

УДК 547.963.3+577.157.6

БИОХИМИЯ

Я. И. БУРЬЯНОВ, В. А. ЛАМБИНА, И. Г. БОГДАРИНА

**ДНК-МЕТИЛАЗНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ В КЛЕТКАХ
PSEUDOMONAS FLUORESCENS ДО И ПОСЛЕ ЗАРАЖЕНИЯ
BDELLOVIBRIO BACTERIOVORUS**

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 16 VI 1972)

В 1962 г. были впервые описаны ранее неизвестные микроорганизмы, паразитирующие на бактериях ⁽¹⁾. Эти паразитические бактерии были отнесены к новому роду и виду *Bdellovibrio bacteriovorus*. Установлены широкое распространение *Bd. bacteriovorus* в природных субстратах и значительная вариабельность формы и размеров клеток в зависимости от различных факторов ⁽²⁾.

В последние годы представлены данные исследования свойств ДНК *Bdellovibrio*. ДНК двух групп этого рода содержат 50% и 43% ГЦ-пар оснований ⁽³⁾. По степени гомологичности своих ДНК представители *Bdellovibrio* в настоящее время разделены на 3 группы ⁽⁴⁾. Данные об отсутствии в ДНК *Bdellovibrio* необычных азотистых оснований ⁽³⁾ можно поставить под сомнение, так как применяемая авторами этой работы методика не позволяет определять микроколичества редких компонентов ДНК.

О ферментах, действующих на полинуклеотидном уровне в клетках этих микроорганизмов, нет никаких данных.

В настоящей работе представлены результаты анализа нуклеотидного состава ДНК *Pseudomonas fluorescens* и данные о ДНК-метиلاзной активности в бесклеточных экстрактах из *Ps. fluorescens* до и после заражения *Bd. bacteriovorus*.

Выращивание *Ps. fluorescens* ИБФМ-В22 проводили на качалке на дрожжево-пептонной среде, pH 7,2 ⁽⁵⁾ при 29° в течение 18 час. Культуру отмывали 0,2 М KCl + 0,15 М NaCl и хранили в замороженном состоянии при -30°. Для определения минорного нуклеотидного состава ДНК клетки *Ps. fluorescens* раздельно выращивали в присутствии 8-С¹⁴-аденина (уд. акт. 55 мС/г) и 2-С¹⁴-оротовой кислоты (уд. акт. 60 мС/г) в концентрации 2 мС/мл на глюкозо-минеральной среде, pH 7,2. Для заражения клеток *Ps. fluorescens* использовали культуру *Bd. bacteriovorus* ИБФМ-В609. Множественность заражения 0,2. Зараженную культуру выращивали на качалке в разбавленной в 4 раза дрожжево-пептонной среде при 29° в течение 21 часа. За это время подавляющая масса клеток *Ps. fluorescens* имела форму сферопластов. Известно, что проникновение паразита внутрь клетки приводит к образованию «сферопластов» у бактерий-хозяина ^(6, 7). «Сферопласты» отмывали специальной средой ⁽⁸⁾ в присутствии 0,001 М 2-меркаптоэтанола. Отмытые клетки разрушали путем экструзии в замороженном состоянии под давлением около 2000 кг/см². К 6 г гомогената добавляли 10 мл 0,01 М трис-НСl, pH 8, 0,01 М MgCl₂ и 0,01 М 2-меркаптоэтанола и центрифугировали 40 мин. при 45000 g на холоду. Супернатант разбавляли в 1,5 раза 0,002 М трис-НСl pH 8 + 0,002 М MgCl₂ + 0,01 М 2-меркаптоэтанола и центрифугировали 1 час при 165 000 g на холоду. Полученный бесклеточный экстракт использовали для метилирования ДНК. Энзиматическое метилирование ДНК проводили в реакционной среде следующего состава: 40 мкмол. трис-НСl, pH 8; 2 мкмоль MgCl₂; 4 мкмоль 2-меркаптоэтанола; 0,01 мкмоль S-аденозил-L-метионина (метил-С¹⁴) (уд. акт.

47 мкС/моль (Amersham, Англия); 0,3 ммоля ДНК (в пересчете на нуклеотиды); 4 мкг РНКазы, 1 мг белка бесклеточного экстракта; объем 1 мл. Реакцию проводили в течение 30 мин. при 30°, затем добавляли равный объем 0,75 М NaOH и далее производили выделение ДНК и определение нуклеотидного состава как описано (⁹). ДНК из зубной железы теленка и *Ps. fluorescens*, используемые в ДНК-метилазных реакциях, выделяли по Мармуру (¹⁰). В опытах по определению радиоактивности среди азотистых оснований к полученному гидролизату ДНК добавляли синтетические препараты 5-метилцитозина, 6-метиламинопурина и 6-диметиламинопурина. Для определения радиоактивности в зонах различных азотистых оснований использовали бумажную хроматографию в системах *n*-бутанол : вода : 25% аммиак (60 : 10 : 0,1); *n*-бутанол : вода : 1 N NH₄OH (86 : 13 : 1); абсолютный метанол : концентрированная HCl : вода (70 : 20 : 10). В этом случае зоны 5-метилцитозина, 6-метиламинопурина, 6-диметиламинопурина и тимина вырезали, элюировали на вытекание 0,01 N HCl, элюаты упаривали и многократно рехроматографировали в 3 указанных выше растворителях. После окончательной рехроматографии элюаты собирали на алюминиевые подложки, высушивали и измеряли их радиоактивность на газопроточном счетчике «Протока». Все представленные величины по радиоактивности даны с вычитанием фона. В ДНК, выделенной из клеток, выращенных в присутствии 2-С¹⁴-оротовой кислоты, значительная часть радиоактивности распределилась среди пиримидинов, а при выращивании на среде с 8-С¹⁴-аденином — среди пуринов. Наряду с аденином и цитозином заметная радиоактивность была обнаружена также и в 6-метиламинопуриле (МА), 6-диметиламинопурине (диМА) и 5-метилцитозине (МЦ). Для цитозина и МЦ величины радиоактивности (имп/мин) соответственно равны 32 381 и 219, для аденина, МА и диМА — соответственно 250 780, 108 и 96. Определение количественного содержания метилированных азотистых оснований по радиоактивности дает следующие результаты: МЦ составляет 0,67% от цитозина, МА 0,043% от аденина, диМА 0,038% от аденина.

Приводим нуклеотидный состав ДНК (в мол.%) *Ps. fluorescens* с учетом данных по количественному определению минорных азотистых оснований: Г 30,57±0,22; Ц 31,20±0,49; А 19,23±0,14; Т 18,76±0,37; МЦ 0,21; МА 0,083; диМА 0,073.

Для 4 обычных азотистых оснований эти данные являются средними из 6 отдельных определений в 3 гидролизатах ДНК. До настоящего времени было известно, что в ДНК нескольких изученных видов *Pseudomonas* содержится только МА (¹¹, ¹²). И только индукция профага и синтез дефектных фаговых частиц (пиоцина) в клетках *Ps. aeruginosa* R. под действием ультрафиолета приводит к появлению МЦ в суммарной ДНК бактерий и профага (¹²). Тот факт, что в ДНК других изученных видов *Pseudomonas* МЦ не пайдэн, может свидетельствовать о видовой специфичности метилирования ДНК у бактерий рода *Pseudomonas*. В то же время данные о составе минорных азотистых оснований в ДНК, полученные обычным анализом, сочетающим хроматографию и у.-ф. спектрофотометрию, не всегда могут быть полными. Это вызвано часто весьма незначительным содержанием минорных компонентов в ДНК. Вместе с тем, использование более чувствительного метода анализа по радиоактивности позволяет обнаруживать даже 1 остаток минорного основания на всю молекулу ДНК (¹³). Не исключено, что применение подобного метода позволяет обнаружить и иные, еще не известные для ДНК минорные компоненты. Именно с этой точки зрения мы и рассматриваем обнаружение по радиоактивности диМА в ДНК *Ps. fluorescens*. Результаты ферментического метилирования ДНК экстрактами из незараженных клеток и «сферопластов» *Ps. fluorescens* представлены в табл. 1. Во всех опытах радиоактивность в МЦ и МА более чем в 10–20 раз превышала суммарную радиоактивность в зонах аденина и цитозина.

Из данных по ДНК-метилазной активности в экстракте из незараженных клеток *Ps. fluorescens* следует, что эти клетки, действительно, обладают ДНК-метилазами для модификации остатков цитозина с образованием МЦ и аденина с образованием МА. В опытах по энзиматическому метилированию ДНК достоверной радиоактивности в зоне диМА обнаружить не удалось.

Приведенные в табл. 1 данные по ДНК-метилазной активности в бесклеточных экстрактах из «сферопластов» свидетельствуют об изменении ДНК-метилазной специфичности в клетках *Ps. fluorescens*, инфицированных

Таблица 1

Энзиматическое метилирование ДНК экстрактами из незараженных клеток *Ps. fluorescens* и их «сферопластов»

Источник ДНК-метилаз	Источник ДНК	Радиоактивность, имп/мин	
		МЦ	МА
Незараженные клетки	Зобная железа теленка	251	80
«Сферопласты»	То же	14	107
Незараженные клетки	<i>Ps. fluorescens</i>	13	7
«Сферопласты»	То же	23	136

ных *Bd. bacteriovorus*. На это указывает снижение практически до нуля ДНК-метилазной активности по цитозину и сохранение ДНК-метилазной активности по аденину. Кроме того, на изменение ДНК-метилазной специфичности в бактериальных клетках, зараженных *Bdellovibrio*, указывают и результаты метилирования ДНК *Ps. fluorescens* двумя бесклеточными экстрактами. Как известно, ДНК-метилазы не метилируют *in vitro* гомологичные ДНК, так как в нормальных условиях они уже осуществили эту модификацию в клетках, и поэтому *in vitro* обычно можно зафиксировать включение дополнительных метильных групп лишь в гетерологичные ДНК (¹⁴).

Таким образом, тот факт, что ДНК *Ps. fluorescens* не метилируется экстрактом из незараженных клеток *Ps. fluorescens*, но метилируется экстрактом из клеток, инфицированных *Bdellovibrio*, свидетельствует о появлении новой ДНК-метилазной специфичности в клетках, содержащих паразитирующие *Bdellovibrio*. Известно, что в момент прикрепления и проникновения *Bd. bacteriovorus* в клетку-хозяина наблюдается дезорганизация ядерного вещества хозяина (¹⁵), а в самом «сферопласте» происходит размножение *Bdellovibrio* и разрушение структур хозяина (⁶, ⁷). В наших опытах инфицированные клетки *Ps. fluorescens* выращивали 21 час, а спустя 1 час наблюдается полное разрушение инфицированных бактерий и от них остаются лишь «тени». На основании этих данных можно предположить, что новая наблюдаемая ДНК-метилазная специфичность в бесклеточных экстрактах из «сферопластов» связана с ДНК-метилазами паразита бактерий *Bd. bacteriovorus*.

Окончательный вывод будет получен при изучении ДНК-метилаз чистой культуры *Bd. bacteriovorus* и анализе минорного состава азотистых оснований ее ДНК.

Выражаем глубокую благодарность чл.-корр. АН СССР Г. К. Скрыбину за постоянное внимание и поддержку.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР
Пушино-на-Оке

Поступило
15 VI 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. Stolp, H. Petzold, *Phytopathology*, 45, 364 (1962).
- ² Е. Н. Мишустин, Э. С. Никитина, *Изв. АН СССР, сер. биол.*, № 3, 423 (1970).
- ³ R. J. Seidler, M. P. Starr, M. Mandel, *J. Bacteriol.*, 100, 786 (1969).
- ⁴ R. J. Seidler, M. Mandel, J. N. Baptist, *J. Bacteriol.*, 109, 209 (1972).
- ⁵ Н. Stolp, M. P. Starr, *J. Microbiol. Serol.*, 29, 217 (1963).
- ⁶ M. P. Starr, N. L. Baigent, *J. Bacteriol.*, 91, 2006 (1966).
- ⁷ A. Guelin, P. Lepine et al., *C. R., D* 266, № 26, 2500 (1968).
- ⁸ H. Mahler, D. Fraser, *Biochim. et biophys. acta*, 22, 197 (1956).
- ⁹ Б. Ф. Ванюшин, *В сборн. Современные методы в биохимии*, 1, М., 1964.
- ¹⁰ J. Marmur, *J. Mol. Biol.*, 3, 208 (1961).
- ¹¹ В. Ф. Ванюшин, А. Н. Белозерский et al., *Nature*, 218, 1066 (1968).
- ¹² Б. Ф. Ванюшин, Н. А. Кокурина, А. Н. Белозерский, *ДАН*, 193, 215 (1970).
- ¹³ A. Razin, J. W. Sedat, R. L. Sinsheimer, *J. Mol. Biol.*, 53, 251 (1970).
- ¹⁴ M. Gold, J. Hurwitz, *J. Biol. Chem.*, 239, 3858 (1964).
- ¹⁵ В. А. Ламбина, В. И. Бирюзов и др., *Тез. докл. IV съезда Всесоюзн. микробиол. общ.*, Минск, 1971, стр. 27.