

СОСТАВ ФРАКЦИЙ НЕГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА
ПРИ ГИДРОКОРТИЗОНОВОЙ ИНДУКЦИИ У КРЫС

Э. С. ГЕВОРКЯН, А. Р. ДЖЕРБАШЬЯН, Г. А. ПАНОСЯН

Методом фенольной экстракции выявлен состав негистоновых белков хроматина мозга и печени крыс в контроле и при подкожном введении животным гидрокортизона. Показано, что гормон в концентрации, индуцирующей ряд ферментативных систем в обеих тканях крыс, вызывает ощутимые изменения в составе фенолрастворимых негистоновых белков хроматина, выражающиеся в уменьшении одних и увеличении других фракций.

Роль отдельных компонентов хроматина в активировании генетического аппарата при гормональной индукции выявлена далеко не полностью. В литературе все чаще появляются данные, свидетельствующие о возможной ключевой роли отдельных фракций негистоновых белков хроматина при гормональных воздействиях [1—4]. С этой точки зрения исследование состава негистоновых белков хроматина может явиться необходимым начальным этапом изучения тех структурных и функциональных изменений, которые претерпевает хроматин при гормональной индукции.

Настоящая работа посвящена выделению и фракционированию тотальных кислых негистоновых белков хроматина клеток мозга и печени крыс при гидрокортизонавой индукции.

Материал и методика. Эксперименты проводили на крысах обоего пола. Гидрокортизон (фирмы «Рихтер», ВНР) вводили в концентрации, индуцирующей ряд ферментативных систем—5 мг на 100 г веса животного.

Выделение ядер. Ядра выделяли двумя методами: Ловtrup-Рейна и Мак Ивена [5], а также по методике, основанной на ряде имеющихся в литературе методов [6—8]. Ткани гомогенизировали в смеси, содержащей 0,25 М сахарозу, 3 мМ MgCl₂, фильтровали через 2—4 слоя марли, центрифугировали 5 мин при 1000 g. Осадок ресуспензировали в 0,5% тритоне X-100, 0,25 М сахарозе, 2 мМ MgCl₂; центрифугировали 5 мин при 1000 g. Осадок промывали два раза в 0,25 М сахарозе, 1 мМ MgCl₂ и центрифугировали 20 мин при 2000 g. Очищенный осадок ядер ресуспензировали в растворе, содержащем 0,5 М сахарозу, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ 2-меркаптоэтанол в 10 мМ трис-HCl буфере pH 7,4; 1% тритон X-100. Гомогенат фильтровали через капрон и центрифугировали 10 мин при 1000 g. Осадок промывали два раза в 0,25 М сахарозе, 1 мМ MgCl₂.

Выделение хроматина. При выделении хроматина основывались на ряде известных в литературе методов [6, 8, 9]. Осадок ядер ресуспензировали в 50 объемах раствора 0,075 NaCl, 0,042 М Na-ЭДТА, pH 7,9; центрифугировали 10 мин при 10000 g. Эту процедуру повторяли три раза. Затем осадок промывали соответственно в следу-

ющих трех растворах: 0,01 М трис-HCl, 0,005 М трис-HCl; 0,001 М трис-HCl, pH 7,9 во всех случаях. Во всех процедурах при выделении ядер и хроматина использовали метабисульфит калия для подавления активности протеаз. Соотношение белок/ДНК для полученного нами хроматина равнялось 1,47 (из мозга) и 1,41 (из печени).

Выделение негистоновых белков. Негистоновые белки выделяли по методу Тенга и др. [10]. Из очищенных ядер без предварительного выделения хроматина осадок ядер промывали в 0,01 М трис-HCl буфере pH 7,9 и центрифугировали 10 мин при 10000 g. Затем для удаления кислых белков ядер осадок растворяли в 0,14 М NaCl. Эту процедуру повторяли три раза. Для удаления кислотно-растворимых белков хроматина осадок дважды промывали по 30 мин в 0,25 М HCl, а затем центрифугировали 15 мин при 4000 g. Осадок суспензировали в смеси, содержащей 0,1 М трис, 0,01 М Na-ЭДТА pH 9,0; 0,14 М 2-меркаптоэтанол и равные объемы фенола, насыщенного этим же раствором, и оставляли в течение 16 час. После перемешивания центрифугировали 30 мин при 4000 g. Отсасывали фенольные фазы, негистоновые белки осаждали, добавляя два объема холодного метанола. Осадки негистоновых белков хроматина трижды промывали метанолом, подсушивали на воздухе и растворяли в соответствующих растворителях для фракционирования.

Электрофорез негистоновых белков. Для фракционирования применяли электрофорез в полиакриламидном геле в двух системах—с мочевиной и с додецилсульфатом натрия. При электрофорезе в системе полиакриламидный гель—мочевина белки растворяли в 9 М мочевины и 0,9 н уксусной кислоте, а при электрофорезе—в системе полиакриламид—додецилсульфат натрия—в 1% Na-додецилсульфате и 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,4) [11]. В пробах определяли содержание белка, затем добавляли 2-меркаптоэтанол до концентрации 0,14 М и оставляли на ночь при комнатной температуре. Образцы в количестве 250 мкг наносили на трубочку. Гели обоих типов окрашивали амидочерным 10Б и кумасси бриллиантовым, отмывали от несвязанной краски 7% уксусной кислотой.

Определение белка проводили по методу Лоури и др. [12]. ДНК определяли по методу Дише [13].

Результаты и обсуждение. Выделение и фракционирование негистоновых белков хроматина проводились по методике Тенга и др. [10], позволяющей выделить фенолрастворимые фракции кислых негистоновых белков. Известно, что часть негистоновых белковых фракций, непосредственно участвующих в генной регуляции, в частности фракции, чувствительные к гормональным воздействиям, имеют более кислую природу и хорошо выявляются среди фенолрастворимых негистоновых белков. Однако растворение в феноле приводит к довольно значительному загрязнению препаратов ядерномембранными белками, которые частично можно удалить обработкой 0,5% тритоном X-100 [14]. Учитывая сказанное, нами применялась методика Тенга и др. с соответствующими изменениями для достижения хорошей очищенности с минимальными денатурационными потерями. При изменениях метода основывались на ряде имеющихся в литературе методов по выделению ядер и хроматина, с применением на всех стадиях выделения метабисульфита калия.

Предварительно нами было показано, что негистоновые белки, выделенные непосредственно из очищенных ядер и из предварительно выделенного из ядер хроматина почти идентичны, что, по-видимому, свидетельствует либо о незначительной загрязненности препаратов, либо о том, что измененная нами методика не позволяет удалять ядерномембранные контаминанты даже при тритоновой обработке.

На рисунке представлены электрофореграммы негистоновых белков хроматина из ядер мозга и печени крыс, из которых видно, что негистоновые белки, выделенные из этих тканей, представлены 17—20 фракциями, причем 3—4 фракции, выявленные в хроматине из мозга, отсутствуют в таковой из печени. Последнее согласуется с имеющимися в литературе данными о тканеспецифичности негистоновых белков хроматина, в частности, с наличием ряда «уникальных» фракций в хроматине мозговой ткани крыс, имеющих, по-видимому, особое физиологическое значение, характерное для сложной организации и функции мозговой ткани [15].

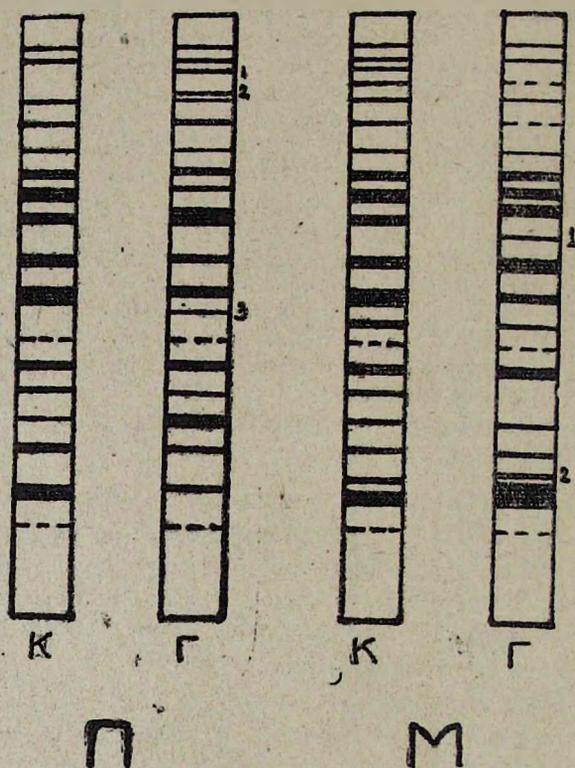


Рис. Электрофореграммы фенолрастворимых негистоновых белков хроматина печени (П) и мозга (М) крыс в контроле (К) и при гидрокортизоновой индукции (Г). Цифрами на электрофореграммах обозначены появившиеся при гормональной индукции фракции.

На рис. приведены также электрофореграммы негистоновых белков хроматина клеток печени и мозга обработанных гидрокортизоном крыс, из которых явствует, что под действием гормона состав негистоновых белков хроматина из обеих тканей претерпевает значительные изменения. Меняется интенсивность минимум 2—3 фракций, чувствительных к воздействию гидрокортизоном; появляются 2—3 новые фракции, а некоторые—исчезают. Полученные результаты частично совпадают с немногочисленными литературными данными. Так, было пока-

зано, что в составе негистоновых белков хроматина имеется фракция, интенсивность которой при гормональной индукции резко возрастает. Предполагается, что данная фракция может играть ключевую роль во взаимодействии гормон-рецепторного комплекса с хроматином [2]. Кроме того, имеются данные и об уменьшении определенной фракции негистоновых белков под воздействием гидрокортизона [4]. Учитывая то, что гидрокортизон является «универсальным» индуцирующим гормоном, способным регулировать биосинтез ряда ферментативных систем в тканях высших животных, полученное нами изменение интенсивности ряда фракций негистоновых белков можно, видимо, объяснить сродством гидрокортизона к разным участкам хроматина. Однако более вероятным является предположение о том, что фракционированные нами белки содержат определенное количество ядерномембранных контаминантов, которые выделены нами вместе с истинными негистоновыми белками хроматина. Хотя в литературе имеются сведения о том, что тритоновая обработка ядер приводит к уменьшению сродства к ДНК негистоновых белков, выделенных фенольной экстракцией по Тенгу и др., т. е. к предполагаемой потере ядерномембранных белков, обладающих высоким сродством к ДНК [14], не исключена возможность и того, что обработка ядер тритоном X-100, разрушающая полностью внутреннюю и частично внешнюю структуру ядерной мембраны, может приводить к «облегчению» выделения этих отделившихся от мембранной структуры белков вместе с негистоновыми белками хроматина. На такую возможность указывают также работы Джаксона [16].

Учитывая сказанное, полученные нами ощутимые изменения в составе негистоновых белков при воздействии гидрокортизоном, по-видимому, можно объяснить в основном изменением ядерномембранных белков, чувствительных к гидрокортизон-рецепторному комплексу. Белки ядерномембранной структуры могут претерпевать значительные изменения при проникновении гормон-рецепторного комплекса в ядро. Эти изменения, возможно, непосредственно связаны с дальнейшим специфическим активированием генетического аппарата и несомненно требуют более детального и всестороннего исследования.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 10.XI 1977 г

**ՔՐՈՄԱՏԻՆԻ ՈՉ ՀԻՍՏՈՆԱՅԻՆ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՖՐԱԿՑԻԱՆԵՐԻ
ԿԱԶՄԸ ԱՌԵՏՆԵՐԻ ՄՈՏ՝ ՀԻԴՐՈԿՈՐՏԻՉՈՆԱՅԻՆ
ԻՆԴՈՒԿՑԻԱՅԻ ԴԵՊՔՈՒՄ**

Է. Ս. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Ա. Ռ. ԶՐԹԱՇՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

Ֆենոլային էքստրակցիայի մեթոդով ի հայտ է բերվել կոնտրոլ և հիդրոկորտիզոն սրակած կենդանիների զլխուղեղի և լյարդի քրոմատինի ոչ հիստոնային սպիտակուցների կազմը: Ձույց է տրվել, որ հորմոնը առաջացնում է

քրոմատինի ֆենոլում լուծվող ոչ հիստոնային սպիրտակուցների կազմի զգալի փոփոխություն, որն արտահայտվում է սի բանի ֆրակցիաների ինտենսիվությունն աճամար և մյուսների նվազմամբ:

THE FRACTION COMPOSITION OF NON-HISTONE CHROMATIN PROTEINS DURING HYDROCORTIZONE INDUCTION IN RATS

E. S. GEVORKIAN, A. R. CHERBASHIAN, G. A. PANOSYAN

The composition of brain and liver chromatin non-histone proteins of normal and subcutaneously hydrocortizone injected rats has been revealed by the phenol extraction method. It was shown that the hormone caused the marked changes in the composition of phenol extractable chromatin non-histone proteins which are expressed in qualitative and quantitative changes of these fractions.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. O'Malley B. W., Means A. R. The cell Nucleus ed. by H. Bush, 3, 379—417, 1974.
2. Shelton K. K., Alfrey V. A. Nature, 228, 132—134, 1970.
3. Spelsberg T. S., Wilhelm J., Hnilica L. S. Sub. Cell. Biochem, 1, 107—145, 1972.
4. Уманский С. Р. Успехи биол. химии, 26—44, 1976.
5. Lovtrup—Rein H., McEwen B. S. J. Cell. Biol., 30, 2, 405, 1966.
6. Spelsberg T. S., Steggle A. W., O'Malley B. W. J. Biol. Chem., 246, 13, 4188—4197, 1971.
7. Blobel G., Peter V. R. Science, 154, 1662—1665, 1966.
8. Mac Gillivray A. J. et al. Methods in Enzymology, 40, part E, 160—171, 1975.
9. Marushige K., Bonner J. J. Molec. Biol., 15, 166—174, 1966.
10. Teng C. S., Teng C. T., Alfrey V. G. J. Biol. Chem., 246, 11, 3597—3609, 1971.
11. Панченко Л. Ф., Сапунов М. И. Бохонько А. И. Укр. биохим. журн., 46, 1, 73—77, 1974.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193—265, 1951.
13. Филиппович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Г. А. Практикум по общей биохимии, 181—182. М., 1975.
14. Rowekamp W., Sekeris C. E. Arch. Biochem. Biophys., 160, 156—161, 1974.
15. Elgin S., Bonner J. Biochemistry, 11, 5, 772, 1972.
16. Jackson R. C. Biochemistry, 15, 25, 5652—5655, 1976.