

Г. А. НЕЧАЕВА, Н. Н. ДЕМИН, И. П. АШМАРИН

## ВЛИЯНИЕ ГИСТОНОВ НА ВЫХОД КИСЛОЙ РНКазы ИЗ ЛИЗОСОМ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

(Представлено академиком Е. М. Крепом 22 III 1971)

Во внутриклеточной регуляции активности ферментов должны иметь значение различные эндогенные факторы, изменяющие проницаемость мембран различных клеточных структур для ионов, кофакторов, субстратов и некоторых белков, в частности ферментов. Из таких биоактивных факторов привлекают внимание малоизученные в этом отношении, в особенности в нервной ткани, основные белки — гистоны.

Имеются данные, что гистоны в очень низкой концентрации (0,3—50 мкг/мл) влияют на проницаемость различных клеточных мембран (1-4). Так, богатые аргинином фракции гистонов в десятки раз усиливают проникновение альбумина в клетки (1-3). Активация некоторыми фракциями гистонов окислительного фосфорилирования и АТФазы интактных митохондрий печени, а также дыхания и связывания фосфата спермиями тоже, вероятно, обусловлена влиянием гистонов на свойства и структуру соответствующих мембран (5-7). Известны также данные Мак-Ильвейна с соавторами (8, 9), показавших, что основные белки клеток головного мозга могут мигрировать из клеточных ядер и связываться с анионными группами в мембранах эндоплазматического ретикулума.

В настоящей работе было исследовано влияние препаратов ряда гистонов *in vitro* на проницаемость мембраны полианионных гранул лизосом клеток нервной ткани для содержащейся внутри них кислой РНКазы, которая сама имеет основной характер. Мы полагали, что ввиду небольшого молекулярного веса кислая РНКаза может выходить из лизосом не только после их полного разрушения, но и при достаточном увеличении проницаемости поверхностной мембраны этих гранул. Основные белки сравнительно легко проникают через клеточные мембраны (1).

Опыты проводили на белых крысах линии Вистар весом 180—200 г. Животных обезглавливали в холодной комнате и извлеченный головной мозг гомогенизировали в 0,25 М сахарозе (1:10) с 0,001 М ЭДТА и 0,01 М трис-НСI-буфером с рН 7,4. Гомогенат центрифугировали 10 мин. при 1000 *g* и из надосадочной жидкости центрифугированием при 12000 *g* в течение 20 мин. выделяли грубую митохондриальную фракцию (МФ), вместе с которой осаждались лизосомы. Осадок промывали один раз 0,25 М сахарозой с 0,01 М трис-НСI-буфером (рН 7,4), а затем суспендировали в этой же среде. В выделенном осадке МФ содержалось около 60% кислой РНКазы и такого лизосомного фермента, как кислая фосфатаза, от суммарной активности этих ферментов в гомогенате, поэтому осадок МФ можно рассматривать как фракцию, обогащенную лизосомами.

Активность кислой РНКазы МФ проявлялась лишь после того, как этот фермент становился свободным при действии агентов, разрушающих липопротеидные мембраны (4 М мочевины, 0,1% тритона X-100) (10, 11).

Таблица 1

Влияние гистонов на выход кислой РНКазы из грубой митохондриальной фракции головного мозга крыс (1 мл белка на 1 мл суспензии). Активность РНКазы в надосадочной жидкости инкубированных с гистонами проб выражена в процентах от величины активности ее в надосадочной жидкости контрольных проб (инкубация суспензии МФ без гистонов). Средние из 5—8 опытов

Препарат гистона	Концентрация гистона, $\mu\text{г}/\text{мл}$						
	1	2	5	10	20	100	250
F <sub>1</sub>	115,0 $\pm$ 4,9 $p > 0,95$	137,0 $\pm$ 3,2 $p > 0,99$	163,0 $\pm$ 11,0 $p > 0,99$	175,0 $\pm$ 21,8 $p > 0,95$	259,0 $\pm$ 17,9 $p > 0,99$	301,0 $\pm$ 39,5 $p > 0,99$	373,0 $\pm$ 27,9 $p > 0,99$
F <sub>2a</sub>	122,0 $\pm$ 5,4 $p > 0,98$	139,0 $\pm$ 3,2 $p > 0,99$	187,0 $\pm$ 19,0 $p > 0,99$	189,0 $\pm$ 19,1 $p > 0,99$	286,0 $\pm$ 25,4 $p > 0,99$	412,0 $\pm$ 64,0 $p > 0,99$	509,0 $\pm$ 32,1 $p > 0,99$
F <sub>2b</sub>	98,0 $\pm$ 0,8 $p < 0,7$	99,0 $\pm$ 1,6 $p < 0,7$	124,0 $\pm$ 5,2 $p > 0,98$	142,0 $\pm$ 15,0 $p > 0,95$	186,0 $\pm$ 25,7 $p > 0,95$	218,0 $\pm$ 26,7 $p > 0,98$	224,0 $\pm$ 31,3 $p > 0,98$
F <sub>3</sub>	98,0 $\pm$ 0,4 $p < 0,7$	98,0 $\pm$ 1,0 $p < 0,7$	111,0 $\pm$ 10,4 $p < 0,95$	100,0 $\pm$ 3,1 $p < 0,90$	144,0 $\pm$ 20,2 $p < 0,95$	265,0 $\pm$ 23,6 $p > 0,99$	402,0 $\pm$ 3,4 $p > 0,9$

Постановка опытов по изучению влияния гистонов на проницаемость лизосомной мембраны была следующей. Суспензию свежeweделенной МФ в 0,25 M сахарозе с 0,01 M трис-HCl-буфером при pH 7,4 инкубировали 30 мин. в водяном термостате при 23° с добавлением гистонов и без них (контрольные пробы), в каждом случае по 2 пробы. Затем пробы охлаждали, осадок отделяли центрифугированием при 12000 g в течение 20 мин. В надосадочной жидкости всех проб определяли активность кислой РНКазы в ацетатном буфере при pH 5,8 с полимерной РНК из дрожжей в качестве субстрата, как описано ранее (10). Объем проб составлял 1 мл, конечная концентрация буфера 0,1 мол/л, РНК 0,2%.

Активность РНКазы выражали через  $\Delta E_{260}$  на 1 мг белка МФ. Белки определяли микробиуретановым методом (12). Гистоны выделяли из зубной железы телят методом Джонса (13) (некоторые особенности этих препаратов были описаны ранее (14)).

Так как высокоочищенные препараты гистонов всегда сами обладают некоторой РНКазной активностью (15, 16), в каждом опыте определяли РНКазную активность исследуемых гистонов в соответствующей концентрации при pH 5,8 и полученную величину вычитали из величины РНКазной активности кислой РНКазы, определяемой в надосадочной фракции опытных проб. Суммарную активность РНКазы в осадке и суспензии МФ определяли с 0,1% триптоном X-100.

При инкубации суспензии МФ (1 мг в 1 мл) в 0,25 M сахарозе с 0,01 трис-HCl-буфером с pH 7,4 при 23° в течение 30 мин. происходил небольшой спонтанный выход кислой РНКазы из частиц МФ в среду. Поэтому после центрифугирования суспензии МФ (12000 g, 20 мин.) в надосадочной жидкости обнаруживалось около 5% общего количества кислой РНКазы суспензии МФ, а около 95% фермента находилось в

Таблица 2

Влияние гистонов на активность кислой РНКазы из грубой митохондриальной фракции в процентах к контролю (инкубация РНКазы без гистонов). Средние из 5 опытов

Препарат гистона	Концентрация гистона, $\mu\text{г}/\text{мл}$				
	2	5	10	20	100
F <sub>1</sub>	101,0 $\pm$ 0,4	100,0 $\pm$ 0,3	99,0 $\pm$ 0,3	94,0 $\pm$ 2,2	86,0 $\pm$ 2,9
F <sub>2a</sub>	100,0 $\pm$ 0,3	100,0 $\pm$ 0,4	99,0 $\pm$ 0,4	90,0 $\pm$ 3,1	91,0 $\pm$ 0,5
F <sub>2b</sub>	100,0 $\pm$ 0,01	100,0 $\pm$ 0,3	100,0 $\pm$ 0,4	95,0 $\pm$ 3,3	94,0 $\pm$ 2,4
F <sub>3</sub>	100,0 $\pm$ 0,02	100,0 $\pm$ 0,3	97,0 $\pm$ 0,5	89,1 $\pm$ 4,2	87,0 $\pm$ 1,9

Таблица 3

Распределение активности кислой РНКазы между надосадочной фракцией и осадком после инкубации суспензии МФ с гистоном  $F_1$ ,  $F_{2a}$ ,  $F_{2b}$ ,  $F_3$  и без них (К) (в процентах от суммарной активности суспензии МФ). Средние из 5 опытов

Концентрация гистона, $\mu\text{г/мл}$	Надосадочная фракция						Осадок			
	К	$F_1$	$F_{2a}$	$F_{2b}$	$F_3$	К	$F_1$	$F_{2a}$	$F_{2b}$	$F_3$
20	$5,4 \pm 0,4$	$13,2 \pm 0,3$	$15,2 \pm 0,2$	$8,6 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,1$	$94,0 \pm 0,4$	$88,0 \pm 0,7$	$78,0 \pm 1,6$	$91,0 \pm 1,1$	$92,9 \pm 0,7$
100	$6,4 \pm 0,1$	$16,7 \pm 1,55$	$30,1 \pm 0,1$	$11,2 \pm 1,6$	$22,3 \pm 1,4$	$94,0 \pm 0,4$	$78,0 \pm 1,7$	$63,0 \pm 0,8$	$78,7 \pm 1,9$	$74,6 \pm 2,1$
250	$6,4 \pm 0,4$	$20,8 \pm 1,7$	$38,7 \pm 0,2$	$25,2 \pm 1,5$	$31,1 \pm 2,4$	$93,4 \pm 0,36$	$85,4 \pm 2,5$	$54,4 \pm 0,8$	$75,0 \pm 1,1$	$61,0 \pm 2,1$

осадке. РНКазы, переходившая при центрифугировании в надосадочную жидкость, в отличие от оставшейся в лизосомах РНКазы осадка, лишь незначительно активировалась тритоном X-100, т. е. она не была связана с какими-либо структурными элементами. При инкубации же суспензии МФ с добавлением гистонов активность кислой РНКазы в надосадочной жидкости, полученной после отделения осадка центрифугированием суспензии при 12 000 g, значительно увеличивалась (табл. 1). Эта фракция РНКазы почти не активировалась тритоном X-100, следовательно фермент был в свободном состоянии.

Действие гистонов зависело от их концентрации (табл. 2): при добавлении 1  $\mu\text{г}$  гистонов на 1 мл суспензии МФ выход РНКазы из гранул в надосадочную жидкость увеличивался на 30% по сравнению с контрольными пробами. С повышением концентрации гистонов выход РНКазы в надосадочную жидкость увеличивался. Максимальный эффект — увеличение выхода кислой РНКазы в среду в 4—5 раз по сравнению с пробами, инкубированными без гистонов, — наблюдали при концентрации гистонов 100—200  $\mu\text{г/мл}$ . При дальнейшем же увеличении концентрации гистонов (до 500  $\mu\text{г/мл}$ ) активность кислой РНКазы в среде больше не повышалась.

Наиболее активными из гистонов оказались препараты  $F_{2a}$  и  $F_1$ . Препараты  $F_{2b}$  и  $F_3$  в концентрации 1—10  $\mu\text{г/мл}$  совсем не влияли на выход кислой РНКазы из лизосом, их действие обнаруживалось лишь при концентрации 20—100  $\mu\text{г/мл}$  и было менее выражено, чем действие гистонов  $F_{2a}$  и  $F_1$ . Степень влияния гистонов на выход кислой РНКазы из лизосом зависела от концентрации белка в суспензии МФ: при ее уменьшении эффект гистонов увеличивался. Так, после инкубации гистона  $F_{2a}$  (20  $\mu\text{г/мл}$ ) с суспензией МФ, содержащей белок 2  $\text{мг/мл}$ , активность кислой РНКазы в надосадочной жидкости составила  $193 \pm 2,9\%$  от ее величины в пробах, инкубированных без гистона; при содержании белка 1  $\text{мг/мл}$   $249 \pm 4,8\%$  и при 0,4  $\text{мг/мл}$   $579 \pm 8,4\%$ .

При разбавлении суспензии пороговая концентрация действия гистона  $F_{2a}$  тоже уменьшалась: при инкубации суспензии, содержащей белок 0,4  $\text{мг/мл}$ , с 0,3  $\mu\text{г/мл}$  гистона  $F_{2a}$  выход кислой РНКазы составлял  $128 \pm 3,9\%$  ( $n = 6$ ,  $p < 0,01$ ) по сравнению с контрольными пробами.

Гистоны оказывают тормозящее, а в некоторых случаях активирующее влияние на ряд энзиматических систем (<sup>4</sup>, <sup>7</sup>). В наших же опытах оказалось, что гистоны  $F_1$ ,  $F_{2a}$ ,  $F_{2b}$ ,  $F_3$  при инкубации их с выделенной из лизосом путем

повторных замораживаний и оттаиваний свободной кислой РНКазой (неактивируемой тритоном X-100) в низкой концентрации (1—10 мкг/мл) не влияли на активность этого фермента, а в более высокой концентрации даже несколько тормозили ее (табл. 2). Следовательно увеличение активности РНКазы надосадочной жидкости после инкубации суспензии МФ с гистонами было обусловлено только увеличением выхода этого фермента из лизосом в окружающую среду, а не было связано с непосредственным влиянием гистонов на активность РНКазы.

Выход кислой РНКазы из лизосом под влиянием гистонов был также подтвержден данными об уменьшении содержания латентной РНКазы в осадке, отделяемом после инкубации проб (табл. 3). Уменьшение активности РНКазы в осадке было несколько больше, чем увеличение ее в надосадочной фракции. Это зависело, по-видимому, от некоторого торможения активности свободной кислой РНКазы надосадочной фракции гистонами.

Представленные результаты позволяют заключить, что гистоны могут вызывать существенное усиление выхода кислой РНКазы из лизосом. Это связано, вероятно, с влиянием гистонов на проницаемость и на сорбционную способность мембран лизосом клеток головного мозга для этого фермента. Гистоны проявляли свой эффект на лизосомы в очень низких концентрациях (0,3—1 мкг/мл). В таких же концентрациях гистоны влияли на проницаемость клеточных мембран и в опытах Райсера и Ханкока (<sup>1-3</sup>). Механизм этого эффекта неясен. По-видимому, адсорбция положительно заряженных гистонов может уменьшить отрицательный заряд клеточных мембран (<sup>17</sup>) и тем самым вызывать изменение их проницаемости. Как полагают (<sup>9</sup>), гистоны реагируют с липидными компонентами мембран. Несмотря на приведенные аргументы, окончательное заключение о действии гистонов именно на проницаемость мембран лизосом требует дополнительных подтверждений, так как нельзя, в принципе, исключить и более грубое, повреждающее, влияние гистонов на мембраны лизосом.

Наблюдавшийся в наших опытах эффект гистонов может иметь значение и в метаболизме нервных клеток *in vivo*, в частности, для регуляции активности кислой РНКазы цитоплазмы, так как действие гистонов проявлялось при физиологических значениях pH и при таких концентрациях гистонов, которые естественно встречаются в тканях.

Институт физиологии им. И. П. Павлова  
Академии наук СССР

Поступило  
16 III 1971

Ленинградский государственный университет  
им. А. А. Жданова  
Ленинград

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> P. Ryser, *Science*, 159, 3813, 390 (1968). <sup>2</sup> H. Ryser, R. Hancock, *Science*, 150, 3695, 501 (1965). <sup>3</sup> R. Hancock, H. Ryser, *Nature*, 213, 5077, 701 (1967). <sup>4</sup> Г. Буш, Гистоны и другие ядерные белки, М., 1967. <sup>5</sup> A. Schwartz, *J. Biol. Chem.*, 240, 939, 944 (1965). <sup>6</sup> И. П. Ашмарин, Е. Р. Суродеева, *Биохимия*, 33, 655 (1969). <sup>7</sup> C. L. Johnson, B. Safer, A. Schwartz, *J. Biol. Chem.*, 241, 4513 (1966). <sup>8</sup> H. McIlwain, In: *Chemical Exploration of the Brain*, Amsterdam, 1963, p. 29. <sup>9</sup> M. H. Meisler, R. H. McCluer, *Science*, 154, 3750, 896 (1966). <sup>10</sup> Г. А. Нечаева, *Биохимия*, 30, 644 (1965). <sup>11</sup> Н. Н. Демин, Г. А. Нечаева, *ДАН*, 178, 1436 (1968). <sup>12</sup> R. F. Itzhaki, D. M. Gill, *Analyt. Biochem.*, 9, 401 (1964). <sup>13</sup> E. M. Johns, *Biochem. J.*, 92, 55 (1964). <sup>14</sup> И. П. Ашмарин, А. И. Комкова, *Биохимия*, 32, 640 (1967). <sup>15</sup> S. J. Martin, H. England et al., *Biochem. J.*, 89, 327 (1963). <sup>16</sup> В. С. Шапот, В кн. *Нуклеазы*, М., 1968, стр. 40. <sup>17</sup> A. Katchalski, D. Danou et al., *Biochim. et biophys. acta*, 33, 120 (1959).