

УДК 612.821.6:547.963.3

БИОХИМИЯ

Б. Ф. ВАНЮШИН, Н. А. ТУШМАЛОВА, Л. В. ГУСЬКОВА

**МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК МОЗГА КАК ПОКАЗАТЕЛЬ
УЧАСТИЯ ГЕНОМА В МЕХАНИЗМАХ
ИНДИВИДУАЛЬНО ПРИОБРЕТЕННОЙ ПАМЯТИ**

(Представлено академиком А. С. Спириным 8 VIII 1974)

Формирование памяти у животных сопровождается заметными изменениями в содержании, составе и молекулярной популяции РНК и белков (^{1, 2}). Это косвенно указывает на то, что в данном процессе каким-то образом участвует и ДНК клеток мозга. Предполагается, что при обучении ДНК мозга может изменяться (³⁻⁵). Однако до сих пор никому не удалось показать, что формирование памяти действительно как-то отражается на структуре самой ДНК. Никаких изменений собственно в структуре ДНК мозга при обучении самых различных животных до сих пор не найдено.

Известно, что уровень метилирования ДНК у животных связан с клеточной дифференцировкой, изменяется в онтогенезе, под воздействием различных индуцирующих факторов, в том числе гормонов и, в целом, отражает уровень функционирования генов и клеток (^{6, 7}). Поскольку выработка условного рефлекса представляет собой процесс выраженной индуцируемой функциональной активности определенных отделов головного мозга, можно думать, что этот процесс сопровождается заметными изменениями в характере метилирования ДНК соответствующих активно функционирующих нервных клеток.

В настоящей работе изучен нуклеотидный состав ДНК в разных отделах головного мозга крыс и предпринята попытка выяснить, изменяется ли уровень метилирования этих ДНК в процессе выработки условных рефлексов как модели долговременной памяти. Это исследование проводили в плане проверки гипотезы о возможном участии ДНК в механизмах как врожденной, так и приобретенной памяти (⁵).

Эксперименты проводили на 112 нелинейных белых крысах-самцах весом 180—230 г. Моделью долговременной памяти служили простые двигательные условные рефлексы на свет. В качестве критериев выработки прочного условного рефлекса использованы: средний латентный период условной реакции продолжительностью не более 3 сек. и не более 3 межсигнальных реакций за десять сочетаний. Контрольными животными были необученные крысы. Опытным животным предъявляли 160—180 сочетаний условного сигнала с безусловным. Затем крыс декапитировали и из их мозга выделяли мозжечок, гиппокамп, кору больших полушарий.

Выделение ДНК из полученных отделов головного мозга проводили по методу Мармура (⁸). Ткань гомогенизировали в стандартном солевом растворе pH 8,0 на холоду в присутствии 2% додецилсульфата натрия. Полученный после центрифугирования гомогената (15 мин., 2000 g) солевой раствор нуклеиновых кислот депротеинизировали многократной обработкой смесью хлороформ — изоамиловый спирт; затем нуклеиновые кислоты осаждали этанолом и обрабатывали щелочью (0,5 N NaOH 18 час., 37°) для удаления РНК. ДНК отделяли подкислением раствора на холоду, быстро промывали 1% HClO₄, многократно спиртом и эфиром, затем окончательно высушивали и использовали для анализа нуклеотидного состава.

ДНК гидролизovali до оснований (99% муравьиная кислота, 176°, 1 час), основания разделяли с помощью тонкослойной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе (9) и определяли спектрофотометрически, как это описано ранее (10). В табл. 1 приведены данные по нуклеотидному составу ДНК разных отделов головного мозга крыс с выработанным условным рефлексом и контрольных животных.

Таблица 1

Нуклеотидный состав ДНК из разных отделов мозга обученных и необученных (контрольных) крыс ($\bar{X} \pm \sigma$)

Отдел мозга	Животные	Основания в ДНК, мол. %						
		Г	А	Ц	МЦ	Т	Г+Ц+ +МЦ	Р
Кора больших полушарий	Опытные	21,4	28,6	20,0	1,45 ± 0,13	28,5	42,9	<0,1
	Контрольные	21,3	28,7	20,3	1,07 ± 0,07	28,6	42,7	
Гиппокамп	Опытные	21,6	29,6	19,9	1,63 ± 0,04	27,3	43,1	<0,01
	Контрольные	21,6	29,2	19,4	1,15 ± 0,01	28,6	42,2	
Мозжечок	Опытные	21,4	28,6	20,4	0,99 ± 0,01	28,6	42,8	>0,03
	Контрольные	21,4	28,7	20,3	0,96 ± 0,06	28,6	42,7	

Как можно видеть из табл. 1, все изученные ДНК головного мозга крыс принадлежат к АТ-типу, очень близки по нуклеотидному составу и содержат в качестве обязательного минорного основания 5-метилцитозин. Исследованные ДНК из разных отделов мозга контрольных животных различаются по содержанию 5-метилцитозина (например, ДНК мозжечка и гиппокампа). Это означает, что у крыс, также как это было установлено ранее для крупного рогатого скота (10), ДНК разных отделов головного мозга различаются по уровню метилирования. Иными словами, у крыс, так же как и у других животных (10, 11), существует тканевая разнокачественность ДНК по этому признаку.

В процессе выработки условного рефлекса в ДНК коры больших полушарий и гиппокампа происходит заметное увеличение (соответственно на 36% и 42%) содержания 5-метилцитозина. Это свидетельствует о том, что геном клеток мозга не остается безучастным при образовании условно-рефлекторной связи и сам претерпевает при этом заметные структурные изменения. Эти изменения весьма значительны и специфичны. Они выявлены именно в тех структурах мозга (кора и гиппокамп), которые связаны с условнорефлекторной деятельностью и формированием памяти. В других отделах мозга, не связанных с этими функциями (мозжечок), никаких изменений в содержании 5-метилцитозина в ДНК не происходит (табл. 1). Отмеченные изменения в геноме клеток коры и гиппокампа скорее всего отражают увеличение собственно уровня метилирования ДНК. Молекулярная популяция ДНК в клетках мозга, по-видимому, не меняется: количество ДНК в них остается постоянным при самых разнообразных воздействиях (12) и содержания ГЦ-пар оснований при обучении не изменяется (табл. 1).

Установлено, что при индуцированном гормонами (дексаметазон, гидрокортизон) резком изменении содержания 5-метилцитозина в ДНК клеток печени и головного мозга крыс собственно молекулярная популяция ДНК (набор молекул) остается неизменной (8). Мы склонны считать, что и в данном случае индуцированное обучением увеличение количества 5-метилцитозина в клетках коры и гиппокампа вызвано не избирательным синтезом или распадом каких-то молекул ДНК, а ее дополнительным метилированием. Такое индуцированное метилирование, по-видимому, связано с изменениями ДНП, в результате которых появляются новые доступные для метилирования участки. Вместе с тем, не исключена и воз-

возможность изменения специфичности метилирования ДНК метилазами при обучении.

Метилирование ДНК не безразлично для ее структуры, оно имеет существенное значение в белково-нуклеиновых взаимодействиях и, по-видимому, играет ощутимую роль в регуляции транскрипции (⁶, ⁷). Так, при гормональной индукции кинетика метилирования ДНК соответствует кинетике транскрипции и синтеза индуцированных ферментов. Метилирование ДНК резко увеличивается на начальных стадиях индукции, а затем возвращается к норме (⁶). По-видимому, аналогичная картина наблюдается и в кинетике метилирования ДНК клеток мозга в процессе обучения. Найденные нами изменения метилирования ДНК, по-видимому, зависят от степени выработки и упроченности условного рефлекса. Так, например, у крыс, забитых сразу же после достижения критериев, выработки условного рефлекса, уровень метилирования ДНК коры и гиппокампа увеличен по сравнению с нормой на 35 и 42% соответственно, а у животных, закреплявших достигнутый критерий в течение 40–60 сочетаний — только на 8–15%. Иными словами, процесс обучения сопровождается весьма характерной динамикой метилирования ДНК, которое является, по-видимому, обратимым. Такая кинетика метилирования ДНК может коррелировать с хорошо известными данными о характере электрической активности мозга в процессе выработки условных рефлексов. Кроме того, она может соответствовать также данным и по кинетике синтеза ядерной РНК в клетках мозга при обучении: как известно, синтез РНК в ядрах клеток гиппокампа и коры наиболее резко увеличивается именно на ранних этапах обучения, а затем заметно падает (¹³).

Все сказанное указывает на то, что метилирование ДНК действительно коррелирует с функционированием клеток мозга в процессе выработки условного рефлекса. Более того, уровень метилирования ДНК может отражать уровень функциональной активности клеток. Не исключено, что метилирование ДНК является одним из механизмов запуска транскрипции при обучении, которая сопровождается появлением в клетках мозга новых РНК (¹⁴).

Таким образом, процесс выработки условных рефлексов у животных связан с транскрипцией, модификацией генома и отражается на степени метилирования ДНК клеток мозга.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
4 VIII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. Hyden, P. W. Lange, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 53, 946 (1965). ² H. Hyden, P. W. Lange, Brain Res., v. 61, 446 (1973). ³ J. Gaito, Psychol. Rev., v. 70, 471 (1963). ⁴ I. S. Griffith, H. R. Mahler, Nature, v. 229, 580 (1969). ⁵ Н. А. Тушмалова, Научн. докл. высш. школы, биол. науки, № 7, 37 (1973). ⁶ В. Ф. Ванюшин, Л. Е. Nemirovsky et al., Gerontologia, v. 19, 138 (1973). ⁷ Б. Ф. Ванюшин, Усп. совр. биол., т. 65, 163 (1968); т. 77, 68 (1974). ⁸ J. Margat, J. Mol. Biol., v. 3, 208 (1964). ⁹ В. К. Васильев, Научн. докл. высш. школы, биол. науки, т. 9, 118 (1971). ¹⁰ В. К. Васильев, Д. В. Гарибян и др., ДАН, т. 205, 721 (1972). ¹¹ В. Ф. Ванюшин, А. Л. Mazin et al., Biochim. et biophys. acta, v. 229, 398 (1973). ¹² L. L. Pevzner, In: Macromolecules and Behavior, N. Y., 1966, p. 43. ¹³ В. Н. Тимкин, С. М. Кузьмин и др., Журн. высш. нервн. деят., т. 18, 968 (1968); т. 20, 185 (1970). ¹⁴ J. Gaito, K. Bonnet, Psychol. Rev., v. 75, 109 (1971).