Все рассмотренные факторы воздействия—кислая среда, восстановление pH до нейтральных значений, влияние ХП—оцениваются с позиций нарушения билипидного слоя мембран эритроцитов. Однако процесс кислотного гемолиза, несомненно, включает в себя и нарушения белкового компонента мембран, цитоскелета, что также может привести к образованию дефектов в структуре мембран. Роль этих факторов в кислотном гемолизе требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гительзон И. И., Терсков И. А.* Эритрограммы как метод клинического исследования крови. Красноярск, 1959 г.
2. *Микаелян Л. Г., Айвазян С. А., Карапетян А. К.* Биолог. ж. Армении. *39*, 3, 241—243, 1986.
3. *Crandall E. D., Kloche R. A., Forster R. E.* J. Gen. Physiol., *57*, 6, 654—683, 1971.
4. *James A. M.* Chem. Soc. Rew., *8*, 3, 389—418, 1979.
5. *Rand R. P., Burton A. C., Canham P.* Nature, *205*, 4975, 977—978, 1965.
6. *Seeman P.* Pharmacol. Rew., *24*, 4, 583—655, 1972.
7. *Sheetz M. P., Singer S. J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, *71*, 11, 4457—4461, 1974.

Поступило 10.III 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 4, 1988 УДК 612.352.3:547.963

ИЗМЕНЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ «ОСТАТОЧНОЙ» ФРАКЦИИ ХРОМАТИНА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭСТРАДИОЛА

А. Ш. АБРАМЯН, Э. С. ГЕВОРКЯН, П. О. ВАРЛЕВАНЯН, Г. А. ПАНОСЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики

Показано, что «остаточная» фракция белков хроматина, экстрагируемая при обработке 3 М NaCl и 5 М мочевиной, увеличивается после введения животным эстрадиола. Методом плавления выявлена общая стабилизация структуры этой фракции при гормональной активации генома. Вместе с тем показано небольшое снижение ее термостабильности при относительно низких температурах плавления. Некоторая дестабилизация структуры может быть непосредственно связана с процессами эстрадиоловой дерепрессии определенных участков генетического аппарата.

Ցույց է տրված, որ քրոմատինի սպիտակուցների «մնացորդային» ֆրակցիան, որ էքստրակցվում է 3 Մ նատրիումի քլորիդի և 5 Մ միզանյութով, բաժակապես աճում է կենդանիներին էստրադիոլ ներարկելուց հետո։ Գենոմի հորմոնալ ակտիվացման ժամանակ հալման մեթոդով նկատվում է «մնացորդային» ֆրակցիայի ընդհանուր կայունացում։ Դրա հետ միևնույն ժամանակ նկատելի է նաև ջերմակայունության որոշ իջեցում հալման համեմատաբար ցածր ջերմաստիճանների կառուցվածքի այս որոշ ապակայունացումը կարող է ոչ անմիջականորեն կապված լինել գենետիկական ապարատի որոշակի հատվածների էստրադիոլային դերեպրեսիայի հետ։

It has been shown that "residual" fraction of protein of chromatin, extracted during the treatment with 3MNaCl and 5 M urea increases in the quantity after the administration of estradiol to animals. By the melting-

---

Сокращения ЛСНБ—лабильно связанные негистоновые белки, ПСНБ—прочно связанные негистоновые белки, ОСНБ—«остаточные» негистоновые белки.

technique the general stabilization of structure of this fraction during the hormonal activation of genome has been shown. At the same time some decrease of thermostability during comparatively low temperatures of melting has been revealed. Some destabilization of structure can be directly connected with the processes of estradiol derepression of definite parts of genetic apparatus.

Плавление хроматина—эстрадиоловая активация генома.

Эстрадиоловая активация генома сопровождается структурной перестройкой хроматина в результате специфического и высокоаффинного связывания стероид-рецепторных комплексов с акцепторными участками ядра. До сих пор окончательно не выяснена природа акцепторных участков. Большое количество работ свидетельствует о наличии в них негистоновых белков хроматина, видимо, обеспечивающих специфичность связывания [3, 10, 12]. При этом в одних работах показан существенный вклад лабильно связанных негистоновых белков во взаимодействии гормон-рецепторных комплексов с хроматином [3, 6], а в других выявлена ведущая роль прочно связанных с ДНК негистоновых белков в этом процессе [7, 9, 12].

Разноречивость данных свидетельствует о сложной зависимости связывания различных стероид-рецепторных комплексов от белкового состава хроматина. По-видимому, при взаимодействии стероидных рецепторов с хроматином необходимо учитывать комплексное влияние различных фракций негистоновых белков.

Ранее нами были выявлены изменения в составе лабильно связанных негистоновых белков хроматина печени петушков при дерепрессирующем геном влиянии эстрадиола [2] и изучена роль этой фракции кислых белков в термостабильности хроматина. В настоящем сообщении приводятся результаты изучения термостабильности «остаточной» фракции хроматина печени петушков при воздействии стероида, представляющей собой комплекс ДНК с прочно связываемыми негистоновыми белками, экстрагируемыми из хроматина при обработке его 3 М NaCl и 5 М мочевиной.

Материал и методика. Исследования проводили на неполовозрелых петушках породы белый леггорн. Эстрадиол-17 β («Sigma», США) вводили внутримышечно в концентрации 20 мг на 1 кг массы тела. Петушков декапитировали через 1 ч после введения гормона. Ядра из клеток печени выделяли как описано Шово и соавт. [5], а хроматин из очищенных ядер — по Уманскому и соавт. [11]. Чистоту полученных препаратов проверяли путем измерения их оптических параметров при разных длинах волн и определения соотношения основных компонентов хроматина (при этом средние значения соотношений равнялись: белок/ДНК=1,57—1,60, а гистон/ДНК = 0,85—1,00). Белок определяли по Лоури и соавт. [8], ДНК — по Бартону [4].

Фракционирование негистоновых белков проводили по методу Ванга [12]. Хроматин промывали дважды 0,35 М NaCl в 10 мМ трис-HCl буфере (pH 8,2) в течение 20 мин и центрифугировали при 20 000 G 20 мин. Надосадочную жидкость, содержащую лабильно связанные негистоновые белки, удаляли, осадок растворяли в 10 мМ трис-HCl буфере (pH 8,2), содержащем 2 М NaCl, 5 М мочевину, размешивали в течение 6 ч и центрифугировали при 105000 G 2 ч. Надосадочную жидкость, содержащую прочно связанные негистоновые белки, диализовали против 13-кратного объема дистиллированной воды, осаждая ДНК-гистоновый комплекс. Осадок, полученный после ультрацентрифугирования, растворяли в 10 мМ трис-HCl буфере (pH 8,2), содержащем 3 М NaCl и 5 М мочевину, центрифугировали при 105000 G 2 ч. Надосадочная жидкость содержала «остаточную» фракцию белков.

Плавление ДНК, хроматина и его «остаточной» фракции проводили на спектрофотометре «Unicam SP-8-100» в трис-HCl буфере (pH 7.0), при $\lambda = 260$ нм [1]. Перед плавлением препараты ставили на диализ в течение 24 ч против буфера, в котором их плавили. Нагрев осуществляли с помощью температурного программатора с линейной скоростью нарастания 0,5 град/мин. Поглощение регистрировали на программируемом калькуляторе «HP 975 1/0». Точность определения температуры составляла ± 0.05°, оптической плотности ±5·10⁻⁴ ОЕ. Кривые плавления каждого образца снимали 5—6 раз. Использовали 10-миллиметровые кюветы с плотно притертыми пробками. Измерения проводили в интервале температур от 40 до 100°.

Результаты и обсуждение. Фракционирование негистоновых белков хроматина удобно проводить последовательной экстракцией белков растворами с различной концентрацией хлористого натрия и мочевины. Этим методическим подходом были выделены три фракции негистоновых белков хроматина печени петушков: лабильно связанные белки, прочно связанные белки и так называемые «остаточные» негистоновые белки, экстрагируемые только при обработке препаратов 3 М NaCl и и 5 М мочевиной. Показано, что при таком фракционировании примерно 70% общих негистоновых белков хроматина находится во фракции лабильно связанных белков, 20—22% — в составе прочно связанных белков и 5—7% — в составе «остаточной» фракции (табл.). Эстрадио-

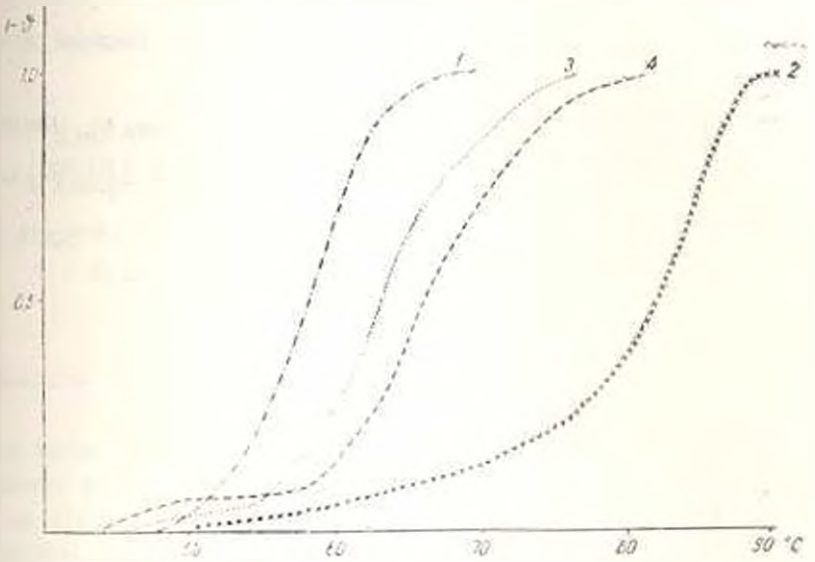
Содержание белка в отдельных фракциях негистоновых белков в контроле и после введения животным эстрадиола-17 β, мг на 1 мг ДНК

Вариант эксперимента	ЛСНБ	ПСНБ	ОСНБ
Контроль	0.245±0.015	0.074±0,004	0.025±0.002
Эстрадиол	0.250±0.010	0.057±0.003	0.045±0.003

ловое воздействие не оказывает существенного влияния на общее содержание лабильно связанных негистоновых белков (табл.), хотя нами ранее были выявлены изменения в составе отдельных фракций этих белков при дальнейшем их фракционировании ионообменной хроматографией и электрофорезом в ПААГ [2]. Заметные изменения обнаруживаются во фракциях прочно связанных и «остаточных» негистоновых белков. При этом количество прочно связанных белков уменьшается на 20% с одновременным повышением содержания негистоновых белков «остаточной» фракции на 50—55% (табл.). Такое существенное перераспределение, по всей вероятности, связано с сильным дерепрессирующим воздействием гормона. Обращает на себя внимание заметное увеличение количества белка в «остаточной» фракции хроматина, интерес к которой обусловлен данными о том, что она обогащена последовательностью ДНК, специфически узнаваемой «остаточными» белками [13]. В связи с этим представляет интерес изучение изменения термостабильности этой фракции в контроле и при активирующем влиянии эстрадиола с целью уточнения возможностя структурных перестроек в ней.

Как видно из рисунка, воздействие эстрадиолом не влияет на плавление препаратов нативного хроматина, в то время как кривая плавле-

ния его «остаточной» фракции смещается в сторону высоких температур. Высокая термостабильность остаточной фракции при воздействии эстрадиола, по-видимому, объясняется повышенным содержанием в ней белка. Вместе с тем на фоне повышения общей термостабильности обращает на себя внимание заметное ее снижение при относительно низких температурах плавления, затрагивающее 7—8% плавящегося комплекса в области АТ-богатых участков ДНК (рис.). Следовательно,



Кривые плавления: 1 свободной ДНК, 2 хроматина, 3 «остаточной» фракции хроматина в контроле, 4 «остаточной» фракции хроматина при воздействии эстрадиола. На оси абсцисс—температура, на оси ординат—доля расплавленности ДНК

введение гормона приводит к увеличению некоторой роли легкоплавких участков, соответствующих сайтам связывания «остаточных» негистоновых белков с АТ-богатыми участками.

Полученные результаты свидетельствуют о структурных перестройках в «остаточной» фракции хроматина при дерепрессирующем геном влиянии эстрадиола в клетках печени петушков. Гормональная активация генома сопровождается общей стабилизацией структуры «остаточной» фракции хроматина, по-видимому, являющейся результатом заметного перераспределения прочно связанных с ДНК негистоновых белков в хроматине. Некоторая дестабилизация структуры может быть непосредственно связана с процессами специфической дерепрессии определенных участков генетического аппарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Вардеванян П. О., Тирацуян С. Г., Вардапетян Р. Р., Паносян Г. А.* Физиология растений, *1*, 58, 1983.
2. *Геворкян Э. С., Абрамян А. Ш., Матиня» К. С., Паносян Г. А.* Вопросы мед. химии, *31*, 5, 107, 1985.
3. *Лукша Г. Л., Романов Г. А.* Биологические науки, *4*, 22, 1984.

4. *Burton K.* Biochem. J., *62*, 315, 1956.
5. *Chauveau J., Moule Y., Rouiller C.* Exp. Cell Res., *11*, 317, 1956.
6. *Hiremath S. T., Maciewicz R. Y., Wang T. Y.* Biochim. Biophys. Acta, *653*, 1
1981.
7. *Klyzsejko—Stefanowicz L., Chiu J. F., Tsai Y. H., Hnilica L. S.* Proc. Natl. Aca
Sci USA, 73, 1954, 1976.
8. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al.* J. Biol. Chem., *193*, 265, 19
9. *Nyberg L. M., Wang T. Y.* J. Steroid Biochem., *7*, 267, 1976.
10. *Thrall C. L., Webster R. A., Spelsberg T. C.* In: The Cell Nucleus. N. Y., *6*, 4
1978.
11. *Umansky S. R., Kovalev V. I., Tokarskaya V. I.* Biochim. Biophys. Acta, *3*
242, 1975.
12. *Wang T. Y.* Biochim. Biophys. Acta, *518*, 61, 1978.
13. *Wang T. Y., Chiu J. F., Klyzsejko-Stefanowicz L., Fujitani H., Hnilica L.*
J. Biol. Chem., *251*, 1471, 1976.

Поступило 18.V 1987