



УДК 577.113.(5+4)

## ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ЦИТОЗИНА В ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ CCWGG ДНК

© 1999 г. Т. В. Шевчук, Я. И. Бурьянов<sup>#</sup>Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
Пушино Московской обл.

Поступила в редакцию 13.01.99 г. Принята к печати 11.03.99 г.

Предложен метод определения уровня метилирования внутреннего цитозина в последовательности CCWGG эукариотических ДНК. Метод основан на свойстве ДНК-метилазы *Bst*NI метилировать ДНК, содержащую в участке CCWGG внутренний цитозин как в немодифицированной форме, так и в форме 5-метилцитозина, с образованием соответственно *N*<sup>4</sup>-метил- или *N*<sup>4</sup>,5-диметилцитозина.

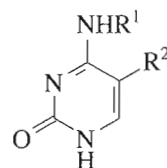
**Ключевые слова:** метилирование ДНК, ДНК-метилтрансферазы, уровень метилирования цитозина; CCWGG; метод.

В геноме высших эукариотических организмов 5-метилцитозин (*m*<sup>5</sup>Cyt) – единственное модифицированное основание, образованное в результате ферментативного метилирования ДНК. У животных и растений метилирование ДНК связано с регуляцией экспрессии генов [1, 2], дифференциацией и развитием [3, 4], инактивацией транспозонных элементов [5] и различными эпигенетическими явлениями [5, 6]. В последние годы развивается идея о защите клетки от экспрессии внутригенных паразитических элементов как об основной функции ферментативного метилирования ДНК [7]. У животных и растений в основном исследовано метилирование суммарной ДНК клетки, а также ее метилирование в индивидуальных генах в последовательности CpG. Однако как у растений, так и у млекопитающих имеет место и CpNpG-тип метилирования ДНК [8–11]. Не исключено, что оба этих типа метилирования ДНК несут различные функции. Растущее внимание к динамике метилирования суммарной ДНК клетки, на фоне которого развиваются такие важные процессы, как канцерогенез [12], ставит вопрос о раздельном анализе каждого из этих типов метилирования.

Мы разработали ферментативный метод определения уровня метилирования цитозина в нуклеотидной последовательности эукариотических ДНК, соответствующей CpNpG-метилированному мотиву. Предлагаемый метод основан на применении ДНК-метилтрансфераз (ДНК-метилаз

*Eco*RII и *Bst*NI (КФ 2.1.1.37). Оба фермента узнают в ДНК одинаковую двуцепочечную палиндромную последовательность GGWCC, где метилируют оба внутренних остатка цитозина, но образуют при этом разные продукты [13, 14]. ДНК-метилаза *Eco*RII метилирует остатки цитозина по C5-положению пиримидинового кольца с образованием 5-метилцитозина (*m*<sup>5</sup>Cyt) (I). ДНК-метилаза *Bst*NI метилирует эти же остатки цитозина по экзоциклической аминогруппе с образованием *N*<sup>4</sup>-метилцитозина (*m*<sup>4</sup>Cyt) (II) или *N*<sup>4</sup>,5-диметилцитозина (*m*<sup>4</sup>,*m*<sup>5</sup>Cyt) (III). Таким образом, разность между числом метильных групп, включенных в анализируемую ДНК ферментами *Bst*NI и *Eco*RII, отражает степень метилирования этой ДНК *in vivo*.

Определение степени метилирования участков CCWGG в исследуемых ДНК проводили двумя способами. В первом варианте использовали пару ДНК-метилаз *Eco*RII и *Bst*NI. Для полного насыщения ДНК метильными группами ферментативную реакцию проводили при избытке фермента и донора метильных групп (20 ед. акт.

(I) *m*<sup>5</sup>Cyt (*R*<sup>1</sup> = H, *R*<sup>2</sup> = CH<sub>3</sub>)(II) *m*<sup>4</sup>Cyt (*R*<sup>1</sup> = CH<sub>3</sub>, *R*<sup>2</sup> = H)(III) *m*<sup>4</sup>,*m*<sup>5</sup>Cyt (*R*<sup>1</sup> = CH<sub>3</sub>, *R*<sup>2</sup> = CH<sub>3</sub>)

Сокращения: W – аденозин или тимидин; N – любой нуклеозид.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 925-23-42; факс: (8-27) 79-05-27; e-mail: buryanov@fibkh.serpukhov.su).

Анализ уровня метилирования цитозина в последовательности CCWGG различных ДНК

ДНК	Уровень метилирования (в процентах)	
	Метилазы <i>EcoRII</i> + <i>BstNI</i> (I способ)	Метилазы <i>BstNI</i> (II способ)
<i>E. coli</i> B834	0*	1.8 ± 0.5
<i>E. coli</i> B834(N3)	97.5 ± 3.2	98.2 ± 2.8
<i>E. coli</i> B834(N3) + <i>E. coli</i> B834 (1 : 1)	49.4 ± 1.8	47.5 ± 1.3
<i>N. tabacum</i> (листья)	64.5 ± 2.7	63.3 ± 1.2

Общее количество ДНК в стандартной ферментативной реакции составляло 0.5 мкг для метилазы *EcoRII* + *BstNI* и 1 мкг для метилазы *BstNI*.

\*Включение метил-<sup>3</sup>H групп в ДНК ферментом *EcoRII* на уровне фона.

ДНК-метилазы на 0.1–1.0 мкг ДНК, 6.6 мкМ S-аденозилметионин). Степень метилирования ДНК *in vivo* определяли по формуле:

$$N_{Me} = \left(1 - \frac{IEcoRII}{IBstNI}\right) \times 100,$$

где  $N_{Me}$  – уровень метилирования ДНК *in vivo* (в процентах),  $IEcoRII$  и  $IBstNI$  – радиоактивность, включенная в ДНК метилазой *EcoRII* и метилазой *BstNI*. Этот способ проверили на модельной ДНК *E. coli* B834(N3), полностью модифицированной *in vivo* ДНК-метилазой *EcoRII*, и ДНК *E. coli* B834, не содержащей остатков 5-метилцитозина, а также на их смеси (см. рис. 1 и 2). Данные анализа этих ДНК, а также их смеси в соотношении 1 : 1, полностью соответствуют ожидаемым результатам (таблица). Измеренный этим способом уровень метилирования участков CCWGG в ДНК листьев табака *Nicotiana tabacum* равен 64%.

Для определения степени метилирования последовательности CCWGG вторым способом проводили количественный анализ продуктов ферментативной модификации ДНК ферментом *BstNI*. Уровень метилирования *in vivo* последовательности CCWGG в исследуемой ДНК определяли по формуле:

$$N_{Me} = \left(\frac{I(m^4, m^5Cyt)}{I(m^4, m^5Cyt) + I(m^4Cyt)}\right) \times 100,$$

где  $N_{Me}$  – уровень метилирования ДНК *in vivo* (в процентах),  $I(m^4Cyt)$  и  $I(m^4, m^5Cyt)$  – радиоактивность (количество)  $N^4$ -метилцитозина и  $N^4,5$ -диметилцитозина. Этот метод проверили на тех же модельных ДНК *E. coli* B834, *E. coli* B834(N3) и эквимольной смеси этих ДНК (таблица). Данные анализа этих ДНК, проведенные двумя способами, хорошо коррелируют друг с другом. Уровень метилирования внутреннего цитозина в последовательности CCWGG ДНК табака *N. tabacum*, определенный с помощью ДНК-метиلاзы *BstNI* равен 63%, что также хорошо соответствует результатам анализа этой ДНК первым способом.

Использование S-аденозил-L-[метил-<sup>3</sup>H]метионина с высокой удельной активностью позволяет брать для анализа в реакцию ферментативного метилирования менее 1 мкг ДНК, что ставит этот метод в ряд современных методов аналитическо-

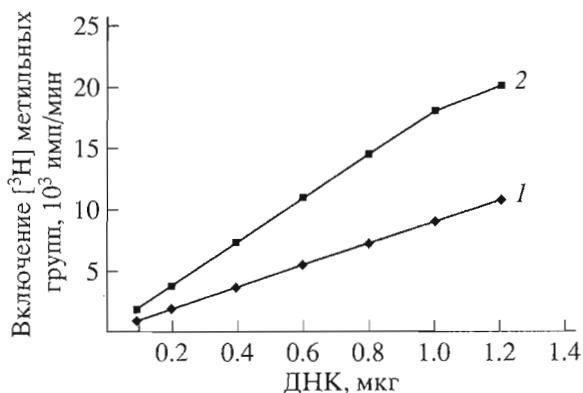


Рис. 1. Включение метильных групп в стандартных условиях реакции в смесь (1 : 1) ДНК *E. coli* B834 и *E. coli* B834(N3) ДНК-метилазой *EcoRII* (1) и в ДНК *E. coli* B834(RII) ДНК-метилазой *BstNI* (2).

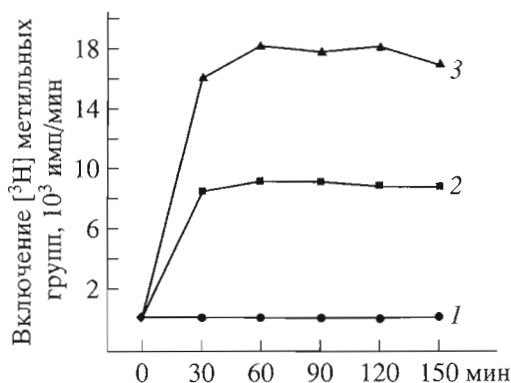


Рис. 2. Включение метильных групп в ДНК *E. coli* B834(N3) ДНК-метилазой *EcoRII* (1), смесь (1 : 1) ДНК *E. coli* B834 и *E. coli* B834(N3) ДНК-метилазой *EcoRII* (2) и ДНК *E. coli* B834(N3) ДНК-метилазой *BstNI* (3). Общее количество ДНК в стандартной ферментативной реакции составляло 1 мкг.

го микроанализа ДНК. Необходимо отметить, что оба способа не требуют информации о точной концентрации исследуемой ДНК, так как они основаны на оценке соотношения включения метильных групп в  $N^4$  и  $C^5$ -положение остатков цитозина, а выбранные условия проведения реакции ферментативного метилирования позволяют проводить насыщающее метилирование переменного количества ДНК (0.1–1.0 мкг).

Наблюдаемые в целом статистические закономерности для частоты встречаемости различных нуклеотидных последовательностей в ДНК позволяют предположить, что разработанный в данной работе метод можно использовать не только для анализа уровня метилирования участков CCWGG, но и всех участков CpNpG в ДНК. Для этой же цели вместо ДНК-метилазы *Bst*NI можно, по-видимому, использовать изометилмерную ДНК-метилазу *Mva*I [18]. Использование для этой цели ДНК-метилазы с менее выраженной специфичностью к центральному нуклеотиду и к нуклеотидам, фланкирующим последовательность CpNpG, позволит более полно проводить анализ степени метилирования ДНК.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Ферменты.** ДНК-метилаза *Eco*RII выделена из *Escherichia coli* B834(N3) согласно [15], а ДНК-метилаза *Bst*NI из *Bacillus stearothermophilus* согласно [14].

**ДНК.** Неметилированная по остаткам цитозина ДНК из *E. coli* B834 и ДНК из *E. coli* B834(N3) (метилированная *in vivo* ДНК-метилазой *Eco*RII) выделены по методу [16]. ДНК из листьев табака *N. tabacum* выделена по методу [17].

**Условия реакции ферментативного метилирования ДНК.** Реакционная смесь (20 мкл) содержала 40 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 2 мМ EDTA, 7 мМ 2-меркаптоэтанол, 6.6 мкМ *S*-аденозил-*L*-[метил- $^3$ H]метионин (уд. акт. 15 Ки/ммоль, Amersham, Англия), от 0.1 до 1.2 мкг ДНК и 20 ед. акт. ДНК-метилазы (1 ед. акт. – количество фермента, катализирующее перенос на ДНК фага  $\lambda$   $dcm^+$  1 пмоля метильных групп за 1 ч при оптимальной температуре). Реакцию проводили в течение 2 ч при 37°C с метилазой *Eco*RII и 55°C с метилазой *Bst*NI. Аликвоту объемом 19 мкл реакционной смеси наносили на DE-81 бумагу (Whatman, Англия) размером 2 × 2 см, промывали последовательно 0.2 М раствором  $NaHCO_3$ ,  $H_2O$ , этанолом и высушивали. Радиоактивность проб определяли на сцинтилляционном спектрометре Beckman LS6800 в стандартном сцинтилляционном растворе PPO-POPOP-толуол. Фон неспецифического связывания радиоактивности бумагой DE-81 составлял менее 0.6% от радиоактивной метки, включенной в ДНК.

**Определение радиоактивности в  $m^4$ Cyt и  $m^4, m^5$ Cyt.** ДНК после реакции ферментативного метилирования осаждали этанолом, промывали дважды этанолом и высушивали. Гидролиз ДНК до азотистых оснований проводили в 57% хлорной кислоте в течение 1 ч при 100°C. К полученному гидролизату добавляли в качестве маркеров по 0.01 мкмоль синтетических  $m^4$ Cyt и  $m^4, m^5$ Cyt. Азотистые основания разделяли хроматографией на пластинках с микрокристаллической целлюлозой (HPTLC cellulose Merck, Германия) размером 10 × 20 см в системе бутанол–вода–аммиак (60 : 10 : 0.1). В этой системе значения  $R_f$  для  $m^4$ Cyt и  $m^4, m^5$ Cyt соответственно равны 0.30 и 0.41. Радиоактивность сорбента из областей, соответствующих положению метилированных азотистых оснований, определяли в стандартном толуольном сцинтилляционном растворе на сцинтилляционном спектрометре Beckman LS6800. Фон неспецифического связывания радиоактивности сорбентом составлял менее 1%. Результаты статистически обрабатывали с помощью программы "Excel".

Авторы выражают глубокую благодарность А. Янулайтису и В. Буткусу (Ферментас, Литва) за любезное предоставление препаратов  $N^4$ -метилцитозина и  $N^4, 5$ -диметилцитозина.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 98-04-48296).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cedar H. // Cell. 1988. V. 53. P. 3–4.
2. Finnegan E.J., Brettell R.J.S., Dennis E. // DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance / Eds J.P. Jost, H.P. Saluz. Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser Verlag, 1993. P. 218–261.
3. Li E., Bestor T.H., Jaenisch R. // Cell. 1992. V. 69. P. 915–926.
4. Richards E.J. // Trends in Genetics. 1997. V. 13. P. 319–323.
5. Fedoroff N.V. // Cell. 1989. V. 56. P. 181–191.
6. Swain J.L., Stewart T.A., Leder P. // Cell. 1987. V. 50. P. 719–727.
7. Yoder J.A., Walsh C.P., Bestor T.H. // Trends in Genetics. 1997. V. 13. P. 335–340.
8. Курнос М.Д., Александрюшкина Н.И., Ванюшин Б.Ф. // Биохимия. 1981. Т. 46. С. 1458–1474.
9. Gruenbaum Y., Naveh-Manly T., Cedar H., Razin A. // Nature. 1981. V. 292. P. 860–862.
10. Woodcock D.M., Crowther P.J., Jefferson S., Diver W.P. // Gene. 1988. V. 74. P. 151–152.
11. Clark S.J., Harrison J., Frommer M. // Nature Genetics. 1995. V. 10. P. 20–28.
12. Gama-Sosa M.A., Slagel V.A., Trewyn R.W., Ehrlich M. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. P. 6883–6894.
13. Buryanov Ya.I., Bogdarina I.G., Bayev A.A. // FEBS Lett. 1978. V. 88. P. 251–254.

14. Барышев М.М., Бурьянов Я.И., Косых В.Г., Бавев А.А. // Биохимия. 1989. Т. 54. С. 1894–1903.
15. Бурьянов Я.И., Нестеренко В.Ф., Косых В.Г., Бавев А.А. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 257. С. 495–497.
16. Marmur J. // J. Mol. Biol. 1961. V. 3. P. 208–218.
17. Lichtenstein C.P., Draper J. // DNA Cloning / Ed. D.M. Glover. Oxford: IRL Press, 1985. V. II. P. 67–119.
18. Butkus V., Klimasauskas S., Kersulyte D., Vaitkevicius D., Lebionka A., Janulaitis A. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. P. 5727–5746.

## DNA Methyl Transferase-based Assay for the Cytosine Methylation Level in the DNA Sequence CCWGG

T. V. Shevchuk and Ya. I. Buryanov<sup>#</sup>

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch,  
Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia*

An assay for the cytosine methylation level in the eukaryotic DNA CCWGG sequence is proposed. The method is based on the ability of DNA methylase *Bst*NI to methylate DNA containing in a CCWGG site a nonmodified or 5-methylated cytosine to yield  $N^4$ -methyl- or  $N^4,5'$ -dimethylcytosine, respectively.

*Key words: CCWGG site, DNA methylation, DNA methyl transferases, cytosine methylation level*

---

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 925-2342; fax: +7 (827) 79-0527;  
e-mail: buryanov@fibkh.serpukhov.su.