

УДК 547.963.3:612.419

БИОХИМИЯ

Н. А. ФЕДОРОВ, Н. А. КОРЕШКОВА

МЕТИЛИРОВАНИЕ ВНОВЬ СИНТЕЗИРОВАННОЙ ДНК В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРЫС

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 20 VII 1972)

В настоящее время получены данные о значительном увеличении ДНК-метилазной активности в эмбриональных тканях выюна⁽¹³⁾, в регенерирующей печени⁽⁸⁾ и увеличении метилирования ДНК в лейкоцитах больных лейкозами^(2, 3, 11, 15). В противоположность дифференцированным клеткам эмбриональные клетки выюна содержат 70% ДНК-метилазной активности в цитоплазме и только 10% — в ядре⁽¹³⁾. В связи с тем, что содержание 5-метилцитозина (5-МЦ) различно в разных органах некоторых животных⁽¹⁴⁾ и изменяется в период нереста у лосося, Б. Ф. Ванюшин и соавторы отводят метилированию ДНК определенную роль в регуляции активности генов клетки⁽¹¹⁾. Существование тканевой специфичности по содержанию 5-МЦ было продемонстрировано на клетках тканей мышей и в органах развивающегося куриного эмбриона методом инкубации клеток с радиоактивным C^{14} -дезоксидитидином⁽⁶⁾.

Клетки костного мозга, происходящие из родоначальной стволовой клетки, образуют несколько морфологически и функционально разнородных групп на разных стадиях дифференцировки. Соотношение между популяциями клеток костного мозга может в значительной степени варьировать в зависимости от потребностей организма и воздействия различных агентов. Однако конкретные биохимические механизмы, управляющие дифференцировкой клеток костного мозга, совершенно не изучены. В этой работе сообщаются данные об уровне метилирования вновь синтезированной ДНК с применением трех радиоактивных пиримидиновых предшественников: 2- C^{14} -оротовой кислоты (2- C^{14} -Оро), 2- C^{14} -уридина (2- C^{14} -У) и равномерно меченого C^{14} -дезоксидитидина (C^{14} -ДЦ).

Опыты проводили на крысах-самцах линии Вистар весом 200–250 г. После декапитации костный мозг вымывали из трубчатых костей средой следующего состава: среда 199–90%, инактивированная сыворотка группы АВ 10%, пенициллин 100 ед/мл, стрептомицин 100 мкг/мл, гепарин 3 мкг/мл. Приготовленную суспензию разливали во флакончики так, чтобы каждая проба содержала 50–80 млн клеток в 5 мл среды, и добавляли меченые предшественники: по 40 мкС 2- C^{14} -Оро (уд. активность мкС/μмоль), по 20 мкС 2- C^{14} -У (уд. активность 8 мкС/μмоль), по 1 мкС равномерно меченого C^{14} -ДЦ (уд. активность 512 мкС/μмоль) на пробу. Пробы инкубировали при 37° 1;3 и 24 час, затем клетки отмывали холодным физиологическим раствором, добавляли 1 мг протелина* (предварительно инкубировали его при 37° в 1 мл 0,15 М NaCl, 0,015 М цитрата Na с целью инактивации возможных примесей ДНКазы), 8 мг сухого NaCl и оставляли при 37°. Через 18 час. добавляли равный объем 0,6 N КОН с целью гидролиза присутствующей РНК. Через 1 час пробы охлаждали и добавляли равный объем холодной 10% ТХУ. Надосадочную жидкость отбрасывали, осадок 2 раза промывали 5% ТХУ с целью удаления продуктов гидролиза РНК и экстра-

* Протелин — протеолитический фермент, аналогичный проназе, получаемый в Институте органической химии АН СССР, лаборатория проф. Е. Д. Каверзневой.

гиревали ДНК из осадка 1 мл 5% ТХУ 15 мин. при 90°. Затем ТХУ удаляли эфиром, водный экстракт высушивали, гидролизovali в 85% муравьиной кислоте 1 час при 170°. Полученные основания разделяли хроматографией на бумаге FN 12 (ГДР) — изопропиловый спирт: конц. HCl:H₂O (65:17,2:17,8) 24–26 час., применяя в качестве свидетеля 5-МЦ. Радиоактивность элюатов пятен измеряли в диоксановом сцинтилляторе на Nuclear Chicago Mark-1. Помимо хроматографической идентификации

Таблица 1

Включение C¹⁴-оротовой кислоты в ДНК костного мозга крыс

Продолж. инкубации, час	Число животных	Цитозин		5-метилцитозин		Тимин		5-МЦ 5-МЦ+Ц' %
		имп/мин на образец	%	имп/мин на образец	%	имп/мин на образец	%	
1	1	1089	37,5	1069	37	742	25,5	49,5
	1	921	39	923	39	516	22	50
	1	470	22,8	1528	74,2	58	3	76,5
	1	32	13,5	118	50	87	36,5	78,6
3	1	274	19	814	54	402	27	74
	2	335	23,8	187	13,3	887	62,9	35,8
	2	534	29,6	104	5,8	1167	64,6	16,3
	1	243	25	164	17	555	58	40,3
24	1	279	25	279	25	564	50	50
	2	2235	27	218	2,6	5843	70,4	8,9
	2	1726	20,6	146	1,7	6539	77,7	7,8
	1	1784	36	335	7	2772	57	15,8
	1	3196	40	457	6	4290	54	12,5

5-МЦ мы применяли реакцию дезаминирования при помощи NaNO₂ по схеме (*). Условия дезаминирования обеспечивали превращение 50–60% 5-МЦ в тимин.

Как можно видеть из табл. 1, при инкубации клеток костного мозга с C¹⁴-Оро в течение 1 часа максимальное включение метки происходит в 5-МЦ (>50%). Инкубация в течение 3 час. приводит к изменению распределения метки между пиримидиновыми основаниями: включение в тимин возрастает примерно в 2 раза (>50%), а включение в 5-МЦ снижается в 2 раза (<25%). Дальнейшее увеличение инкубации до 24 часа приводит к дополнительному небольшому увеличению процента метки в тимине и снижению в 5-МЦ.

Чтобы исключить предположение о том, что столь высокое содержание 5-МЦ во вновь синтезированной ДНК при инкубации клеток костного мозга в течение 1 и 3 час. с C¹⁴-Оро является артефактом и радиоактивность связана с какими-либо примесями, а не с 5-МЦ, элюаты 5-МЦ в нескольких опытах дезаминировали. Продукты дезаминирования подвергли рехроматографии с последующей радиометрией пятен 5-МЦ и тимина. Полученные данные распределения метки между 5-МЦ и тиминотом соответствовали проценту эффективности химического дезаминирования 5-МЦ при данных условиях.

Б. Ф. Ванюшин с соавторами в опытах на растениях с C¹⁴-урацилом, напротив, обнаружили уровень метилирования цитозина вновь синтезированной ДНК в 10–20 раз ниже обычного, установленного спектрофотометрически (*).

Изучение метилирования цитозина по отношению радиоактивных 5-МЦ/Ц + 5-МЦ позволяет находить уровень метилирования только небольшой фракции ДНК, которая синтезируется за период инкубации и с радиоактивным пиримидином, в то время как спектрофотометрическое определение дает среднее содержание 5-МЦ в сумме гетерогенных фракций ДНК из суммы всех клеток.

В случае синтеза C^{14} -5-МЦ на нуклеотидном уровне удельная активность его не может быть больше, чем удельная активность C^{14} -цитозина, и поэтому включение C^{14} -5-МЦ в ДНК не должно превышать включение C^{14} -цитозина. Такое превышение возможно только в случае существования специального независимого пути синтеза 5-МЦ. Но возможность существования нескольких самостоятельных путей синтеза предшественников ДНК постулировано пока только на *Escherichia coli* (16).

Таблица 2

Включение C^{14} -уридина и C^{14} -дезокситидина в ДНК костного мозга
(число исследованных животных 12)

Меченый предшественник	Продолж. инкубации, час	Цитозин		5-метилцитозин		Тимин		5-МЦ 5-МЦ+Ц %
		имп/мин на образец	%	имп/мин на образец	%	имп/мин на образец	%	
C^{14} -У	3	2483	28,9	112	1,3	5988	69,8	4,3
	3	6373	32,8	306	1,6	12749	65,6	4,6
	21	25526	39,4	1262	2	37911	58,6	4,7
C^{14} -ДЦ	0,5	8110	50,8	409	2,6	7,428	46,6	4,8
	3	49725	41,9	2645	2,2	66219	55,9	5,0
	3	21452	47,4	1081	2,4	22740	50,2	4,8
	21	55180	33	3268	2	108494	65	5,6

Как показывает табл. 2, распределение метки между пиримидиновыми основаниями ДНК клеток костного мозга крыс при инкубации их с C^{14} -У и C^{14} -ДЦ является сходным и не изменяется с увеличением продолжительности инкубации. В этих опытах наблюдается обычный уровень метилирования цитозина ДНК $(5\text{-МЦ} / (5\text{-МЦ} + \text{Ц}) \cdot 100 = 4,5\%)$. Как показывают абсолютные цифры (имп/мин), включение C^{14} -У и C^{14} -ДЦ в ДНК (запасный путь) во много раз интенсивнее, чем C^{14} -Оро (путь де novo). В свете этих данных мы полагаем, что необычно высокий уровень метилирования цитозина вновь синтезированной ДНК при инкубации с C^{14} -Оро обусловлен тем, что C^{14} -Оро хорошо утилизируется только небольшой популяцией клеток, в которых еще не выключен биосинтез пиримидинов de novo. Применение меченых пиримидинов позволяет определять процент метилирования цитозина только во вновь синтезированной ДНК, а не во всей суммарной ДНК клеток. Поэтому отчетливо удалось наблюдать, что клетки костного мозга, хорошо утилизирующие C^{14} -Оро, синтезируют ДНК с необычно высоким уровнем метилирования цитозина. Содержание 5-МЦ в этой вновь синтезированной ДНК быстро падает, по-видимому, в результате ферментативного дезаминирования 5-МЦ на полинуклеотидном уровне (10, 12).

Действительно, в наших опытах через 3 часа инкубации (табл. 1) имеет место абсолютное и процентное увеличение активности в тимине и уменьшение в 5-МЦ по сравнению с часовой инкубацией (2). В случае инкубации клеток костного мозга с C^{14} -У и C^{14} -ДЦ происходит интенсивное использование их для биосинтеза пиримидинов ДНК клетками всех популяций. Это обстоятельство не позволяет наблюдать вновь синтезированную ДНК с высоким уровнем метилирования цитозина, которая синтезируется только сравнительно небольшой популяцией клеток, утилизирующих Оро. Наиболее вероятно, что такими клетками являются полипотентные стволовые клетки костного мозга.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Б. Ф. Ванюшин, Д. Х. Кадырова и др., Биохимия, **36**, 6, 1521 (1971).
- ² Н. А. Федоров, Т. В. Боровкова, Р. Э. Кимерал, Патогенез, лечение и эпидемиология лейкозов. Матер. Всесоюзн. симп., Рига, 1971. ³ L. S. Desai, U. C. Wulff, G. E. Foley. *Exp. Cell Res.*, **65**, 1, 260 (1971). ⁴ P. Grippo, M. Iaccarino et al., *J. Mol. Biol.*, **36**, 2, 195 (1968). ⁵ F. Kalousek, N. R. Morris, *J. Biol. Chem.*, **244**, 5, 1157 (1969). ⁶ J. W. Kappler, *J. Cell. Physiol.*, **78**, 1, **33** (1971).
- ⁷ J. W. Kappler, *J. Cell. Physiol.*, **75**, 1, 21 (1970). ⁸ N. R. Morris, K. D. Pih, *Cancer Res.*, **31**, 4, 433 (1971). ⁹ S. R. Pelk, *Cell and Tissue Kinetics*, **4**, 6, 577 (1971).
- ¹⁰ E. Scarano, M. Iaccarino et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**, 1394 (1967).
- ¹¹ R. Silber, E. Berman et al., *Biochim. et biophys. acta*, **123**, 3, 638 (1966).
- ¹² T. W. Sneider, V. R. Potter, *J. Mol. Biol.*, **42**, 2, 271 (1969). ¹³ B. F. Vanyushin, G. I. Kiryanov et al., *FEBS Letters*, **15**, 4, 343 (1971). ¹⁴ B. F. Vanyushin, S. G. Tkacheva, A. N. Belosersky, *Nature*, **225**, 948 (1970). ¹⁵ S. Shirakawa, G. F. Saunders, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **138**, 1, 369 (1971).
- ¹⁶ R. Werner, *Nature New Biol.*, **233**, 38, 99 (1971).