Доклады Академии Наук СССР
1954. Том XCIX, № 4

БИОХИМИЯ

С. С. ДЕБОВ

МЕТИЛИРОВАНИЕ УРАЦИЛА В ГОМОГЕНАТАХ ТКАНЕЙ

(Представлено академиком А. Д. Сперанским 2 VI 1954)

Рядом работ, главным образом цитохимических, показано, что в процессе онтогенетического развития наблюдается превращение рибонуклеиновой кислоты (РНК) в дезоксирибонуклеиновую (ДНК). Так, Браше [1] при изучении развития яйца морского ежа обнаружил, что неоплодотворенное яйцо содержит чрезвычайно мало ДНК и большое количество РНК, в процессе же эмбриогенеза содержание РНК снижается и, соответственно, нарастает количество ДНК. Так как общее содержание нуклеиновых кислот при этом остается постоянным, это указывает на количественный переход нуклеиновой кислоты одного типа в другой. А. Н. Белозерский [2] нашел, что при прорастании семян новообразование клеток сопровождается падением количества пентозонуклеотидов с одновременным увеличением содержания ДНК.

Взаимопревращение нуклеиновых кислот имеет место, вероятно, во многих клетках во время митоза, так как цитоплазма делящихся клеток обычно менее базофильна, чем цитоплазма интеркинетических клеток. Облучение рентгеновскими лучами, блокируя митоз, ведет к увеличению базофилии цитоплазмы и накоплению РНК [3].

Для перехода РНК в ДНК необходимо, чтобы, помимо перестройки макромолекулы нуклеиновой кислоты, произошло превращение рибозы в дезоксирибозу и урацила — в тимин. Возможность взаимопревращения в тканях животных пентоз (рибоза $\rightleftarrows$ дезоксирибоза) в настоящее время показана работами О. П. Чепиноги и Б. И. Гольдштейна [4–7]. Вместе с тем в литературе отсутствуют доказательства возможности перехода в тканях урацила в тимин.

В настоящей работе изучалась возможность образования тимина в гомогенатах тканей путем прямого метилирования урацила (переметилирования). Постановка опытов была следующей: из исследуемых тканей готовились гомогенаты (разведение 1 : 1 или 1 : 2) в фосфатном буфере *M*/15 pH 6,5 и из полученного гомогената брались отдельные пробы по 1 мл. К одной пробе добавлялся 1 мл того же фосфатного буфера, содержащего 2 мл урацила, ко второй — фосфатный буфер, содержащий, кроме урацила, 2 мг *d,l*-метионина, и к третьей — 1 мл фосфатного буфера, содержащего 2 мг тимина. Кроме того, в каждом случае ставились контрольные пробы (1 мл гомогената + 1 мл фосфатного буфера), которые обрабатывались совершенно аналогично опытным пробам. В нескольких опытах ставились еще дополнительные контроли, о которых будет сказано ниже. Пробы инкубировались при 37° в течение 3 час., после чего белки осаждались добавлением 0,5 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты и отделялись центрифугированием. В надосадочной жидкости путем одномерной распределительной хроматографии на бумаге качественно определялось содержание пуриновых и пиримидиновых оснований. Для хроматографи-

ческого определения был использован метод Маршака и Фогеля [8]: на лист фильтровальной бумаги обычным образом наносились точки исследуемых растворов (по 7 μл) и точки «свидетелей» — тимина и урацила (по 7 μг). Места нанесения опытных растворов нейтрализовались аммиаком, и хроматограмма проявлялась в смеси нормального бутилового спирта с 0,1 *н* NH_4OH (7 : 1). За 18—24 часа фронт растворителя продвигался на 30—35 см, после чего хроматограмма вынималась, высушивалась на воздухе и просматривалась под ультрафиолетовыми лучами с длиной волны 260 мμ. Места нахождения пуринов и пиримидинов (темные пятна на общем светлом фоне) обводились карандашом.

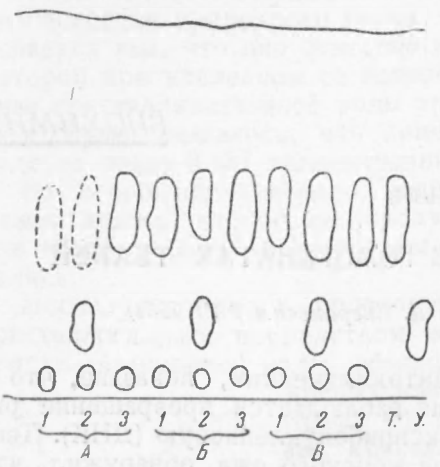


Рис. 1. Хроматограмма безбелковых фильтратов гомогенатов мышц (*А*), почек (*Б*) и печени (*В*) взрослых крыс. *1* — контроль (гомогенат, инкубированный вместе с опытными пробами); *2* — гомогенат + урацил + метионин; *3* — гомогенат + тимин. *Т* — тимин, *У* — урацил

В опытах с гомогенатами органов и тканей взрослых крыс (мышцы, печень, почки, селезенка) метилирования урацила доказать не удалось. В качестве примера на рис. 1 приведена хроматограмма, полученная с гомогенатами мышцы, почки и печени взрослой крысы. Характерно, что пятна, по значению R_F (0,52) соответствующие тимину, обнаруживаются как в опытных пробах, инкубированных с добавкой урацила и метионина, так и в контрольных пробах, инкубированных с одним фосфатным буфером. При этом интенсивность пятен в опытных и контрольных пробах практически одинакова. Надо заметить, что в использованном нами растворителе равный R_F имеют тимин и аденин. Поэтому весьма вероятно, что в контрольной пробе пятна с R_F 0,52 соответствуют не тимину, а аденину, освобождающемуся в процессе инкубации из нуклеотидов под действием ферментов. Для проверки этого предположения были поставлены дополнительные опыты с гомогенатами печени взрослых крыс, где взяты два контроля: в одном осаждение белков трихлоруксусной кислотой производилось сразу (до инкубации), а в другом — после инкубации. В остальном постановка опытов не отличалась от предыдущих. Полученные результаты (см. рис. 2) подтвердили, что в процессе инкубации гомогената в нем появляются свободные пурины (или пиримидины). Здесь также не было получено доказательств возможности образования тимина из урацила.

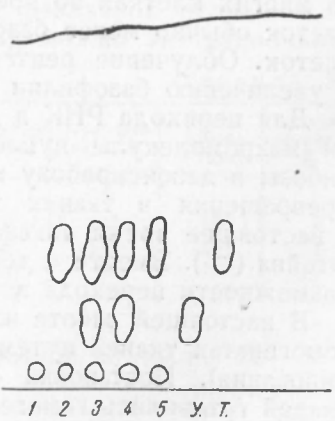


Рис. 2. Хроматограмма безбелковых фильтратов гомогенатов печени взрослых крыс. *1*—контроль (гомогенат, в котором осаждение белков произведено до инкубации); *2* — контроль (гомогенат, инкубированный вместе с опытными пробами); *3* — гомогенат + урацил; *4* — гомогенат + урацил + метионин; *5* — гомогенат + тимин. *У* — урацил, *Т* — тимин

Исходя из предположения, что переход урацила в тимин (метилирование урацила) должен наблюдаться в тех тканях, где имеет место интенсивный синтез ДНК из РНК, в дальнейшем были поставлены

опыты с куриными эмбрионами разных сроков развития (от 6-го до 20-го дня). Гомогенаты готовились из цельных эмбрионов на том же фосфатном буфере.

Действительно, оказалось, что в гомогенатах тканей куриных эмбрионов до 12-го дня развития включительно обнаруживается ясный переход урацила в тимин. На рис. 3 приводится хроматограмма полученная с гомогенатами 6-дневного эмбриона. На хроматограмме отчетливо видно, что в тех пробах, где гомогенаты инкубировались с добавкой одного урацила или урацила с метионином, появились пятна, соответствующие тимину. Интересно, что в этом случае в контрольных пробах, инкубированных вместе с опытными, не обнаружено свободных пуринов или пиримидинов. В гомогенатах куриных эмбрионов после 12 дня развития не отмечено превращения урацила в тимин. Это вероятно, объясняется тем, что интенсивный синтез нуклеиновых кислот происходит в курином эмбрионе только до 12 дня, а затем идет на убыль ([9]).

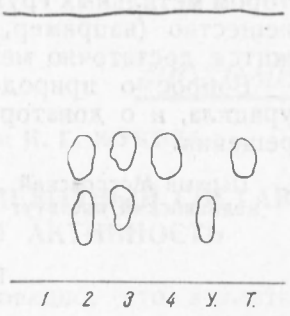


Рис. 3. Хроматограмма безбелковых фильтратов гомогенатов куриного эмбриона (6-й день развития). *1* — контроль (гомогенат, инкубированный вместе с опытными пробами); *2* — гомогенат + урацил; *3* — гомогенат + урацил + метионин; *4* — гомогенат + тимин. *У* — урацил, *Т* — тимин

Как известно, нормальный регенерат по ряду физиологических и биохимических показателей близко напоминает эмбриональные ткани. В связи с этим в дальнейшем нами было исследовано метилирование урацила в гомогенатах нормального регенерата печени крыс. Регенерат получался после частичной гепатоэктомии, так же как и в ранее опубликованной работе ([10]). Гомогенаты готовились из регенерирующих и отдельно из соседних (нерезецированных при операции) участков печени. Было найдено, что в нормальном регенерате печени крыс на 6 и 13 день регенерации происходит, как и в тканях эмбрионов, образование тимина из урацила (см. рис. 4). Контрольные пробы, инкубированные вместе с опытными, не обнаруживают на хроматограмме пятен, которые соответствовали бы тимину. С гомогенатами соседних (не резецированных) участков печени получены такие же результаты, как и с гомогенатами тканей взрослых крыс, т. е. метилирования урацила не показано.

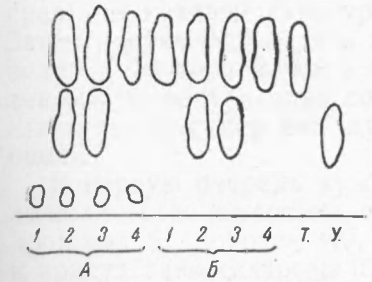


Рис. 4. Хроматограмма безбелковых фильтратов гомогенатов нормального регенерата печени крысы (*А*) и соседних участков печени (*Б*) (6-й день регенерации). *1* — контроль (гомогенат, инкубированный вместе с опытными пробами); *2* — гомогенат + урацил; *3* — гомогенат + урацил + метионин; *4* — гомогенат + тимин. *Т* — тимин, *У* — урацил

Приведенные выше экспериментальные наблюдения позволяют сделать вывод, что в тканях куриных эмбрионов ранних сроков развития и в нормальном регенерате печени крыс имеются ферменты, катализирующие перенос метильной группы с какого-то донатора на урацил. Можно полагать, что эта ферментативная система активирована не всегда, а только при определенных условиях — при интенсивном образовании ДНК из РНК (например, при эмбриональном развитии или регенерации).

Интересно отметить также, что интенсивность пятен тимина в тех пробах, где к гомогенатам добавлялся один урацил, и в тех, где вместе с урацилом добавлялся метионин, во всех случаях была практически одинаковой. Это может объясняться или тем, что донатором метильных групп здесь является не метионин, а какое-то другое вещество (например, холин), или тем, что в самих тканях содержится достаточно метионина и его добавка оказывается излишней.

Вопрос о природе ферментов, осуществляющих метилирование урацила, и о донаторах метильных групп требует специального разрешения.

Первый Московский
медицинский институт

Поступило
31 V 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] J. Brachet, Arch. Biol., **44**, 519 (1933); Symp. Soc. Exp. Biol., No. 1, Cambridge, 207 (1947). [2] А. Н. Белозерский, Усп. совр. биол., **18**, 42 (1944). [3] J. Mitchell, Brit. J. Radiol., **16**, 339 (1943). [4] О. П. Чепинога, Н. В. Костлан, Укр. биохим. журн., **22**, 69 (1950). [5] О. П. Чепинога, Л. П. Рукина, там же, **25**, 388 (1953). [7] Б. И. Гольдштейн, Д. В. Волькензон, Биохимия, **12**, 89 (1947). [7] Б. И. Гольдштейн, Сборн. Витамины, Изд. АН УССР, **1**, 197 (1953). [8] A. Marshak, H. Vogel, J. Biol. Chem., **189**, 597 (1951). [9] D. V. Reddy, M. E. Lombardo, ibid., **198**, 267 (1953). [10] С. С. Дебов, Вопр. мед. химии, **6**, 117 (1953).