

Г. И. КИРЬЯНОВ, Г. А. РОМАНОВ, Б. Ф. ВАНЮШИН

ВНУТРИГЕНОМНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ 5-МЕТИЛЦИТОЗИНА В ДНК НЕКОТОРЫХ ЭУКАРИОТОВ

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

Метилирование ДНК у животных видов — тканеспецифично⁽¹⁾, оно изменяется при старении, различных гормональных воздействиях, по-видимому, связано с транскрипцией и в известной степени отражает уровень функциональной активности генов и клеток⁽²⁾. В этой связи особенно важно выяснить, каким образом распределяется 5-метилцитозин (МЦ) в геноме и в какой степени проявляются те или иные изменения метилирования ДНК в структурно и функционально различных классах нуклеотидных последовательностей. Как известно, помимо уникальных последовательностей, представленных в геноме двумя или немногим более копиями, существует несколько классов последовательностей, повторенных 10^4 — 10^6 раз⁽³⁾.

В настоящей работе исследовали характер метилирования различных по степени повторяемости последовательностей ДНК асцитных клеток мыши, печени крысы, молока и печени щуки и листьев хлопчатника. ДНК из тканей животных выделяли, как описано ранее⁽²⁾, с использованием проназной обработки, а из тканей хлопчатника — по методу Мармура⁽⁴⁾. Полученные препараты полимерных ДНК (18 — $22 S_{20, \text{с}}$) содержали менее 1% белка и РНК. Белок определяли по методу Лоури⁽⁵⁾, а РНК — по методу Спирина⁽⁶⁾. ДНК для реассоциации фрагментировали при помощи ультразвука на у.-з. дезинтеграторе фирмы «MSE» до 4—5 S фрагментов и дополнительно очищали путем хроматографии на оксиапатите. Оксиапатит синтезировали по методу Тизеллиуса в модификации Миязава и Томаса⁽⁷⁾. Денатурацию, реассоциацию в различных интервалах C_0t и фракционирование ДНК проводили по методу Бриттена и Кона⁽⁸⁾. ДНК денатурировали в 0,12 M фосфатном буфере при 101 — 102°C в течение 10—15 мин, а ренатурацию вели при 60° в течение заданного времени. При очень малом значении C_0t реассоциацию останавливали добавлением формальдегида до конечной концентрации 1%. В результате фракционирования ДНК получены фракции в интервалах C_0t от 0 до 10^{-3} , от 0 до 1, от 1 до 10, от 10 до 500 и выше. В ДНК полученных фракций определяли нуклеотидный состав, в том числе и содержание МЦ. Нуклеотидный состав ДНК определяли с помощью хроматографии в тонком слое ДЭАЭ-целлюлозы, как описано ранее⁽⁸⁾.

Как видно из табл. 1, ДНК всех изученных организмов обладают выраженной гетерогенностью по степени повторяемости определенных нуклеотидных последовательностей. Изученные животные и растения (хлопчатник) характеризуются довольно сходным планом строения генома, однако они все же могут довольно резко различаться по количеству ДНК в одноименных фракциях. Эти различия могут объясняться как разным размером геномов, так и какими-то специфическими особенностями их структурной организации. Так, доля фракции высокоповторяющихся последовательностей в ДНК (вп-ДНК) варьирует почти в три раза (от 5,6% у мыши до 15% у щуки). Доля уникальных последовательностей в разных ДНК колеблется от 20 до 70% (в ДНК молоко и печени щуки 20%, хлопчатника — 40%, печени крысы — 63%, асцита мыши — 68%, тимуса теленка — 55%).

Таблица 1

Содержание и нуклеотидный состав ДНК во фракциях с разными значениями C_{ot}

Интервал C_{ot}	% от гено- ма	ГЦ, мол. %	МЦ, мол. %	Интервал C_{ot}	% от гено- ма	ГЦ, мол. %	МЦ, мол. %
ДНК мыши				ДНК щуки			
0—10 ⁻³	5,6	35,3	2,87	0—10 ⁻³	14,9	45,1	2,2
0—1	15,6	41,3	1,14	0—1	21,0	44,1	1,70
0—10	5,8	42,3	1,80	1—10	12,9	43,9	1,89
10—500	5,0	49,3	2,63	10—500	33,3	44,0	2,15
Выше 500	68,0	43,9	0,77	Выше 500	22,5	42,5	2,13
Тотальная ДНК	100,0	42,3	1,1	Тотальная ДНК	100,0	43,3	1,87
ДНК крысы				ДНК хлопчатника			
0—1	12,9	42,7	2,05	0—3,7·10 ⁻²	13,9	64,7	5,8
1—500	24,0	49,8	1,51	0—0,8	29,2	43,9	4,47
Выше 500	63,1	42,2	0,78	0—490	62,1	37,6	7,4
Тотальная ДНК	100,0	43,9	1,0	Выше 490	37,9	51,5	0,51
				Тотальная ДНК	100,0	42,3	4,9

ДНК различных классов последовательностей из одного источника иногда почти не отличаются по составу. Так, в разных фракциях ДНК щуки содержание ГЦ-пар колеблется в очень узком интервале (от 42,5 до 45,1 мол. %). Невелика гетерогенность по составу и во фракциях ДНК крысы (табл. 1). С другой стороны, у мыши эти колебания весьма значительны (от 35,3 до 49,3 мол. % ГЦ). Наименьшим содержанием ГЦ-пар оснований в ДНК мыши характеризуется *вп*-ДНК, составляющая 5,6% от всего генома. Известно, что сателлитная ДНК мыши содержит от 32 до 41 мол. % ГЦ-пар оснований, и, видимо, она может быть отождествлена с *вп*-ДНК. Выделенная нами фракция *вп*-ДНК мыши по составу ближе к той сателлитной ДНК, которая содержит 32 мол. % ГЦ-пар (*).

В ДНК высших растений (хлопчатник) обнаружены две резко ГЦ-обогащенные, различающиеся по степени повторяемости фракции. *Вп*-ДНК хлопчатника составляет 14% от всего генома и обладает высоким содержанием ГЦ-пар (65 мол. %). Около 40% генома хлопчатника представлены уникальными последовательностями. Любопытно, что у этого растения уникальные гены, как и *вп*-ДНК ($C_{ot} 0 - 3,7 \cdot 10^{-2}$), обладают весьма высоким содержанием ГЦ-пар оснований.

У животных одноименные *вп*-ДНК могут довольно значительно варьировать по содержанию ГЦ-пар оснований. В то же время особо следует подчеркнуть, что у этих же видов фракции уникальных последовательностей ДНК чрезвычайно близки по нуклеотидному составу. Это указывает на то, что уникальные последовательности в ДНК у разных видов животных весьма консервативны и, по-видимому, довольно сходны между собой. Это согласуется с известными представлениями об удивительном сходстве первичной структуры многих одноименных белков (гемоглобина и др.) у самых различных животных. Иными словами, в процессе эволюции у животных наиболее существенные изменения по составу претерпевают высокоповторяющиеся, а не уникальные последовательности — структурные гены. Значит, в геноме преимущественно эволюционируют повторяющиеся последовательности.

Из наших данных следует, что геном у эукариот метилирован крайне неравномерно. Содержание МЦ в разных фракциях ДНК у тех или иных организмов колеблется в значительно более широком интервале, чем содержание ГЦ-пар оснований. Во всех исследованных ДНК наиболее метилированы фракции повторяющихся последовательностей. Так, *вп*-ДНК мыши является суперметилированной: содержание МЦ в ней (2,9 мол. %) более чем в 2,5 раза выше по сравнению с тотальной ДНК. Это еще раз

свидетельствует о сходстве выделенной нами *вп*-ДНК с известной сателлитной ДНК мышцы, которая содержит около 3 мол. % МЦ (⁹). В аналогичной по степени повторяемости фракции ДНК хлопчатника содержится 5,8 мол. % МЦ, что в 1,2 раза выше, чем в тотальной ДНК этого растения. Это весьма характерно и для ДНК из других источников. Наиболее низким уровнем метилирования ДНК обладает фракция уникальных последовательностей (содержание МЦ в ДНК этой фракции составляет у крысы, мыши, тимуса теленка и хлопчатника соответственно 0,8, 0,8, 0,4 и 0,5 мол. %). Поскольку по методу выделения фракции уникальных последовательностей слегка «загрязнены» ДНК других, более метилированных фракций, то истинный уровень метилирования уникальных последовательностей на самом деле может быть еще ниже.

Несколько отлично от всех животных ДНК распределение МЦ внутри генома изученной рыбы (щука). Здесь не наблюдается столь низкого содержания МЦ во фракции уникальных последовательностей, как у млекопитающих. Необходимо отметить, что сама структура генома щуки существенно отличается от структуры генома млекопитающих. В отличие от млекопитающих, в геноме рыбы содержится всего около 20% уникальных последовательностей ($C_{ot} > 500$). Правда, это резкое отличие от генома млекопитающих, по-видимому, в известной степени может определяться меньшим размером генома рыбы. У щуки выявляется существенная неоднородность по составу и особенно по содержанию МЦ во фракциях ДНК, реассоциирующих при определенных значениях C_{ot} .

Таким образом, геном изученных животных и растений метилирован весьма неравномерно. Характер метилирования ДНК скорее отражает некие тонкие структурные особенности геномов, а не детерминирован прямо нуклеотидным составом соответствующих фракций ДНК. Так, *вп*-ДНК мышцы, крысы, щуки и хлопчатника чрезвычайно резко различаются по составу (содержание ГЦ составляет соответственно 35, 43, 45 и 65 мол. %). Тем не менее, эти резко отличающиеся по составу фракции объединяет одно общее свойство: все они более метилированы по сравнению с суммарной ДНК.

До сих пор функциональная роль высокоповторяющихся последовательностей в ДНК неясна. Полученные нами данные об исключительно высоком уровне метилирования этих последовательностей позволяют заключить, что они могут играть некую роль при структурировании генетического материала в интерфазном ядре и в специфических белково-нуклеиновых взаимодействиях при функционировании генов. Во всяком случае, установленные нами связанные с транскрипцией изменения в уровне метилирования ДНК при различных функциональных состояниях клеток (тканей) (²) в первую очередь должны касаться именно фракции высокоповторяющихся последовательностей ДНК.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
5 VIII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ B. F. Vanyushin et al., Biochim. et biophys. acta, v. 229, 397 (1973). ² B. F. Vanyushin et al., Gerontologia, v. 19, 138 (1973). ³ R. J. Britten, D. E. Kohne, Science, v. 161, 529 (1968). ⁴ J. Marmur, J. Mol. Biol., v. 3, 208 (1961). ⁵ O. Lowry et al., J. Biol. Chem., v. 193, 265 (1951). ⁶ А. С. Спирич, Биохимия, т. 23, 656 (1958). ⁷ Y. Miyazawa, C. A. Thomas, J. Mol. Biol. v. 11, 223 (1965). ⁸ В. К. Васильев, Научн. докл. высш. школы, Биол. науки, т. 9, 118 (1971). ⁹ H. E. Bond et al., J. Mol. Biol., v. 27, 289 (1967).