

УДК 612.748.5

ФИЗИОЛОГИЯ

В. С. ГУРЕВИЧ, Н. И. РАЗУМОВСКАЯ, Н. М. ХАЛАФОВА

**НЕРВНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССОВ ТРАНСКРИПЦИИ В ЯДРАХ
СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ**

(Представлено академиком Е. М. Крепсом 29 I 1973)

За последние годы получены данные о реализации регулирующего влияния нервной импульсации на синтез ферментных белков в генетическом аппарате клетки, в частности на этапе транскрипции⁽¹⁻⁴⁾. По современным представлениям, матричная активность ядерной ДНК находится в прямой зависимости от функционального состояния ее комплекса с белками — хроматина. Важная роль в ограничении матричной активности приписывается хроматиновым белкам основного характера — гистонам, в связи с чем ранее нами было проведено электрофоретическое исследование фракционного состава этой гетерогенной группы белков в ядрах нормальной мышцы, мышцы, лишенной нервной импульсации (денервированной), и мышцы обездвиженной (тендотомированной). Только в денервированной мышце через 3 дня после денервации было отмечено значительное избирательное увеличение одной фракции гистонов — F_{2a1} ⁽⁵⁾. Так как эта фракция, наряду с фракцией F_3 , в наибольшей степени подвергается ферментативному ацетилированию, которое, по мнению многих авторов, достоверно снижает репрессирующее действие гистонов на матричную активность хроматина⁽⁶⁻⁸⁾, предметом настоящего исследования явилось ацетилирование гистонов и, параллельно, синтез РНК в ядрах интактной, денервированной и денервированной, подвергнутой непрямой электростимуляции, икроножных мышц кролика.

Денервацию производили путем перерезки седалищного нерва на уровне средней трети бедра. Электростимуляцию периферического отрезка нерва проводили в течение часа (при исследовании ацетилирования гистонов) или 2 час. (при исследовании синтеза РНК) через биполярные платиновые электроды с помощью генератора прямоугольных импульсов ЭС-4М с частотой 3 имп/сек, амплитудой 10 в и продолжительностью импульса 5 мсек. Затем из мышц выделяли чистые ядра по методу Силаковой⁽⁹⁾. Чистоту ядер контролировали микроскопически (рис. 1). Ядра инкубировали с C^{14} -ацетатом натрия в течение часа по методике

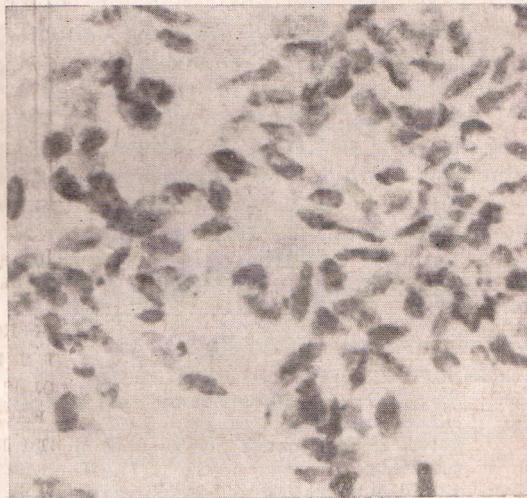


Рис. 1. Ядра, выделенные из нормальной скелетной мышцы по методу А. И. Силаковой. Толуидиновый синий. 300×

(¹⁰), экстрагировали из них суммарный гистон и измеряли его радиоактивность. Синтез РНК исследовали в обычной инкубационной среде (¹¹), но в присутствии только ионов Mn^{2+} в течение 30 мин. при 37°, измеряя интенсивность включения C^{14} -уридуина в кислотонерастворимую фракцию ядер. Радиоактивность проб измеряли на газопроточном счетчике. Содержание ДНК в ядрах определяли по (¹²), проводя измерения на спектрофотометре при двух длинах волн: 595 и 650 мкм (¹³). Количества белка во фракции гистонов определяли микробиуретовым методом.

Несмотря на увеличение одной из быстро ацетилирующихся фракций, включение меченого ацетата в общий гистон денервированной мышцы через 3 дня после денервации оказалось сниженным на 50—60%. Поэтому увеличение фракции F_{2a1} , по-видимому, можно расценивать как компенсаторную реакцию. Снижение скорости ацетилирования было выражено в такой же сильной степени уже через 18 час. после денервации, а в результате электростимуляции денервированной мышцы в течение 1 часа

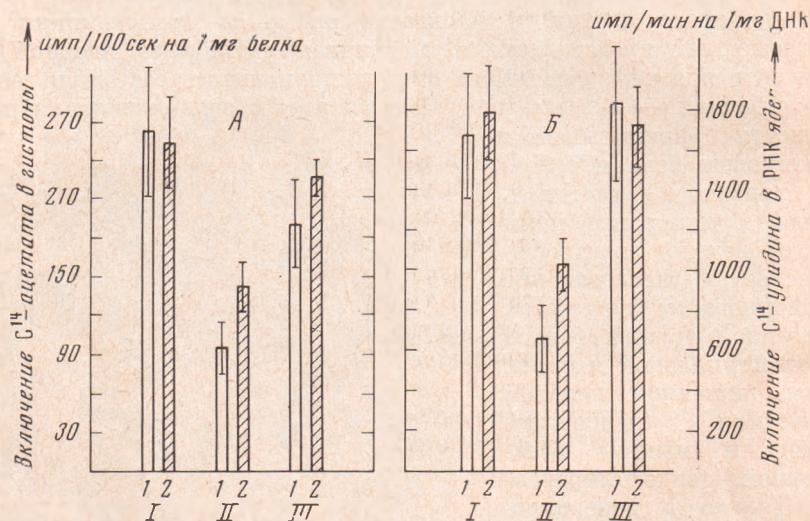


Рис. 2. А — ацетилирование гистонов и синтез РНК в ядрах икроножных мышц кроликов: интактной (I); через 18 час. после денервации (II); через 18 час. после денервации проводили электростимуляцию периферического отрезка первого (III). Б — то же, что А, но в короткие сроки после денервации. I — интактная мышца; II — через 1 час. после денервации для ацетилирования гистонов и через 2 часа для синтеза РНК; III — то же, что II, но с применением электростимуляции после указанных сроков. 1 — ацетилирование гистонов; 2 — синтез РНК

уровень ацетилирования нормализовался (рис. 2А). Изменения интенсивности включения метки в РНК полностью соответствовали изменениям ацетилирования гистонов с той, однако, разницей, что восстановление нормального уровня синтеза РНК с помощью электростимуляции достигалось не за 1 час, а за 2 часа (рис. 2А). Последнее обстоятельство соответствует данным об отставании во времени пика изменений синтеза РНК от пика изменения ацетилирования с момента воздействия модифицирующего агента приблизительно в 2 раза (⁶). Такое быстрое воздействие электростимуляции заставило нас предположить, что сама по себе перерезка первого также должна привести к менее быстрым и резким изменениям исследуемых параметров в мышечных ядрах. Действительно, уже через 1 час после денервации мы смогли получить такое же значительное снижение ацетилирования гистонов, как и через 18 час., а через 2 часа — снижение синтеза РНК. Электростимуляция нерва восстанавливала исходные уровни этих величин (рис. 2Б).

Полученные данные позволяют заключить, что изменения ацетилирования гистонов предшествуют дальнейшим биохимическим сдвигам в деятельности нервированной мышцы. Не менее важен тот факт, что электростимуляция практически сразу восстанавливает исходный уровень ацетилирования, независимо от того, насколько давно (1 час или 18 час. назад) была произведена перерезка нерва. В отличие об большого ряда относительно медленно развивающихся ферментативных изменений, ацетилирование гистонов, очевидно, занимает особое место по своей оперативности.

В настоящее время существуют представления о том, что изменения в скорости и степени ацетилирования гистонов происходят в результате или, по крайней мере, одновременно с конформационной перестройкой нуклеопротеидного комплекса ядра (⁶, ¹⁴). Согласно современным моделям организации хромосом, этот комплекс специфически связан с ядерной мембраной (¹⁵), а через нее со всей мембранный системой клетки. Поэтому при интерпретации полученных результатов мы исходили из представлений Нахманзона, Тасаки, Конева и др. о роли конформационных изменений мембранных белков в образовании и проведении первичного импульса (¹⁶⁻¹⁸). Основываясь на существовании непрерывной мембранный системы клетки, можно предположить, что возникающие в связи с генерацией первичного импульса конформационные изменения в возбудимых мембранах могут быть функционально связаны со структурными перестройками дезоксирибонуклеопротеидных комплексов ядра; иначе говоря, речь идет о проведении конформационного сигнала по специфическим каналам до биохимической мишени. Тогда определенному (например, по своим частотным или амплитудным характеристикам) типу первичных сигналов соответствовало бы избирательно определенное структурное состояние хроматинового комплекса, изменяющее в каких-то конкретных участках связь матрицы с гистоном (или группой гистонов) и увеличивающее или уменьшающее их доступность для действия ацетилтрансферазы. В этом случае степень специфичности репрессии — дерепрессии генома могла бы определяться как специфичность самого первого импульса, так и конформационным состоянием хроматина в момент приема сигнала.

Представления о нервной регуляции активности генетического материала не противоречат схеме Жакоба и Моно, а также существованию гормонального уровня регуляции. Занимая в иерархии регуляторных уровней наиболее высокое положение, созданное эволюцией, первая система, по-видимому, направляет и корректирует действие других регуляторных факторов и может затрагивать более общирные области генома, участвуя, например, в процессах дифференцировки.

Институт экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР
Ленинград

Поступило
10 I 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. С. Ильин, А. М. Емельяницев и др., Журн. эволюцион. биохим. и физиол., 8, № 3, 240 (1972). ² Н. И. Разумовская, Биохимия, 36, № 4, 702 (1971).
³ W. Grampp, J. B. Harris, S. Thesleff, J. Physiol. (Gr. Brit.), 221, № 3, 743 (1972). ⁴ F. J. Samaha, L. Guth, R. W. Albers, Exp. Neurol., 27, № 2, 276 (1970). ⁵ В. С. Гуревич, Н. И. Разумовская, Биохимия, 38, № 4 (1973).
⁶ V. G. Allfrey, Federat Proc., 29, № 4, 1447 (1970). ⁷ S. C. Bondy, S. Roberts, R. C. Morelos, Biochem. J., 119, № 4, 665 (1970). ⁸ L. Berlowitz, D. Pallotta, Exp. Cell Res., 71, № 1, 45 (1972). ⁹ А. И. Силакова, С. Н. Полящук, Ю. Л. Коноплицкая, ДАН, 198, № 6, 1468 (1971). ¹⁰ L. C. Boffa, G. Vidali, Biochim. et biophys. acta, 236, № 1, 259 (1971). ¹¹ D. Baieve, J. R. Florini, Arch. Biochem. and Biophys., 139, № 2, 393 (1970). ¹² K. Burton, Biochem. J., 62, 315 (1956). ¹³ З. Дише, В. кн. Нуклеиновые кислоты, М., 1957, стр. 425. ¹⁴ D. Killander, R. Rigler, Exp. Cell Res., 54, № 2, 163 (1969). ¹⁵ А. Н. Мосолов, В. кн. Успехи современной генетики, М., 1971, стр. 122. ¹⁶ D. Nachmanson, Science, 168, № 3935, 1059 (1970). ¹⁷ И. Тасаки, В. кн. Нервное возбуждение, М., 1971. ¹⁸ С. В. Конев, С. Л. Аксенцев, Е. А. Черницкий, В. кн. Кооперативные переходы белков в клетке, Минск, 1970.