

УДК 547.963.3 : 577.157.6

БИОХИМИЯ

Б. Ф. ВАНЮШИН, Г. В. БОЯРСКИХ, И. И. НИКОЛЬСКАЯ,
А. М. ЛЫСЕНКО, Т. И. ТИХОНЕНКО

ЛОКАЛИЗАЦИЯ МЕТИЛИРУЕМЫХ ОСТАТКОВ АДЕНИНА В ПОЛИНУКЛЕОТИДНЫХ ЦЕПЯХ ДНК ФАГА ДД7 И ЕГО ХОЗЯИНА *ESCHERICHIA COLI* C

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 13 I 1971)

В ДНК фага ДД7 и *E. coli* C. в качестве минорных оснований обнаружены N⁶-метиладенин (МА) и 5-метилцитозин (¹). Эти основания образуются на полинуклеотидном уровне путем метилирования остатков аденина и цитозина особыми ДНК-метилазами (²). Из наших данных следует, что МА в цепях ДНК *E. coli* распределен весьма неравномерно и нехаотично (³, ⁴). Это указывает на специфическое и строго избирательное метилирование определенных остатков аденина в цепи ДНК. Тем не менее, до сих пор еще неизвестно, какими именно являются эти узнаваемые ДНК-метилазами последовательности, в которых происходит метилирование остатков аденина. Сравнительное изучение специфичности метилирования ДНК фага и хозяина имеет существенное значение для понимания явлений рестрикции и хозяйской модификации фагов. К сожалению, до сих пор в этом отношении фаговые ДНК остаются практически не изученными: известно только лишь, что характер распределения МА по пуриновым изоплитам в ДНК фага T₂ и *E. coli* B нехаотичен и очень близок (⁵, ⁶).

Т а б л и ц а 1

Содержание N⁶-метиладенина в пуриновых изоплитах
из ДНК *E. coli* C и фага ДД7 ($\bar{X} \pm \sigma$), %

Изоплиты	ДНК <i>E. coli</i> C		ДНК фага ДД7
	по спектрофотометрическому определению	по определению радиоактивности, включенной из C (N ³)- ₂ -метионина	
I	5,49±0,58	6,29±0,13	7,33±0,24
II	36,81±1,87	37,08±0,31	33,43±0,29
III	20,00±0,47	20,15±0,08	15,29±0,06
IV	9,01±0,93	10,07±0,38	7,96±0,28
V	9,08±1,11	10,26±0,28	11,13±0,17
VI	5,51±0,43	5,15±0,14	5,92±0,11
VII	—	3,88±0,15	3,04±0,12
≥VIII	14,10±1,22	7,12±0,08	15,90±0,38

В настоящей работе изучено содержание МА в разных по длине и составу пуриновых последовательностях из ДНК фага ДД7 и его хозяина *E. coli* C. Кроме того, установлена локализация МА в некоторых пуриновых ди- и тринуклеотидах, выделенных из ДНК фага ДД7 и *E. coli* C.

Пуриновые олигонуклеотиды получали методом химической деградации апириимидиновой ДНК анилином (3% анилин, pH 5,0, 37°, 5 час.) (⁷). С помощью хроматографии на ДЭАЭ-Сефадексе смесь пуриновых олигонуклеотидов разделяли по длине при pH 6,0 и далее по составу при pH 3,5 (⁸). Для изучения характера метилирования ДНК *E. coli* C выделенные пуриновые изоплиты (фрагменты с одинаковым числом нуклеотидных

остатков) обессоливали, гидролизовали до оснований и после отделения с помощью хроматографии на бумаге МА определяли спектрофотометрически (⁷) (табл. 1). Такой метод прямого определения МА требует очень большого количества ДНК (не менее 100 мг) даже при изучении распределения МА по изоплитам. Анализ же распределения МА в отдельных, разных по составу, пуриновых последовательностях ДНК *E. coli* С и особенно фага ДД7 таким путем практически невозможен. Поэтому мы отработали метод анализа распределения МА по учету его радиоактивности в тех или иных последовательностях ДНК фага ДД7 или клеток *E. coli* С, выращенных в присутствии меченого метионина. Для этого воздействием N-нитрозогуанидина на клетки *E. coli* С мы получили дефицитный по метионину штамм *E. coli* С (мет⁻). После выращивания клеток этого мутанта (соответственно незараженных и зараженных фагом ДД7) в присутствии (метил-Н³)-метионина (Amersham, активность 0,5 мк/мл, конечная концентрация в среде 2 мг/мл) были выделены высокомолекулярные препараты ДНК *E. coli* С и фага ДД7 (⁹), содержащие радиоактивный МА. Меченые ДНК с добавленным носителем (ДНК молок горбуши) гидролизовали в очень мягких условиях до пуриновых последовательностей (⁷); полученные пуриновые олигонуклеотиды разделяли по длине и составу, обессоливали и измеряли их радиоактивность на сцинтилляционном счетчике с эффективностью счета для трития около 30%. Практически вся радиоактивность во фракциях отдельных пуриновых последовательностей принадлежала МА. Это позволило определять количество МА в пуриновых олигонуклеотидах непосредственно по уровню содержащейся в них радиоактивности. Как это можно видеть из табл. 1, анализ содержания МА в пуриновых изоплитах ДНК *E. coli* С по радиоактивности изоплитов и по прямому спектрофотометрическому определению МА, выделенного из этих изоплитов, дает практически одинаковые результаты (табл. 1).

МА обнаружен во всех выделенных пуриновых изоплитах ДНК фага ДД7 и хозяина *E. coli* С (табл. 1). Основное количество МА (около 1/3) сосредоточено во фракции динуклеотидов. Распределение МА по изоплитам в ДНК фага ДД7 и *E. coli* С имеет примерно одинаковый характер, однако во фракции длинных олигонуклеотидов (октануклеотиды и другие) частота встречаемости МА в фаговой ДНК примерно вдвое выше чем в ДНК *E. coli* С. Подобная картина распределения МА по изоплитам выявлена при сравнительном изучении ДНК фага T₂ и *E. coli* В (^{5, 6}).

Использование для анализа меченых ДНК позволило нам по измерению радиоактивности изучить содержание МА в отдельных пуриновых олигонуклеотидах разного состава, выделенных из ДНК *E. coli* С и фага ДД7 (табл. 2). Как это можно видеть, практически вся радиоактивность содержится только в олигонуклеотидах состава А или АГ. В полинуклеотидах, содержащих только

Таблица 2

Содержание N⁶-метиладенина в пуриновых олигонуклеотидах разного состава из ДНК *E. coli* С и фага ДД7 ($\bar{X} \pm \sigma$), %.

Изоплиты	Состав олигонуклеотидов	Количество МА в % от общего его содержания в ДНК	
		ДНК <i>E. coli</i> С	ДНК фага ДД7
I	A	6,24 ± 0,01	7,23 ± 0,03
	Г	0,05 ± 0,01	0,10 ± 0,03
II	A ₂	5,85 ± 0,10	6,73 ± 0,08
	АГ	31,10 ± 0,10	26,57 ± 0,08
III	Г ₂	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,04
	A ₃	1,64 ± 0,01	1,32 ± 0,08
	A ₂ Г	13,70 ± 0,02	10,50 ± 0,08
	АГ ₂	4,72 ± 0,03	3,33 ± 0,01
IV	Г ₃	0,09 ± 0,04	0,14 ± 0,01
	A ₄	0,97 ± 0,01	0,46 ± 0,03
	A ₃ Г	3,85 ± 0,04	4,10 ± 0,01
	A ₂ Г ₂	4,75 ± 0,01	3,13 ± 0,04
V	АГ ₃	0,45 ± 0,02	0,19 ± 0,03
	Г ₄	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,04
	A ₅	0,57 ± 0,02	0,68 ± 0,06
	A ₄ Г	1,33 ± 0,01	2,74 ± 0,03
	A ₃ Г ₂	4,95 ± 0,04	5,45 ± 0,05
	A ₂ Г ₃	3,19 ± 0,03	2,15 ± 0,01
VI	АГ ₄	0,22 ± 0,02	0,11 ± 0,03
	Г ₅	—	—
VII	—	5,15 ± 0,14	5,92 ± 0,11
VIII	—	3,88 ± 0,15	3,04 ± 0,12
≥VIII	—	7,12 ± 0,08	15,90 ± 0,30

Г, радиоактивность ничтожно мала (обычно менее 1% от активности всего изоплита). Это может объясняться некоторым незначительным перекрытием фракций разного состава. С другой стороны, не исключено, что некоторое метилирование остатков гуанина в ДНК *E. coli* может иметь место.

ДНК фага и хозяина довольно четко различаются по количеству МА в аналогичных пуриновых фрагментах разного состава. Так, в ДНК *E. coli* С содержание МА в олигонуклеотидах A_4 и AG_3 примерно в 2 раза выше, чем в ДНК фага ДД7. Напротив, количество МА в олигонуклеотидах состава A_4G и более длинных (фракция VIII, табл. 1) в ДНК фага примерно вдвое больше, чем в ДНК хозяина. Это по-видимому, объясняется разной частотой встречаемости метилируемых последовательностей в ДНК фага и хозяина. Основное количество МА в этих ДНК локализовано в (AG)-динуклеотиде. Заметное количество МА содержится также в олигонуклеотидах A_2G , AA , AG_2 , A_3G , A_2G_2 , A_3G_2 и других. В олигонуклеотидах A_3 , A_4 , A_5 количество МА относительно невелико, в то время как в аналогичных по длине олигонуклеотидах, содержащих А и Г вместе, количество МА примерно на порядок выше. Таким образом, предпочтительным соседом МА в выделенных пуриновых фрагментах является Г, а не А.

Мы изучили локализацию меченого МА в динуклеотидах AA , (AG) из ДНК *E. coli* С и фага ДД7 и тринуклеотидах A_2G из ДНК *E. coli* С. Радиоактивность этих олигонуклеотидов была достаточно высокой, и именно поэтому мы избрали их для определения локализации МА. Эти олигонуклеотиды типа X_pY_r последовательно обрабатывали фосфомоноэстеразой *E. coli* и фосфодиэстеразой змеиного яда, а затем продукты гидролиза (X и pY) разделяли с помощью хроматографии на бумаге (изопропанол — H_2O , 70:30 с аммиаком в газовой фазе). Практически вся радиоактивность (более 97%) изученных олигонуклеотидов обнаруживалась только в пятнах, соответствующих местоположению N^6 -метилдезоксиаденозина. Это показывает, что во всех изученных олигонуклеотидах МА расположен только на 5'-конце. Тем самым, МА находится в начале изученных пуриновых последовательностей и, по-видимому, всех других полипуриновых фрагментов цепи ДНК. Так, например, МА есть в AG, но отсутствует в GA и т. д. После обработки олигонуклеотидов указанными ферментами радиоактивности в местоположениях нуклеотидов, динуклеозидомонофосфатов и динуклеотидов не найдено. Это означает, что МА в цепи ДНК *E. coli* и фага ДД7 встречается только поодиночке, а последовательности МА — МА в этих ДНК нет. Тем самым, метилирование остатков аденина в этих ДНК имеет выраженный точечный характер.

МА в ДНК *E. coli* С и фага ДД7 локализован в одних и тех же нуклеотидных последовательностях. Тем самым, специфичность метилирования остатков аденина в фаговой и хозяйской ДНК одинакова. Это согласуется с представлениями Хесина и Богдановой⁽¹⁰⁾ об идентичной специфичности ДНК-метилаз фага T_2 и *E. coli* В. Одинаковая локализация МА в цепях ДНК фага ДД7 и *E. coli* С может указывать на то, что метилирование остатков аденина в ДНК фага и хозяина, а стало быть, и хозяйская модификация фага осуществляются одним и тем же ферментом (или очень сходными ДНК-метилазами) и контролируются одними и теми же генами.

Мы установили, что в ДНК *E. coli* С и фага ДД7 МА локализован в следующих последовательностях: (5')...Пир — $\overset{\cdot}{A}$ — Пир... (3'), ...Пир — $\overset{\cdot}{A}$ — Г — Пир..., ...Пир — $\overset{\cdot}{A}$ — А — Пир..., ...Пир — $\overset{\cdot}{A}$ — (А, Г) — Пир... Как видно, соседом МА справа может быть любое основание, а слева всегда находится только пиримидин. Это подтверждает высказанное нами ранее предположение о том, что для ДНК-метилазы *E. coli*, по-видимому, неважна последовательность справа от метилируемого аденина, а она узнает только последовательность, расположенную слева от него^(5, 6). Мы уже знаем, что таким обязательным соседом слева является пиримидин.

Им может быть Т или реже Ц (¹¹). Однако ДНК-метилаза, по-видимому, узнает последовательность не менее чем из трех нуклеотидов (¹²). Следовательно, такими последовательностями могут быть триплеты Пир — Пир — А и Пир — Пир — А. Поскольку триплеты, начинающиеся пуринами, не метилируются (¹²), то, по-видимому, для ДНК-метилазы важно именно то, чтобы в начале метилируемого триплета находился пиримидин. Ранее мы предположили, что в состав метилируемой последовательности ДНК *E. coli* и фага входят именно триплеты ... Пир — Пир — А, т. е. ТТА, ЦТА, ЦТА и ЦЦА (^{5, 6}). Большинство этих триплетов (первые три) соответствуют терминирующим кодоном в мРНК, УАА, УГА и УАГ. Полученные здесь данные также свидетельствуют в пользу представления (^{5, 6, 13}) о том, что МА может быть локализован преимущественно именно в последовательностях, соответствующих терминирующим кодоном, и, по-видимому, может указывать на локализацию в цепях ДНК отдельных генов или цистронов.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
12 I 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ I. I. Nikolskaya, Z. G. Tkatcheva et al., *Biochim. et biophys. acta*, **155**, 626 (1968).
- ² M. Gold, J. Hurwitz, *J. Biol. Chem.*, **239**, 3858, 3866 (1964).
- ³ Я. И. Бурьянов, Б. Ф. Ванюшин и др., *ДАН*, **183**, 707 (1968).
- ⁴ Б. Ф. Ванюшин, Г. В. Боярских и др., *ДАН*, **195**, № 1 (1970).
- ⁵ Б. Ф. Ванюшин, Я. И. Бурьянов и др., Тез. докл. на VII международном симпозиуме по химии природных соединений, Рига, 1970, стр. 211.
- ⁶ Б. Ф. Ванюшин, Я. И. Бурьянов, *Вопр. вирусол.*, **16**, 503 (1971).
- ⁷ Б. Ф. Ванюшин, Я. И. Бурьянов, *Биохимия*, **34**, 546, 718 (1969).
- ⁸ А. Л. Мазин, Б. Ф. Ванюшин, *Биохимия*, **32**, 377 (1967).
- ⁹ J. Marmur, *J. Mol. Biol.*, **3**, 208 (1961).
- ¹⁰ Р. Б. Хесин, Е. С. Богданова, *Биохимия*, **31**, 405 (1966).
- ¹¹ J. Doscočil, Z. Sormova, *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.*, **30**, 2445 (1965).
- ¹² A. Falashi, A. Kornberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **54**, 1713 (1965).
- ¹³ Б. Ф. Ванюшин, Н. А. Кокурина, А. Н. Белозерский, *ДАН*, **161**, 1451 (1965).