

Я. И. БУРЬЯНОВ, Г. П. ДЬЯЧЕНКО, Н. В. ЕРОШИНА,
А. В. ИЛЬИН, О. Ф. КОРСУНСКИЙ

**ХАРАКТЕР РАСПРЕДЕЛЕНИЯ 5-МЕТИЛЦИТОЗИНА
В ПИРИМИДИНОВЫХ ИЗОПЛИТАХ РАЗЛИЧНЫХ ДНК,
МЕТИЛИРОВАННЫХ В ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ДНК-МЕТИЛАЗНОЙ
РЕАКЦИИ**

(Представлено академиком А. С. Спириным 16 V 1973)

Большинство исследований, связанных с энзиматическим метилированием ДНК на полинуклеотидном уровне, проведено на микроорганизмах. Одним из основных достижений этих работ явилось обнаружение видовой и штаммовой специфичности бактериальных ДНК-метилаз (¹).

Благодаря существованию четко выраженной специфичности ДНК-метилаз возможно проведение гетерологичных ДНК-метилазных реакций *in vitro* (^{1, 2}). Сущность этого явления заключается в следующем. Если ДНК метилирована в клетке нормально, то гомологичные ДНК-метилазы не переносят на свою ДНК метильные группы *in vitro*, так как в таких ДНК уже отсутствуют свободные акцептирующие участки. Однако эти ДНК способны дополнительно акцептировать метильные группы в присутствии гетерологичных ферментов. Этот факт с достаточной убедительностью доказывает, что разные ДНК-метилазы «настроены» на специфические нуклеотидные последовательности. Анализ метилированных нуклеотидных участков ДНК имеет важное значение для выяснения механизма действия ДНК-метилаз и в решении проблемы узнавания на уровне взаимодействия «белок — нуклеиновая кислота». Кроме того, получение такой информации имеет значение и для понимания функциональной роли энзиматической модификации ДНК.

Мы обладаем пока немногочисленными данными относительно расположения метилированных азотистых оснований в полинуклеотидных последовательностях различных ДНК (³⁻⁶). Что касается локализации вновь включенных метилированных азотистых оснований в цепи ДНК, метилированной в гетерологичной ДНК-метилазной реакции, то такие данные полностью отсутствуют.

В проведенной работе нами впервые получены данные по характеру распределения вновь включенного 5-метилцитозина (5-МЦ) в ДНК различного происхождения, которые были метилированы гетерологичной ДНК-метилазой *Escherichia coli* MRE-600.

В опыте использовали бесклеточный экстракт *E. coli* MRE-600. Источником ДНК-метилазной активности служил супернатант 165 000 g, полученный путем дифференциального центрифугирования (⁷).

В гетерологичной ДНК-метилазной реакции участвовали ДНК *E. coli* В, *Pseudomonas fluorescens* и зубной железы телят. Энзиматическое метилирование ДНК проводили в реакционной среде следующего состава (в μ молях): трис-НСl, рН 8,0, 40; MgCl₂ 2; 2-меркаптоэтанол 4; S-аденозил-*L*-метионин (метил-С¹⁴) (уд. акт. 47 μ С/ μ моль) («Amersham», Англия) 0,01; ДНК 0,3 (в пересчете на нуклеотиды); РНКазы 4 μ г; белок бесклеточного экстракта 1 мг; объем 1 мл. Реакцию проводили при 37° в течение 40 мин. Предварительными опытами установлено, что за это время происходит насыщение различных ДНК метильными группами. Реакцию пре-

крапали добавлением равного объема хлороформа и далее ДНК выделяли по методу Мармура (8).

ДНК подвергали по методу Бартон деградации до пиримидиновых последовательностей в 66% муравьиной кислоте, содержащей 2% дифениламин (9). Пиримидиновые изоплиты делили на ДЭАЭ-сефадексе А-25 в 0,01 *M* натрийацетатном буфере, pH 5,65 в линейном градиенте хлористого натрия (0—0,35 *M*) в присутствии 5 *M* мочевины. Так как в результате ДНК-метиلاзной реакции радиоактивность обнаруживали только в минорных метилированных основаниях, то о количественном содержании 5-МЦ в изоплитах судили по радиоактивности, связанной с включением $C^{14}H_3$ -групп S-аденозилметионина в 5-метилцитозин. Для этого выделенные изотопы обессоливали (10), высушивали и измеряли радиоактивность на сцинтилляционном спектрометре SL-30, «Intertechnique» (Франция) в сцинтилляционном растворе в толуоле. Для определения минорного нуклеотидного состава и распределения 5-МЦ в ДНК *E. coli* MRE-600 клетки раздельно выращивали в присутствии 8- C^{14} -аденина (уд. акт. 55 мС/г) и 2- C^{14} -оротовой кислоты (уд. акт. 60 мС/г) в концентрации 2 мС/мл на глюкозо-минеральной среде.

Пиримидиновые изоплиты после обессоливания гидролизovali в 57% $HCIO_4$ (1 час, 100°). К гидролизату ДНК добавляли синтетические препараты 5-метилцитозина и 6-метиламинопурина, а к гидролизатам пиримидиновых изоплит — 5-метилцитозин. Бумажную хроматографию в системах *n*-бутанол — вода — 25% аммиак (60:10:0,1), абсолютный метанол — концентрированная HCl — вода (70:20:10), *n*-бутанол — вода — 98% муравьиная кислота (77:13:10) использовали для определения радиоактивности в зонах различных азотистых оснований. Зоны 5-МЦ и МА вырезали,

Таблица 1

Частота встречаемости 5-метилцитозина в пиримидиновых изоплитах различных ДНК (в % от всего 5-МЦ)

ДНК	Изоплиты						
	1	2	3	4	5	6	>6
ДНК <i>E. coli</i> B	1,50	87,75	6,31	2,32	1,33	0,59	0,84
ДНК <i>Ps. fluorescens</i>	1,16	84,30	9,15	2,78	1,12	0,89	0,58
ДНК тимуса теленка	0,85	26,16	37,25	15,50	6,46	6,43	5,85
ДНК <i>E. coli</i> MRE-600 (метилирование in vivo)	2,68	44,60	27,54	12,48	5,75	2,74	4,10

элюировали на вытекание 0,01 *M* HCl, элюаты упаривали и многократно рехроматографировали в разных растворителях. После окончательной рехроматографии пятна азотистых оснований вырезали и измеряли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике.

Участвующие в реакции ДНК имеют следующий нуклеотидный состав (в мол.%): *E. coli* B: ГЦ 52,2; МА 0,50; 5-МЦ 0; *Ps. fluorescens*: ГЦ 62; МА 0,15; 5-МЦ 0,21; зубной железы теленка: ГЦ 44; МА 0; 5-МЦ 1,5.

Таким образом, выбранные для экспериментов ДНК различались по нуклеотидному составу, а также по степени и характеру метилирования. В гетерологичной ДНК-метиلاзной реакции степень метилирования, выраженная в пМ CH_3 -групп, включенных в 100 нМ ДНК, составляла для ДНК *E. coli* B 7,4; *Ps. fluorescens* 20,0; зубной железы теленка 8,1. Данные по распределению 5-МЦ в пиримидиновых изоплитах указанных ДНК, метилированных ДНК-метилазой *E. coli* MRE-600, представлены в табл. 1. Кроме того, в табл. 1 представлены данные по частоте встречаемости 5-МЦ в пиримидиновых изоплитах ДНК *E. coli* MRE-600, метилированной в клетке.

Прежде всего, обращает на себя внимание сходство всех ДНК по незначительному метилированию «одионого» цитозина. По чрезвычайно ма-

лой степени метилирования цитозина в последовательности Pur — Cyt — Pur ДНК-метилаза *E. coli* проявляет тот же характер специфичности действия в гетерологичной реакции, как и *in vivo*, и совершенно отличается от ДНК-метилаз животных⁽³⁻⁶⁾.

Как известно, в ДНК животных максимальное количество 5-МЦ (до 70% всего 5-МЦ) сосредоточено как раз в последовательности Pur — Cyt — Pur, т. е. в фракции «одиночного» цитозина.

Несмотря на различную акцепторную способность, ДНК *E. coli* В и *Ps. fluorescens* обнаруживают значительнейшее сходство в распределении вновь включенного 5-МЦ по всем изоплитам. Поразительным фактором оказалось сосредоточение вновь включенного 5-МЦ во фракции пиримидиновых динуклеотидов (около 90% всего 5-МЦ).

ДНК зубной железы теленка, проявляя сходство с бактериальными ДНК в чрезвычайно малой степени метилирования «одиночного» цитозина, в то же время отличается от бактериальных ДНК по характеру метилирования олигопиримидиновых последовательностей. Так, например, в результате гетерологичного метилирования ДНК зубной железы теленка максимальное количество вновь включенного 5-МЦ оказывается во фракции тринуклеотидов, а не динуклеотидов, как это имеет место в бактериальных ДНК. В то же время характер распределения 5-МЦ в пиримидиновых олигонуклеотидах ДНК *E. coli* MRE-600, метилированной гомологичной ДНК-метилазной системой в клетке, отличается от распределения 5-МЦ во всех гетерологичных ДНК, метилированных *in vitro*.

Следует обратить внимание на то, что все рассмотренные различия наблюдаются на уровне пиримидиновых олигонуклеотидов, а одиночный цитозин всегда метилирован незначительно. Незначительное метилирование одиночного цитозина во всех изученных ДНК, по-видимому, указывает на то, что характер метилирования ДНК в гетерологичной ДНК-метилазной реакции в большей мере определяется ДНК-метилазой, чем ДНК. В то же время гетерологичные ДНК проявляют заметные особенности в картине метилирования олигопиримидиновых последовательностей и отличаются от модифицированной *in vivo* ДНК *E. coli* MRE-600. Исходя из вероятного сходства первичных структур ДНК *E. coli* MRE-600 и *E. coli* В и отсутствия 5-МЦ в ДНК *E. coli* В, следовало ожидать, что в гетерологичной ДНК-метилазной реакции характер метилирования цитозина в ДНК *E. coli* В окажется таким же, как и в ДНК *E. coli* MRE-600. Однако по частоте встречаемости вновь включенного 5-МЦ в пиримидиновых изоплитах ДНК *E. coli* В отличается от ДНК *E. coli* MRE-600. Вероятно, в бесклеточном бактериальном экстракте присутствует несколько ДНК-метилаз, модифицирующих одно азотистое основание в различных нуклеотидных последовательностях, причем *in vitro* координированное действие этих ферментов нарушено. Этим можно объяснить отличия в характере метилирования олигопиримидиновых последовательностей всех гетерологичных ДНК, и в первую очередь ДНК *E. coli* В, от метилирования гомологичной ДНК *E. coli* MRE-600 *in vivo*.

Авторы выражают искреннюю благодарность академику А. С. Спирину за полезные советы и замечания.

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

Поступило
3 V 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Gold, J. Hurwitz, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 50, 164 (1963).
² M. Gold, J. Hurwitz, J. Biol. Chem., 239, 3866 (1964). ³ J. Doskocil, F. Sorm, Biochim. et biophys. acta, 55, 953 (1962). ⁴ J. Doskocil, Physiol. Gene and Mutat. Express., Prague, Czechoslov. Acad. Sci., 1966, p. 317. ⁵ A. Razin, J. Sedat, R. Sinsheimer, J. Mol. Biol., 53, 251 (1970). ⁶ B. F. Vanyushin, Ya. I. Burianov, A. N. Belozersky, Nature New Biol., 230, 25 (1971). ⁷ Я. И. Бурьянов, В. А. Ламбина, И. Г. Богдарина, ДАН, 208, 1476 (1973). ⁸ J. Marmur, J. Mol. Biol., 3, 208 (1961). ⁹ K. Burton, Biochem. J., 77, 547 (1960). ¹⁰ G. Rushizky, H. Sober, Biochim. et biophys. acta, 55, 217 (1962).