

Б. Ф. ВАНЮШИН, Н. А. КОКУРИНА, академик А. Н. БЕЛОЗЕРСКИЙ

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И ИНДУКЦИЯ ПИОЦИНА В КЛЕТКАХ PSEUDOMONAS AERUGINOSA R.

Ультрафиолетовое облучение или обработка митомицином клеток *Pseudomonas aeruginosa* R. приводят к индукции образования пиоцина R (¹⁻⁴). Пиоцин R обладает сложной макромолекулярной структурой, он содержит базальную пластинку, стержень, покрытый сократительным чехлом из белковых субъединиц, и, по-видимому, представляет собой хвостовые отростки какого-то дефектного фага *P. aeruginosa* R (⁴). Вместе с тем, известно, что различные индуцирующие (мутагенные) факторы резко изменяют характер метилирования ДНК в клетках некоторых бактерий. Так, впервые Дани и Смит обнаружили, что при выращивании *Escherichia coli* 15T⁻ в присутствии аналогов тимина содержание N⁶-метиладенина (МА) в ДНК этих клеток увеличивается примерно в 10 раз (⁵). Это наблюдение затем было подтверждено и другими исследователями (⁶⁻⁸). Аналогичные изменения в метилировании ДНК *E. coli* 15T⁻ и некоторых других мутантов происходят при у.-ф. облучении (^{7, 9}), тиминном голодании (^{5-8, 10}), под воздействием митомицина С (^{7, 8}) и других индуцирующих факторов. Недавно установлено, что изменение метилирования ДНК в клетках *E. coli* 15T⁻ связано с индукцией дефектного фага и появлением в индуцированных клетках новой фаговой ДНК-метилазы (^{7, 8}). В отличие от хозяйской ДНК-метилазы этот фермент метилирует только остатки аденина и может метилировать *in vitro* ДНК из неиндуцированных клеток хозяина (⁷). Таким образом, хотя изменения метилирования ДНК в клетках *E. coli* 15T⁻ под воздействием индуцирующих агентов известны уже давно (⁵), однако связь этого явления с индукцией профага установлена только совсем недавно (^{7, 8}). Напротив, в отношении клеток *P. aeruginosa* R. мы хорошо знаем, что у.-ф. облучение и другие мутагенные факторы индуцируют образование пиоцина, однако до сих пор неизвестно, что при этом происходит с ДНК и каков характер ее метилирования.

В настоящей работе мы изучили нуклеотидный состав и содержание минорных оснований в суммарной ДНК нормальных (исходных) и у.-ф. облученных (индуцированных) клеток *Pseudomonas aeruginosa* R.

Клетки *P. aeruginosa* R. выращивали при 37° в течение 4 час. (середина логарифмической фазы роста) и облучали у.-ф. светом, пропуская культуру через кварцевую трубку, освещаемую у.-ф. лампами (БУФ), как это описано в работе Горяева и Поглазова (⁴). После облучения культуру инкубировали в течение 1—2 час. при 37°, затем клетки отделяли от культуральной среды при помощи центрифугирования на специальном сепараторе и полученную массу фиксировали спиртом*. Высушенные бактерии (3—9 г) гидролизовали 0,75 N NaOH (37°, 18 час.) для удаления РНК; полученные из остатка солевой экстракцией частично депротенизированные препараты ДНК гидролизовали (72% HClO₄, 100°, 60 мин.) до оснований (¹¹). Основания разделяли хроматографией на бумаге, как это уже описано ранее, и определяли спектрофотометрически (¹¹⁻¹³). Минорные основания N⁶-метиладенин (МА) и 5-метилцитозин (МЦ) определяли количественно после рехроматографии в соответствующих растворите-

* Авторы благодарят П. П. Горяева и Б. Ф. Поглазова за предоставление бактериальной массы.

лях (13). Данные по составу ДНК четырех исходных и семи облученных у.-ф. светом культур *P. aeruginosa* R. представлены в табл. 1.

ДНК *P. aeruginosa* R. принадлежит к высокому ГЦ-типу (ГЦ 67,2%); по составу она близка ДНК других штаммов этого вида (14) и отличается от ДНК представителей других видов, например изученного нами ранее *P. syringae* 19P (13). Это еще раз указывает на видовую специфичность состава ДНК у бактерий из рода *Pseudomonas*.

В качестве минорного основания в ДНК исходной культуры *P. aeruginosa* R. обнаруживается только МА. Содержание МА в этой ДНК примерно в 2—3 раза выше, чем в ДНК других видов *Pseudomonas* (13). Это указывает на видовую специфичность метилирования ДНК у этих бактерий.

Таблица 1

Состав ДНК у.-ф. облученных и необлученных клеток *Pseudomonas aeruginosa* R

№ культуры	Основания, мол. %						ГЦ, %	Пиоцино-образован- ные
	Г	Ц	А	Т	МА	МЦ		
Исходная культура								
1	33,6	33,6	16,2	16,6	0,05	0	67,2	—
2	33,2	33,0	16,7	17,1	0,09	0	66,2	—
3	34,0	33,8	16,3	15,9	0,05	0	67,8	—
4	33,7	33,6	16,4	16,3	—*	0	67,3	—
У.-ф. облученная культура								
5	29,5	29,8	20,2	20,0	0,35	0,18	59,5	+
6	30,2	30,6	19,1	19,6	0,42	0,16	61,0	+
7	28,5	28,8	20,7	21,6	0,32	0**	57,3	+
8	30,0	28,5	20,2	21,3	—*	—*	58,5	+
9	33,8	33,9	16,3	16,0	0,03	0	67,7	—
10	33,7	33,3	16,9	16,1	0,05	0	67,0	—
11	31,8	32,9	17,0	18,3	—*	—*	64,7	—

* Минорные основания не определяли.

** Количество взятой для анализа ДНК в 4 раза меньше, чем в культуре 5.

После у.-ф. индукции пиоцина состав ДНК в клетках *P. aeruginosa* R. резко изменяется: в ДНК индуцированных клеток количество ГЦ-пар значительно уменьшается (ГЦ 58—60%). При этом ДНК всей популяции клеток, по-видимому, не подвержена заметной деградации: несмотря на уменьшение количества ГЦ-пар состав ДНК индуцированных клеток полностью отвечает «правилам Чаргаффа». Кроме того, у.-ф. индукция в описанных условиях не сопровождается значительным лизисом клеток, а выход пиоцина в среду при этом все же крайне мал (около 40 мг на 500 л культуры) (4) и значительно возрастает только при обработке клеток митомидином (3). Хотя выход пиоцина при у.-ф. индукции относительно невысок, тем не менее разительные изменения в составе ДНК индуцированной культуры свидетельствуют о том, что при этом, по-видимому, изменяется характер синтеза ДНК в значительной части всей популяции клеток (выход пиоцина в среду, по-видимому, еще не отражает полностью количество индуцированных клеток). Наряду с уменьшением содержания ГЦ-пар у у.-ф. индуцированных клеток резко изменяется характер метилирования ДНК. Здесь наряду с количественными изменениями (содержание МА увеличивается на порядок) происходят также качественные (после у.-ф. индукции в ДНК появляется новое основание МЦ). В ряде случаев после у.-ф. облучения клеток *P. aeruginosa* в стандартных усло-

виях индукции не происходило и пиоцин из культуральной жидкости выделить не удавалось. Это, по-видимому, связано с некомпетентностью клеток в момент облучения или какими-то иными неизвестными факторами. В этих случаях ДНК у.-ф. облученных клеток (культуры №№ 9—11) по составу и минорным основаниям от ДНК исходных клеток не отличались. Тем самым, изменения в составе и характере метилирования ДНК в клетках *P. aeruginosa* R. связаны именно с у.-ф. индуцированным образованием пиоцина, а не с каким-то иным действием у.-ф. света на клетки. Отмеченные изменения в составе обычных оснований заставляют предположить, что после индукции в клетках начинается репликация только какой-то определенной части ДНК (по-видимому, генома профага), которая существенно отличается по составу от ДНК исходных клеток. На наш взгляд, сегодня уже не удивительно, что избирательная репликация такой «профаговой» ДНК может вызвать заметные изменения в составе ДНК клеточной популяции, так как известно, что ДНК некоторых умеренных фагов (PBS2) обладает меньшим содержанием ГЦ-пар и в этом отношении резко отличается от ДНК хозяина (14). Уменьшение ГЦ-пар в ДНК индуцированных клеток позволяет думать, что ДНК дефектного фага, ответственная за образование пиоцина, отличается от собственно бактериальной ДНК меньшим содержанием ГЦ-пар. По-видимому, эта профаговая ДНК является двутяжной, так как комплементарность состава ДНК после индукции не нарушается.

Изменения в характере метилирования указывают на то, что в ходе индукции появляются особые специфические ДНК-метилазы. В частности, видимо, заново появляется метилаза, осуществляющая модификацию остатков цитозина (в неиндуцированных клетках МЦ не выявляется даже в том случае, когда количество анализируемой ДНК в несколько раз превышает количество ДНК индуцированных клеток). По-видимому, эта ДНК-метилаза закодирована в геноме дефектного профага и начинает транскрибироваться только после его индукции. Судя по резкому увеличению количества МА в ДНК индуцированных клеток, индукция пиоцина сопровождается также и индукцией нового фермента, метилирующего остатки аденина в ДНК. К сожалению, мы не можем еще сказать, какие ДНК (хозяйские или профаговые) подвержены избирательному действию этих индуцированных ферментов.

Не исключено, что обнаруживаемое в ДНК исходной культуры небольшое количество МА может принадлежать именно геному профага, а не хозяина. Известно, что некоторые метилазы (РНК-метилаза) могут синтезироваться на геноме умеренного профага в неиндуцированной клетке (15). В то же время, этот МА в ДНК исходных клеток может быть отражением спонтанной индукции пиоцина, однако, по литературным данным, количество спонтанно индуцируемых клеток обычно слишком мало (не более 1%) (1, 16). Как бы там ни было, совершенно определено то, что индукция пиоцина в клетках *P. aeruginosa* R. сопровождается резким изменением состава и характера метилирования ДНК. В этой связи можно было бы думать, что некоторые известные превращения микроорганизмов с выраженным изменением состава ДНК под влиянием голодания (щелочеобразователи) (17) или других мутагенных факторов могли произойти в результате индукции и последующей редупликации генома профагов в бактериальной хромосоме. По-видимому, известное отношение к этому имеет также необычно высокое содержание МЦ в ДНК щелочеобразователей (0,62 мол.%) (13).

Высокая специфичность метилирования ДНК бесспорно указывает на связь этой естественной модификации генома с явлением дифференцировки видов (13, 18). Так, например, диссоциация и превращение R-клеток в S-клетки у *Bacillus brevis* отражаются в характере метилирования ДНК (13). Поэтому мы склонны думать, что это превращение связано с индукцией профага в клетках *Bac. brevis* и появлением особых ДНК-

метилаз. Настоящая работа о связи индукции профага (появления пиоци-на) с изменением характера метилирования ДНК в клетках *P. aeruginosa* еще раз подкрепляет это предположение.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
19 III 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ F. Jacob, *Ann. Inst. Pasteur*, 86, 149 (1954). ² M. Kageyama, F. Egami, *Life Sci.*, 9, 471 (1962). ³ K. Ikeda, F. Egami, *Zs. allgem. Mikrobiol.*, 6, 219, (1966).
⁴ П. П. Гаряев, Б. Ф. Поглазов, *Биохимия*, 34, 585 (1969); 35, 304 (1970).
⁵ D. V. Dunn, J. D. Smith, *Biochem. J.*, 68, 627 (1958). ⁶ E. C. Theil, S. Zamenhof, *J. Biol. Chem.*, 238, 3058 (1963). ⁷ A. Yudelevich, M. Gold, *J. Mol. Biol.*, 40, 77 (1969). ⁸ G. Medoff, M. N. Swartz, *J. Gen. Virol.*, 4, 15 (1969). ⁹ A. Ryan, E. Borek, *Biochemistry*, 3, 616 (1964). ¹⁰ Т. А. Hudnik-Plevnik, N. E. Meleschen, *J. Biol. Chem.*, 242, 4118 (1967). ¹¹ А. С. Спириц, А. Н. Белозерский и др., *Биохимия*, 22, 744 (1957). ¹² Б. Ф. Ванюшин, Н. А. Кокурина, А. Н. Белозерский, *ДАН*, 158, 722 (1964). ¹³ B. F. Vanyshin, A. N. Belozersky et al., *Nature*, 218, 1066 (1968). ¹⁴ I. Takahashi, J. Marmur, *Nature*, 197, 794 (1963). ¹⁵ E. Wainfan, D. W. Visser, *Virolog.*, 37, 148 (1969). ¹⁶ Y. Hamon, *Ann. Inst. Pasteur*, 91, 82 (1956). ¹⁷ А. С. Спириц, А. Н. Белозерский и др., *Биохимия*, 23, 154 (1958). ¹⁸ Б. Ф. Ванюшин, *Усп. совр. биол.*, 65, 163 (1968).