

Б. Ф. ВАНЮШИН, В. Н. ДАНИЛЕВИЧ, А. М. ЛЫСЕНКО

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ 5-МЕТИЛЦИТОЗИНА В ДНК ФАГА ДД7

(Представлено академиком А. С. Спириным 29 III 1973)

В ДНК фага ДД7 в качестве минорных оснований нами выявлены 5-метилцитозин (МС) и N⁶-метиладенин (МА) ⁽¹⁾. Содержание МС в ДНК этого фага вдвое меньше, чем в ДНК хозяина *Escherichia coli* С и составляет 0,13 мол. % ⁽¹⁾. МС обнаружен также в ДНК фагов λ ⁽²⁾ и ϕ X174 ⁽³⁾. МС возникает в ДНК в результате избирательного метилирования определенных немногочисленных остатков цитозина специфическими ДНК-метиلاзами. Недавно было показано, что это метилирование ДНК в клетках *E. coli* может быть связано с хозяйской модификацией фаговой ДНК, контролируемой определенными плазмидами ⁽⁴⁾. Однако модификация цитозиновых остатков в ДНК, по-видимому, имеет полифункциональное значение, и ее роль еще не совсем ясна. О характере распределения (локализации) МС в фаговых ДНК до сих пор практически ничего неизвестно.

В настоящей работе изучено содержание МС в разных по длине и составу пиримидиновых блоках и предпринята попытка однозначно установить локализацию этого минорного основания в некоторых пиримидиновых фрагментах, выделенных из ДНК фага ДД7.

Фаг ДД7 выращивали, как и ранее ⁽⁵⁾, на клетках штамма *E. coli* С (мет⁻) в присутствии (метил-N³)-метионина (1,0 мкМ «Amersham»). После удаления бактериальных клеток центрифугированием из фаголизатов выделяли и очищали с помощью хроматографии на волокнистой ТЭАЭ-целлюлозе фаг ДД7 ⁽⁶⁾. Из этих препаратов фага по методу Мармура ⁽⁷⁾ выделяли высокомолекулярную ДНК, которая содержала радиоактивность в МА и МС. Эту ДНК гидролизовали до пиримидиновых последовательностей по методу Бартона ⁽⁸⁾. Пиримидиновые фрагменты (Ру_nР_{n+1}) разделяли по длине и составу с помощью разработанного нами метода жидкостной хроматографии олигодезоксирибонуклеотидов на ДЭАЭ-сефадексе (А-25, «Pharmacia») ⁽⁹⁾. Путем хроматографии при рН 6,0 пиримидиновые фрагменты гидролизата ДНК разделяли по длине на отдельные изоплиты *, а затем полученные изоплиты (моно-, ди-, три- и тетрануклеотиды) разделяли при рН 3,0 на фракции, различающиеся по составу. Количество более длинных олигонуклеотидов ($n \geq 5$) в фаговой ДНК относительно невелико, и радиоактивность их довольно низка, поэтому такие пиримидиновые блоки по составу не разделяли и радиоактивность определяли только в изоплитах. Выделенные пиримидиновые олигонуклеотиды обессоливали и измеряли их радиоактивность на сцинтилляционных счетчиках «Mark 1» или «Mark 2» («Nuclear Chicago») с эффективностью счета для трития не менее 30%. Суммарную радиоактивность всех пиримидиновых олигонуклеотидов принимали за 100% и рассчитывали процентное содержание активности, т. е. МС, в каждом изоплите. Аналогичным образом суммарную радиоактивность отдельных компонент того или иного изоплита принимали за 100% и рассчитывали по активности процентное содержание МС в разных по составу олигонуклеотидах данного изоплита.

* Изоплит — смесь олигонуклеотидов с одинаковым количеством нуклеотидных остатков.

Ниже представлены результаты изучения распределения радиоактивности МС по пиримидиновым изоплитам.

Изоплиты	Количество МС, % от всего МС в ДНК
I	0,98±0,37
II	36,52±0,38
III	37,80±0,30
IV	12,01±0,27
V	5,09±0,24
VI	3,32±0,26
≥ VII	4,28±0,34

Суммарная радиоактивность всех пиримидиновых изоплит в каждом отдельном определении составляла около 3000 имп/мин. Количество параллельных определений равно 6. Общее количество МС в ДНК фага ДД7 составляет 0,13 мол. % ⁽¹⁾.

Прежде всего следует отметить, что в ДНК фага ДД7 МС в монопиримидиновой фракции практически отсутствует (радиоактивность всех нуклеотидов этой фракции составляет менее 1% от радиоактивности всего МС ДНК фага ДД7). Иными словами, в ДНК фага ДД7 МС не содержится в последовательности Pu—МС—Pu. Этим ДНК фага ДД7 сходна с ДНК клеток хозяина ⁽¹⁰⁾ и существенно отличается от ДНК высших растений и животных, у которых подавляющее количество МС (около 2/3) локализовано именно в последовательности Pu—МС—Pu ^(11, 12).

В ДНК фага ДД7 подавляющее количество МС (около 70%) локализовано в пиримидиновых ди- и тринуклеотидных последовательностях. Содержание МС в тринуклеотидах несколько выше, чем в динуклеотидах. Поскольку общее количество тринуклеотидов (7,91 мол.%) в ДНК фага несколько меньше динуклеотидов (10,80 мол.%) ⁽¹³⁾, можно заключить, что частота встречаемости МС в тринуклеотидах заметно выше, чем в динуклеотидах. МС обнаружен также во всех более длинных выделенных пиримидиновых изоплитах, однако его количество в тетрануклеотидах примерно втрое меньше, чем в тринуклеотидах. Между тем, по общему количеству нуклеотидного материала три- и тетрануклеотиды различаются не так существенно (соответственно 7,9 и 5,7 мол.%) ⁽¹³⁾. Все эти факты указывают на то, что распределение МС по изоплитам в ДНК фага ДД7 не является хаотичным и имеет выраженный специфический характер. Это заключение еще более упрочилось в результате анализа распределения МС в разных по составу фракциях олигонуклеотидов, выделенных из некоторых изоплит (табл. 1). Так, например, при анализе пиримидиновых динуклеотидов оказалось, что практически вся радиоактивность этого изоплита принадлежит последовательности СС*. Во фракции состава СТ она составляет менее 2% от радиоактивности всех динуклеотидов. Не исключено, что эта «мизерная» радиоактивность может представлять собой остаточную следовую метку СС. Иными словами, в ДНК фага, как это справедливо и для ДНК *E. coli* ⁽¹⁰⁾, МС не содержится в последовательности СТ и ТС. Любопытно заметить, что единственный остаток МС в ДНК фага φX174 содержится именно в этой последовательности (СТ или ТС) ⁽³⁾. Тем самым изученный нами фag ДД7 резко отличается от фага φX174 не только по уровню, но и по специфичности метилирования ДНК, несмотря на то что эти фаги репродуцируются в клетках одного и того же хозяина (*E. coli* C). Так как практически вся радиоактивность динуклеотидов принадлежит фракции СС и составляет 35,8% от активности всех пиримидиновых олигонуклеотидов (табл. 1), в ДНК фага ДД7 по крайней мере около 1/3 всего МС локализовано в последовательности Pu—С—С—Pu.

Во фракции тринуклеотидов небольшая радиоактивность обнаружена в олигонуклеотиде Сз, однако подавляющее количество метки этого изопли-

* С — цитозин, Т — тимин.

та (>94%) сосредоточено в олигонуклеотидах состава C_2T . В олигонуклеотидах состава CT_2 радиоактивности нет вообще. Таким образом, в ДНК фага ДД7, кроме отмеченной ранее последовательности CC , метилированный цитозин содержится в тринуклеотидах CCC , C_2T и отсутствует в CT_2 . К такому же выводу о распределении MC в пиримидиновых тринуклеотидах ДНК *E. coli* пришли ранее Доскочил и Шормова (¹⁰). Тем самым можно думать, что специфичность метилирования остатков цитозина в фаговой и хозяйской ДНК может быть одинаковой.

Таблица 1

Содержание 5-метилцитозина в пиримидиновых блоках разного состава из ДНК фага ДД7 ($\bar{X} \pm \sigma$)

Изоплит	Состав олигонуклеотидов	Содержание MC	
		% от MC данного изоплита	% от всего MC ДНК фага
II	C_2	98,04 ± 0,33	35,8
	CT	1,96 ± 0,28	0,7
	T_2	Нет	
III	C_3	5,96 ± 0,51	2,3
	C_2T	94,04 ± 0,37	35,5
	CT_2	Нет	
IV	T_3	Нет	
	C_4	4,82 ± 0,47	0,6
	C_3T	41,43 ± 0,42	5,0
	C_2T_2	53,75 ± 0,38	6,4
	CT_3	Нет	
	T_4	Нет	

Примечание. Число параллельных определений равно 4.

При анализе тетрануклеотидов небольшое количество радиоактивного MC мы нашли во фракции C_4 , а основное количество MC (более 95% от всего MC тетрануклеотидов) найдено в фрагментах состава C_3T и C_2T_2 (табл. 1). В олигонуклеотидах состава CT_3 MC не содержится. Все это означает, что метилирование ДНК фага ДД7 осуществляется в тех последовательностях, которые содержат по меньшей мере два остатка цитозина (C_2 , C_2T , но не CT_2 ; C_2T_2 , C_3 , C_4 и др.). Исходя из анализа тринуклеотидов и, в особенности, динуклеотидов мы заключаем, что одной из обязательных метилируемых последовательностей в ДНК фага ДД7 является последовательность, в которой содержатся подряд два цитозиновых остатка, т. е. фрагмент CC . Однако остается еще неясным, где в этом динуклеотиде находится MC (возможны сочетания: $MC - C$, $C - MC$ или $MC - MC$).

Выделенную фракцию олигонуклеотидов CC мы обработали фосфомоноэстеразой из *E. coli*, получив соответственно динуклеозидмонофосфаты (NpN), и затем фосфодиэстеразой змеиного (гюрза) яда. Предварительно мы установили, что использованный препарат «пришитой» к ДЭАЭ-целлюлозе фосфомоноэстеразы* не обладал фосфодиэстеразной активностью, а препарат фосфодиэстеразы лишен фосфомоноэстеразной активности. После количественного расщепления фосфодиэстеразой пиримидиновых динуклеозидмонофосфатов (NpN) полученные нуклеотиды (pN) были отделены от нуклеозидов (N) с помощью хроматографии на бумаге, элюированы водой и определена их радиоактивность. Оказалось, что более 95% всей радиоактивности олигонуклеотида CC сосредоточено во фракции нуклеотидов (3000 имп/мин), а в нуклеозидной фракции (N) найдено менее 5% радиоактивности (140 имп/мин). Следовательно, практически вся

* За любезное предоставление препарата «пришитой» фосфомоноэстеразы выражаем глубокую благодарность проф. Р. И. Салганику.

радиоактивность олигонуклеотида СС содержится в последовательности С — МС.

Таким образом, нами установлено, что около $\frac{1}{3}$ всего МС ДНК фага ДД7 содержится в последовательности (5') ...Pu—С—МС—Pu ... (3').

После обработки суммарной фракции пиримидиновых тринуклеотидов фосфомоно- и фосфодиэстеразой более 90% их радиоактивности высвобождается в виде нуклеотидов (pN). Это означает, что и в тринуклеотидах МС, по-видимому, не содержится на 5'-конце.

Сопоставление полученных нами ранее данных по распределению МА (⁵) с распределением МС в ДНК фага ДД7 указывает на высокую специфичность и совершенно разный характер метилирования остатков цитозина и аденина. Так, в этой ДНК МА может находиться в монопуриновой последовательности Pu—МА—Pu, а в аналогичной монопиримидиновой последовательности Pu—МС—Pu метилирования цитозина не происходит, и весь МС сосредоточен только в полипиримидиновых блоках. МА содержится на 5'-концах полипуриновых блоков (⁵, ¹⁴), а МС в качестве 5'-концевого нуклеотида в полипиримидиновых блоках не найден. Однако несмотря на эти различия все же обязательным соседом МС и МА слева является пиримидин.

По-видимому, метилазы, модифицирующие ДНК в клетках *E. coli* по остаткам цитозина, так же как и по остаткам аденина (⁵, ¹⁴), узнают такую последовательность, которая включает в себя метилируемое основание и распространяется слева от него.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
10 III 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ I. I. Nikolskaya, Z. G. Tkatcheva et al., *Biochim. et biophys. acta*, **155**, 626 (1968). ² N. Ledinko, *J. Mol. Biol.*, **9**, 834 (1964). ³ A. Razin, J. W. Sedat, R. L. Sinsheimer, *J. Mol. Biol.*, **53**, 251 (1970). ⁴ S. Hattman, *J. Virology*, **10**, 356 (1972). ⁵ Б. Ф. Ванюшин, Г. В. Боярских и др., *ДАН* **201**, 234 (1971). ⁶ Т. И. Тихоненко, И. Г. Чирикадзе и др., *Вопр. вирусол.*, **1**, 34 (1966). ⁷ J. Marmur, *J. Mol. Biol.*, **3**, 208 (1961). ⁸ K. Burton, *Biochem. J.*, **77**, 547 (1960). ⁹ А. Л. Мазин, Б. Ф. Ванюшин, *Биохимия*, **32**, 377 (1967). ¹⁰ J. Doskocil, Z. Sormova, *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.*, **30**, 2445 (1965). ¹¹ Б. Ф. Ванюшин, Л. В. Машарина, А. Н. Белозерский, *ДАН* **147**, 958 (1962). ¹² J. Doskocil, F. Sorm, *Biochim. et biophys. acta*, **55**, 953 (1962). ¹³ Б. Ф. Ванюшин, Г. В. Боярских и др., *ДАН*, **195**, 217 (1970). ¹⁴ B. F. Vanyushin, Y. I. Buryanov, A. N. Belozersky, *Nature, New Biology*, **230**, 25 (1971).