

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ЯДЕРНЫХ МЕМБРАН И СОСТАВ ЯДЕРНОМЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ ПРИ ГИДРОКОРТИЗОНОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Ж. В. ЯВРОЯН, А. А. МИНАСЯН, Э. С. ГЕВОРКЯН, Г. А. ПАНОСЯН

Выделены препараты ядерных мембран из клеток печени крыс и определены их состав и активность пяти ферментов-маркеров. Показано, что выделенные препараты обладают достаточной чистотой. Выявлен состав белков ядерной мембраны в контроле и при введении в организм животных гидрокортизона. Показано, что одна из 22—24 фракций ядерномембранных белков чувствительна к воздействию гормона.

Хотя в структурном отношении ядерные мембраны достаточно хорошо изучены [14, 16, 24, 30], многие вопросы, касающиеся функций этих образований, остаются далеко невыясненными. В последние годы внимание исследователей было обращено к изучению химического состава, ферментативной активности ядерных мембран, выявлению роли этих структур в установлении динамического равновесия между ядром и цитоплазмой, к изучению биогенетической взаимозависимости между эндоплазматическим ретикулумом и ядерной мембраной. Несмотря на большое сходство ядерной мембраны с другими мембранными образованиями клетки, она отличается от последних двумя существенными моментами. Во-первых, ядерная мембрана проницаема для макромолекул с молекулярным весом до 40 тыс. [8, 9], которые свободно проходят через поры, пронизывающие всю толщу внешней и внутренней мембраны. Во-вторых, характерной особенностью ядерномембранной оболочки является то, что ее внутренняя мембрана частично связана с хроматином [17]. Непосредственная связь структур внутренней ядерной мембраны с хроматином предполагает их возможное участие в изменении функциональной активности генома у эукариотов. С этой точки зрения представляется возможным также участие ядерномембранных компонентов (в особенности белков и фосфолипидов) в процессах специфической регуляции генетической активности, в частности, в механизмах гормональной регуляции, на что указывают работы Джаксона и Чалкли [18].

Настоящая работа посвящена выделению и определению ряда параметров ядерной мембраны клеток печени крыс, выявлению состава ядерномембранных белков в контроле и при гидрокортизоновом воздействии в целях дальнейшего изучения механизмов гормональной индукции в печеночной ткани и роли ядерномембранных структур в этом процессе.

Материал и методика. Эксперименты проводили на беспородных крысах обоего пола. Гидрокортизон (фирмы «Рихтер», ВНР), вводили в концентрации, индуцирующей ряд ферментативных систем—5 мг на 100 г массы животного. Животных забивали через 4 ч после введения гормона.

Ядра выделяли по методу Блобела и Потера [7]. Перфузированную и размельченную ткань гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в 10 объемах смеси, содержащей 0,32 М сахарозу, 0,025 М KCl, 5 мМ MgCl₂, 50 мМ трис-HCl буфер, pH 7,5. Гомогенат фильтровали через 4—5 слоев марли, центрифугировали 15 мин при 2500 об/мин. Осадок промывали в гомогенизирующей смеси с последующим центрифугированием до получения прозрачного супернатанта. Полученный осадок ресуспендировали в той же смеси, однако вместо 0,32 М сахарозы применяли 2,2 М сахарозу, центрифугировали 45 мин при 18000 об/мин. Осадок промывали 2—3 раза в том же растворе (вместо 2,2 М сахарозы добавляли 0,25 М сахарозу) до получения прозрачного супернатанта; центрифугировали 15 мин при 2500 об/мин и в осадке получали чистые ядра.

Ядерные мембраны выделяли по методу Березня и др. [4]. Чистые ядра ресуспендировали в растворе, содержащем 0,025 М KCl, 5 мМ MgCl₂, 50 мМ трис-HCl буфер, pH 7,5 и добавляли ДНК-азу в тот же раствор с конечной концентрацией 100 мкг/мл. Полученную суспензию инкубировали 30—40 мин при комнатной температуре, постоянно перемешивая на магнитной мешалке. Действие ДНК-азы останавливали добавлением 1,5 объема того же холодного раствора. Затем центрифугировали 20 мин при 18000 об/мин. Осадок промывали 2—3 раза в том же растворе с добавлением 0,25 М сахарозы. После каждой промывки ядерные мембраны осаждали центрифугированием 20 мин при 18000 об/мин.

Активность Na⁺, K⁺-АТФ-азы, 5'-нуклеотидазы и глюкозо-6-фосфатазы в препаратах ядер и ядерных мембран определяли по методу Центгрофа и др. [32], а активность щелочной и кислой фосфатаз—по методу Лоури и др. [22]. Результаты выражали в единицах мкмоль выделившегося P₂O₅ на 1 мг белка в час.

Электрофорез препаратов ядер и ядерных мембран проводили в системе Na-додецилсульфат—полиакриламидный гель по методу Бланше [6]. Образцы растворяли в 10 мМ трис-HCl буфере, pH 8,0, содержащем 1%-ный Na-додецилсульфат, 10%-ную сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ β-меркаптоэтанол, в течение 30 мин при 37°. На каждую трубочку наносили 300 мкг белка. Электрофорез проводили при силе тока, равной 8 мА на трубочку, в течение двух часов. Гели окрашивали согласно методу Фейрбанкса и др. [11].

Белок определяли по методу Лоури и др. [23], ДНК и РНК—спектрофотометрически по методу Шмидта и Танхаузера [27]. Количественное определение фосфолипидов проводили по методу Фиске и Суббароу [12]. Результаты экспериментов обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение. Выделение и изучение химического состава ядерных мембран требует применения разных методических подходов, позволяющих разрыхлять их очень компактную структуру. При этом возникает необходимость сильной физической или химической обработки ядерных препаратов, включающей применение гипотонического шока [2, 31], ультразвука [13, 20], высокой ионной силы [24, 25], ДНК-азы [4, 21], природного полианиона гепарина [10, 26] или же различных сочетаний этих факторов [15, 21, 32]. Естественно, что эти методы выделения обеспечивают разную степень чистоты ядерномембранных препаратов, порой затрудняющих сопоставление и сравнение результатов. Обработка ультразвуком, применение высокой ионной силы приводят к выделению частично фрагментированных препаратов ядерной оболочки и отделению внутренней ядерной мембраны от внеш-

ней; при этом содержание ДНК в выделенных препаратах ничтожно [16]. Малые количества ДНК содержатся также в препаратах, выделенных с применением гепарина, способного растворять хроматин в ядрах путем специфического взаимодействия с ядерными белками [5]. Препараты ядерных оболочек, выделенные этим методом, не требуют дальнейшей очистки и имеют 100%-ный выход [10]. С другой стороны, препараты, выделенные с применением ДНК-азы и гипотонического шока, содержат значительные количества ДНК (до 8%), однако в них сохраняется морфология ядерной оболочки. Структура внешней и внутренней мембран не нарушается, сохраняются также комплексы ядерных пор [16]. Такая обработка позволяет выделить препараты, содержащие частично связанный с внутренней мембраной остаточный хроматин [16]. Ясно, что в аспекте выявления возможного участия ядерномембранных компонентов в процессах специфической регуляции генетической активности и изучения их связи с компонентами хроматина методы выделения с применением ДНК-азы и гипотонического шока представляются предпочтительными.

В табл. 1 суммированы результаты химического анализа препаратов ядерных мембран, выделенных нами с применением ДНК-азы. Полученные ощутимые количества ДНК (7,7%) и РНК (6,2%) согласуются с литературными данными и, видимо, свидетельствуют о том, что выделенные препараты ядерных мембран—структуры, связанные, с одной стороны, с хроматином, с другой—с цитоплазмой, в частности с рибосомами.

Другой важнейшей характеристикой препаратов ядерных мембран является определенная активность ряда ферментов. В настоящее время тщательно изучена активность 15—16 ферментов ядерной оболочки, однако результаты крайне разноречивые [14, 16, 19]. Вариабельность активности одного и того же фермента в разных препаратах ядерных мембран во многом зависит от различия методических подходов при их выделении.

Нами изучалась активность пяти ферментов в ядерных и ядерномембранных препаратах (табл. 2). Все пять ферментов обнаруживаются в препаратах ядерных мембран. Активность Na^+ - K^+ -АТФ-азы в обоих препаратах почти одинакова, что хорошо согласуется с данными Франке и сотр. [15]. 5'-нуклеотидазная активность на 30% выше в ядерных препаратах; о чем свидетельствуют и литературные данные [14]. Очень разноречивые данные имеются в литературе относительно глюкозо-6-фосфатазной активности ядерных мембран [14, 16]. Известно, что этот фермент является маркером эндоплазматического ретикула клеток печени. В работах Збарского и др. [31], Франке и др. [15] показано, что большая часть фермента локализована в микросомах и ядерной фракции, в препаратах ядерных мембран активность фермента незначительна. Вместе с тем в ряде работ [19—21] показана значительно большая активность глюкозо-6-фосфатазы именно в ядерномембранных препаратах. В наших опытах активность фермента в

Таблица 1

Процентное содержание и соотношения основных компонентов препаратов ядер и ядерных мембран клеток печени крыс

Фракция	Процентное содержание				Соотношение компонентов			
	белок	ДНК	РНК	фосфолипиды	ДНК/белок	РНК/белок	фосфолипиды/белок	ДНК/фосфолипиды
Ядра	58,5 $\pm$ 3,20	20,5 $\pm$ 1,98	6,08 $\pm$ 0,88	12,8 $\pm$ 1,50	0,37 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,06	0,28 $\pm$ 0,06	1,71 $\pm$ 0,23
Ядерные мембраны	64,7 $\pm$ 2,81	7,7 $\pm$ 0,73	6,21 $\pm$ 0,68	21,3 $\pm$ 2,54	0,12 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,07	0,39 $\pm$ 0,04

Таблица 2

Активность ряда ферментов в препаратах ядер и ядерных мембран

Фермент	Ядра	Ядерные мембраны	Ядерные мембраны/Ядра
(Na ⁺ , K ⁺)—АТФ-аза	5,61	6,17	1,08
5'-нуклеотидаза	6,87	5,06	0,76
Глюкозо-6-фосфатаза	3,66	5,57	1,75
Кислая фосфатаза	4,36	5,62	1,29
Щелочная фосфатаза	5,21	4,97	0,95

Приведены средние значения от пяти серий опытов.

ядерных препаратах на 35% выше активности его в ядрах. Активности двух фосфатаз обнаруживается как в препаратах ядер, так и ядерных мембран (табл. 2). Оба фермента имеют почти одинаковую активность в обоих препаратах, активность кислой фосфатазы на 23% выше в ядерных мембранах.

Нами проводилось также фракционирование ядерномембранных белков в контроле и при введении в организм животных гидрокортизона. При изучении состава негистоновых белков хроматина печени крыс при гидрокортизоновой индукции ранее нами было высказано предположение о возможной чувствительности фракций ядерномембранных белков к гормональному воздействию [1]. Белки ядерной мембраны могут контролировать не только транспорт гормон-рецепторных комплексов через поры, но непосредственно или опосредованно участвовать в специфической регуляции генетической активности. В этой связи интересны работы Джаксона и Чалкли [18], показавших, что 17 β -эстрадиол высокоаффинно связывается с ядерномембранной фракцией клеток эндометрия матки, а также Вигнери и др. [29] о специфическом связывании инсулина с ядерной мембраной клеток печени крыс.

Электрофореграммы белков ядер и ядерных мембран выявляют соответственно 28—30 и 22—24 фракции разной интенсивности, причем почти все фракции ядерных мембран представлены на электрофореграммах белков ядер (рис.). Наличие на электрофореграммах белков

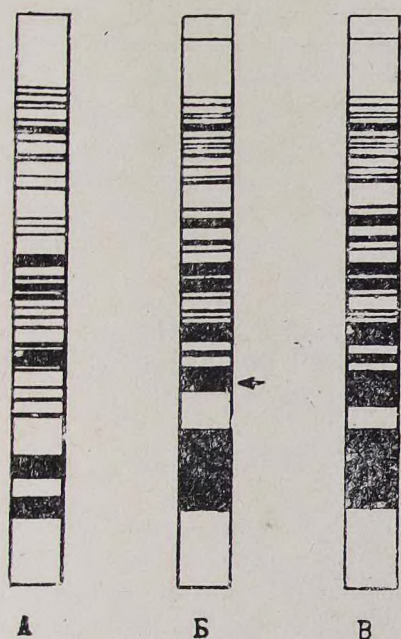


Рис. Электрофореграммы белков препаратов ядер и ядерных мембран. А—белки ядер, Б—белки ядерных мембран, В—белки ядерных мембран после введения гидрокортизона. Стрелкой на электрофореграммах показана фракция, утолщающаяся при гидрокортизоновом воздействии.

ядерных мембран низкомолекулярных фракций высокой подвижности свидетельствует о частичной загрязненности препаратов гистонами, в то время как высокомолекулярные фракции, вероятно, представлены негистоновыми белковыми контаминантами или же белками плазматичес-

ческой мембраны. Такой широкий белковый спектр препаратов ядерных мембран является следствием сравнительно слабой химической обработки при выделении. Истинные ядерномембранные белки, обладающие средней электрофоретической подвижностью и имеющие молекулярную массу в пределах 50000—80000, сосредоточены в середине электрофореграммы [17]. Именно среди них обнаруживается белковая зона, заметно утолщающаяся после введения животным гидрокортизона (рис.). Изменение интенсивности белковой фракции на электрофореграмме ядерных мембран свидетельствует о ее возможной ключевой роли в механизме действия гормона на генетический аппарат клетки. Эта ядерномембранная белковая фракция может способствовать проникновению гидрокортизон-рецепторного комплекса в ядро или же непосредственно участвовать в связывании этого комплекса в ядре, приводящем к специфическому активированию генома.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 20.VII 1979 г.

**ԿՈՐԻԶԱԹԱՂԱՆԹԱՅԻՆ ՊՐԵՊԱՐԱՏՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ
ՈՒ ԿՈՐԻԶԱԹԱՂԱՆԹԱՅԻՆ ՍՊԵՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ԲԱՂԱԴՐՈՒԹՅՈՒՆԸ
ՀԻԳՐՈԿՐԻՏՈՆԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅԱՆ ՆԵՐՔՈՒ**

ժ. Վ. ՅԱՎՐՈՅԱՆ, Ա. Ա. ՄԻՆԱՍՅԱՆ, Է. Ս. ԳԵՎՈՐԿՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

Առնետի լյարդի բջիջներից անջատվել են կորիզային թաղանթների պրեպարատները, որոշվել են նրանց մի քանի պարամետրերը: Պարզվել է, որ անջատված պրեպարատները ունեն բավարար մաքրություն: Որոշված է կորիզաթաղանթային սպիտակուցների բաղադրությունը կենդանիներին հիդրոկորիզոն ներարկելուց հետո: Ցույց է տրված, որ կորիզաթաղանթային սպիտակուցների 22—24 ֆրակցիաներից մեկն զգալուն է հորմոնի ազդեցության նկատմամբ:

**NUCLEAR MEMBRANE PREPARATE ISOLATION AND
COMPOSITION OF NUCLEAR MEMBRANE PROTEINS
UNDER THE HYDROCORTISONE ACTION**

J. V. YAVROYAN, A. A. MINASYAN, E. S. GEVORKIAN, G. A. PANOSYAN

Nuclear membrane² preparates have been isolated from rat liver cells and some of their parameters determined. Satisfactory purity of isolated preparates has been shown. Nuclear membrane protein composition has been determined in control and under hydrocortisone administration. It has been shown that one of 22—24 bands of nuclear membrane proteins is hormone sensitive.

1. Геворкян Э. С., Джербашьян А. А., Паносян Г. А. Биол. ж. Армении, 31, 4, 370, 1978.
2. Збарский И. Б., Перевощикова К. А., Делекторская Л. Н. ДАН СССР, 177, 2, 445, 1967.
3. Agutter P. S. Bioch. Bioph. Acta, 255, 397, 1972.
4. Berezney R., Funk L. K., Crane F. L. Bioch. Bioph. Acta, 203, 531, 1970.
5. Berlowitz L., Kitchin R., Fallotta D. Bioch. Bioph. Acta, 262, 160, 1972.
6. Blanchet J. P. Exptl. Cell Res., 84, 159, 1974.
7. Blobel G., Potter V. R. Science, 154, 76, 1966.
8. Bonner J. M. J. Cell Biol. 64, 421, 1975.
9. Bonner J. M. J. Cell Biol. 64, 431, 1975.
10. Borners M., Courvalin J.-C. J. Cell Biol., 76, 191, 1978.
11. Fairbanks G., Steck T. L., Wallack D. F. H. Biochemistry, 10, № 13, 2606, 1971.
12. Fiske C. H., Subbarow. J. Biol. Chem., 66, 375, 1925.
13. Franke W. W. J. Cell Biol., 31, 619, 1966.
14. Franke W. W. Phil. Trans. R. Soc. Lond., B, 268, 67, 1974.
15. Franke W. W., Deumling B., Ermen B., Jarasch E.—D., Kleinig H. J. Cell Biol. 46, 379, 1970.
16. Harris J. R. Bioch. Bioph. Acta, 515, 55, 1978.
17. Jackson R. C. Biochemistry, 15, 25, 5641, 1976.
18. Jackson V., Chalkley R. J. Biol. Chem., 249, 5, 1615, 1974.
19. Kartenbeck J., Jarasch E. D., Franke W. W. Exptl. Cell Res. 81, 175, 1973.
20. Kashling D. M., Kasper C. B. J. Biol. Chem., 244, 3786, 1969.
21. Kay R. R., Fraser D., Johnston J. R. Eur. J. Bioch., 30, 145, 1972.
22. Lowry O. H., Lopez I. A. J. Biol. Chem., 162, 3, 421, 1946.
23. Lowry O. H., Rosenbraugh N. J., Farr A. K., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
24. Merriam R. W. J. Bloch. Bioph. Cytol., 11, 559, 1961.
25. Monneron A., Blobel G., Palade G. E. J. Cell Biol., 55, 104, 1972.
26. Prescott D. M. Meth. Cell Biol., 15, 163, 1977.
27. Schmidt G., Tannhauser J. J. Biol. Chem., 161, 83, 1945.
28. Sikstrom R., Lanolx J., Bergemon J. J. M. Bloch. Bioph. Acta, 448, 88, 1976.
29. Vigneri R., Goldfine I. D., Wong K. Y., Smith G. J., Pezzino V. J. Biol. Chem., 253, 7, 2098, 1978.
30. Watson M. Z. J. Bioph. Bloch. Cytol., 6, 149, 1959.
31. Zbarsky I. B., Perevoscikova K. A., Delectorskaya L. N., Delectorsky V. V. Nature (London), 221, 257, 1969.
32. Zentgraft M., Deumling B., Jarasch E. D., Franke W. W. J. Biol. Chem., 246, 9, 2986, 1971.