

САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА BslI УЗНАЕТ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК 5'-G(5mC)N↓GC-3' И РАСЩЕПЛЯЕТ ЕЕ С ОБРАЗОВАНИЕМ 3'-ВЫСТУПАЮЩИХ КОНЦОВ

В.А. ЧЕРНУХИН*, Ю.Э. ТОМИЛОВА, Е.В. ЧМУЖ, О.О. СОКОЛОВА,
В.С. ДЕДКОВ, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Из природных изолятов выделен бактериальный штамм *Bacillus simplex* 23, продуцент сайт-специфической эндонуклеазы BslI. Этот фермент узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)N↓GC-3', как и обнаруженная ранее сайт-специфическая эндонуклеаза BsiI (сайт узнавания 5'-G(5mC)↓NGC-3'), но, в отличие от последней, расщепляет ДНК с образованием однонуклеотидных 3'-выступающих концов. Благодаря своей способности расщеплять только метилированную ДНК фермент BslI может найти практическое применение в генно-инженерных работах, а также для определения статуса метилирования ДНК эукариот.

Ключевые слова: метил-зависимые сайт-специфические ДНК эндонуклеазы, метилирование ДНК.

В настоящее время известны и достаточно изучены только три сайт-специфические эндонуклеазы, которые узнают и расщепляют исключительно метилированную ДНК, не требуют кофакторов помимо ионов Mg^{2+} и, вследствие этого, могут рассматриваться как метил-зависимые сайт-специфические эндонуклеазы IIМ типа [1].

Это — эндонуклеаза рестрикции DpnI и ее изоэизомеры, которые узнают и расщепляют последовательность нуклеотидов 5'-G(6mA)↓TC-3' [2], и описанные в наших исследованиях сайт-специфические эндонуклеазы BsiI и GlaI, узнающие и расщепляющие нуклеотидные последовательности ДНК 5'-G(5mC)↓NGC-3' [3] и 5'-G(5mC)↓G(5mC)-3' [4, 5], соответственно.

В данной работе описан новый представитель этой группы, фермент BslI, неоэизомер обнаруженной недавно эндонуклеазы BsiI [3]. Фермент узнает нуклеотидную последовательность 5'-G(5mC)N↓GC-3' и расщепляет ее как указано стрелкой с образованием однонуклеотидных 3'-выступающих концов.

Материалы и методы

Выращивание штамма-продуцента. Бактериальный штамм *Bacillus simplex* 23 выделен из почвы в результате направленного систематического поиска штаммов-продуцентов сайт-специфических эндонуклеаз, как описано ранее [6]. Культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства штамма изучали с использованием методик [7]. Штамм идентифицировали по определителю [8], а также с помощью анализа первичной последовательности фрагмента 16S рибосомной РНК [9].

Выращивание штамма проводили в ферментере при температуре 30 °С в 20 л питательной среды, содержащей 1% триптона (Organotechnie, Франция), 0,5% дрожжевого экстракта (Organotechnie, Франция), 0,5% NaCl и 0,05% $MgCl_2$, при pH 7,5 с аэрацией 10 л/мин. и перемешиванием 200 об/мин. При достижении культурой поздней логарифмической стадии роста клетки осаждали с помощью центрифугирования при 5000 об/мин. при 4 °С. В результате получили 100 г биомассы, которую хранили при -20 °С.

Выделение фермента. Все процедуры выделения фермента проводили при температуре 4 °С. 40 г сырой биомассы суспендировали в 100 мл буфера А (10 мМ Трис-НСl, pH 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанол), содержащего 0,2 М KCl, 0,3 мг/мл лизоцима и 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF). Клетки

* Автор для переписки:

© 2007 г. Чернухин Валерий Алексеевич

НПО «СибЭнзим»

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

Тел./факс: 8-383-333-49-91

E-mail: valera@sibenzyme.ru

разрушали ультразвуком на дезинтеграторе Soniprep 150 («MSE», Англия) 10 раз по 1 мин. с интервалами по 1 мин. для охлаждения суспензии. Разрушенные клетки осветляли центрифугированием в течение 30 мин. при 12000 об/мин. Препарат фермента получали путем хроматографической очистки супернатанта в три стадии на следующих сорбентах: 30 мл фосфоцеллюлозы P-11 («Whatman», Англия), 5 мл гидроксипатита («Bio-Rad», США), 7 мл гепарин-сефарозы («Bio-Rad», США).

Супернатант пропускали через колонку с фосфоцеллюлозой P-11, предварительно уравновешенную буфером А, содержащим 0,2 М КСl. Колонку промывали 60 мл буфера А с 0,2 М КСl, затем линейным градиентом концентрации КСl (0,2 М — 1,5 М) в буфере А. Фракции, содержащие эндонуклеазу, объединяли и наносили на колонку с гидроксипатитом, предварительно уравновешенную буфером В (10 мМ KH_2PO_4 , рН 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β -меркаптоэтанол, 0,2 М КСl). Колонку промывали 10 мл буфера В, затем проводили элюцию белка линейным градиентом концентрации KH_2PO_4 (0,01 М — 0,5 М) в буфере В. Активные фракции объединяли, диализовали против 20 объемов буфера А и наносили на колонку с гепарин-сефарозой, уравновешенную буфером А с 0,2 М КСl. Колонку промывали 14 мл буфера А, содержащего 0,2 М КСl. Фермент элюировали линейным градиентом концентрации КСl (0,2 М — 1 М) в буфере А. Активные фракции объединяли и диализовали против концентрирующего буфера (50% глицерин, 10 мМ Tris-HCl, рН 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β -меркаптоэтанол, 0,2 М КСl). Препарат хранили при -20 °С.

Выявление активности фермента. В качестве субстрата для определения активности BslI использовали ДНК плазмиды pFsp4HI1 [9]. Эта плазида содержит ген ДНК-метилтрансферазы Fsp4HI из *Flavobacterium* sp. 4H, которая модифицирует первое цитозиновое основание в последовательности нуклеотидов 5'-GCNGC-3' с образованием 5-метилцитозина. Таким образом, плазида pFsp4HI1 содержит метилированные сайты 5'-G(5mC)NGC-3'.

Как было предварительно установлено, наибольшую активность BslI проявляет в буфере следующего состава: 10 мМ Tris-HCl, рН 8,5, 5 мМ MgCl_2 , 100 мМ NaCl и 1 мМ β -меркаптоэтанол с добавлением БСА (бычий сывороточный альбумин) до конечной концентрации 0,1 мг/мл. Поэтому все эксперименты по расщеплению ДНК ферментом BslI проводили в данном буфере.

Активность сайт-специфической эндонуклеазы BslI в хроматографических профилях определяли, инкубируя аликвоты из фракций с ДНК плазмиды pFsp4HI1. Для этого к 40 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкг ДНК плазмиды pFsp4HI1 в реакционном буфере, добавляли аликвоту 2 мкл из соответствующей фракции хроматографического профиля. Реакционную смесь инкубировали 30 мин. при 30 °С. Продукты реакции разделяли в 1% агарозном геле.

За единицу активности (ед) принимали минимальное количество фермента, необходимое для полного расщепления 1 мкг ДНК плазмиды pFsp4HI1 в течение 1 часа при температуре 30 °С в 20 мкл реакционной смеси.

Определение сайта узнавания и позиций гидролиза ДНК. Специфичность фермента BslI определяли по картинам специфического расщепления различных ДНК. В качестве субстратов для выявления специфичности расщепления использовали различные ДНК плазмид и фагов, а также синтетические олигонуклеотидные ДНК-дуплексы, содержащие или не содержащие метилированные основания. Сайт узнавания сайт-специфической эндонуклеазы BslI установили путем сравнения картины гидролиза ДНК плазмиды pFsp4HI1 ферментами BslI и BsiI. Расщепление ДНК проводили в оптимальных условиях (30 °С, реакционный буфер — 10 мМ TrisHCl, рН 8,5, 5 мМ MgCl_2 , 100 мМ NaCl, 1 мМ β -меркаптоэтанол, 0,1 мг/мл БСА) в течение 1 часа. Продукты расщепления плазмидной ДНК разделяли гель-электрофорезом в 1,5% агарозе. Определенный таким образом сайт узнавания был подтвержден в экспериментах по расщеплению синтетических олигонуклеотидных дуплексов.

Позиции гидролиза ДНК сайт-специфической эндонуклеазой BslI были установлены путем сравнения длин фрагментов, образующихся при расщеплении [^{32}P]-меченного синтетического олигонуклеотидного дуплекса, содержащего сайт узнавания, эндонуклеазами BslI и BsiI. В качестве маркера длин фрагментов использовали продукты частичного расщепления этого же дуплекса экзонуклеазой III из *E. coli* (ExoIII). Для разделения продуктов гидролиза применяли электрофорез в 20% ПААГ с 7 М мочевиной в трис-боратном буфере.

Результаты и обсуждение

Бактериальный штамм-продуцент фермента BslI был выделен из образца почвы. Штамм имеет следующие характеристики. На среде Лурia — Бертрани штамм образует гладкие, выпуклые, непрозрачные колонии размером 4 мм. Колонии белого цвета. Клетки палочко-

видные, размером $1 \times (3-5)$ мкм, одиночные, в парах или в коротких цепочках. Образуют эллиптические центрально расположенные споры, не раздувающие спорангий. Грамположительны. Не способны к анаэробному росту, каталазоположительны, оксидазоотрицательны. Растут при температуре $10-40^\circ\text{C}$. На основании анализа морфологических и биохимических свойств, а также с помощью анализа первичной последовательности фрагмента 16S рибосомной РНК, штамм идентифицировали как вид бактерии *Bacillus simplex* 23, а продуцируемую им сайт-специфическую эндонуклеазу назвали BslI.

Фермент выделяли из клеточного экстракта путем последовательных хроматографических процедур, как описано в «Материалы и методы». Выход фермента — 200 ед/г сырой биомассы, удельная активность — 1000 ед/мл.

Эндонуклеаза BslI не гидролизует стандартные вирусные и плазмидные ДНК, используемые для нахождения и определения активности эндонуклеаз рестрикции, такие как ДНК фагов λ и T7, аденовируса-2, плазмид рUC19 и рBR322. В экспериментах по расщеплению ДНК были протестированы также плазмиды, содержащие гены некоторых бактериальных метилаз, модифицирующих цитозиновые основания в ДНК: M.Fsp4HI метилирует ДНК с образованием последовательности 5'-G(5mC)NGC-3' [10], M.HspAI модифицирует ДНК с образованием последовательности 5'-G(5mC)GC-3' [5], M.FauIA и M.FauIB метилируют ДНК с образованием последовательностей 5'-C(5mC)CGC-3' и 5'-G(5mC)GGG-3', соответственно [11].

Результаты показали, что фермент BslI специфически расщепляет только ДНК плазмиды рFsp4HI1, которая метилирована по сайтам 5'-GCNGC-3', благодаря содержащемуся в ней гену метилазы Fsp4HI, тогда как в случае остальных плазмид гидролиз ДНК не происходит. Следовательно, полученные данные указывают на то, что фермент BslI обладает специфичностью к определенной последовательности ДНК, содержащей 5-метилцитозиновые основания.

На рисунке 1 представлены результаты расщепления ДНК плазмид рUC19 и рFsp4HI1 сайт-специфической эндонуклеазой BslI. Исходная плаزمида рUC19 не содержит метилированных цитозиновых оснований в последовательности 5'-GCNGC-3' и, как видно из электрофореграммы, она не расщепляется эндонуклеазой BslI. Плазмида рFsp4HI1 включает в себя ген ДНК-метилтрансферазы M.Fsp4HI, которая метилирует первое цитозиновое основание в последовательности 5'-GCNGC-3'. Эта плазмида содержит только метилированные последовательности 5'-G(5mC)NGC-3' и,

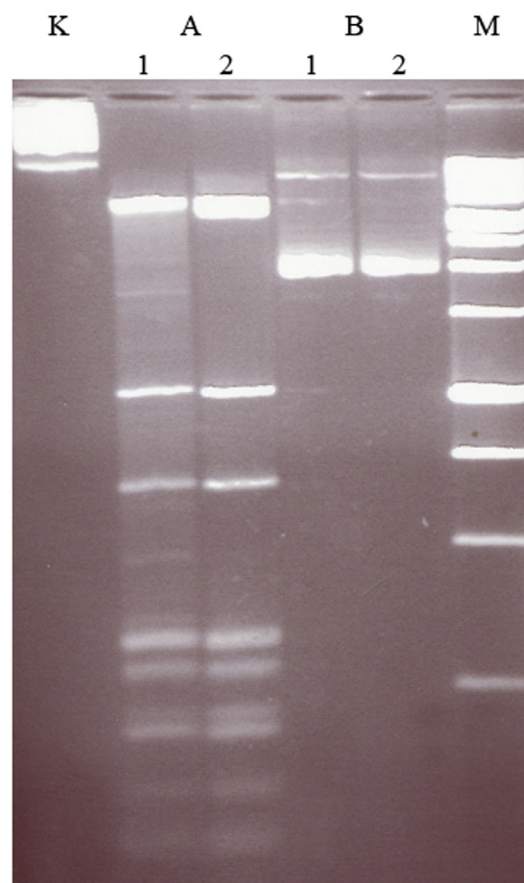


Рис. 1. Расщепление ДНК плазмид рFsp4HI1 (А) и рUC19 (В) эндонуклеазами BslI (дорожка 1) и BslI (дорожка 2). Электрофорез в 1,5% агарозном геле. К — ДНК рFsp4HI1, М — маркер молекулярной массы 1 Kb (НПО «СибЭнзим») со следующими длинами фрагментов ДНК (т.п.н.): 10; 8; 6; 5; 4; 3х2; 2,5; 2; 1,5; 1х3; 0,75; 0,5х2; 0,25

как видно из рисунка, расщепляется ферментом BslI, а образовавшиеся в результате гидролиза фрагменты ДНК идентичны фрагментам, получаемым при расщеплении той же плазмиды ферментом BslI. Полученные данные доказывают, что сайт-специфическая эндонуклеаза BslI расщепляет только метилированную ДНК, причем узнаваемая последовательность нуклеотидов совпадает с таковой для фермента BslI. Таким образом, сайтом узнавания сайт-специфической эндонуклеазы BslI является метилированная последовательность 5'-G(5mC)NGC-3'.

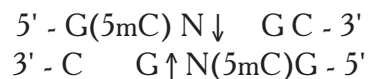
Для подтверждения этих данных и определения места гидролиза ДНК были проведены эксперименты по расщеплению синтетических олигонуклеотидных дуплексов, содержащих метилированный или неметилированный сайт узнавания (последовательность 5'-GCNGC-3' подчеркнута):

NN01: 5' GCTTGTACTTTAGGCGGCATTGATTCTCACCACG 3'
 NN02: 5' CGTGGTGAGAATCAATGCCGCTAAAGTACAAGC 3'
 NN1: 5' GCTTGTACTTTAG(5mC)GGCATTGATTCTCACCACG 3'
 NN2: 5' CGTGGTGAGAATCAATG(5mC)CGCTAAAGTACAAGC 3'

Как видно из рисунка 2, эндонуклеаза BslI расщепляет дуплекс NN1*/NN2, содержащий метилированную последовательность 5'-GCNGC-3', но не расщепляет дуплекс NN01*/NN02, который содержит такую же неметилированную последовательность. Таким образом, BslI действительно расщепляет лишь метилированные нуклеотидные последовательности 5'-G(5mC)NGC-3'.

Определение места расщепления ДНК сайт-специфической эндонуклеазой BslI осуществляли путем сравнения длин фрагментов, образующихся при расщеплении олигонуклеотидного дуплекса NN1/NN2 эндонуклеазами BslI и BisI (рис. 3). Из рисунка 3 видно, что длины продуктов расщепления ДНК этими ферментами различаются на 1 нуклеотид, причем при расщеплении ДНК эндонуклеазой BslI образуется более длинный 5'-меченый олигонуклеотидный фрагмент, что свидетельствует о смещении места расщепления ДНК эндонуклеазой BslI на 1 нуклеотид в сторону 3'-конца относительно места расщепления ДНК эндонуклеазой

BisI. Таким образом, BslI расщепляет последовательность узнавания, как показано стрелками:



Результаты работы по изучению способности BslI расщеплять сайт узнавания с различным распределением метилированных цитозиновых оснований будут приведены отдельно.

Таким образом, в настоящей работе охарактеризована сайт-специфическая эндонуклеаза BslI, являющаяся неоизомером фермента BisI. Фермент BslI относится к редкой группе сайт-специфических эндонуклеаз, которые узнают и расщепляют только метилированную ДНК. Эндонуклеазы BisI и BslI узнают нуклеотидную последовательность 5'-G(5mC)NGC-3', но BslI, в отличие от BisI [3], расщепляет ее с образованием однонуклеотидных 3'-выступающих концов. Следует отметить, что BslI — это первый обнаруженный представитель данной группы ферментов, расщепляющий ДНК с образованием 3'-выступающих концов.

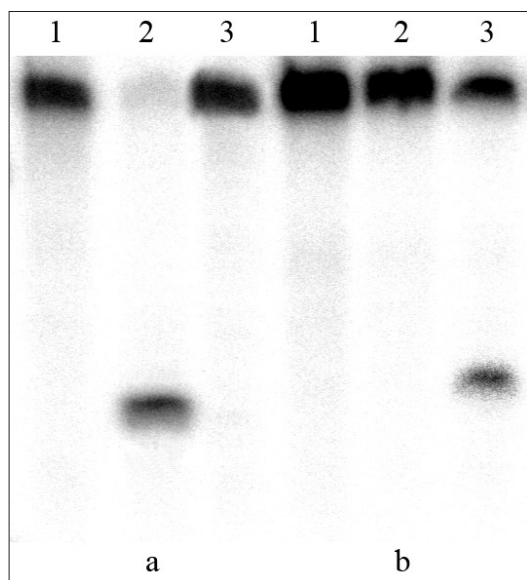


Рис. 2. Расщепление олигонуклеотидных дуплексов NN01*/NN02 (a) и NN1*/NN2 (b) эндонуклеазами Fsp4HI (сайт узнавания 5'-GCNGC-3') (дорожка 2) и BslI (дорожка 3). Дорожка 1 — контроль. Меченые олигонуклеотиды отмечены знаком «*»

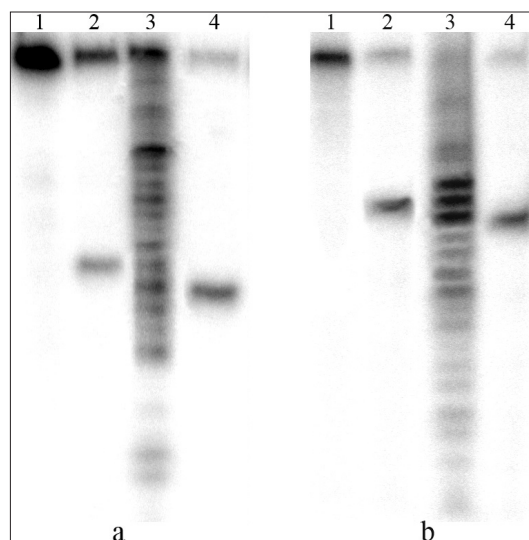


Рис. 3. Расщепление олигонуклеотидных дуплексов NN1*/NN2 (a) и NN2*/NN1 (b) экзонуклеазой III из E. Coli (дорожка 3) эндонуклеазами BslI (дорожка 2) и BisI (дорожка 4). Дорожка 1 — контроль. Меченые олигонуклеотиды отмечены знаком «*»

Так как оба фермента *BisI* и *BlsI* обнаружены в бактериальных штаммах, относящихся роду *Bacillus*, можно предположить, что их существование в клетках этого рода микроорганизмов играет какую-то особую роль, характерную для клеток *Bacillus*.

Наиболее вероятным представляется высказанное нами ранее предположение, что эти ферменты обеспечивают защиту бактерий от заражения фагами, содержащими метилированную ДНК [3].

Известно, что ряд бактериофагов, размножающихся именно на бактериальных клетках рода *Bacillus*, содержит гены сайт-специфических ДНК-метилтрансфераз, что приводит к метилированию ДНК фагов по ряду нуклеотидных последовательностей, в том числе и по сайту 5'-GCNGC-3' [12].

В этом случае роль ферментов *BisI* и *BlsI* может заключаться в расщеплении проникающей в клетку метилированной ДНК бактериофагов и предотвращении, таким способом, заражения клетки вирусом.

Мы полагаем, что *BisI* и *BlsI* могут найти применение для выявления и анализа метилированных участков ДНК эукариот, которые обычно содержат значительную долю 5-метилцитозиновых оснований. Как известно, метилирование ДНК играет значительную роль в регуляции клеточных процессов, но до сих пор остается недостаточно изученным [13].

Патент по данной работе находится в стадии оформления.

Литература

1. Roberts R.J., Belfor M., Bestor T., Bhagwat A.S., Bickle T.A. et al. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes // *Nucleic Acids Res.* — 2003. — Vol. 31. — P. 1805–1812.
2. Lacks S., and Greenberg B.J. A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA // *Biol. Chem.* — 1975. — Vol. 250. — P. 4060–4066.
3. Чмуж 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 *BisI* из *Bacillus subtilis* T30 узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(m5C)^NGC-3' // *Биотехнология.* — 2005. — № 3. — С. 22–26.
4. Чернухин В.А., Наякшина Т.Н., Абдурашитов М.А., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Михненко Н.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции *GlaI* узнает метилированную последовательность 5'-G(m5C)^GC-3' // *Биотехнология.* — 2006. — № 4. — С. 23–28.
5. Томилова Ю.Э., Чернухин В.А., Дегтярев С.Х. Зависимость активности сайт-специфической эндонуклеазы *GlaI* от количества и положения последовательности 5'-GCCGC-3' // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова.* — 2006. — Т. 2. — № 1. — С. 30–39.
6. Белафин П.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Метод определения эндонуклеаз рестрикции в колониях бактерий // *Прикладная биохимия и микробиология.* — 1988. — Т. 24. — № 1. — С. 121–124.
7. *Руководство к практическим занятиям по микробиологии* / Под ред. Н.С. Егорова. — М., 1995.
8. *Определитель бактерий Берджи* / Под ред. Хоулта Дж. и др.: 9-е изд. в 2-х томах: Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина. — М., 1997.
9. Madden T.L., Tatusov R.L., Zhang J. Applications of network BLAST server // *Meth. Enzymol.* — 1996. — Vol. 266. — P. 131–141.
10. Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Чернухин В.А., Охупкина С.С., Гончар Д.А., Дедков В.С., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Клонирование генов, сравнительный анализ структуры белков системы рестрикции-модификации *Fsp4HI* и биохимическая характеристика рекомбинантной ДНК-метилтрансферазы *M.Fsp4HI* // *Молекулярная биология.* — 2007. — Т. 41. — № 1. — С. 1–9.
11. Чернухин В.А., Каширина Ю.Г., Суханова К.С., Абдурашитов М.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. ДНК-метилтрансфераза *FauIA*, модифицирующая второй остаток цитозина в непалиндромной последовательности 5'-CCCCG-3' // *Биохимия.* — 2005. — Т. 70. — № 6. — С. 829–837.
12. Lange C., Noyer-Weidner M., Trautner T.A., Weiner M., Zahler S.A. M.H2I, a multispecific 5C-DNA methyltransferase encoded by *Bacillus myoliquefaciens* phage H2 // *Gene.* — 1991. — Vol. 100. — P. 213–218.
13. Costello J.F., and Plass C. Methylation matters // *J. Med. Genet.* — 2001. — Vol. 38. — P. 285–303.

SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE B_lI FROM BACILLUS SIMPLEX 23 RECOGNIZES METHYLATED DNA SEQUENCE 5'-G(M5C)N ↓ GC-3' AND CLEAVES IT PRODUCING 3' ENDS

V.A. CHERNUKHIN*, Yu.E. TOMILOVA, E.V. CHMUZH, O.O. SOKOLOVA,
V.S. DEDKOV, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd., Novosibirsk

A bacterial strain *Bacillus simplex* 23, a producer of a methyl-directed site-specific DNA endonuclease has been discovered. The enzyme, designated as B_lI, recognizes methylated nucleotide sequence 5'-G(m5C)N ↓ GC-3' and cleaves it as shown by arrow, producing 3' ends. B_lI is a neoschizomer of B_{is}I, which recognizes nucleotide sequence 5'-G(m5C) ↓ NGC-3'. B_lI may be used in genetic engineering experiments and in determination of methylation status of eukaryotic DNA.

Keywords: methyl-directed site-specific DNA endonucleases, DNA methylation.