ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

XXXII, 12, 1979

УДК 599.73:576.312.31:535.37.07

ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОМАТИНА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ГИДРОКОРТИЗОНОМ in vitro

Р. Р. КАЗАРЯН, Ю. М. ДЕМИН, М. А. ДАВТЯН

При инкубации срезов печени крыс в присутствии гидрокортизона наблюдаются глубокие сдвиги в флуоресцирующих характеристиках хроматина. Инкубация гомогената печени с гидрокортизоном не вызывает каких-либо изменений. Сдвиги четко выявляются лишь при добавке к гомогенату нуклеозидтрифосфатов, а также ионов Mg^{++} (<0,01). Модельные эксперименты с реконструкцией отдельных субклеточных элементов печени позволяют предполагать возможное связывание гидрокортизона с белковым рецептором цитоплазмы, с дальнейшей реализацией действия образовавшегося гормон-белок комплекса на ДНК.

В последнее время установлено, что многие гормоны действуют как индукторы транскрипции, усиливая или включая в гормончувствительных тканях синтез белков, ответственных за физиологические функции данного гормона [5, 6]. В предыдущих наших исследованиях была показана возможность улавливания тонких изменений структуры хроматина и его компонентов при гормональной индукции и установлено, что эти сдвиги (изменение интенсивности эмиссии, сдвиги в коротковолновую область, появление новых флуоресцирующих комплексов) отражают претерпеваемое при этом изменение как гистоновых, так и негистоновых белков хроматина [1].

Решение проблемы гормонального контроля транскрипции, лежащего в основе ферментативной индукции, следует искать на пути исследования тех структурных и функциональных изменений хроматина, которые происходят в нем после акцептирования стероид-рецепторного комплекса. Непосредственных же данных, проведенных в этом направлении на модельных экспериментах in vitro, пока очень мало.

В настоящей работе предпринята попытка исследования хроматина с помощью флуоресцентного анализа с целью выявления вероятных механизмов связывания гормон-рецепторного комплекса.

Материал и методика. В экспериментах использовались белые крысы массой 120—150 г. Хроматин из печени животных получали предварительно выделив ядра. После забивки животных печень перфузировали 0,9%-ным раствором NaCl, быстро извлекали и хорошо измельченную ткань гомогенизировали в растворе 0,25 М сахароза+1 мМ $MgCl_2$ (pH 7,5), фильтровали через четырехслойный нейлон. На этой стадии проводились эксперименты по приведенной ниже схеме.

СХЕМА ОПЫТА

Гомогенат

Добавлялся гидрокортизон в концентрациях 10^{-2}—10^{-8} М

↓

Центрифугирование 600 g

↓

Дальнейшее выделение ядерной фракции

↓

Получение хроматина

Центрифугирование при 600 g

Растворимая фракция

Добавлялся гидрокортизон в в концентрациях 10^{-2}—10^{-8} М в присутствии ионов Mg^{++} (0,01) и нуклеозидтрифосфатов, инкубация 2,5 ч. при 37°

Ядерная фракция

Реконструкция гомогената с ресуспендированием
Инкубация 2,5 ч. при 37°
Дальнейшее выделение ядерной фракции
Получение хроматина

Добавлялся гидрокортизон в концентрациях 10^{-2}—10^{-8} М, инкубация 2,5 ч. при 37° в присутствии нуклеозидтрифосфатов и Mg^{++}

↓

Центрифугирование 600 g

↓

Дальнейшее выделение ядерной фракции

↓

Получение хроматина

Добавлялся гидрокортизон в концентрациях 10^{-2}—10^{-8} М, инкубация 2,5 ч. при 37°

↓

Центрифугирование 600 g

↓

Дальнейшее выделение ядерной фракции

↓

Получение хроматина

Гомогенат

Центрифугирование при 600 g

↓

Тщательное ресуспендирование ядерной фракции 0,25 М сах. +0,5%-ный тритон—х—100+1 мМ $MgCl_2$ (pH (7,5)

Добавлялся гидрокортизон в концентрациях 10^{-2}—10^{-8} М в присутствии ионов Mg^{++} (0,01) и нуклеозидтрифосфатов, инкубация 2,5 ч. при 37°

↓

Дальнейшее выделение ядерной фракции

↓

Получение хроматина

Центрифугирование при 600 g

Растворимая фракция

↓

Добавлялся гидрокортизон в концентрациях 10^{-2}—10^{-8} М в присутствии ионов Mg^{++} (0,01) и нуклеозидтрифосфатов, инкубация 2,5 ч. при 37°

↓

Термическая обработка растворимой фракции при 70—80° 10 мин

Ядерная фракция

Реконструкция гомогената с ресуспендированием

↓

Инкубация 2,5 ч. при 30°

↓

Дальнейшее выделение ядерной фракции

↓

Получение хроматина

Выделение ядер проводили в растворах 0,25 М сахарозы, 0,25 М сахарозы с 0,5%-ным тритон—х-100, с дальнейшей очисткой ядерной фракции через слой 2,2 М сахарозы (d=1,291), при pH буферных растворов 7,5.

Хроматин получали отмывкой (по 4—5 раз) очищенных клеточных ядер 0,024 М ЭДТА с 0,075 М NaCl буфером (pH 8), а затем по два раза 0,05, 0,01, 0,002 и 0,001 М трис-HCl буфером (pH 8). Каждый этап промывки сопровождался тщательным ресуспендированием и центрифугированием при 7000 g в течение 15 мин.

Все растворы с сахарозой были приготовлены на 0,01 М трис-HCl буфере (pH 7,5). Во всех использованных для выделения растворах присутствовал 0,5 мМ метабисульфат калия для предотвращения действия протеаз.

Нами применен способ получения хроматина с промежуточным выделением ядер, описанный в работе Шово и др. [3].

В экспериментах использовался также хроматин, полученный из срезов печени крыс. После тщательной перфузии 0,9%-ным NaCl печень быстро извлекалась. Готовились срезы на строгом холоду, после чего проводилась инкубация их в растворе 0,25 М сахарозы с 1 мМ $MgCl_2$ (pH 7,5) в присутствии гидрокортизона в различных концентрациях 10^{-2}—10^{-8} М. Инкубацию проводили в течение двух часов при 37°, после чего проводили гомогенизацию и центрифугирование при 600 g в течение 10—15 мин. После повторной гомогенизации ядер в растворе 0,25 М сахароза+0,5%-ный тритон—х-100+1 мМ $MgCl_2$, pH 7,5 (этот этап повторялся дважды), их очищали центрифугированием при 16000 g 50 мин через слой 2,2 М сахарозы в присутствии 1 мМ $MgCl_2$. Дальнейшее получение хроматина проводилось как описано выше.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [8], ДНК—по Дише [4], РНК—спектрофотометрически после гидролиза 1 N $HClO_4$. Спектральные характеристики снимали на спектрофотометрах СФ-4А и СФ-16.

Спектры возбуждения и эмиссии регистрировали на флуоресцентном спектрофотометре MPF-2A фирмы «Hitachi» (Япония), в кварцевых прямоугольных кюветах при комнатной температуре, с многократными разбавлениями 1×10^{-3} М трис-HCl буфера (pH 8), при высоких чувствительностях SS-5, SS-6. Для устранения градиента температуры раствор в кювете перемешивали механической стеклянной мешалкой.

Результаты и обсуждение. В первой серии экспериментов исследовались флуоресцирующие свойства хроматина, полученного после добавления гидрокортизона к гомогенату без инкубации. Как показали исследования, он обнаруживает один максимум спектра возбуждения при 295 нм и один максимум спектра эмиссии при 340 нм, т. е. выявляются характерные спектры максимумов возбуждения и эмиссии исходного состояния хроматина, обусловленные триптофановой флуоресценцией [2]. Флуоресцентный анализ на всех длинах волн энергии активации показал также, что качественных перестроек в флуоресцирующих характеристиках хроматина, полученного после добавления гидрокортизона, нет.

Не выявлены также изменения флуоресцирующих свойств хроматина, полученного после добавления гидрокортизона к гомогенату, инкубированному 2,5 ч. при 37°.

На следующей стадии работы флуоресцентному анализу подвергался хроматин, полученный после добавления гидрокортизона к гомогенату, инкубированному 2,5 ч. при 37° в присутствии нуклеозидтрифосфатов, а также ионов ^{++}Mg (<0,01). Результаты этих опытов и на этот раз не выявили существенных изменений в максимумах спектров возбуждения и эмиссии при 295 и 340 нм нативного хроматина, с незначительной разницей в интенсивности эмиссии. Однако детальный

флуоресцентный анализ препарата на всех длинах волн энергии активации обнаружил качественные изменения в структуре хроматина с проявлением новых флуоресцирующих комплексов в области длин волн возбуждения 237—270 нМ в пределах спектра флуоресценции 330—485 нм, при этом максимальный эффект этих изменений достигал при добавлении гормона в концентрациях 10^{-5}—10^{-7} М (рис. 1, 2).

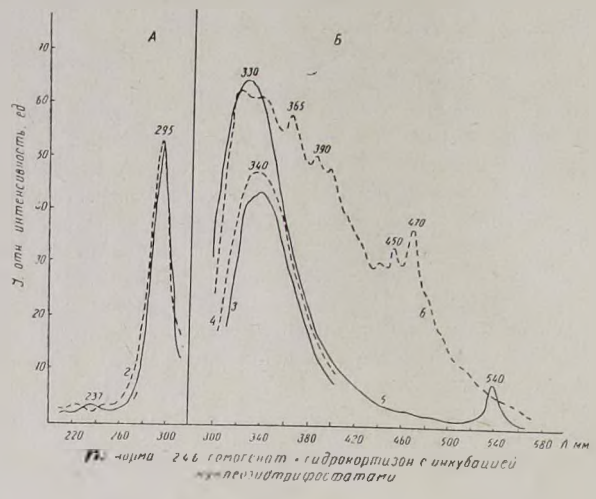

Рис. 1. Спектры возбуждения (А) и эмиссии (Б) при длине волн возбуждения Exw—295 нм (1, 2, 3, 4), Exw—270 нм (5, 6) хроматина, выделенного из печени крыс. Ширина щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии—4 нм (1, 2, 3, 4). 6 нм (1, 3, 5)—Нативный хроматин, разбавленный ×20 в 1×10^{-3}М трис-HCl буфере, pH 8. 2, 4. 6—Хроматин, полученный при добавлении гидрокортизона (в концентрациях 10^{-5}—10^{-7} М) к гомогенату, инкубированному 2,5 ч. в присутствии нуклеозидтрифосфатов и ионов Mg^{++} (<0,01), разбавленный ×20 в 1×10^{-3} М трис-HCl буфере, pH 8.

В следующей серии экспериментов исследовались флуоресцирующие свойства хроматина после добавления гидрокортизона к растворимой фракции гомогената, которая инкубировалась с различными концентрациями гормона (10^{-2}—10^{-8} М), в присутствии нуклеозидтрифосфатов и ионов Mg^{++} в течение 2,5 ч, с дальнейшей инкубацией в течение 2,5 ч при 37° и добавлением ядерной фракции. Полный флуоресцентный анализ препарата и в этом случае выявил конформационные изменения в структуре хроматина, с проявлением аналогичных флуоресцирующих комплексов в области длин волн возбуждения 237—270 нМ в пределах спектра флуоресценции 340—465 нМ, при этом максимальный эффект этих изменений также обнаруживался при добавлении гормона к растворимой фракции гомогената в концентрациях 10^{-5}—10^{-7} М.

Однако при добавлении гидрокортизона к растворимой фракции гомогената, инкубированного с гормоном в различных концентрациях (10^{-2}—10^{-8} М) в присутствии нуклеозидтрифосфатов и ионов Mg^{++}

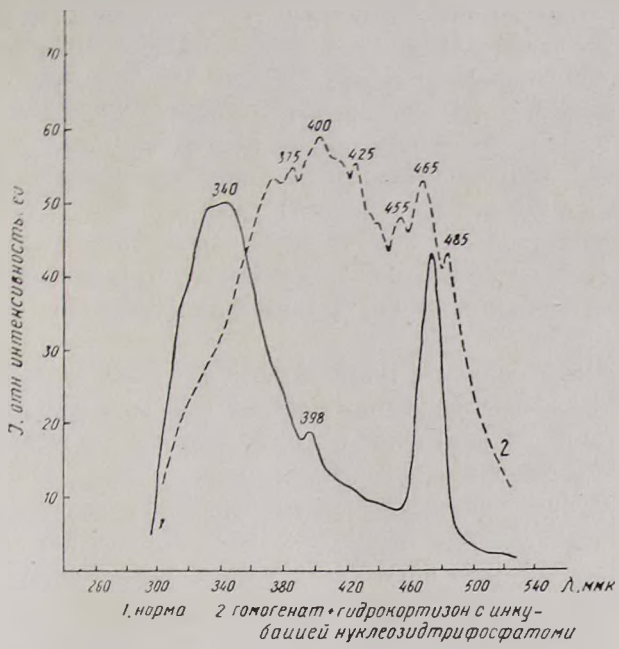

Рис. 2. Флуоресценция хроматина при длине волны возбуждения Exw—237 нм. Ширина щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии—8 нм. Разъяснения 1, 2 см. на рис. 1.

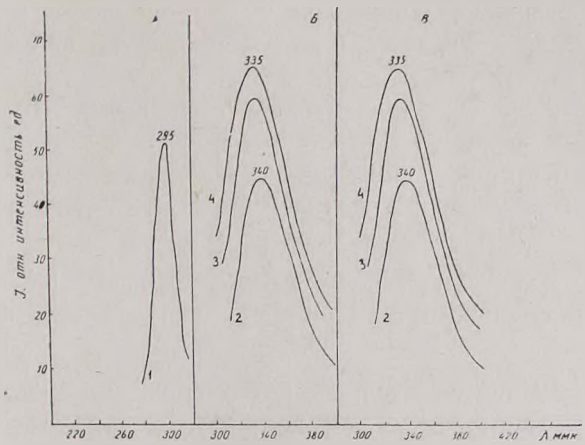

Рис. 3. Спектр возбуждения (А) при длине волны эмиссии Emw—340 нм и спектры эмиссии (Б, В) при длине волн возбуждения Exw—295 нм (2), Exw—270 нм (4), Exw—230 нм (3), хроматина—(Б), полученного при добавлении гидрокортизона к растворимой фракции гомогената (в концентрациях 10^{-5}—10^{-7} М), с инкубацией нуклеозидтрифосфатов и ионов $++Mg$ (<0,01) 2,5 ч, с последующей термической обработкой и дальнейшей инкубацией с ядерной фракцией 2,5 ч.—(В), полученного при добавлении гидрокортизона (в концентрациях 10^{-5}—10^{-7} М) к ядерной фракции, инкубированного 2,5 ч с нуклеозидтрифосфатом и ионами $++Mg$ (<0,01). Ширина щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии—4 нм (1, 2), 6 нм (4), 8 нм (3).

(<0,01) в течение 2,5 ч, с последующей термической обработкой при 70—80° (5—10 мин) и инкубацией с добавленной ядерной фракцией у полученного хроматина никаких изменений в флуоресцирующих характеристиках не наблюдается (рис. 3). Аналогичная картина была выявлена при исследовании флуоресцирующих свойств хроматина, полученного при добавлении гидрокортизона на различных стадиях выделения ядерной фракции, инкубированной 2,5 ч при 37° в присутствии нуклеозидтрифосфатов и ионов Mg^{++} (<0,01) (рис. 3).

На основании анализа полученных данных можно предположить, что для проявления эффекта гидрокортизона необходимо предварительное связывание со своим специфическим цитоплазматическим белком-рецептором.

Далее мы исследовали флуоресцирующие характеристики хроматина, полученного при инкубации срезов печени с гидрокортизоном. Обнаружены такие же изменения флуоресцирующих свойств хроматина (сдвиг основного флуоресцирующего комплекса с подавлением квантового выхода флуоресценции; проявление новых флуоресцирующих комплексов в области длин волн возбуждения 230—270 нМ, в пределах спектра эмиссии 330—485 нМ), какие наблюдались при гормональной (гидрокортизон) индукции аргиназы и ряда других катаболических ферментов [1], при этом эти перестройки четко выявлялись при инкубировании срезов печени с гидрокортизоном в концентрации 10^{-5}—10^{-7} М.

Следует отметить, что в отношении тирозинаминотрансферазы работами Либерта и др. [7] показано, что максимальная индукция этого фермента в срезах печени крыс также происходит при концентрации кортизона 10^{-6} М.

Анализ полученных данных позволяет заключить, что, очевидно, решающим этапом контроля стероидом транскрипции является связывание стероид-рецепторного комплекса с внутриядерными компонентами, что и вызывает изменения в флуоресцирующих характеристиках хроматина.

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии,
филиал ВНИИК и ЭХ МЗ СССР
Поступило 6.VII 1979 г.

ՔՐՈՄԱՏԻՆԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՏԱՅԻՆ ԱՆԱԼԻԶԻ ՄԻՋՈՑՈՎ, ՀԻԴՐՈԿՈՐՏԻԶՈՆԻ ՆԵՐԳՈՐԾՈՒԹՅԱՄԲ IN VITRO

Ռ. Ռ. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, Յու. Մ. ԴՅՈՄԻՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

Հիդրոկորտիզոնի ներգործությամբ առնետների լյարդի հյուսվածքաշերտերի ինկուբացիայի ժամանակ քրոմատինի ֆլուորեսցենտող ցուցանիշներում դիտվում են տեղաշարժեր, որ բնորոշ են առնետների լյարդից ստացված և արգինազայի ու մյուս կատաբոլիկ ֆերմենտների հորմոնալ ինդուկցիայի ենթարկված քրոմատինին։ Լյարդի հոմոգենատի ինկուբացիան հիդրոկորտիզոնով փոփոխություններ առաջ չի բերում քրոմատինի ֆլուորեսցենտող ցու-

ցանիշներում։ Այս փոփոխությունները հստակ արտահայտվում են միայն հոմոգենատին նուկլեոզիդտրիֆոսֆատներ, ինչպես նաև Mg^{++} *(<0,01) իոններ ավելացնելու դեպքում։*

Մոդելային փորձերը լյարդի առանձին ենթաբջջային էլեմենտների վերականգնելով թույլ են տալիս եզրակացնելու հիդրոկորտիզոնի հնարավոր միացումը ցիտոպլազմայի սպիտակուցային ռեցեպտորին, ստացված հորմոն-սպիտակուցի կոմպլեքսի հետագա արդյունքով ԴՆԹ-ի նկատմամբ։

FLUORESCENT ANALYSIS OF CHROMATIN UNDER THE ACTION OF HYDROCORTISONE IN VITRO

R. R. KAZARIAN, Yu. M. DYOMIN, M. A. DAVTIAN

During the incubation of rat liver cuts in the presence of hydrocortisone, deep shifts in fluorescent characteristics of chromatin, are observed. The incubation of homogenate of the liver with hydrocortisone doesn't change the fluorescenting characteristics of chromatine. These changes are clearly displayed only when adding nucleozidtriphosphats to homogenate, and also ions of Mg^{++} (<0,01). Model experiments with reconstruction of some subcellular elements of liver allow to conclude possible binding of hydrocortisone with protein receptor of cytoplasm, with further realization of the effect of hormone-protein complex on DNA.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Давтян М. А., Казарян Р. Р., Демин Ю. М.* Биолог. ж. Армении, *32*, 1, 1979.
2. *Казарян Р. Р., Демин Ю. М., Тирацуян С. Г., Манвелян А. Г.* Биолог. ж. Армении, *31*, 7, 1978.
3. *Chauvean J., Moule Y., Rouiller C.* Exptl. Cell Res., *11*, 317, 1956.
4. *Dishe L.* Microchemie, *8*, 9, 1930.
5. *Kenney F., Wicks W., Greenman D.* J. Cellular Compar. Physiol., *66*, 1, 125, 1965.
6. *Knox W.* Synthesis of Molecular and Cellular Structure, 13, N. Y., 1960.
7. *Liberti J. P., Pu Vall C. H., Wood P. M.* Canad. J. Biochem., *49*, 1359, 1931.
8. *Lowry P. U., Rosenbrough N. T.* J. Biol. Chem., *193*, 265, 1951.