

Г. И. КИРЬЯНОВ, Б. Ф. ВАНЮШИН, И. Б. КУДРЯШОВА

ДНК-МЕТИЛАЗА ЗАРОДЫШЕЙ ВЬЮНА MISGURNUS FOSSILIS

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 4 XII 1970)

Обнаруживаемые в различных ДНК «минорные» основания (МЦ* и другие) представляют собой продукты ферментативской модификации обычных оснований на полинуклеотидном уровне⁽¹⁻⁴⁾. Функциональная роль этой модификации еще неясна, тем не менее имеется предположение о том, что она может играть исключительную роль в процессах клеточной дифференцировки⁽⁵⁾. Несмотря на то, что МЦ в ДНК высших организмов найден уже давно⁽⁶⁾, сведения о характере метилирования животных ДНК немногочисленны^(7, 8). Так, например, до сих пор ничего неизвестно о метилировании цитоплазматических ДНК (цДНК). Между тем, на определенных (ранних) стадиях эмбриогенеза именно эти ДНК, не учитывая митохондриальных, составляют подавляющее большинство ДНК клетки⁽⁹⁾. Неизвестно, существуют ли цитоплазматические ДНК-метилазы. В дифференцированных животных клетках ДНК-метилазная активность (ДНК-МА) сосредоточена главным образом во фракции ядер (около 90%) и отчасти в митохондриях (10%), а в растворимой цитоплазматической фракции она практически отсутствует^(2, 3).

Относительно свойств и локализации ДНК-метилаз эмбриональных клеток вообще нет никаких сведений. Отчасти это объясняется тем, что, в отличие от бактерий⁽¹⁾, в клетках эукариотов долгое время вообще не удавалось обнаружить ДНК-МА, а из животных клеток (печень крысы) ДНК-метилаза выделена впервые всего только два года назад⁽²⁾. Однако, как было показано позднее⁽³⁾, свойства и характеристики этого фермента на самом деле относились к препарату, который содержал 99,8% активности метилаз РНК и белка. Таким образом, сведения о ДНК-метилазах животных не только крайне скудны, но и, по-видимому, весьма противоречивы. Трудности при изучении этих ферментов в основном связаны с их крайне низкой активностью в дифференцированных клетках на фоне высокой активности других различных метилаз, которые используют один и тот же довор CH_3 -групп — S-аденозилметиний (SAM).

В настоящей работе предпринята попытка выявить ДНК-МА в развивающихся зародышах вьюна (*Misgurnus fossilis*) и изучить ее внутриклеточную локализацию. Особое внимание уделено выявлению и изучению свойств цитоплазматической ДНК-метилазы. В частности, изучена способность этого фермента метилировать суммарную ДНК зародышей, разных соматических клеток и спермы вьюна, а также гетерологичную ДНК *E. coli*. На наш взгляд, все это может представлять определенный интерес для понимания функциональной роли метилирования ДНК вообще и для решения вопроса о возможной специфичности метилирования разных клеточных ДНК в процессе эмбриогенеза.

Для изучения ДНК-МА использовали зародыши вьюна на стадиях бластулы и гастротулы, т. е. во время наиболее интенсивной репликации ДНК

* Сокращения: МЦ — 5-метилцитозин, Т — тимин, ДНК-МА — ДНК-метилазная активность, цДНК — цитоплазматическая ДНК, яДНК — ядерная ДНК, SAM — S-аденозил-L-метионин.

(¹⁰, ¹¹). Получение половых продуктов, оплодотворение икры, получение бластомер (зародыши без оболочек) и инкубирование бластомер проводили по методике Костомаровой и Нейфаха (¹²).

Поскольку о ДНК-метилазах рыб вообще нет сведений, мы прежде всего попытались установить, существует ли ДНК-МА в клетках развивающихся зародышей вьюна. Полученные бластомеры разрушали ультразвуком или гомогенизировали в растворе, содержащем 0,25 моля сахарозы, 0,05 М трис-НСI-буфер pH 7,8, 0,004 моля ацетата магния. Гомогенат (пробы, содержащие около 2 мг белка) инкубировали с 1—2 μ C C^{14} H₃-метионина (уд. активность 14 мС/ммоль, Венгрия) и 1,5 мг АТФ («Реанал») при 21° в течение 30—60 мин. Затем инкубационную смесь депротенизировали многократной хлороформенной обработкой, ДНК осаждали этанолом, обрабатывали щелочью (0,75 N NaOH, 18 час., 37°) для удаления РНК. Затем ДНК гидролизовали 5% HClO₄ (0,5 мл, 100°, 15 мин.) и измеряли радиоактивность гидролизата на сцинтиляционном счетчике Mark 1 («Nuclear Chicago») или гидролизовали до оснований (72% HClO₄, 100°, 60 мин.) и после разделения с помощью хроматографии на бумаге (⁷) основания элюировали и измеряли их радиоактивность.

После инкубирования гомогенатов зародышей вьюна с C^{14} H₃-метионином метка обнаруживается в пуриновых основаниях и в тимине ДНК. Радиоактивность выделенного МЦ составляет около 10% от всей радиоактивности ДНК, однако удельная радиоактивность МЦ примерно в 5—10 раз больше, чем обычных оснований. Аналогичная картина наблюдалась и после инкубирования с C^{14} H₃-метионином цитоплазматической фракции гомогената (без ядер). Это означает, что наряду с утилизацией CH₃-группы метионина по моноуглеродному пути обмена и включением C^{14} в кольца оснований в клетках зародышей вьюна происходит метилирование ДНК по остаткам цитозина.

После инкубирования неразрушенных бластомер C^{14} H₃-метионином в аналогичных условиях, но в присутствии 20 мМ формиата калия метка обнаруживается как в ДНК выделенных ядер, так и в ДНК цитоплазматической фракции. В обеих ДНК радиоактивностью обладают только МЦ и Т. В яДНК общая радиоактивность МЦ и Т примерно одинакова (отношение удельных активностей МЦ/Т равно около 20), а в цДНК активность Т очень низка и примерно в 3 раза меньше, чем МЦ. Таким образом, в клетках зародышей вьюна происходит метилирование, как яДНК, так и цДНК. Судя по активности тимина можно думать, что на стадии бластулы в клетках происходит и синтез, и метилирование яДНК, а цДНК при этом, по-видимому, только метилируется без значительного синтеза заново. Как бы там ни было, цДНК зародышей вьюна метилирована (содержит МЦ) и, по-видимому, может метилироваться в цитоплазме. Мы обнаружили МЦ (около 0,8 мол. %) также и в ДНК неоплодотворенных яиц морского ежа *Strongylocentrotus nudus*. Поскольку количество собственно ядерной ДНК в этих клетках ничтожно мало по сравнению с цДНК (около 1:1000), а содержание МЦ в яДНК невелико (около 0,8 мол. %), обнаруженный МЦ может принадлежать только цДНК яиц морского ежа. Таким образом, цДНК, как и яДНК животных содержат МЦ, однако эти ДНК отличаются, как по степени, так и, возможно, по характеру метилирования.

Для определения ДНК-МА экстракты из разных клеточных фракций (0,1—1 мг белка) с добавлением или без добавления ДНК инкубировали 60 мин. при 30° в 1 мл раствора, содержащего 0,2—1 μ C C^{14} H₃-SAM (уд. активность 52 мС/ммоль, «Amerskam»). Установлено, что практически вся включающаяся в ДНК метка (около 99%) содержится только в МЦ. Заметной активности в N⁶-метиладенине не найдено. Таким образом, в ДНК вьюна метилирования аденина не происходит, как это было установлено ранее для других животных (⁸). Это также указывает на отсутствие в инкубационной смеси бактериальных примесей, ДНК которых, как известно, содержит N⁶-метиладенин (¹³).

В противоположность дифференцированным клеткам животных (^{2, 3}), в клетках зародыша выюна почти вся ДНК-МА сосредоточена в цитоплазме, а во фракции ядер содержится только около 10% этой активности. В цитоплазматической фракции небольшая активность (по 10%) от суммарной активности клетки обнаруживается во фракции митохондрий (осадок, 20 000 g, 20 мин.) и микросом (осадок, 105 000 g, 60 мин.), вся остальная активность клетки (более 70%) сосредоточена в растворимой фракции (надосадочная жидкость, 105 000 g, 60 мин.). Обнаружение ДНК-МА во фракции митохондрий может указывать на то, что митохондриальная ДНК животных (рыб) может метилироваться и содержать МЦ. При изменении условий гомогенизации клеток и даже при намеренном частичном разрушении ядер заметного изменения в распределении ДНК-МА по отмеченным субклеточным фракциям не происходило. Резкое преобладание цитоплазматической ДНК-МА над ядерной в клетках зародышей выюна, по-видимому, не связано с переходом ферментов из ядра в цитоплазму при разрушении клеток.

При инкубировании растворимой фракции цитоплазмы клеток зародышей выюна с $C^{14}H_3$ -SAM происходит включение метки в ДНК без добавления экзогенной ДНК, т. е. ДНК-метилаза цитоплазмы этих клеток способна метилировать гомологичную ДНК. По этому признаку эта ДНК-МА отлична от бактериальных и сходна с ДНК-МА селезенки крысы и мыши (³). Следовательно, в клетках зародышей выюна, так же как и селезенки некоторых животных, ДНК может быть частично «недометилирована». Иными словами, в отличие от бактерий (^{14, 15}), в клетках животных может существовать определенный временный разрыв между собственно синтезом ДНК и ее модификацией.

Выявляемая в цитоплазме ДНК-метилаза активна в трис-буфере в довольно широком интервале pH; максимум ее активности наблюдается при pH 7,8. В калий-фосфатном буфере той же молярной концентрации ДНК-МА существенно ниже, чем в трис-буфере. Оптимальная температура ДНК-МА цитоплазмы равна 30°, она значительно выше оптимальной температуры развития зародышей (21°). При инкубировании растворимой цитоплазматической фракции с $C^{14}H_3$ -SAM в стандартных условиях количество включившейся в ДНК метки линейно зависит от времени (по крайней мере в течение 60 мин.). С увеличением количества вносимого в смесь белка цитоплазматической фракции включение метки возрастает, не достигая насыщения, отчасти, по-видимому, из-за присутствия во вносимых порциях белка «эндогенной» ДНК.

Включение метки из $C^{14}H_3$ -SAM заметно стимулируется при добавлении к смеси экзогенной ДНК из спермы и разных тканей выюна, и в особенности чужеродной ДНК из *E. coli* (рис. 1). При добавлении ДНК *E. coli*

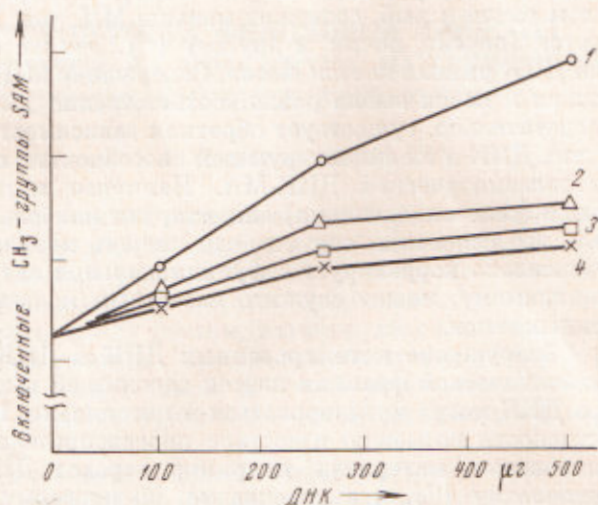


Рис. 1. Включение CH_3 -групп из $(C^{14}H_3)$ -S аденозилметионина в различные ДНК в присутствии растворимой цитоплазматической фракции бластодермы выюна. 1 мл реакционной смеси содержал: 2 мг белка цитоплазматической фракции, 0,5 $\mu C^{14}H_3$ — SAM, 0,05 M трис-буфер, pH 7,8. Смесь после добавления или без добавления ДНК инкубировали при 30° в течение 1 часа. ДНК: 1 — *E. coli*; 2, 3, 4 — селезенка, сперма, печень выюна

включение метки увеличивается более чем на 300%. Тем самым фермент из зародышей вьюна, как и другие метилазы (¹⁻³), способен метилировать гетерологичные ДНК. Тот факт, что этот фермент метилирует ДНК из всех изученных соматических клеток и спермы вьюна (рис. 1), указывает на то, что в цитоплазме зародышей может содержаться ДНК-МА, отличная от ядерной по своей специфичности. С другой стороны, это может отражать существование разной степени метилирования ДНК в различных клетках. Ранее мы обнаружили, что ДНК спермы и селезенки разных животных, в том числе и рыб, содержат меньше МЦ, чем ДНК других соматических клеток (печень, почки и другие) (¹²). Это же оказалось справедливым и для ДНК разных клеток вьюна. Содержание МЦ в ДНК селезенки, спермы, печени и почек вьюна равно соответственно 1,24, 1,35; 1,42 и 1,62 мол. %. Следовательно, существует обратная зависимость между содержанием МЦ в этих ДНК и их акцентирующей способностью при метилировании *in vitro* цитоплазматической ДНК-МА. Наименее метилированные *in vivo* ДНК вьюна (селезенка, сперма) акцентируют наибольшее количество CH_3 -групп. Есть все основания считать, что степень метилирования ДНК *in vivo* положительно коррелирует с функциональной активностью клетки (^{13, 16}) и, по-видимому, может служить известным показателем активности определенных генов.

Обнаружение метилированных ДНК и ДНК-МА в растворимой цитоплазматической фракции клеток зародышей вьюна свидетельствует о том, что ДНК могут метилироваться в цитоплазме. При высокой митотической активности возможно известное перераспределение ядерного и цитоплазматического материала, например переход ДНК-полимеразы из ядра в цитоплазму (¹⁷), и в цитоплазме, по-видимому, может содержаться фермент, метилирующий ядерную ДНК. Наряду с этим выявленная нами ДНК-МА в цитоплазме может содержать качественно отличную от ядерной ДНК-метилазу, которая предназначена для специфического метилирования именно цДНК. Поэтому дальнейшее изучение свойств и специфичности выявленной цитоплазматической ДНК-МА представляет значительный интерес.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
30 XI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Gold, J. Hurwitz, J. Biol. Chem., 239, 3858, 3866 (1964). ² B. Sheid, P. R. Srinivasan, E. Borek, Biochemistry, 7, 280 (1968). ³ F. Kalousek, R. Morris, J. Biol. Chem., 249, 2439 (1968); 244, 1157 (1969). ⁴ F. Kalousek, R. Morris, Science, 164, 721 (1969). ⁵ E. Scarano, M. Iaccarino et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 57, 1394 (1967). ⁶ G. R. Wyatt, Nature, 166, 237 (1950). ⁷ А. С. Антонов, О. О. Фанорова, А. Н. Белозерский, ДАН, 147, 1480 (1962). ⁸ В. Ф. Ваныushin, Z. G. Tkacheva, A. N. Belozersky, Nature, 225, 948 (1970). ⁹ L. Piko, A. Tyler, J. Vinograd, Biol. Bull., 132, 68 (1967). ¹⁰ М. А. Айтхожин, Н. В. Белицина, А. С. Спири, Биохимия, 29, 1 (1964). ¹¹ М. Я. Тимофеева, К. А. Кафиани, Биохимия, 28, 1 (1964). ¹² А. А. Костомарова, А. А. Нейфах, Журн. общ. биол., 25, 386 (1964). ¹³ В. Ф. Ваныushin, A. N. Belozersky et al., Nature, 218, 1066 (1968). ¹⁴ C. Lark, J. Mol. Biol., 31, 389 (1968). ¹⁵ D. Billen, J. Mol. Biol., 31, 477 (1968). ¹⁶ Г. Д. Бердышев, Г. К. Коротаев и др., Биохимия, 32, 988 (1967). ¹⁷ J. B. Gurdon, V. A. Speight, Exp. Cell Res., 55, 253 (1969). ¹⁸ L. A. Loeb, B. Fansler, Biochim. et biophys. acta, 217, 50 (1970).