

УДК 547.963.3

БИОХИМИЯ

Р. А. Захарян, Р. Г. Погосян

Индукция глюкокортикоидами деградации ДНК хроматина лимфоцитов в регулярно повторяющиеся участки, *in vivo*

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 3/IV 1978)

На основе ряда исследований сформулирована модель повторяющейся субъединичной структуры хроматина, нуклеосомы, которая включает участки по 130—170 нуклеотидных пар, упакованных октамерной единицей четырех основных типов гистонов H2A, H2B, H3, H4 и разделенных сегментами в 30—60 нуклеотидных пар (¹⁻³).

Микрококковая нуклеаза, в частности, переваривает ДНК в составе хроматина эукариотов на 90%, высвобождая хроматиновую субъединицу—нуклеосому. При длительном переваривании нуклеазой выявлен относительно стабильный фрагмент в 140 пар оснований (^{1,4}).

Избирательная фрагментация хроматина в ядрах печени эндогенной Ca^{++} , Mg^{++} зависимой эндонуклеазой продемонстрирована в ряде исследований, в том числе показано, что при 16 часовой культивации печеночных клеток эмбриона мышей *in vitro* наступает фрагментация ядерной ДНК в регулярных участках-повторах (⁵⁻⁷).

Недавно показано, что в клетках лимфоидной ткани мышей при облучении в дозе 600R ДНК деградирует на регулярные фрагменты, аналогично действию микрококковой нуклеазы, то есть преимущественно по спейсерным участкам хроматина (⁸). Авторы предполагают энзиматическую природу пострадиационного повреждения хроматина.

Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что клетки печени обладают ферментной системой избирательно фрагментирующей ДНК хроматина, а в клетках лимфоидной ткани постулирована подобная активность. Однако механизм специфической физиологической активации данной ферментативной системы пока неизвестен.

В данном сообщении впервые описан феномен активации глюкокортикоидом избирательно в лимфоидной ткани эндонуклеазной системы, фрагментирующей ДНК по спейсерным участкам хроматина.

В опытах использованы беспородные крысы весом 150—180 г. Животные в одной серии получали кортикостерон в дозе 100 γ /мл или дексаметазон в дозе 20—600 γ /мл и были забиты через 6 часов. В другой серии опытов животные были облучены в дозе 600 R и забиты через 4 часа. В исследованиях использованы тимус, селезенка и печень. Ядра из тканей были изолированы гомогенизацией в 0,25M сахарозе, 5 mM CaCl_2 , 5 mM трис-HCl, pH 7,2 и последующим осаждением центрифугированием при $600 \times g$ 10^1 при 2°C.

Ядра, изолированные из тканей интактных животных, суспензировали в растворе 0,25 M сахарозы, 1 mM CaCl_2 , 5 mM трис-HCl, pH—7,4, обрабатывали микрококковой нуклеазой при концентрации около 1,5 мг ДНК/мл в течение 5' при 37°C.

Ядра, изолированные из тканей интактных и опытных животных, равно как и обработанные микрококковой нуклеазой, были лизированы 0,2 mM ЭДТА, pH—7,0.

Лизат несколько раз замораживали и оттаивали, центрифугировали при $4000 \times g$ 5'. Супернатант, в который добавляли SDS и NaCl, до конечной концентрации 1% и 1 M соответственно, депротеинизировали хлороформ-изоамиловым спиртом 24 : 1; из надосадка ДНК осаждали этанолом и перед электрофорезом растворяли в буфере с SDS 1%; 260/280 выделенных препаратов ДНК составляло 2,0—2,1.

Электрофоретическое разделение ДНК осуществляли в 0,6%-ном агарозном геле и в 4%-ном полиакриламидном геле (ПАГ) в аппаратах фирмы «Reanal» при силе тока 5 мА на трубку. Гели обрабатывали бромистым этидием, фрагменты ДНК выявляли на ультрамикроскопе.

При инкубации изолированных ядер из клеток тимуса, селезенки при $t=10^\circ\text{C}$ в течение 2—3 часов происходит деградация хромосомальной ДНК на ряд гомогенных по молекулярному весу высокомолекулярных фрагментов, сепарируемых электрофорезом в геле, рис. 1: слева направо: ДНК, выделенная из ядер клеток тимуса интактных животных в 0,6% агарозном геле; ДНК, выделенная из ядер клеток тимуса интактных животных в 4%-ном полиакриламидном геле; ДНК ядер клеток тимуса после предварительной инкубации в 0,6%-ном агарозном геле. В 4%-ном полиакриламидном геле в изолированных препаратах ДНК низкомолекулярные фракции не обнаруживались. ДНК ядер после предварительной инкубации фракционируется в геле на три гомогенных высокомолекулярных фрагмента.

М. Скалка и соавторы показали, что в ядрах клеток лимфатической ткани мышей, облученных в дозе 600 R, хромосомальная ДНК деградирует на фрагменты, величины молекулярных весов которых относятся друг к другу как члены арифметического ряда, и профиль электрофоретического разделения которых в 4%-ном полиакриламидном геле аналогичен деградации, вызываемой микрококковой нуклеазой.

Авторы рассматривают полученные данные как подтверждение ранее предполагаемой энзиматической природы пострадиационного повреждения хроматина (¹).

Полученный нами результат свидетельствует о наличии и в норме в клетках лимфонной ткани выраженной эндонуклеазной активности, атакующей спейсерные участки в хроматине, возможно аналогично описанной в печени Са, Mg-зависимой эндонуклеазе ядер печени (5-7). Аналогичный профиль электрофоретического разделения характерен и для ДНК, изолированной из клеток селезенки.

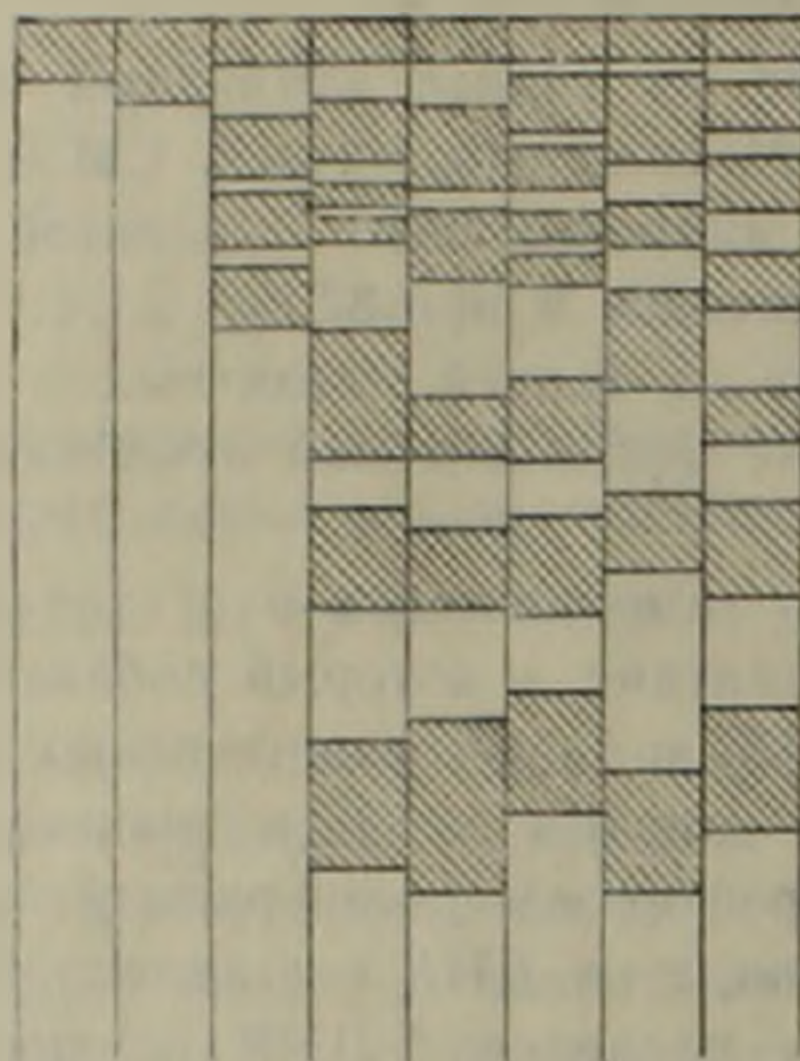


Рис. 1 Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК хроматина лимфоцитов.

слева направо: 1—ДНК тимуса интактных животных в 0,6% агарозном геле; 2—ДНК тимуса интактных животных в 4%-ном ПАГ; 3—ДНК ядер клеток тимуса после предварительной инкубации в 0,6% агарозном геле; 4, 5—ДНК тимуса, селезенки животных, облученных 600 R, в 4%-ном ПАГ; 6, 7—ДНК тимуса, селезенки животных, получавших глюкокортиконд, в 4%-ном ПАГ; 8—ДНК хроматина, обработанная микрококковой нуклеазой, в 4%-ном ПАГ

Результаты по электрофоретическому разделению ДНК, выделенных из ядер клеток тимуса, селезенки и печени животных, облученных в дозе 600R или получавших дексаметазон или кортикостерон показаны на последующих гелях рис. 1. При сопоставлении полученных электрофореграмм видно, что рентгенооблучение вызывает резкое повышение внутриядерной эндонуклеазной активности в ядрах клеток тимуса, селезенки, но не печени, что совпадает с данными, полученными Скалка и др. (8). Аналогично, глюкокортиконд также избирательно

вызывает активацию внутриядерной эндонуклеазной активности в ядрах клеток лимфонной ткани тимуса и селезенки, что сопоставимо с электрофореграммой хроматина, обработанной микрококковой нуклеазой. Полученные фрагменты имеют молекулярные веса кратные молекулярному весу мономера-нуклеосомы, вытекающие из их относительной электрофоретической подвижности рис. 2. Из плазмы крови, после воздействия глюкокортикоидов, методом электрофореза в 2.4%-ном акриламидном геле (⁹) нами сепарированы ДНК с молекулярным весом от $10 \cdot 10^6$ до 10^5 и ниже.

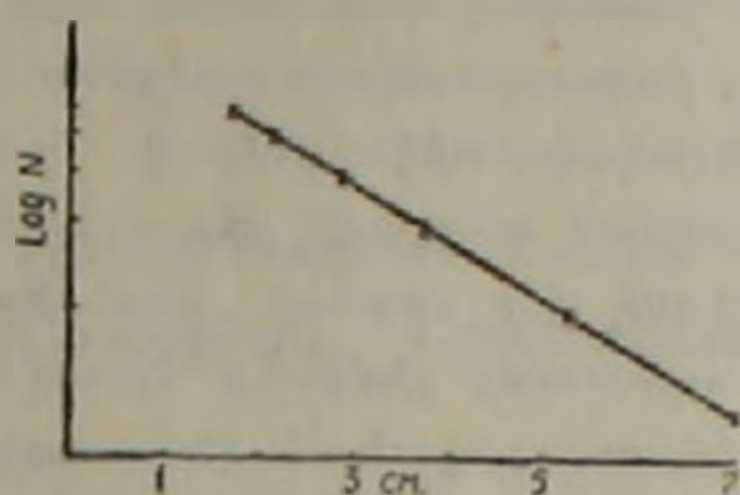


Рис. 2. Графическое изображение кратности молекулярных весов фрагментов ДНК к весу мономера-нуклеосомы согласно их относительной электрофоретической подвижности

Таким образом, впервые описано явление физиологической активации глюкокортикоидами эндонуклеазной активности избирательно в клетках лимфонной ткани, активности фрагментирующей ДНК хроматина по спейсерным участкам. В настоящее время имеется большое число экспериментальных данных относительно стимулирующего влияния гомологичных экзогенных нуклеиновых кислот ДНК и РНК на метаболические процессы организма, в частности, для стимуляции репаративных процессов, иммунологических реакций организма и т. д.

Открытое явление показывает, что в организме существует регулирующая система высвобождения гомологичной ДНК. Источником ее служат клетки лимфонной ткани, а процесс высвобождения регулируется гормонами глюкокортикоидами, суточный ритм которых может обеспечивать цикличность описанного процесса или повышение концентрации которых в крови при стрессе может обеспечить высвобождение фрагментов ДНК из лимфонной ткани, способных оказать физиологический эффект в восстановительных процессах через непосредственно возможную интеграцию на уровне генетического аппарата клетки или путем внегеномной экспрессии (¹⁰).

Գլյուկոկորտիկոիդներով լիմֆոցիտների Լեուկոստմալ ԴՆԹ-ի
 ղեգրադաֆիան կանոնավոր կրկնվող հատվածների

Առաջին անգամ նկարագրված է հորմոնալ գլյուկոկորտիկոիդների նոր
 հատկություն—լիմֆոիդ հյուսվածքների քիչներում էնդոնուկլեալային ալտի-
 վության ընտրողական ալտիվացում, որի շնորհիվ քրոմատինի ԴՆԹ-ն
 ֆրագմենտացիայի է ենթարկվում սպեյսերային հատվածներով, նկարագր-
 ված Լրևույթը ցույց է տալիս, որ օրգանիզմում գոյություն ունի հոմոլոգ
 ԴՆԹ-ի ազատման կանոնավորող համակարգ, որի սկզբնաղբյուրը լիմֆոիդ
 հյուսվածքի քիչներն են, իսկ ազատման պրոցեսը կանոնավորվում է մակե-
 րիկամի հորմոններով՝ գլյուկոկորտիկոիդներով: Նրանց օրեկան ուժեղ կա-
 րող է ապահովել նկարագրված պրոցեսի ցիկլայնությունը, իսկ կոնցենտրա-
 ցիայի բարձրացումը արյան մեջ ստրեսի ժամանակ, կարող է ապահովել
 ԴՆԹ-ի հատվածների ազատումը լիմֆոիդ հյուսվածքից: Այդ հատվածները
 վերականգնման պրոցեսներում ընդունակ են առաջացնելու ֆիզիոլոգիական
 էֆեկտ՝ անմիջական ինտեգրացիայի միջոցով գենետիկական ապարատի մա-
 կարդակի վրա, կամ արտագենոմային էքսպրեսիայի ճանապարհով:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Կ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

- ¹ M. Woll, Nature, 251, 249 (1974). ² R. D. Kornberg, Science, 184, 868 (1974).
³ R. D. Kornberg, X Meel, FEAS, abst. 6, Paris (1975). ⁴ J. D. McGhee, J. D. Engel,
 Nature, 254, 449 (1975). ⁵ D. R. Hewish, L. A. Burgoyne, Biochem. Biophys. Res.
 Commun. 52, 504 (1973). ⁶ Г. Н. Чухуржина, Л. К. Домкина, Н. Гизарева, Н. Л.
 Ашмарин, Мол. биол., 10, № 6 (1976). ⁷ R. Williamson, J. Mol. Biol., 52, 157 (1970).
⁸ M. Skalka, J. Matyasova, M. Ceskova, FEBS Letters, 72, 2, 271 (1976). ⁹ D. H. L.
 Bishop, J. R. Claybrook, S. Spiegelman, J. Mol. Biol., 26, 373 (1967). ¹⁰ А. Н. Шымко,
 И. Н. Шатикина, Укр. биохимический журнал, 49, 2, 42 (1977).