

МТЕI-ПЦР-АНАЛИЗ – НОВЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ GC-БОГАТЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ УЧАСТКОВ ГЕНОВ-ОНКОСУПРЕССОРОВ ЧЕЛОВЕКА

М.А. АБДУРАШИТОВ*, А.Н. КУКОВА, А.Г. АКИШЕВ, Е.В. ЗЕМЛЯНСКАЯ, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Предложен новый метод MteI-ПЦР-анализа GC-богатых участков ДНК, основанный на уникальной метилзависимой сайт-специфической ДНК-эндонуклеазе MteI, имеющей протяженный высокометилированный сайт узнавания. Метод включает в себя гидролиз ДНК ферментом MteI с последующим проведением ПЦР либо в реальном времени, либо с определением полученных продуктов методом гель-электрофореза. Установлен статус метилирования регуляторных участков ряда генов-онкосупрессоров методом MteI-ПЦР-анализа в сравнении с ранее предложенным методом BlnI- и ClaI-ПЦР-анализа. Показана применимость метода MteI-ПЦР-анализа для анализа статуса метилирования регуляторных участков генов SEBP2, HS3ST2, RASSF1A, SEPT9b и TWIST1. В случае гена RASSF1A real-time MteI-ПЦР-анализ, в отличие от real-time ClaI- и BlnI-ПЦР-анализа, не обнаруживает метилирования регуляторного участка ДНК в здоровых клетках, что позволяет более четко определять и дискриминировать статус метилирования регуляторного участка как этого гена, так и, вероятно, ряда других GC-богатых участков ДНК человека.

Ключевые слова: метилзависимые сайт-специфические эндонуклеазы, метилирование ДНК, полимеразная цепная реакция.

Введение

За последние годы был открыт и охарактеризован целый ряд метилзависимых сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз (МД-эндонуклеаз), расщепляющих короткие последовательности, содержащие 5-метилцитозин (5mC) и не гидролизующие неметилированную ДНК [3–9, 20]. Такая специфичность делает МД-эндонуклеазы удобным инструментом для изучения метилирования участков ДНК высших эукариот, геномы которых содержат значительные количества 5mC [1, 2, 10, 18].

Метилирование ДНК играет важную роль в регуляции генной активности эукариот. Регуляторные участки значительного числа генов высших организмов содержат так называемые CpG-островки, метилирование CpG-пар внутри которых подавляет экспрессию этих генов [11, 13, 15]. Особый интерес исследователей вызывает модификация регуляторных областей ге-

нов-онкосупрессоров, так как она является основным эпигенетическим маркером при диагностике раковых заболеваний [12, 16, 17, 19].

Ранее нами был описан простой метод определения статуса метилирования участков ДНК с помощью МД-эндонуклеаз ClaI и BlnI — метод ClaI- и BlnI-ПЦР-анализа [1, 2]. Известно, что de novo метилирование ДНК в клетках млекопитающих и человека осуществляется ДНК-метилтрансферазами DNMT3a и DNMT3b, модифицирующими цитозин в обеих цепях сайта RCGY с образованием последовательности 5'-R(5mC)GY-3'/3'-YG(5mC)R-5' [14]. При этом МД-эндонуклеаза ClaI узнает именно сайт 5'-R(5mC)GY-3'/3'-YG(5mC)R-5', что делает ее удобным инструментом для выявления метилированных de novo сайтов в ДНК. В свою очередь, BlnI расщепляет последовательность 5'-R(5mC)GYNR(5mC)GY-3'/3'-YG(5mC)RNYG(5mC)R-5', представляющую собой два метилированных сайта, разделенных одним нуклеотидом. Метод ClaI- и BlnI-ПЦР-анализа [2] заключается в расщеплении геномной ДНК МД-эндонуклеазой с последующей амплификацией исследуемой области генома. При наличии в ней указанных метилированных участков они расщепляются ферментами ClaI и BlnI, соответственно, и их амплификации в ПЦР не происходит. Неметилированные участки ДНК после

© 2013 г. Абдурашитов М.А., Куксова А.Н., Акишев А.Г., Землянская Е.В., Дегтярев С.Х.

* Автор для переписки:

Абдурашитов Мурат Абдурашитович

НПО «СибЭнзим»

630117 Новосибирск-117, ул. Академика Тимакова, 2/12

E-mail: abd@sibenzyme.ru

обработки МД-эндонуклеазами остаются интактными, и амплификация с них проходит успешно.

Одной из наиболее интересных МД-эндонуклеаз является фермент MteI, который, в отличие от остальных ферментов этого типа, узнает протяженную и высоко-метилированную последовательность ДНК [3]. Такая уникальная субстратная специфичность может быть использована для определения статуса метилирования GC-богатых участков ДНК методом MteI-ПЦР-анализа, заключающимся в гидролизе исследуемой ДНК ферментом MteI и последующем ПЦР-анализе интересующего участка.

Целью настоящей работы явилось определение статуса метилирования GC-богатых участков регуляторных областей ряда генов-онкосупрессоров методом MteI-ПЦР-анализа.

Материалы и методы

Гидролиз ДНК клеточных культур человека. В качестве субстратов для ПЦР использовались препараты ДНК, выделенной из одной контрольной немалигнантной

клеточной линии L-68 (легочные фибробласты) и четырех малигнанных клеточных линий: Raji (лимфома Беркитта), U-937 (гистиоцитарная лимфома), HeLa (аденокарцинома шейки матки) и Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия). Геномная ДНК из линий клеток человека, эндонуклеаза рестрикции HaeIII, метилзависимые сайт-специфические ДНК-эндонуклеазы BlnI, GluI и MteI, а также HotStart-Taq-ДНК-полимераза — производства компании «СибЭнзим» (Новосибирск, Россия).

0,1 мкг ДНК инкубировали в 30 мкл реакционной смеси, содержащей либо 100 единиц активности (ед. акт.) HaeIII, либо 16 ед. акт. BlnI, либо 16 ед. акт. GluI в реакционном буфере, рекомендованном производителем, с добавлением 0,1 мкг/мкл BSA при температуре 37 °C (для HaeIII), 30 °C (BlnI и GluI) и 55 °C (MteI) в течение 2 ч. После инкубации ферменты инактивировались путем прогрева (80 °C для HaeIII и MteI, 65 °C — в случае BlnI и GluI) в течение 20 мин. 1 мкл реакционной смеси, содержащей 3,3 нг ДНК, использовали в ПЦР.

Проведение ПЦР. Для проведения ПЦР использовали праймеры, указанные в таблице 1.

Таблица 1

Структура праймеров и амплифицируемые участки генома человека

Регуляторный участок гена	Хромосома	Координаты участка по сборке GRCh37/hg19	Длина фрагмента, п.н.	Прямой и обратный праймеры
MGMT	10	131265230–131265585	356	GGCGTGCCGGCGTCCAGCG GGAGCGAGGCGACCCAGACACTCACC
RASSF2	20	4803816–4804239	424	GCGAGAGAAAAGAGAGGACAGCGGACGAGC CAGCCGGGGTAGGGACCATCGTGGA
RARB	3	25469693–25470545	853	CCGGGTAGGGTTACCCGAAAGTTCACCTCGC TCAGCAAAGGGAATCAATATGCATGCCAGC
RASSF1A	3	50378209–50378593	385	CCGGATGTGGGGACCCTCTTCCTCTAGC GCTCAATGAGCTCAGGCTCCCCCGAC
SFRP1	8	41166416–41167262	847	CCGCCCTGGTCTCTCTCC GCCATGGTCTCGTGCTCC
CEBPD	8	48650692–48651032	341	CCTGGAGTGCTGGCAGAGGGAGTGTC GGGCCGGGCTCTGCGTCCAA
CEBPD	8	48650593–48651032	440	CCTGGAGTGCTGGCAGAGGGAGTGTC CGCCCGGCCCGGTTCGTAGAA
HS3ST2	16	22825348–22826048	701	GCTGTGTTTCTGGGAGGGGTA GCACAGGAAGCTGTAACACAGGTA
TWIST1	7	19156756–19157957	1202	CGAGAGAGCAGGCCGGGACGCAA GCCGCCCTCCGACGCCCCCA
RASSF1A	3	50377790–50378239	450	CTGTGGCCCAGATACGAGTGGAGTGCGAC GCCATGTGCGGGGAGCCTGAGCTCA
SEPT9b (1)	17	75369017–75369448	432	CTGCCCCAATACAGCCTCCTGCAGAAGG CCCTAGGCCCCCTGGCTCAGCTG
SEPT9b (2)	17	75369405–75369601	197	CGCCTTCCTCCCCCATTCATTCAGCTG CGTTGACCGCGGGGTCCGACATG
SEPT9b (3)	17	75369557–75369955	399	CGACCCGCTGCCACCAGCCATC CGAGGAGGTCGCTGTGCTTGGA

**Структура праймеров и зондов для амплифицируемых участков генома человека
в режиме реального времени**

Регуляторный участок гена	Хромосома	Координаты участка по сборке GRCh37/hg19	Длина фрагмента, п.н.	Прямой, обратный праймеры и флуоресцентно меченный зонд
RASSF1A	3	50378020–50378236	217	ATGTCGGGGGAGCCTGAG AGATGAAGTCGCCACAGAGGTC FAM-TGCCAGCTCCCGCAGCTCAAT-BHQ1
SEPT9b	17	75369721–75369840	120	GGGAGACGGGAGTGCGCTGAGG GCCCCCTAACAGGGTCCCCCAGCTAG FAM-CCCTCCCGCTGAGAGCGCCG-BHQ1

Реакции амплификации проводили в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 1× буфер AS, 1× стабилизатор, 0,2 мМ каждого dNTP, 2 мМ MgCl₂, 0,4 мкМ каждого праймера, 4% DMSO (в случае регуляторного участка гена RARB DMSO не добавляли), 0,8 ед. акт. HotStart Taq-ДНК полимеразы, 3,3 нг гидролизованной или негидролизованной геномной ДНК. Все перечисленные компоненты реакционной смеси — производства компании «СибЭнзим» (Новосибирск, Россия).

ПЦР проводили в приборе C1000 Thermal Cycler («BioRad», США). Проводили предварительный прогрев 3 мин. при 95 °С, затем 38 циклов амплификации: плавление — 96 °С, 20 сек.; отжиг — при температуре на 3–5 °С меньшей, чем температура плавления праймеров, 20 сек.; элонгация — 72 °С в течение 20–70 сек. (в зависимости от длины амплифицируемого фрагмента).

Для проведения ПЦР в реальном времени использовали праймеры и зонды, указанные в таблице 2.

ПЦР в реальном времени проводили в приборе CFX96 Real-Time System («BioRad», США). Реакция с каждой матричной ДНК (гидролизованной или негидролизованной) проводилась в трех повторах. Использовалась программа амплификации: предварительный прогрев при 95 °С в течение 5 мин., затем 45 циклов амплификации: плавление — 95 °С, 10 сек.; отжиг — 61 °С, 30 сек. и элонгация — 72 °С, 20 сек. Анализ данных и их обработка осуществлялись с помощью программ Bio-Rad CFX Manager v.2.1 и Microsoft Excel 2010.

Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлен список регуляторных областей девяти генов-онкосупрессоров, статус метилирования которых определялся методом Glal- и BlsI-ПЦР-анализа, а также методом MteI-ПЦР-анализа, включающим в себя гидролиз ДНК ферментом MteI с последующей амплификацией исследуемой области генома. В таблице указаны

хромосомная локализация и координаты исследуемых участков ДНК, представлена структура использованных праймеров и приведены длины получаемых ампликонов. В случае гена SEBPD изучались короткий и расширенный варианты регуляторной области, в случае гена SEPT9b определялся статус метилирования трех отдельных участков регуляторной области, а в случае гена RASSF1A — двух отдельных участков.

В качестве субстрата мы использовали ДНК клеточных линий L-68 и Raji, которые расщеплялись МД-эндонуклеазами Glal, BlsI и MteI. Выбор данных клеточных линий обусловлен тем, что ДНК из клеток L-68, как правило, не содержит метилированных цитозиновых остатков в регуляторных участках ранее изучавшихся нами генов-онкосупрессоров, в то время как ДНК из клеток Raji, напротив, в подавляющем большинстве случаев метилирована в этих областях [1]. Как положительный и отрицательный контроли (на наличие или отсутствие расщепления ДНК) мы использовали HaeIII-гидролизат ДНК и исходную ДНК, соответственно. Амплификацию полученных гидролизатов и контрольной ДНК проводили, как описано в методах.

На рисунке 1 даны электрофореграммы, полученные после разделения в геле фрагментов ДНК, амплифицированных с выбранных регуляторных участков геномной ДНК, гидролизованной различными эндонуклеазами.

Как видно из рисунка 1, МД-эндонуклеазы гидролизуют большую часть анализируемых участков в ДНК клеточной линии Raji, в то время как контрольная ДНК L-68 ими не расщепляется. Данные по гидролизу ДНК Raji сведены в таблицу 3. В таблице 3 также представлено количество сайтов RCGY, RCGYNRCGY и GCGCNGCGC, расположенных в изучаемых участках. В случае метилирования DNMT3a или DNMT3b первые две последовательности становятся сайтами узнавания Glal и BlsI, соответственно. Сайт GCGCNGCGC является минимальным сайтом узнавания MteI при наличии в нем шести 5-метилцитозинов [3].

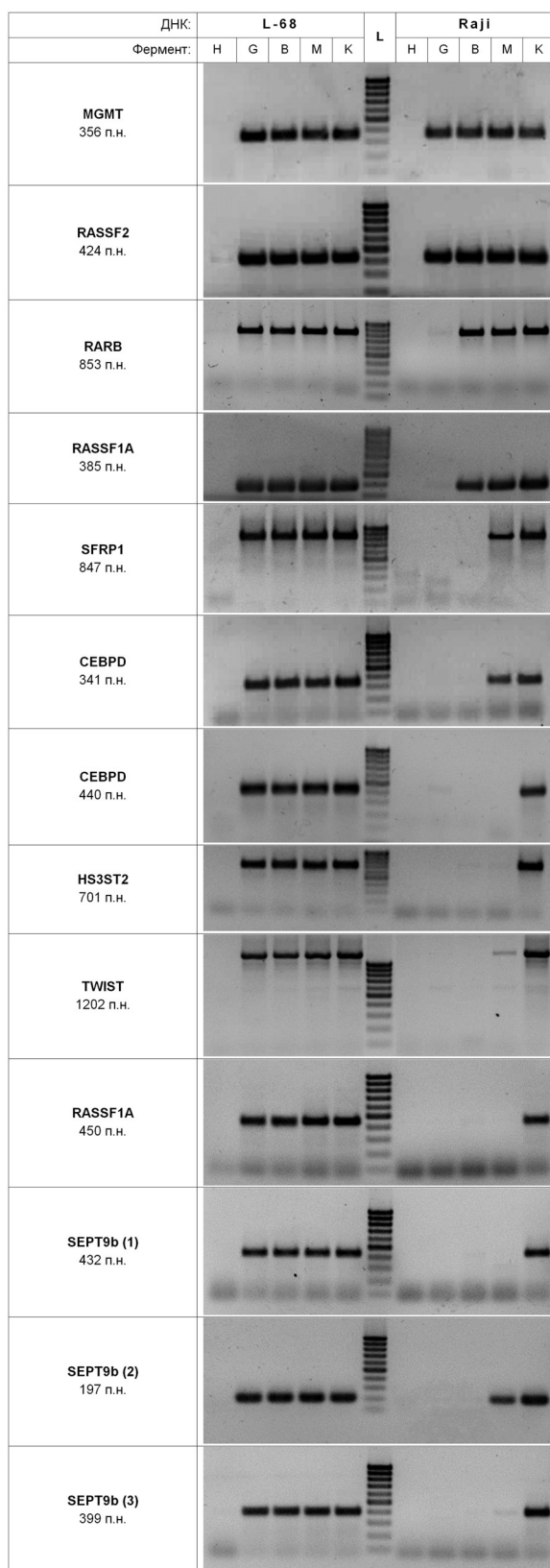


Рис. 1. Результаты *GlaI*-, *BlsI*- и *MteI*-ПЦР-анализа регуляторных участков генов-онкосупрессоров. Обозначения дорожек: гидролизаты Н – *HaeIII*, G – *GlaI*, B – *BlsI*, M – *MteI*; K – ДНК без обработки эндонуклеазой; L – маркер длин фрагментов 100 bp («СибЭнзим», Россия)

Как видно из рисунка 1 и таблицы 3, в случае регуляторных участков генов *MGMT* и *RASSF2* наблюдается образование соответствующих ПЦР-продуктов после гидролиза ДНК ферментами *GlaI*, *BlsI* и *MteI*, что соответствует отсутствию метилирования по сайтам *RCGY*. Для регуляторного участка гена *MGMT* отсутствие метилирования в ДНК клеточной линии *Raji* было показано ранее [1]. Регуляторные участки генов *RARB* и *RASSF1A* в ДНК *Raji* расщепляются лишь *GlaI*, а *BlsI* и *MteI* не гидролизуют ДНК на этих участках в связи с отсутствием соответствующих сайтов узнавания на данных участках. Регуляторный участок гена *SFRP1*, короткий фрагмент регуляторного участка гена *CEBPD* (341 п.н.) и второй участок регуляторной области гена *SEPT9b* (197 п.н.) расщепляются ферментами *GlaI* и *BlsI*, однако гидролиз этих фрагментов МД-эндонуклеазой *MteI* затруднен. Как можно видеть, в структуре сайтов узнавания *MteI*, находящихся в этих участках, присутствует только 4 цитозина, метилируемых *DNMT3a* и *DNMT3b*, что недостаточно для полного гидролиза ферментом указанных метилированных сайтов. В более длинном фрагменте регуляторного участка гена *CEBPD* (440 п.н.) присутствуют три сайта *NGCGCNGCGCN*, один из которых содержит 8 метилируемых цитозинов, и такой метилированный сайт является хорошим субстратом *MteI* [3]. Один из сайтов *NGCGCNGCGCN* в регуляторном участке гена *TWIST* содержит 6 метилируемых цитозинов, и такой метилированный сайт также полностью расщепляется всеми тремя МД-эндонуклеазами. Ситуация, аналогичная гену *TWIST*, наблюдается в случае регуляторного участка гена *RASSF1A* (450 п.н.), а также первого и третьего участков регуляторной области гена *SEPT9b* (432 и 399 п.н., соответственно), которые полностью расщепляются *MteI*. Анализ первичной структуры регуляторной области гена *HS3ST2* выявил только один сайт *NGCGCNGCGCN*, который содержит всего 4 метилируемых цитозина и вследствие этого является плохим субстратом *MteI*. Однако эксперимент (см. рис.1) показал, что данный фрагмент ДНК полностью расщепляется *MteI*. Дальнейшие исследования по установлению первичной структуры регуляторной области гена *HS3ST2* в клетках *Raji* и прямое определение «узора» метилирования в сайте *NGCGCNGCGCN* должно выявить последовательность ДНК, гидролизуемую ферментом *MteI*.

Полученные результаты показывают, что *MteI*-ПЦР-анализ позволяет определить статус метилирования регуляторных участков генов-онкосупрессоров, содержащих в последовательности *NGCGCNGCGCN* шесть и более 5-метилцитозинов, и может быть использован при анализе гиперметилированных участков ДНК.

**Результаты определения статуса метилирования регуляторных участков генов-онкосупрессоров
в ДНК клеточной линии Raji методом Glal-, BslI- и MteI-ПЦР-анализа**

Регуляторный участок гена (длина ПЦР-продукта)	Количество сайтов узнавания / результат гидролиза ферментом			Структура сайтов NNGCGCNGCGCNN в изучаемом регуляторном участке и число цитозинов, метилируемых DNMT3
	RCGY/GlaI гидролиз	RCGYN-RCGY/BslI гидролиз	GCGCNGC-GC/MteI гидролиз	
MGMT (356 п.н.)	16/-	-/-	-/-	-
RASSF2 (424 п.н.)	13/-	-/-	-/-	-
RARB (853 п.н.)	4/+	-/-	-/-	-
RASSF1A (385 п.н.)	7/+	-/-	-/-	-
SFRP1 (847 п.н.)	28/+	1/+	1/(-/+)	5'-GGGCGCGCGCGCTT-3' (4) 3'-CCCGCGCGCGCGAA-5'
CEBPD (341 п.н.)	11/+	1/+	1/(-/+)	5'-CAGCGCGAGCGCAG-3' (4) 3'-GTCCGCTCGCGTC-5'
CEBPD (440 п.н.)	19/+	3/+	3/+	5'-CAGCGCGAGCGCAG-3' (4) 3'-GTCCGCTCGCGTC-5' 5'-GAGCGCGCGCGCTC-3' (4) 3'-CTCGCGCGCGCGAG-5' 5'-GCGCGCGCGCGCGC-3' (8) 3'-CGCGCGCGCGCGCG-5'
HS3ST2 (701 п.н.)	29/+	2/+	1/+	5'-GGGCGCGCGCGCGG-3' (4) 3'-CCCGCGCGCGCGCC-5'
TWIST (1202 п.н.)	28/+	2/+	2/+	5'-CGGCGCGCGCGCGC-3' (6) 3'-GCCGCGCGCGCGCG-5' 5'-AGGCGCGAGCGCGG-3' (4) 3'-TCCGCGTCCGCGCC-5'
RASSF1A (450 п.н.)	19/+	1/+	1/+	5'-ACGCGCTGCGCAT-3' (6) 3'-TGCGCGACCGCTA-5'
SEPT9b (1-432 п.н.)	10/+	1/+	1/+	5'-GGGCGCAGCGCGC-3' (6) 3'-CCCGCGTCCGCGCG-5'
SEPT9b (2–197 п.н.)	7/+	1/+	1/(-/+)	5'-GGGCGCGCGCGCCC-3' (4) 3'-CCCGCGCGCGCGG-5'
SEPT9b (3-399 п.н.)	16/+	1/+	1/+	5'-GAGCGCGCGCGCGC-3' (6) 3'-CTCGCGCGCGCGCG-5'

Примечание: * Последовательность GCGCNGCGC подчеркнута. Серым цветом выделены цитозины, метилируемые ферментами DNMT3a или DNMT3b

Ранее нами было предложено использовать Glal- и BslI-ПЦР-анализ для идентификации малигнанных клеточных линий человека, так как они отличаются по статусу метилирования регуляторных участков известных генов-онкосупрессоров [1]. При лабораторном культивировании часто происходит загрязнение клеточных линий другими клетками и «вырождение» культур клеток, приводящее к утра-

те нужной линии или ее исходных свойств. Заранее определенный профиль метилирования ряда участков ДНК может служить эпигенетической характеристикой линии клеток. Для этой цели, наряду с Glal- и BslI-ПЦР-анализом, может быть использован MteI-ПЦР-анализ.

С помощью MteI-ПЦР-анализа мы провели определение статуса метилирования сайта

NGCGCNGCGCN в регуляторных участках генов RASSF1A и SEPT9b (см. табл. 3) для ДНК из четырех малигнанных клеточных линий Raji, U-937, HeLa и Jurkat, а также из контрольных клеток L-68. Координаты амплифицируемых участков в геноме, длины ПЦР-продуктов и структуры использовавшихся праймеров приведены в таблице 1.

Полученные результаты представлены на рисунке 2. Как видно из этого рисунка, Glal-, BslI- и MteI-ПЦР-анализ дает одинаковые результаты при определении статуса метилирования регуляторных участков генов RASSF1A и SEPT9b(3). Исследуемые районы этих двух генов расщепляются ферментами Glal, BslI и MteI в ДНК клеток Raji и не гидролизуются в ДНК контрольной клеточной линии L-68.

В то же время Glal-, BslI- и MteI-ПЦР-анализ гена RASSF1A дал положительный результат в ДНК клеточной линии Jurkat, тогда как в случае гена SEPT9b(3) гидролиз ДНК происходит в клеточных линиях U-937 и HeLa и не происходит в клетках Jurkat. Полученные результаты соответствуют ранее опубликованным данным [1]. Таким образом, MteI-ПЦР-анализ, наряду с Glal- и BslI-ПЦР-анализом, может также использоваться для типирования малигнанных клеточных линий.

В последнее время метод real-time ПЦР все шире применяется как в научных исследованиях, так и в клинической работе, вытесняя метод электрофоретического анализа ПЦР-продуктов из повседневной практики. В связи с этим мы также провели real-time Glal-, BslI- и MteI-ПЦР-анализ регуляторных участков генов RASSF1A и SEPT9b(3). Структуры использовав-

шихся праймеров и флуоресцентно меченных зондов и координаты амплифицируемых участков приведены в таблице 2. Полученные данные после статистической обработки были использованы для построения диаграмм, показывающих степень гидролиза различных амплифицируемых участков. Результаты real-time Glal-, BslI- и MteI-ПЦР-анализа представлены на рисунке 3. Полученные данные достаточно хорошо согласуются с результатами электрофоретического анализа, описанными выше (см. рис. 2). Как видно из рисунка 3, гидролиз указанных фрагментов ДНК Raji всеми тремя ферментами происходит практически полностью. Однако, если MteI практически не расщепляет сайт NGCGCNGCGCN в исследуемых фрагментах ДНК контрольной клеточной линии L-68, то Glal и BslI гидролизуют регуляторный участок гена RASSF1A в ДНК L-68 на 20 и 15%, соответственно, что говорит о частичном метилировании сайтов RCGY в этом участке в ДНК контрольной линии фибробластов.

При этом, согласно результатам real-time Glal- и BslI-ПЦР-анализа, регуляторный участок гена RASSF1A не метилирован в клетках HeLa и U-937, в которых данный ген так же активен, как и в контрольной клеточной линии L-68.

Таким образом, в случае гена RASSF1A real-time MteI-ПЦР-анализ, в отличие от real-time Glal- и BslI-ПЦР-анализа, не показывает метилирования данного участка ДНК в здоровых клетках, что позволяет более четко определять и дискриминировать статус метилирования регуляторного участка как этого гена, так и, вероятно, ряда других GC-богатых участков ДНК человека.

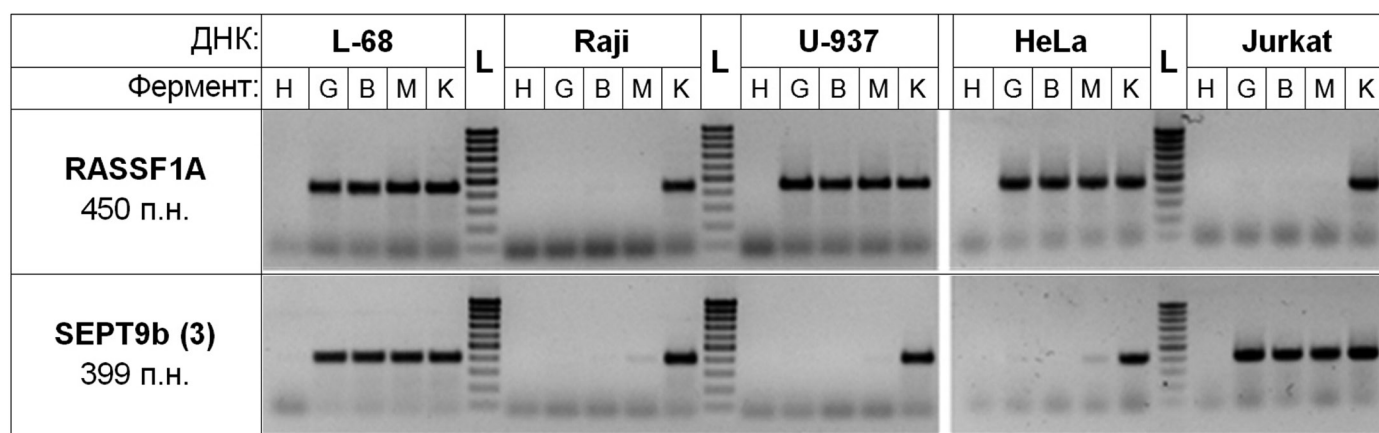
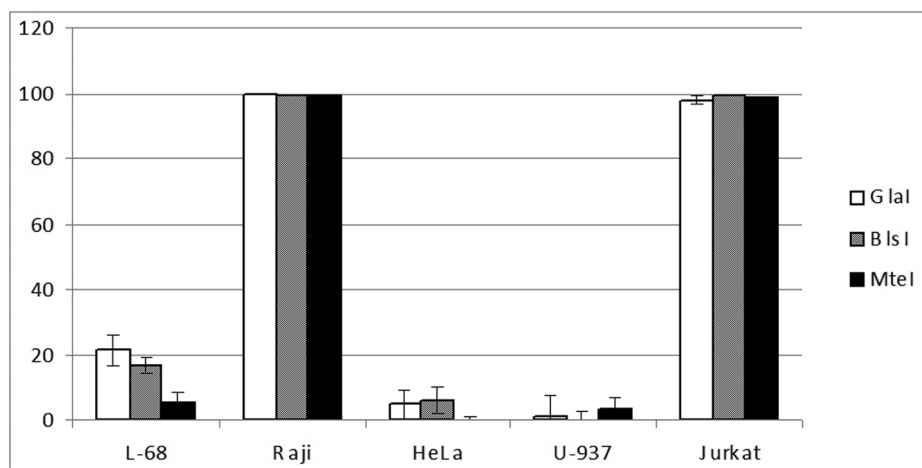
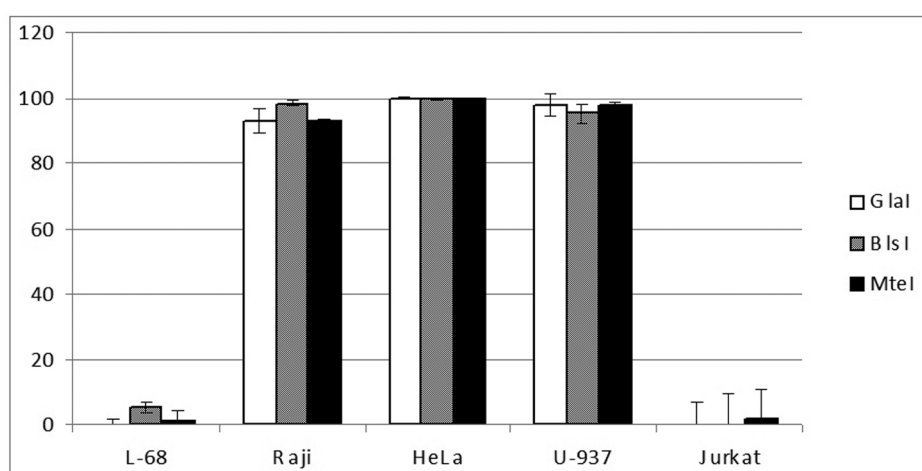


Рис. 2. ПЦР-продукты, образующиеся при амплификации частей регуляторных участков генов-онкосупрессоров после обработки эндонуклеазами. Обозначения дорожек — как на рисунке 1



RASSF1A

217 п.н.



SEPT9b (3)

120 п.н.

Рис. 3. Степень гидролиза коротких участков ДНК по данным ПЦР в реальном времени. По оси ординат показан процент гидролизированных участков

Закключение

Таким образом, в настоящем исследовании предложен новый метод MteI-ПЦР-анализа GC-богатых участков ДНК, основанный на уникальной метилзависимой сайт-специфической ДНК-эндонуклеазе MteI, имеющей протяженный высокометилированный сайт узнавания.

Был определен статус метилирования регуляторных участков ряда генов-онкосупрессоров методом MteI-ПЦР-анализа в сравнении с ранее предложенным методом BIsI- и G Ial-ПЦР-анализа. Метод MteI-ПЦР-анализа применим для анализа статуса метилирования регуляторных участков генов CEBPD, HS3ST2, RASSF1A, SEPT9b и TWIST1.

Показана эффективность real-time MteI-ПЦР-анализа при определении и дискриминации статуса метилирования регуляторного участка гена RASSF1A.

Авторы выражают благодарность Чернухину В.А. и Гончару Д.А. за консультации и помощь.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по государственному контракту № 14.512.11.0080 от 20.06.2013 г., заключенному в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы».

Литература

1. Акишев А.Г., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Эпигенетическое типирование малигнанных клеточных линий человека с помощью BIsI- и G Ial-ПЦР-анализа // Вестник биотехнологии и физико-химической

- биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2011. — Т. 7. — № 3. — С. 5–16.
2. Гончар Д.А., Акишев А.Г., Дегтярев С.Х. *BlsI*- и *GlaI*-ПЦР-анализ — новый метод исследования метилированных участков ДНК // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2010. — Т. 6. — № 1. — С. 5–12.
 3. Чернухин В.А., Гончар Д.А., Килева Е.В., Соколова В.А., Голикова Л.Н., Дедков В.С., Михненко Н.А., Дегтярев С.Х. Новая метилзависимая сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза *MteI* расщепляет девятинуклеотидную последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)NG(5mC)GC-3' / 3'-CG(5mC)GN(5mC)G(5mC)G-5' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2012. — Т. 8. — № 1. — С. 16–26.
 4. Чернухин В.А., Килева Е.В., Томилова Ю.Э., Болтенгаген А.А., Дедков В.С., Михненко Н.А., Гончар Д.А., Голикова Л.Н., Дегтярев С.Х. Новая метил-зависимая сайт-специфическая эндонуклеаза *KroI* узнает и расщепляет последовательность ДНК 5'-G[^]C(5mC)GGC-3' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2011. — Т. 7. — № 1. — С. 14–20.
 5. Чернухин В.А., Наякина Т.Н., Абдурашитов М.А., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Михненко Н.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции *GlaI* узнает метилированную последовательность 5'-G(m5C)[^]GC-3' // Биотехнология. — 2006. — № 4. — С. 23–28.
 6. Чернухин В.А., Наякина Т.Н., Гончар Д.А., Томилова Ю.Э., Тарасова М.В., Михненко Н.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Новая сайт-специфическая метилзависимая ДНК-эндонуклеаза *PkrI* узнает и расщепляет метилированную последовательность ДНК 5'-GCN[^]GC-3' / 3'-CG[^]NCG-5', содержащую не менее трех 5-метилцитозинов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2011. — Т. 7. — № 3. — С. 35–41.
 7. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э., Чмуз Е.В., Соколова О.О., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Сайт-специфическая эндонуклеаза *BlsI* 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.
 8. Чернухин В.А., Чмуз Е.В., Томилова Ю.Э., Наякина Т.Н., Гончар Д.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Новая сайт-специфическая эндонуклеаза *GluI* узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)NG(5mC)-3' / 3'-(5mC)GN(5mC)G-5' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 2. — С. 13–17.
 9. Чмуз Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции *BlsI* из *Bacillus subtilis* T30 узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(m5C)[^]NGC-3' // Биотехнология. — 2005. — № 3. — С. 22–26.
 10. Abdurashitov M.A., Chernukhin V.A., Gonchar D.A., Degtyarev S.Kh. *GlaI* digestion of mouse γ -satellite DNA: study of primary structure and ACGT sites methylation // BMC Genomics. — 2009. — Vol. 10. — P. 322.
 11. Blackledge N.P., Klose R.J. CpG island chromatin: A platform for gene regulation // Epigenetics. — 2011. — Vol. 6. — No. 2. — P. 147–152.
 12. Cohen-Karni D., Xu D., Apone L., Fomenkov A., Sun Z.Y., Davis P.J., Kinney S.R.M., Yamada-Mabuchi M., Xu S.Y., Davis T., Pradhan S., Roberts R.J., Zheng Y. The *MspJI* family of modification-dependent restriction endonucleases for epigenetic studies // Proc. Natl. Acad. Sci. — 2011. — Vol. 108. — P. 11040–11045.
 13. Deaton A.M., Bird A. CpG islands and the regulation of transcription // Genes Dev. — 2011. — Vol. 25. — No. 10. — P. 1010–1022.
 14. Handa V., Jeltsch A. Profound sequence preference of Dnmt3a and Dnmt3b mammalian DNA methyltransferases shape the human epigenome. // J. Mol. Biol. — 2005. — Vol. 348 — P. 1103–1112.
 15. Illingworth R.S., Bird A.P. CpG islands — «A rough guide» // FEBS Lett. — 2009. — Vol. 583. — No. 11. — P. 1713–1720.
 16. Jain S., Wojdacz T.K., Su Y.H. Challenges for the application of DNA methylation biomarkers in molecular diagnostic testing for cancer // Expert Rev. Mol. Diagn. — 2013. — Vol. 13. — No. 3. — P. 283–294.
 17. Mikeska T., Bock C., Do H., Dobrovic A. DNA methylation biomarkers in cancer: progress towards clinical implementation // Expert Rev. Mol. Diagn. — 2012. — Vol. 12. — No. 5. — P. 473–487.
 18. Rand K.N., Young G.P., Ho T., Molloy P.L. Sensitive and selective amplification of methylated DNA sequences using helper-dependent chain reaction in combination with a methylation-dependent restriction enzymes // Nucleic Acids Res. — 2013. — Vol. 41(1). — e15.
 19. Sproul D., Meehan R.R. Genomic insights into cancer-associated aberrant CpG island hypermethylation // Brief. Funct. Genomics. — 2013. — Vol. 12. — No. 3. — P. 174–190.
 20. Zheng Y., Cohen-Karni D., Xu D., Chin H.G., Wilson G., Pradhan S., Roberts R.J. A unique family of *Mrr*-like modification-dependent restriction endonucleases // Nucleic Acids Res. — 2010. — Vol. 38. — P. 5527–5534.

MTEI-PCR ASSAY – A NEW METHOD OF METHYLATION STATUS DETERMINATION FOR GC-RICH REGULATORY REGIONS OF HUMAN TUMOR SUPPRESSOR GENES

M.A. ABDURASHITOV, A.N. KUKSOVA, A.G. AKISHEV,
E.V. ZEMLYANSKAYA, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd, Novosibirsk

A novel method of MteI-PCR analysis of GC-rich DNA regions has been proposed based on the unique methyl-dependent site-specific DNA endonuclease MteI, which recognizes a long highly methylated site. The method includes DNA hydrolysis with MteI followed by real-time PCR or PCR with electrophoretic determination of the obtained products. Methylation status of regulatory regions of a number of tumor suppressor genes has been determined by this method in comparison with the similar data obtained by previously proposed method of BlnI- and GluI-PCR analysis. An applicability of MteI-PCR analysis has been shown by analysis of methylation status of CEBPD, HS3ST2, RASSF1A, SEPT9b and TWIST1 genes regulatory regions. In case of RASSF1A regulatory region, real-time MteI-PCR analysis in contrast to BlnI- and GluI-PCR analysis, does not show methylation of this DNA region in a control healthy lung fibroblast cell line. Thus, MteI-PCR analysis allows to perform more distinct determination and discrimination of RASSF1A regulatory region methylation and, probably, some other GC-rich regions of human DNA as well.

Keywords: methyl-dependent site-specific endonucleases, DNA methylation, polymerase chain reaction.