

**Кинетика взаимодействия метилтрансферазы Dnmt3a с ДНК, содержащими CpG-сайты в различном нуклеотидном окружении**

**Тамьяр Е.Л.**

студентка

**Баскунов В.Б.**

научный сотрудник, к.х.н.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: gromova@genebee.msu.ru

Метилирование ДНК является природной эпигенетической модификацией генома и играет важную роль в регуляции многих клеточных процессов. Метилирование ДНК осуществляется ДНК-метилтрансферазами (МТазы). В эукариотах метилирование происходит по атому углерода С5 остатков цитозина преимущественно в CpG-последовательностях (CpG-сайтах). Установление нового профиля метилирования (метилирование *de novo*) ДНК в эукариотах происходит на стадии раннего эмбриогенеза. Одной из МТаз млекопитающих, осуществляющих метилирование *de novo*, является МТазы мыши Dnmt3a. Особенностью функционирования Dnmt3a является то, что метилирование CpG-сайтов этой МТазой происходит с различной эффективностью. Анализ нуклеотидных последовательностей в районе эффективно метилируемых CpG-сайтов показал, что предпочтительно метилированными Dnmt3a являются CpG-сайты, окруженные в позициях  $-2$  и  $+1$  пиримидиновыми нуклеотидами, а в позиции  $-1$  - пуриновыми: (C/T)(G/A)CG(C/T).

Целью настоящей работы явилось изучение механизма такого предпочтительного метилирования CpG-сайтов ДНК каталитическим доменом МТазы Dnmt3a (Dnmt3a-CD).

Для этого были выбраны 18-ти звенные ДНК-дуплеты, содержащие участки узнавания CpG-сайты в различном нуклеотидном окружении. Часть субстрата была полуметилированной, то есть содержала в одной из цепей вместо метилируемого остатка цитозина остаток 5-метилцитозина. Изучение субстратных свойств таких дуплексов позволяет оценить эффективность метилирования Dnmt3a-CD каждой из олигонуклеотидных цепей. Кинетический анализ взаимодействия МТазы с ДНК-дуплексами проводили в условиях «одного оборота», что позволило определить влияние нуклеотидов, фланкирующих CpG-сайты, на константу скорости переноса метильной группы ( $k_{chem}$ ). За прохождением реакции следили по включению тритиевой метки в ДНК-дуплекс, происходящему в процессе переноса меченной тритием метильной группы от кофактора S-аденозил-L-метионин в ходе ферментативной реакции.

Показано, что  $k_{chem}$  переноса метильной группы МТазой Dnmt3a-CD на CpG-сайты, имеющие более предпочтительные фланкирующие нуклеотидные последовательности выше, чем  $k_{chem}$  в случае CpG-сайтов, имеющих менее предпочтительные для метилирования фланкирующие последовательности.

На кинетических кривых метилирования полуметилированных дуплексов обнаружен разный уровень плато. Этот факт может быть объяснен тем, что Dnmt3a-CD способна связываться с полуметилированной ДНК в двух ориентациях, когда активный центр фермента взаимодействует либо с еще не метилированным цитозином (продуктивная ориентация), либо с уже метилированным цитозином (непродуктивная ориентация). Сделано предположение, что Dnmt3a-CD преимущественно связывается с ДНК в ориентации на цепь с более предпочтительными для метилирования фланкирующими нуклеотидными последовательностями.

Поддержано грантами РФФИ.