

В. К. ВАСИЛЬЕВ, Д. В. ГАРИБЯН, Р. А. ЗАХАРЯН,
А. А. ГАЛЮЯН, Б. Ф. ВАНЮШИН

РАЗЛИЧНЫЙ УРОВЕНЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В РАЗНЫХ ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 12 X 1971)

В ДНК всех животных в качестве дополнительного основания найден 5-метилцитозин (МЦ). Это основание формируется на полинуклеотидном уровне в результате избирательного метилирования отдельных остатков цитозина в определенных последовательностях ДНК ⁽¹⁾ под воздействием специфических ДНК-метилаз ^(2, 3).

Мы показали, что разные соматические и половые клетки (ткани) одного животного могут заметно различаться по содержанию МЦ в ДНК ⁽⁴⁾. Это может указывать на существование различного характера и степени модификации генома в разных клетках одного и того же организма и согласуется с известным представлением о возможной роли метилирования ДНК в явлениях клеточной дифференцировки ⁽⁵⁾. К сожалению, до сих пор значение метилирования ДНК в животных клетках еще не совсем ясно, однако несомненно, что эта модификация генома является высокоспецифичной, отражается на вторичной структуре ДНК и имеет существенное значение для узнавания при различных ДНК-белковых взаимодействиях. Тем самым, метилирование ДНК, по-видимому, играет большую роль в регуляции активности генов, в особенности на уровне репликации и транскрипции ДНК ⁽⁶⁾.

О характере метилирования ДНК в разных отделах центральной нервной системы животных вообще ничего неизвестно. Мы исследовали такие отделы как гипоталамус, нейрогипофиз, большие полушария головного мозга и мозжечок.

Наши многолетние исследования показали, что между медиаторами нервного импульса и нейросекреторным гормонообразованием в одних и тех же нейронах существуют интимные функционально-биохимические взаимоотношения. Хотя в нейрогипофизе обнаружены октапептиды — вазопрессин, окситоцин и др., они образуются в гипоталамусе. Известно, что в нейрогипофизе отсутствуют нервные клетки. Нейрогипофизу в течение долгого времени приписывали роль лишь резервуара гипоталамических гормонов.

Многочисленные наши биохимические исследования, однако, показали, что в нейрогипофизе синтезируются физиологически активные пептиды, фосфолипиды и другие соединения, которые отсутствуют в гипоталамусе. В нем мы обнаружили все виды нуклеиновых кислот ⁽⁸⁾.

Поэтому можно представить, что глиальные клетки нейрогипофиза могут также быть секреторно активными элементами. Если гипоталамус и нейрогипофиз являются своеобразными железами внутренней секреции и имеют исключительно важное значение в гуморальной регуляции функции эндокринных желез и других органов, то кора головного мозга, мозжечок и продолговатый мозг имеют совершенно другие морфо-функциональные и биохимические особенности. Можно предположить, что в отдельных частях мозга имеется функциональная гетерогенность генетического материала клеток. Одним из показателей такой гетерогенности служит изучение уровня метилирования ДНК. Мы допускаем также возможность наличия специфических, альтернативных путей биосинтеза белка в различных частях мозга ⁽⁹⁾.

В свете наших данных о разной степени метилирования ДНК в разных клетках и в связи с выраженной специализацией и полифункциональной активностью нервных тканей нам представлялось интересным провести сравнительное изучение состава обычных оснований и содержания МЦ в ДНК из разных отделов головного мозга. Мы использовали головной мозг крупного рогатого скота, что позволило получить для анализа ДНК мозговую ткань в достаточном количестве. Сразу же после убоя животных быстро выделяли отделы мозга и замораживали сухим льдом. Для получения ДНК из больших полушарий использовали мозг 1 животного, из мозжечка и продолговатого мозга — 3—5 животных, из нейрогипофиза и гипоталамуса — около 20 животных.

Замороженную нервную ткань гомогенизировали в стандартном солевом растворе с ЭДТА в присутствии 1—2% додецилсульфата натрия при pH 8 и из гомогената с помощью хлороформенной и фенольной депротеинизации выделяли препараты суммарной ДНК. Полученные препараты обрабатывали панкреатической РНКазой и затем проназой в стандартных условиях для удаления РНК и белка. Выделенные сухие препараты высокополимерных ДНК гидролизовали до оснований (99% муравьиная кислота, 175°, 30 мин.) и основания разделяли с помощью двукратной одномерной восходящей хроматографии на бумаге в растворителе *n*-бутанол — вода — 25% NH_4OH (60:40:0,1). Затем через зону, содержащую гуанин, пропускали 0,1 *N* HCl в том же направлении для получения более локальных пятен этого основания. После разделения оснований в зоне МЦ обычно обнаруживается заметное количество аденина, поэтому для определения МЦ мы прибегали к рехроматографии МЦ в кислых растворителях (*). Такая рехроматография может приводить к частичной потере самого МЦ (до 10%). Для того чтобы избежать потери МЦ, в настоящей работе мы не проводили рехроматографию, а определяли его непосредственно после двукратной хроматографии спектрофотометрически:

$$\mu\text{мол на 1 мл МЦ} = 0,1205 \cdot (E_{290} - E_{310}).$$

Поскольку аденин и тимин практически не обладают поглощением при 290 мμ, такое измерение позволяло количественно определять МЦ в соответствующих элюатах без заметного искажения данных за счет следовых количеств аденина или тимина.

Данные по составу обычных оснований и содержанию МЦ в ДНК разных отделов мозга крупного рогатого скота представлены в табл. 1. Они являются средними по крайней мере из 3—5 определений состава ДНК в каждом из выделенных препаратов.

Как можно видеть из табл. 1, по составу все изученные ДНК полностью отвечают правилам Чаргаффа и принадлежат к АТ-типу. Количество ГЦ-пар оснований (Г + Ц + МЦ) в этих ДНК составляет 44,6—45,5 мол. %. По этому признаку заметных различий в ДНК из разных отделов головного мозга не обнаруживается. Это согласуется с общепринятыми представлениями об отсутствии выраженной тканевой специфичности ДНК по составу. Вместе с тем, изученные ДНК четко различаются по содержанию МЦ: некоторые из изученных ДНК отличаются более чем в 1,5 раза (кора мозжечка, гипоталамус $P < 0,001$).

Максимальное содержание МЦ имеется в ДНК больших полушарий и коре мозжечка, а наименьшее — в ДНК гипоталамуса. ДНК гипоталамуса по этому признаку статистически достоверно отличается от ДНК всех других отделов головного мозга. Относительно немного МЦ находится в ДНК нейрогипофиза. По-видимому, более тонкие структуры того или иного отдела мозга могут также иметь неодинаковое содержание МЦ в ДНК (отдельные слои коры мозга и мозжечка, отделы гипофиза, различные нейросекреторные ядра гипоталамуса, ядра продолговатого мозга и т. д.).

Таблица 1

Состав ДНК некоторых отделов мозга крупного рогатого скота (*Bos taurus*), мол. %

Источник ДНК	Г	А	Ц	МЦ ($M \pm m$)	Т	Г + Ц + М
Большое полушарие	22,7	27,3	21,2	$1,63 \pm 0,01$	27,3	45,5
Белое вещество больших полушарий	22,3	27,8	20,9	$1,43 \pm 0,03$	27,6	44,6
Мозжечок	22,5	27,7	20,9	$1,55 \pm 0,02$	27,4	45,0
Кора мозжечка	22,9	27,7	20,9	$1,62 \pm 0,09$	26,9	45,4
Продолговатый мозг	22,8	27,4	21,2	$1,44 \pm 0,02$	27,1	45,4
Нейрогипофиз	22,6	27,8	20,8	$1,40 \pm 0,09$	27,4	44,8
Гипоталамус	22,7	27,6	21,5	$1,11 \pm 0,02$	27,1	45,3

Данные по содержанию МЦ в ДНК разных отделов мозга в принципе могут объясняться разной степенью метилирования ДНК и (или) различным соотношением молекул ДНК неодинакового состава. Хотя сейчас нет оснований, чтобы исключать вторую из этих альтернатив, мы склонны принять первую. Отчасти это может подтверждаться нашими данными о том, что акцептирование CN_2 -групп при метилировании ДНК разных тканей *in vitro* обратно пропорционально степени метилирования ДНК в исходных клетках ⁽³⁾. К тому же, изученные ДНК, как видно из табл. 1, не отличаются по составу; заметных тканевых различий не обнаружено и по другим параметрам первичной структуры ⁽¹⁰⁾.

Таким образом, не только клетки из разных органов (тканей) животного ⁽⁴⁾, но и клетки из разных отделов одной и той же высокодифференцированной ткани (головной мозг) обладают разными уровнями метилирования ДНК.

К сожалению, сейчас еще нельзя определенно сказать, чем обусловлен разный уровень метилирования ДНК разных отделов мозга. Поскольку с метилированием ДНК может быть связана дифференцировка клеток, то отмеченные различия в известной мере могут рассматриваться как отражение собственно самой дифференциации и специализации клеток нервной ткани. В этом случае метилированные (или, напротив, неметилированные) участки ДНК, по-видимому, необходимы для выраженного дифференцированного функционирования генов той или иной клетки. Вместе с этим, вполне возможно, что уровень метилирования ДНК может изменяться в зависимости от функционального состояния клеток. Так, например, известно, что по мере угасания функциональной активности клеток (при старении) содержание МЦ в их ДНК падает ⁽¹¹⁾. Более того, мы предположили, что уровень метилирования ДНК может изменяться в результате возможного энзиматического деметилирования ⁽¹¹⁾. Тем самым, выявленные нами различия в степени метилирования ДНК разных отделов мозга могут быть и отражением определенного функционального состояния клеток.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
12 X 1971

Институт биохимии
Академии наук АрмССР
Ереван

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Б. Ф. Ванюшин, Л. В. Машарина, А. Н. Белозерский, ДАН, 147, 958 (1962).
- ² F. Kalousek, N. R. Morris, J. Biol. Chem., 244, 1157 (1969).
- ³ B. F. Vanyushin, G. I. Kiryanov et al., FEBS Letters, 15, 313 (1971).
- ⁴ B. F. Vanyushin, S. G. Tkacheva, A. N. Belozersky, Nature, 225, 948 (1970).
- ⁵ E. Scaramo, M. Iaccarino et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 57, 1394 (1967).
- ⁶ Б. Ф. Ванюшин, Усп. совр. биол., 65, 163 (1968).
- ⁷ А. А. Галоян, Некоторые проблемы биохимии гипоталамической регуляции, Ереван, 1965.
- ⁸ А. А. Галоян, Р. А. Захарян, Ж. Г. Абелян, Вопр. биохимии мозга, 4, 157 (1968).
- ⁹ А. А. Галоян, Р. А. Захарян, Д. В. Гарибян, Биол. журн. Армении, 23, 14 (1970).
- ¹⁰ А. Л. Мазин, Б. Ф. Ванюшин, Г. К. Коротаев, ДАН, 186, 1434 (1969).
- ¹¹ Г. Д. Бердышев, Г. К. Коротаев и др., Биохимия, 32, 988 (1967).