

УДК 547.963.3.577.157.6

БИОХИМИЯ

А. Л. МАЗИН, Г. Е. СУЛИМОВА

КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ СОДЕРЖАНИЕМ ГЦ И 5-МЕТИЛЦИТОЗИНА В ДНК РАСТЕНИЙ

(Представлено академиком А. С. Спириным 31 I 1973)

В ДНК всех изученных до сих пор растений, животных, водорослей и многих микроорганизмов содержится метилированное производное цитозина — 5-метилцитозин (МЦ), количество которого может варьировать у разных видов от 0,05 до 9,5 мол. % (¹⁻⁴). Известно, что МЦ образуется путем энзиматического метилирования остатков цитозина в определенных последовательностях полинуклеотидной цепи ДНК (⁵). До настоящего времени не ясно, какое функциональное значение может иметь подобная модификация первичной структуры ДНК.

Принято считать, что содержание МЦ не зависит от состава ДНК (⁴). Однако, заключение это было сделано не на основании прямого статистического анализа экспериментальных данных, а, скорее всего, под впечатлением известных исследований Голда и Гурвитца по метилированию ДНК *in vitro* с использованием препаратов ДНК — метилаз из *Escherichia coli* (⁵).

В настоящей работе мы систематизировали и обобщили данные о содержании МЦ и нуклеотидном составе ДНК разных таксонов растений (всего около 200 видов) (^{1-4, 6}). Мы попытались выяснить не только общую картину распределения МЦ в ДНК различных в систематическом отношении групп организмов, но и вскрыть некоторые принципы, лежащие в основе процесса метилирования разных ДНК.

Как видно из табл. 1, содержание МЦ и ДНК определенно связано с систематическим положением разных групп организмов. Количество МЦ, усредненное для всех изученных представителей данного таксона, заметно увеличивается в ряду: микроорганизмы (0,2%), водоросли (2,3%), архегонные растения (3,4%), двудольные (4,9%) и однодольные растения (5,9%). Вместе с тем нуклеотидный состав ДНК для тех же таксонов

Таблица 1
Корреляция между МЦ и ГЦ в ДНК растений из разных таксонов*

Таксоны	n	ГЦ, %	МЦ, %	$r \pm m$	t_r	P	ГЦ = A + RМЦ		t_R	P
							A	R $\pm m$		
Отдел Angiospermae	182	40,7 $\pm$ 0,9	6,0 $\pm$ 3,6	0,33 $\pm$ 0,07	4,1	<0,01	35,0	1,02 $\pm$ 0,26	3,9	<0,01
Класс Liliatae	161	40,8 $\pm$ 9,9	5,9 $\pm$ 3,6	0,42 $\pm$ 0,06	3,3	<0,05	32,9	1,33 $\pm$ 0,22	6,1	<0,001
Сем. Liliaceae	93	39,2 $\pm$ 8,7	6,1 $\pm$ 2,9	0,50 $\pm$ 0,03	5,8	<0,01	30,3	1,46 $\pm$ 0,26	5,6	<0,001
Род Lilium	23	38,2 $\pm$ 4,5	5,5 $\pm$ 2,2	0,75 $\pm$ 0,09	5,8	<0,01	28,7	1,72 $\pm$ 0,33	5,2	<0,001
Род Allium	28	38,0 $\pm$ 5,0	6,4 $\pm$ 1,3	0,73 $\pm$ 0,09	5,6	<0,01	20,7	2,73 $\pm$ 0,50	5,5	<0,001
Сем. Orchidaceae	33	42,2 $\pm$ 6,8	5,5 $\pm$ 3,2	0,74 $\pm$ 0,10	4,7	<0,01	31,7	1,96 $\pm$ 0,32	6,3	<0,001
Класс Magnoliatae	21	39,9 $\pm$ 6,2	4,9 $\pm$ 1,5	0,58 $\pm$ 0,14	4,1	<0,01	29,6	2,06 $\pm$ 0,66	3,12	<0,05
Архегониальные **	14	43,4 $\pm$ 4,7	3,4 $\pm$ 0,9	—	—	—	—	—	—	—
Водоросли	19	55,5 $\pm$ 6,8	2,3 $\pm$ 1,5	0,59 $\pm$ 0,14	3,9	<0,01	45,2	4,49 $\pm$ 1,48	3,0	<0,05
Микроорганизмы	22	52,7 $\pm$ 11,2	0,2 $\pm$ 0,2	0,34 $\pm$ 0,19	1,9	>0,05	50,0	18,42 $\pm$ 11,52	1,6	>0,05

* r — коэффициент корреляции, R — коэффициент, регрессии, t — нормированное отклонение, P — уровень значимости (достоверность), n — число изученных видов в каждом таксоне.

** В группу архегониальные включены голосеменные растения, папоротники, мхи.

очень сходен (табл. 1). Таким образом очевидно, что увеличение содержания МЦ в ДНК шло параллельно с повышением общего уровня организации видов в процессе их прогрессивной эволюции.

Легко заметить, что между содержанием метилированного цитозина и нуклеотидным составом ДНК имеется определенная взаимосвязь — корреляция, достоверность и степень тесноты которой можно оценить

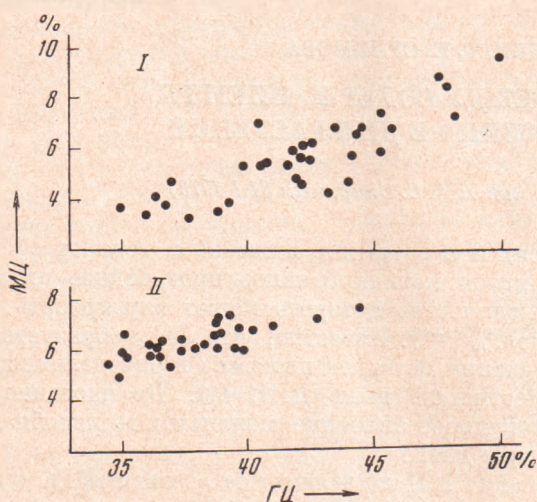


Рис. 1. Корреляция между содержанием МЦ и ГЦ в ДНК видов из сем. Orchidaceae (I) и рода Allium (II). Данные взяты из обзора [1]

статистически, считая, что выбор объектов случаен, а характер распределения признаков близок к нормальному (7). Для всех рассмотренных нами таксонов растений, а также для водорослей имеет место достоверная положительная корреляция (табл. 1). Интересно отметить, что теснота корреляции (r) обратно пропорциональна рангу таксона. Так, например, у лилиецветных величина r возрастает в следующем порядке: класс Liliatae $0,42 \pm 0,06$, семейство Liliaceae $0,50 \pm 0,08$, род Lilium $0,75 \pm 0,09$ (табл. 1). Иными словами, теснее сгруппировались близкие в систематическом отношении виды и степень связи между МЦ и ГУ тем уже, чем

ниже ранг таксона. Последнее характерно лишь для таксономически важных признаков. Вполне естествен поэтому вопрос о том, насколько специфичен характер зависимости между МЦ и ГЦ для разных групп.

Если по оси ординат отложить количество МЦ, а по оси абсцисс — содержание ГЦ-пар в ДНК, то соответствующие одному и тому же таксону точки образуют вытянутый по диагонали овал (рис. 1). Это говорит о том, что зависимость, связывающая между собой МЦ и ГЦ, близка к линейной и ее можно описать уравнением регрессии: $ГЦ = A + RМЦ$, где R — коэффициент регрессии, отражающий величину $\tan$ угла наклона прямой к оси абсцисс (7). Тем самым величина R точно отразит характер зависимости между МЦ и ГЦ в данном таксоне. Из уравнения регрессии для класса Liliatae ($ГЦ = 32,9 \pm 1,33 МЦ$) следует, что с увеличением МЦ на 1 моль. % содержание ГЦ в ДНК увеличится в среднем на 1,33 мол. %. В то же время в другом классе покрытосеменных растений Magnolitae, ($ГЦ = 29,6 \pm 2,06 МЦ$) с увеличением МЦ на 1 % ГЦ возрастает в среднем уже на 2,06 %. Величина R специфична не только для разных классов одного отдела, но и для разных семейств одного порядка: сем. Liliaceae $R = 1,46 \pm 0,26$ и сем. Orchidaceae $R = 1,96 \pm 0,32$; и даже для разных родов одного и того же семейства: род Lilium $R = 1,72 \pm 0,33$ и род Allium $R = 2,73 \pm 0,50$. В силу этого теоретические линии регрессии для названных таксонов пересекаются между собой (рис. 2). Примечательно, что линия регрессии для ДНК водорослей проходит значительно ниже и не пересекается с линиями для высших растений. Промежуточное положение между ними занимает прямая, полученная нами для ДНК костистых рыб: $ГЦ = 40,4 \pm 1,7 МЦ$ (8). Таким образом, сам факт наличия тесной взаимосвязи между МЦ и ГЦ в ДНК различных групп организмов не вызывает сомнений. Характер этой зависимости, судя по имеющимся данным, специфичен для разных таксонов и может оказаться полезным в

качестве дополнительного таксономического признака. Так, если какой-либо вид выходит за пределы доверительной зоны регрессии (ширина которой также обратно пропорциональна рангу таксона), то, видимо, имеются основания ставить под сомнение или его принадлежность к данному таксону, или качество экспериментальных данных.

В ДНК водорослей и бактерий помимо МЦ содержится метилированное производное аденина-N-6 метиладенин (³, ⁴). Как показали наши расчеты, ни у водорослей, ни у микроорганизмов МА с нуклеотидным составом ДНК достоверно не коррелирует. Для бактерий наличия достоверной корреляции между МЦ и ГЦ мы не обнаружили. Возможно, дальнейшие исследования позволят вскрыть аналогичную зависимость и в этой группе.

Судя по литературным данным, мы, по-видимому, впервые столкнулись с широко распространенным фактом существования взаимосвязи между содержанием МЦ и нуклеотидным составом ДНК. В чем же причина существования подобной корреляции?

На этот вопрос можно дать, по крайней мере, два неальтернативных ответа.

1. Корреляция между МЦ и ГЦ возможна лишь при условии, что в ДНК разных организмов метилируются сходные или одинаковые последовательности.

Известно, что в ДНК всех исследованных высших растений и животных большая часть МЦ (около 60%) локализована в последовательностях типа: Пур — МЦ — Пур (⁹). При этом предпочтительно метилируются лишь те цитидиловые остатки, которые связаны 3'-фосфатом с дезоксигуаниловой кислотой МЦ — Г (¹⁰). Следовательно, МЦ преимущественно содержится в богатых ГЦ-парами участках ДНК. В этой связи следует упомянуть, что ДНК-метилаза из *B. Subtilis* (модифицирующая исключительно остатки цитозина) в опытах *in vitro* включает CH_3 -группы в ДНК пропорционально содержанию в них ГЦ (¹¹). Сходные результаты были получены Драговским и Моррисом для фермента из печени крыс (¹²). Таким образом, наличие корреляции может быть связано с тем, что у высших организмов преимущественно метилируются ГЦ-обогащенные последовательности ДНК.

2. С другой стороны, сам факт существования корреляции позволяет предположить, что различные по нуклеотидному составу фракции одной и той же ДНК должны закономерно отличаться и по степени метилирования. Именно к такому выводу мы пришли в результате термического фракционирования по составу (¹³) ДНК некоторых покрытосеменных растений (⁶). Оказалось, что содержание МЦ прямо пропорционально содержанию ГЦ во фракциях ДНК: $\text{ГЦ} = 32,0 \pm 2,0 \text{ МЦ}$ ($S = \pm 0,03$, $t = 20,4$, $P < 0,001$). Примечательно, что все изученные фракции содержали одинако-

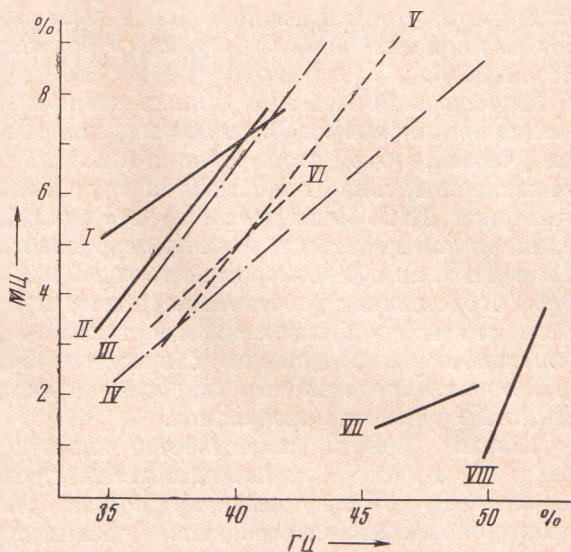


Рис. 2. Теоретические линии регрессии МЦ по ГЦ для разных таксонов: I — род *Allium*, II — род *Lilium*, III — класс *Magnoliatae*, IV — класс *Liliatae*, V — сем. *Liliaceae*, VI — сем. *Orchidaceae*, VII — костистые рыбы [⁸], VIII — водоросли. Коэффициенты соответствующих уравнений регрессии приведены в табл. 1

вое количество цитозина (около 16%), а различия между ними по ГЦ были обусловлены только разным содержанием МЦ, т. е. соответственно Г — МЦ-пар. Следовательно, сильно обогащенные гуанином и цитозином участки ДНК могут обладать исключительно высокой степенью метилирования. Так, в одной из фракций ДНК ландыша (ГЦ = 53,4%), составляющей 19% от всей ДНК, мы обнаружили около 12% МЦ, т. е. почти каждый второй остаток цитозина в ней был метилирован⁽⁶⁾. Эта фракция отличалась также очень высокой скоростью ренатурации. Таким образом, можно констатировать, что МЦ распределен в цепи ДНК крайне неравномерно и сконцентрирован главным образом в богатых ГЦ-парами последовательностях ДНК.

На основании всех этих данных можно заключить, что тотальные ДНК высших организмов содержат особые «суперметилированные» ГЦ-обогащенные участки. Объем этой фракции в геноме может широко варьировать у разных видов, влияя тем самым на содержание МЦ и нуклеотидный состав суммарной ДНК. Если удельный вес этой фракции в геноме достаточно велик, то количество ГЦ должно коррелировать не только с содержанием МЦ в ДНК, но и с размером всего генома. В этой связи значительный интерес представляет работа Ашмарина и соавторов⁽¹⁴⁾, обнаруживших зависимость между нуклеотидным составом и величиной генома у различных в экологическом отношении (сапрофиты, паразиты) видов микроорганизмов. Вполне вероятно, что аналогичная взаимосвязь будет в дальнейшем найдена и у высших организмов.

Таким образом, складывается впечатление, что корреляция между МЦ и ГЦ может быть лишь частью более общей закономерности, связывающей между собой нуклеотидный состав ДНК, величину генома и определенные биологические особенности разных организмов. В следующем сообщении мы приведем экспериментальные данные, которые помогут дать трактовку возможного функционального значения выявляющихся закономерностей.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
1 III 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. С. Антонов, Г. П. Мирошниченко, А. Г. Слюсаренко, Усп. совр. биол., **74**, 247 (1972).
- ² Б. Ф. Ванюшин, В сборн. Строение ДНК и положение организмов в системе, М., 1972, стр. 279.
- ³ М. В. Пахомова, Г. Н. Зайцева, А. Н. Белозерский, ДАН, **182**, 712 (1968).
- ⁴ Б. Ф. Ванюшин, Усп. совр. биол., **65**, 163 (1968).
- ⁵ M. Gold, J. Hurwitz, Cold. Spring Harbor, Symp. Quant. Biol., **28**, 149 (1964).
- ⁶ Г. Е. Сулимова, А. Л. Мазин и др., ДАН, **193**, 1422 (1970).
- ⁷ В. Ю. Урбах, Биометрические методы, «Наука», 1964.
- ⁸ А. Л. Мазин, В. Г. Васильев и др., ДАН, **210**, № 4 (1973).
- ⁹ H. S. Shapiro, E. Chargaff, Biochim. et biophys. acta, **39**, 68 (1960).
- ¹⁰ J. Doskočil, F. Sorm, Biochim. et biophys. acta, **55**, 953 (1962).
- ¹¹ K. Oda, J. Marmur, Biochem. **5**, 761 (1966).
- ¹² D. Drahovsky, N. R. Morris, Biochim. et biophys. acta, **277**, 245 (1972).
- ¹³ А. Л. Мазин, Г. Е. Сулимова, Б. Ф. Ванюшин, Молек. биол., **4**, 265 (1970).
- ¹⁴ И. П. Ашмарин, М. С. Лойцянская, Е. П. Харченко, В сборн. Строение ДНК и положение организмов в системе, М., 1972, стр. 135.