

Г. Е. СУЛИМОВА, А. Л. МАЗИН, Б. Ф. ВАНЮШИН, академик А. Н. БЕЛОЗЕРСКИЙ

СОДЕРЖАНИЕ 5-МЕТИЛЦИТОЗИНА В РАЗЛИЧНЫХ ПО СОСТАВУ ФРАКЦИЯХ ДНК ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Сведения о характере метилирования разных фракций ДНК крайне малочисленны. Известно, что полученные путем солевого фракционирования препараты ДНК из зародышей ржи заметно различались не только по составу обычных оснований, но и по содержанию 5-метилцитозина (МЦ) (1). Обогащенная ГЦ-парами оснований фракция, выделенная из ДНК тимуса теленка методом хроматографии на полиметакрилате, значительно отличалась от суммарной ДНК высоким содержанием МЦ (3%), а обогащенная АТ-парами фракция ДНК обладала заметно меньшим количеством МЦ (1%) (2). В быстро реассоциирующей сателлитной ядерной ДНК мыши количество МЦ также значительно больше (около 3%), чем в суммарной ДНК (3). По содержанию МЦ ДНК митохондрий и хлоропластов в ряде случаев могут существенно отличаться от ядерных ДНК (4). Таким образом, до настоящего времени остается практически неизученным вопрос о принадлежности этого метилированного основания к определенным фракциям (молекулам) ДНК с известной структурой и функциональной специфичностью.

В настоящей работе мы изучили состав ДНК у 11 видов высших растений, осуществили фракционирование ДНК некоторых растений: пшеницы (*Triticum vulgare*), тимофеевки (*Phleum pratense*), ландыша (*Convallaria majalis*) и тимуса теленка (*Bos taurus*) и определили содержание МЦ в выделенных фракциях.

Для выделения ДНК растения замораживали при температуре жидкого азота, тщательно растирали и к полученной массе прибавляли раствор 0,15 M NaCl с 0,1 M ЭДТА, содержащий 1% додецилсульфат натрия, pH 8,0 с последующим доведением концентрации NaCl до 1 M. Для более полного лизиса суспензию нагревали при 70° 5—10 мин. (5).

ДНК депротенизировали многократной обработкой фенолом по методу Кирби (6) и освобождали от РНК по методу Мармура (7). Полученные препараты ДНК содержали не более 1% белка и РНК и по своим физико-химическим свойствам соответствовали нативным высокополимерным ДНК из высших организмов: они обладали температурным гиперхромизмом около 30% и молекулярным весом порядка $6-8 \cdot 10^6$ дальтон ($s_{20, w} = 17-19 S$).

Для определения состава и содержания МЦ ДНК гидролизовали до оснований (72% HClO₄; 100°; 60 мин.), основания затем разделяли хроматографией на бумаге в системе бутанол — вода — 25% NH₄OH (60 : 10 : 0,1) и определяли спектрофотометрически (8). Количество МЦ определяли только после рехроматографии в том же растворителе. Кроме того, состав ДНК определяли по температуре плавления в стандартных условиях (9).

В ДНК всех изученных растений в качестве дополнительного основания обнаруживается только МЦ. ДНК отдельных видов различаются по содержанию МЦ более, чем в три раза (табл. 1). Из всех изученных растительных ДНК наиболее высоким содержанием МЦ обладают ДНК однодольных. Отчасти именно поэтому мы и избрали эти растения для изучения распределения МЦ во фракциях ДНК разного состава. Выделение из

Нуклеотидный состав ДНК некоторых высших растений ($M \pm m$)

Вид	Число определений	Содержание оснований (мол. %)					$\frac{5МЦ}{Г+Ц+МЦ}$	ГЦ, %	
		А	Т	Г	Ц	5МЦ		по хромат.	по $T_{пл}$
(Тип <i>Sphenophyta</i> , класс <i>Equisetinae</i>)									
<i>Equisetum arvense</i>	4	31,0±0,5	30,3±0,2	19,4±0,3	17,2±0,2	2,1±0,1	0,11	38,7	39,5
(Тип <i>Gymnospermae</i> , класс <i>Coniferinae</i>)									
<i>Larix decidua</i>	4	30,8±0,4	30,7±0,4	19,2±0,4	15,9±0,3	3,4±0,3	0,18	38,5	—
(Тип <i>Agnospermae</i> , класс <i>Monocotyledoneae</i>)									
<i>Convallaria majalis</i>	6	28,0±0,2	28,3±0,1	21,8±0,1	15,4±0,1	6,5±0,1	0,30	43,7	42,0
<i>Phleum pratense</i>	5	28,3±0,4	27,8±0,3	21,9±0,4	15,7±0,1	6,2±0,1	0,28	43,8	43,2
<i>Triticum vulgare</i>	8	28,0±0,4	27,6±0,3	22,2±0,3	16,2±0,3	6,0±0,2	0,27	44,4	44,3
<i>Hordeum sativum</i>	4	29,2±0,1	29,0±0,1	20,9±0,1	14,5±0,1	6,4±0,1	0,31	41,8	43,2
(Класс <i>Dicotyledoneae</i>)									
<i>Atriplex rosea</i>	4	32,2±0,4	32,8±0,6	17,5±0,4	13,5±0,3	4,0±0,1	0,23	35,0	—
<i>Gossypium hirsutum</i>	4	31,3±0,4	31,5±0,5	18,6±0,4	14,8±0,4	3,8±0,1	0,20	37,2	41,2
<i>Lamium album</i>	4	31,1±0,1	31,2±0,2	18,8±0,2	14,5±0,1	4,4±0,1	0,23	37,7	39,5
<i>Brassica oleraceae botrytis</i>	5	27,5±0,4	27,3±0,5	22,6±0,5	19,6±0,4	3,0±0,1	0,15	45,2	41,2
<i>Matricaria inodora</i>	4	31,5±0,4	31,5±0,4	18,5±0,4	14,0±0,2	4,5±0,1	0,24	37,0	38,2

ДНК фракций различного состава производили при помощи описанного нами ранее метода термического фракционирования ДНК (10). Перед фракционированием препараты ДНК фрагментировали ультразвуком до молекулярного веса порядка $0,5 \cdot 10^6$ дальтон. Затем ДНК в 0,05 *M* натрий-фосфатном буфере рН 6,8 нагревали при такой температуре, когда денатурировало около 25% от всей ДНК. После соответствующей фиксации (замораживание при температуре жидкого азота с последующим оттаиванием при комнатной температуре в присутствии 1% формальдегида) денатурированную ДНК (фракция I) отделяли от нативной при помощи хроматографии на гидроксипатите (ГАП) (10). Оставшуюся нативной ДНК нагревали при такой более высокой температуре, при которой не денатурирует только около 20—30% от суммарной исходной ДНК. Денатурировавшую на этот раз ДНК (фракция II) фиксировали и отделяли от неденатурированных молекул (фракция III) хроматографией на ГАП. Таким образом, близкие по составу (43,7—44,8%) ДНК из зародышей пшеницы, соцветий тимофеевки, листьев ландыша и тимуса теленка были разделены на три разные по составу фракции: фракция I были обогащены АТ-парами оснований (32,7—37,9% ГЦ) и поэтому условно названы АТ-фракциями; фракция II имели приблизительно тот же состав, что и суммарные ДНК; фракция III обогащены ГЦ*-парами оснований (50,3—53,4% ГЦ) и названы ГЦ-фракциями (табл. 2). Само по себе выделение таких разных по составу фракций указывает на значительную гетерогенность ДНК изученных растений и тимуса теленка.

Выделенные из одной и той же ДНК фракции разного состава резко различаются по степени метилирования. Так, количество МЦ в АТ-фракциях ДНК растений (2,4%) примерно в 2,5 раза меньше, чем в исходной ДНК (6,0—6,5%) и в 4 раза меньше, чем в ГЦ-фракциях соответствующих ДНК (9,0—9,6%). Интересно, что в более «узкой» ГЦ-фракции, составляющей 19% от суммарной ДНК ландыша и сильно обогащенной ГЦ-парами оснований (ГЦ 53,4%), содержится 11,5% МЦ, т. е. почти вдвое больше, чем в исходной ДНК (см. табл. 2). Содержание МЦ в ГЦ-фракции ДНК тимуса теленка составляет 2,5%, а в соответствующей ей по количеству АТ-фракции количество МЦ, видимо, крайне незначительно (менее 0,05%). Следовательно, МЦ распределен между различными по составу молекулами

* Здесь и в дальнейшем принято: ГЦ = Г + Ц + МЦ.

Таблица 2

Содержание 5-метилцитозина в разных фракциях ДНК ($M \pm m$)

Фракция ДНК	Содерж. фракции, % от всей ДНК	Число опытов	Содержание оснований (моп. %)					5МП	$\frac{5МП}{Ц+5МП}$	5МП, %	Г+Ц+5МП, %	Пур
			А	Т	Г	Ц	5МП					
Triticum vulgare												
Суммарная ДНК	100	8	28,05±0,39	27,48±0,34	22,24±0,29	16,23±0,34	6,00±0,17	0,27	100	44,47	1,01	
Средняя фракция	45	6	27,65±0,51	27,55±0,51	22,32±0,37	16,55±0,45	5,93±0,14	0,26	45	44,80	1,00	
АТ-фракция	25	5	31,08±0,58	30,98±0,60	18,96±0,50	16,58±0,42	2,40±0,05	0,13	40	37,94	1,00	
ГЦ-фракция	30	6	24,83±0,48	24,67±0,48	25,43±0,08	16,37±0,49	9,00±0,20	0,35	45	50,50	1,00	
Phleum pratense												
Суммарная ДНК	100	5	28,34±0,58	27,88±0,55	21,90±0,45	15,70±0,44	6,18±0,08	0,28	100	43,78	1,01	
АТ-фракция	25	3	32,04±0,42	31,86±0,43	18,42±0,23	15,62±0,21	2,36±0,03	0,13	10	36,10	1,00	
ГЦ-фракция	30	4	25,02±0,44	24,64±0,31	25,17±0,29	16,02±0,41	9,45±0,15	0,36	45	50,34	1,01	
Convallaria majalis												
Суммарная ДНК	100	6	27,99±0,49	28,32±0,08	21,75±0,40	15,42±0,42	6,52±0,43	0,30	100	43,69	0,99	
АТ-фракция	24	3	32,27±0,36	32,21±0,45	17,72±0,25	15,36±0,17	2,44±0,03	0,14	9	35,52	1,00	
ГЦ-фракция	30	3	24,78±0,32	24,72±0,36	25,16±0,34	15,74±0,14	9,60±0,10	0,38	44	50,50	1,00	
ГЦ-фракция	49	4	23,31±0,41	23,34±0,43	26,67±0,32	15,17±0,31	11,51±0,23	0,43	34	53,35	0,99	
Bos taurus												
Суммарная ДНК	100	9	27,73±0,21	27,51±0,46	22,43±0,21	21,00±0,35	1,33±0,07	0,06	100	44,76	1,00	
АТ-фракция	25	8	33,74±0,21	33,59±0,22	16,21±0,29	16,41±0,26	<0,05	<0,003	<1	32,67	0,99	
ГЦ-фракция	30	6	24,95±0,34	24,30±0,52	25,61±0,38	22,64±0,28	2,50±0,06	0,11	56	50,75	1,02	

(фрагментами) ДНК изученных видов весьма неравномерно. На долю АТ-фракций, составляющих одну четвертую часть растительных ДНК, приходится лишь менее 10% от всего МЦ, в то время как в ГЦ-фракциях (треть от исходной ДНК) сконцентрировано около 50% от всего МЦ (см. табл. 2).

По мере увеличения во фракциях ДНК содержания гуанина и цитозина, в них закономерно возрастает количество 5-метилцитозина. Обращает на себя внимание тот факт, что количество собственно цитозина в АТ- и ГЦ-фракциях ДНК растений остается постоянным (около 16%), а отношение МЦ/Ц + МЦ возрастает с увеличением количества ГЦ-пар. Следовательно, различия в содержании ГЦ-пар между этими фракциями ДНК (около 14%) обусловлены только разным содержанием в них МЦ (около 7%), т. е. соответственно Г — МЦ-пар. Значит, степень метилирования различных по составу фракций ДНК (в пределах изученного нами интервала — от 36,1 до 53,4% ГЦ) прямо пропорциональна количеству ГЦ-пар оснований. Это позволяет думать, что сильно обогащенные ГЦ-парами участки ДНК могут характеризоваться исключительно высокой степенью метилирования цитозина. Действительно, в одной из таких ГЦ-фракций ДНК ландыша (ГЦ 53,4%) почти каждый второй остаток цитозина метилирован (см. табл. 2).

Таким образом, в ДНК изученных растений и тимуса теленка МЦ распределен весьма неравномерно и содержится преимущественно в богатых ГЦ-парами «суперметилированных» последовательностях. Количество МЦ возрастает пропорционально содержанию ГЦ-пар во фракциях ДНК.

Встает вопрос о том, почему существует такой градиент концентрации МЦ в цепи ДНК и почему избирательно метилируются только обогащенные гуанином и цитозином последовательности ДНК.

Известно, что основное количество МЦ (около 70%) в ДНК растений и животных локализовано в последовательности Пур — МЦ — Пур (¹, ¹¹). При этом преимущественно метилируются те дезоксицитидиловые остатки, которые связаны 3'-фосфатом с дезоксигуаниловой кислотой (¹²). Естественно, в обогащенных гуанином и цитозином фракциях ДНК избирательно метилируемые последовательности типа Пур — Ц — Г встречаются с большей частотой, чем в АТ-фракциях.

Это хорошо объясняет полученные в настоящей работе данные о преимущественной локализации МЦ в обогащенных ГЦ-парами участках ДНК.

Резко выраженные различия в степени метилирования цитозина в богатых АТ- и ГЦ-парами участках ДНК должны определенным образом отражаться в функциональной специфичности соответствующих им генов.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
7 V 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. S. Shapiro, E. Chargaff, *Biochim. et biophys. acta*, 39, 68 (1960).
² F. R. Frankel, C. F. Crampton, *J. Biol. Chem.*, 237, 3200 (1962). ³ H. E. Bond, W. G. Flamm et al, *J. Molec. Biol.*, 27, 289 (1967). ⁴ S. A. Bard, M. P. Gordon, *Plant Physiol.*, 44, 377 (1969). ⁵ Е. И. Маринина, Н. С. Владыченская, А. С. Антонов, *ДАН*, 185, 945 (1969). ⁶ K. C. Kirby, *Biochim. et biophys. acta*, 36, 117 (1959). ⁷ J. Marmur, *J. Molec. Biol.*, 3, 208 (1961). ⁸ Б. Ф. Ванюшин, *Современные методы в биохимии*, М., 1964, стр. 236. ⁹ J. Marmur, P. Doty, *J. Mol. Biol.*, 5, 109 (1962). ¹⁰ А. Л. Мазин, Г. Е. Сулимова, Б. Ф. Ванюшин, *Молек. биол.*, 4, № 2 (1970). ¹¹ Б. Ф. Ванюшин, Л. В. Машарина, А. Н. Белозерский, *ДАН*, 147, 145 (1962). ¹² J. Doškočil, F. Sorm, *Biochim. et biophys. acta*, 55, 953 (1962).