

Биология

УДК 577.1:616--006--008.9.

А. С. МИКАЕЛЯН, Р. Р. ВАРДАПЕТЯН

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ В ХРОМАТИНОВЫХ
БЕЛКАХ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОД ДЕЙСТВИЕМ
ДИЭТИЛНИТРОЗОАМИНА

Исследовалось включение 1,2-дн-(1-¹⁴C)-этилнитрозоамина в гистоны и негистоновые белки печени гепатозктомированных крыс. Обнаружена разница между включениями метки указанного канцерогена в различные белковые подфракции транскрипционно активных и неактивных фракций хроматина, получаемые в градиенте глицерина после предварительного переваривания его эндонуклеазами. Очевидно, при канцерогенезе печени существенная роль принадлежит алкилированию определенных подфракций белков хроматина, идентификация которых на данном этапе исследования затруднена.

В настоящее время хорошо известно, что ряд алкилирующих агентов может действовать как в качестве канцерогенов, так и канцеростатических агентов [1]. В последние годы прилагаются значительные усилия для понимания механизма их действия. Среди клеточных макромолекул в качестве мишени для таких канцерогенов, как диэтилнитрозоамин (ДЭНА), идентифицированы ДНК, РНК и ряд белков [2]. Факт связывания белков с канцерогенными соединениями послужил основой для возникновения так называемой теории выпадения, согласно которой первичное значение придавалось именно реакции канцерогена с белками, приводящей к алкилированию белковых сульфгидрильных групп.

Хотя имеется значительная информация о действии алкилирующих агентов на модификацию ядерных белков, роль этого процесса в развитии злокачественной трансформации изучена недостаточно [3, 4].

Целью настоящей работы являлось исследование включения алкильных остатков в отдельные фракции ядерных белков в процессе злокачественной трансформации печени крыс, вызванной диэтилнитрозоамином (ДЭНА). Особый интерес вызвало исследование связи между степенью алкилирования и матричной активностью отдельных фракций хроматина.

Материалы и методика. Самцы белых беспородных крыс весом 150—200 г частично гепатозктомировали методом Хиггинса и Андерсона [5]. Спустя 24 ч каждому животному инъецировали внутривенно ¹⁴C-ДЭНА (New England Nuclear, Англия) около 7 мккюри из расчета на 40 мг/кг общего веса крыс. Через 48 ч животные забивались и вырезалась регенерирующая печень.

Для анализа транскрипционной активности хроматина за час до забивки животным вводили внутривенно 250 мккюри ³H-оротовой кислоты (New England Nuclear, Англия). Частично переваренный хро-

матин получали по методу Андерсона и др. [6]. Фракционирование хроматина осуществляли центрифугированием в линейном градиенте 7,6—76% глицерина, содержащем 10 мМ глицина при 900000g, в течение 24 ч [7]. Для анализа транскрипционной активности за час до декаптации животным внутривенно вводили 250 мкюри ^3H -оротовой кислоты [6]. Полученный после центрифугирования материал разделяли на фракции по 0,5 мл с помощью коллектора фракций ОЕ-606 (Венгрия) при одновременном сканировании посредством проточной кюветы на спектрофотометре «Spikord»-UV-Vis (ГДР). Включение радиоактивности в кислотонерастворимый материал полученных фракций определяли после осаждения посредством 10% ТХУ на фильтрах «Сынпор» № 4. Концентрацию белка в отдельных фракциях определяли по Лоури [8].

Полученные на коллекторе фракции, обладающие одинаковой активностью, объединяли (во фракции А, В и С), разбавляли равным объемом дистиллированной воды и осаждали центрифугированием при 900000g в течение 2 ч. Белки из полученных осадков экстрагировали 0,2н НСl, осаждали 10 объемами холодного ацетона и повторно растворяли в смеси 0,2н НСl-8М мочевины. Электрофорез гистонов и кислоторастворимых НГБ проводили в присутствии мочевины [9], а идентификацию белковых зон—окрашиванием амидочерным («Реанал» Венгрия). Полученные электрофореграммы сканировали на денситометре спектрофотометра «Uvicam SP-8-100», после чего гели разрезали на равные блоки, растворяли в 30% H_2O_2 [10] и определяли радиоактивность на сцинтилляционном спектрофотометре SL-3000 Intertechique (Франция).

Результаты и обсуждения. На рис. 1 приведены результаты исследования центрифугирования в градиенте глицерина хроматина, выде-

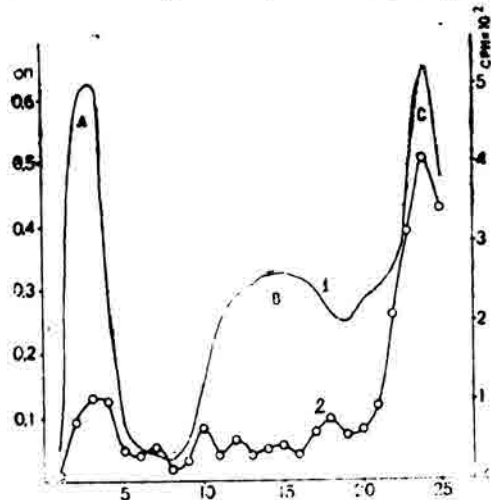


Рис. 1. Фракционирование частично-переваренного эндонуклеазами хроматина печени крыс в градиенте 7,2—72% глицерина. По оси абсцисс—номера фракции, по оси ординат—оптическая плотность (ОП) при 260 нм (1) и включение ^3H -оротовой кислоты (СРМ) (2).

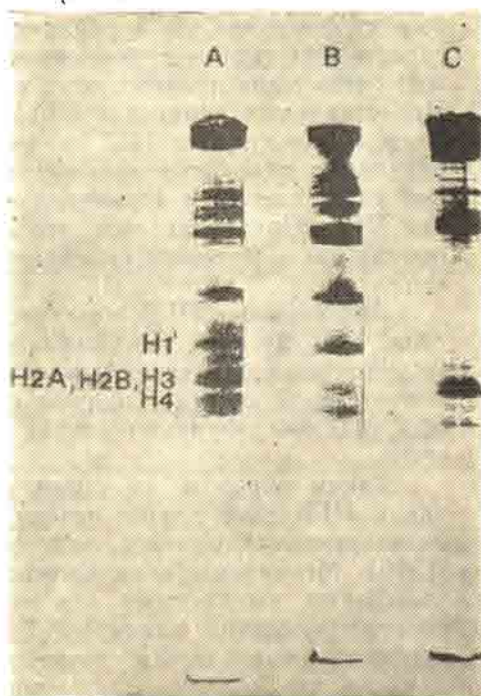


Рис. 2. Электрофорез отдельных фракций А, В и С хроматина печени крыс, полученных в градиенте глицерина (см. рис. 1).

ленного из регенерирующей печени крыс после введения ДЭНА. Как видно из рис. 1, в центрифугате обнаруживаются три выраженные фракции (А, В и С), обладающие различной плотностью и неодинаковым включением ^3H -оротовой кислоты. Наибольшее включение оротовой кислоты на мг нуклеиновых кислот обнаруживается во фракции С, а во фракциях А и В—гораздо меньше. Это указывает на то, что путем центрифугирования в градиенте глицерина удается фракционировать переваренный эндогенными нуклеазами хроматин на фракции, обладающие различной матричной активностью [11]. Полученные результаты позволили в дальнейшем использовать данную методику для определения степени алкилирования ядерных белков отдельных фракций хроматина, обладающих различной матричной активностью, после введения ДЭНА.

Как показали результаты электрофореза в ПААГ (рис. 2), все фракции хроматина (А, В и С) хотя и содержат гистоны, характерные для нуклеосомного пула, но отличаются друг от друга как содержанием гистонов, так и негистоновых белков. При исследовании алкилирования канцерогеном (включение ^{14}C -ДЭНА) белков фракции А, В и С хроматина оказалось, что все электрофоретические подфракции белков алкилированы.

В дальнейшем представлялось интересным исследование степени алкилирования канцерогеном ядерных белков, экстрагированных из различных фракций хроматина. Денситограммы электрофоретических подфракций и кривых включения в них ^{14}C -ДЭНА приведены на рис. 3, из которого видно, что ядерные белки алкилированы канцерогеном во всех фракциях, но в различной степени. Относительное уменьшение содержания гистонов указывает на то, что активная фракция содержит очень мало нуклеосомных единиц, в том числе мономеры (рис. 3с). Представляется интересным различное включение метки в отдельные подфракции гистона Н1. Аналогичная картина наблюдается в этилировании и отдельных коровых гистонов. Довольно интересные различия наблюдаются в алкилировании экстрагируемых с гистонами фракций НГБ. Предполагается, что они принадлежат к группе белков, основная часть которых сконцентрирована в активной фракции хроматина.

Большинство НГБ обнаруживается в активных фракциях хроматина, (рис. 2а, 3а), что указывает на их локализацию в участках, легко доступных действию нуклеаз. Большая часть НГБ алкилируется в значительной степени, причем степень алкилирования выше в активных участках. Функциональная роль этих белков пока ясна неполностью.

Таким образом, из наших результатов следует, что как гистоны, так и НГБ ядер клеток печени служат мишенью для алкилирующих (этилирующих) остатков, полученных при метаболическом превращении ДЭНА. Механизмы алкилирования, по всей вероятности, сходны с механизмами, выявленными для метилирования и ацетилирования белков соответствующими канцерогенами [12]. Алкилирование ядерных белков может приводить к структурной модификации ДНК-белковых комплексов, что должно отражаться на доступности тех или иных генов для транскрипции.

В последнее время обсуждается возможность упорядоченного действия химических канцерогенов на отдельные компоненты хроматина, хотя приводимые результаты достаточно противоречивы. Большинство авторов склоняется к мысли, что предпочтение дается участкам хроматина, находящимся в фазе активной транскрипции [13—15] и репликации [16]. Вероятно, это сходно с процессами репарации, которые зависят как от предшествующей деконденсации или упаковки хрома-

тина [16, 17], так и от характеристик связывания хромосомных белков с ДНК [18].

В наших экспериментах с хроматиновыми фракциями наблюдается мечение большинства гистонов и НГБ в различной степени. Полученные нами данные позволяют заключить о преимущественном алкилировании определенных фракций хроматина, вообще, и отдельных белковых подфракций транскрипционно активного хроматина, в частности. Идентификация указанных подфракций белков является задачей специальных исследований.

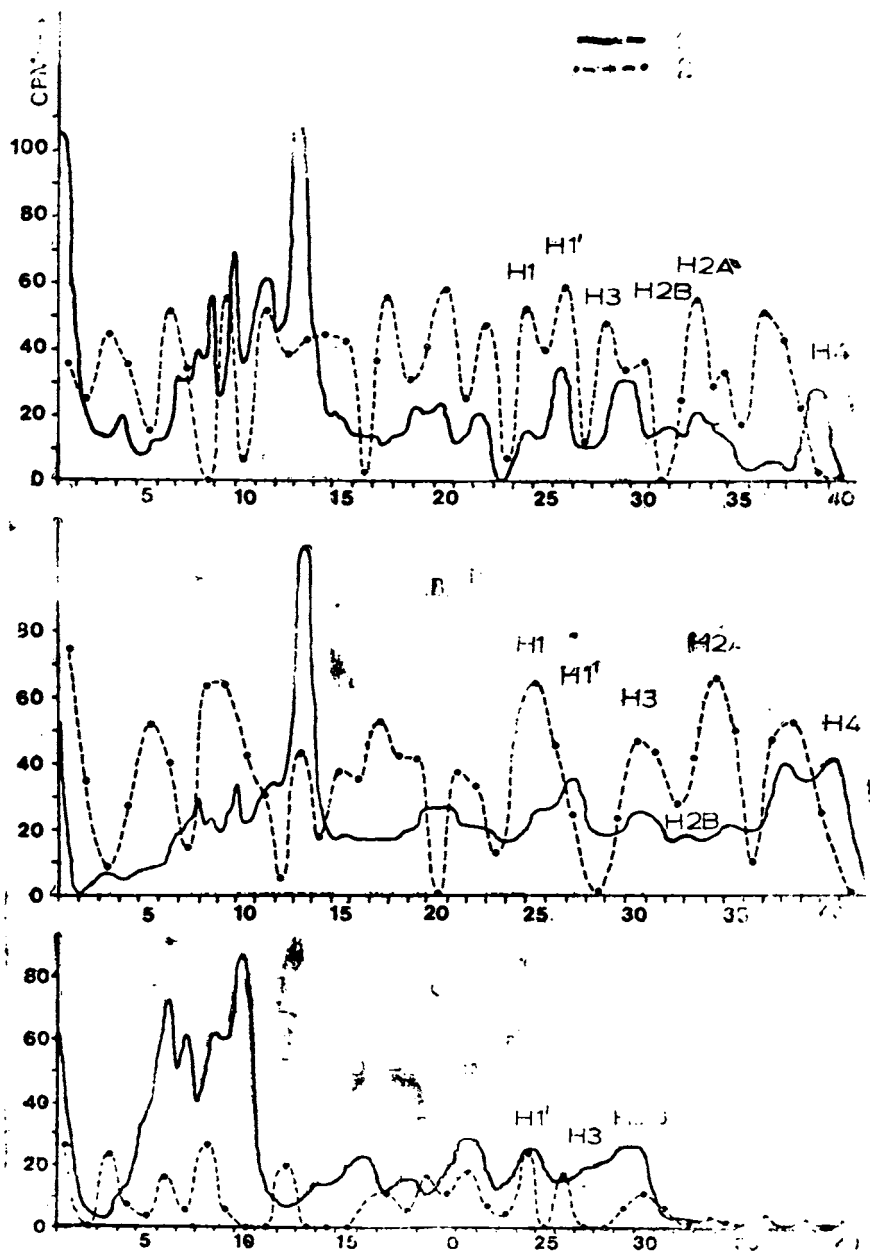


Рис. 3. Денситограммы и значения радиоактивности (СРМ) отдельных зон электрофореграмм белков, экстрагированных из фракций А, В и С тотального хроматина. 1—оптическая плотность, 2—значения радиоактивности.

Алкилирование гистонов может принимать участие в процессах регуляции транскрипции и репликации. В отличие от процессов фосфорилирования и ацетилирования, которые, уменьшая положительный заряд гистонов, приводят к ослаблению связи гистонов с ДНК, метилирование приводит к обратному эффекту [19]. Стабилизирующий или дестабилизирующий эффект этих модификаций может лежать в основе регуляции матричной активности хроматина.

Кафедры биохимии и биофизики

Поступила 23.03.1988

ЛИТЕРАТУРА

1. Miller E. C. Some Current Perspectives on Chemical Carcinogenesis in Humans and Experimental Animals: Presidential Address.— *Cancer Res.*, 1978, v. 38, p. 1479.
2. Godoy H. M., Diaz Gomes M. I., Castro J. A. Mechanism of Dimethylnitrosamine Metabolism and Activation in Rats.—*J. Natl. Cancer Inst.*, 1978, v. 61, p. 1285.
3. Letnansky K. The Phosphorylation of Nuclear Proteins in the Regenerating and Pre-malignant Rat Liver and its Significance for Cell Proliferation.— *Cell Tissue Kinet.*, 1975, v. 8, p. 423.
4. Ramanathan R., Sarma D. S. R., Rajalakshmi S. Non-random Methylation of Rat Liver Chromatin DNA by Dimethylnitrosamine (DMN) in Vivo.— *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, 1975, v. 16, p. 9.
5. Higgins G. M., Anderson R. M. Experimental Pathology of the Liver: Restoration of the Liver of the White Rat Following Partial Surgical Removal.— *Arch. Pathol.*, 1931, v. 12, p. 186.
6. Anderson K. M., Chance H., Kadohama N. Separation of Transcriptionally Active from Less Active Rat Ventral Prostate Chromatin.—*Exp. Cell Res.*, 1975, v. 94, p. 176.
7. Paul I. J., Duerksen J. D. Characterization of Mouse Taper Liver Tumor Hepatoma Chromatin Autodigestion and the Release of Euchromatic Segments.— *Arch. Biochem. Biophys.*, 1976, v. 174, p. 491.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.— *J. Biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265.
9. Letnansky K. Nuclear Proteins in Genetically Active and Inactive Parts of Chromatin.— *FEBS Letters*, 1978, v. 89, p. 93.
10. Letnansky K., Reisinger L. Circadian Rhythms in the Phosphorylation of Rat Liver Histones and Similar Basic Proteins.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, v. 49, p. 312.
11. Paul I. J., Duerksen J. D. Release of Euchromatic Segments by Mg/Ca-Dependent Autodigestion of Chromatin.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976, v. 68, p. 97.
12. Pegg A. E. Effect of Pretreatment with other Dialkylnitrosamines on Excision from Hepatic DNA of O⁶-Methylguanine Produced by Dimethylnitrosamine.— *Chem. Biol. Interact.*, 1978, v. 22, p. 109.
13. Stein G. S., Stein J. L., Thomson J. A. Chromosomal Proteins in Transformed and Neoplastic Cells: A Review.—*Cancer Res.*, 1978, v. 38, p. 1181.
14. Cooper H. K., Margison G. P., O'Connor P. J., Itzhaki R. F. Heterogenous Distribution of DNA Alkylation Products in Rat Liver Chromatin after in Vivo Administration of N, N-Di(¹⁴C)-methylnitrosamine.— *Chem. Biol. Interact.*, 1975, v. 11, p. 483.
15. Ramanathan R., Rajalakshmi S., Sarma D.S.R., Farber E. Nonrandom Nature of in Vivo Methylation by Dimethylnitrosamine and the Subsequent Removal of Methylated Products from Rat Liver Chromatin DNA.— *Cancer Res.*, 1976, v. 36, p. 2073.
16. Slor H., Cleaver J. E. Repair Replication in Replicating and Non-Replicating DNA after Irradiation with UV-Light.—*Nucleic Acids Res.*, 1978, v. 5, p. 2095.
17. Harbers E. Z. Zur Rolle der enzymatischen DNA-Reparatur bei Carcinogenese und Krebschemotherapie.— *Krebsforsch. u. Klin. Onkol.*, 1978, v. 92, p. 1.
18. Tlsty T. D., Lieberman M. W. The Distribution of DNA Repair Synthesis in Chromatin

its Rearrangement following Damage with N-Acetoxy-2-acetylaminofluorene.—
Nucleic Acids Res., 1978, v. 5, p. 3261.

19. Borun T. W., Paik W. K., Lee H. W., Pearson D., Marks D. Histone Methylation and Phosphorylation During the Hela S-3 Cell Cycle, Cold Spring Harbor Conf.—
Cell Prolif. 1974, v. 1, p. 701.

Ա մ փ ն փ ու մ

Հետազոտված է հեպատոէկտոմացված առնետի լյարդի հիստոնների և ոչ հիստոնային սպիտակուցների մեջ 1,2-դի-(1-¹⁴C)-էթիլնիտրոզամինի ներմուծումը: Հայտնաբերված է գլիցերինի գրադիենտում նախապես էնդոնուկլեազներով տրոհված քրոմատինի բաժանումից ստացվող տրանսկրիպցիոն ակտիվ և ոչ ակտիվ ֆրակցիաների սպիտակուցներում վերոհիշյալ քաղցկեղածինի ներմուծումների տարբերություն: Քաղցկեղագոյացման ժամանակ, հավանաբար, էական նշանակություն ունի քրոմատինային որոշակի սպիտակուցների ալկիլացումը, թեև նրանց իդենտիֆիկացիան առայժմ դժվար է:

S u m m a r y

We have investigated the introduction of N-di-(1-¹⁴C)—etyl nitrosoamine into the histones and non-histone proteins of hepatoectomized rat liver. Differences have been noted between the introductions of the mentioned carcinogen into various protein subfractions of transcriptionally active and non-active fractions of the chromatin, obtained in the glucine gradient after a preliminary digestion by endonucleases. Apparently, the essential role during the carcinogenesis belongs to the alkylation of certain subfractions of the chromatin proteins, the identification of which is difficult in this phase of investigation.