



УДК 577.218

ОТСУТСТВИЕ CpNpG-МЕТИЛИРОВАНИЯ В 5'-КОНЦЕВОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА КАЛЬЦИТОНИНА ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ЛЕЙКОЗАХ

© 2000 г. Я. И. Бурьянов[#], Т. В. Шевчук, Н. С. Захарченко,
О. В. Дьяченко, Д. В. Маринич*, И. А. Воробьев**

Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
142292, Пуцино, Московская обл.;

* Научно-исследовательский клинический институт радиационной медицины и эндокринологии,
220009, Минск, ул. Долгобродская, 23;

** Белорусский центр трансплантации костного мозга, 220089, Минск, ул. Семашко, 8

Поступило в редакцию 29.09.99 г. Принято к печати 24.12.99 г.

Проведен анализ метилирования внутреннего цитозина в последовательностях CCWGG 5'-концевой области гена кальцитонина человека из клеток периферической крови и костного мозга при различных формах лейкозов. Эти последовательности сохраняются неметилированными в норме и при разных формах лейкозов. Таким образом, характерное для развития лейкоемий гиперметилирование CpG-динуклеотидов в 5'-концевой области гена кальцитонина человека не распространяется на близлежащие последовательности CpNpG.

Ключевые слова: метилирование ДНК, CpNpG-последовательности; ген кальцитонина человека; рестрикционные эндонуклеазы *EcoRII* и *BstNI*; блот-гибридизация, лейкоемии.

В структурно-функциональном исследовании ферментативного метилирования ДНК млекопитающих существует значительный пробел, связанный с изучением только CpG-типа этой модификации. В то же время окончательно доказано, что в клетках млекопитающих, как и в клетках высших растений, ДНК может быть метилирована как в CpG, так и в CpNpG-последовательностях [1–3]. Это поднимает вопросы о функциональной роли CpNpG-типа метилирования ДНК у млекопитающих, о ферментах, осуществляющих эту модификацию, а также о специфичности генетических областей, подвергающихся CpNpG-метилированию. Специальные исследования CpNpG-типа метилирования генов млекопитающих не проводились. В этой связи представляет интерес ген кальцитонина (СТ) человека, который в своей 5'-концевой области содержит наряду с динуклеотидами CpG также и кластер последовательностей CCWGG, являющихся потенциальными мишенями для CpNpG-специфического метилирования ДНК [4]. Ген СТ расположен на коротком плече хромосомы 11p15, где локализованы также гены-супрессоры опухолей [5]. При развитии некоторых раковых заболеваний человека обнаружено гиперметилирование последовательностей CpG в этой области [6]. В указанном хромосомном районе ген СТ подвергается CpG-гиперметилированию

при развитии различных форм лейкозов [7–11], а также некоторых видов рака легких [7] и карцином молочной железы [12]. Гиперметилирование последовательностей CpG в 5'-концевой области гена СТ может служить молекулярным диагностическим маркером лейкозов [7–11]. Анализ состояния метилирования CCWGG-последовательностей в этой области гена СТ не проводился.

В настоящей работе проведено исследование метилирования последовательностей CCWGG 5'-концевой области гена СТ при лейкозах методом блот-гибридизационного анализа геномной ДНК. ДНК гидролизовали рестрикционной эндонуклеазой *EcoRII*, чувствительной к присутствию в последовательностях CCWGG внутреннего цитозина в форме 5-метилцитозина и не чувствительной к этому типу метилирования ДНК изошизомерной рестриктазой *BstNI*. Для анализа взяты ДНК из лейкоцитов периферической крови и ядросодержащих клеток костного мозга пациентов с различными формами миелоидного и лимфоидного лейкозов. В качестве контроля взяты ДНК из лейкоцитов периферической крови 12 здоровых доноров. Для каждого случая заболевания проведен анализ ДНК двух разных пациентов. Во всех исследуемых образцах ДНК нами ранее была проанализирована картина метилирования внутреннего цитозина в последовательностях CCGG 5'-концевой области гена СТ, и в случаях лейкозов в них было обнаружено CpG-гиперметилирование [11].

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

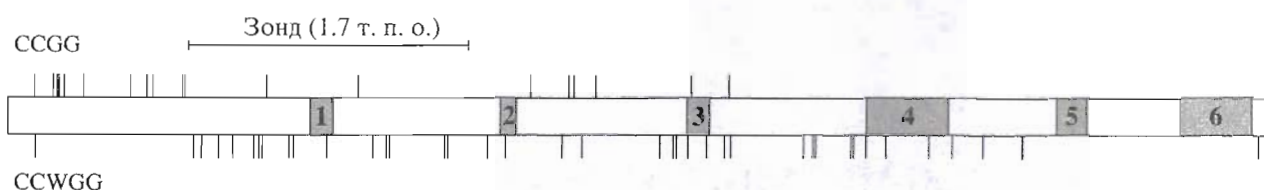


Рис. 1. Рестрикционная карта гена кальцитонина человека (согласно [4]). Указано положение последовательностей CCGG (*HpaII*-сайты) и CCWGG (*EcoRII*-сайты). Пронумерованные заштрихованные прямоугольники – экзоны. Верхняя линия указывает положение использованного зонда (1.7 т. п. о.).

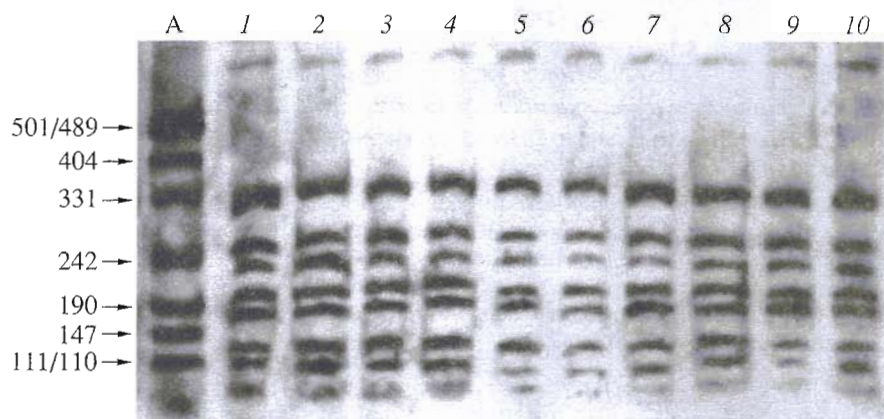


Рис. 2. Блот-гибризационный анализ состояния метилирования сайтов CCWGG в 5'-концевой области гена СТ человека в норме и при лейкозах. Продукты гидролиза ДНК рестриктазами *EcoRII* и *BstNI* разделяли в 6% ПААГ, проводили блот-гибридизацию с ^{32}P -меченым зондом, специфическим к 5'-концевой области гена СТ, и радиоавтографировали. А – ДНК рUC19/*MspI*; 1, 2 – ДНК больных с острым лимфоидным лейкозом, полная ремиссия; 3, 4 – ДНК больных с острым лимфоидным лейкозом, рецидив; 5, 6 – ДНК больных с острым миелоидным лейкозом, первая атака; 7, 8 – ДНК больных с хроническим миелоидным лейкозом, бластный криз; 9, 10 – ДНК здоровых доноров. Гидролиз осуществлен *EcoRII* (1, 3, 5, 7, 9) и *BstNI* (2, 4, 6, 8, 10).

ДНК (10–12 мкг) гидролизировали в течение 16–18 ч рестриктазой *EcoRII* (20 ед. акт./мкг ДНК) при 37°C или рестриктазой *BstNI* (15 ед. акт./мкг ДНК) при 55°C. Продукты гидролиза подвергали электрофорезу в 6% ПААГ и переносили на нейлоновую мембрану Hybond-N⁺ (Amersham, Англия) методом электроблоттинга в аппарате Mini Trans Blot (Bio-Rad, США). В качестве зонда использовали фрагмент 5'-концевой области гена СТ длиной 1.7 т. п. о. [7]. Зонд метили [α - ^{32}P]dATP с помощью метода случайной множественной затравки до удельной активности 1×10^9 имп./мин на мкг ДНК. Предгибридизацию, гибридизацию и отмывку мембраны проводили при 65°C по рекомендации изготовителя и радиоавтографировали. С целью проверки полноты расщепления ДНК рестриктазой *EcoRII* образцы ДНК гидролизировали ферментом в более высоких концентрациях (30 ед. акт./мкг ДНК): при этом гибридационная картина не изменялась. Специфичность используемых препаратов рестриктаз *EcoRII* и *BstNI* была проверена на контрольной ДНК плазмиды pBR322, полностью метилированной ДНК-метилтрансферазой *EcoRII* в клетках *E. coli* с сис-

темой рестрикции-модификации *EcoRII* (данные не приведены).

Рестрикционная карта гена СТ представлена на рис. 1. Блот-гибризационный анализ 5'-концевой области гена СТ с помощью рестриктазы *BstNI* и указанного зонда выявил ожидаемые нуклеотидные фрагменты с размерами 962, 331, 274, 235, 205, 157, 130, 101 и 83/80 п. о. (рис. 2). Относительно слабая интенсивность радиоактивного сигнала фрагмента размером 962 п. о. связана с незначительным перекрытием его гибридуемым зондом и жесткими для этого фрагмента условиями гибридизации. Условия электрофореза и последующей блот-гибридизации продуктов рестриктазного гидролиза не позволили локализовать на радиоавтограмме более мелкие *BstNI*-фрагменты из этого участка гена.

Во всех случаях картина гидролиза 5'-концевой области гена СТ рестриктазой *EcoRII*, чувствительной к присутствию 5-метилцитозина в узнаваемой последовательности, не отличалась от соответствующей *BstNI*-картины. Это указывает на отсутствие 5-метилцитозина в последовательностях CCWGG этой области гена, т. е. на отсут-

ствие ее метилирования по типу CpNpG как в норме, так и при различных формах лейкозией.

Следует отметить, что в клетках млекопитающих при установлении *de novo* картины метилирования ДНК волна метилирования может распространяться не только на соседние CpG-сайты, но даже на отдельные остатки цитозина в непалиндромных последовательностях [13]. Однако ни в одном из проанализированных случаев нам не удалось обнаружить такого распространения гиперметилирования CpG-динуклеотидов в 5'-концевой области гена СТ на близлежащие последовательности CpNpG.

Таким образом, нами обнаружено, что CpNpG-последовательности 5'-концевой области гена кальцитонина человека в отличие от CpG-динуклеотидов сохраняются неметилированными в процессе развития лейкозов. Можно предположить, что молекулярно-генетические процессы канцерогенеза не связаны с CpNpG-типом метилирования ДНК.

Дальнейшее исследование состояния метилирования гена СТ и других генов, расположенных в хромосомных областях, подвергающихся ассоциированному с канцерогенезом гиперметилированию ДНК, поможет выяснить этот вопрос.

Авторы выражают глубокую благодарность доктору S.B. Baylin (Johns Hopkins University Oncology Center, Baltimore) за любезно предоставленные зонды гена кальцитонина человека.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Курнос М.Д., Александрушкина Н.И., Ванюшин Б.Ф. // Биохимия. 1981. Т. 46. С. 1458–1474.
2. Gruenbaum Y., Naveh-Manly T., Cedar H., Razin A. // Nature. 1981. V. 292. P. 860–862.
3. Clark S.J., Harrison J., Frommer M. // Nature Genetics. 1995. V. 10. P. 20–27.
4. Broad P. M., Symes A.J., Thakker R.V., Craig R.K. // Nucl. Acid Res. 1989. V. 17. P. 6999–7011.
5. Koi M., Johnson L.A., Kalikin L.M., Little P.F.R., Nakamura Y., Feinberg A.P. // Science. 1993. V. 260. P. 361–364.
6. de Bustros A., Nelkin B.D., Silverman A., Ehrlich G., Poiesz B., Baylin S.B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 5693–5697.
7. Baylin S.B., Hoppener J.W.M., de Bustros A., Steenbergh P.H., Lips C.J.M., Nelkin B.D. // Cancer Res. 1986. V. 46. P. 2917–2922.
8. Baylin S.B., Fearon E.R., Vogelstein B., de Bustros A., Sharkis S.J., Burke P.J., Staal S.P., Nelkin B.D. // Blood. 1987. V. 70. P. 412–417.
9. Nelkin B.D., Przepiorka D., Burke P.J., Thomas E.D., Baylin S.B. // Blood. 1991. V. 77. P. 2431–2434.
10. Malinen T., Palotie A., Pakkala S., Peltonen L., Ruutu T., Jansson S.E. // Blood. 1991. V. 77. P. 2435–2440.
11. Маринич Д.В., Воробьев И.А., Смольникова В.В., Холмс Дж., Бабан Д., Шевчук Т.В., Бурьянов Я.И., Мирошников А.И. // Гематология и трансфузиология. 1999. Т. 44. С. 7–10.
12. Hakkarainen M., Wahlfors J., Myöhänen S., Hiltunen M.O., Eskelinen M., Johansson R., Jänne J. // Int. J. Cancer. 1996. V. 69. P. 471–474.
13. Toth M., Müller U., Doerfler W. // J. Mol. Biol. 1990. V. 214. P. 673–683.

The Lack of the CpNpG Methylation at the 5'-Terminal Region of the Human Calcitonin Gene in Norm and Leukemias

Ya. I. Buryanov^{##}, T. V. Shevchuk^{*}, N. S. Zakharchenko^{*},
O. V. D'yachenko^{*}, D. V. Marinich^{**}, and I. A. Vorob'ev^{***}

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

^{**}Research and Clinical Institute of Radiational Medicine and Endocrinology, ul. Dolgobrodskaya 23, Minsk, 220009 Belarus

^{***}Belorussian Bone Marrow Transplantation Center, ul. Semashko 8, 220089 Belarus

The inner cytosine methylation was analyzed in the CCWGG sequences of the 5'-terminal region of the human calcitonin gene from peripheral blood and bone marrow cells in various forms of leukemia. Since these sequences remain nonmethylated both in norm and in various leukemia forms, the CpG dinucleotide hypermethylation of the 5'-terminus of the human calcitonin gene, characteristic for the development of leukemias, does not spread over adjacent CpNpG sequences.

Key words: DNA methylation, CpNpG sequences, human calcitonin gene, restriction endonucleases *EcoRII* and *BstNI*, blot hybridization, leukemia

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

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 5. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.