

УДК 599.23:[612.82+612.35]:547.963.3

Ю. А. АНТОНЯН, Дж. В. ГАРИБЯН, В. Т. ГАЛФАЯН, А. А. ГАЛОЯН

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОГОРМОНА «С» НА СОДЕРЖАНИЕ
5-МЕТИЛЦИТОЗИНА В ДНК МОЗГА И ПЕЧЕНИ КРЫС

Исследовалось влияние коронарорасширяющего нейрого르몬а «С» на уровень метилирования ДНК мозга и печени. Полученные данные свидетельствуют о том, что метилирование ДНК является функционально зависимым, гормонально регулируемым процессом, при этом молекулярная популяция ДНК при гормональных воздействиях изменяется незначительно.

Известно, что гормоны могут оказывать влияние на различные функции организма путем изменения генетического аппарата клетки. Однако молекулярные механизмы гормональной регуляции транскрипции и трансляции все еще остаются невыясненными. Данные же о влиянии гормонов на структуру генетического материала малочисленны и противоречивы. В этом аспекте особый интерес, на наш взгляд, представляет изучение влияния одного из коронарорасширяющих нейрого르몬ов «С», выделенного из гипоталамуса крупного рогатого скота, на первичную структуру ДНК некоторых органов [4, 5].

В ДНК всех животных в качестве минорного основания содержится 5-метилцитозин (МЦ). Это основание формируется на полинуклеотидном уровне в результате метилирования отдельных остатков цитозина в определенных последовательностях ДНК под воздействием специфических ДНК-метилаз [9—11].

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 [1], уменьшение количества МЦ в ДНК некоторых органов крыс (мозг, сердце и др.) при старении, а также изменение уровня метилирования ДНК печени крыс под влиянием гидрокортизона [3]. Значительное увеличение МЦ (на 30%) в печени крыс отмечено также под влиянием дексаметазона [6].

Таким образом, изменение количества МЦ в ДНК под действием гормона прямо коррелирует с функциональной активностью клеток и, по-видимому, может играть существенную роль в регуляции активности генов на уровне репликации, амплификации и транскрипции.

В настоящей работе мы попытались выяснить, происходят ли какие-либо изменения в ДНК (содержание МЦ, ГЦ-пар оснований и сблоченность пиримидинов) мозга и печени крыс под воздействием нейрого르몬а «С».

Опыты проводили на беспородных крысах обоего пола весом 120—150 г. Нейрого르몬 «С» вводили крысам в v. jugularis в дозе

1 мкг на целое животное. Крыс забивали декапитацией спустя 2 часа после введения нейрого르몬а «С». Соответствующие органы животных (мозг, печень) быстро выделяли и замораживали с помощью жидкого азота. Замороженную ткань гомогенизировали в стандартном солевом растворе с ЭДТА в присутствии 1—2% додецилсульфата натрия при pH 8, и из гомогената с помощью хлороформной и фенольной депротеинизации выделяли препараты суммарной ДНК, которую обрабатывали 0,5 N NaOH (18 час., 25°), осаждали HClO_4 на холоду, промывали спиртом, спирт—эфиром (1:1) и эфиром, высушивали под вакуумом. Затем ДНК гидролизовали 99% муравьиной кислотой в течение 50 мин при 175°, и основания разделяли с помощью двукратной одномерной восходящей хроматографии на бумаге в растворителе п-бутанол—вода—25% NH_4OH (60:10:0,1). Гидролиз ДНК до пиримидиновых последовательностей Pug , P_{n+1} производили 66% муравьиной кислотой в присутствии 2% дифенилаланина в течение 18 часов при 37° по методу Бартона [8]. Полученную смесь пиримидиновых олигонуклеотидов разделяли по длине на отдельные изоплиты путем двумерной тонкослойной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе [12]. Затем количество отдельных пиримидиновых изоплит в ДНК определяли спектрофотометрически [7, 12].

Как можно видеть из табл. 1, выделенные ДНК полностью отвечают правилам Чаргаффа и принадлежат к АТ-типу. Уровень метилирования ДНК мозга (содержание 5-метилцитозина) под влиянием нейрого르몬а «С» увеличивается на 30%, а в ДНК печени этого не происходит (количество МЦ в ДНК контрольных и опытных животных составляет 1,0—1,1 мол% соответственно). Таким образом, действие нейрого르몬а «С» на метилирование ДНК имеет выраженный тканевоспецифический характер.

Индуктированное нейрого르몬ом «С» увеличение количества МЦ в ДНК мозга крыс может быть обусловлено изменением собственно уровня метилирования ДНК и (или) молекулярной популяции ДНК. Так как изменений в структуре ДНК (содержание ГЦ-пар оснований, частота встречаемости разных пиримидиновых блоков) при индукции гормона не отмечено (табл. 1, 2), следовательно, под влиянием гормона происходит быстрое суперметилирование ДНК, по-видимому, за счет активации и изменения специфичности ДНК-метилаз или появления участков ДНК, способных акцептировать метильные группы. Кроме того, по-видимому, быстрое суперметилирование ДНК под влиянием гормона сопряжено с одновременным включением в работу определенных генов в индуцированных клетках и, поскольку 5-метилцитозин локализован в основном в повторяющихся последовательностях ДНК, то отмеченные изменения в уровне метилирования, которые происходят за счет амплификации каких-то обогащенных ГЦ-парами генов [16], касаются, по-видимому, рибосомальных и регуляторных генов.

Таким образом, единственным обнаруженным нами изменением в структуре ДНК мозга при введении нейрого르몬а «С» является повы-

Таблица 1

Нуклеотидный состав ДНК мозга и печени крыс до и после введения нейрого르몬а „С“ и содержание разных пиримидиновых блоков в ДНК мозга

Источник ДНК	Основания ДНК, мол %					
	А	Т	Г	Ц	МЦ ($\bar{x} \pm \sigma$)	ГЦ
Мозг — контроль	28,9	28,6	21,3	20,2	$0,98 \pm 0,03$	42,5
Мозг — опыт	29,0	28,1	21,6	20,0	$1,3 \pm 0,10$	42,9
Печень — контроль	29,1	28,3	21,4	20,1	$1,1 \pm 0,05$	42,6
Печень — опыт	29,6	28,5	21,5	20,0	$1,0 \pm 0,07$	42,5

Пиримидиновые изоплиты ДНК, мол %

I	II	III	IV	V	VI
$12,11 \pm 0,45$	$9,82 \pm 0,24$	$8,19 \pm 0,24$	$5,86 \pm 0,21$	$4,48 \pm 0,22$	$9,56 \pm 0,11$
$10,62 \pm 0,27$	$9,63 \pm 0,20$	$8,54 \pm 0,18$	$6,5 \pm 0,30$	$4,82 \pm 0,25$	$9,88 \pm 0,28$

Таблица 2

Содержание пиримидиновых олигонуклеотидов различного состава в ДНК мозга крыс до и после введения нейрого르몬а „С“

Изоплиты	Олигонуклеотиды	Компоненты олигонуклеотидов	Содержание пиримидиновых олигонуклеотидов в ДНК, мол % ($\bar{x} \pm \sigma$)	
			опыт	контроль
I	1	Ср ₂	$4,46 \pm 0,69$	$3,85 \pm 0,36$
	2	Тр ₂	$6,16 \pm 0,74$	$8,26 \pm 0,30$
II	1	С ₂ Р ₃	$1,93 \pm 0,28$	$2,11 \pm 0,05$
	2	СТр ₃	$4,84 \pm 0,15$	$5,02 \pm 0,03$
	3	Т ₂ Р ₃	$2,86 \pm 0,07$	$2,69 \pm 0,08$
III	1	С ₃ Р ₄	$0,83 \pm 0,10$	$4,15 \pm 0,08$
	2	С ₂ Т ₂ Р ₄	$2,82 \pm 0,22$	$2,28 \pm 0,12$
	3	СТ ₂ Р ₄	$3,46 \pm 0,13$	$3,28 \pm 0,08$
	4	Т ₃ Р ₄	$1,46 \pm 0,13$	$1,48 \pm 0,12$
IV	1	С ₄ Р ₅	$0,29 \pm 0,07$	$0,68 \pm 0,15$
	2	С ₃ Тр ₅	$1,13 \pm 0,09$	$1,08 \pm 0,05$
	3	С ₂ Т ₂ Р ₅	$2,31 \pm 0,16$	$1,86 \pm 0,29$
	4	СТ ₂ Р ₅	$1,83 \pm 0,13$	$1,59 \pm 0,10$
	5	Т ₄ Р ₅	$0,95 \pm 0,14$	$0,65 \pm 0,14$

Примечание. $\bar{x}$ — средняя арифметическая, σ — среднее квадратическое отклонение.

шение степени ее метилирования, которое, по-видимому, не сопровождается заметным изменением собственно популяции ДНК, во всяком случае появлением каких-то молекул с иной специфической нуклеотидной последовательностью.

С этим представлением согласуются данные о том, что под действием гидрокортизона уменьшается митотический индекс в печени крыс и сильно подавляется репликация ДНК [13, 15], в то время как уровень метилирования остается высоким [14]. Следовательно, в условиях подавления общего уровня синтеза ДНК наблюдается увеличение уровня метилирования ДНК под влиянием гормона.

Таким образом, в настоящей работе мы выявили, что при гормональной активации клеток мозга крыс под влиянием вещества «С» происходят изменения и в самой ДНК, выражающиеся, в частности, в увеличении количества 5-метилцитозина. И так как известно, что метилирование ДНК может иметь отношение к регуляции функциональной активности определенных генов [16, 17], то проводимые нами в настоящее время исследования для выяснения первичных механизмов действия нейрого르몬а «С» на уровень ДНК, на наш взгляд, могут представлять значительный интерес.

Институт биохимии АН Арм. ССР

Поступила 20/VII 1976 г.

Յ. Ա. ԱՆՏՈՆՅԱՆ, Զ. Վ. ՂԱՐԻԲՅԱՆ, Վ. Բ. ԳԱԼՅԱՆ, Ա. Ա. ԳԱՂՅԱՆ

ՆԵՅՐՈԶՆՈՐՄՈՆ «С»-Ի ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԴՆԹ-Ի 5 ՄԵԹԻԼ ՑԻՏՈԶԻՆԻ
ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՈՒՂԵՂՈՒՄ ԵՎ ԼՅԱՐԴՈՒՄ

Ա. մ փ ո փ ո լ մ

Հոգվածում բերված են տվյալներ առնետների ուղեղի և լյարդի ԴՆԹ-ում 5 մեթիլ ցիտոզինի քանակական փոփոխության և պիրիմիդինային իզոպլիտաների պարունակության մասին, կորոնար լայնացնող նեյրոհորմոն «С»-ի ազդեցության տակ:

Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ ԴՆԹ-ի մեթիլացումը համարվում է ֆունկցիոնալ կախված, հորմոններով կարգավորվող պրոցես, որի ժամանակ ԴՆԹ-ի մոլեկուլար պոպուլյացիան նկատելի փոփոխություն չի կրում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бердышев Г. Д., Коротаев Г. К., Боярских Г. В., Ванюшин Б. Ф. Биохимия, 1967, 32, стр. 988.
2. Ванюшин Б. Ф. Сб. тр. науч. конф. межфакульт. лаб. биоорганич. химии. М., 1971, стр. 56.
3. Васильев В. К. Автореф. канд. дисс. М., 1973.
4. Галоян А. А. В кн.: Некоторые проблемы биохимии гипоталамической регуляции. Ереван, 1965.

5. Галоян А. А. В сб.: *Вопр. биох. мозга*, т. VIII. Ереван, 1973, стр. 107.
6. Галфаян В. Т., Васильев В. К., Захарян Р. А. и др. *ДАН СССР*, 1973, 212, 4, стр. 992.
7. Мазин А. Л., Ванюшин Б. Ф. *Биохимия*, 1967, 32, стр. 377.
8. Burton K. and Petersen G. *Biochem. J.*, 1960, 75, 17.
9. Gold M., Hurwitz Y., Anders M. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1963, 11, 107, 196.
10. Groppo P., Jaccarino M., Partsi E., Scarano T. W. *J. Mol. Biol.*, 1968, 36, 195.
11. Kalousek F., Morris N. R. *J. Biol. Chem.*, 1968, 243, 244.
12. Kirnos M. D., Vasillev V. K., Vanyushin B. F. *J. of Chromatogr.*, 1975, 104, 113.
13. Rizzo A. I., Heilpern P., Webb M. E. *Cancer Res.*, 1971, 31, 6.
14. Seemayer G. *Biochim. et Biophys. acta*, 1970, 224, 10.
15. Szilyan I., Burdman J. A. *Biochim. et Biophys. acta*, 1973, 299, 344.
16. Vanyushin B. E., Mazin A. L., Vasillev V. K., Belozersky A. N. *Biochim. et Biophys. acta*, 1973, 299, 397.
17. Vanyushin B. F., Nemirovsky L. E., Klimenko V. V. et al. *Gerontologia*, 1973, 19, 138.