

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1999

УДК 616.441-079.3:575

Я. Х. Туракулов, Д. А. Кадырова, Б. А. Атаханова

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА ТИРЕОГЛОБУЛИНА ПРИ ТИРЕОИДНОЙ ПАТОЛОГИИ

Лаборатория биохимии гормонов (зав. — акад. АН Республики Узбекистан Я. Х. Туракулов), Институт биохимии (дир. — член-корр. АН Республики Узбекистан Т. С. Саатов) АН Республики Узбекистан, Ташкент

Влияние метилирования разных областей ДНК на экспрессию гена может проявляться на всех регуляторных уровнях, связанных с этим процессом: на уровне транскрипции и посттранскрипционном, на уровне трансляции и посттрансляционном. Изучение взаимосвязи метилирования ДНК и экспрессии гена тиреоглобулина (ТГ) при некоторых видах тиреоидной патологии представляет интерес для познания механизмов регуляции генетической информации вообще.

Целью настоящей работы было исследование влияния метилирования ДНК на экспрессию гена ТГ при тиреоидной патологии. Нами была изучена возможность участия метилирования ДНК в регуляции экспрессии гена ТГ. Статус метилирования гена ТГ изучали при узловом эутиреоидном, диффузном токсическом зобах и при раке щитовидной железы. Была проанализирована 5'-фланкирующая область гена, которая содержит последовательности, признаваемые рестриктазами HpaII и MspI. Показано, что при раке щитовидной железы происходит гиперметилирование 5'-фланкирующей области гена ТГ. Эти данные свидетельствуют о том, что между экспрессией гена ТГ и его метилированием существует обратная корреляция.

Effect of methylation of different DNA domains on gene expression can manifest at all regulatory levels involved in this process: at the level of transcription and posttranscription, translation and posttranslation. Study of the relationship between DNA methylation and thyroglobulin (TH) gene expression in some thyroid diseases is needed for understanding the mechanisms regulating genetic information in general.

The aim of this study was to investigate the effect of DNA methylation on TH gene expression in thyroid disease. We investigated the probability of contribution of DNA methylation to regulation of TH gene expression. TH gene methylation was studied in nodular euthyroid and diffuse toxic goiter and in thyroid cancer. The 5'-flanking domain of the gene, containing sequences recognized by HpaII and MspI restrictases, was analyzed. The 5'-flanking domain of TH gene is hypermethylated in thyroid cancer. These data indicate an inverse correlation between TH gene expression and methylation.

Изучение закономерностей регуляции активности генов в клетках высших организмов является одной из интенсивно развивающихся областей молекулярной биологии и эндокринологии. В настоящее время накопилось довольно много данных о значении метилирования в регуляции генетической экспрессии. Влияние метилирования разных областей ДНК на экспрессию генов может проявляться на всех регуляторных уровнях, связанных с этим процессом: на уровне транскрипции и посттранскрипционном, на уровне трансляции и посттрансляционном. Изучение взаимосвязи метилирования ДНК и экспрессии гена тиреоглобулина (ТГ) при некоторых видах тиреоидной патологии представляет интерес для познания механизмов регуляции генетической информации вообще.

Материалы и методы

Для выделения высокомолекулярной ДНК использовали щитовидные железы людей, удаленные во время операции по поводу зоба в лаборатории тиреоидной патологии Института эндокринологии АН Республики Узбекистан.

Выделение ДНК из клеток щитовидной железы проводили методом фенольной экстракции [2].

Рестрикционный анализ проводили с помощью рестрикционных эндонуклеаз BamHI, HindIII, HpaII, MspI. Фрагменты ДНК (1 мкг на пробу) разделяли методом электрофореза в 0,8% агарозном геле. Перенос ДНК из геля на нейлоновые

фильтры "Biodan" осуществляли по методу K. Southern [4] в течение 24 ч.

Введение радиоактивной метки в плазмидную ДНК проводили методом нуклеотидного замещения с помощью ДНК-полимеразы E. coli. Гибридизацию проводили с меченной ^{32}P плазмидной ДНК (удельная активность 10^7 – 10^8 имп/мкг) в течение 18 ч при 65°C в смеси, содержащей $4 \times \text{ССР}$, четырехкратный раствор Денхарта, 0,5 мг (У), 0,1% ДСН, 5% раствор декстрансульфата. После гибридизации фильтры тщательно отмывали и подвергали автордиографии в течение 5–15 дней при -70°C , используя пленку РМ-1 и усиливающие экраны.

Результаты и их обсуждение

Ранее при исследовании экспрессии гена ТГ при узловом эутиреоидном, диффузном токсическом и врожденном зобах, а также при раке щитовидной железы было показано снижение количества ТГ мРНК при узловом эутиреоидном и врожденном зобах. При раке щитовидной железы наблюдалось полное отсутствие ТГ мРНК. Выявленное снижение количества ТГ мРНК свидетельствовало о том, что при изученных видах тиреоидной патологии имеет место нарушение синтеза ТГ на уровне транскрипции [1].

Для того чтобы проанализировать, является ли снижение уровня ТГ мРНК результатом блокирования транскрипции гена или изменением стабильности ТГ мРНК, нами были проведены экс-

перименты по гибридизации ДНК, выделенной из клеток щитовидной железы при узловом эутиреоидном, диффузном токсическом зобах и при раке, с различными зондами.

Блокирование транскрипции гена ТГ при узловом эутиреоидном зобе может быть вызвано значительными перегруппировками в структуре гена ТГ в пределах кодирующей области или в пределах регуляторной фланкирующей 5'-области гена.

Высокомолекулярная ДНК, выделенная из клеток щитовидной железы при диффузном токсическом, узловом эутиреоидном зобах и при раке, была обработана рестриктазами BamHI, HindIII и гибридизована с различными зондами.

Для гибридизации использовали разные кДНК-зонды, которые покрывают 80% кодирующей ТГ области и фрагмент ДНК, близкий к 5'-области гена ТГ.

Мы исследовали возможность перегруппировок в пределах кодирующей области гена ТГ. На рис. 1 показано, что различия в рестрикционных структурах ДНК из клеток щитовидной железы при узловом эутиреоидном и диффузном токсическом зобах нет. Эти данные ясно показывают, что значительных перегруппировок в ТГ-кодирующей области гена не обнаружено, что можно было бы отнести на счет транскрипционной реактивности этого гена при данной патологии.

Нами была исследована также возможность значительных перегруппировок в 5'-фланкирующей области гена ТГ. В качестве зонда использовали фрагмент ДНК, близкий к 5'-области гена. На рис. 2 видно, что различия в рестрикционных структурах ДНК из клеток щитовидной железы при узловом эутиреоидном и диффузном токсическом зобах нет.

Таким образом, полученные данные показывают, что значительных перегруппировок в ТГ-кодирующей области и 5'-фланкирующей области гена ТГ не обнаружено.

Мы исследовали возможность участия метилирования в регуляции экспрессии гена ТГ. Статус метилирования изучали в клетках щитовидной железы при раке и диффузном токсическом зобе. Была проанализирована 5'-фланкирующая об-

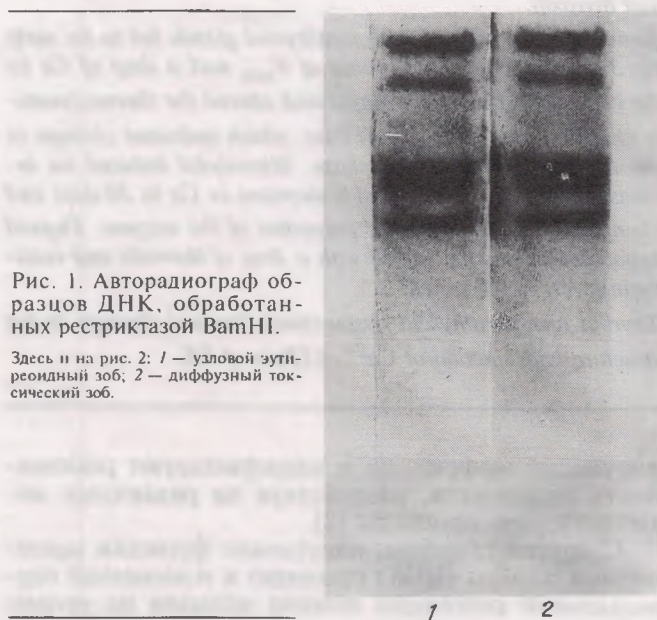


Рис. 1. Авторадиограф образцов ДНК, обработанных рестриктазой BamHI.

Здесь и на рис. 2: 1 — узловый эутиреоидный зоб; 2 — диффузный токсический зоб.

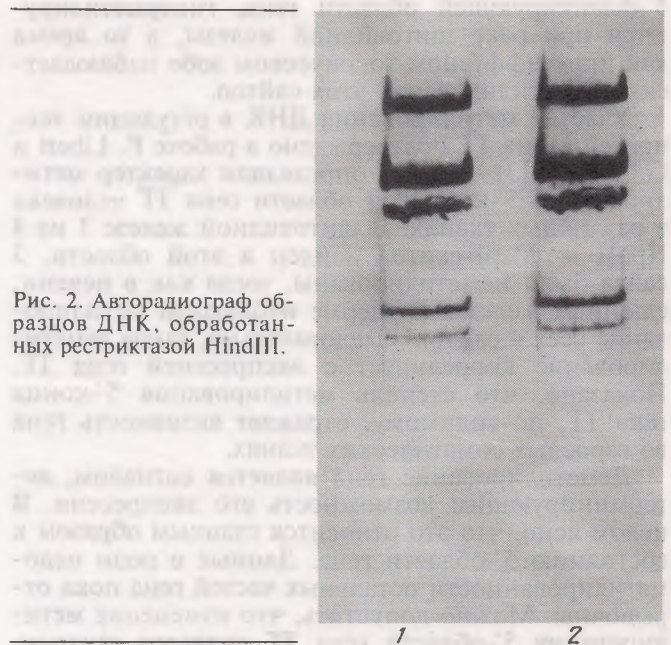


Рис. 2. Авторадиограф образцов ДНК, обработанных рестриктазой HindIII.

ласть гена, которая содержит 2 последовательности, признаваемые рестриктазами, чувствительными к метилированию HpaII и MspI, которые картируются соответственно на 680 и 1800 п. п. от исходного участка транскрипции [3].

Как показано на рис. 3, при обработке ДНК, выделенной из клеток щитовидной железы при раке, рестриктазой MspI наблюдается гиперметилирование 5'-фланкирующей области гена ТГ при полном блокировании синтеза ТГ [1], т. е. между экспрессией гена ТГ и его метилированием существует обратная корреляция.

При изучении взаимосвязи экспрессии гена ТГ и его метилирования показано, что чувствительные к метилированию сайты, расположенные в

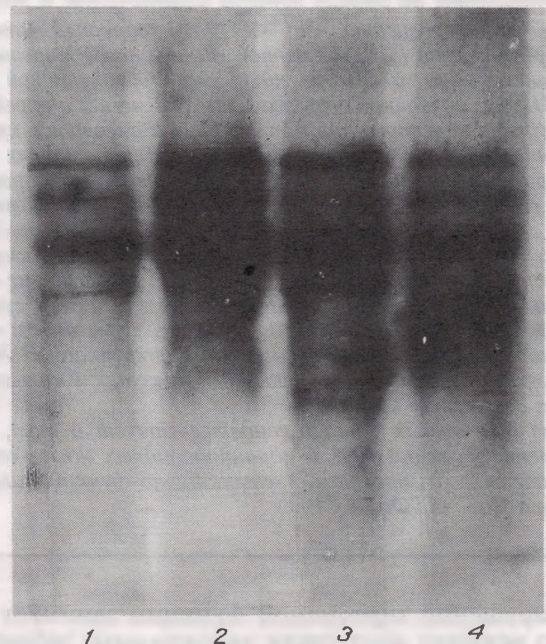


Рис. 3. Авторадиограф образцов ДНК, обработанных рестриктазой MspI.

1, 4 — диффузный токсический зоб; 2 — рак щитовидной железы; 3 — узловый эутиреоидный зоб.

5'-фланкирующей области гена, гиперметируются при раке щитовидной железы, в то время как при диффузном токсическом зобе наблюдается неометилирование этих сайтов.

Участие метилирования ДНК в регуляции экспрессии гена ТГ подтверждено в работе F. Libert и G. Vassart [3]. Авторы определяли характер метилирования 5'-концевой области гена ТГ человека в различных тканях. В щитовидной железе 1 из 4 HpaII — MspI-сайтов найден в этой области, 3 сайта были неметилованы, тогда как в печени, слюнных железах и сперме наблюдали метилирование всех 4 сайтов. Следовательно, такое деметилирование коррелирует с экспрессией гена ТГ. Показано, что степень метилирования 5'-конца гена ТГ, по-видимому, отражает активность гена во взрослых соматических тканях.

Деметилирование гена является сигналом, детерминирующим возможность его экспрессии. В целом ясно, что это относится главным образом к состоянию 5'-области гена. Данные о роли неометилованности остальных частей гена пока отрывочны. Можно допустить, что изменение метилирования 5'-области гена ТГ является важным, так как контролирует какие-то факторы транскрипции гена в его активации, являющиеся об- щими для всех генов.

При изучении взаимосвязи экспрессии гена ТГ и его метилирования показано, что чувствительные к метилированию сайты, расположенные в 5'-фланкирующей области гена, гиперметируются при раке щитовидной железы, в то время как при диффузном токсическом зобе наблюдается неометилирование этих сайтов.

Выводы

1. Блокирование синтеза ТГ при раке щитовидной железы происходит при метилировании.
2. При раке щитовидной железы наблюдается гиперметилование 5'-фланкирующей области гена ТГ, т. е. между экспрессией гена и его метилированием существует обратная корреляция.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кадырова Д. А., Атаханова Б. А., Туракулов Я. Х., Шипицына Г. И. // Молекул. биол. — 1989. — Т. 23, № 4. — С. 1101—1106.
2. Шипицына Г. И., Лунц М. Г., Шифтер К. А. и др. // Генетика. — 1980. — Т. 16, № 1. — С. 78—85.
3. Libert F., Vassart G. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1986. — Vol. 134. — P. 1109—1116.
4. Southern K. M. // J. Mol. Biol. — 1973. — Vol. 98. — P. 509—517.

Поступила 03.09.98

© И. М. БАГЕЛЬ, 1999

УДК 616.441-008.64-074-092.9

И. М. Багель

ВЛИЯНИЕ МЕРКАЗОЛИЛА И ТИРЕОПАРАТИРЕОИДЭКТОМИИ НА СВОЙСТВА Ca^{2+} -АТФазы САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ

Лаборатория эндокринологии (зав. — канд. мед. наук И. М. Багель) Института радиобиологии (дир. — акад. НАН Республики Беларусь Е. Ф. Конопля) НАН Республики Беларусь, Минск

В эксперименте на крысах изучены кинетические и термодинамические свойства Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума (СР) скелетной мышцы после тиреопаратиреоидэктомии, а также гипофункции щитовидной железы (ЩЖ), вызванной мерказолилом (10 мг/кг) с определением уровня кальцитонина и тироксина в сыворотке крови. Установлено, что удаление ЩЖ и паратитовидных желез приводит к достоверному снижению V_{max} в ранние сроки (3-и сутки) и уменьшению K_a к концу эксперимента (30-е сутки), а также к изменению термодинамических характеристик Ca^{2+} -АТФазы, свидетельствующему об изменениях в белковой фазе мембран СР. Применение мерказолила характеризуется увеличением V_{max} (3-и сутки) и снижением K_a (30-е сутки), а также изменением термодинамических свойств фермента. Гипофункция ЩЖ сопровождается снижением уровня тироксина и кальцитонина в сыворотке крови.

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что нарушение функции ЩЖ и паратитовидных желез сопровождается изменением структурно-функциональных свойств Ca^{2+} -АТФазы СР.

The kinetic and thermodynamic properties of Ca^{2+} -ATPase of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum (SR) are studied in rats subjected to thyroparathyroidectomy and in rats with thyroid hypofunction induced by mercaptozyl (10 mg/kg). The studies included measurements of the blood serum calcitonin and thyroxine.

Removal of the thyroid and parathyroid glands led to an early (in 3 days) significant decrease of V_{max} and a drop of Ca by the end of experiment (30 days) and altered the thermodynamic characteristics of Ca^{2+} -ATPase, which indicated changes in the SR membrane protein phase. Mercaptozyl induced an increase of V_{max} in 3 days and a decrease in Ca in 30 days and changed the thermodynamic properties of the enzyme. Thyroid hypofunction was associated with a drop of thyroxine and calcitonin levels in the serum.

Thyroid and parathyroid dysfunctions involved changes in the structure and function of Ca^{2+} -ATPase of SR.

Нарушение тиреоидной функции занимает одно из ведущих мест среди эндокринных заболеваний [4]. Существенное влияние на клиническое проявление тиреоидной патологии оказывают кальцитропные гормоны [7, 12]. Кальцитонин (КТ) и паратгормон не только дают кальцийрегу-

лирующий эффект, но и модифицируют реактивность тиреоцитов, воздействуя на различные метаболические процессы [8].

С другой стороны, нарушение функции щитовидной железы (ЩЖ) приводит к изменению гормональной регуляции обмена кальция на уровне