

УДК 547.963.3+577.157.6

БИОХИМИЯ

Н. И. АЛЕКСАНДРУШКИНА, Л. В. КОМИССАРОВА, В. Н. ГЕРШАНОВИЧ,
Б. Ф. ВАНЮШИН

**НУКЛЕОТИДНЫЙ СОСТАВ И ПИРИМИДИНОВЫЕ БЛОКИ ДНК
ПАРАЗИТИЧЕСКОЙ И САПРОФИТНОЙ ФОРМ
VDELLOVIBRIO BACTERIOVORUS**

(Представлено академиком А. С. Спириным 8 VIII 1974)

К настоящему времени сведения о составе ДНК у микроорганизмов из рода *Vdellovibrio*, паразитирующих в клетках граммотрицательных бактерий, ограничиваются лишь данными по величине температуры плавления этих ДНК (¹). Природа азотистых оснований и, в особенности, минорные основания в ДНК этих паразитирующих бактерий неизвестны. Вместе с тем обнаружено, что экстракты из зараженных *Vdellovibrio bacteriovorus* клеток *Pseudomonas fluorescens* заметно отличаются по специфичности ДНК-метилазных активностей от экстрактов из незараженных клеток *Ps. fluorescens*; это позволило предположить, что паразитические бактерии обладают собственными ДНК-метилирующими ферментами, которые отличны от ДНК-метилаз бактерии-хозяина (²). Нет данных о нуклеотидной последовательности ДНК *Vdellovibrio bacteriovorus*. Вместе с тем, изучение первичной структуры ДНК этого организма — паразита бактерий — представляет интерес как для познания структуры генома этой бактерии, так и для уточнения таксономического положения и степени гетерогенности рода *Vdellovibrio* в бактериальном мире, а также для выяснения своеобразного пути эволюции генома и выработки у бактерий паразитического образа существования в клетках прокариот.

В настоящей работе исследован нуклеотидный состав ДНК у паразитической и сапрофитной форм *Vdellovibrio bacteriovorus* штамма ОПН. Кроме того, мы провели сравнительное изучение содержания разных пиримидиновых изоцит в ДНК сапрофитной формы и предприняли попытку выявить минорные основания в ДНК паразитической формы *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН.

Для получения бактериальной массы сапрофитной формы *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН культуру выращивали на среде Рхе (³) при 37° до титра $1 \cdot 10^9$ кл/мл; клетки отделяли центрифугированием и промывали физиологическим раствором. Паразитическую форму *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН культивировали на клетках *Escherichia coli* штамма ЦМММ-В-70 (мет⁻) на синтетической среде в присутствии (метил-³H)-метионина (0,25 мС, «Amersham») при 28° в течение 1 суток. Клетки *E. coli* отделяли фильтрованием через миллиметровые фильтры «AUFS» (1,5 мкм). Биомассу паразитической формы *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН из фильтрата отделяли центрифугированием и хранили при -20°.

Из клеток сапрофитной и паразитической форм *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН выделяли ДНК по методу Мармура (⁴) с РНКазной и проназной обработкой. Меченую ДНК из паразитической формы выделяли по модифицированному методу Шмидта и Таннгаузера (⁵). Определение нуклеотидного состава выделенных препаратов ДНК проводили спектрофотометрически после гидролиза ДНК до оснований (57% HClO₄, 100°, 1 час) и разделения оснований с помощью хроматографии на бумаге (⁵) или в тонком слое ДЭАЭ-целлюлозы (⁶). Меченую ДНК гидролизовали таким же образом, и основания разделяли путем хроматографии на бумаге в

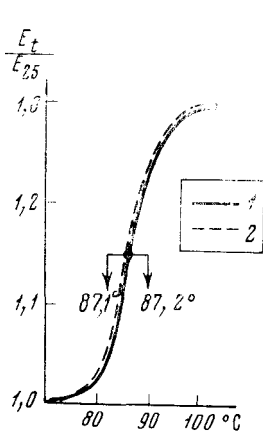


Рис. 1

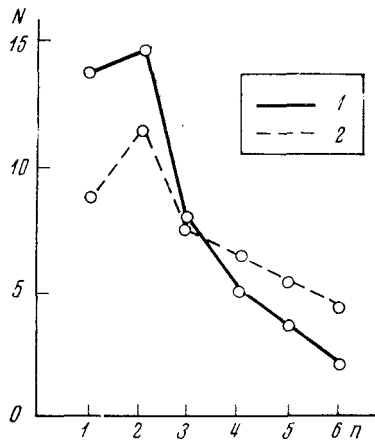


Рис. 2

Рис. 1. Термическая денатурация ДНК разных форм *Bdellovibrio bacteriovorus*. 1 — ДНК сапрофитной формы, 2 — ДНК паразитической формы

Рис. 2. Зависимость количественного содержания нуклеотидного материала (N) в изоплитах из разных ДНК от длины пиримидиновых блоков (изоплит). n — число нуклеотидных остатков в цепи пиримидинового олигонуклеотида. 1 — ДНК *E. coli* В, 2 — ДНК *Bdellovibrio bacteriovorus*

щелочном растворителе n -бутанол — 25% NH_4OH — H_2O (60—0,1—10) ⁽⁵⁾. Зоны хроматограмм, соответствующие по R_f местоположению 5-метилцитозина и N^6 -метиладенина и обычным основаниям, вырезали, элюировали 1 мл 0,1 N HCl во флаконы с 10 мл сцинтиллятора. Радиоактивность элюатов измеряли по специальной программе (диоксановый сцинтиллятор — кислота) на сцинтилляционном счетчике «Mark-2» («Nuclear-Chicago»). Плавление препаратов ДНК в стандартном солевом растворе осуществляли на регистрирующем спектрофотометре SP-700 («Unicum») в специальных кварцевых кюветках. Определение $T_{пл}$ и содержания ГЦ-пар оснований в ДНК по кривым плавления производили по методу Мармура и Доти ⁽⁷⁾.

Для изучения количественного содержания разных по длине пиримидиновых блоков (изоплит) в ДНК сапрофитной формы *Vd. bacteriovorus* штамме ОПН и *E. coli* В, препараты этих ДНК гидролизовали до пиримидиновых последовательностей муравьиной кислотой в присутствии дифениламина по методу Бартона ⁽⁸⁾. Смесь пиримидиновых олигонуклеотидов $\text{Pu}_n\text{P}_{n+1}$ разделяли по длине с помощью ионообменной хроматографии на отдельные изоплиты, как это описано ранее ⁽⁹⁾. Количество нуклеотидного материала в отдельных изоплитах определяли спектрофотометрически ⁽⁹⁾.

ДНК сапрофитной и паразитической форм *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН принадлежат к АТ-типу и не отличаются по нуклеотидному составу. Содержание ГЦ-пар оснований в этих ДНК, по данным хроматографического анализа в сочетании со спектрофотометрией, составляет соответственно 42,3 и 42,1 мол. % (табл. 1). Не удалось выявить ощутимых различий у этих ДНК также по характеру и температуре плавления (рис. 1). $T_{пл}$ ДНК сапрофитной и паразитической форм *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН составляет 87,2° и 87,1° соответственно. Таким образом, судя по величинам $T_{пл}$, эти ДНК должны содержать 43,6 и 43,4 мол. % ГЦ-пар оснований. Это довольно хорошо соответствует данным по составу ДНК, полученным путем прямого определения оснований (табл. 1). Сходство данных по нуклеотидному составу, полученных с помощью хроматографии осно-

Нуклеотидный состав ДНК *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН ($\bar{X} \pm \sigma$)

Источник ДНК	Метод определения *	Основания, мол. %				
		А	Г	Ц	Т	ГЦ
<i>Vd. bacteriovorus</i> штамма ОПН (сапрофитная форма)	1	29,0 ± 0,3	20,9 ± 0,3	21,4 ± 0,2	28,7 ± 0,3	42,3 ± 0,3
	2	29,0 ± 0,2	21,0 ± 0,1	21,3 ± 0,2	28,7 ± 0,3	42,3 ± 0,2
<i>Vd. bacteriovorus</i> штамма ОПН (паразитическая форма)	1	29,1 ± 0,2	20,8 ± 0,3	21,2 ± 0,4	28,9 ± 0,4	42,0 ± 0,4
	2	29,1 ± 0,3	20,8 ± 0,2	21,4 ± 0,2	28,7 ± 0,3	42,2 ± 0,3

* 1 — хроматография оснований на бумаге; 2 — хроматография оснований в тонком слое ДЭАЭ-целлюлозы.

ваний и рассчитанных по $T_{пл}$, указывает на то, что изученные ДНК *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН не имеют каких-либо выраженных «аномалий» во вторичной структуре.

Идентичность по составу ДНК у паразитической и сапрофитной культур *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН соответствует представлению о том, что они генетически идентичны, чрезвычайно сходны по физиолого-биохимическим свойствам и различаются только по регуляции клеточной активности в зависимости от условий существования (¹⁰). Известно, что по составу ДНК штаммы *Vd. bacteriovorus* разделяются на две группы: для первой и наиболее многочисленной из них характерно эквимолярное соотношение оснований в ДНК (ГЦ = 50,4 ± 0,9 мол. %), а ДНК второй группы содержит около 43,0 мол. % ГЦ-пар оснований (¹).

Таблица 2

Содержание пиримидиновых изоплит в ДНК *Vdellovibrio bacteriovorus* штамма ОПН и *E. coli* В ($\bar{X} \pm \sigma$)

Изоплиты	<i>Vd. bacteriovorus</i> , сапрофитная форма	<i>E. coli</i> В
	мол. % в ДНК	
I	9,80 ± 0,23	13,54 ± 0,19
II	11,42 ± 0,36	14,73 ± 0,43
III	7,58 ± 0,29	7,87 ± 0,31
IV	6,57 ± 0,20	5,09 ± 0,08
V	5,41 ± 0,17	3,67 ± 0,09
VI	4,42 ± 0,15	2,16 ± 0,24
VII	4,80 ± 0,20	2,94 ± 0,10

Изученный нами штамм ОПН по составу ДНК принадлежит ко второй группе. По этому признаку он четко отличается от бактерии-хозяина: в ДНК *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН количество ГЦ-пар оснований почти на 10 мол. % меньше, чем в ДНК *E. coli* В (¹¹).

При анализе ДНК клеток *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН, выращенных на *E. coli* В (мет⁻) в присутствии (метил-³H)-метионина, мы обнаружили заметную радиоактивность в зонах хроматограмм, соответствующих местоположению 5-метилцитозина, N⁶-метиладенина и тимина (радиоактивность элюатов этих оснований составляла соответственно 103212, 23133 и 25584 распада в 1 мин.). Это означает, что в ДНК паразитической формы в качестве минорных оснований присутствуют 5-метилцитозин и N⁶-метиладенин. Следовательно, в клетках *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН имеются собственные специфические ферменты, которые осуществляют метилирование цитозиновых и адениновых остатков в ДНК. Судя по радиоактивности, количество 5-метилцитозина в ДНК *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН значительно выше, чем N⁶-метиладенина. Обычно в бактериальных ДНК содержится 5-метилцитозина меньше, чем N⁶-метиладенина, а в ДНК *E. coli* В 5-метилцитозин отсутствует вовсе (¹¹). Стало быть, характер метилирования ДНК в клетках *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН заведомо отличается от метилирования ДНК в клетках хозяина *E. coli* В. В этой связи

особенно интересным представляется выяснить, не может ли паразит на ранних этапах инфекции как-либо изменять специфичность метилирования ДНК зараженных клеток, влияя на регуляцию активности генов бактерии-хозяина.

Кроме определения нуклеотидного состава для выяснения специфичности тех или иных ДНК особое значение приобретает изучение их нуклеотидной последовательности, и в частности характера распределения пиримидинов. Мы определили содержание разных по длине пиримидиновых изоплит в ДНК *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН (сапрофитная форма). Подобно большинству изученных бактерий, в ДНК этого микроорганизма количество дипиримидиновых фрагментов заметно выше, чем монопиримидиновых (табл. 2), т. е. наблюдается выраженный S-образный характер зависимости между содержанием нуклеотидного материала в отдельных разных по длине пиримидиновых блоках и длиной этих блоков (рис. 2). Это вообще характерно для бактериальных ДНК, в то время как у эукариотов (животные, растения) наблюдается более или менее линейное убывание количества пиримидиновых блоков по мере увеличения их длины^(12, 13).

Несмотря на эту общую отличительную особенность бактериальных ДНК, исследованная ДНК *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН обладает специфическим уникальным характером распределения пиримидинов. Среди всех изученных бактериальных ДНК она характеризуется самой высокой степенью сблоченности пиримидинов. Так, в ДНК *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН количество коротких (моно- и динуклеотиды) пиримидиновых фрагментов почти в 1,5 раза меньше, а содержание длинных пиримидиновых блоков ($n \geq 6$) примерно в два раза больше, чем в ДНК *E. coli* В или других бактерий (табл. 2). По этому признаку первичной структуры ДНК *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН резко отлична от ДНК бактерий и приближается к ДНК эукариотов^(12, 13). Поскольку между степенью сблоченности пиримидинов в ДНК и асимметрией ее цепей существует корреляция⁽¹⁴⁾, то можно предполагать, что из всех изученных микроорганизмов у *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН ДНК может обладать наибольшей асимметрией цепей, т. е. в этой ДНК одна цепь должна быть резко обогащена пиримидинами, а комплементарная ей — пуринами. Такой уникальный характер распределения пиримидинов в ДНК *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН, по-видимому, как-то отражает своеобразную эволюцию бактериального генома, смысл которой еще неясен. Не исключено, что выявленная необычная для бактерий организация нуклеотидной последовательности ДНК у *Vd. bacteriovorus* штамма ОПН может быть связана с выработкой особой формы существования — способности паразитировать в клетках бактерий.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
5 VIII 1974

Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалеи
Академии медицинских наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. J. Seidler, M. P. Starr, M. Mandel, J. Bacteriol., v. 100, 786 (1969). ² Я. И. Бурьянов, В. А. Ламбина, И. Г. Богдарина, ДАН, т. 208, 1476 (1973). ³ H. Stolp, M. P. Starr, Antonie van Leeuwenhoek, v. 29, 217 (1963). ⁴ J. Marmur, J. Mol. Biol., v. 3, 208 (1961). ⁵ Б. Ф. Ванюшин, В сб.: Современные методы в биохимии (под ред. В. Н. Ореховича), т. 1, стр. 236, 1964. ⁶ В. К. Васильев, Научн. докл. высш. школы, Биологич. науки, т. 9, 118 (1971). ⁷ J. Marmur, P. Doty, J. Mol. Biol., v. 5, 109 (1962). ⁸ K. Burton, G. B. Petersen, Biochem. J., v. 75, 17 (1960). ⁹ А. Л. Мазин, Б. Ф. Ванюшин, Биохимия, т. 32, 377 (1967). ¹⁰ M. P. Starr, R. J. Seidler, Ann. Rev. Mikrobiol., v. 25, 649 (1971). ¹¹ B. F. Vanyushin, N. A. Kokurina et al., Nature, v. 218, 1066 (1968). ¹² А. Л. Мазин, Б. Ф. Ванюшин, Молекул. биол., т. 3, 846 (1969). ¹³ А. Л. Мазин, Г. Е. Сулимова и др., ДАН, т. 199, 228 (1971). ¹⁴ А. Л. Мазин, Б. Ф. Ванюшин, Молек. биол., т. 8, 340 (1974).