

УДК 547.963.3:577.157.6

БИОХИМИЯ

В. Т. ГАЛФАЯН, В. К. ВАСИЛЬЕВ, Р. А. ЗАХАРЯН,  
Б. Ф. ВАНЮШИН, А. А. ГАЛОЯН

### ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА СОДЕРЖАНИЕ 5-МЕТИЛЦИТОЗИНА И СТЕПЕНЬ СБЛОЧЕННОСТИ ПИРИМИДИНОВ В ДНК ПЕЧЕНИ КРЫС

(Представлено академиком А. С. Спириным 28 V 1973)

В ДНК всех животных в качестве минорного основания содержится 5-метилцитозин (МЦ) <sup>(1, 2)</sup>. Это основание возникает в результате метилирования некоторых остатков цитозина в определенных нуклеотидных последовательностях ДНК <sup>(3, 4)</sup>. Метилирование ДНК является высокоспецифичным и в норме связано с репликацией ДНК. Эта модификация генома отражается на вторичной структуре ДНК и, по-видимому, имеет существенное значение для узнавания при различных ДНК-белковых взаимодействиях. Тем самым метилирование ДНК, по-видимому, может играть существенную роль в регуляции активности генов на уровне репликации, амплификации и транскрипции. Ранее нами было показано, что ДНК из разных тканей (органов) одного и того же животного различны по содержанию МЦ <sup>(2)</sup>. Более того, оказалось, что ДНК из разных отделов одной высокодифференцированной ткани (головной мозг) также различаются по этому признаку <sup>(5)</sup>. Полученные нами данные по содержанию МЦ в ДНК разных отделов головного мозга крупного рогатого скота и собак свидетельствуют и о видовом различии ДНК из соответствующих отделов мозга разных животных по количеству МЦ. Мы предположили, что тканевые различия ДНК по содержанию МЦ могут быть связаны с клеточной дифференцировкой и в то же время отражают определенное функциональное состояние генома. На изменение уровня метилирования ДНК в зависимости от функционального состояния клеток указывают данные по уменьшению содержания МЦ в соматических клетках по мере полового созревания и нерестовой миграции горбуши <sup>(6)</sup>, уменьшению количества МЦ в ДНК некоторых органов крыс (мозг, сердце и др.) при старении, а также изменение уровня метилирования ДНК печени крыс под влиянием гидрокортизона <sup>(7)</sup>. Изменение количества МЦ в ДНК печени крыс под действием гормона прямо коррелирует с функциональной активностью клеток, т. е. транскрипцией ДНК и индуцированным синтезом белка <sup>(7)</sup>. Эти сведения явились указанием на то, что под влиянием гидрокортизона в клетках тканей-мишеней могут происходить изменения в ДНК.

В настоящей работе мы попытались выяснить, происходят ли какие-либо изменения в ДНК (содержание МЦ, ГЦ-пар оснований и сблоченность пиримидинов) печени крыс под воздействием другого гормона — дексаметазона, который является аналогом преднизолона.

В опытах использованы белые крысы весом 100—150 г. Дексаметазон вводили крысам внутривентрально из расчета 20—30 г на 100 г веса животного. Крыс забивали через 4 часа после введения гормона. Соответствующие органы животных (печень, селезенка) быстро выделяли и замораживали с помощью жидкого азота. ДНК из этих органов выделяли с помощью хлороформной и последующей фенольной депротенинизации.

Для изучения состава препараты ДНК гидролизovali 99% муравьиной кислотой в течение 50 млн. при 175° и полученные основания разделяли путем двукратной одномерной восходящей хроматографии на бумаге в растворителе *n*-бутанол — вода — 25%  $\text{NH}_4\text{OH}$  (60:10:0,1). Гидролиз ДНК до пиримидиновых последовательностей  $\text{P}_n, \text{P}_{n+1}$  производили 66% муравьиной кислотой в присутствии 2% дифениламина в течение 18 час. при 37° по методу Бартона (<sup>8</sup>). Разделение полученных пиримидиновых блоков по длине с помощью хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе и их количественное определение осуществляли так же, как это описано ранее (<sup>9</sup>).

Ниже представлены данные по нуклеотидному составу и содержанию МЦ в ДНК печени и селезенки крыс в норме и после однократного введения дексаметазона (мол. %):

Источник ДНК	Г	Ц	МЦ	А	Т	Г + Ц + МЦ
Печень — норма	21,5	20,0	1,10 ± 0,03	29,1	28,3	42,6
После введения дексаметазона	21,0	19,8	1,37 ± 0,03	28,7	29,1	42,2
Селезенка — норма	21,1	19,7	0,97 ± 0,04	29,1	29,1	41,8
После введения дексаметазона	21,6	20,1	0,98 ± 0,05	28,8	28,5	42,7

Как видно, содержание МЦ в ДНК печени крыс через 4 часа после введения гормона увеличивается на 25%. В тех же условиях дексаметазон заметных изменений в ДНК селезенки не вызывает (количество МЦ в ДНК селезенки контрольных и опытных животных составляет 0,97 и 0,98 мол. % соответственно). Таким образом, здесь, как это было отмечено и ранее (<sup>7</sup>), четко выявляется избирательный тканево-специфический характер действия гормона на ДНК.

Индуктированное дексаметазоном увеличение количества МЦ в ДНК печени крыс может быть обусловлено изменением собственно уровня метилирования ДНК и (или) молекулярной популяции ДНК. Как можно видеть из вышеприведенных данных, увеличение количества МЦ не сопровождается увеличением ГЦ-пар оснований в ДНК печени. Под влиянием дексаметазона в суммарной ДНК клеток печени не изменяется также и содержание соответствующих пиримидиновых блоков (табл. 1). На основании этих данных можно думать, что под действием гормона заметных изменений в популяции ДНК клеток печени не происходит, а отмеченное увеличение количества МЦ, по-видимому, обусловлено увеличением степени метилирования ДНК. С этим представлением согласуются известные данные о том, что под действием гидрокортизона резко уменьшается митотический индекс в печени крыс и сильно подавляется репликация ДНК (<sup>10, 11</sup>), в то время, как уровень ее метилирования остается достаточно высоким (<sup>12</sup>). Таким образом, на фоне подавления синтеза ДНК под действием гормона в ней происходит явное увеличение содержания МЦ. Разумеется, это прежде всего приводит к мысли о том, что под влиянием гормона в клетках печени происходит какое-то суперметилирование ДНК за счет активации и изменения специфичности ДНК-метилаз или появления (деактивирования) участков ДНК, способных акцептировать метильные группы. Вместе с тем не исключено, что отмеченное увеличение содержания МЦ в ДНК может быть связано с синтезом какой-то небольшой, но явно суперметилированной фракции, которая, однако, не изменяет заметно количество ГЦ-пар и степень сблоченности пиримидинов в суммарной ДНК клеток печени. В этом случае, судя по обнаруженной нами корреляции между содержанием ГЦ-пар оснований и количеством МЦ в ДНК животных (<sup>2</sup>), увеличение МЦ под действием гормона должно происходить за счет амплификации каких-то обогащенных ГЦ-парами генов. В частности, такими генами могут быть рибосомальные и некоторые регуляторные гены. Такая небольшая обогащенная ГЦ-парами оснований фракция ДНК (по-видимому, соответствующая рибосомаль-

Таблица 1

Содержание пиримидиновых изоцитов в ДНК печени и селезенки крыс в норме и после введения дексаметазона

Источник ДНК	Пиримидиновые изоциты, мол. %					
	моно-	ди-	три-	тетра-	пента-	гекса- гепта- ≥8
Печень — норма	14,05±0,14	9,92±0,18	7,57±0,17	6,02±0,08	4,81±0,20	2,79±0,20
После введения гормона	10,57±0,21	9,26±0,20	8,27±0,18	5,67±0,35	4,72±0,10	3,22±0,20
Селезенка — норма	12,31±0,10	9,63±0,08	8,36±0,05	6,16±0,15	4,87±0,14	2,17±0,05
После введения гормона	10,97±0,16	9,44±0,30	7,67±0,10	5,27±0,07	4,75±0,16	3,50±0,21
						3,87±0,27 4,88±0,14 3,36±0,11 3,97±0,16

ным генам) появляется в молочной железе мышей на время лактации при отсутствии митотической репликации ДНК<sup>(13)</sup>.

Как бы там ни было, гормональная активация клеток печени крыс (увеличение транскрипции и индуцированный белковый синтез) сопровождается увеличением количества МЦ в их ДНК. Поэтому, как это предполагалось и ранее<sup>(2, 7)</sup>, метилирование ДНК может иметь отношение к регуляции функциональной активности определенных генов, а количественное содержание МЦ может рассматриваться как некий показатель функциональной активности клеток. Даже если изменение количества МЦ является отражением изменения в молекулярной популяции ДНК (амплификации определенных генов), то это все равно означает, что амплифицированные гены почему-то должны быть прометилированы. Может быть, это всего лишь структурная особенность индуцированных (амплифицированных) генов, а может быть — и обязательное условие для их функционирования.

До сих пор принято считать, что действие кортикостероидов реализуется на уровне транскрипции в комплексе со специфическим белком-рецептором, играющим регуляторную роль в синтезе РНК и белка<sup>(14)</sup>. Как уже отмечалось, кортикостероиды обратимо угнетают митотическую активность пролиферирующих тканей, в том числе регенерирующей печени и печени молодых растущих животных<sup>(11)</sup>. Это угнетение синтеза ДНК сопровождается увеличением РНК-полимеразной активности, усилением синтеза различных РНК, в особенности в ядрышковой фракции, и повышением уровня образования рибосом<sup>(15)</sup>. Стимуляция глюкокортикостероидами синтеза РНК печени носит весьма специфический и избирательный характер, и в первые часы гормональный эффект особенно сказывается на повышении уровня синтеза рибосомальных РНК.

В настоящей работе мы выявили, что под действием гормона происходят изменения и в самой ДНК, выражающиеся, в частности, в увеличении количества МЦ. Таким образом, специфичность и избирательность глюкокортикостероидной стимуляции синтеза РНК может

осуществляться не только в результате увеличения скорости транскрипции предшествовавших генов, но и вследствие временного увеличения количества определенных генов в ядре.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
28 V 1973

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> B. F. Vanyushin, S. G. Tkacheva, A. N. Belozersky, *Nature*, **225**, 948 (1970). <sup>2</sup> B. F. Vanyushin et al., *Biochim. et biophys. acta*, **299**, 397 (1973). <sup>3</sup> L. Descocil, F. Sorm, *Biochim. et biophys. acta*, **55**, 953 (1962). <sup>4</sup> N. R. Morris, K. D. Pih, *Cancer Res.*, **31**, 433 (1971). <sup>5</sup> В. К. Васильев и др., *ДАН*, **205**, 721 (1972). <sup>6</sup> Г. Д. Бердышев и др., *Биохимия*, **32**, 988 (1967). <sup>7</sup> B. F. Vanyushin et al., *Gerontologia*, in press. <sup>8</sup> K. Burton, G. B. Petersen, *Biochem. J.*, **75**, 17 (1960). <sup>9</sup> А. Л. Мазин, Б. Ф. Ванюшин, *Биохимия*, **32**, 377 (1967). <sup>10</sup> A. I. Rizzo, P. Heilpern, M. E. Webb, *Cancer Res.*, **31**, 6 (1971). <sup>11</sup> I. Szijjan, J. A. Burdman, *Biochim. et biophys. acta*, **299**, 344 (1973). <sup>12</sup> G. Seemayer, *Biochim. et biophys. acta*, **224**, 10 (1970). <sup>13</sup> M. R. Banerjee, J. E. Wagner, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 480 (1972). <sup>14</sup> K. von Hungen, *Nature*, **229**, 114 (1971). <sup>15</sup> Y. Fu-li, P. Feigelson, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2177 (1971).