

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

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ И СИНТЕЗ НЕГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА КЛЕТОК ПЕЧЕНИ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ БЕЛЫХ КРЫС

Вопрос о молекулярных механизмах регуляции активности генетического аппарата клетки является одним из наиболее важных и сложных на современном этапе развития биологической науки. Согласно многочисленным экспериментам, активность генома клеток эукариотов в большой мере определяется гистоновыми и негистоновыми белками хроматинового комплекса. Установлено (¹⁻³) различное воздействие этих белков на ДНК: гистоны в основном определяют репрессорное состояние ДНК, оказывают большое влияние на конформационную структуру хроматинового комплекса, а негистоновые белки, наоборот, дерепрессируют геном и, по некоторым данным (³), могут влиять на специфичность транскрипции.

Следует, однако, констатировать, что детальные механизмы участия гистонов и негистоновых белков в регуляции генетической функции ДНК пока еще не выходят за рамки предположений, встречающих значительные трудности для их экспериментальной проверки.

Учитывая важную роль негистоновых белков в регуляции генетической функции ДНК, большой интерес представляет их изучение на разных этапах возрастного развития эукариотов. В возрастном аспекте эти белки еще практически не изучены.

В данной работе ставилась задача исследовать степень гетерогенности негистоновых белков и интенсивность их синтеза в хроматиновом комплексе клеток печени в процессе постнатального онтогенеза белых крыс. Все исследования проводили на животных линии Вистар в возрасте 1,3, 12 и 24 мес. Для изучения синтеза негистоновых белков животным за 60 мин. до забоя вводили внутривенно ¹⁴C-белковый гидролизат хлореллы с удельной активностью 0,9 мС/мл из расчета 30 мкк на 100 г веса тела. Из ядер клеток печени крыс по методу Марушиге и Боннера (⁴) выделяли хроматин, из которого с помощью 0,05 N раствора NaOH экстрагировали негистоновые белки. Оптическую плотность препаратов определяли на спектрофотометре, а их радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике «Нуклеар Чикаго» (США) в жидком сцинтилляторе ЖС-7 с эффективностью счета по ¹⁴C 80%. Гетерогенность негистоновых белков изучали с помощью метода электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Для этого из хроматина негистоновые белки последовательно экстрагировались на протяжении ночи сначала раствором, содержащим 8 M мочевины, 50 mM фосфатный буфер, 1,4 mM 2-меркаптоэтанол, pH раствора 7,2 (⁵) — (раствор I), первая серия экспериментов; затем к осадку добавлялся 0,05 N раствор NaOH (раствор II) и экстракция проводилась на протяжении ночи — вторая серия экспериментов. Перед электрофорезом в ПААГ экстракт с негистоновыми белками в обеих сериях экспериментов диализовали на протяжении ночи против раствора, содержащего 8 M мочевины, 1% додецилсульфат натрия (ДСН), 1% 2-меркаптоэтанол, 0,01 M фосфат натрия, pH 7,0. После этого белоксодержащий экстракт инкубировали при 37° 3 часа и диализовали 2 часа против уже названного раствора, но без добавления ДСН. На один столбик геля наносилось подслаиванием под электродный буфер 0,02 мл раствора, содержащего 100 мкг белка. Электрофорез проводили в 15% ПААГ с прибавлением до конечных кон-

центраций в гель 0,1% ДСН и 4 М мочевины при силе тока 2 ма/гель в течение 4,5 час. (°). После окончания электрофореза гели в течение ночи выдерживались в фиксирующем растворе, содержащем метанол и 20% CH_3COOH (1 : 1). Окрашивание гелей проводили в 1% растворе амидового черного на протяжении 2 час.

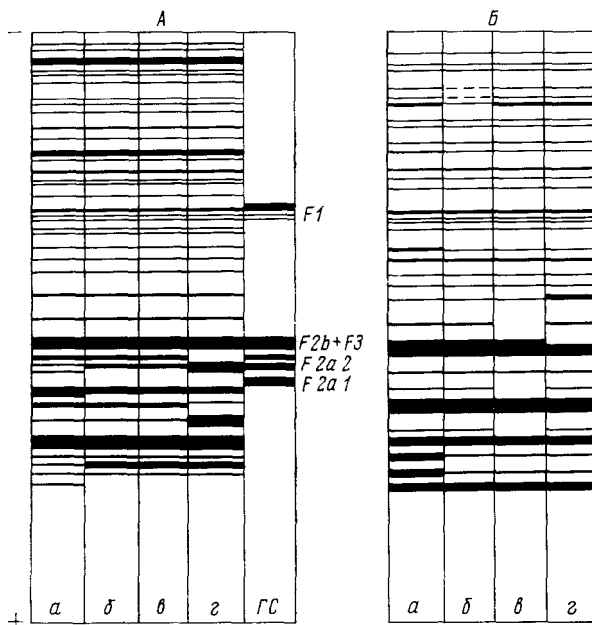


Рис. 1. Электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле негистоновых белков хроматинового комплекса ядер клеток печени белых крыс разного возраста. А — электрофореграммы негистоновых белков, экстрагированных из хроматина раствором I, Б — электрофореграммы негистоновых белков, экстрагированных из хроматина раствором II, ГС — топография различных фракций суммарных гистоновых белков в ПААГ при их совместном электрофорезе с негистоновыми белками. Возраст животных: а — 1 мес., б — 3 мес., в — 12 мес., г — 24 мес.

Изучение гетерогенности негистоновых белков хроматина показало, что спектр фракций этих белков весьма различается по своей электрофоретической подвижности в ПААГ и по относительному содержанию белка в отдельных зонах (рис. 1). Степень гетерогенности этих белков также высока и составляет в зависимости от условий их выделения 32—39 фракций. Следует, однако, учесть, что часть зон на электрофореграммах может принадлежать гистоновым белкам хроматинового комплекса. Детальное изучение этого вопроса показало, что в случае экстракции негистоновых белков из цельного хроматина вместе с ними удаляется и часть гистоновых белков. Это подтверждено как с помощью метода ионообменной хроматографии этих белков на карбоксиметилцеллюлозе (КМ-52, Ватман), позволившего выявить характерные для гистонов хроматографические фракции, так и при одновременном электрофорезе в ПААГ гистонов и негистоновых белков. На рис. 1 А показана топография пяти основных фракций гистоновых белков в геле относительно электрофореграмм негистоновых белков. Не исключено, что в зонах гистоновых белков находятся и сходные с ними по молекулярному весу и электрофоретической подвижности фракции негистоновых белков, так как экстракция аналогичным способом негистоновых белков из предварительно дегистонизированного хроматина показывает сходную их гетерогенность с негистоновыми белками, выделенными в первой серии экспериментов. Изучение степени гетерогенности негистоновых белков в возрастном аспекте показало, что в данных условиях

(рис. 1 А) наиболее гетерогенными были препараты негистоновых белков из хроматина 1-месячных животных, содержащие 39 зон. У животных 3- и 12-месячного возраста визуально удается определить по 37 зон, у старых животных — 36 зон. Таким образом, в процессе постнатального онтогенеза происходит исчезновение некоторых из фракций негистоновых белков, наличие которых характерно только для молодых животных. Некоторые возрастные различия наблюдаются также в относительном содержании белка в зоне быстромигрирующих в ПААГе фракций.

При дальнейшей обработке осадков 0,05 *N* NaOH в течение ночи в экстракт добавочно переходит значительное количество белков, оставшихся после обработки хроматина раствором с 8 *M* мочевиной. Степень гетерогенности этих препаратов негистоновых белков по данным электрофореза в ПААГ (рис. 1 Б) несколько ниже, чем в первой серии экспериментов (рис. 1 А), однако еще значительна и составляет 29–32 фракции в геле в зависимости от возраста животных. По относительному содержанию белка в электрофоретических зонах негистоновые белки хроматина, экстрагированные в щелочной среде, также имеют некоторую возрастную специфику. Необходимо отметить, что электрофоретический анализ белков, полученных с помощью 0,25 *N* раствора HCl из оставшихся после поэтапного удаления из хроматина негистоновых белков, показывает наличие в осадках основных фракций гистоновых белков.

Изучение синтеза негистоновых белков хроматинового комплекса в процессе постнатального развития белых крыс показало (табл. 1), что наиболее высокая интенсивность включения радиоактивных предшественников наблюдается в белки 3- и 12-месячных животных (соответственно 134 и 164% по сравнению с 1-месячными животными). У неполовозрелых и старых животных заметных различий включения метки в негистоновые белки не наблюдалось.

Таблица 1

Возрастные особенности включения меченых предшественников в негистоновые белки хроматина ядер клеток печени белых крыс

Возраст животных, мес.	Число опытов	Интенсивность включения метки, расп/мин на 1 мг белка	Достоверность различий (<i>p</i>) относительно 1-месячных животных
1	10	1027±173	
3	12	1379±129	0,01
12	10	1687±157	0,001
24	11	1021±57	0,1

Итак, поэтапное фракционирование негистоновых белков различными экстрагирующими агентами позволило выявить значительную гетерогенность этих белков в хроматиновом комплексе клеток печени крыс. На протяжении постнатального развития животных отмечаются возрастные различия в степени гетерогенности этих белков и относительном содержании их отдельных фракций. Установлено, что интенсивность синтеза негистоновых белков хроматина у животных разного возраста также имеет возрастную специфику.

Харьковский государственный университет
им. А. М. Горького

Поступило
11 VI 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ T. C. Spelsberg, L. S. Hnilica, Biochem. et biophys. acta, v. 228, № 1, 202 (1971).
- ² T. C. Spelsberg, J. A. Wilhelm, L. S. Hnilica, Sub-Cell Biochem., v. 1, 107 (1972).
- ³ S. G. Stein, T. C. Spelsberg, L. J. Kleinsmith, Science, v. 183, № 4127, 817 (1974).
- ⁴ K. Marushige, J. Bonner, J. Mol. Biol., v. 15, 160 (1966).
- ⁵ H.-R. Olpe, H. P. von Hahn, C. C. Honegger, Experientia, v. 29, № 6, 665 (1973).
- ⁶ A. J. Megillvray, A. Cameron et al., Biochim. et biophys. acta, v. 277, 384 (1972).