

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-266

АНАЛИЗ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ И КИНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК
МЕТИЛЗАВИСИМОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ *GLAI*

CALCULATION OF THE THERMODYNAMIC AND KINETIC CHARACTERISTICS
OF THE *GLAI* METHYL-DEPENDENT RESTRICTION ENDONUCLEASE

В. Г. Мартюшова, М. Жежера, С. Е. Седых

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Новосибирский государственный университет, Новосибирск
Институт неорганической химии СО РАН, Новосибирск

V. G. Martyushova, M. Zhezhera, S. E. Sedykh

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University
Institute of Inorganic Chemistry SB RAS, Novosibirsk

✉ vladislavmartyusova@gmail.com

Аннотация

Метилирование ДНК играет важную роль в эпигенетическом наследовании. Проведено исследование термодинамических и кинетических параметров метилзависимой эндонуклеазы рестрикции *GlaI*, играющей важную роль в эпигенетических исследованиях. Определены константы диссоциации, энергии Гиббса, а также кинетические параметры (K_m , V_{max}) для различных субстратов.

Abstract

DNA methylation plays an important role in epigenetic inheritance. A study was conducted on the thermodynamic and kinetic parameters of the methyl-dependent restriction endonuclease *GlaI*, which plays an important role in epigenetic research. The dissociation constants, Gibbs energies, and kinetic parameters (K_m , V_{max}) for various substrates were determined.

Метилирование ДНК — ключевой эпигенетический механизм, регулирующий экспрессию генов и поддерживающий стабильность генома. Метилирование ДНК играет критическую роль в развитии заболеваний, включая онкологические, аутоиммунные и нейродегенеративные. Изучение метилирования ДНК важно для поиска новых диагностических маркеров и персонализированных методов терапии. Для нахождения маркеров метилирования можно использовать метилзависимые эндонуклеазы рестрикции, например *GlaI* — фермент, специфически расщепляющий ДНК по сайтам, содержащим метилированные цитозины: R(5mC)↓GY. Благодаря этой особенности *GlaI* применяют в эпигенетических исследованиях, например в *GlaI*-ПЦР-анализе, который позволяет специфически детектировать метилированные и неметилированные сайты в образцах ДНК. Данная работа посвящена расчету термодинамических и кинетических характеристик метилзависимой эндонуклеазы рестрикции *GlaI*.

Проведен анализ термодинамических параметров *GlaI*: константы диссоциации (K_d) и энергии Гиббса (ΔG°) методом задержки в геле, который основан на изменении электрофоретической подвижности ДНК-олигонуклеотида при образовании комплекса с белком, что позволяет количественно оценить взаимодействие фермента с субстратом. Для измерений использовали ^{32}P -радиоактивно меченые олигонуклеотиды. Полученные данные обрабатывали с помощью программы ImageQuant, были вычислены равновесные концентрации комплексов и определены значения K_d и ΔG° для дуплексов ДНК, содержащих метилированные и неметилированные остатки цитозинов в сайте рестрикции.

Кинетические параметры *GlaI*: константу Михаэлиса — Ментен (K_m) и максимальную скорость (V_{max}) исследовали с помощью дуплексов ДНК-олигонуклеотидов, содержащих флуорофор (FAM) и тушитель (BHQ1) на противоположных концах. Гидролиз эндонуклеазой приводил к разделению флуорофора и тушителя и увеличению флуоресценции. Детекция изменения уровня флуоресценции во времени позволили измерить начальные скорости реакций для различных субстратов: метилированных, полуметилированных (содержащих метилированный цитозин в одной цепи дуплекса) и неметилированных.

Результаты исследования могут быть использованы для анализа термодинамических параметров и специфичности новых метилзависимых эндонуклеаз рестрикции.