

УДК 577:1:547.96+578.088.543.545

ФИЗИОЛОГИЯ

А. И. КЛИМЕНКО, А. Б. МАЛЫШЕВ,
академик АН УССР В. Н. НИКИТИН

ВОЗРАСТ И ВКЛЮЧЕНИЕ МЕЧЕНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В ГИСТОНЫ ХРОМАТИНА КЛЕТОК ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ КРЫС

Начиная с классических исследований Седман и Седман (¹), впервые постулировавших вероятное участие гистонов в регуляции активности клеточного генома, интерес к этим белкам стремительно возрос. По современным представлениям (^{2, 3}), функция гистонов как регуляторов процесса транскрипции ДНК может осуществляться, вероятно, как путем их непосредственного взаимодействия с матрицей, с изменением структурно-конформационных свойств хроматинового комплекса в целом, так и путем прямого «связывания» с ДНК хроматина, с репрессией процессов репликации и транскрипции.

Так как, по данным ряда авторов (^{4, 5}), в постнатальном онтогенезе животных заметно снижается матричная активность ДНК, то изучение возрастных особенностей гистоновых белков, как вероятных ингибиторов этой активности, представляет существенный интерес.

Выполненные ранее исследования показали изменения с возрастом соотношения гистоны/ДНК и особенности ацетилирования гистонов в хроматине и ядрах клеток печени в условиях нормы и при различном физиологическом состоянии организма животных (^{6, 7, 13, 14}). Вместе с тем оказалось, что набор гистоновых белков в этих условиях не изменяется, в то время как относительное содержание их отдельных фракций в постнатальном онтогенезе интактных животных и при различных воздействиях на организм заметно меняется (^{8, 9}).

Целью настоящего исследования явилось изучение возрастных особенностей синтеза различных фракций гистоновых белков хроматина клеток печени интактных белых крыс в процессе их постнатального развития.

В опытах использовались белые крысы линии Вистар в возрасте 1, 3, 12 и 24 мес. В качестве меченого предшественника применяли ¹⁴C-белковый гидролизат хлореллы с удельной активностью 0,9 мС/мл, который вводился внутривенно из расчета 30 мкг на 100 г веса тела животного за 60 мин. до их забоя. Хроматин выделяли из ядер клеток печени по методу Марушиге и Боннера (¹⁰). Гистоны их хроматина экстрагировали 0,25 N раствором HCl. После диализа в течение ночи против 0,1 M ацетатного буфера, pH 4,2, суммарные гистоны подвергали фракционированию на колонке с карбоксиметилцеллюлозой ступенчатым градиентом (рис. 1). На колонку размером 1,6×18 см наносили 80 мг белка. Скорость элюции составляла 25 мл/час, объем каждой фракции 4 мл. Оптическую плотность элюируемых с колонки фракций определяли на СФ-4А. Их радиоактивность измерялась на стинцилляционном счетчике «Нуклеар Чикаго Изотоп-300» в жидком сцинтиляторе (1 л диоксана, 100 г нафталина, 5 г ППО, 250 мг ПОПОП*). Эффективность счета по ¹⁴C составляла 80%. Хроматографические фракции гистонов идентифицировали также путем их электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) как описано ранее (⁸). В зависимости от возраста, в одном опыте использовалось 3—10 животных; для каждой возрастной группы животных поставлено 6—7 опытов.

* ППО — 2,5-дифенилоксазол; ПОПОП — 1,4-ди-5-фенил-2-оксазаминбензол.

Результаты экспериментов подвергались вариационно-статистическому анализу по методу Стьюдента — Фишера.

Были проанализированы возрастные особенности включения радиоактивных предшественников в четыре фракции гистоновых белков: в две лизинбогатые (F1a и F1b), во фракцию с умеренным содержанием лизина и аргинина (F2) и в аргининбогатую фракцию (F3). Электрофоретический анализ в ПААГ хроматографических фракций гистонов показал их существенную гетерогенность. Наиболее выраженной гетерогенностью обладала фракция лизинбогатых гистонов. Включение радиоактивной метки

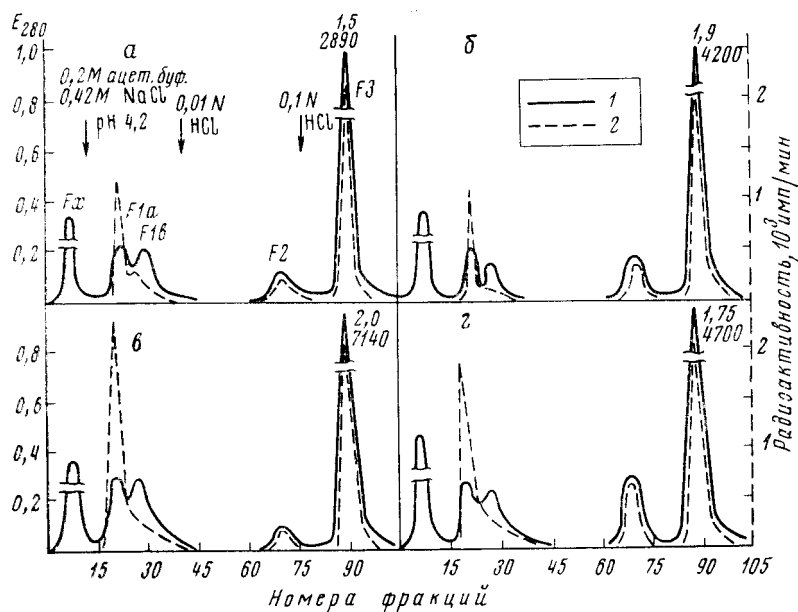


Рис. 1. Сравнительные хроматограммы гистонов хроматина клеток печени белых крыс разного возраста. Возраст животных: а — 1 мес.; б — 3 мес.; в — 12 мес.; г — 24 мес. 1 — оптическая плотность, 2 — радиоактивность

гистонов также наиболее интенсивно происходит в одну из лизинбогатых фракций гистонов F1a (табл. 1). Интенсивный метаболизм лизинбогатых гистонов установлен и в ряде других исследований (см. обзор (14)). Как видно из представленных в табл. 1 данных, включение метки в изученные фракции гистонов хроматина клеток печени обладает заметной возрастной спецификой. Общей закономерностью для всех фракций гистонов является постепенное усиление в процессе возрастного развития включения в них радиоактивных предшественников. Обращает на себя внимание, что наиболее выражена эта возрастная стимуляция для фракции лизинбогатых гистонов F1b и гистонов F2.

Согласно имеющимся данным (12), количество ядерных гистонов белков в печени значительно нарастает (при расчете на 1 ядро), начиная с 3-месячного возраста животных, и этот высокий уровень сохраняется до глубокой старости. Это хорошо коррелирует с динамикой включения меченых предшественников в различные фракции гистонов (табл. 1).

Сопоставляя данные о возрастном накоплении в ядрах клеток печени гистоновых белков с результатами об усилении с возрастом включения метки в эти белки в изолированном от ядер хроматине, можно сделать заключение об усилении в постнатальном онтогенезе белых крыс синтеза гистоновых белков в клетках печени этих животных.

Современное состояние исследований по выяснению роли гистоновых

Включение меченых предшественников в гистоны хроматина
клеток печени белых крыс разного возраста (число распадов
в минуту на 1 мг белка)

Возраст живот- ных, мес.	Фракции гистонов			
	F1a	F1b	F2	F3
1	9668±829	1406±149	2746±407	4446±442
3	11291±618	2048±296	4153±845	5613±385
12	12222±999	2348±553	3802±678	5871±779
24	11448±386	2463±286	4016±244	7322±687

белков в функционировании клеточного генома не позволяет пока сделать окончательных выводов о функциональной значимости усиления синтеза в печени этой группы белков в процессе постнатального развития животных. Однако, учитывая данные о репрессии этими белками активности ДНК, найденные многими исследователями, их важную роль в поддержании конформационного состояния хроматинового комплекса, можно сделать предположение, что нарастающая интенсивность синтеза гистонов может детерминировать в конечном итоге затухание матричной активности клеточного генома по мере развития организма.

Харьковский государственный университет
им. А. М. Горького

Поступило
6 V 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. Stedman, E. Stedman, Nature, v. 152, 556 (1943). ² Г. П. Георгиев, В сб.: Успехи соврем. генетики, в. 3, 28, М., «Наука», 1971. ³ И. П. Ашмарин, Молекулярная биология, Л., «Медицина», 1974. ⁴ В. Н. Никитин, Журн. эволюцион. биохим. и физиол., т. 8, 3, 233 (1972). ⁵ А. И. Клименко, Г. С. Тупчиенко, Онтогенез, т. 4, № 1, 80 (1973). ⁶ А. И. Клименко, В сб.: Молекулярные и функциональные основы онтогенеза, «Медицина», М., 1970, стр. 89. ⁷ А. И. Клименко, А. Б. Малышев и др., ДАН, т. 216, № 6, 1491 (1974). ⁸ А. И. Клименко, Биохимия, т. 39, № 1, 54 (1974). ⁹ А. И. Клименко, Вопр. мед. химии, т. 20, № 1, 37 (1974). ¹⁰ H. Marushige, J. Bonner, J. Mol. Biol., v. 15, 160 (1966). ¹¹ Э. А. Рапопорт, Усп. совр. биол., т. 59, № 1, 57 (1967). ¹² А. И. Клименко, Возрастные и функциональные изменения в соотношении гистонов к ДНК в ядрах клеток печени. Канд. дис., Харьков, 1968. ¹³ Y. H. Oh, R. A. Conard, Life Sci., v. 2, 11 (1972). ¹⁴ Y. H. Oh, R. A. Conard, Life Sci., v. 2, 1207 (1972).