

## ЛИТЕРАТУРА

1. Куприянов В. В. Пути микроциркуляции. Кишинев, 1969.
2. Мангейм А. Е. и Хурейна М. А. Клиническая медицина, 13, 3, 432—437, 1936.
3. Олпин И. А. Патол. физиол. и эксперимент. терапия, 8, 1, 81—92, 1959.
4. Роскин Г. И. Бюлл. экспер. биол. и мед., 18, 6, 12, 1944.
5. Сигахан С. А., Манукян Л. А. Кровообращение, 5, 11—15, 1976.
6. Ball J., Chapman J. A. and Myrdal K. D. Cell. Biol., 22, 351—364, 1964.
7. Barland P., Noytkoff A. B., Hamerman D. J. Cell. Biol., 14, 207—220, 1962.
8. Coulter W. Arthritis & Rheumat., 5, 70, 1962.
9. Gumbel G. Arch. Path., 32, 189—193, 1941.
10. Langer E., Huth F., Z. Zellforsch. mikroskop. Anat., 37, 545—559, 1960.
11. Lever J. D., Ford E. H. Anat. Rec., 122, 533—534, 1956.

«Биолог. ж. Армения», г. XXKVIII, М 2, 1985

УДК 599.323:576.312.31

### ЧАСТИЧНАЯ ОЧИСТКА РЕЦЕПТОРНОГО БЕЛКА ГИДРОКОРТИЗОНА ЦИТОПЛАЗМЫ ПЕЧЕНИ КРЫС

Р. Р. КАЗАРЯН, А. С. ПОГОСЯН, М. А. ДАВТЯН

Проведен флуоресцентный анализ хроматина, полученного при реконструкции ядра с белковыми фракциями цитозоля после гель-фильтрации последнего на различных сефадексах (G-50, G-200). Показано, что при гормональной индукции гидрокортизон предварительно образует комплекс с белковым рецептором цитоплазмы (локализованным в высокомолекулярной фракции белка) с дальнейшей реализацией влияния образовавшегося гормон-белок комплекса на хроматин ядра.

*Ключевые слова:* хроматин, рецептор, гидрокортизон.

В настоящее время в решении вопроса гормонального контроля транскрипции, лежащей в основе ферментативной индукции, большое значение приобрели исследования на модельных экспериментах *in vitro*, касающихся тех структурно-функциональных изменений хроматина, которые происходят в нем после акцептирования стероид-рецепторного комплекса.

Предыдущими нашими исследованиями было показано [1, 2], что решающим этапом контроля стероидами транскрипции генетической информации является связывание стероид (гидрокортизон) — рецепторного комплекса с внутриядерными компонентами, что и вызывает глубокие изменения в флуоресцирующих свойствах хроматина. Тем самым были подтверждены данные многих авторов о внутриклеточном механизме реализации влияния индуцирующих факторов на хроматин [3].

В настоящей работе приводятся данные о локализации цитоплазматического рецепторного белка гидрокортизона печени крыс в модель-

ных экспериментах, проведенных на уровне субклеточных элементов и реконструированной системы.

*Материал и методика.* В экспериментах использовались белые крысы массой 120—150 г. Хроматин получали, предварительно выделяя ядра [2]. Структурные элементы клеток печени выделяли методом Шнейдера и Хогебума [4]. Осаждение микросом не проводили, вследствие чего полученный супернатант представлял собой объединенную фракцию микросомы + гиалоплазмы. Для получения белкового спектра растворимой фракции гомогената (цитозоля) применяли метод гель-фильтрации на колонне с сефадексом G-50 и G-200. На колонку (1,5×80 см) наносили 3 мл надосадочной жидкости (цитозоля). Уравновешивание и элюцию проводили 0,01 М трис-буфером (рН 8,0). Скорость элюции равнялась 5 мл за 30 минут. Элюция проходила в водных условиях при температуре 0+3°. Пробы объемом 5 мл собирали на коллекторе и в них определяли содержание белка измерением оптической плотности при 280 мμ на спектрофотометре СФ-16. Пробы, содержащие белок, в дальнейшем реконструировали с ядерной фракцией.

Флуоресцентный анализ хроматина проводили на японском флуоресцентном спектрофотометре MPF-1A (Лигаги) в кварцевых прямоугольных кюветках при комнатной температуре с высокими чувствительностями—SS-6.

*Результаты и обсуждение.* Первая серия опытов была посвящена изучению флуоресцирующих свойств хроматина, выделенного после реконструкции ядер с белковыми фракциями цитоплазмы печени, предынкубированными с гидрокортизоном. Белковые фракции получали гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50. Для этого полученный супернатант (микросомы + гиалоплазмы) был стабилизирован дитионитолом и подвергнут протамин-сульфатной обработке для осаждения нуклеиновых кислот и получения более стандартной системы. Готовили 2% -ный водный раствор протаминсульфата, который нейтрализовывали по универсальному индикатору до рН 5,5 и добавляли к цитозолю из расчета 1:10 по объему центрифугата. Затем все перемешивали механической мешалкой с охлаждением (ледово-водяная баня) в течение 45—60 мин (после добавления протаминсульфата рН доводили до 7,0 и нейтрализовали его в процессе перемешивания). Центрифугированием в течение 20 мин при 10000 об/мин получали фракцию, лишенную нуклеиновых кислот, которую подвергали анализу в течение 2—3 часов. На каждой стадии до и после обработки определяли количество белка по Лоури или спектрофотометрически. Далее добавляли гидрокортизон (Рихтер, ВНР) в концентрации  $10^{-6}$  М и систему инкубировали 2,5 ч в присутствии избыточных количества АТФ (выше 2 М) и при низких концентрациях ионов  $Mg^{2+}$  (0,01 М). После проведенных операций систему подвергали гель-фильтрации сефадексом G-50. Пробы, содержащие белок, в дальнейшем реконструировали с ядерной фракцией и инкубировали 2,5 ч при 37°, после чего осуществляли полную очистку ядерной фракции и получение хроматина.

Результаты исследований показали, что при гель-фильтрации цитозоля через колонку с сефадексом G-50 обнаруживаются два белковых пика (рис. 1). Хроматин, полученный после реконструкции ядер с белковыми фракциями 3—7, входящими в состав первого пика, обнаруживает качественные изменения флуоресцирующих свойств с проявлением новых флуоресцентных комплексов в области воли возбуждения 237—

270 нм в пределах спектра эмиссии 350–465 нм (рис. 2), в то время как белковые фракции второго пика (фракции 9–11), реконструированные с ядерной фракцией, не вызывали аналогичных перестроек флуоресцирующих свойств структуры хроматина.

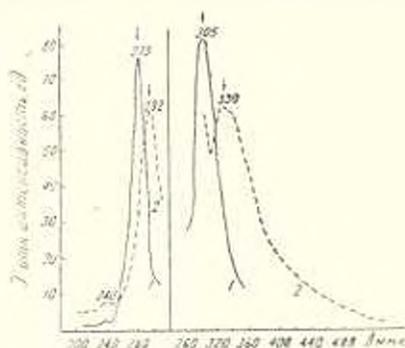


Рис. 1.

Рис. 1. Гель-фильтрация растворимой фракции гомогената через колонку с сефадексом G-50.

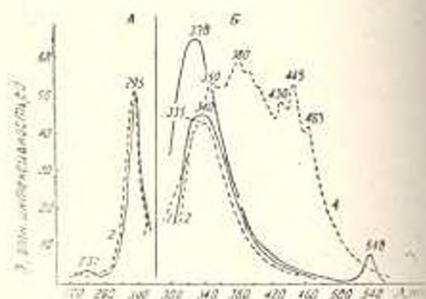


Рис. 2.

Рис. 2. Спектры возбуждения (А) при длине волны эмиссии  $E_m W=340$  нм и спектры эмиссии (Б) при длине волны возбуждения  $E_x W=295$  нм (1, 2) и  $E_x W=270$  нм (3, 4) хроматина, полученного из печени белых крыс. 1. Контрольный хроматин, 2. хроматин, полученный при добавлении гидрокортизона к растворимой фракции гомогената с концентрацией  $10^{-6}$  М, инкубации в присутствии АТФ и ионов  $Mg^{++}$  (0,01 М) 2,5 ч, гель-фильтрации сефадексами G-50 и G-200 и дальнейшей инкубации 2,5 ч. Ширина щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии—5 нм (1,2),—7 нм (3,4)

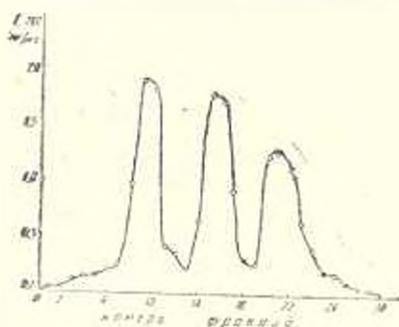


Рис. 3. Гель-фильтрация растворимой фракции гомогената через колонку с сефадексом G-200

С целью более детального изучения характера локализации цитоплазматического рецепторного белка гидрокортизона аналогичные эксперименты были проведены также при гель-фильтрации цитозоля на колонке с сефадексом G-200. Как видно из рис. 3, при этом выявляется белковый спектр с тремя пиками. Реконструкция ядер с белковыми фракциями первого пика (фракции 6–11) приводит к качественным перестройкам структуры хроматина (выявляются новые флуоресцирующие комплексы, характерные для состояния индукции, см. рис. 2). Однако эти изменения флуоресцирующих свойств хроматина не обнаруживаются после реконструкции ядер в отдельности с белковыми фракциями цитозоля второго (фракции 13–18) и третьего (фракции 19–25) пиков. Обнаруживается только характерная для нативного хроматина триптофановая флуоресценция при 335–340 нм (рис. 2).

Таким образом, результаты наших исследований показывают, что рецепторный белок для гидрокортизона печени крысы является высокомолекулярным соединением и фильтруется в составе высокомолекулярных протенидных фракций цитоплазмы. Очевидно, при гормональной индукции гидрокортизон предварительно образует комплекс с белковым рецептором цитоплазмы, локализованным в высокомолекулярной фракции, с дальнейшей реализацией влияния образовавшегося комплекса на хроматин ядра.

Իրևանский государственный университет,  
кафедра биохимии

Получено 23.III 1981 г.

ԱՌՆՆՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԻՆԻ ՑԻՏՈՊԼԱԶՄԱՅԻ ՀԻՎՐՈՎՈՐՏԻԶՈՆԻ ՌԵՑԵՓՈՐՆԱԿԻ ՄԱՍՆԱԿԻ ՄԱՔՐՈՒՄԸ

Ռ. Ռ. ԿԱԶԱՐԻԱՆ, Ա. Ս. ՊՈԳՈՍԻԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԻԱՆ

Կատարված է բրոմատինի ֆլուորեսցենտային անալիզ՝ ստացված հորիզոնների ուղեհատրոպիայից սարբեր սեֆադեքսներով (Շ-50, Շ-200) Նև-ֆիլտրացիայի ենթարկված ջրաուլտրալամայի սպիտակուցային ֆրակցիաների նկատմամբ է տրված, որ հորմոնային ինդուկցիայի մասնակց հիդրոկորտիզոնը նախապես կոմպլեքս է կազմում ջրաուլտրալամայի սպիտակուցային բարձրագույն (լոկալիզացված սպիտակուցների բարձր մոլեկուլային ֆրակցիայում) հորմոն-սպիտակուց կոմպլեքսի ադդեցտիվյան հետագա սեպարացիայով կոմպլեքսին բրոմատինի վրա:

PARTIAL CLEANING OF RECEPTOR HYDROCORTIZONE PROTEIN OF RAT LIVER CYTOPLASM

R. R. KAZARIAN, A. S. POGHOSSIAN, M. A. DAVTIAN

Fluorescent analysis of chromatin, received during reconstruction of nuclei with protein fractions of cytozole after gelfiltration of the latter on different sephadexes (C-50, C-200) has been carried out. It is shown that in hormone induction hydrocortizone preliminarily complies the complex with protein receptor of cytoplasm (localized in high molecular protein fraction) with further realization of the influence of the hormone-protein complex or chromatin of nucleus.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Լավյան Ա. Ա., Կազարյան Ք. Ք., Դեմյան Ե. Մ. Բիոլոգ. թ. Արմենի, 32, 1, 1979.
2. Կազարյան Ք. Ք., Դեմյան Ե. Մ., Լավյան Ա. Ա. Բիոլոգ. թ. Արմենի, 32, 12, 1979.
3. Baulieu E. E., Wika C., Milzkom E., Raynan-Gammel C. In: Gene Transcription in Reproductive Tissue., 396. Stockholm, 1972.
4. Scheneider D. C., Hagelboom G. H. J. Biol. Chem., 183, 123, 1950.