

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ  
УДК: 576.315.42:612.351.11:57.084.1

## ИЗМЕНЕНИЕ ГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА ПЕЧЕНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАПРЯЖЕНИЯ ОРГАНИЗМА

Л.Е.ПАНИН, И.Г.СВЕЧНИКОВА, Н.Н.МАЯНСКАЯ

Институт биохимии СО РАМН, г.Новосибирск. 630117, ул.Ак.Тимакова, 2

На модели интенсивной физической нагрузки на фоне предварительного введения препаратов, модулирующих функции лизосом, изучали изменение спектра гистоновых белков хроматина печени крыс с помощью электрофореза в ПААГ.

Обнаружили увеличение содержания ацетилированных форм гистона H4, а также повышение протеолиза фракций гистонов, богатых лизином (H1 и H2A + H2B), которое проявлялось при предварительной стимуляции плавающих крыс продигиозаном. Обсуждается роль указанных изменений в механизме активации хроматина печени крыс при стрессе и возможное участие лизосомальных протеиназ в этом процессе.

**Ключевые слова:** гистоны, стресс, протеолиз, хлорохин, продигиозан, печень крысы.

**Введение.** Гистоны связываются с ДНК с образованием нуклеосом — структурной основы хроматина. Они репрессируют считывание информации РНК-полимеразой с матрицы ДНК [1, 2]. Постсинтетические модификации гистонов, наблюдаемые в активном хроматине, дестабилизируют нуклеосомы и усиливают транскрипцию генов [3, 4].

В исследованных с применением интеркалирующего зонда акридинового оранжевого нами показано, что под влиянием стресса, вызванного интенсивной физической нагрузкой или частичной гепатоэктомией, происходит активация хроматина печени крыс [5, 6]. Однако, неизвестно, каким именно образом влияет реализация стресс-синдрома на изменение гистоновых белков хроматина.

Исследования, проведенные нами ранее, указывают на то, что в активации хроматина при стрессе принимает участие лизосомальная система клеток печени [7]. Наблюдали вовлечение лизосомальной системы клеток в процесс активации хроматина, вызванной стероидными гормонами [8], эпидермальным фактором роста [9], диетой с высоким содержанием углеводов после голодания [10]. Установлена способность протеолитических ферментов повышать матричную активность хроматина и стимулировать включение меченого гуанозина в РНК изолированных ядер [11]. Показана специфическая протеолитическая активность ферментов в отношении гистонов H1, H2A [12, 13, 14], H3 [15], H5 [16]. Протеиназы разных классов способны к гидролизу гистонов [17].

Нами изучены изменение спектра гистоновых белков хроматина печени крыс в условиях его активации под влиянием интенсивной физической нагрузки на фоне модуляторов лизосомальных функций.

**Методика.** Исследования были проведены на крысах-самках Wistar массой 150-200 г. Животные содержались на полноценном общевиварном рационе с приемом воды *ad libitum*. Моделью стресса являлась физическая нагрузка в интенсивном режиме: плавание крыс в аквариуме в течение 3,5 часов с грузом, составляющим 4% от массы тела при температуре воды 32-34 °С. Как было показано ранее, такая нагрузка не вызывает повреждения лизосомального аппарата печени и приводит лишь к повышению свободной активности лизосомальных ферментов [7].

Для выяснения роли межклеточных взаимодействий (гепатоцит-макрофаг) в активации хроматина печени при физической нагрузке крыс стимулировали липополисахаридом продигозаном, специфически повышающим активность системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ). Препарат вводили животным внутрибрюшинно в дозе 0,25 мг/кг массы тела за 24 часа до плавания.

Для выявления роли лизосом в изменении спектра гистоновых белков хроматина при физической нагрузке крысам вводили ингибиторы функций лизосом: иодацетамид, подавляющий активность цистеиновых протеиназ [19], в дозе 5 мг/кг; хлорохин, повышающий рН внутри лизосом и моделирующий лизосомальные болезни накопления [20, 21], в дозе 0,5 мг/кг; винбластин, ингибитор полимеризации микротрубочек [22], в дозе 0,1 мг/кг массы тела. Последний вводили, чтобы заблокировать перемещение лизосом к ядру. Растворы ингибиторов в 0,14М NaCl вводили за 1 час до плавания внутрибрюшинно в объеме, не превышающем 0,5 мл. Контрольным животным перед плаванием вводили в том же объеме физиологический раствор. Животных забивали методом декапитации.

Гистоны выделяли из очищенной по методу [23] ядерной фракции, экстрагировали 0,5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и осаждали ацетоном, как описано ранее [18]. Ингибирование протеиназ в ходе выделения ядер и гистонов достигалось применением фенилметилсульфонилфторида (0,1 мМ). Электрофорез проводили по методу [24] в модификации [25, 26]. Гель окрашивали 0,2% раствором Кумасси голубого R-250. Полученные электрофореграммы денситометрировали на микрофотометре ИФО-451. Площадь пиков отдельных фракций гистонов считали на ЭВМ "Север" Института автоматики и электрометрии СО РАН. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием параметрического и непараметрического критериев t-Стьюдента и Вилкоксона. Результаты выражали в % от общего содержания гистонов, считая среднее содержание и ошибку средней по 3 — 13 животным, и в относительных величинах каждой подфракции гистонов, принимая за единицу содержание данной подфракции у интактного животного в качестве контроля (см. рис. 1, 2).

**Результаты и обсуждение.** При электрофоретическом изучении гистоновых белков хроматина печени крыс, подвергавшихся интенсивной физической нагрузке, были идентифицированы все основные фракции гистонов и некоторые их подфракции. В частности, выявлены моно- и диацетилированные формы гистона H4. Выявлены также продукты протеолиза гистонов. Мы полагаем, что последний протекает *in vivo* под влиянием протеолитических ферментов, активность которых при интенсивной физической нагрузке в ядрах повышается [7], так как все стадии выделения гистонов про-

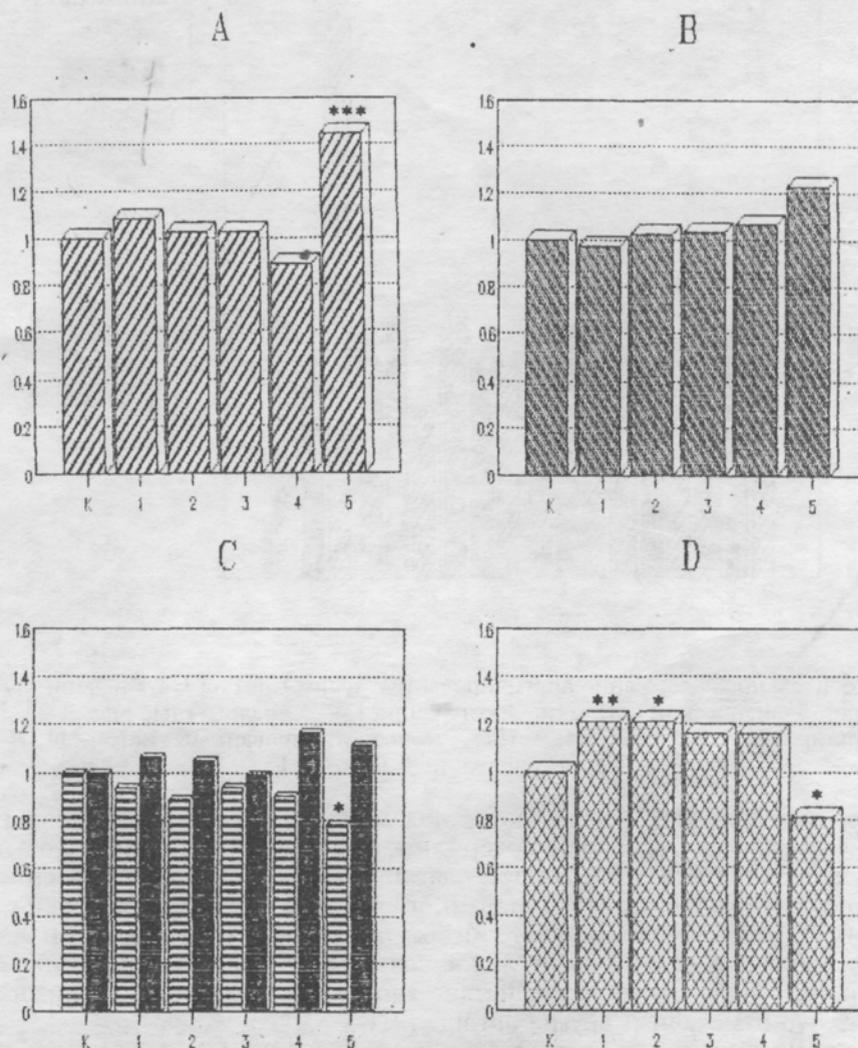


Рис. 1. Относительное содержание некоторых фракций гистонов в печени крыс после интенсивной физической нагрузки:

К — интактные животные; 1-5 — плавание в течение 3,5 ч с грузом на фоне введения; 1 — 0,15 М NaCl; 2 — винбластин; 3 — иодацетамида; 4 — хлорохина; 5 — продигоизана. А — продукты протеолиза гистона Н1; В — гистон Н3; С — столбики со штриховкой — суммарная фракция гистонов Н2А+Н2В; сплошные столбики — продукты протеолиза этой фракции; D — гистон Н4. Звездочками указаны достоверные отличия от контроля: \* —  $P < 0,05$ ; \*\* —  $P < 0,001$ ; \*\*\* —  $P < 0,001$ . Приведены средние данные по 7-12 животным.

изводились в присутствии ингибиторов протеиназ. Следует особо отметить, что физическая нагрузка — это удобная и очень распространенная модель стресса. Она может точно дозироваться и позволяет изучать физиологические механизмы адаптации в широком диапазоне, не приводя к патологическим сдвигам в организме [27].

Спектр гистоновых белков хроматина печени крыс после интенсивной физической нагрузки не изменялся, за исключением гистона Н4. Суммарное содержание гистона Н4 (в % от общего содержания гистонов) при плавании достоверно увеличилось ( $P < 0,05$ ). Это увеличение, вероятно, отчасти связано с некоторым повышением содержания диацетилированных форм данного гистона, хотя и не достоверным.

Для выяснения роли лизомальных протеиназ в активации хроматина при стрессе были применены модуляторы лизосомальной активности. Введение винбластина, препятствующего перемещению лизосом к ядру, не отразилось на изменении спектра гистоновых белков при плавании. Суммарное содержание гистона Н4 оставалось повышенным ( $P < 0,05$ ; рис. 1D), как и его ацетилированных форм.

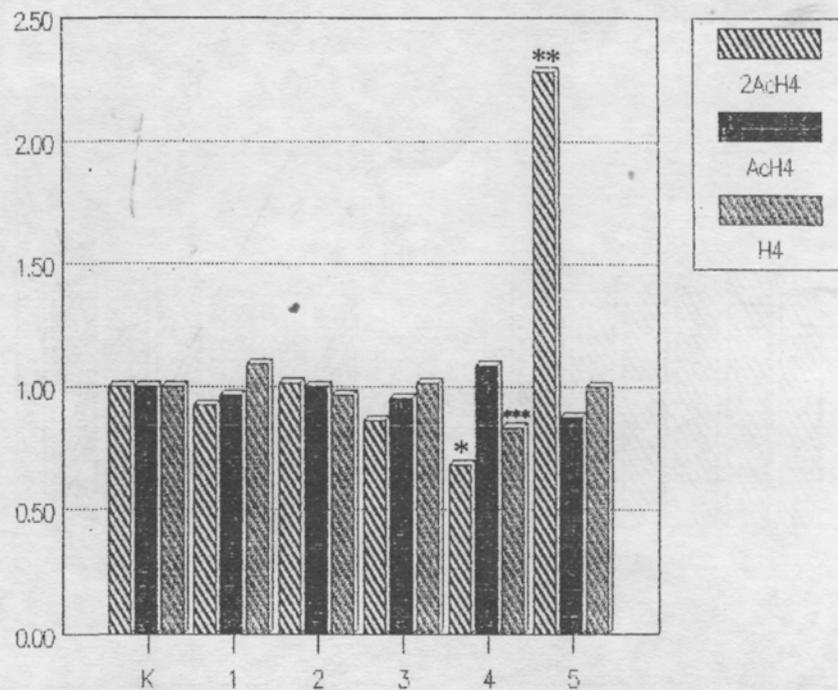


Рис. 2. Относительное содержание ацетилированных форм гистона Н4 в печени крыс после интенсивной физической нагрузки. Обозначения К — 5 аналогичные рис. 1. 2AcH4 — диацетилированный гистон Н4; AcH4 — моноацетилированный гистон Н4; Н4 — неацетилированный гистон Н4.

Ингибитор цистеиновых протеиназ — иодацетамид — также не влиял на спектр гистонов при плавании. Суммарное содержание гистона Н4 оставалось повышенным.

Действие хлорохина на гистон Н4 при плавании имело некоторые особенности. Так, относительное содержание неацетилированного гистона в суммарной фракции Н4 снизилось ( $P < 0,001$ ), по сравнению как с интактными, так и с плавающими животными (рис. 2). Снизилось также и относительное содержание диацетилированных форм Н4 ( $P < 0,05$ ; рис. 2). Парадоксальное действие хлорохина на активность лизосомальных ферментов *in vivo* отмечали и другие авторы [21].

С целью стимуляции системы мононуклеарных фагоцитов был применен бактериальный липополисахарид продигиозан. Под влиянием продигиозана усиливается секреция макрофагами в межклеточную среду лимфокинов, монокинов, лизосомальных ферментов и других факторов [28], что приводит, в частности, к ускорению репаративной регенерации печени после ЧГЭ [7]. Повышению скорости биосинтеза белка в гепатоцитах [29].

В условиях активации лизосомального аппарата печени под влиянием продигиозана обнаружено усиление протеолиза гистона Н1 при плавании. Содержание продуктов протеолиза гистона Н1 повышалось ( $P < 0,001$ ; рис. 1А). Содержание суммарной фракции гистонов Н2А+Н2В снижалось на фоне некоторого усиления главной полосы продуктов протеолиза данной фракции, по сравнению как с интактными ( $P < 0,001$ ), так и с плавающими крысами ( $P < 0,01$ ; рис. 1С). Мы полагаем, что это снижение связано с усилением протеолиза данной фракции гистонов. Достоверных изменений со стороны гистона Н3 не обнаружено (рис. 1В).

Содержание суммарной фракции гистона Н4 снижалось при плавании на фоне продигиозана, по сравнению с интактными ( $P < 0,05$ ; рис. 1D), так и с плавающими крысами ( $P < 0,01$ ). По-видимому, указанное снижение связано с протеолизом данной фракции гистонов, хотя продукты протеолиза не были выявлены на электрофореграмме. Так как гистон Н4 является наиболее быстро мигрирующим белком из всех гистонов, продукты его протеолитической деградации, движущиеся впереди фронта данного белка, могли быть утеряны в ходе электрофореза.

При анализе содержания ацетилированных форм гистона Н4 обнаружен выраженный сдвиг в сторону диацетилированных форм ( $P < 0,01$ ; рис. 2). Усиление ацетилирования гистонов характерно для активно транскрибирующегося хроматина [30].

Таким образом, при плавлении наблюдается изменение спектра гистоновых белков хроматина, выражающееся в относительном повышении суммарного содержания гистона Н4, вызванного, вероятно, повышением его ацетилированных форм. При плавлении на фоне стимуляции лизосомального аппарата печени продигозаном процесс ацетилирования гистона Н4 усиливается. Наряду с этим наблюдается протеолиз гистона Н4, а также гистонов, обогащенных лизином — Н2А, Н2В и Н1. Все указанные изменения в спектре гистонов могут ослаблять взаимодействие их с ДНК и делать ее более доступной для связывания зонда акридинового оранжевого (АО) и экспрессии генов. Повышение эффективности АО с хроматином при плавлении было показано нами ранее [5, 6]. Вероятно, при плавлении усиливаются также процессы ограниченного протеолиза гистоновых белков, так как применение ингибиторов лизосомальной функции препятствует повышению связывания АО с хроматином [5].

Предварительная стимуляция СМФ продигозаном приводила к значительному изменению спектра гистоновых белков хроматина печени крыс при плавлении. Стимуляция такого рода сопровождается прежде всего усилением секреции лизосомальных ферментов в межклеточную среду [28]. В настоящее время можно считать доказанным существование тесной функциональной связи между макрофагами и гепатоцитами [7]. Повышение секреции лизосомальных ферментов макрофагами в межклеточную среду может приводить к изменениям, наблюдаемым нами в структуре активированного хроматина (усилению протеолиза некоторых гистоновых белков). Лизосомальные ферменты (протеиназы) из внеклеточной среды могут включаться в своего рода каскадный механизм, начальным звеном которого является активация связанной с плазматической мембраной гепатоцита сериновой протеиназы [31]. Вероятно, в результате этого в процесс активации вовлекается и лизосомальная система самих гепатоцитов, что приводит в конечном счете к дестабилизации хроматина, сопровождающейся протеолизом и повышенным ацетилированием гистоновых белков. Повышенное ацетилирование гистонов может быть следствием сниженного деацетилирования. Не исключено, что регуляция активности деацетилазы гистонов осуществляется по механизму ограниченного протеолиза.

Близкие к плавлению на фоне введения продигозана результаты были получены нами на модели частичной гепатэктомии [13]. Через 3 часа после операции суммарное содержание фракции гистона Н4 было выше, по сравнению с ложнооперированными животными, главным образом, за счет диацетилированных форм. У ложнооперированных животных через 3 часа (по сравнению с 13 часами) было повышено содержание продуктов протеолиза гистона Н1. Еще более выраженным это отличие было у крыс с ЧГЭ. У ложнооперированных крыс и крыс с ЧГЭ через 3 часа после операции было снижено содержание суммарной фракции гистонов Н2А+Н2В ( $P < 0,001$ ), при некоторой тенденции к повышению продуктов протеолиза данной фракции. Содержание гистона Н3 было выше у крыс с ЧГЭ, и у ложнооперированных животных через 3 часа после операции (по сравнению с 13 часами), возможно, за счет повышения ацетилированных форм, которые однако в данном случае идентифицированы не были. Что касается гистона Н4, то его суммарное содержание было выше у животных с ЧГЭ через 3 часа после операции за счет повышения ацетилированных форм, по сравнению с аналогичной группой спустя 13 часов после операции. У ложнооперированных животных суммарное содержание гистона Н4 и его ацетилированных форм через 3 и 13 часов после операции существенно не различалось.

Приведенные выше данные позволяют говорить о том, что существуют определенные закономерности в изменении спектра гистоновых белков при активации хроматина, вызванной различными факторами. К ним относятся: 1) протеолиз богатых лизином гистонов (Н1, Н2А, Н2В) и 2) ацетилирование богатых аргинином гистонов, в первую очередь Н4 и, возможно, Н3.

Наши данные согласуются с многочисленными наблюдениями других авторов, обнаруживших обогащение активно транскрибируемого хроматина ацетилированными формами гистона Н4 [3, 30, 32], а также быстрое повышение активности гидролаз в ядре после частичной гепатэктомии [33, 34].

Регуляция функций гистонов в ядре с помощью ограниченного протеолиза заслуживает внимания исследователей. Известно, что основной синтез гистонов сопряжен с синте-

зом ДНК. Однако, 10% гистонов и некоторые их минорные подфракции синтезируются на протяжении всего клеточного цикла [35]. Это так называемый базальный синтез гистонов. Следовательно, регуляция содержания гистонов с помощью ограниченного протеолиза может быть весьма эффективной. Особенно интересен в этом плане гистон H1, являющийся "скрепкой" витков ДНК в основании нуклеосомы. Протеолиз этого и других гистонов может привести к депрессии генов и активации хроматина.

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Lu Q., Wallrath L.L., Elgin S.C.R. // *J. Cell. Biochem.* — 1994. — V. 55. — N. 1. — P. 83-92.
- 2 Bouvet P., Dimitrov S., Wolffe A.P. // *Genes & Development.* — 1994. — V. 8. — N. 10. — P. 1147-1159.
- 3 Allfrey V.G. // *Chromatin and chromosome structure* / Ed. H.J.Li, R.Eckhardt. — N.Y.: Acad. Press, 1977. — P. 167-191.
- 4 Barratt M.J., Hazzalin C.A., Cano E., Mahadevan L.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1994. — V. 91. — N. 11. — P. 4781-4785.
- 5 Маянская Н.Н., Панин Л.Е. // *Вопр. мед. химии.* — 1984. — Т. 30. — № 6. — С. 53-56.
- 6 Панин Л.Е., Свечникова И.Г., Маянская Н.Н. // *Укр. биохим. журн.* — 1995. — Т. 67. — N 2. — С. 64-70.
- 7 Панин Л.Е., Маянская Н.Н. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении. — Новосибирск: Наука, 1987. — 198 с.
- 8 Szero C.M. // *Life Sciences.* — 1984. — V. 35. — N. 24. — P. 2383-2396.
- 9 Wideltz R.B., Matrisian L.M., Russell D.H., et al. // *Exp. Cell Res.* — 1984. — V. 155. — P. 163-170.
- 10 Mak I.T., Wells W.W. // *Arch. Biochem. and Biophys.* — 1977. — V. 183. — P. 8-47.
- 11 Hirschhorn R., Troll W., Brittingen G., et al. // *Nature.* — 1969. — V. 222. — N. 6. — P. 1247-1250.
- 12 Тюленев В.И., Коноплич А.А., Кривонос А.А., Храпунов С.Н. // *Биохимия.* — 1993. — Т. 58. — № 8. — С. 1206-1212.
- 13 Surowy C.S., Berger N.A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1983. — V. 80.
- 14 Watson D.K., Moudrianakis E.N. // *Biochemistry.* — 1982. — V. 21. — N. 2. — P. 248-256.
- 15 Dyson M., Walker J.M. // *Int. J. Pept. Protein Res.* — 1984. — V. 24. — P. 201-207.
- 16 Puigdomenech P., Jose M., Ruiz-Carillo A., Crane-Robinson C. // *FEBS Lett.* — 1983. — V. 154. — N. 1. — P. 151-155.
- 17 Narvima R.J., Yabe K., Fraki J.E., et al. // *Biochem. J.* — 1988. — V. 250. — P. 859-864.
- 18 Панин Л.Е., Свечникова И.Г., Маянская Н.Н. // *Бюлл. эксп. биол. и мед.* — 1995. — N 4. — С. 369-371.
- 19 Proteinases in mammalian tissues and cells. / Kirschke H., Langner J., Wiederanders B., Bohley P., eds. // *Halle: Martin-Luter-Universitat Halle-Wittenberg*, 1982.
- 20 De Duve C., de Barsey T., Poole B., et al. // *Biochem. Pharmacol.* — 1974. — V. 23. — P. 2495-2531.
- 21 Korolenko T.A., Rukavishnikova E.V., Safina A.F., et al. // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* — 1992. — V. 373. — P. 573-580.
- 22 Ben-Ze A., Faramer S.R., Penman S. // *Cell.* — 1979. — V. 17. — N. 2. — P. 319-325.
- 23 Blobel G., Potter V.R. // *Science.* — 1966. — V. 154. — N. 3757. — P. 1662-1665.
- 24 Panyim S., Chalkley R. // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1969. — V. 130. — N. 1-2. — Part. 2. — P. 337-346.
- 25 Zweidler A. // In: *Methods in cell biology.* — V. XVII "Chromatin and Chromosomal protein reserch". — N. 11. / Stein G., Stein J., eds. — N.Y.: Academic Press, 1978. — P. 223-233.
- 26 Bonner W.M., West M.H.P., Stedman J.D. // *Eur. J. Biochem.* — 1980. — V. 109. — N.1. — P. 17-23.
- 27 Виру А.А. *Функции коры надпочечников при мышечной деятельности.* — М.: Медицина, 1977. — 176 с.
- 28 Маянский Д.Н. *Клетка Купфера и система мононуклеарных фагоцитов.* Новосибирск: Наука, 1981. — 168 с.
- 29 Панин Л.Е., Соколова М.В., Усынин И.Ф. // *Патол. физиология и эксперим. терапия.* — 1991. — N 1. — С. 20-22.
- 30 Davie J.R., Hendzel M.J. // *J. Cell. Biochem.* — 1994. — V. 55. — N. 1. — P. 98-105.
- 31 Локшина Л.А. // *Молекуляр. биол.* — 1979. — Т. 13. — N 6. — С. 1205-1229.
- 32 Annunziato A.T., Frado L.-L.Y., Seale R.L., et al. // *Chromosoma.* — 1988. — V. 96. — P. 132-138.
- 33 Dolbeare F. // *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* — 1973. — V. 142. — P. 645-649.
- 34 Куцый М.П., Закржевская Д.Т., Газиев А.И. // *Биохимия.* — 1992. — Т. 57. — № 10. — С. 1548-1553.
- 35 Wu R.S., Bonner W.M. // *Cell.* — 1981. — V. 27. — P. 321-330.

#### CHANGING IN HISTONE PROTEINS PATTERN OF RAT LIVER CHROMATINE UNDER ORGANISM FUNCTIONAL STRESS CONDITIONS.

*L.E.Panin, I.G.Svechnikova, N.N.Mayanskaya*

Institute of Biochemistry Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch. Timakov Str., 2, Novosibirsk-117, 630117, Russia

Pattern of rat liver histones at intensive physical exercises with preliminary injection of lysosomotropic drugs was studied by method of electrophoresis in PAAG. Elevation of the acetylated forms of histone H4 was revealed. The increased proteolysis of lysine-rich histones (H1, H2A, H2B) was shown in swimming rats previously stimulated by prodigiosan. The possible role of lysosomal proteinases of liver cells in mechanism of chromatine activation is discussed. Key words: histones, stress, proteolysis, prodigiosan, rat liver, chroloquine.