

НОВАЯ 5-МЕТИЛЦИТОЗИН-ЗАВИСИМАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА GluI УЗНАЕТ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК 5'-G(5mC)↓NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN↓(5mC)G-5'

В.А. ЧЕРНУХИН*, Е.В. ЧМУЖ, Ю.Э. ТОМИЛОВА, Т.Н. НАЯКШИНА,
Д.А. ГОНЧАР, В.С. ДЕДКОВ, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Из бактериального штамма *Glacial ice bacterium* GL24 была выделена и охарактеризована новая сайт-специфическая эндонуклеаза GluI. Этот фермент узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)↓NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN↓(5mC)G-5' и расщепляет ее, как указано стрелкой. Благодаря своей способности расщеплять только высокометилованную ДНК фермент GluI может найти практическое применение в генно-инженерных работах, а также для определения статуса метилирования ДНК эукариот.

Ключевые слова: системы рестрикции-модификации, сайт-специфические эндонуклеазы, метилированная ДНК.

В настоящее время известно только четыре сайт-специфические эндонуклеазы, которые узнают и расщепляют исключительно метилированную ДНК, не требуют кофакторов помимо ионов Mg^{2+} и, вследствие этого, могут рассматриваться как ИМ сайт-специфические эндонуклеазы [1]. Это — эндонуклеаза рестрикции DpnI, которая узнает и расщепляет последовательность нуклеотидов 5'-G(6mA)↓TC-3' [2], и описанные в наших работах сайт-специфические эндонуклеазы BisI, GluI и BliI, узнающие и расщепляющие нуклеотидные последовательности ДНК 5'-G(5mC)↓NGC-3' [3], 5'-G(5mC)↓G(5mC)-3'/3'-(5mC)G↓(5mC)G-5' [4, 5] и 5'-G(5mC)N↓GC-3' [6], соответственно.

В данной работе описан новый представитель этой группы, фермент GluI, являющийся изоизомером сайт-специфической эндонуклеазы BisI [3], однако требующий для проявления активности более глубокого метилирования сайта узнавания. Фермент GluI узнает нуклеотидную последовательность ДНК 5'-G(5mC)↓NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN↓(5mC)G-5' и расщепляет ее, как указано стрелкой, с образованием одонуклеотидных 5'-выступающих концов.

Материалы и методы

Выращивание штамма-продуцента. Выращивание штамма *Glacial ice bacterium* GL24 проводили в 20-литровом ферментере (LKB, Швеция) при температуре 30 °С в питательной среде, содержащей 1% триптон (Organotechnie, Франция), 0,5% дрожжевой экстракт (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 на центрифуге J-2-21 (Beckman, США) при 5000 об/мин при 4 °С. В результате получали 100 г биомассы, которую хранили при -20 °С.

Выделение фермента. Все процедуры выделения фермента проводили при температуре 4 °С. 100 г замороженной биомассы клеток суспендировали в 250 мл буфера А (10 mM Трис-НCl, pH 7,4, 0,1 mM ЭДТА, 7 mM β-меркаптоэтанол, 0,01 % Тритон X-100), содержащего 0,05 M NaCl, 0,1 % Тритон X-100, 0,1 мг/мл лизоцима и 1 mM фенилметилсульфонилфторид (PMSF). Клетки разрушали ультразвуком на дезинтеграторе Soniprep 150 («MSE», Великобритания) 10 раз по 1 мин. с интервалами по 1 мин. для охлаждения суспензии. Лизат осветляли центрифугированием в течение 30 мин. при 12000 об/мин. на центрифуге J-2-21 (Beckman, США). Препарат фермента получали путем хроматографической очистки экстракта в четыре последовательные стадии на следующих сорбентах: 100 мл фосфоцеллюлозы P-11

* 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

(«Whatman», Великобритания), 15 мл гидроксиапатита («Bio-Rad», США), 4 мл гепарин-сефарозы («Bio-Rad», США), 10 мл гидроксиапатита («Bio-Rad», США).

Первоначально супернатант наносили на колонку с фосфоцеллюлозой P-11, предварительно уравновешенную буфером А, содержащим 0,05 М NaCl. Колонку промывали 200 мл буфера А с 0,05 М NaCl, затем 1000 мл линейного градиента концентрации NaCl (0,2 М–0,95 М) в буфере А, собирая фракции по 10 мл. Фракции, содержащие эндонуклеазу, объединяли и наносили на колонку с гидроксиапатитом, предварительно уравновешенную буфером В (5 мМ KH_2PO_4 , pH 7,2, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β -меркаптоэтанол, 0,01% Тритон X-100) с 0,02 М NaCl. Колонку промывали 30 мл буфера В, содержащего 0,02 М NaCl, затем проводили элюцию белка линейным градиентом концентрации KH_2PO_4 (0,005 М–0,2 М) в буфере В объемом 400 мл, собирая фракции по 10 мл. Активные фракции объединяли, диализовали против 20 объемов буфера А с 0,02 М NaCl и наносили на колонку с гепарин-сефарозой, уравновешенную буфером А с 0,2 М NaCl. Колонку промывали 8 мл буфера А, содержащего 0,2 М NaCl. Фермент элюировали линейным градиентом концентрации NaCl (0,2 М–0,9 М) в буфере А объемом 120 мл, собирая фракции по 3 мл. Фракции, содержащие целевую активность, объединяли и наносили на колонку с гидроксиапатитом, предварительно уравновешенную буфером В с 0,02 М NaCl. Колонку промывали 20 мл буфера В, содержащего 0,02 М NaCl. Элюцию сорбированного материала проводили линейным градиентом концентрации KH_2PO_4 (0,005 М–0,17 М) в буфере В объемом 320 мл, собирая фракции по 6 мл. Активные фракции объединяли и диализовали против концентрирующего буфера (50% глицерин, 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β -меркаптоэтанол, 0,01 % Тритон X-100, 0,1 М NaCl). Препарат хранили при -20°C .

Определение активности фермента. В качестве субстрата для определения активности GluI использовали ДНК плазмиды pFsp4HI3, которая является производной плазмиды pFsp4HI2 [7]. Последняя содержит ген ДНК-метилтрансферазы Fsp4HI из *Flavobacterium* sp. 4H, которая модифицирует первое цитозиновое основание в последовательности нуклеотидов 5'-GCNGC-3' [7]. Таким образом, плазида pFsp4HI2 содержит метилированные сайты 5'-G(5mC)NGC-3'. Плазида pFsp4HI3 была получена в результате встраивания в плазмиду pFsp4HI2 по сайтам HindIII и Bsp19I следующего синтетического олигонуклеотидного дуплекса:

5' CATGGGCCGCGGCAGCTCGAATTCTAGA 3'
3' CCGGCGCCGTCGAGCTTAAGATCTTCTGA 5'.

Полученная плазида pFsp4HI3 отличается от pFsp4HI2 четырехнуклеотидной заменой (в структуре дуплекса соответствующие нуклеотиды выделены жирным шрифтом), в результате которой образуется последовательность нуклеотидов 5'-GCCGCGGCAGC-3' (в структуре дуплекса эта последовательность подчеркнута), представляющая собой три перекрывающихся сайта 5'-GCNGC-3'. Поскольку плазида включает в себя ген ДНК-метилтрансферазы M.Fsp4HI, модифицирующей все эти три сайта, то в итоге в плазмиде появляется нуклеотидная последовательность 5'-G(5mC)GG(5mC)-3'/3'-(5mC)GC(5mC)G-5', содержащая 4 метилированных цитозиновых остатка и представляющая собой полностью метилированный сайт узнавания.

Как было предварительно установлено, наибольшую активность GluI проявляет в буфере следующего состава: 10 мМ Tris-HCl, pH 9,0, 7,5 мМ MgCl_2 , 75 мМ NaCl, 1 мМ β -меркаптоэтанол. Поэтому все эксперименты по расщеплению ДНК ферментом GluI проводили в данном буфере.

Активность сайт-специфической эндонуклеазы GluI в хроматографических профилях определяли, инкубируя аликвоты из фракций с ДНК плазмиды pFsp4HI3, линеаризованной рестриктазой BglII. Для этого к 10 мкл реакционной смеси, содержащей линеаризованную ДНК плазмиды в реакционном буфере, добавляли аликвоту 2 мкл из соответствующей фракции хроматографического профиля. Реакционную смесь инкубировали 30 мин. при 37°C . Продукты реакции разделяли в 1%-ном агарозном геле.

За единицу активности (е.а.) принимали минимальное количество фермента, необходимое для полного расщепления 1 мкг ДНК плазмиды pFsp4HI3, гидролизованной эндонуклеазой рестрикции BglII, в течение 1 часа при температуре 37°C в 50 мкл реакционной смеси.

Определение сайта узнавания и места расщепления ДНК. Для определения специфичности GluI проводили гидролиз различных ДНК. В качестве субстратов для определения специфичности фермента использовали ДНК плазмид и фагов, а также синтетические олигонуклеотидные ДНК-дуплексы, содержащие или не содержащие метилированные основания.

Позиции гидролиза ДНК сайт-специфической эндонуклеазой GluI были установлены путем сравнения длин фрагментов, образующихся при расщеплении [^{32}P]-меченных синтетических олигонуклеотидных дуплексов эндонуклеазами GluI и BspI. В качестве маркера длин

фрагментов использовали продукты частичного расщепления этих же дуплексов экзонуклеазой III из *E. coli* (ExoIII).

Расщепление ДНК проводили в оптимальных условиях (37 °С, реакционный буфер — 10 мМ TrisHCl, pH 9,0, 7,5 мМ MgCl₂, 75 мМ NaCl, 1 мМ β-меркаптоэтанол) в течение 1 часа. Продукты расщепления плазмидной и фаговой ДНК разделяли гель-электрофорезом в 1,2% агарозе. Фрагменты ДНК, образующиеся в результате расщепления олигонуклеотидных дуплексов, разделяли путем электрофореза в денатурирующем 20% полиакриламидном геле (ПААГ) с 7 М мочевиной.

Результаты и обсуждение

Новый фермент GluI был выделен из неидентифицированного штамма бактерии *Glacial ice bacterium* GL24 из коллекции микроорганизмов НПО «СибЭнзим». Этот штамм характеризуется следующими признаками.

Клетки представляют собой грамположительные аэробные нерегулярные, мелкие палочки, размером 0,5–(1–1,5) мкм, одиночные и образующие палисадные скопления, неподвижные, не образующие спор. На среде Лурия — Бертрани (ЛБ) штамм образует светло-коричневые, полупрозрачные небольшие (1–2 мм), округлые с ровными краями колонии. Температура роста — от 10 до 30 °С. Клетки продуцируют каталазу. Оксидоза не обнаружена.

Сайт-специфическую эндонуклеазу GluI, продуцируемую штаммом *Glacial ice bacterium* GL24, выделяли из клеточного экстракта путем последовательных хроматографий на сорбентах, как описано в разделе «Материалы и методы». Выход фермента составил 200 е.а./г сырой биомассы, концентрация — 1000 е.а./мл.

Эндонуклеаза GluI не гидролизует стандартные вирусные и плазмидные ДНК, используемые для нахождения и определения активности эндонуклеаз рестрикции, такие как ДНК фагов λ (dam⁺/dcm⁺ и dam⁻/dcm⁻), 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' [7], 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 [8]. При инкубации плазмид, несущих гены данных метилаз, с препаратом GluI гидролиз ДНК

также не наблюдается. Фермент GluI расщепляет только ДНК плазмиды рFsp4HI3, полученной, как указано в разделе «Материалы и методы». Эта плазида, благодаря имеющемуся в ней гену метилазы Fsp4HI, содержит метилированные последовательности 5'-G(5mC)NGC-3', а также один полностью метилированный сайт 5'-G(5mC)NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN(5mC)G-5'.

На рисунке 1 представлены результаты гидролиза ДНК плазмид рFsp4HI2 и рFsp4HI3, линейаризованных различными эндонуклеазами рестрикции и сайт-специфической эндонуклеазой GluI. Как видно из рисунка, плазида рFsp4HI2 полностью расщепляется ферментом BisI, для которого последовательность 5'-G(5mC)NGC-3' является каноническим сайтом узнавания [3]. Фермент GluI не расщепляет плазмиду рFsp4HI2, однако он гидролизует ДНК плазмиды рFsp4HI3. Для определения места расщепления ДНК проводили совместный гидролиз ДНК плазмиды рFsp4HI3 сайт-специфической эндонуклеазой GluI и рестриктазами PciI, DseDI и BglII.

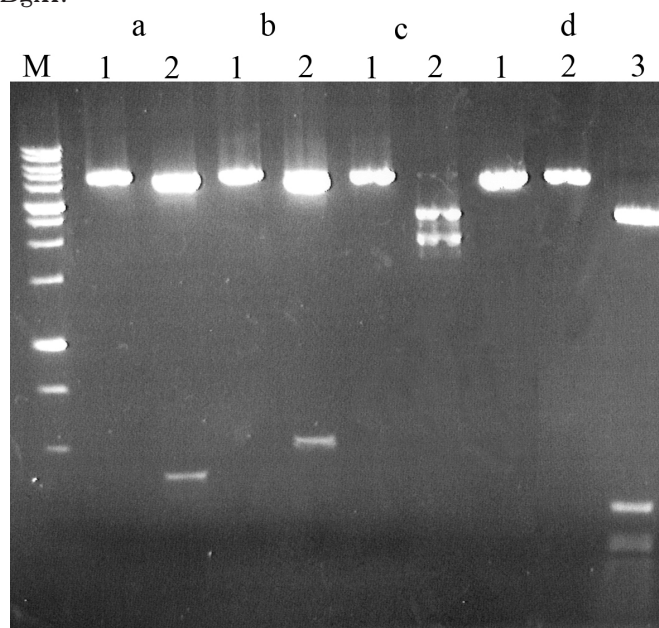


Рис. 1. Расщепление плазмидных ДНК эндонуклеазами GluI (дорожка 2) и BisI (дорожка 3).

a — плазида рFsp4HI3, линейаризованная PciI, b — плазида рFsp4HI3, линейаризованная DseDI, c — плазида рFsp4HI3, линейаризованная BglII, d — плазида рFsp4HI2, линейаризованная BglII, Дорожка 1 — соответствующая плазида без гидролиза.

М — маркер молекулярной массы 1 Кб (СибЭнзим) со следующими длинами фрагментов ДНК (т.п.н.): 10; 8; 6; 5; 4; 3x2; 2,5; 2; 1,5; 1x3; 0,75; 0,5x2; 0,25.

Сравнение длин фрагментов ДНК, получаемых при совместном гидролизе, показывает, что расщепление ДНК эндонуклеазой GluI происходит в сайте 5'-G(5mC)GG(5mC)-3'/3'-(5mC)GC(5mC)G-5'.

Для подтверждения этих данных и определения позиции гидролиза ДНК были проведены

эксперименты по расщеплению синтетических олигонуклеотидных дуплексов, содержащих последовательность 5'-GCNGC-3' с метилированными или неметилированными цитозиновыми основаниями (сайты узнавания подчеркнуты):

NN01: 5' GCTTGTA^{CTTT}AGCGGCATTGATTCTCACCACG 3'
 NN02: 5' CGTGGTGAGAATCAATGCCGCTAAAGTACAAGC 3'
 NN1: 5' GCTTGTA^{CTTT}AG(5mC)GGCATTGATTCTCACCACG 3'
 NN2: 5' CGTGGTGAGAATCAATG(5mC)CGCTAAAGTACAAGC 3'
 DD1: 5' GCTTGTA^{CTTT}AG(5mC)GG(5mC)ATTGATTCTCACCACG 3'
 DD2: 5' CGTGGTGAGAATCAATG(5mC)CG(5mC)TAAAGTACAAGC 3'
 4mT: 5' GGGAAAAG(5mC)TG(5mC)AAAAGAGGAAAGGG 3'
 4mA: 5' CCCTTTCCTCTTTTG(5mC)AG(5mC)TTTTCCC 3'

Как видно из рисунка 2, эндонуклеаза GluI расщепляет дуплексы DD1*/DD2 и 4mT*/4mA, содержащие полностью метилированную последовательность 5'-G(5mC)NG(5mC)-3', но не расщепляет дуплекс NN01*/NN02, который содержит такую же неметилированную последовательность, а также дуплекс NN1*/NN2, который содержит метилированную последовательность 5'-G(5mC)NGC-3'. Полученные данные доказывают, что сайт-специфическая эндонуклеаза GluI расщепляет только метилированную ДНК, причем сайтом узнавания новой сайт-специфической эндонуклеазы GluI является метилированная последовательность 5'-G(5mC)NG(5mC)-3'.

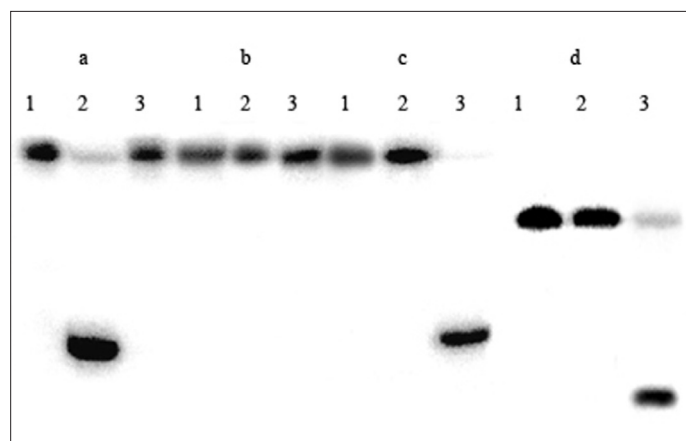


Рис. 2. Расщепление олигонуклеотидных дуплексов NN01*/NN02 (a), NN1*/NN2 (b), DD1*/DD2 (c) и 4mT*/4mA (d) эндонуклеазами Fsp4HI (сайт узнавания 5'-GCNGC-3', дорожка 2) и GluI (дорожка 3). Дорожка 1 — соответствующий дуплекс без гидролиза. Меченые олигонуклеотиды отмечены знаком «*».

На рисунке 3 приведены результаты гидролиза олигонуклеотидного дуплекса DD1/DD2 эндонуклеазами GluI и BisI. Сравнение длин фрагментов, образуемых при расщеплении этого субстрата, указывает на то, что GluI расщепляет метилированный дуплекс с четырьмя C5-метилцитозинами так же, как BisI. Следовательно, GluI расщепляет сайт узнавания, как показано стрелками:

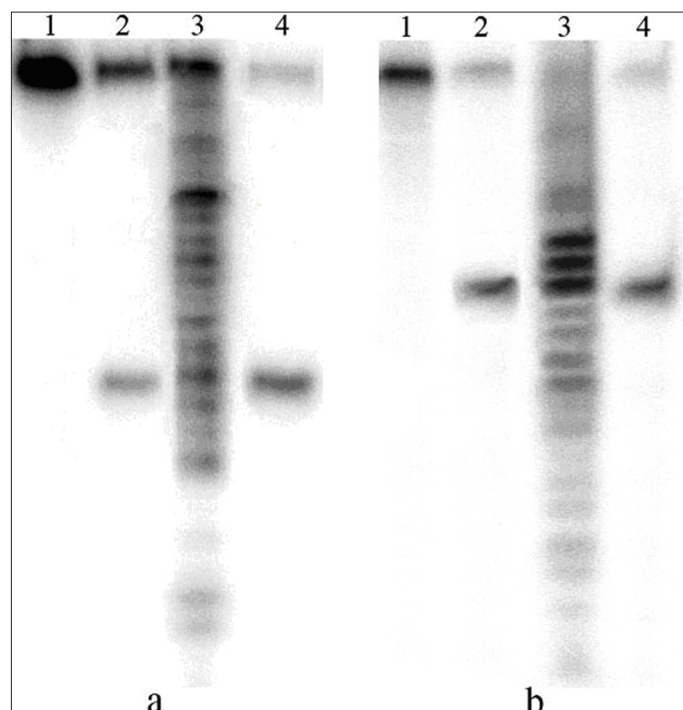


Рис. 3. Определение места расщепления ДНК эндонуклеазой GluI.
 а — дуплекс DD1*/DD2, б — дуплекс DD2*/DD1

Таким образом, в настоящей работе мы описали новую сайт-специфическую эндонуклеазу GluI, принадлежащую к редкой группе ферментов, которые узнают и расщепляют только метилированную ДНК. Нуклеотидная последовательность, узнаваемая новым ферментом, и место гидролиза ДНК совпадают с таковыми для фермента BspI, однако GluI, в отличие от BspI, не активен на субстратах с двумя метильными группами и расщепляет ДНК, содержащую полностью метилированный сайт узнавания. В дальнейшей работе мы планируем более детально исследовать влияние метилирования цитозиновых оснований внутри и вблизи узнаваемой последовательности на эффективность сайт-специфического гидролиза метилированной ДНК.

Гидролиз избыточно метилированной ДНК не является исключительным свойством нового фермента. В частности, ранее было показано, что эндонуклеаза GluI, также являющаяся представителем группы ферментов подтипа IIM, обнаруживает максимальную активность на полностью метилированной узнаваемой последовательности 5'-G(5mC)↓G(5mC)-3'/3'-(5mC)G↓(5mC)G-5' [5].

Ранее обсуждалась возможная роль ферментов, которые узнают и расщепляют только метилированную ДНК, в защите бактерий от заражения фагами, ДНК которых метилирована [4]. В частности, известно, что ряд бактериофагов содержит гены сайт-специфических ДНК-метилтрансфераз, что приводит к метилированию ДНК фагов [9]. Однако наличие такого свойства, как предпочтительное расщепление избыточно метилированной ДНК, свидетельствует в пользу существования каких-то других дополнительных функций данных ферментов в бактериальной клетке.

Мы полагаем, что GluI может 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, которая до сих пор остается недостаточно изученной [10].

Литература

1. Roberts R.J., Belfort M., Bestor, T., Bhagwat A.S., Bickle T.A. et al. // *Nucleic Acids Res.* — 2003. — Vol. 31. — P. 1805–1812.
2. Lacks S. and Greenberg B.J. // *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. // *Биотехнология.* — 2005. — № 3. — С. 22–26.
4. Чернухин В.А., Наякишина Т.Н., Абдурашитов М.А., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Михненко Н.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. // *Биотехнология.* — 2006. — № 4. — С. 23–28.
5. Томилова Ю.Э., Чернухин В.А., Дегтярев С.Х. // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова.* — 2006. — Т. 2. — № 1. — С. 30–39.
6. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э., Чмуж Е.В., Соколова О.О., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. // *Биотехнология (в печати).*
7. 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. // *Молекулярная биология.* — 2007. — Т. 41. — № 1. — С. 1–9.
8. Чернухин В.А., Каширина Ю.Г., Суханова К.С., Абдурашитов М.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. // *Биохимия.* — 2005. — Т. 70. — № 6. — С. 829–837.
9. Lange C., Noyer-Weidner M., Trautner T.A., Weiner M., Zahler S.A. // *Gene.* — 1991. — Vol. 100. — P. 213–218.
10. Costello J.F. and Plass C. // *J. Med. Genet.* — 2001. — Vol. 38. — P. 285–303.

Список сокращений: PMSF — фенилметилсульфонилфторид, БСА — бычий сывороточный альбумин, ExoIII — экзонуклеаза III из *E. coli*, ПААГ — полиакриламидный гель, е.а. — единица активности.

A NOVEL SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE GluI RECOGNIZES METHYLATED DNA SEQUENCE 5'-G(5mC)↓NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN↓(5mC)G

V.A. CHERNUKHIN, E.V. CHMUZH, Yu.E. TOMILOVA, T.N. NAYAKSHINA, D.A. GONCHAR,
V.S. DEDKOV, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme SPA, Novosibirsk

A novel site-specific endonuclease GluI from the bacterial strain GL24 has been isolated and characterized. The enzyme recognizes methylated DNA sequence 5'-G(5mC)N↓G(5mC)-3' and cleaves it as it is shown by arrow. Due to its ability to cleave only modified DNA GluI may be useful for genetic engineering experiments as well as for determination of DNA methylation status in eucariotes.

Keywords: restriction-modification systems, site-specific endonucleases, methylated DNA