

УДК 547.963.3+577.157.6

БИОХИМИЯ

Я. И. БУРЬЯНОВ, В. Ф. НЕСТЕРЕНКО, Л. М. ВАГАБОВА

**ПРИСУТСТВИЕ ДВУХ ДНК-ЦИТОЗИН-МЕТИЛАЗ
В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI* MRE 600**

(Представлено академиком А. С. Спириным 11 XII 1975)

Из *Escherichia coli* MRE 600 была выделена ДНК-цитозин-метилаза, модифицирующая цитозин в последовательности 5'...Pu—MC—C—Pu...3'. При этом существуют некоторые данные о присутствии в клетках *E. coli* MRE 600 нескольких ДНК-цитозин-метилаз, модифицирующих цитозин в различных нуклеотидных последовательностях (^{1, 2}).

В настоящей работе получено прямое доказательство существования в клетках *E. coli* MRE 600 двух различных ДНК-цитозин-метилаз, описан метод их выделения и представлены данные анализа нуклеотидной последовательности, модифицируемой второй ДНК-цитозин-метилазой.

Бесклеточный экстракт из 1 кг *E. coli* MRE 600 выделен, как описано ранее (³). Все последующие центрифугирования вели при 10 000 *g* в течение 30 мин. Все операции проводили при 0—5°. 0,02 *M* калий-фосфатный буфер, pH 6,7 (фосфатный буфер) содержал 10 *mM* 2-меркаптоэтанол, 5% глицерин и 0,5 *mM* ЭДТА. К 3 л недосадочной жидкости 165 000 *g* добавляли 600 мл 10% раствора стрептомицинсульфата. Суспензию центрифугировали и осадок отбрасывали (фракция 1). К 3550 мл фракции 1 добавляли 800 г сульфата аммония до 40% насыщения, суспензию центрифугировали и осадок отбрасывали. Надосадочную жидкость доводили до 60% насыщения сульфатом аммония (123 мг/мл). Полученный после центрифугирования осадок растворяли в 1000 мл фосфатного буфера и интенсивно диализовали против этого же буфера (фракция 2). Фракцию 2 доводили до 0,1 *M* NaCl и наносили на колонку с ДЭАЭ-сефадексом А-50 (80×10 см), уравновешенную 0,1 *M* NaCl в фосфатном буфере. Колонку промывали 0,1 *M* NaCl в фосфатном буфере. ДНК-цитозин-метилазная активность обнаружена в 4500 мл элюата. Фракцию концентрировали добавлением 440 мг/мл сульфата аммония. Осадок растворяли в 300 мл 0,15 *M* NaCl в фосфатном буфере и диализовали против этого же раствора (фракция 3). Фракцию 3 наносили на колонку (25×2,6 см) с фосфоцеллюлозой «Whatman» Р 11, уравновешенную 0,15 *M* NaCl в фосфатном буфере. Колонку промывали 400 мл 0,15 *M* NaCl в фосфатном буфере и элюировали со скоростью 46 мл/час 2000 мл линейным градиентом 0,15—0,6 *M* NaCl в фосфатном буфере. Две ДНК-цитозин-метилазы (I и II) были обнаружены в элюате со средней концентрацией NaCl 0,24 *M* и 0,45 *M* (объемы элюатов соответственно 230 и 300 мл).

ДНК-цитозин-метилазу II рехроматографировали на фосфоцеллюлозе. Для этого раствор доводили до 0,3 *M* NaCl, 0,2% тритона X-100 в фосфатном буфере (90 мл) и наносили на колонку (15×1,6 см) с фосфоцеллюлозой «Whatman» Р 11, уравновешенную 0,3 *M* NaCl в фосфатном буфере. Колонку промывали 400 мл 0,3 *M* NaCl в фосфатном буфере и элюировали со скоростью 20 мл/час 320 мл линейным градиентом 0,3—0,6 *M* NaCl в фосфатном буфере. Пик ДНК-цитозин-метилазы II был обнаружен в элюате со средней концентрацией NaCl 0,42 мол/л. ДНК-цитозин-метилазы концентрировали ультрафильтрацией в системе Amicon на мембране PM 10 и хранили в 50% глицерине при —20°.

Для последующего анализа гетерологичную ДНК метилировали в условиях полного насыщения их метильными группами. Энзиматическое метилирование ДНК проводили в реакционной среде следующего состава: 40 мМ трис-НСl (рН 8,0); 10 мМ 2-меркаптоэтанол; 10 мМ ЭДТА; 6,6 мкМ *S*-аденозин-*L*-метионин (метил-³H) (удельная активность 5 С/ммоль, Amersham, Англия); 6 мкг ДНК и до 50 ед. ДНК-метилазы (1 ед. ДНК-метилазной активности — количество фермента, которое включает в ДНК 1 пмол. метильных групп за 1 час); объем пробы 0,15 мл. Реакцию проводили при 37° в течение 3 час. для ДНК-цитозин-метилазы I и 2 час. для ДНК-цитозин-метилазы II. Реакцию останавливали, ДНК выделяли и деградировали до пиримидиновых последовательностей по методам, описанным ранее (¹). Пиримидиновые дезоксирибоолигонуклеотиды разделяли по длине (изоплиты) и составу по методам, описанным ранее, а также путем тонкослойной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе (¹, ², ⁴). Локализацию остатков 5-метилцитозина (МС) в пиримидиновых динуклеотидах определяли, как описано ранее (¹). Для анализа тринуклеотидов применяли также экзонуклеазу А5, свободную от примесей фосфомоноэстераз (⁵).

Таблица 1

Очистка ДНК-цитозин-метилаз I и II из *E. coli* MRE 600

Стадия очистки	Белок, мг	Активность	Удельная активность	Очистка	Выход, %
40–60% (NH ₄) ₂ SO ₄	40 000	4,07·10 ⁵	27	—	100
ДЭАЭ-сефадекс А-50	3600	4,25·10 ⁵	118	4	39,7
Фосфоцеллюлоза					
ДЦМ I	325	2,75·10 ⁴	85	—	—
ДЦМ II	86	1,45·10 ⁵	1686	62	13,5
Фосфоцеллюлоза ДЦМ II (рехроматография)	38	1·10 ⁵	2632	97	9,3

Примечание. В качестве субстрата использована ДНК сперма лосося. ДЦМ I — ДНК-цитозин-метилаза I, ДЦМ II — ДНК-цитозин-метилаза II.

Ранее нами было отмечено, что заметная часть ДНК-метилазной активности не задерживается на ДЭАЭ-сефадексе А-50 (¹). Анализ этой фракции показал присутствие в ней особой ДНК-цитозин-метилазы, которая отличается от ДНК-цитозин-метилазы, связывающейся с ДЭАЭ-сефадексом А-50. В табл. 1 представлены результаты очистки двух ДНК-цитозин-метилаз. Хроматография на ДЭАЭ-сефадексе А-50 позволяет выделить смесь двух ДНК-цитозин-метилаз, существенно очищенных от ДНК-аденин-метилазы. Хроматография ДНК-цитозин-метилаз на фосфоцеллюлозе приводит к разделению этих двух ферментов. Из-за отсутствия простого метода тестирования индивидуальных ДНК-цитозин-метилаз в их смеси очистку ДНК-цитозин-метилазы II определяли относительно суммарной ДНК-цитозин-метилазной активности. При этом следует отметить, что по способности метилировать ДНК зобной железы телянка и спермы лосося вся ДНК-цитозин-метилаза I представляет относительно незначительную часть ДНК-цитозин-метилирующего потенциала *E. coli* MRE 600 и его большая часть связана с ДНК-цитозин-метилазой II. Так как ДНК спермы лосося оказалась лучшим акцептором метильных групп, ее применяли в ДНК-метилазной реакции как гетерологичную ДНК вместо ДНК зобной железы телянка. Данные по анализу распределения включенного МС в пиримидиновых изоплитах ДНК спермы лосося, метилированной двумя ДНК-цитозин-метилазами, представлены в табл. 2. ДНК-цитозин-метилаза I идентична «фракции фосфоцеллюлозы Б», описанной нами ранее (¹, ²). Около 100% от всего МС динуклеотидного изоплита было найдено в последовательности МС_рС. Таким образом, ДНК-цитозин-метилаза I

Таблица 2

Частота встречаемости МС в пириимидиновых изооплитах ДНК спермы лосося, метилированной ДНК-цитозин-метилазами I и II из *E. coli* MRE 600 (количество МС от всего МС, %)

ДНК-метилаза	Изооплиты					
	I	II	III	IV	V	>V
ДНК-цитозин-метилаза I	4,62	91,88	0,73	0,44	0,30	2,33
ДНК-цитозин-метилаза II	1,41	28,92	32,61	16,03	6,41	14,62

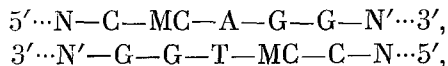
Таблица 3

Локализация МС в пириимидиновых олигонуклеотидах ДНК спермы лосося, метилированной ДНК-цитозин-метилазой II *E. coli* MRE 600

Анализируемые пириимидиновые фрагменты	Распределение радиоактивности (МС) в продуктах гидролиза различными ферментами, имп/мин						Установленная последовательность
	ФДЭ змеиного яда		ФДЭ селезенки		Экзонуклеаза А5		
	pN	N	Np	N	NpN	pN	
C ₂ p C ₂ T _{p2}	1326 1122	47 32	21 1946	2446 28	— 4350 4132 C ₂ p 218 CT _p	— 153	5'...C _p MC...3' 5'...C _p MC _p T...3'

производит модификацию цитозина в последовательности 5'...Pu—MC—C—Pu...3'. В то же время, в отличие от полученных ранее данных, мы не обнаружили ДНК-метилазу, значительно метилирующую в ДНК одиночный цитозин (^{1, 2}). По-видимому, эти различия связаны или с особенностями ДНК спермы лосося, или с тем, что ДНК-цитозин-метилаза I может переходить в особую форму, способную модифицировать цитозин наряду с последовательностью 5'...Pu—MC—C—Pu...3' также и в последовательности ...Pu—MC—Pu... (⁶). ДНК-цитозин-метилаза II в значительной и в почти равной степени метилирует пириимидиновые ди- и тринуклеотиды, а также заметно метилирует и более длинные пириимидиновые блоки в ДНК спермы лосося (табл. 2). При анализе ДНК, метилированной ДНК-цитозин-метилазой II, около 100% от всего МС динуклеотидов было найдено в динуклеотидах состава C₂ и более 80% от всего МС тринуклеотидов было найдено в тринуклеотидах состава C₂T. Полученные после фосфатазной обработки динуклеозидмонофосфаты C_pC и тринуклеозиддифосфаты состава C₂T гидролизовали в параллельных опытах фосфодиэстеразами (ФДЭ) змеиного яда и селезенки, а тринуклеозиддифосфаты также и экзонуклеазой А5. Данные анализа локализации МС в указанных олигонуклеотидах представлены в табл. 3. С помощью фосфодиэстераз змеиного яда и селезенки МС однозначно определен в последовательности C_pMC. Применение этих ферментов для анализа тринуклеотидов состава C₂T позволило установить отсутствие МС на их 5'- и 3'-концах. В результате применения экзонуклеазы А5 и последующих разделений продуктов гидролиза тринуклеотидов состава C₂T хроматографией на бумаге и затем на ДЭАЭ-целлюлозе при pH 3,0 было установлено, что около 95% МС в тринуклеотидах состава C₂T содержится во фрагменте C_pC. Следовательно, в тринуклеотидах состава C₂T МС содержится в последовательности

C_pMC_pT. Таким образом, ДНК-цитозин-метилаза II *E. coli* MRE 600 модифицирует цитозин в последовательностях: 5'...Pu—C—MC—Pu...3' и 5'...Pu—C—MC—T—Pu...3'. Эти последовательности идентичны пиримидиновым фрагментам деплексной структуры, метилируемой ДНК-цитозин-метилазой *E. coli* II (⁷):



(N — любой из четырех нуклеотидов).

Такие же пиримидиновые метилированные последовательности обнаружены в ДНК *E. coli* C, однако в этой ДНК была обнаружена еще одна последовательность C_pMC_pC (⁸). Кроме того, имеются данные о присутствии в клетках *E. coli* K12 ДНК-цитозин-метилазы, способной модифицировать последовательность, которую узнает метилаза фактора устойчивости N-3 и которая имеет сходство с метилазой *EcoR* II (⁹). Все эти данные поднимают вопрос о природе сходства или идентичности ДНК-цитозин-метилаз различных штаммов *E. coli* и ДНК-метилазы *EcoR* II. Ранее были получены данные о множественности бактериальных ДНК-аденин-метилаз (¹⁰⁻¹²). В настоящей работе показано, что *E. coli* MRE 600 имеет две ДНК-цитозин-метилазы I и II, модифицирующие цитозин в следующих последовательностях соответственно: ДНК-цитозин-метилаза I 5'...Pu—MC—C—Pu...3' и ДНК-цитозин-метилаза II 5'...Pu—C—MC—Pu...3' и 5'...Pu—C—MC—T—Pu...3'. Таким образом, бактериальной клетке может быть свойственна множественность ДНК-аденин- и ДНК-цитозин-метилаз.

Авторы выражают глубокую благодарность Р. И. Татарской за любезное предоставление препарата экзонуклеазы A5 и О. К. Шулюпину за квалифицированную помощь.

Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов
Академии наук СССР
Пуццино Московской обл.

Поступило
19 XI 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Я. И. Бурьянов, В. Ф. Нестеренко и др., ДАН, т. 227, № 1 (1976). ² Y. I. Buryanov, O. F. Korsunsky et al., FEBS Letters, v. 49, № 1, 57 (1974). ³ Я. И. Бурьянов, В. А. Ламбина, И. Г. Богдарина, ДАН, т. 208, № 6, 1476 (1973). ⁴ M. D. Kirnos, V. K. Vasilyev, B. F. Vanyushkin, J. Chromatogr., v. 104, № 1, 113 (1975). ⁵ Т. Н. Львова, О. П. Артамонова, Р. И. Татарская, Биохимия, т. 40, № 4, 703 (1975). ⁶ Yu. Buryanov, V. F. Nesterenko, Abstr. of X Meeting of the FEBS, Paris, 1975, p. 177. ⁷ H. W. Boyer, L. T. Chow et al., Nature New Biol., v. 244, 40 (1973). ⁸ Б. Ф. Ванюшин, В. Н. Данилевич, Биохимия, т. 39, № 6, 1293 (1974). ⁹ M. S. May, S. Hattman, J. Bacteriol., v. 122, № 1, 129 (1975). ¹⁰ P. H. Roy, H. O. Smith, J. Mol. Biol., v. 81, 427, 445 (1973). ¹¹ M. G. Marinus, Mol. Gen. Genet., v. 127, 47 (1973). ¹² M. G. Marinus, N. R. Morris, J. Mol. Biol., v. 85, № 2, 309 (1974).