

ИЗМЕНЕНИЕ СТАТУСА БЕЛКОВ ХРОМАТИНА ПЕЧЕНИ ПЕТУШКОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭСТРАДИОЛА

А. Ш. АБРАМЯН, А. С. КАЛАЧЯН, Н. А. САРВАЗЯН, К. А. ШАГИНЯН*,
Т. И. АКОПЯН, А. А. АРУТЮНЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР,
*Институт ботаники АН АрмССР

Проведена количественная оценка статуса белков в хроматине с помощью новых физико-химических характеристик, полученных методом двухкоординатной экстракции, в норме и при гормональном воздействии. Кроме изменения общего сродства к хроматину, для некоторых белков обнаружены специфические сдвиги, что указывает на изменение типа взаимодействия этих белков со структурой при гормональном воздействии.

Երկհարկանոցի լուծուցումի մեթոդի շնորհիվ ստացվող ֆիզիկա-քիմիական նոր ցուցանիշների օգտագործման հետևանքով է քրոմատինի սպիտակուցների իրազեկմանը երբեքում և հորմոնայ ազդեցության ներքո: Բացի իրազեկմանը ընդհանուր ֆորմալից, սպիտակուցների համար հայտնաբերվել են բնորոշ շեղումներ, որոնք արտացոլում են հորմոնայ ազդեցության շնորհիվ կառուցվածքի ներսյա սպիտակուցների ֆորմալիցիցիոնի փոփոխումները:

New physico-chemical characteristics provided by two-coordinate extraction method the chromatin proteins status quantitation under the hormonal influence is carried out. Among the nature changes for some proteins the specific status shifts were observed, caused by the interaction type conversions of these proteins within the structure during hormonal action.

Белки хроматина печени петушков — эстрадиол — новый полимеханизм — двухкоординатная экстракция.

Гормональная индукция синтеза белков является удобной моделью для исследования механизма активации генома, структурных перестроек в хроматине, сопровождающихся функциональными изменениями в целом. В этом плане весьма популярны представления о том, что при модификациях экранируются заряженные или функционально важные группы на белках, что приводит либо к ослаблению взаимодействий типа белок—ДНК, в результате чего разрыхляется структура хроматина и увеличивается степень экспонированности ДНК, либо к внутримолекулярным конформационным перестройкам самих белков с приблизительно аналогичным морфологическим эффектом на уровне хроматина. Исследования в этой области постепенно конкретизируют функциональную роль тех или иных белков хроматина при транскрипции, обеспечивая различные конформационные состояния хроматина и других процессов, наблюдаемых, в частности, при гормональных воздействиях. Нам представляется, что дальнейший успех при изучении хроматина во многом будет определяться преодолением методических трудностей. В настоящее время четко установлены два главных подхода при изучении хроматина. Первый из них — с помощью физико-химических мето-

дов (оптические, калориметрические, рентгеноструктурный анализ) в качестве конечного объекта исследования рассматривает хроматин. Полученные при этом результаты проясняют вопросы, связанные с физико-химическими особенностями строения хроматина, как целой структуры. Второй подход основан на детальном изучении свойств конкретных белков хроматина с помощью биохимических методов и тестов. Он более информативен для выяснения роли того или иного белка в целостной структуре хроматина. В этом плане, на наш взгляд, очень ценной является информация, характеризующая статус белков в составе хроматина. Она в принципе представляется исследователям при изучении экстрагируемости белков хроматина различными хаотропными агентами. Так, например, хорошо известно, что под воздействием растворов с повышающейся ионной силой (0—2 М NaCl) или мочевины (0—5 М) из хроматина постепенно высвобождается до 80% негистоновых белков и гистоны [6, 7]. С другой стороны, лишь по одному параметру—экстрагируемости белка при дискретных значениях концентрации экстрагирующего агента—очень трудно получить однозначные и интерпретируемые результаты на таком сложном объекте, каковым является хроматин. Поэтому в настоящей работе мы задались целью изучить статус некоторых белков хроматина печени петушков в норме и при гормональном воздействии с использованием метода двухкоординатной экстракции белков [2]. Мы ожидаем, что такой подход позволит нам с качественно новой позиции описать изменения статуса белков в двух различных функциональных состояниях хроматина.

Материал и методика. Цеполовозрелым петушкам породы «белый лотторн» вводили эстрадиол-17 β («Sigma» США), внутримышечно в концентрации 20 мг на 1 кг массы тела. Петушков декалцитировали через 24 ч после введения гормона. Хроматин из клеток печени выделяли по методу Цанева [9]. Ткань гомогенизировали в растворе, содержащем 0,075 М NaCl, 0,025 М ЭДТА, при pH 8 (раствор А). Гомогенат отфильтровывали через 2-слойную марлю, после чего инкубировали при 4° в течение 15 мин в указанном растворе, содержащем дополнительно 0,2% Nonidet P-40 (Shell Chemicals, S. K. Limited), затем центрифугировали при n и $600 \times g$, 5 минут. Процедуру повторяли дважды. Полученный описанным методом ядерный осадок гомогенизировали в растворе А с последующим центрифугированием ($600 \times g$, 5 минут), затем промывали в 0,01 М трис-HCl буфере (pH 7,5) с 1 мМ MgCl₂. Экстракцию белков хроматина [3] проводили в отдельных пробах при одновременном изменении двух компонент раствора К 200 мл суспензии хроматина добавляли по 200 мл соответствующих буферов для получения возрастающих концентраций экстрагирующих агентов. Для двухкоординатной экстракции использовали пары таких реагентов, действие которых на нативную структуру хроматина неоднотипно (например, различные комбинации концентраций NaCl и мочевины или NaCl и pH). Все пробы хроматина инкубировали при 0° с непрерывным перемешиванием в течение 1 часа. Надосадочную жидкость, содержащую растворимые белки, отделяли, определяли в ней содержание белка по методу Бридфорда [4]. SDS-электрофорез белков проводили по методу Лаземли [8]. При полимеризации гель химически связывался со стеклянной пластинкой с помощью связывающего агента silan A-174. Наносимый на каждый трек геля образец содержал не более 100 мкг белка. После электрофореза пластинку геля окрашивали в 0,2% ном растворе кусачки G-250, содержащем 40% изопропилового спирта и 10% уксусной кислоты. Далее гель обесцвечивали в 7%-ной уксусной кислоте, высушивали на воздухе, предварительно выдержав в растворе, содержащем 3% глицерина и 70% изопропанола, в течение 5 минут. Сканирование проводили на приборе «Ultascan XI» (I.KB).

Результаты и обсуждение. После сканирования электрофорегрaмм по методике, детально описанной ранее [2], составлялись особые таблицы, условно называемые диаграммой состояния или таблицей-диаграммой. На рис. 1 в качестве примера для описания результатов,

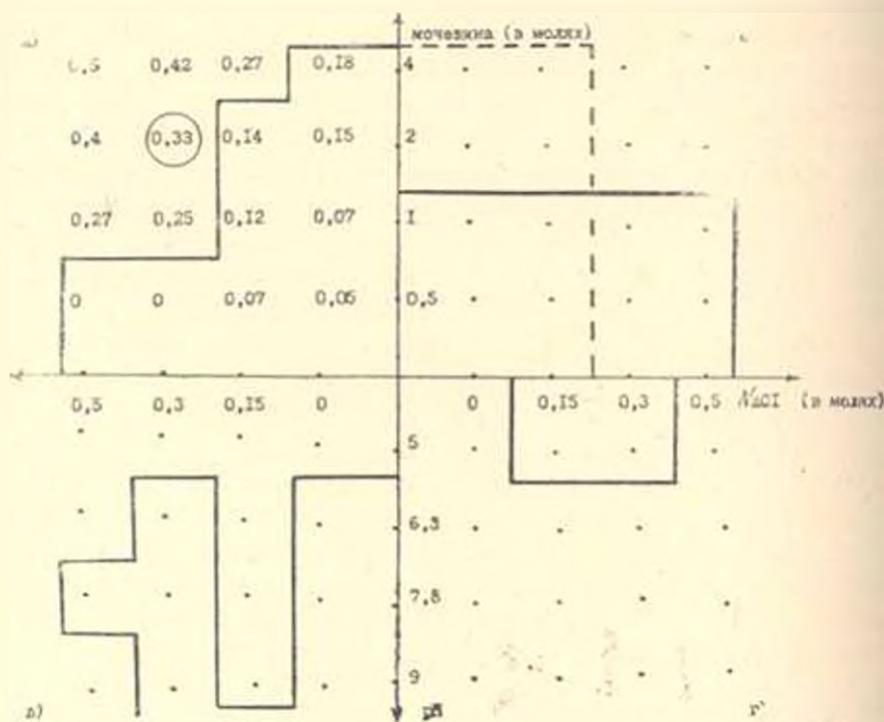


Рис. 1. Рисунок, поясняющий принципы построения диаграмм. На рисунке указаны линии полувыходов белков контрольного хроматина (левая часть—а, в) и хроматина подопытных животных (правая часть—б, г) в двухкоординатной системе экстракции «NaCl-мочевина» (верхняя полуплоскость—а, б) и «NaCl-pH» (нижняя полуплоскость—в, г). Подробные объяснения рисунка см. в тексте.

встречаемых в наших экспериментах, приведены условные данные с характерными линиями полувыходов. По оси абсцисс слева и справа от начала координат отложены значения концентраций NaCl (0, 0,15 М, 0,3 М, 0,5 М), по оси ординат вверх и вниз от начала координат отложены значения концентраций мочевины (0,5 М, 1 М, 2 М, 4 М) и pH среды (5, 6,3, 7,8, 9) соответственно. В итоге, в верхней полуплоскости рис. 1 приведены диаграммы в «координатах NaCl-мочевина», в нижней полуплоскости—диаграммы в «координатах NaCl-pH». Слева от оси ординат приведены диаграммы выхода белка хроматина контрольными животными, справа—диаграммы выхода белка подопытных животных.

Каждая диаграмма составляется из 16 точек. Приведенные на диаграмме числовые значения представляют собой высоты пиков белка № 12 на электрофорегрaмме в соответствующих экстрагируемых точках. В качестве примера на рис. 1 число, обозначенное кружком, является экспериментальной точкой и показывает высоту пика белковой полосы № 12, экстрагируемой из структуры хроматина в среде, со-

держашей 0,3 М NaCl, 2 М мочевины. Высота пика данной полосы пропорциональна количеству белковой фракции № 12, солюбилизированной при указанных экстрагирующих условиях. Так называемые линии полувыходов, представленные на диаграмме, проведены через точки 50%-ного выхода белка из структуры и разграничивают области связанного и свободного состояния белковой фракции. Поскольку линия полувыхода отражает переход белка из связанного состояния в свободное, то по диаграмме и форме кривой можно, в принципе, оценить характер тех или иных сил, осуществляющих комплексобразование. Очевидно, что белки, имеющие однотипные линии полувыходов, должны иметь схожий тип взаимодействия со структурой. Описанным способом были построены диаграммы для большинства обнаруженных на электрофограмме белков. Количество идентифицированных полос составляло около 32. На общей форме линий полувыхода диаграммы изучаемых белков можно систематизировать следующим образом:

1. Диаграммы «простой» формы линии полувыхода белковых фракций (рис. 1 б). В этом случае выход белка зависит только от концентрации одного из ингредиентов, другой—слабо влияет на его стабильность. Линия полувыхода горизонтальная или вертикальная.

2. Диаграммы «диагональной» формы линии полувыхода белковых фракций (рис. 1 а). Такой тип экстракции белков является наиболее распространенным в обеих координатных диаграммах. Эта форма линии свидетельствует о том, что в составе структуры белок стабилизирован как ионными, так и гидрофобными взаимодействиями, включая также механизм стабилизации структур более высокого порядка, поскольку выход белков из состава структуры зависит от обеих переменных в системах NaCl—рН и NaCl—мочевина. Сочетание более высоких значений концентраций соли, мочевины и рН среды понижает порог выхода белка в раствор.

3. Диаграммы «сложной» формы линии полувыхода белковых фракций (рис. 1 в). Наблюдаются у группы белков, обнаруживающих резкую дискретность выхода вдоль какой-либо из осей диаграммы. Чаще всего этот эффект обусловлен стабилизирующим воздействием физиологических значений ионной силы и рН среды.

4. Диаграммы «островковой» формы линии полувыхода белковых фракций (рис. 1 г). Такой выход обусловлен тем, что белок стабилен в составе исходной структуры только в условиях какого-то определенного сочетания условий экстрагирующей среды.

С другой стороны, по характеру связывания со структурой хроматиновые белки в экстрагирующей паре NaCl—мочевина можно сгруппировать следующим образом (рис. 2, 3):

1. «NaCl-мочевиназависимые» белки—№№ 4, 6, 7, 10, 11, 12. Мочевина без соли практически не нарушает связь белка со структурой, но в сочетании с солью она усиливает эффект высвобождения. Форма линии полувыхода этих белков «диагональная». Белковая полоса № 4 единственная в данной группе, которая имеет сложный характер выхода. Белок устойчив при физиологической ионной силе (0,15 М NaCl) неза-

висимо от концентрации мочевины. При уменьшении или увеличении ионной силы он становится «мочевинозависимым».

2. «Мочевина—NaCl зависимые» белки—№№ 1, 3, 5, 8, 9, 13, 14, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32. В бессолевом растворе группа этих белков высвобождается при концентрации мочевины 2—4 М, но введение в экстрагирующую среду 0,15—0,3 М NaCl приводит к понижению порога требуемой концентрации мочевины. Форма линии полувыхода данной группы белков также «диагональная».

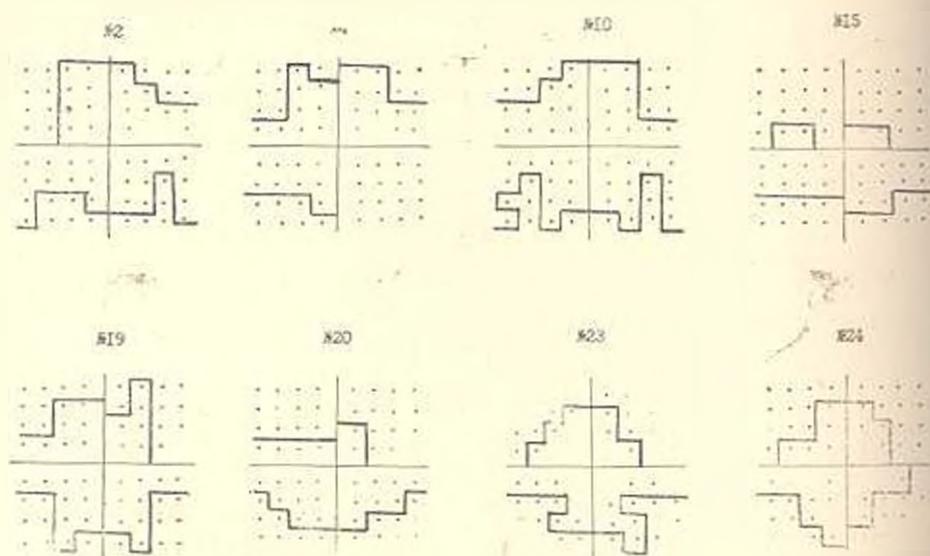


Рис. 2. Линии полувыходов белков хроматина печени петухов в норме (а, в) и при гормональном воздействии (б, г) в двухкоординатной системе экстракции «NaCl-мочевина» и «NaCl-pH» (условия указаны на рис. 1). Каждая из приведенных конкретных диаграмм является наиболее характерной для белковых групп, описанных в тексте (номера приведенных на рис. 2 белков в тексте набраны курсивом).

3. «Мочевинозависимые» белки. В эксперименте обнаружен один такой белок—№ 20, выход которого зависит только от концентрации мочевины. Повышение ионной силы не влияет на его связь со структурой хроматина, а 1 М мочевины уже способствует 50%-ному выходу белка из комплекса. Эти данные свидетельствуют о том, что лишь нарушение внутримолекулярных водородных связей в белке обеспечивает его переход из связанного с хроматином состояния в диссоциированное. Форма линии полувыхода этого белка «простая».

4. «NaCl-зависимые» белки. В эксперименте обнаружен только один представитель этой группы—№ 2. Связь этого белка со структурой обусловлена исключительно ионными взаимодействиями, поскольку при ионной силе выше 0,15 М NaCl происходит высвобождение белка из структуры независимо от присутствия мочевины. Форма линии полувыхода белков этой группы «простая».

5. В отдельную группу нами выделены белки №№ 15, 16, обнаруживающие «островковую» форму линии полувыхода. Они стабильны в

структуре хроматина в среде, содержащей 0,15, 0,5 М NaCl и 0,5 М мочевины.

В координатах NaCl—pH хроматиновые белки можно сгруппировать следующим образом:

1. «pH-зависимые» белки—№№ 15, 16, 26. Выход этих белков обнаруживается при нейтральных и щелочных pH независимо от ионной силы раствора. Линия полувыхода белков данной группы имеет горизонтальную форму.

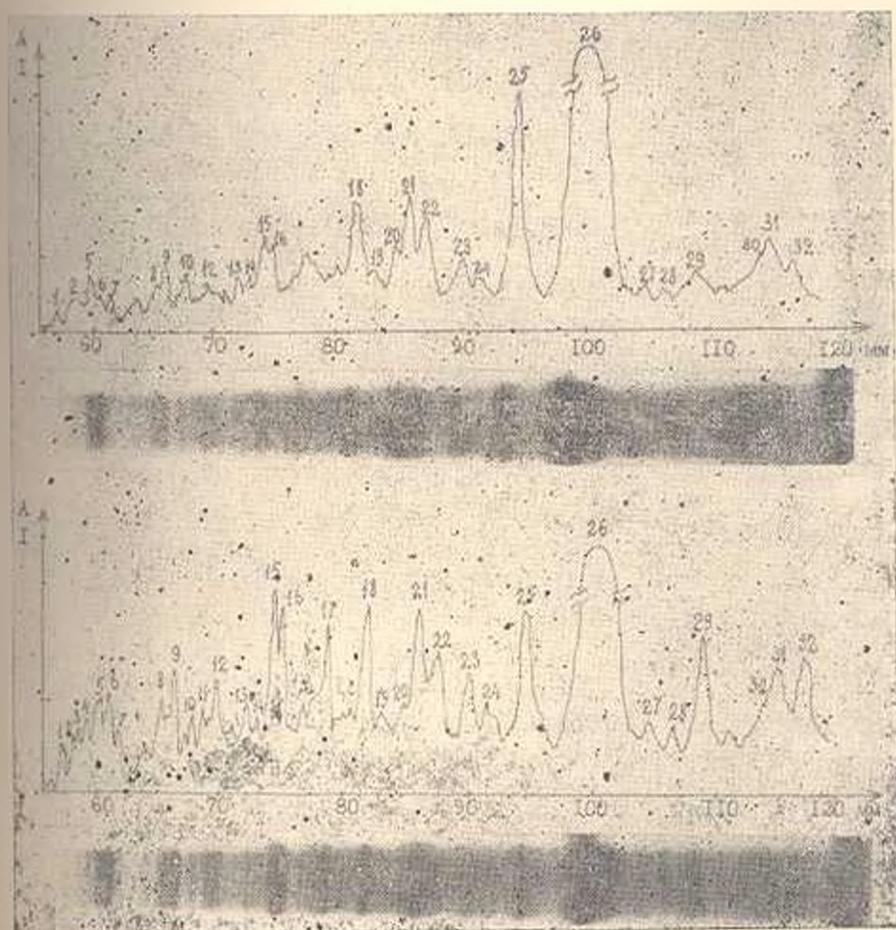


Рис. 3а. Из 64 трекв, анализированных в работе, в качестве примера на рисунке представлены электрофореграммы контрольных (К) и опытных (О) трекв в точке экстракции 0,3 М NaCl—pH 7,8 системы координат «NaCl—pH». Рисунки электрофореграмм остальных трекв не приводятся. Более детально аналогичные рисунки рассмотрены в работе [3]. Деинтеграммы контрольных (К) и опытных (О) трекв в точке экстракции 0,3 М NaCl—pH 7,8. Пронумерованы белки, поведение которых при экстракциях обсуждается в работе.

2. «NaCl—pH-сложнозависимые» белки—№№ 7, 9, 10, 11, 12, 19. Эта группа белков остается в структуре хроматина при определенной ионной силе независимо от pH. Уменьшение или увеличение ионной силы приводит к резкому изменению состояния белка. Так, например, во всех ис-

следующих областях рН белки №№ 10, 11, 19 стабильны при физиологической ионной силе, а белки №№ 7, 9, 12 и при 0,5 М NaCl. Причем в большинстве случаев переход этих белков из связанного состояния в диссоциированное происходит при щелочных рН в условиях отсутствия соли, а при повышении концентрации соли выше указанных значений устойчивость наблюдается лишь в кислой среде. Форма линии полувыхода белков данной группы «сложная».

3. «рН-NaCl зависимые» белки—а) №№ 4, 5, 6, 8, 17, 20, 22, 25. Эта группа белков не стабильна в структуре хроматина при рН 9. Ионная сила существенно влияет на солюбилизацию белка. С повышением концентрации NaCl выход белка увеличивается, б) №№ 18, 21, 24, 28, 30. При отсутствии соли эти белки стабильны в структуре в областях рН 5—9. По мере повышения концентрации соль экстрагирует данную группу белков. Форма линии полувыхода белков этой группы «диагональная».

4. «рН-NaCl сложнoзависимые» белки—№№ 13, 14, 23, 27, 31. Характерным для этой группы является то, что при определенных рН наблюдается эффект стабилизации или дестабилизации белка в структуре хроматина, что объясняется изменением суммарного поверхностного заряда белка, вызванного конформационным изменением его структуры. Ассоциированное состояние белка при данном значении рН и физиологической ионной силе говорит о том, что в этих условиях его конформация близка к нативной.

Анализ общих закономерностей выхода белков в обеих двухкоординатных диаграммах свидетельствует о том, что у ряда белков наблюдается агрегация со структурой при высоких значениях концентрации соли (уменьшение выхода в раствор при высоких концентрациях ионных сил). Это явление скорее всего связано с эффектом высаливания белка уже после выхода из состава хроматина.

Известно, что при гормональном воздействии структура хроматина претерпевает существенные перестройки, которые приводят к изменению характера связывания белков с общей структурой [1, 5]. С помощью метода двухкоординатной экстракции анализировались образцы хроматина, подвергнутые гормональной индукции. Наши данные свидетельствуют о том, что по характеру изменения связи со структурой хроматина белки можно разделить на три принципиальные группы: 1. гормон-независимые—практически не изменяющие характер выхода; 2. гормон-слабозависимые—обнаруживающие незначительные изменения характера выхода; 3. гормон-зависимые—проявляющие значительные сдвиги в характере выхода.

Введение гормона приводит к двум противоположным эффектам. Одна группа белков становится более лабильной в своих связях с хроматином, другая же проявляет большую стабильность, и для ее выхода в растворимую фракцию необходимы более высокие концентрации солюбилизующих агентов, чем в контрольных препаратах. Здесь налицо одновременно противоположные эффекты—«разрыхление» и «конденсация» структуры хроматина под действием гормона. Лабильная

группа включает фракции №№ 10, 11, 12, 19, 20, 27, 28, 30 (координаты NaCl-мочевина) и №№ 9, 21, 24, 27, 28 (координаты NaCl-pH), в стабильную группу входят белки №№ 1, 3, 4, 13, 18, 21, 22, 25, 31 в системе NaCl-мочевина и белки №№ 5, 6, 8, 14, 15, 16, 29, 30 в системе NaCl-pH. При гормональном воздействии обнаруживается, что белки №№ 1, 3, 8, 14, 18, 19, 21, 22, 25, 31 слабее эстрагируются мочевиной из структуры хроматина в условиях отсутствия соли или при низких ее концентрациях, а для группы белков №№ 8, 13, 14, 18, 19, 20, 22 при повышении порога концентрации мочевины, необходимой для их выхода из структуры, порог концентрации соли уменьшается. «Разрыхление» структуры хроматина в зависимости от концентрации соли наблюдается у белков №№ 8, 9, 13, 14, 18, 19, 20, 22, 24, 28, 29 в координатах NaCl-мочевина и у белков №№ 21, 24, 27, 28, 29 в координатах NaCl-pH. Поскольку у ряда белков, полученных с гормон-обработанного хроматина, обнаруживается «чувствительность» выхода при физиологической ионной силе, можно заключить, что данное проявление обусловлено «чувствительностью» самого гормон-обработанного хроматина к физиологическим значениям ионной силы. Так, например, у белков №№ 8, 14, 19 наблюдается стабилизирующий эффект 0,15 М NaCl как в координатах NaCl-мочевина, так и NaCl-pH. Тот же эффект имеет место у белков №№ 8, 14, 23 в координатах NaCl-pH.

Кроме изменения общего сродства белков к хроматину заметны также специфические изменения характера выхода или формы линий полувыходов некоторых белков, что указывает на изменение типа взаимодействия этих белков со структурой. В большинстве случаев происходит переход диагональной формы линии полувыхода в сложную. Рассмотрим эти переходы на характерном примере—белковой фракции №19 (координаты NaCl-мочевина). Если в контрольных препаратах выход этого белка из связанного состояния в диссоциированное зависит от обеих переменных (концентраций NaCl, мочевины), причем повышение концентрации соли до 0,3 М снижает требуемый для выхода белка порог концентрации мочевины, то после гормонального воздействия белок при физиологической ионной силе остается стабильным в структуре при всех используемых в опыте концентрациях мочевины.

В эксперименте выявляются также белковые фракции, которые при гормональной индукции в спектре белков хроматина отсутствуют (полосы №№ 7, 17, 32 в координатах NaCl-мочевина, и полосы №№ 3, 4, 11, 17 в координатах NaCl-pH).

Таким образом, описанные выше результаты свидетельствуют о том, что с помощью двухкоординатной экстракции можно количественно описать сдвиги в сродстве белков хроматина, вызванные гормональным воздействием. Помимо обнаруженного факта, что эстрадиол вызывает разнонаправленные сдвиги в хроматине (по-видимому, осуществляемые в разных локусах), мы ожидаем, что указанным методом нам удастся оценить вклад сопутствующей гормональную индукцию фосфорилирования в сдвиги сродства белков к хроматину.

ЛИТЕРАТУРА

1. Геворкян Э. С., Абрамян А. Ш., Матинян К. С., Паносян Г. А. *Вопр. мед. химии*, 31, 5, 107—110, 1985.
2. Мнацаканян Г. А., Казачян А. С., Шагинян К. А., Акопян Т. Н., Арутюнян А. А. *Биолог. ж. Армении*, 42, 6, 538—546, 1989.
3. Сарвазян Н. А., Абрамян А. Ш., Шагинян К. А., Акопян Т. Н., Арутюнян А. А. *Биолог. ж. Армении*, 43, 8, 1990.
4. Bradford M. E. *Anal. Biochem.*, 33, 248—254, 1976.
5. Burch H. *Cell*, 33, 65—76, 1983.
6. Chin J. F., Wing R., Fujitani H., Hailica C. S. *Biochemistry*, 14, 2), 4552—455, 1975.
7. Goodwin G. H., Nichols R. H., Johns E. W. *Biochem. Biophys. acta*, 405, 1, 280—291, 1973.
8. Laemmli U. K., *Nature*, 227, 680—685, 1970.
9. Tsanev R. *Eur. Jour. Bioch.*, 43, 257—263, 1974.

Поступило 12.II 1990 г

Биолог. журн. Армении, № 10—11, (43), 1990

УДК 612.823

ПРОЕКЦИЯ ТЕМЕННОЙ КОРЫ В ЗРИТЕЛЬНУЮ

Н. М. ИПЕКЧЯН

Институт физиологии им. Л. А. Орбели АН Армении, Ереван

Показано, что поле 7, в отличие от поля 5, проецируется в зрительную кору. Ассоциативные волокна поля 7 оканчиваются в части латеральной извилины, расположенной над латеральной бороздой. Место окончания этих волокон соответствует полям 19 и 18 зрительной коры.

Ցույց է տրվել, որ 7-րդ դաշտը, ի տարբերություն 5-րդի, պրոյեկցվում է տեսողական կեղևում: 7-րդ դաշտից սկզբող նյարդաթելերը վերջանում են լատերալ գալտրի այն մասում, որը հարկում է լատերալ սկզբին Այն համապատասխանում է 19, 18 տեսողական դաշտերին:

It has been shown that area 7 of the parietal cortex, in difference from area 5, is projected in the visual cortex. Area 7 associative fibers terminate in the part of the lateral gyrus localized near under the lateral sulcus, corresponding to areas 19, 18.

Теменная кора—ассоциативные связи—зрительная кора.

Согласно литературным данным, теменная кора принимает участие в функции зрительного анализатора. В частности, показаны зрительные расстройства, изменения зрительных условных рефлексов, дефицит зрительного внимания и зрительного поведения при разрушении поля 7 у животных [1, 4, 8] и у человека [19]. Полю 7 отводится командная функция в отношении зрительного поведения [15]. Указанные литературные данные послужили основанием для изучения морфологического субстрата связей теменной и зрительной коры. Следует отметить многочисленность и противоречивость морфологических исследований, касающихся связей указанных отделов коры мозга [5, 11, 14, 20]. Задачей настоящего исследования явилось определение топографического