделяли с помощью электрофореза (рис. 2), в каждом из которых измеряли радиоактивность. В табл. 1 видно, что метка включалась преимущественно во фрагменты длиной 19 и 9 нуклеотидов. Такая картина могла наблюдаться только в том слу-

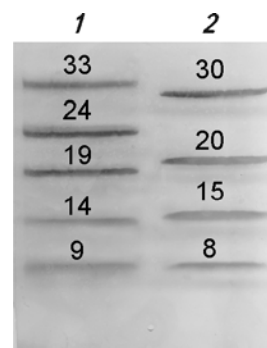


Рис. 2. Электрофорез в 40%-ном полиакриламидном геле с 7,5 М мочевиной фрагментов цепей меченого олигонуклеотидного дуплекса после его гидролиза *AcIWI*: 1 — гидролизат, 2 — маркер длины фрагментов ДНК. Цифры обозначают число нуклеотидов в каждом фрагменте

Таблица 1

Распределение метки во фрагментах олигонуклеотидного дуплекса, меченного *M.Bss*ECI в присутствии ^3H -SAM, после его гидролиза *Ac*/WI

Цепь дуплекса	Нуклеотидная последовательность фрагмента*	Длина, число нуклеотидов	Радиоактивность ^3H , имп/мин
Верхняя	5'-CACAACGTTAGGATCATAC-3'	19	1048
	5'-CATGGTAACCAAAT-3'	14	166
Нижняя	5'-ACCTGTGTTGCAATCCTAGTATGG-3'	24	141
	5'-TACCATTGG-3'	9	1008

*Нуклеотиды сайта, метилированного *M.Bss*ECI, выделены жирным шрифтом.

чае, если *M.Bss*ECI метилировала внешний цитозин узнаваемой последовательности с образованием фрагмента 5'-[^3H]mCCNNGG-3'.

Специфичность *M.Bss*ECI определяли также с использованием рестриктаз и моделирования (см. «Условия эксперимента»). Этот метод должен был позволить определить, какой именно цитозин, C5 или C4, подвергся метилированию. Для этого в условиях, оптимальных для активности *M.Bss*ECI, проводили метилирование метилтрансферазой *M.Bss*ECI ДНК вируса Адено-2, которую затем расщепляли рестриктазами. На рис. 3 (а, дорожка 1) видно, что *Bss*ECI расщепляла исходную ДНК по сайту 5'-CCNNGG-3', но не расщепляла метилированную ДНК (см. рис. 3, а, дорожка 2).

Моделирование метилирования наружного цитозина в обеих цепях узнаваемой последовательности путем замен (C=>N)CNNG(G=>N) также исключало узнавание сайтов 5'-CCNNGG-3' рестриктазой *Bss*ECI (см. рис. 3, б, дорожка 2). На рис. 3 видно также, что рестриктаза *Mva*I, узнающая 5'-CCWGG-3', не расщепляла сайты 5'-CCWGGG-3' на метилированной ДНК. Поскольку *Mva*I не чувствительна к m5C, но блокируется метилированием 5'-Cm4CWGG-3' [15] и 5'-m4CCWGG-3' [16], полученный результат свидетельствует о том, что *M.Bss*ECI образует m4C в последовательности 5'-CCNNGG-3'. Чтобы определить, какой именно цитозин метилирован, использовали *Msp*I, которая не расщепляет ни 5'-m5CCGG-3', ни 5'-m4CCGG-3' [4] даже при метилировании одной цепи сайта узнавания, однако расщепляет 5'-Cm5CGG-3' [17] и 5'-Cm4CGG-3' [18]. На рис. 3 видно, что *Msp*I не расщепляла сайты 5'-CCGGGG-3' (см. рис. 3, а, б, дорожки 2) и расщепляла сайты 5'-CCCGGG-3' (см. рис. 3, а, дорожка 2, и б, дорожка 3), метилированные *M.Bss*ECI. Таким образом, ДМТ *M.Bss*ECI образывала 5'-m4CCNNGG-3', не модифицируя

внутренний цитозин. На рис. 3 также видно, что перекрывающее метилирование достаточно полно блокировало *Mva*I и *Msp*I. Это свидетельствует о том, что *M.Bss*ECI метилировала обе цепи ДНК в сайте узнавания.

Таким образом, *M.Bss*ECI, образующая 5'-m4CCNNGG-3', относится к цитозин (N4)-ДНК-метилтрансферазам (КФ 2.1.1.113) [1]. По своей специфичности она близка к *M.Cfr*BI, которая образует 5'-m4CCWWGG-3' [19]. Таким образом, *M.Bss*ECI как фермент с новой специфичностью

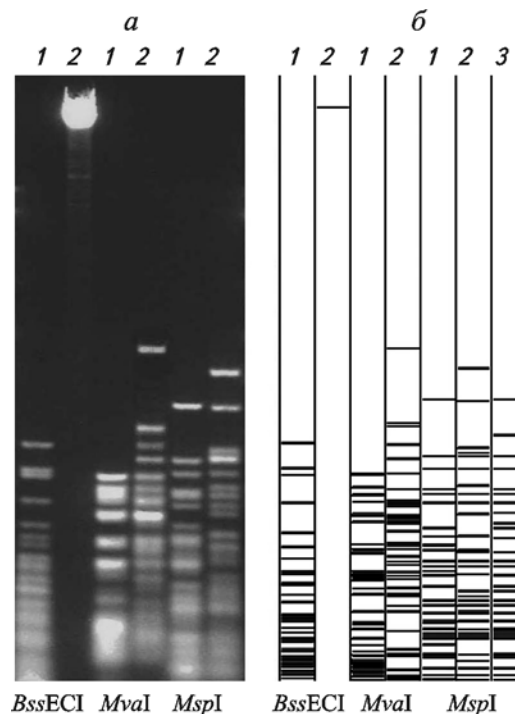


Рис. 3. Экспериментальный (а) и расчетный (б) гидролиз нативной (1) и *M.Bss*ECI-метилированной (2) ДНК вируса Адено-2 рестриктазами *Bss*ECI (узнает 5'-CCNNGG-3'), *Mva*I (узнает 5'-CCWGG-3') и *Msp*I (узнает 5'-CCGG-3'): 1 — ДНК; 2 — ДНК + *M.Bss*ECI (а) или замены при моделировании (б): (C=>N)CNNG(G=>N); 3 — C(C=>N)CG(G=>N)G

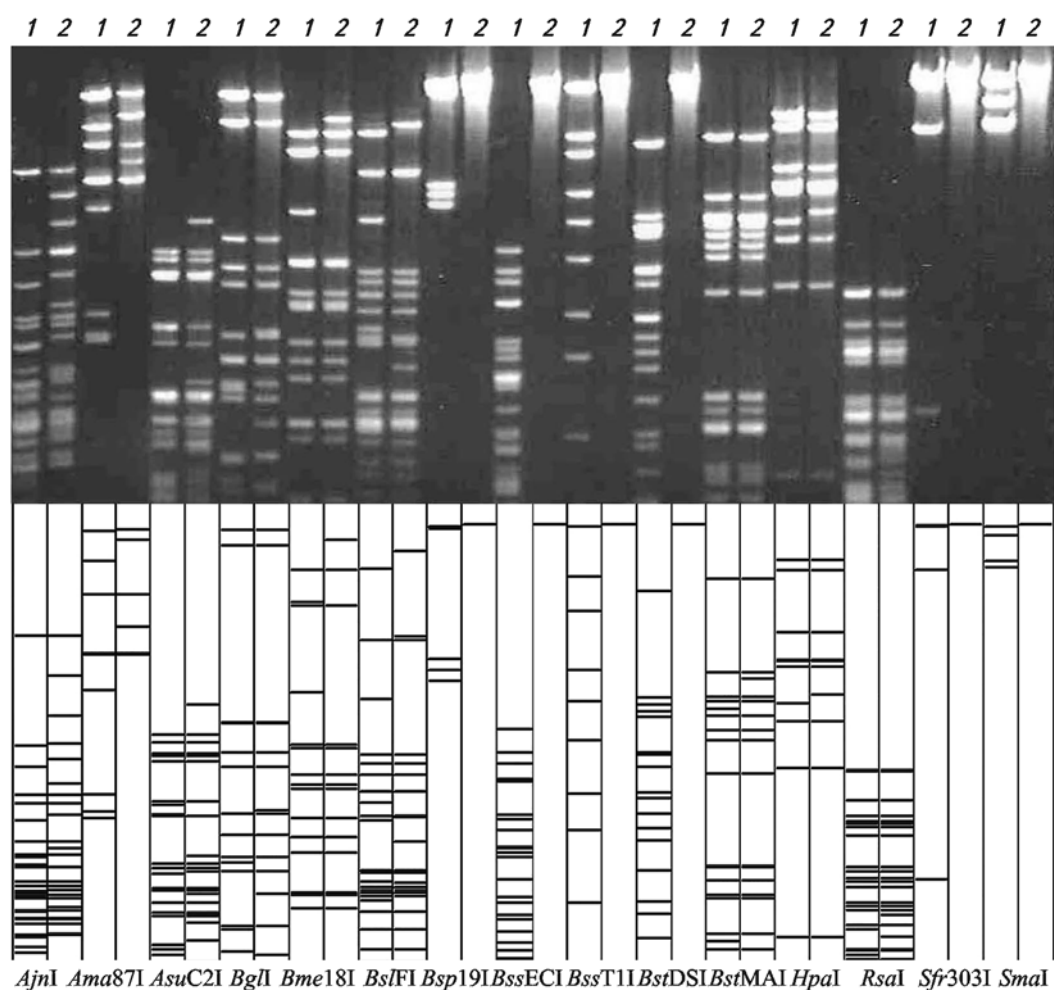


Рис. 4. Экспериментальный (вверху) и расчетный (внизу) профили гидролиза рестриктазами ДНК фага λ до (1) и после (2) ее обработки ДМТ *M.BssECI*: 1 — исходная ДНК (эксперимент) (или ее последовательность (модель)); 2 — ДНК + *M.BssECI* (эксперимент) или замены (C=>N)CNNG(G=>N) в последовательности ДНК при моделировании ее расщепления следующими рестриктазами: *AjiI* (узнает 5'-CCWGG-3'); *BstFI* (5'-GGGAC-3'); *Bsp19I* (5'-CCATGG-3'); *BssECI* (5'-CCNNGG-3'); *BssT1I* (5'-CCWWGG-3'); *BstDSI* (5'-CCRYGG-3'); *HpaI* (5'-GTTAAC-3'); *RsaI* (5'-GTAC-3'); *Sfr303I* (5'-CCGCGG-3') и *SmaI* (5'-CCCGGG-3'). Замены при расщеплении *Ama87I* (5'-CYCGRG-3') — (C=>N)CCGG(G=>N); *AsuC2I* (5'-CCSGG-3') — (C=>N)CSGGG и CCCSG(G=>N); *BglI* (5'-GCCNNNNNGGC-3') — GC(C=>N)NNGGNGGC и GGCNCCNN(G=>N)GC; *Bme18I* (5'-GGWCC-3') — GGWC(C=>N)CNNGG и CCNNG(G=>N)GWCC; *BstMAI* (5'-GTCTC-3') — CCNNG(G=>N)TCTC и GAGA(C=>N)CNNGG

вполне может представлять интерес для молекулярно-генетических исследований.

Существенной характеристикой специфичности рестриктаз является их чувствительность к метилированию сайтов узнавания. Поэтому мы использовали ДНК фагов λ и T7, метилированные *M.BssECI*, для изучения чувствительности ряда рестриктаз к новому виду метилирования.

Для рестриктаз, сайты узнавания которых перекрываются с 5'-m4CCNNGG-3', моделировали расщепление канонических и редактированных (C=>N)CNNG(G=>N) последовательностей ДНК фагов λ и T7. Рестриктазы, для которых выявили блокирование расщепления, использовали для экспериментального гидролиза метилированной ДНК.

В некоторых случаях расчетные и экспериментальные результаты не совпадали. Это объясняли тем, что ДМТ *M.BssECI* могла метилировать разные цитозины в сайтах узнавания рестриктаз, которые, в свою очередь, проявляли избирательную чувствительность к метилированию. Для каждой такой рестриктазы затем моделировали метилирование каждого цитозина отдельно, как описано в “Условиях эксперимента”. Таким образом определяли влияние метилирования этих оснований на блокирование изучаемой рестриктазы, а расчетные профили приводили в соответствие с экспериментом. Результаты, полученные при расщеплении ДНК фагов λ и T7, показаны соответственно на рис. 4 и 5, а также суммированы в табл. 2.

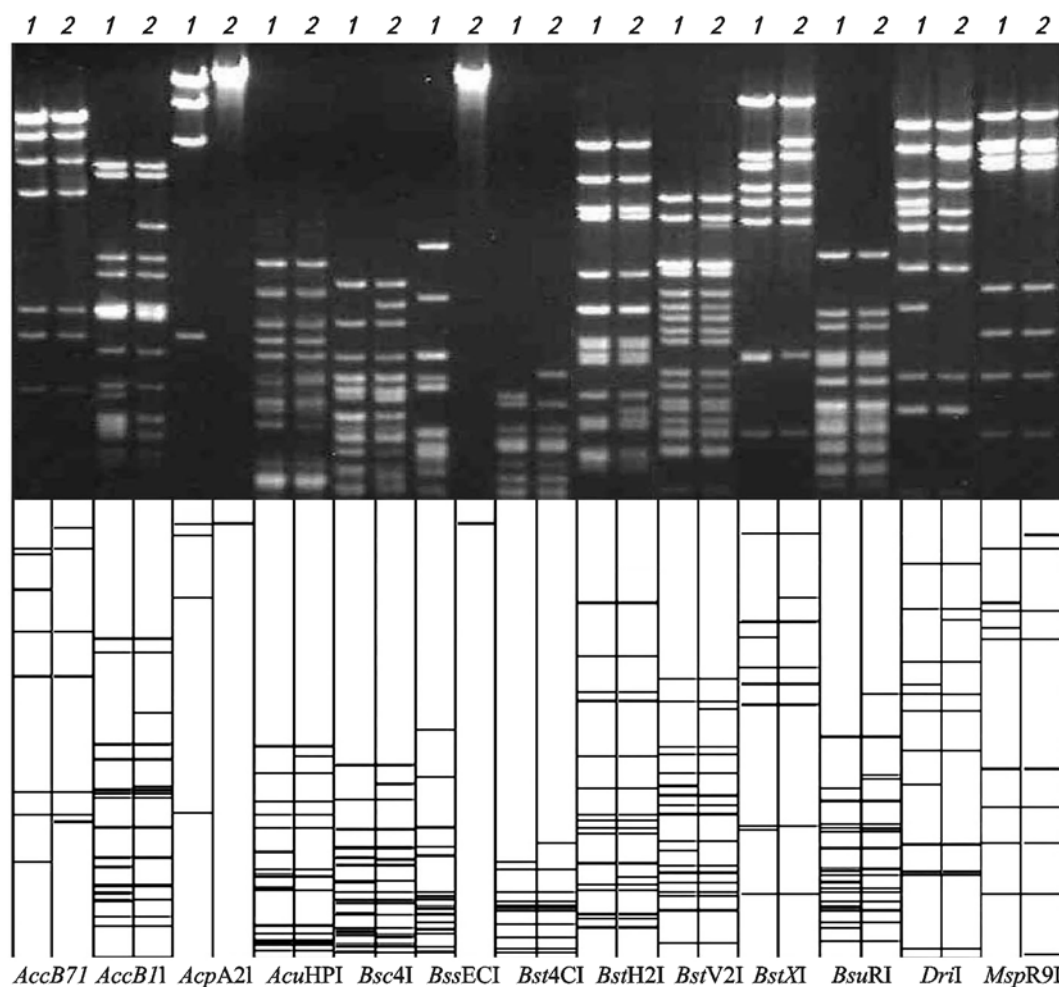


Рис. 5. Экспериментальный (вверху) и расчетный (внизу) профили гидролиза рестриктазами ДНК фага Т7 до (1) и после (2) ее обработки ДМТ *M.BssECI*: 1 — исходная ДНК (эксперимент) (или ее последовательность (модель)); 2 — ДНК + *M.BssECI* (эксперимент) или замены (C=>N)CNNG(G=>N) в последовательности ДНК при моделировании ее расщепления следующими рестриктазами: *AccB7I* (узнает 5'-CCANNNNNTGG-3'); *AcpA2I* (5'-CCTAGG); *BssECI* (5'-CCNNGG); *Bst4CI* (5'-ACNGT-3'); *BstXI* (5'-CCANNNNNTGG-3') и *BsuRI* (5'-GGCC-3'). Замены при расщеплении *AccB1I* (5'-GGYRCC-3') — GGYR(C=>N)CNNGG и CCNNG(G=>N)YRCC; *AsuHPI* (5'-GGTGA-3') — CCNNG(G=>N)GTGA и TCAC(C=>N)CNNGG; *Bsc4I* (5'-CCNNNNNNNNGG-3') — (C=>N)CNNGGNNNGG и CCNNNNCCNG(G=>N); *BstH2I* (5'-RGCGCY-3') — RGCG(C=>N)CNNGG и CCNNG(G=>N)CGCY; *BstV2I* (5'-GAAGAC-3') — CCNNG(G=>N)AAGAC и GTCTT(C=>N)CNNGG; *DriI* (5'-GACNNNNNGTC-3') — GA(C=>N)CNNGGGTC и GACCCNNG(G=>N)TC; *MspR9I* (5'-CCNNGG-3') — (C=>N)CNNGG и CCCNG(G=>N)

Из данных табл. 2 видно, что метилированную ДНК фага λ не расщепляла как *BssECI* (по сайту 5'-m4CCNNGG-3'), так и *Bsp19I* (5'-m4CCATGG-3'), *BssT1I* (5'-m4CCWWGG-3'), *BstDSI* (5'-m4CCRYGG-3'), *Sfi303I* (5'-m4CCGCGG-3') и *SmaI* (5'-m4CCCGGG-3'), а метилированную ДНК фага Т7 кроме *BssECI* не расщепляла также *AcpA2I* (5'-m4CCTAGG-3'). Сайты узнавания этих рестриктаз были метилированы по внешним цитозинам обеих цепей. *Ama87I*, узнающая 5'-CYCGRG-3', не расщепляла на ДНК фага λ сайт 5'-m4CCCGGG-3' (см. табл. 2).

В сайтах, узнаваемых некоторыми рестриктазами, *M.BssECI* могла метилировать только

один цитозин на одной из цепей. На рис. 4 видно, что в этих случаях рестриктаза *AjnI* не расщепляла 5'-m4CCWGG-3', *HpaI* не расщепляла 5'-GTAAm4C-3', а *RsaI* не расщепляла 5'-GTAm4C-3'. На рис. 5 видно также, что *AccB7I* расщепляла 5'-m4CCANNNNNTGG-3'. В табл. 2 показано, что в сайте узнавания другая цепь ДНК была метилирована вне этого сайта.

Моделирование показало, что ДМТ *M.BssECI* метилировала разные цитозины в одной из цепей в сайтах, узнаваемых рестриктазами *BglI*, *Bme18I* и *BstFI* на ДНК фага λ , а также рестриктазами *AccB1I*, *BstH2I*, *BstVI*, *BsuRI* и *DriI* на ДНК фага Т7 (рис. 6). Рестриктазы при этом могли прояв-

Таблица 2

Гидролиз ДНК рестриктазами по сайтам узнавания, метилированным М.*Bss*ECI

ДНК фага λ			ДНК фага T7		
Рестриктаза	Метилированный сайт, узнаваемый рестриктазой	Гидролиз, %	Рестриктаза	Метилированный сайт, узнаваемый рестриктазой	Гидролиз, %
<i>AjnI</i>	5'-m4CCWGG-3' 3'-GGWCC-5'	0	<i>AccB7I</i>	5'-m4CCANNNNNNTGG-3' 3'-GGTNNNNNACC-5'	100
<i>Ama87I</i>	5'-m4CYCGRG-3' 3'-GRGYm4C-5'	0	<i>AccB1I</i>	5'-GGYRm4CC-3' 3'-CCRYGG-5'	0
<i>AsuC2I</i>	5'-m4CCSSGG-3' 3'-GGSCC-5'	0		5'-GGYRCm4C-3' 3'-CCRYGG-5'	100
<i>BglI</i>	5'-Gm4CCNNNNNNGGC-3' 3'-CGGNNNNNCCG-5'	0	<i>AspA2I</i>	5'-m4CCTAGG-3' 3'-GGATCm4C-5'	0
	5'-GCCNNNNNNGGm4C-3' 3'-CGGNNNNNCCG-5'	100	<i>AsuHPI</i>	5'-GGTGA-3' 3'-m4CCACT-5'	100
<i>Bme18I</i>	5'-GGWCm4C-3' 3'-CCWGG-5'	0	<i>Bsc4I</i>	5'-m4CCNNNNNNNNGG-3' 3'-GGNNNNNNNCC-5'	0
	5'-GGWm4CC-3' 3'-CCWGG-5'	100	<i>BssECI</i>	5'-m4CCNNGG-3' 3'-GGNNCm4C-5'	0
<i>BslFI</i>	5'-m4ccnnGGGAC-3' 3'-ggnnCm4CCTG-5'	0	<i>Bst4CI</i>	5'-Am4CNGT-3' 3'-TGNCA-5'	0
	5'-GGGAC-3' 3'-CCm4CTG-5'	0	<i>BstH2I</i>	5'-RGCGm4CY-3' 3'-YCGCGR-5'	0
<i>Bsp19I</i>	5'-m4CCATGG-3' 3'-GGTACm4C-5'	0		5'-RGCGCm4Y-3' 3'-YCGCGR-5'	100
<i>BssECI</i>	5'-m4CCNNGG-3' 3'-GGNNCm4C-5'	0	<i>BstV2I</i>	5'-GAAGAm4C-3' 3'-CTTCTG-5'	100
<i>BssT1I</i>	5'-m4CCWWGG-3' 3'-GGWWCm4C-5'	0		5'-GAAGAC-3' 3'-4CTTCTG-5'	80
<i>BstDSI</i>	5'-m4CCRYGG-3' 3'-GGYRCm4C-5'	0	<i>BstXI</i>	5'-m4CCANNNNNNTGG-3' 3'-GGTNNNNNACC-5'	0
<i>BstMAI</i>	5'-GTCTC-3' 3'-m4CAGAG-5'	100	<i>BsuRI</i>	5'-GGm4CC-3' 3'-CCGG-5'	100
<i>HpaI</i>	5'-GTTAAm4C-3' 3'-CAATTG-5'	0		5'-GGCm4C-3' 3'-CCGG-5'	100
<i>RsaI</i>	5'-GTAm4C-3' 3'-CATG-5'	0	<i>DriI</i>	5'-GAm4CNNNNNGTC-3' 3'-CTGNNNNNCAG-5'	0
<i>Sfr303I</i>	5'-m4CCGCGG-3' 3'-GGCGCm4C-5'	0		5'-GACNNNNNGTm4C-3' 3'-CTGNNNNNCAG-5'	100
<i>SmaI</i>	5'-m4CCCGGG-3' 3'-GGGCCm4C-5'	0	<i>MspR9I</i>	5'-m4CCNNGG-3' 3'-GGNCC-5'	100

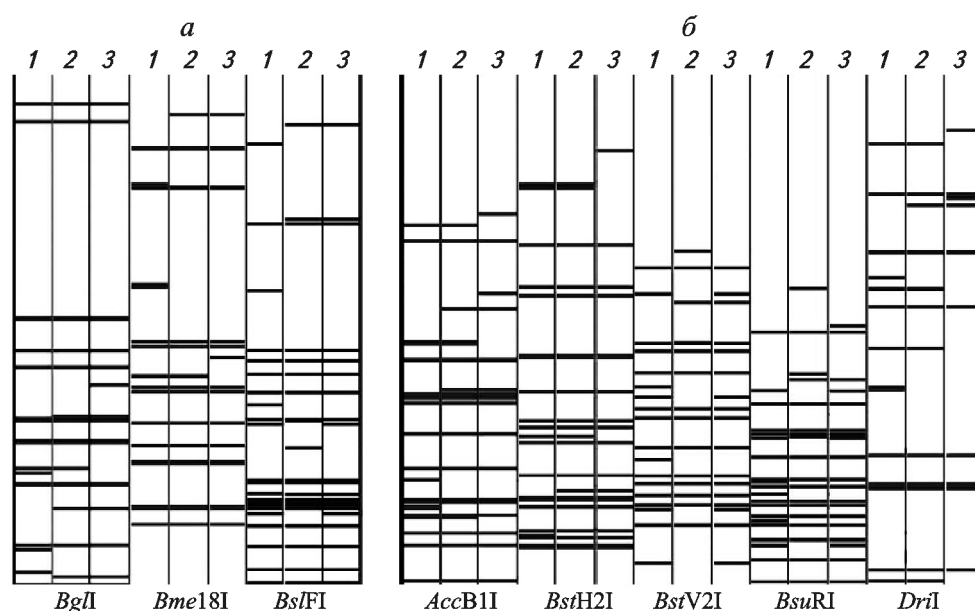


Рис. 6. Моделирование блокирования сайтов узнавания рестриктаз при перекрытии в них отдельных цитозинов метилированием 5'-m4CCNNGG-3' на ДНК фагов λ (а) и T7 (б): дорожки 1 — исходные последовательности ДНК; дорожки 2, 3 для *BglI* (узнает 5'-GCCNNNNNGGC-3') — замены G(C $\Rightarrow$ N)CNNGGNGGC и GGCNCCNNG(G $\Rightarrow$ N)C, соответственно; дорожка 3 — дополнительные замены GCCNNNNNGG(C $\Rightarrow$ N)CNNGG и CCNNG(G $\Rightarrow$ N)CCNNNNNGGC; дорожки 2, 3 для *Bme18I* (5'-GGWCC-3') — замены GGWC(C $\Rightarrow$ N)CNNGG и CCNNG(G $\Rightarrow$ N)GWCC, соответственно; дорожка 3 — дополнительные замены GGW(C $\Rightarrow$ N)CNNGG и CCNNG(G $\Rightarrow$ N)WCC; дорожка 2 для *BstFI* (5'-GGGAC-3') — замены CCNNG(G $\Rightarrow$ N)GAC и GTC(C $\Rightarrow$ N)CNNGG, а также замены CCNNG(G $\Rightarrow$ N)AC и GT(C $\Rightarrow$ N)CCNNG, соответственно; дорожка 3 — замены только CCNNG(G $\Rightarrow$ N)GAC и GTC(C $\Rightarrow$ N)CNNGG; дорожки 2, 3 для *AccB1I* (5'-GGYRCC-3') — замены GGYR(C $\Rightarrow$ N)CNNGG и CCNN(G $\Rightarrow$ N)GYRCC; дорожка 3 — дополнительные замены GGYRC(C $\Rightarrow$ N)CNNGG и CCNNG(G $\Rightarrow$ N)GYRCC; дорожки 2, 3 для *BstH2I* (5'-RGCGCY-3') — замены RGCG(C $\Rightarrow$ N)CNNGG и CCNNG(G $\Rightarrow$ N)CGCY, соответственно; дорожка 3 — дополнительные замены RGCGC(C $\Rightarrow$ N)CNNGG и CCNNG(G $\Rightarrow$ N)GCGCY; дорожки 2, 3 для *BstV2I* (5'-GAAGAC-3') — замены CCNNG(G $\Rightarrow$ N)AAGAC и GTCTT(C $\Rightarrow$ N)CNNGG, соответственно; дорожка 3 — дополнительные замены GAAGA(C $\Rightarrow$ N)CNNGG и CCNNG(G $\Rightarrow$ N)TCTTC; дорожка 2 для *BsuRI* (5'-GGCC-3') — замены (C $\Rightarrow$ N)CNNGG и CCNNG(G $\Rightarrow$ N); дорожка 3 — замены только GG(C $\Rightarrow$ N)CNNGG и CCNNG(G $\Rightarrow$ N)CC; дорожки 2, 3 для *DriI* (5'-GACNNNNNGTC-3') — замены GA(C $\Rightarrow$ N)CNNGGGTC и GACCCNNG(G $\Rightarrow$ N)TC, соответственно; дорожка 3 — дополнительные замены GACNNNNNGT(C $\Rightarrow$ N)CNNGG и CCNNG(G $\Rightarrow$ N)ACNNNNNGTC

лять различную чувствительность к метилированию. На дорожках 2 рис. 6 представлено моделирование блокирующего метилирования цитозинов, которое соответствовало эксперименту на дорожках 2 рис. 4 и 5. На дорожках 3 рис. 6 представлены результаты моделирования блокирующего метилирования и других цитозиновых остатков. Видно, что дорожки 3 отличаются от дорожек 2. При этом рестриктазы не расщепляли сайты, метилированные по одним цитозинам, и расщепляли сайты, метилированные по другим. Например, *BglI* (узнает 5'-GCCNNNNNGGC-3') не расщепляла 5'-Gm4CCNNNNNGGC-3', но расщепляла 5'-GCCNNNNNGGm4C-3'. Это следует из того, что экспериментальное расщепление метилированной ДНК фага λ при помощи *BglI* (см. рис. 4, дорожка 2) совпадало с расчетным при заменах G(C $\Rightarrow$ N)CNNGGNGGC и GGCNCCNNG(G $\Rightarrow$ N)C (см. рис. 4 и рис. 6, дорожка 2), но отличалось от расчетного при дополнительных заменах

GCCNNNNNGG(C $\Rightarrow$ N)CNNGG и CCNNG(G $\Rightarrow$ N)CCNNNNNGGC (см. рис. 6, дорожка 3). Показано также, что на ДНК фага λ (см. рис. 4 и 6) рестриктаза *Bme18I* не расщепляла 5'-GGWcm4C-3', но расщепляла 5'-GGWm4CC-3', а *BstFI* не расщепляла 3'-Cm4CCTG-5' и 3'-CCm4CTG-5'; в отношении ДНК фага T7 (см. рис. 5 и 6) полученные данные свидетельствуют, что *AccB1I* не расщепляла 5'-GGYRm4CC-3' и расщепляла 5'-GGYRCm4C-3', а *BstH2I* не расщепляла 5'-RGCGm4CY-3' и расщепляла 5'-RGCGcm4Y-3'. *BstVI* частично гидролизовала 5'-GTCTTm4C-3' и полностью — 5'-GAAGAm4C-3'. *BsuRI* расщепляла 5'-GGm4CC-3' и 5'-GGCm4C-3', *DriI* не вызывала деградацию 5'-GAm4CNNNNNGTC-3' и расщепляла 5'-GACNNNNNGTm4C-3'. Эти данные суммированы в табл. 2.

M.BssECI может метилировать цитозинные основания в сайтах узнавания и других рестриктаз. Однако в выбранных ДНК было выявлено

метилование только одного цитозина в сайте узнавания. Мы показали, что *AsuC2I* не вызывала деградации 5'-m4CCSGG-3' (см. рис. 4), *AsuHPI* расщепляла 5'-TCACm4C-3' (см. рис. 5), *MspR9I* — 5'-m4CCNNGG-3' (см. рис. 5), а *BstMAI* — 5'-GAGAm4C-3' (см. рис. 4 и табл. 2).

Сайт, узнаваемый рестриктазой, может быть перекрыт не одним, а двумя сайтами метилирования *M.BssECI*. Примером может служить сайт 5'-GTAC-3' (узнаваемый *RsaI*), находящийся в окружении 5'-ccnngGTACcnngg-3'. В этом случае *M.BssECI* метилирует оба цитозина в сайте 5'-GTAC-3' (на верхней и нижней цепях). Однако последовательность 5'-ccnngGTACcnngg-3' отсутствует в ДНК фага λ . Очевидно, что вероятность нахождения указанного декануклеотида среди 48502 оснований ДНК фага λ достаточно мала. Мы, тем не менее, рассмотрели возможность двойного перекрытия метилированием сайтов узнавания рестриктаз, перечисленных в табл. 2. Было показано, что лишь для сайта 5'-GGYRCC-3', узнаваемого *AccBII*, в последовательности ДНК фага T7 присутствует фрагмент CCGTGGCACCGAGG в позиции 7522. Моделирование, однако, показало, что блокирование расщепления этого сайта на электрофореграмме невозможно детектировать. Тем не менее, как видно из данных табл. 2, для блокирования рестриктаз *RsaI* и *AccBII* достаточно метилирования и одной цепи в их сайтах узнавания в области 5'-GTAm4C-3' и 5'-GGYRm4CC-3', соответственно.

Чувствительность рестриктаз к метилированию m4C (см. табл. 2) вполне можно использовать для изучения характера метилирования ДНК. Она также может характеризовать и специфичность сопряженных ДНК-метилтрансфераз. Рестриктазы не расщепляют ДНК, метилированную сопряженной метилазой даже по одной цепи. Поэтому, например, *M.BglI*, относящаяся к m4C ДНК-метилтрансферазам [20], вероятно, не образует 5'-GCCNNNNNGGm4C-3', поскольку *BglI* расщепляла такой сайт, метилированный *M.BssECI*.

Получено 14.09.11

ЛИТЕРАТУРА

1. S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structures and Functions [eds. X. Cheng, R.M. Blumenthal]. — Singapore, New Jersey, London, Hong Kong: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1999.
2. Arber, W. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. I. Host controlled modification of bacteriophage lambda / W. Arber, D. Dussoix // J. Mol. Biol. — 1962. — V. 5. — P. 18—36.
3. Calleja, F. A new endonuclease recognizing the deoxynucleotide sequence C[^]CNNGG from the cyanobacterium *Synechocystis* 6701 / F. Calleja, N. Tandeau de Marsac, T. Coursin, H. van Ormondt, A. de Waard // Nucleic Acids Res. — 1985. — V. 13. — P. 6745—6751.
4. Nelson, M. Alteration of apparent restriction endonuclease recognition specificities by DNA methylases / M. Nelson, C. Christ, I. Schildkraut // Nucleic Acids Res. — 1984. — V. 12. — P. 5165—5173.
5. Дедков В.С. Определение специфичности ДНК-метилтрансферазы *M.Bsc4I* в клеточном лизате при помощи блокирования эндонуклеаз рестрикции и компьютерного моделирования // Молекул. генетика, микробиол. вирусол. — 2009. — № 3. — С. 3—8.
6. Дедков В.С. Определение специфичности ДНК-метилтрансферазы *M.AspS9I* в клеточном лизате при помощи блокирования эндонуклеаз рестрикции // Биотехнология. — 2009. — № 4. — С. 30—39.
7. Sanger, F. Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA / F. Sanger, A.R. Coulson, G.F. Hong, D.F. Hill, G.B. Petersen // J. Mol. Biol. — 1982. — V. 162. — P. 729—773.
8. Dunn, J. Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements / J. Dunn, F.W. Studier // J. Mol. Biol. — 1983. — V. 166. — P. 477—535.
9. Roberts, R.J., Akusjarvi, G., Alestrom, P., Gelinas, R.E., Ginges, T.R., Sciaky, D., Pettersson, U. A consensus sequence for the adenovirus-2 genome: Adenovirus DNA [ed. W. Doerfler]. — Boston: Martinus Nijhoff Publishing, 1986. — P. 1—53.
10. Sutcliffe, J.G. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1978. — V. 75. — P. 3737—3741.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: пер. с англ. — М.: Мир, 1984.
12. Чернухин В.А. ДНК-метилтрансфераза *FauIA*, модифицирующая второй остаток цитозина в непалиндромной последовательности 5'-CCCGC-3' (Выделение и свойства) / В.А. Чернухин, Ю.Г. Каширина, К.С. Суханова, М.А. Абдурашитов, Д.А. Гончар, С.Х. Дегтярев // Биохимия. — 2005. — Т. 70. — № 6. — С. 829—837.
13. Roberts, R.J. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes / R.J. Roberts, M. Belfort, T. Bestor, A.S. Bhagwat, T.A. Bickle, J. Bitinaite, R.M. Blumenthal, S.K. Degtyarev, D.T. Dryden, K. Dybvig, K. Firman, E.S. Gromova, R.I. Gumpert, S.E. Halford, S. Hattman, J. Heitman, D.P. Hornby, A. Janulaitis, A. Jeltsch, J. Josephsen, A. Kiss, T.R. Klaenhammer, I. Kobayashi, H. Kong, D.H. Kruger, S. Lacks, M.G. Marinus, M. Miyahara, R.D. Morgan, N.E. Murray, V. Nagaraja, A. Piekarczyk, A. Pingoud, E. Raleigh, D.N. Rao, N. Reich, V.E. Repin, E.U. Selker, P.C. Shaw, D.C. Stein, B.L. Stoddard, W. Szybalski, T.A. Trautner, J.L. Van Etten, J.M. Vitor, G.G. Wilson, S.Y. Xu // Nucleic Acids Res. — 2003. — V. 31. — P. 1805—1812.
14. Boyer, H.W. DNA restriction and modification mechanisms in bacteria // Annu. Rev. Microbiol. — 1971. — V. 25. — P. 153—176.

15. Butkus, V. Investigation of restriction-modification enzymes from *M. varians* RFL19 with a new type of specificity toward modification of substrate / V. Butkus, S. Klimasauskas, D. Kersulyte, D. Vaitkevicius, A. Lebonka, A. Janulaitis // *Nucleic Acids Res.* — 1985. — V. 13. — P. 5727—5746.
16. Кубарева Е.А. Особенности расщепления эндонуклеазами рестрикции *MvaI* и *EcoRII* субстратов, модифицированных по аминокетонам гетероциклических оснований / Е.А. Кубарева, Е.С. Громова, Е.А. Романова, Т.С. Орещкая, З.А. Шабарова // *Биоорганическая химия.* — 1990. — Т. 16. — С. 501—506.
17. Waalwijk, C. *MspI*, an isochizomer of *HpaII* which cleaves both unmethylated and methylated *HpaII* sites / C. Waalwijk, R.A. Flavell // *Nucleic Acids Res.* — 1978. — V. 5. — P. 3231—3236.
18. Butkus, V. Cleavage of methylated CCCGGG sequences containing either N4-methylcytosine or 5-methylcytosine with *MspI*, *HpaII*, *SmaI*, *XmaI* and *Cfr9I* restriction endonucleases / V. Butkus, L. Petrauskienė, Z. Maneliene, S. Klimasauskas, V. Laucys, A. Janulaitis // *Nucleic Acids Res.* — 1987. — V. 15. — P. 7091—7102.
19. Zakharova, M.V. Cloning and sequences of the genes encoding the *CfrBI* restriction-modification system from *Citrobacter freundii* / M.V. Zakharova, A.N. Kravetz, I.V. Beletskaja, A.V. Repyk, A.S. Solonin // *Gene.* — 1993. — V. 129. — P. 77—81.
20. Lunnen, K.D. Cloning Type II restriction and modification genes / K.D. Lunnen, J.M. Barsomian, R.R. Camp, C.O. Card, S.-Z. Chen, R. Croft, M.C. Looney, M.M. Meda, L.S. Moran, D.O. Nwankwo, B.E. Slatko, E.M. Van Cott, G.G. Wilson // *Gene.* — 1988. — V. 74. — P. 25—32.

V.S. DEDKOV*, N.A. MIKHENKOVA,
Z.K. DJANOBILOVA, and M.V. TARASOVA

SibEnzyme Ltd, 630117, Novosibirsk Russia

e-mail: dedkov@sibenzyme.ru

A *M.BssECI* DNA Methyltransferase Forms 5'-m4CCNNGG-3'. Sensitivity of Restriction Endonucleases to the New Methylation

A novel DNA methyltransferase, *M.BssECI*, has been isolated and purified from *Bacillus stearothermophilus* EC cells. The enzyme methylates a surface cytosine residue in a 5'-CCNNGG-3' sequence with the formation of N4-methylcytosine, 5'-m4CCNNGG-3'. The approaches to enzyme isolation, purification (gel-filtration on a Biogel A-0,5m with the following chromatography on benzyl-DEAE-cellulose and heparin-Sepharose) and identification of the methylated DNA sequence were developed. The optimum conditions and the activity of the novel methyltransferase were determined using phage λ DNA on the basis of the *BssECI* restriction endonuclease blockage. A base that was methylated within the recognized sequence was detected using the [^3H]-labeling of the oligonucleotide duplex. The specificity of *M.BssECI* was investigated using self-methylated Adeno-2 DNA taking into account the sensitivity of the *BssECI*, *MvaI* and *MspI* restriction endonucleases to methylated DNA; computer modeling was also employed. The isolated enzyme can be used in studying of character of DNA methylation; in particular, it permitted to distinguish the m4C-methylated cytosine from m5C. DNAs of phages λ and T7 methylated by *M.BssECI* were applied to the investigation of the sensitivity of some restriction endonucleases to the methylation of their recognition sites.

Key words: computer modeling, DNA methyltransferase, study on specificity.

* Author for correspondence.