

◆ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2003

УДК 616.441-092-07

Д. А. Кадырова, Г. М. Артыкбаева, Я. Х. Туракулов

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК НА ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА ПРИ ТИРЕОИДНОЙ ПАТОЛОГИИ

Институт биохимии АН Республики Узбекистан

При различных формах тиреоидной патологии наблюдается нарушение регуляции экспрессии гена тиреоглобулина (ТГ). Это нарушение лучше всего объясняется транскрипционными событиями, которые зависят не только от первичной последовательности нуклеотидов в структуре ДНК, но и от структурно-функциональных изменений в хроматине клеток щитовидной железы. Механизмом, регулирующим транскрипцию гена ТГ, является метилирование ДНК. Метилирование ДНК существенно влияет как на структуру самой ДНК, на ДНКазочувствительные участки, так и на взаимодействие ДНК с различными белками, включая РНК-полимеразу.

ДНКазы I-гиперчувствительность метилированного хроматина в ядрах клеток щитовидной железы при диффузном токсическом зобе по выходу гидролизованной ДНК из ядер составила 10%, в то время как ДНКазы I-гиперчувствительность неметилированного хроматина в изолированных ядрах — 50%. При узловом эутиреоидном зобе ДНКазы I-гиперчувствительность метилированного хроматина составляла 7%, а неметилированного — 10%. Гиперчувствительность неметилированного хроматина в изолированных ядрах при врожденном зобе равна нулю.

Изучение РНК-полимеразной активности ядер из клеток щитовидной железы под влиянием метилирования показало значительное уменьшение синтеза РНК независимо от вида патологии.

Impaired regulation of thyroglobin (TG) gene expression is observed in various forms of thyroid pathology. The impairment in question can be explained by the transcription events that depend not only on the primary sequence of nucleotides in the DNA structure, but also on structural and functional alterations in the chromatin of thyroid cells. DNA methylation is the mechanism regulating TG gene transcription. It has a significant effect on the structure of DNA itself and on DNAase-sensitive sites, as well as on the interaction of DNA with various proteins including RNA polymerase.

In the context the yield of hydrolyzed DNA from the nuclei, DNAase I-hypersensitivity of methylated chromatin in the nuclei of thyroid cells was 10% while that of non-methylated chromatin in isolated nuclei was 50%. In nodal euthyroid goiter, DNAase I-hypersensitivity of methylated chromatin was 7% and that of non-methylated one was 10%. In congenital goiter, the hypersensitivity of non-methylated chromatin in the isolated nuclei was 0.

An investigation of the RNA-polymerase activity of thyroid cellular nuclei under the influence of methylation indicated a substantial decrease in RNA synthesis irrespective of the type of an abnormality.

Выявление факторов, определяющих потенциально активное состояние генов и обеспечивающих активацию их транскрипции, чрезвычайно важно для понимания механизмов регуляции генов. В связи с этим необходимо выявление особенностей структуры функционально различных участков хроматина. В большинстве случаев нарушение регуляции экспрессии гена тиреоглобулина (ТГ) лучше всего объясняется транскрипционными событиями, которые зависят не только от первичной последовательности нуклеотидов в структуре ДНК, но и от структурно-функциональных изменений в хроматине клеток щитовидной железы. Механизмом, регулирующим транскрипцию гена ТГ, является метилирование ДНК. Метилирование ДНК существенно влияет как на структуру самой ДНК, на ДНКазочувствительные участки, так и на взаимодействие ДНК с различными белками, включая РНК-полимеразу.

Изменения структуры хроматина, выявляемые ДНКазой I, по-видимому, формируются вслед за изменением картины метилирования, т. е. опосредованное метилирование, связанное с изменением структуры хроматина 5'-области гена ТГ, возможно, делает его компетентным к транскрипции.

В данной статье было проведено изучение влияния метилирования на ДНКазы I-гиперчувствительность и РНК-полимеразную активность хроматина ядер клеток щитовидной железы при патологии.

Материалы и методы

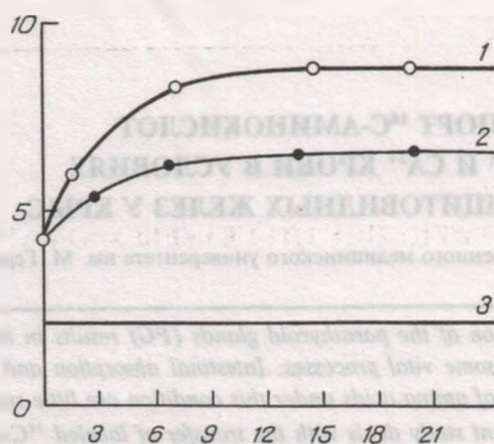
Использовали щитовидные железы людей, удаленные во время операции в лаборатории тиреоидной патологии Института эндокринологии Минздрава Республики Узбекистан.

Ядра из клеток щитовидной железы выделяли осаждением их в 0,25 М сахарозе, содержащей 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ дитиотрей-

тола (ДТТ), 10 мМ трис-НСl pH 7,5 (буфер А), и дальнейшей очисткой их путем наложения на раствор 2 М сахарозы в буфере А (24 000 об/мин, 1 ч, ротор "SW-27 Весман"). Во все буферные растворы добавляли фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) до концентрации 1 мМ. Ядра после плотной сахарозы отмывали буфером А.

Реакция гомологичного метилирования с использованием ДНК-метилазы содержала следующие компоненты: 25 мкг ядерной ДНК щитовидной железы, 100—200 мкг ДНК-метилазы, 7,5 мк/Ки 5 метил- 3H -аденозинметионина, 150—250 мкл инкубационного буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl pH 7,5, 5 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 0,2 мМ ФМСФ, 10% глицерина. Объем инкубационной пробы составлял 0,3 мл. Смесь инкубировали 6 ч при 37°C. По окончании реакции метилирования ДНК осаждали 5% ТХУК, осадок переносили на мембранный фильтр, промывали 5% ТХУК и этанолом, затем измеряли радиоактивность на счетчике "Mark-III".

Для определения ДНКазы I-чувствительности проводили обработку ядер ДНКазой I (2000 Ед/мг, "Serva") в следующих условиях: ядра (1 мг ДНК) суспендировали в среде, содержащей 0,25 мМ сахарозы, 3 мМ $MgCl_2$, 0,3 мМ $CaCl_2$, 10 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ФМСФ, 10 мМ трис-НСl pH 8,6, инкубировали при 4°C в течение 5 мин с различными концентрациями ДНКазы I (от 0,1 до 100 Ед/мл) или с фиксированной концентрацией фермента (20 Ед/мл) при 37°C в течение 15 мин. Гидролиз ДНК останавливали переводом проб в ледяную кислоту с добавлением ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ. Смесь центрифугировали и в супернатанте определяли количество гидролизованной ДНК, а также величину 3H -радиоактивности, просчитывая ее на счетчике "Mark". Концентрацию ДНК в ядрах определяли по Бартону [1], а также спектрофотометрически, принимая, что



ДНКаз-гиперчувствительность метилированного хроматина ядер клеток щитовидной железы.

1 — диффузный токсический зоб; 2 — узловой зутиреоидный зоб; 3 — врожденный зоб. По оси ординат — гибридируемость (в %); по оси абсцисс — время инкубации с ДНКазой I (в мин).

20 Ед D_{260} в 0,1% растворе додецилсульфата натрия соответствует 1 мг ДНК в 1 мл.

Общую РНК-полимеразную активность метилированных ядер определяли в среде, содержащей в объеме 0,25 мл следующие компоненты: 60 мМ трис-НСI pH 7,5, 1 мМ $MgCl_2$, 5 мМ $MnCl_2$, 1 мМ ДТТ, 200 мМ $(NH_4)_2SO_4$, АТФ, ГТФ, УТФ по 0,4 мМ, 0,01 мМ 3H -ЦТФ (13,4 мКи/моль) и суспензию клеточных ядер (100—150 мкг ДНК). Время инкубирования при 30°C составляло 30 мин. Реакцию останавливали охлажденной 10% ТХУК. Осадки собирали на миллипоровые фильтры, промывали их небольшими порциями 5% ТХУК, 5% пирогосфата натрия, этанола и подсчитывали 3H -радиоактивность.

Результаты и их обсуждение

Изучение особенностей метилирования гена ТГ показало, что модификации подвергается 5'-концевой цитозин и более длинные последовательности состава 5'-CCGG-3', и деметилирование этого участка коррелирует с экспрессией гена ТГ, т. е. между метилированием ДНК и экспрессией гена ТГ существует обратная корреляция. Появление в хроматине участков, гиперчувствительных к ДНКазе I, связано с транскрипционной активностью. В связи с этим было интересно изучить влияние метилирования ДНК на ДНКазу I-гиперчувствительность хроматина ядер клеток щитовидной железы при тиреоидной патологии.

ДНКазу I-гиперчувствительность метилированного хроматина в ядрах клеток щитовидной железы при диффузном токсическом зобе по выходу гидролизованной ДНК из ядер составила 10%, в то время как ДНКазу I-гиперчувствительность неметилированного хроматина в изолированных ядрах — 50%. При узловом зутиреоидном зобе ДНКазу I-гиперчувствительность метилированного хроматина составляла 7%, а неметилированного — 10%. Гиперчувствительность неметилированного хроматина в изолированных ядрах при врожденном зобе равна нулю (см. рисунок).

РНК-полимераза выполняет исключительно важную функцию: запускает процесс реализации генетической информации с соответствующих ДНК и осуществляет регуляцию активности генов на уровне транскрипции. Было изучено влияние метилирования ДНК на РНК-полимеразную активность ядер клеток щитовидной железы.

Общая РНК-полимеразная активность ядер из клеток щитовидной железы под влиянием метилирования была изучена

РНК-полимеразная активность изолированных ядер клеток щитовидной железы ($M \pm m$)

Патология	Нормальные ядра	Метилированные ядра	Нормальные ядра	Метилированные ядра
	3H -УМФ, имп/мин		%	
Диффузный токсический зоб	1800 $\pm$ 24	700 $\pm$ 12	100 $\pm$ 12	40
Узловой зутиреоидный зоб	1000 $\pm$ 48	200 $\pm$ 26	82 $\pm$ 16	10,5

при узловом зутиреоидном и диффузном токсическом зобе. Результаты этих исследований представлены в таблице.

Из представленных данных видно, что под влиянием метилирования происходит значительное уменьшение биосинтеза РНК независимо от вида патологии. Нами показано уменьшение активности РНК-полимеразы ядер клеток щитовидной железы под влиянием метилирования.

Таким образом, показано наличие обратной корреляции между уровнем метилирования ДНК и генной активностью, т. е. повышение уровня метилирования ДНК сопровождается потерей сверхчувствительности к ДНКазе I-участкам, уменьшением активности РНК-полимеразы и блоком транскрипции.

В хроматине ядер клеток щитовидной железы было обнаружено 2 района, гиперчувствительных к ДНКазе I, в 7 т. п. н. в сегменте 5'-фланкирующих последовательностей гена ТГ. ДНКаз-чувствительность может возникать вследствие взаимодействия с ДНК-связывающими факторами [3]. Однако другие механизмы также могут принимать участие в формировании этого измененного свойства хроматина. Среди них первое место занимают суперспирализация [4] и метилирование [5]. При изучении взаимосвязи между экспрессией гена ТГ и его метилированием показано, что чувствительные к метилированию сайты, расположенные в 5'-фланкирующей области гена, гиперметилируются при раке щитовидной железы, в то время как при диффузном токсическом зобе наблюдается недометилирование этих сайтов [2].

Деметилирование гена ТГ является сигналом, детерминирующим возможность его экспрессии. В целом это относится в основном к состоянию 5'-области гена. Последовательности ДНК, соответствующие ДНКазу I-гиперчувствительным сайтам, демонстрируют свойства транскрипционного гена-усилителя. При гиперметилировании эти участки теряют свойства гена-усилителя. Метилирование и деметилирование обеспечивает стабильное изменение структуры гена и играет важную роль в регуляции генной активности.

Выводы

1. Показано наличие обратной корреляции между уровнем метилирования ДНК и активностью гена при тиреоидной патологии.

2. Под влиянием метилирования ДНК происходят уменьшение активности РНК-полимеразы и блок транскрипции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бартоном К. Методы исследования нуклеиновых кислот. — М., 1970. — С. 7—9.
2. Berlingier M. T., Mosti A. M., Avvedimento V. E. et al. // Exp. Cell. Res. — 1985. — Vol. 163. — P. 277—283.
3. Hansen S., Christophe D., Vassart G. // Arch. Physiol. Biochem. — 1995. — Vol. 94, N 1. — P. 1322—1329.
4. Komane T. // Rev. Biochem. — 1992. — Vol. 51. — P. 93—121.
5. Libert P., Vassart G. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1996. — Vol. 134. — P. 1109—1116.

Поступила 04.01.02