

УДК: 577.152.314

## СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ И СВОЙСТВА МЕТИЛЗАВИСИМЫХ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ДНК-ЭНДОНУКЛЕАЗ

© 2013 г. Е. В. Землянская\*, С. Х. Дегтярев

Научно-производственное объединение “СибЭнзим”, Новосибирск, 630117

Поступила в редакцию 13.06.2013 г.

Принята к печати 28.06.2013 г.

Метилзависимые сайт-специфические ДНК-эндонуклеазы (МД-эндонуклеазы) – это немногочисленная группа ферментов, которые специфически расщепляют только метилированную ДНК. Среди них различают N6-метиладенин- и 5-метилцитозинзависимые ферменты. МД-эндонуклеазы изучены мало, но представляют интерес, как для фундаментальных исследований, так и с точки зрения их практического использования в биотехнологии и эпигеномике. В обзоре впервые обобщены данные, касающиеся свойств МД-эндонуклеаз, в особенности субстратной специфичности этих ферментов, а также затрагиваются вопросы участия МД-эндонуклеаз в функционировании бактериальной клетки и возможности практического применения этих ферментов в биотехнологии и эпигеномике.

**Ключевые слова:** метилзависимые сайт-специфические ДНК-эндонуклеазы, метилированная ДНК, эпигенетика.

**SUBSTRATE SPECIFICITY AND PROPERTIES OF METHYL-DIRECTED SITE-SPECIFIC DNA ENDONUCLEASES, by E. V. Zemlyanskaya\*, S. Kh. Degtyarev (SibEmzyme Research and Production Association, Novosibirsk, 630117 Russia; \*e-mail: zemlyanskaya@sibenzyme.ru). Methyl-directed site-specific DNA endonucleases (MD endonucleases) form a small group of enzymes which specifically cleave only methylated DNA. There are N6-methyladenine- and 5-methylcytosine-directed enzymes in this group. In spite of limited information on the MD endonucleases they are considered to be a very interesting subject for both fundamental investigations and practical use in biotechnology and epigenomics. In this review for the first time the data on properties of MD endonucleases are summarized in particular on substrate specificity of these enzymes. The role of MD endonucleases in bacterial cells and the potential of their practical use are also discussed.**

**Keywords:** methyl-directed site-specific DNA endonucleases, methylated DNA, epigenetics.

DOI: 10.7868/S0026898413060190

### ВВЕДЕНИЕ

Сайт-специфические ДНК-эндонуклеазы – это ферменты, которые узнают специфическую нуклеотидную последовательность и расщепляют ДНК вблизи или на некотором расстоянии от нее. К ним относятся широко распространенные среди прокариотических организмов эндонуклеазы рестрикции, а также хоминг-эндонуклеазы, транспозазы и некоторые репарационные эндонуклеазы, устраняющие неспаренные основания у прокариот. Среди большого разнообразия известных в настоящее время сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз метилзависимые ферменты, способные специфически узнавать и расщеплять только метилированную ДНК, составляют немногочисленную группу.

Некоторые авторы относят их к эндонуклеазам рестрикции – огромному семейству сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз, которые расщепляют чужеродную ДНК при ее проникновении в бактериальную клетку [1]. Однако метилзависимые ферменты отличаются по своим свойствам (и, вероятно, функциям) от классических эндонуклеаз рестрикции.

Среди метилзависимых ДНК-эндонуклеаз различают N6-метиладенин- и 5-метилцитозинзависимые ферменты. К первым относится, например, фермент DpnI, который узнает и гидролизует тетра-нуклеотидную палиндромную последовательность G(6mA)TC [2]. Абсолютно все обнаруженные до сих пор N6-метиладенинзависимые ДНК-эндо-

Принятые сокращения: МД-эндонуклеазы – метилзависимые сайт-специфические ДНК-эндонуклеазы; 5mC – 5-метилцитозин; 4mC – N4-метилцитозин; 6mA – N6-метиладенин; 5hmC – C5-гидрокси-метилцитозин; glc-5hmC – гликозил-C5-гидрокси-метилцитозин.

\* Эл. почта: zemlyanskaya@sibenzyme.ru

нуклеазы имеют ту же специфичность, т.е. DpnI — прототип этих ферментов. Среди 5-метилцитозинзависимых ДНК-эндонуклеаз наиболее известна эндонуклеаза McrBC, которую открыли в 80-х годах прошлого столетия [3]. Этот фермент узнает пару сайтов R(mC), разделенных неспецифическим участком длиной 30–3000 п.н. [4, 5]. Долгое время McrBC был единственным изученным представителем 5-метилцитозинзависимых сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз. Однако за последние 5–7 лет обнаружено и охарактеризовано более десятка ферментов этого типа — и все они узнают различные метилированные последовательности ДНК. Прогресс в открытии и изучении 5-метилцитозинзависимых ДНК-эндонуклеаз во многом связан с бурным развитием эпигенетических исследований и возможностью использования этих ферментов для изучения статуса метилирования ДНК высших организмов (в том числе человека) — для них именно 5-метилцитозин представляет (5mC) собой эпигенетический маркер.

#### РАЗНООБРАЗИЕ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ МД-ЭНДОНУКЛЕАЗ

Метилзависимые сайт-специфические ДНК-эндонуклеазы (МД-эндонуклеазы) — это ферменты, которые способны специфически фрагментировать только метилированную ДНК. Описанные до настоящего времени МД-эндонуклеазы составляют немногочисленную группу прокариотических ферментов, первый представитель которой был охарактеризован около 40 лет назад. Это фермент DpnI из *Streptococcus* (ранее *Diplococcus*) *pneumoniae*, узнающий метилированную последовательность G(6mA)↓TC и расщепляющий ДНК как указано стрелкой [2].

Позднее в результате изучения рестрикции чужеродной 5mC-содержащей ДНК некоторыми штаммами *Escherichia coli*, а также индукции SOS-ответа при экспрессии генов чужеродных ДНК-метилтрансфераз в клетках *E. coli* были открыты еще три эндонуклеазы, расщепляющие только метилированную ДНК: McrA, McrBC и Mrr [3–6]. Впоследствии гомологи McrA, McrBC, Mrr и DpnI были обнаружены во многих видах бактерий [7–9], что свидетельствует о достаточно широком распространении ферментов этой группы среди прокариотических организмов. Однако в подавляющем большинстве случаев продукты соответствующих генов не были выделены. В течение продолжительного времени список новых МД-эндонуклеаз с установленной субстратной специфичностью пополняли лишь ферменты, узнающие ту же последовательность, что и прототип DpnI (так называемые изоизомеры) [9–12].

Лишь недавно открыты и охарактеризованы сразу несколько 5mC-зависимых сайт-специфи-

ческих ДНК-эндонуклеаз, многие из которых в настоящее время доступны для широкого круга исследователей. В частности, сотрудниками нашей лаборатории описаны 5mC-зависимые сайт-специфические эндонуклеазы BisI, GlaI, GluI, BlsI, PcsI, KroI, AoxI, MteI, PkrI (Патенты на изобретение RU 2270859, RU 2287012, RU 2322492, RU 2322494, RU 2377294, RU 2394099, RU 2399663, RU 2475533, RU 2475534). Зарубежными коллегами охарактеризована эндонуклеаза MspJI из *Mycobacterium* sp., а также ее ортологи из *Frankia* sp., *Legionella pneumophila*, *Azoarcus* sp., *Ruminococcus lactaris*, *Streptomyces griseoflavus* [13, 14]. Еще одной группой авторов определена субстратная специфичность новой 5mC-зависимой эндонуклеазы SgeI (Патент US 20110207139 A).

Метилзависимая эндонуклеазная активность описана также для одного из ортологов белка McrA — эндонуклеазы ScoA3McrA из *Streptomyces coelicolor* [15]. Кроме того, биохимически охарактеризована новая 5mC-зависимая сайт-специфическая эндонуклеаза SauUSI. Более 150 ортологов этого белка обнаружены в различных видах бактерий, что подтверждает мнение о широком распространении МД-эндонуклеаз среди бактерий [16].

#### СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ МД-ЭНДОНУКЛЕАЗ

##### Классификация по сайту узнавания и позиции расщепления ДНК

В зависимости от сайта узнавания и позиции гидролиза ДНК известные в настоящее время МД-эндонуклеазы можно условно разделить на три группы (табл. 1). Первая представлена эндонуклеазами AoxI, BisI, BlsI, DpnI, GlaI, GluI, KroI, MteI, PcsI и PkrI, которые узнают короткие палиндромные метилированные последовательности, в том числе вырожденные, и расщепляют ДНК симметрично по обеим цепям внутри узнаваемой последовательности в строго фиксированном положении.

МД-эндонуклеаза MspJI и родственные ей эндонуклеазы FspEI, LpnPI, AspBHI, RlaI и SgrTI вместе с МД-эндонуклеазой SgeI формируют вторую группу. Эти ферменты также гидролизуют ДНК в строго фиксированной позиции, однако узнают асимметричные последовательности и расщепляют ДНК на некотором расстоянии от узнаваемого метилированного сайта. Способность расщеплять ДНК в стороне от сайта узнавания, вероятно, обусловлена особенностями структурной организации этих ферментов, которые, как показано с помощью биоинформатического анализа, состоят из двух пространственно обособленных доменов, один из которых содержит активный центр, тогда как другой обеспечивает специфическое связывание ДНК [13, 14]. Необходимо отметить, что

Таблица 1. Субстратная специфичность известных МД-эндонуклеаз

| Фермент          | Организм                          | Сайт узнавания   | Модификации    |
|------------------|-----------------------------------|--|----------------|
| <b>DpnI</b>      | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | G(mA)↓TC<br>CT↑(mA)G   | 6mA            |
| <b>BisI</b>      | <i>Bacillus subtilis</i>          | G(mC)↓NGC<br>CGN↑(mC)G   | 5mC            |
| <b>GlaI</b>      | <i>Glacial ice bacterium</i>      | R(mC)↓GY<br>YG↑(mC)R   | 5mC            |
| <b>AoxI</b>      | <i>Arthrobacter oxydans</i>       | ↓RG(mC)Y<br>Y(mC)GR↑   | 5mC            |
| <b>BlsI</b>      | <i>Bacillus simplex</i>           | RYN↓RY<br>YR↑NYR   | 5mC (≥2*)      |
| <b>GluI</b>      | <i>Glacial ice bacterium</i>      | G(mC)↓NG(mC)<br>(mC)GN↑(mC)G   | 5mC            |
| <b>PcsI</b>      | <i>Paracoccus carotinifaciens</i> | (mC)GN <sub>5</sub> ↓N <sub>2</sub> (mC)G<br>G(mC)N <sub>2</sub> ↑N <sub>5</sub> G(mC) | 5mC            |
| <b>KroI</b>      | <i>Kocurea rosea</i>              | G↓C(mC)GGCC<br>GG(mC)C↑G   | 5mC            |
| <b>PkrI</b>      | <i>Planomicrobium koreense</i>    | GCN↓GC<br>CG↑NCG   | 5mC (≥3)*      |
| <b>MteI</b>      | <i>Microbacterium testaceum</i>   | G(mC)G(mC)↓NG(mC)G(mC)<br>(mC)G(mC)GN↑(mC)G(mC)G                                       | 5mC            |
| <b>MspJI</b>     | <i>Mycobacterium sp.</i>          | (mC)NNR(N <sub>9</sub> /N <sub>13</sub> )  | 5mC, 5hmC      |
| <b>FspEI</b>     | <i>Frankia sp.</i>                | C(mC) (N <sub>12</sub> /N <sub>16</sub> )  | 5mC, 5hmC      |
| <b>LpnPI</b>     | <i>Legionella pneumophila</i>     | (mC)DS(N <sub>10</sub> /N <sub>14</sub> )  | 5mC, 5hmC      |
| <b>AspBHI</b>    | <i>Azoarcus sp.</i>               | YN(mC)NS(N <sub>10</sub> /N <sub>14</sub> )  | 5mC, 5hmC      |
| <b>SgeI</b>      | <i>Streptomyces griseoflavus</i>  | (mC)NNG(N <sub>9</sub> /N <sub>13</sub> )  | 5mC            |
| <b>RlaI</b>      | <i>Ruminococcus lactaris</i>      | V(mC)W(N <sub>11</sub> /N <sub>15</sub> )  | 5mC, 5hmC      |
| <b>SgrTI</b>     | <i>Streptomyces griseoflavus</i>  | B(mC)DS(N <sub>10</sub> /N <sub>14</sub> )   | 5mC, 5hmC      |
| <b>McrBC**</b>   | <i>Escherichia coli</i>           | R(mC)N <sub>30-3000</sub> R(mC)  | 5mC, 4mC, 5hmC |
| <b>SauUSI</b>    | <i>Staphylococcus aureus</i>      | S(mC)NGS   | 5mC, 5hmC      |
| <b>McrA</b>      | <i>E. coli</i>                    | (Y > R)(mC)GR***   | 5mC, 5hmC      |
| <b>ScoA3McrA</b> | <i>Streptomyces coelicolor</i>    | Неизвестен   | 5mC, S-ДНК     |
| <b>Mrr</b>       | <i>E. coli</i>                    | Неизвестен   | 5mC, 6mA       |
| <b>GmrSD**</b>   | <i>E. coli</i>                    | Неизвестен   | glc-5hmC       |

\* Минимальное количество модифицированных оснований в обеих цепях сайта узнавания, необходимое для эффективно-го расщепления ДНК.

\*\* Эндонуклеазы с гетеродимерной организацией, состоящие из двух различных полипептидов.

\*\*\* Предполагаемый сайт узнавания эндонуклеазы.

именно такая организация функциональных доменов характерна и для других сайт-специфических эндонуклеаз, расщепляющих ДНК в стороне от сайта узнавания, например, для эндонуклеаз рестрикции подтипа IIS [17]. Интересно, что все охарактеризованные до сих пор МД-эндонукле-

азы этой группы, хотя и различаются сайтами узнавания, расщепляют ДНК на одинаковом расстоянии (N<sub>12</sub>/N<sub>16</sub>) от модифицированного основания.

Третью группу представляют МД-эндонуклеазы, которые не имеют однозначно определяемо-

го сайта узнавания и/или позиции расщепления ДНК. Например, узнаваемая последовательность нуклеотидов не установлена для ферментов Mrr [18, 19], ScoA3McrA [15], GmrSD [20]. Эндонуклеаза McrBC, хотя и узнает строго определенную динуклеотидную последовательность R(mC), расщепляет ДНК неоднозначно. Гидролиз осуществляется на расстоянии приблизительно 30 п.н. вблизи только одного из двух модифицированных динуклеотидов, расположенных на расстоянии от 30 до 3000 п.н. друг от друга [21, 22]. МД-эндонуклеаза SauUSI – сайт узнавания S(mC)NGS – также характеризуется вариабельной позицией расщепления ДНК и вносит разрыв в случайной позиции на расстоянии от 2 до 18 п.н. от узнаваемой последовательности [16].

### Типы узнаваемых модификаций ДНК

Наличие соответствующей модификации в ДНК – ключевой элемент, который необходим для гидролиза ДНК-субстрата МД-эндонуклеазы. У прокариот метилирование ДНК происходит по аденину с образованием N6-метиладенина (6mA) [23] или по цитозину с образованием C5- или N4-метилцитозина (5mC, 4mC) [24, 25]. Соответственно выделяются две группы МД-эндонуклеаз: первые расщепляют только 6mA-содержащую ДНК, вторые представляют собой метилцитозинзависимые эндонуклеазы (табл. 1). Исключительным примером в этом плане можно считать фермент Mrr, субстратом которого может быть ДНК, содержащая как один, так и другой тип модификаций [18].

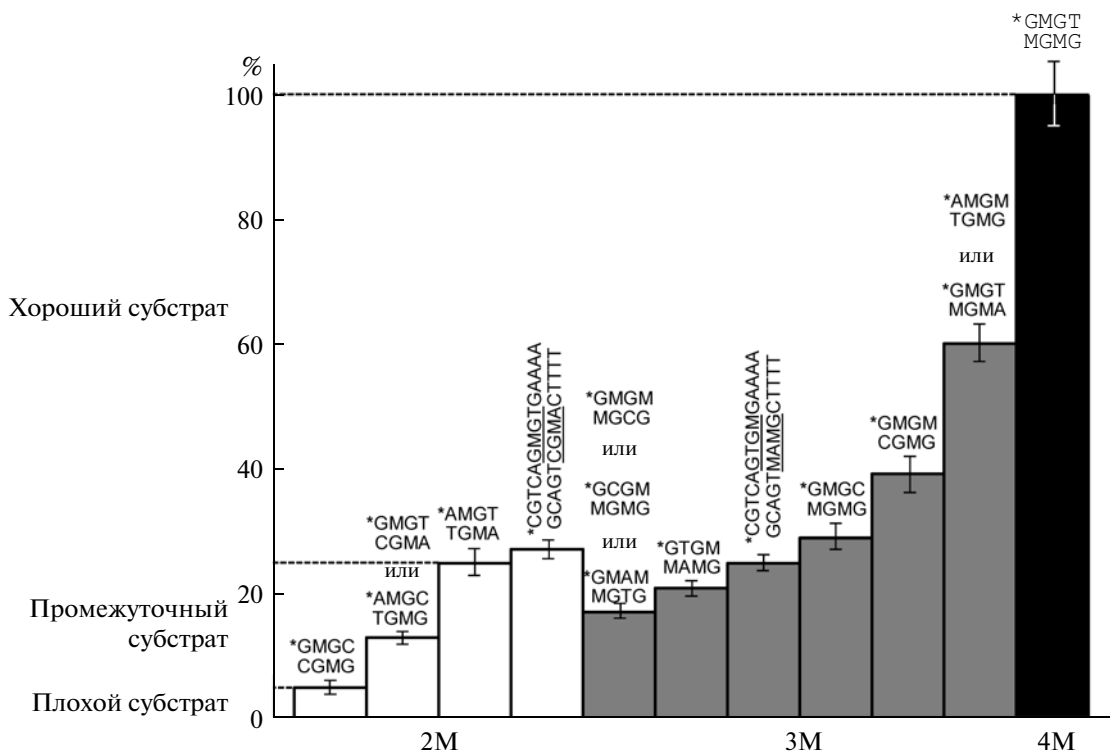
Стоит отметить, что метилцитозинзависимые ферменты, как правило, узнают только один из двух возможных вариантов метилирования цитозинового основания (для большинства охарактеризованных ферментов это 5mC, но не 4mC). В настоящее время известна единственная метилцитозинзависимая ДНК-эндонуклеаза, расщепляющая как 5mC, так и 4mC-содержащую ДНК, – фермент McrBC [4, 5, 26]. Тем не менее, многие 5mC-зависимые ДНК-эндонуклеазы могут специфически узнавать не только C5-метилированные, но и C5-гидроксиметилированные (5hmC) или гликозил-C5-гидроксиметилированные (glc-5hmC) цитозиновые основания (табл. 1), которые встречаются в ДНК некоторых бактериофагов [27, 28]. Кроме того, 5mC-зависимая эндонуклеаза ScoA3McrA из *Streptomyces coelicolor* способна наряду с C5-метилированной расщеплять S-модифицированную ДНК [15], в которой сахарофосфатные остатки в составе некоторых специфических последовательностей ферментативно тиофосфорилированы [29]. Таким образом, для целого ряда МД-эндонуклеаз характерно узнавание расширенного спектра модификаций ДНК.

К сожалению, молекулярный механизм узнавания модифицированных оснований для большинства МД-эндонуклеаз в настоящее время остается неясным. Исключение составляет, например, гетеродимерная эндонуклеаза McrBC, для которой показано, что в процессе узнавания модифицированное цитозиновое основание “выворачивается” из ДНК-дуплекса и располагается внутри белкового кармана субъединицы McrB, отвечающей за связывание ДНК [30]. Этот механизм, однако, не является универсальным для всех МД-эндонуклеаз, о чем свидетельствуют полученные недавно данные рентгеноструктурного анализа 6mA-зависимой эндонуклеазы DpnI в комплексе с ДНК [31].

### Узнаваемая последовательность нуклеотидов

МД-эндонуклеазы, как правило, узнают модифицированные основания в некотором нуклеотидном контексте. Некоторые ферменты, например, DpnI, GluI и KfoI, узнают модифицированные основания в достаточно строго определенном нуклеотидном контексте: G(6mA)TC, G(5mC)NG(5mC), GC(5mC)GGC соответственно [2, 32, 33]. Узнаваемая последовательность в этих случаях имеет длину не менее 4 п.н., ферменты чувствительны к замене нуклеотидов в сайте узнавания, хотя некоторые из них при высокой концентрации эндонуклеазы могут проявлять «звездчатую» активность и расщеплять сайт узнавания с единичными заменами [31]. Но часто активность МД-эндонуклеаз обусловлена скорее наличием модифицированных оснований, нежели определенной последовательностью ДНК. Так, например, McrBC [4], MspJI [13, 14] и MspJI-подобные эндонуклеазы [14] узнают очень короткие (2–3 п.н.) и в значительной мере вырожденные нуклеотидные последовательности (табл. 1). Кроме того, некоторые МД-эндонуклеазы, узнающие более или менее определенную нуклеотидную последовательность (например, SauUSI, сайт узнавания S(5mC)NGS), способны с меньшей эффективностью расщеплять иные сайты, содержащие подходящую модификацию, узнавая, таким образом, целое семейство последовательностей, среди которых есть предпочтительно узнаваемые субстраты [16]. Способность некоторых МД-эндонуклеаз расщеплять очень вырожденные нуклеотидные последовательности или целые семейства последовательностей может вызывать серьезные затруднения для четкого определения субстратной специфичности этих ферментов и выявления консенсусного сайта узнавания, как, например, в случае ферментов Mrr, GmrSD, ScoA3McrA.

Толерантность многих МД-эндонуклеаз к вариациям нуклеотидного контекста, в котором находится модифицированное основание, значительно отличает эти ферменты от классических эндонуклеаз рестрикции, субстратная специфичность кото-



Эффективность гидролиза МД-эндонуклеазой *GlaI* олигонуклеотидных дуплексов с различными вариантами сайта узнавания. М – С5-метилцитозин; звездочкой (\*) обозначена цепь ДНК, для которой приведены значения эффективности гидролиза. Рисунок впервые был опубликован в работе Tarasova G.V. et al. [36] и использован в соответствии с пользовательской лицензией Creative Commons Attribution License, <http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>.

рых определяется вполне однозначно. Вероятно, это свойство МД-эндонуклеаз обусловлено отсутствием давления отбора по строго определенной последовательности узнавания ввиду отсутствия в клетке, где продуцируется эндонуклеаза, соответствующего типа модификации, тогда как только четко определенная специфичность метил-чувствительных эндонуклеаз рестрикции обеспечивает целостность бактериальной ДНК, которая защищена от расщепления ферментативным метилированием соответствующих сайтов узнавания [13, 16].

#### “Рисунок” метилирования ДНК-субстрата

Помимо типа модификации ДНК и нуклеотидного контекста, в котором располагается модифицированное основание, есть еще один параметр, который определяет субстратную специфичность МД-эндонуклеаз, — “рисунок” метилирования ДНК-субстрата. В простейшем случае фермент узнает некоторую нуклеотидную последовательность с фиксированной позицией модифицированного основания. При этом ферменты, узнающие асимметричные последовательности, например *MspII*-подобные эндонуклеазы, расщепляют ДНК, содержащую модифицированное основание только в одной из цепей короткого сайта узнавания [14], тогда как для эффективного расщепления

палиндромной узнаваемой последовательности модифицированные основания должны располагаться симметрично в обеих цепях [34] (реже возможен также достаточно эффективный гидролиз полуметилированного субстрата [33]).

Однако для целого ряда охарактеризованных в настоящее время МД-эндонуклеаз расположение модифицированных оснований в субстрате не строго фиксировано. Показано, что некоторые 5mC-зависимые ДНК-эндонуклеазы, узнающие сайты, в которых несколько оснований потенциально могут быть модифицированы, способны распознавать альтернативные комбинации метилированных нуклеотидов. При этом, как правило, происходит увеличение активности при замене цитозинов на 5mC (исключение составляет МД-эндонуклеаза *BisI* [35]). Нуклеотидный контекст может сохраняться или меняться в зависимости от “рисунка” метилирования. Это исчерпывающе продемонстрировано на примере МД-эндонуклеазы *GlaI* в работах Тарасовой (Tarasova G.V.) с соавт. [36] и Томиловой с соавт. [37]. Выявлено целое семейство последовательностей с различными вариантами метилирования, которые с разной эффективностью расщепляет эндонуклеаза *GlaI* (рисунок). Интересно, что позиция гидролиза ДНК при этом не зависит от “рисунка” метилирования узнаваемой последовательно-

сти. Аналогично действуют, например, МД-эндонуклеазы *BlsI* и *PkrI*. Так, *BlsI* расщепляет последовательность GCNGC, содержащую в обеих цепях в произвольных позициях не менее двух 5mC оснований, а *PkrI* гидролизует ту же последовательность при наличии не менее трех 5mC (табл. 1) [38, 39].

В качестве интересного примера зависимости активности МД-эндонуклеазы от “рисунка” метилирования субстрата можно рассмотреть *MteI*. Минимальный сайт узнавания этого фермента – последовательность G(5mC)G(5mC)NG(5mC)GC; при этом активность *MteI* возрастает не только при замене немодифицированного динуклеотида GC на G(5mC), но и при появлении дополнительных G(5mC) динуклеотидов на 5'-концах узнаваемого нонануклеотида в обеих цепях ДНК [40]. Этот феномен отличает *MteI* от других охарактеризованных в настоящее время МД-эндонуклеаз. Более тонкие детали субстратной специфичности этой эндонуклеазы еще предстоит выяснить.

## СВОЙСТВА МД-ЭНДОНУКЛЕАЗ

### *Зависимость активности от ионов двухвалентных металлов*

МД-эндонуклеазы, как и подавляющее большинство других ДНК-нуклеаз прокариот, способны катализировать реакцию гидролиза фосфоэфирной связи только в присутствии катионов двухвалентных металлов [41]. Как правило, предпочтительный кофактор – ионы  $Mg^{2+}$ , которые, однако, в некоторых случаях могут быть заменены другими двухвалентными катионами. Например, *glc-5hmC*-зависимая эндонуклеаза *GmrSD* отдает предпочтение ионам  $Ca^{2+}$  [20], *ScoA3McrA* проявляет максимальную активность в  $Mn^{2+}$ - или  $Ni^{2+}$ -содержащем буфере [15], метилзависимая эндонуклеаза *SauUSI* сохраняет частичную активность в буферах, содержащих  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  или  $Co^{2+}$ , хотя максимальную активность проявляет только в присутствии  $Mg^{2+}$  [16].

В настоящее время данных о механизме гидролиза фосфоэфирной связи МД-эндонуклеазы нет, однако каталитическая функция двухвалентных катионов в большинстве случаев не вызывает сомнения. Так, с использованием методов биоинформатического, мутационного и рентгеноструктурного анализа показано, что активные центры ряда МД-эндонуклеаз имеют конфигурацию, характерную для нуклеаз, осуществляющих  $Mg^{2+}$ -опосредованный катализ реакции гидролиза фосфоэфирной связи. В частности, консервативный каталитический мотив PD(D/E)XK и его варианты выявлены в структуре белков *DpnI* [31], *Mgt* и его гомологов [7, 42, 43], включая биохимически охарактеризованные *MspII*-подобные эндонуклеазы [13, 14], а также в структуре катали-

тической субъединицы *McrC* гетеросубъединичной эндонуклеазы *McrBC* [44]. В каталитическом домене *McrA* и гомологичных белков (в том числе биохимически охарактеризованного *ScoA3McrA*) выявляется эндонуклеазный мотив HNH [15, 45].

Интересно, что каталитический домен  $Mg^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы *SauUSI* содержит консервативный каталитический мотив HKD, характерный для ЭДТА-устойчивых нуклеаз семейства фосфолипаз D (PLD) [16, 46], которые, как правило, проявляют активность в отсутствии двухвалентных катионов [47–49]. В этом случае не ясно, необходимы ли ионы металла *SauUSI* для осуществления непосредственно эндонуклеазной функции или иной ферментативной активности. Ответ на этот вопрос дадут дальнейшие исследования.

### *Зависимость активности от NTP*

Для гидролиза ДНК некоторыми МД-эндонуклеазами помимо двухвалентных катионов необходимы также молекулы нуклеозидтрифосфатов. В частности, *McrBC* представляет собой GTP-зависимую эндонуклеазу [26], для гидролиза ДНК *GmrSD* необходимо присутствие в реакционной смеси UTP [20], для *SauUSI* – АТФ или dATP [16]. В структуре этих ферментов, как правило, присутствуют функциональные домены, ответственные за связывание и гидролиз соответствующего кофактора. Так, согласно данным анализа *BlastP*, в структуре МД-эндонуклеазы *SauUSI* между каталитическим и ДНК-связывающим доменами присутствует АТРазный/хеликазный домен, высококонсервативный у ДНК/РНК-хеликаз надсемейства DEXD [16]. В случае гетеродимерных эндонуклеаз *McrBC* и *GmrSD* NTP-связывающий домен располагается в одной из двух субъединиц. У *McrBC* GTPазную активность обеспечивает ДНК-связывающая субъединица *McrB* [50, 51], которая помимо ДНК-связывающего [52] содержит также GTP-связывающий домен семейства AAA<sup>+</sup> [53–55]. У *GmrSD*, напротив, потенциальный UTP-связывающий мотив располагается в эндонуклеазной субъединице *GmrS*, содержащей также потенциальный каталитический мотив [56].

Предполагается, что в случае *McrBC* гидролиз GTP требуется для осуществления GTP-зависимой транслокации ДНК, что необходимо для специфического расщепления ДНК-субстрата [21, 52]. В других случаях роль NTP в процессе гидролиза ДНК не совсем ясна. Интересно, что с гипотетической АТФ-зависимой ДНК-хеликазной активностью *SauUSI* связывают необычную электрофоретическую картину расщепления ДНК этой эндонуклеазой, которая отличается от картины, получаемой для других сайт-специ-

фических эндонуклеаз. Вместо дискретных полос на электрофореграмме наблюдается размытое пятно, что свидетельствует о проявлении неспецифической нуклеазной активности после специфического расщепления ДНК. Поскольку эта активность проявляется только *in cis*, предполагается, что эндонуклеаза связывает модифицированные сайты и после внесения разрывов продолжает расщепление ДНК вдоль модифицированной молекулы, используя АТР-зависимую ДНК-хеликазную активность [16].

Неясен также биологический смысл использования разными МД-эндонуклеазами различных нуклеозидтрифосфатов (АТР, ГТР, УТР) в качестве кофактора. Возможно, это может давать преимущество при сосуществовании в одной клетке различных метилзависимых систем ввиду отсутствия конкуренции за один и тот же кофактор [16].

#### **Зависимость активности от количества сайтов узнавания**

Некоторым МД-эндонуклеазам (например, McrBC, SauUSI, DpnI) для эффективного гидролиза ДНК необходимо наличие двух сайтов узнавания на одной молекуле ДНК (*in cis*) [5, 16, 31]. Это свойство связано, как правило, с особенностями механизма действия ферментов. Так, эндонуклеаза McrBC после взаимодействия с модифицированным динуклеотидом R(mC) осуществляет ГТР-зависимую транслокацию ДНК [21, 52], и только после встречи двух транслоцирующих комплексов происходит согласованное расщепление обеих цепей ДНК вблизи одного из сайтов узнавания [52, 22]. Стоит отметить, что сходный механизм, когда для расщепления ДНК требуется заблокировать движение перемещающегося вдоль ДНК белкового комплекса, ранее описан для АТР-зависимых эндонуклеаз рестрикции типов I и III [57–62], которые также расщепляют ДНК при наличии не менее двух сайтов узнавания *in cis*. Механизм действия еще одной АТР-зависимой МД-эндонуклеазы, SauUSI, для реализации гидролитической активности которой необходимо присутствие на субстратной ДНК двух сайтов узнавания [16], предстоит выяснить в дальнейшем.

МД-эндонуклеаза DpnI расщепляет субстрат с двумя сайтами узнавания гораздо эффективнее субстрата с единственным сайтом [31]. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, этот белок содержит два ДНК-связывающих сайта, которые расположены в двух обособленных доменах одного полипептида. Такая структурная организация характерна для эндонуклеаз рестрикции подтипа IIЕ, которым для гидролиза ДНК необходимо связывание второго сайта, выполняющего функцию аллостерического эффектора [63]. Расположение двух сайтов узнавания *in cis* облег-

чает связывание эффекторной последовательности, что объясняет затруднения при расщеплении ДНК с единственным сайтом. Можно предполагать, что DpnI использует сходный механизм расщепления ДНК, однако детали еще предстоит выяснить [31]. Недавно на основании биоинформатического и мутационного анализа для белка Mgt предсказана структурная организация, сходная с установленной структурой DpnI [43]. Интересно узнать, будут ли Mgt и родственные ему белки сходными с DpnI с точки зрения зависимости активности от присутствия эффекторного сайта.

#### **Эндонуклеазная активность *in vitro***

ДНК-эндонуклеазная активность для большинства биохимически охарактеризованных МД-эндонуклеаз подтверждена в экспериментах *in vitro*. Исключения составляют метилзависимые системы McrA и Mgt. Так, в экспериментах *in vivo* продукт гена *mcrA* ограничивает проникновение в клетку модифицированной ДНК, содержащей 5mC основания в последовательности C(mC)GG [3, 64]. Тем не менее, в экспериментах *in vitro* эндонуклеазная активность предполагаемой эндонуклеазы McrA, ответственной за расщепление чужеродной модифицированной ДНК *in vivo*, зафиксировать не удалось, хотя показано, что рекомбинантный белок rMcrA способен специфически связываться с модифицированной последовательностью ДНК (Y > R)(mC)GR [65]. Вторым примером служит система Mgt, которая *in vivo* ограничивает проникновение в клетку ДНК, содержащей 6mA и 5mC основания [6, 18], однако соответствующий рекомбинантный белок не проявляет эндонуклеазной активности *in vitro* [19].

На основании таких наблюдений выдвинули предположение, что белки McrA и Mgt могут осуществлять рестрикцию чужеродной модифицированной ДНК не путем ее расщепления, которое легко обратимо в результате релаксирования, а, например, путем простого связывания ДНК-мишени, что может предотвратить ее репликацию или интеграцию в геном [8]. Однако охарактеризованная недавно в экспериментах *in vitro* эндонуклеазная активность отдаленных гомологов McrA (ScoA3McrA) и Mgt (MspJI-подобные эндонуклеазы) свидетельствует в пользу исходной идеи о том, что рестрикция чужеродной ДНК системами McrA и Mgt также осуществляется в результате гидролиза ДНК [13, 15].

#### **РОЛЬ МД-ЭНДОНУКЛЕАЗ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ**

В настоящее время существует несколько научных гипотез о биологической роли МД-эндонуклеаз, тем не менее, до сих пор этот вопрос

остаётся предметом дискуссий. Долгое время считалось, что основная роль МД-эндонуклеаз — защищать хозяйский геном от инвазии чужеродной ДНК, в частности ДНК бактериофагов [66]. В отличие от классических эндонуклеаз рестрикции, которые входят в состав систем рестрикции-модификации и распознают и расщепляют чужеродную ДНК из-за отсутствия в ней метилирования хозяйского типа [67], МД-эндонуклеазы могут распознавать чужеродную ДНК по наличию в ней каких-либо модификаций, отсутствующих в хозяйской ДНК. Такие системы получили название MDS (modification-dependent systems). Экспериментально показана возможность эффективного функционирования МД-эндонуклеаз в качестве систем рестрикции. Так, присутствие в бактериальной клетке эндонуклеаз DpnI или SauUSI позволяет значительно снизить долю инфицированных клеток при атаке вируса, выращенного в клетках, где продуцируется ДНК-метилтрансфераза M.DpnII или Dcm соответственно [16, 68, 69]. Системы рестрикции типа Msc эффективно ограничивают инвазию негликозилированных T-четных фагов, ДНК которых содержит C5-гидроксиметилцитозиновые основания [70, 71], система GmrSD — инвазию glc-5hmC-содержащего фага T4 *ipl-* [72].

Однако в последнее время исследователи склоняются к тому, что защита клетки от инвазии метилированной ДНК путем прямой атаки все-таки не основная функция МД-эндонуклеаз. Предполагается, что, в первую очередь, эти ферменты способствуют сохранению эпигеномного статуса ДНК, вызывая гибель клетки в ответ на метилирование ДНК чужеродными метилтрансферазами [73]. Поддержание стабильности эпигеномного статуса клетки необходимо, поскольку метилирование ДНК играет важную роль в регуляции фундаментальных клеточных процессов [74–77], и изменение эпигенетических характеристик ДНК может вызывать серьезные фенотипические изменения, не только полезные, но и вредные. Гипотеза об индукции гибели клетки в ответ на инвазию чужеродных эпигенетических систем хорошо подтверждается на примере эндонуклеазы MscBC [8]. В этой работе Фукуда (Fukuda) с соавт. экспериментально показали, что MscBC-опосредованная гибель клеток в результате расщепления метилированной хромосомной ДНК имеет место после внедрения в клетку или индукции гена метилтрансферазы, что предотвращает его фиксацию или активацию. Показано также, что рестрикция фага  $\lambda$ , содержащего ген метилтрансферазы M.PvuII, эндонуклеазой MscBC осуществляется именно в результате иницирования гибели клетки, нежели путем прямого расщепления внедрившейся в клетку метилированной ДНК. Таким образом, именно «суицидальная» защита может быть весьма эффективна в отношении бактериофагов, геномы

которых содержат гены ДНК-метилтрансфераз, что позволяет им избегать расщепления, по крайней мере, некоторыми классическими эндонуклеазами рестрикции [78].

Помимо осуществления защитной функции от инвазии чужеродных генетических и эпигенетических систем, МД-эндонуклеазы могут участвовать в фундаментальных процессах жизнедеятельности клетки, например, репарации ДНК. SOS-ответ — это реакция клетки на повреждение путем активации определенной группы генов (более 20), контролирующей ряд внутриклеточных процессов, ведущих в конечном счете к устранению повреждений. Недавно показано, что МД-эндонуклеаза Mgt из *E. coli* K-12 служит конечным эффектором при индукции RecBCD-зависимого SOS-ответа клетки на стрессовое воздействие высоким давлением [79–82]. К сожалению, до сих пор остаётся неясным механизм, позволяющий в результате такого физического воздействия активировать эндонуклеазу Mgt для внесения двухцепочечных разрывов в хромосомную ДНК и, соответственно, запуска SOS-ответа. Стоит отметить, что не все ортологи Mgt ведут себя одинаково. В частности, белок Mgt, кодируемый *Salmonella typhimurium* LT2, не активируется при воздействии высоким давлением, но может запускать SOS-ответ в результате спонтанного мутирования [83].

По мнению ряда авторов, гены, кодирующие потенциальные МД-эндонуклеазы, представляют собой эгоистичные элементы генома, конкурирующие с мобильными эпигенетическими системами, и подвержены широкому горизонтальному переносу, о чем свидетельствуют результаты филогенетического анализа [8, 73]. В качестве свидетельства потенциальной мобильности генов *mcrBC* авторы приводят результаты геномного анализа, где показали, что гомологи *mcrBC* часто связаны с гомологами генов интеграз и транспозаз; несколько MscBC-подобных систем обнаружены в плазмидах. Некоторые гомологи *mcrBC* представляют собой инсерции в комплекс генов рестрикции-модификации. Эти генные комплексы, по мнению ряда авторов, также есть не что иное как мобильные элементы, которые подвержены широкому горизонтальному переносу [84, 85].

## ПРИМЕНЕНИЕ МД-ЭНДОНУКЛЕАЗ

### *МД-эндонуклеазы в эпигенетических исследованиях*

Метилирование ДНК считается одним из наиболее изученных механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов. С ним связаны, например, такие биологические феномены как инактивация X-хромосомы [86] и геномный импринтинг [87]. Известно, что метилирование регуляторных



областей эукариотических генов приводит к их инактивации [88]. При этом именно aberrантное метилирование ДНК в регуляторных районах некоторых генов обуславливает развитие ряда заболеваний человека, в том числе большинства онкопатологий [89], что во многом объясняет все возрастающий интерес к исследованию эпигенетики человека.

ДНК высших организмов, в том числе человека, содержит в качестве эпигенетического маркера цитозиновые основания, метилированные в 5-ом положении пиримидинового кольца. Большинство остатков 5mC расположены в динуклеотидах CpG и распределены по геному неравномерно. Благодаря способности специфически расщеплять C5-модифицированную ДНК, 5mC-зависимые сайт-специфические эндонуклеазы стали уникальным инструментом для определения эпигенетического статуса ДНК и картирования позиции модификаций.

Применяющиеся в настоящее время методики для определения эпигенетического статуса ДНК с помощью МД-эндонуклеаз основаны, как правило, на ПЦР-анализе образца ДНК, гидролизованного 5mC-зависимой эндонуклеазой, с использованием пары праймеров, ограничивающих исследуемый район [90, 91]. Расщепление матрицы МД-эндонуклеазой (и, соответственно, отсутствие продукта ПЦР) свидетельствует о метилировании исследуемого района ДНК. Такой подход успешно применяется, например, для выявления гиперметилирования регуляторных областей генов-супрессоров опухолей в малигнизированных клетках [91, 92], а также гипометилирования регуляторных областей онкогенов [93]. Использование для метил-специфической деградации ДНК ферментов со сходным сайтом узнавания, но разной чувствительностью к метилированию (например, МД-эндонуклеазы и эндонуклеазы рестрикции, активность которой блокируется соответствующим метилированием ДНК) позволяет расширить возможности этого подхода и дискриминировать четыре различных варианта метилирования ДНК. Это полное метилирование (когда во всех молекулах ДНК-образца модифицированы все целевые сайты), нулевое (исследуемый район свободен от метилирования), неполное (в исследуемом

фрагменте содержатся как метилированные, так и неметилированные сайты) и составное (часть молекул образца метилирована в исследуемом районе, а часть свободна от модификации) [90] (табл. 2). Это уже позволяет выявлять аллель-специфическое метилирование CpG-островков, характерное, например, для генов, подверженных импринтингу как на половых хромосомах, так и в аутосомах [94, 95].

Использование системы ПЦР в реальном времени для детекции продуктов реакции позволяет определять количество интактной матрицы, оставшейся после обработки образца ДНК соответствующими эндонуклеазами, и, соответственно, осуществлять количественный анализ метилирования ДНК [96, 97] (табл. 3). Этот метод, получивший название qAMP (*quantitative analysis of DNA methylation using real-time PCR*), используется для исследования сайт- и район-специфического уровня метилирования ДНК, причем позволяет быстро получить достаточно точные данные о метилировании исследуемой области генома [96].

Кроме анализа метилирования отдельных районов генома с помощью ПЦР-анализа ДНК-гидролизатов, МД-эндонуклеазы могут быть полезны при исследовании глобальной структуры эпигенома. Так, показано, что уровень глобального метилирования ДНК коррелирует с уменьшением количества исходного ДНК-субстрата и средним размером фрагментов, полученных в результате расщепления исследуемой ДНК 5mC-зависимыми сайт-специфическими эндонуклеазами, а также с накоплением специфических фрагментов ДНК среди продуктов гидролиза [14, 98]. Благодаря различиям в последовательностях, узнаваемых МД-эндонуклеазами, доступными в настоящее время, можно установить специфичность метилирования исследуемой ДНК напрямую из электрофоретической картины расщепления субстрата [14]. Кроме того, развитие современных методов секвенирования способствует тому, что МД-эндонуклеазы в ближайшей перспективе могут стать мощным инструментом для картирования эпигеномов высших организмов. Эти технологии основаны на секвенировании фрагментов, полученных при расщеплении геномной ДНК соответствующими ферментами. Возможность практической реализации такого подхода показана в работе группы американских ученых [14]. Таким образом, 5mC-зависимые сайт-специфические эндонуклеазы можно рассматривать как новый мощный инструмент для эпигенетических исследований.

#### *МД-эндонуклеазы в биотехнологии и молекулярной биологии*

Из известных в настоящее время МД-эндонуклеаз в биотехнологии и молекулярно-биологи-

**Таблица 2.** Принцип HpaII-McrBC ПЦР

| Метилирование | Гидролиз матрицы |       | ПЦР-продукт |       |
|---------------|------------------|-------|-------------|-------|
|               | HpaII            | McrBC | HpaII       | McrBC |
| Полное        | –                | +     | ++          | –     |
| Нулевое       | +                | –     | –           | ++    |
| Составное     | +/-              | +/-   | +           | +     |
| Неполное      | +                | +     | –           | –     |

Таблица 3. Принцип qAMP

| Гидролиз матрицы        | ПЦР в реальном времени                 |                                   |   |
|-------------------------|--|-----------------------------------|---|
|                         | количество интактной матрицы отражает: | количественный анализ             |   |
|                         |  | определение порогового цикла (Ct) | определение процента метилирования* (%Me) |
| Без фермента            | общее количество ДНК                   | Ct <sub>контр</sub>               | —   |
| МД-эндонуклеаза         | количество неметилированной ДНК        | Ct                                | $100(1 - e^{-0.7(\Delta Ct)})$            |
| Эндонуклеаза рестрикции | количество метилированной ДНК          |                                   | $100(e^{-0.7(\Delta Ct)})$                |

\*  $\Delta Ct = Ct - Ct_{\text{контр}}$

ческих исследованиях, не касающихся области эпигенетики, широко используется только 6mA-зависимая сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза DpnI. Отчасти это сложилось исторически, поскольку на протяжении долгого времени белок DpnI был единственным охарактеризованным метилзависимым ферментом, расщепляющим ДНК в строго определенной позиции относительно сайта узнавания. С другой стороны, это обусловлено свойствами эндонуклеазы, которая проявляет специфичность, совпадающую с продуктом действия Dam ДНК-метилтрансферазы, в норме продуцирующейся у *E. coli*, причем позиция модифицированного основания сайте узнавания фермента строго фиксирована.

Используя свойство DpnI предпочтительно расщеплять полностью метилированные, а не полуметилированные сайты узнавания, этот фермент применяют для расщепления “ультраредких” последовательностей ДНК, комбинируя эндонуклеазу с соответствующим образом подобранными 6mA-метилтрансферазами [99–101].

Эндонуклеаза DpnI используется также для дискриминации ДНК-матрицы и продуктов полимеразной реакции, проводимой *in vitro*. Так, в стандартной стратегии сайт-направленного мутагенеза (Stratagene) эндонуклеаза DpnI используется для удаления матрицы, которая нарабатывалась в Dam<sup>+</sup> штамме *E. coli* и, соответственно, содержит метилированные последовательности G(6mA)TC, при этом продукт ПЦР, несущий мутацию, остается интактным. Расщепление полуметилированных сайтов в этом случае обеспечивается высокой концентрацией эндонуклеазы. С другой стороны, благодаря способности фермента в низкой концентрации расщеплять последовательность G(6mA)TC только в том случае, если адениновые основания модифицированы в обеих цепях, эндонуклеаза DpnI успешно используется для детекции ДНК, реплицированной *in vitro* [34]. Поскольку в реплицированной ДНК сайты GATC репортерной плазмиды, метилированные *in vivo*

Dam-метилазой, сохраняют модификацию лишь в одной цепи или утрачивают ее полностью, МД-эндонуклеаза расщепляет только исходную ДНК, тогда как реплицированная ДНК будет устойчива к ее действию.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что первые представители МД-эндонуклеаз были открыты более 35 лет назад и, вероятно, достаточно широко распространены среди микроорганизмов, эта группа ферментов до сих пор остается малоизученной как с точки зрения структуры и механизма действия, так и функций, выполняемых ими в бактериальной клетке. В последнее время, благодаря возможности использовать МД-эндонуклеазы в эпигенетических исследованиях, интерес к ним значительно возрос. Открыты новые ферменты и разработаны новые методы, основанные на использовании МД-эндонуклеаз для определения статуса метилирования ДНК. Однако для полной реализации практического потенциала МД-эндонуклеаз необходимо более детальное изучение свойств этих ферментов и их субстратной специфичности. Установление механизма действия МД-эндонуклеаз — одна из задач фундаментальных исследований, направленных на изучение белок-нуклеинового взаимодействия и, в частности, функционирования сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз. Дальнейшие исследования позволят приблизиться к пониманию роли этой группы ферментов в функционировании бактериальной клетки и поддержании стабильности бактериального генома и эпигенома.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roberts R.J., Belfort M., Bestor T., Bhagwat A.S., Bickle T.A., Bitinaite J., et al. 2003. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucl. Acids Res.* **31**, 1805–1812.

2. Lacks S., Greenberg B.J. 1975. A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA. *Biol. Chem.* **250**, 4060–4066.
3. Raleigh E.A., Wilson G. 1986. *Escherichia coli* K-12 restricts DNA containing 5-methylcytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 9070–9074.
4. Raleigh E.A. 1992. Organization and function of the *mcrBC* genes of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **6**, 1079–1086.
5. Stewart F.J., Raleigh E.A. 1998. Dependence of McrBC cleavage on distance between recognition elements. *Biol. Chem.* **379**, 611–616.
6. Heitman J., Model P. 1987. Site-specific methylases induce the SOS DNA repair response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 3243–3250.
7. Bujnicki J.M., Rychlewski L. 2001. Identification of a PD-(D/E)XK-like domain with a novel configuration of the endonuclease active site in the methyl-directed restriction enzyme Mrr and its homologs. *Gene.* **267**, 183–191.
8. Fukuda E., Kaminska K.H., Bujnicki J.M., Kobayashi I. 2008. Cell death upon epigenetic genome methylation: a novel function of methyl-specific deoxyribonucleases. *Genome Biol.* **9**, R163.
9. Roberts R.J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. 2010. REBASE – a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucl. Acids Res.* **38**, D234–D236.
10. Янулайтис А.А., Марцинкявичене Л.Ю., Пятрушите М.П. 1982. Специфическая эндонуклеаза из *Caulobacter fusiformis*, расщепляющая только метилированную ДНК. *Докл. Акад. наук СССР.* **262**, 241–244.
11. Cantalupo G., Bucci C., Salvatore P., Pagliarulo C., Roberti V., Lavitola A., Bruni C.B., Alifano P. 2001. Evolution and function of the neisserial *dam*-replacing gene. *FEBS Letters.* **495**, 178–183.
12. Gallagher L.A., McKevitt M., Ramage E.R., Manoil C. 2008. Genetic dissection of the *Francisella novicida* restriction barrier. *J. Bacteriol.* **190**, 7830–7837.
13. Zheng Y., Cohen-Karni D., Xu D., Chin H.G., Wilson G., Pradhan S., Roberts R.J. 2010. A unique family of Mrr-like modification-dependent restriction endonucleases. *Nucl. Acids Res.* **38**, 5527–5534.
14. Cohen-Karni D., Xu D., Apone L., Fomenkov A., Sun Z., Davis P.J., Kinney S.R.M., Yamada-Mabuchi M., Xu S.-y., Davis T., Pradhan S., Roberts R.J., Zheng Y. 2011. The MspJI family of modification-dependent restriction endonucleases for epigenetic studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 11040–11045.
15. Liu G., Ou H.-Y., Wang T., Li L., Tan H., Zhou X., Rajakumar K., Deng Z., He X. 2010. Cleavage of phosphorylated DNA and methylated DNA by Type IV restriction endonuclease ScoMcrA. *Plos Genetics.* **6**, 1–13.
16. Xu S.-Y., Corvaglia A.R., Chan S.-H., Zheng Y., Linder P. 2011. A type IV modification-dependent restriction enzyme SauUSI from *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* USA300. *Nucl. Acids Res.* **39**, 5597–5610.
17. Wah D.A., Hirsch J.A., Dorner L.F., Schildkraut I., Aggarwal A.K. 1997. Structure of the multimodular endonuclease FokI bound to DNA. *Nature.* **388**, 97–100.
18. Kelleher J.E., Raleigh E.A. 1991. A novel activity in *Escherichia coli* K-12 that directs restriction of DNA modified of CG dinucleotides. *J. Bacteriol.* **173**, 5220–5223.
19. Waite-Rees P.A., Keating C.J., Moran L.S., Slatko B.E., Hornstra L.J., Benner J.S. 1991. Characterization and expression of the *Escherichia coli* Mrr restriction system. *J. Bacteriol.* **173**, 5207–5219.
20. Bair C.L., Black L.W. 2007. A type IV modification dependent restriction nuclease that targets glucosylated hydroxymethyl cytosine modified DNAs. *J. Mol. Biol.* **366**, 768–778.
21. Panne D., Raleigh E.A., Bickle T.A. 1999. The McrBC endonuclease translocates DNA in a reaction dependent on GTP hydrolysis. *J. Mol. Biol.* **290**, 49–60.
22. Dryden D.T., Murray N.E., Rao D.N. 2001. Nucleoside triphosphate-dependent restriction enzymes. *Nucl. Acids Res.* **29**, 3728–3741.
23. Dunn D.B., Smith J.D. 1955. Occurrence of a new base in the deoxyribonucleic acid of a strain of *Bacterium coli*. *Nature.* **175**, 336–337.
24. Hotchkiss R.D. 1948. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J. Biol. Chem.* **168**, 315–332.
25. Janulaitis A., Klimasauskas S., Petrusyte M., Butkus V. 1983. Cytosine modification in DNA by BcnI methylase yields N<sup>4</sup>-methylcytosine. *FEBS Lett.* **161**, 131–134.
26. Sutherland E., Coe L., Raleigh E.A. 1992. McrBC: a multisubunit GTP-dependent restriction endonuclease. *J. Mol. Biol.* **225**, 327–358.
27. Wyatt G.R., Cohen S.S. 1953. The bases of the nucleic acids of some bacterial and animal viruses: the occurrence of 5-hydroxymethylcytosine. *Biochem. J.* **55**, 774–782.
28. Lehman I.R., Pratt E.A. 1960. On the structure of the glucosylated hydroxymethylcytosine nucleotides of coliphages T2, T4 and T6. *J. Biol. Chem.* **235**, 3254–3259.
29. Wang L., Chen S., Xu T., Taghizadeh K., Wishnok J.S., Zhou X., You D., Deng Z., Dedon P.C. 2007. Phosphorothioation of DNA in bacteria by *dnd* genes. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 709–710.
30. Sukackaite R., Grazulis S., Tamulaitis G., Siksnys V. 2012. The recognition domain of the methyl-specific endonuclease McrBC flips out 5-methylcytosine. *Nucl. Acids Res.* **40**, 7552–7562.
31. Siwek W., Czapinska H., Bochtler M., Bujnicki J.M., Skowronek K. 2012. Crystal structure and mechanism of action of the N<sup>6</sup>-methyladenine-dependent type IIM restriction endonuclease R.DpnI. *Nucl. Acids Res.* **40**, 7563–7572.
32. Чернухин В.А., Чмуж Е.В., Томилова Ю.Э., Някшина Т.Н., Гончар Д.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. 2007. Новая сайт-специфическая эндонуклеаза GluI узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)<sup>^</sup>NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN<sup>^</sup>(5mC)G-5'.

- Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. 3, 13–17.
33. 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. 2011. Новая метилзависимая сайт-специфическая эндонуклеаза KfoI узнает и расщепляет последовательность ДНК 5'-G<sup>+</sup>C(5mC)GGC-3'. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. 7, 14–20.
  34. Lu L., Patel H., Bissler J.J. 2002. Optimizing DpnI digestion conditions to detect replicated DNA. *Biotechniques*. 33, 316–318.
  35. Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. 2005. Новая эндонуклеаза рестрикции Bis I из *Vacillus subtilis* T30 узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)↓NGC-3'. *Биотехнология*. 3, 22–26.
  36. Tarasova G.V., Nayakshina T.N., Degtyarev S.Kh. 2008. Substrate specificity of new methyl-directed DNA endonuclease GlaI. *BMC Mol. Biol.* 9, 7. Doi: 10.1186/1471-2199-9-7
  37. Томилова Ю.Э., Чернухин В.А., Дегтярев С.Х. 2006. Зависимость активности сайт-специфической эндонуклеазы GlaI от количества и положения метилированных цитозинов в узнаваемой последовательности 5'-GCGC-3'. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. 2, 30–39.
  38. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э., Чмуж Е.В., Соколова О.О., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. 2007. Сайт-специфическая эндонуклеаза BIsI узнает последовательность ДНК 5'-G(5mC)N<sup>+</sup>GC-3' и расщепляет ее с образованием 3'-выступающих концов. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. 3, 28–33.
  39. Чернухин В.А., Наякшина Т.Н., Гончар Д.А., Томилова Ю.Э., Тарасова М.В., Дедков В.С., Михненко Н.А., Дегтярёв С.Х. 2011. Новая сайт-специфическая метилзависимая ДНК эндонуклеаза RkGI узнаёт и расщепляет метилированную последовательность 5'-GCN<sup>+</sup>GC-3'/3'-CG<sup>+</sup>NCG-5', содержащую не менее 3-х 5-метилцитозинов. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. 7, 35–42.
  40. Чернухин В.А., Гончар Д.А., Килёва Е.В., Соколова В.А., Голикова Л.Н., Дедков В.С., Михненко Н.А., Дегтярёв С.Х. 2012. Новая метилзависимая сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза MteI расщепляет 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*. 8, 16–26.
  41. Cowan J.A. 1998. Metal activation of enzymes in nucleic acid biochemistry. *Chem. Rev.* 98, 1067–1088.
  42. Kosinski J., Feder M., Bujnicki J.M. 2005. The PD-(D/E)XK superfamily revisited: identification of new members among proteins involved in DNA metabolism and functional predictions for domains of (hitherto) unknown function. *BMC Bioinformatics*. 6, 172.
  43. Orłowski J., Mebrhatu M.T., Michiels C.W., Bujnicki J.M., Aertsen A. 2008. Mutational analysis and a structural model of methyl-directed restriction enzyme Mrr. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 862–866.
  44. Pieper U., Pingoud A. 2002. A mutational analysis of the PD...(D/E)XK motif suggests that McrC harbors the catalytic center for DNA cleavage by the GTP-dependent restriction enzyme McrBC from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 41, 5236–5244.
  45. Bujnicki J.M., Radlinska M., Rychlewski L. 2000. Atomic model of the 5-methylcytosine-specific restriction enzyme McrA reveals an atypical zinc finger and structural similarity to ββαMe endonucleases. *Mol. Microbiol.* 37, 1280–1281.
  46. Ponting C.P., Kerr I.D. 1996. A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Sci.* 5, 914–922.
  47. Sapranaukas R., Sasnauskas G., Lagunavicius A., Vilkaitis G., Lubys A., Siksnys V. 2000. Novel subtype of type II restriction enzymes: BfiI endonuclease exhibits similarities to the EDTA-resistant nuclease Nuc of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 275, 30878–30885.
  48. Lagunavicius A., Sasnauskas G., Halford S.E., Siksnys V. 2003. The metal-independent type II restriction enzyme BfiI is a dimer that binds two DNA sites but has only one catalytic centre. *J. Mol. Biol.* 326, 1051–1064.
  49. Bao Y., Higgins L., Zhang P., Chan S.H., Laget S., Sweeney S., Lunnen K., Xu S.Y. 2008. Expression and purification of BmrI restriction endonuclease and its N-terminal cleavage domain variants. *Protein Expr. Purif.* 58, 42–52.
  50. Kruger T., Wild C., Noyer-Weidner M. 1995. McrB: a prokaryotic protein specifically recognizing DNA containing modified cytosine residues. *EMBO J.* 14, 2661–2669.
  51. Pieper U., Brinkmann T., Kruger T., Noyer-Weidner M., Pingoud A. 1997. Characterization of the interaction between the restriction endonuclease McrBC from *E. coli* and its cofactor GTP. *J. Mol. Biol.* 272, 190–199.
  52. Gast F.U., Brinkmann T., Pieper U., Kruger T., Noyer-Weidner M., Pingoud A. 1997. The recognition of methylated DNA by the GTP-dependent restriction endonuclease McrBC resides in the N-terminal domain of McrB. *Biol. Chem.* 378, 975–982.
  53. Neuwald A.F., Aravind L., Spouge J.L., Koonin E.V. 1999. AAA<sup>+</sup>: a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* 9, 2743.
  54. Pieper U., Schweitzer T., Groll D.H., Gast F.-U., Pingoud A. 1999. The GTP-binding domain of McrB: More than just a variation on common theme? *J. Mol. Biol.* 292, 547–556.
  55. Pieper U., Schweitzer T., Groll D.H., Pingoud A. 1999. Defining the location and function of domains of

- McrB by deletion mutagenesis. *Biol. Chem.* **380**, 1225–1230.
56. Bair C.L., Black L.W. 2007. Exclusion of glucosyl-hydroxymethylcytosine DNA containing bacteriophages. *J. Mol. Biol.* **366**, 779–789.
  57. Studier F.W., Bandyopadhyay P.K. 1988. Model for how type I restriction enzymes select cleavage sites in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 4677–4681.
  58. Janscak P., MacWilliams M.P., Sandmeier U., Nagaraja V., Bickle T.A. 1999. DNA translocation blockage, a general mechanism of cleavage site selection by type I restriction enzymes. *EMBO J.* **18**, 2638–2647.
  59. Ellis D.J., Dryden D.T., Berge T., Edwardson J.M., Henderson R.M. 1999. Direct observation of DNA translocation and cleavage by the EcoKI endonuclease using atomic force microscopy. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 15–17.
  60. Raghavendra N.K., Rao D.N. 2004. Unidirectional translocation from recognition site and a necessary interaction with DNA end for cleavage by type III restriction enzyme. *Nucl. Acids Res.* **32**, 5703–5711.
  61. Crampton N., Roes S., Dryden D.T.F., Rao D.N., Edwardson J.M., Henderson R.M. 2007. DNA looping and translocation provide an optimal cleavage mechanism for the type III restriction enzymes. *EMBO J.* **26**, 3815–3825.
  62. Ramanathan S.P., van Aelst K., Sears A., Peakman L.J., Diffin F.M., Szczelkun M.D., Siedel R. 2009. Type III restriction enzymes communicate in 1D without looping between their target sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 1748–1753.
  63. Кирсанова О.В., Баскунов В.Б., Громова Е.С. 2004. Эндонуклеазы рестрикции типа IIE и IIF, взаимодействующие с двумя участками узнавания в ДНК. *Молекуляр. биология.* **38**, 886–900.
  64. Raleigh E.A., Trimarchi R., Revel H. 1989. Genetic and physical mapping of the *mcrA* (*rglA*) and *mcrB* (*rglB*) loci of *Escherichia coli* K-12. *Genetics.* **122**, 279–296.
  65. Mulligan E.A., Hatchwell E., McCorkle S.R., Dunn J.J. 2010. Differential binding of *Escherichia coli* McrA protein to DNA sequences that contain the dinucleotide m5CpG. *Nucl. Acids Res.* **38**, 1997–2005.
  66. Bickle T.A., Kruger D.H. 1993. Biology of DNA restriction. *Microbiol. Rev.* **57**, 434–450.
  67. Wilson G.G., Murray N.E. 1991. Restriction and modification systems. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 585–627.
  68. Bernhelmer H.P. 1979. Lysogenic pneumococci and their bacteriophages. *J. Bacteriol.* **138**, 618–624.
  69. Muckerman C.C., Springhorn S.S., Greenberg B., Lacks S.A. 1982. Transformation of restriction endonuclease phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **152**, 183–190.
  70. Fukasawa T. 1964. The course of infection with abnormal bacteriophage T4 containing non-glucosylated DNA on *Escherichia coli* strains. *J. Mol. Biol.* **9**, 525–536.
  71. Revel H.R. 1967. Restriction of nonglucosylated T-even bacteriophage: Properties of permissive mutants of *Escherichia coli* B and K12. *Virology.* **31**, 688–701.
  72. Bair C.L., Rifat D., Black L.W. 2007. Exclusion of glucosyl-hydroxymethylcytosine DNA containing bacteriophages is overcome by the injected protein inhibitor IPI\*. *J. Mol. Biol.* **366**, 779–789.
  73. Ishikawa K., Fukuda E., Kobayashi I. 2010. Conflicts targeting epigenetic systems and their resolution by cell death: novel concepts for methyl-specific and other restriction systems. *DNA Res.* **17**, 325–342.
  74. Casadesus J., Low D. 2006. Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 830–856.
  75. Wion D., Casadesus J. 2006. N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 183–192.
  76. Collier J. 2009. Epigenetic regulation of the bacterial cell cycle. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 722–729.
  77. Marinus M.G., Casadesus J. 2009. Roles of DNA adenine methylation in host-pathogen interactions: mismatch repair, transcriptional regulation, and more. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 488–503.
  78. Tock M.R., Dryden D.T. 2005. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 466–472.
  79. Aertsen A., van Houdt R., Vanoirbeek K., Michiels C.W. 2004. An SOS response induced by high pressure in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 6133–6141.
  80. Aertsen A., Faster D., Michiels C.W. 2005. Induction of Shiga toxin-converting prophage in *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1155–1162.
  81. Aertsen A., Michiels C.W. 2005. Sula-dependent hypersensitivity to high pressure and hyperfilamentation after high-pressure treatment of *Escherichia coli* lon mutants. *Res. Microbiol.* **156**, 233–237.
  82. Aertsen A., Michiels C.W. 2005. Mrr instigates the SOS response after high-pressure stress in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **58**, 1381–1391.
  83. Aertsen A., Tesfazgi Mebrhatu M., Michiels C.W. 2008. Activation of the *Salmonella typhimurium* Mrr protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **367**, 435–439.
  84. Kobayashi I. 2001. Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucl. Acids Res.* **29**, 3742–3756.
  85. Furuta Y., Abe K., Kobayashi I. 2010. Genome comparison and context analysis reveals putative mobile forms of restriction-modification systems and related rearrangements. *Nucl. Acids Res.* **38**, 2428–2443.
  86. Avner P., Heard E. 2001. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 59–67.
  87. da Rocha S.T., Ferguson-Smith A.C. 2004. Genomic imprinting. *Curr. Biol.* **14**, R646–R649.
  88. Bird A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6–21.
  89. Robertson K. 2005. DNA methylation, human disease. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 597–610.
  90. Yamada Y., Watanabe H., Miura F., Soejima H., Uchiyama M., Iwasaka T., Mukai T., Sakaki Y., Ito T. 2004. A comprehensive analysis of allelic methylation status of CpG islands on human chromosome 21q. *Genome Res.* **14**, 247–266.

91. Гончар Д.А., Акишев А.Г., Дегтярев С.Х. 2010. BlsI- и GluI-ПЦР анализ – новый метод исследования метилированных участков ДНК. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. **6**, 5–12.
92. Акишев А.Г., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. 2011. Эпигенетическое типирование малигнанных клеточных линий человека с помощью BlsI- и GluI-ПЦР анализа. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. **7**, 5–16.
93. Hublarova P., Hrstka R., Rotterova P., Rotter L., Soupkova M., Badal V., Nenutil R., Vojtesek B. 2009. Prediction of human papillomavirus 16 E6 gene expression and cervical intraepithelial neoplasia progression by methylation status. *Int. J. Gyn. Cancer*. **19**, 321–325.
94. Norris D.P., Brockdorff N., Rastan S. 1991. Methylation status of CpG-rich islands on active and inactive mouse X chromosomes. *Mamm. Genome*. **1**, 78–83.
95. Morison I.M., Reeve A.E. 1998. A catalogue of imprinted genes and parent-of-origin effects in humans and animals. *Hum. Mol. Genet*. **7**, 1599–1609.
96. Oakes C.C., La Salle S., Robaire B., Trasler J.M. 2006. Evaluation of a quantitative DNA methylation analysis technique using methylation-sensitive/dependent restriction enzymes and real-time PCR. *Epigenetics*. **1**, 146–152.
97. Oakes C.C., La Salle S., Trasler J.M., Robaire B. 2009. Restriction digestion and real-time PCR. *Methods Mol. Biol.* **507**, 271–280.
98. Abdurashitov M.A., Chernukhin V.A., Gonchar D.A., Degtyarev S.Kh. 2009. GluI digestion of mouse  $\gamma$ -satellite DNA: study of primary structure and ACGT sites methylation. *BMC Genomics*. **10**, 322.
99. Weil M.D., McClelland M. 1989. Enzymatic cleavage of a bacterial genome at a 10-base-pair recognition site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**, 51–55.
100. Waterbury P.G., Reh fuss R.P., Carrol W.T., Sardon A.M., Faldasz B.D., Huckaby C.S., Lane M.J. 1989. Specific cleavage of the yeast genome at 5'-ATC-GATCGAT-3'. *Nucl. Acids Res.* **17**, 9493.
101. Wilson W.W., Mebane E.W., Hoffman R.M. 1993. Creation of ultra-rare restriction sites in intact eucaryotic chromosomes mediated by bacterial methylases: an approach to sequencing and analyzing tumor and normal genomes. *Anticancer Res.* **13**, 17–20.