ISSN 0233-7657. Біополімери і клітина. 2002. Т. 18. № 5

Гідроліз гістонів в ізольованих ядрах клітин печінки і трансплантованої карциноми Герена у щурів-пухлиноносіїв в процесі розвитку онкозахворювання

М. М. Марченко, Г. П. Копильчук, О. В. Григор'єва

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича Міністерства науки і освіти України
Вул. М. Коцюбинського, 2, Чернівці, 58012, Україна

Вивчали особливості протеолізу окремих фракцій гістонів в ізольованих ядрах карциноми Герена та печінки щурів-пухлиноносіїв у процесі розвитку онкозахворювання та при застосуванні модуляторів вільнорадикальних процесів хроматину. Електрофоретичний профіль гістонових білків ізольованих ядер печінки хворих щурів не виявив якісних змін у порівнянні зі здоровими тваринами. Відмінності торкалися лише кількісного перерозподілу субфракцій лінкерного гістону. В ядрах неопластично трансформованих клітин відбувалася посилена деградація гістону H1 та корової фракції H2A. Фітопрепарат поглиблював деструктивні процеси в хроматині клітин пухлини, нормалізуючи ядерний протеоліз у печінці пухлиноносіїв. Хімічний агент 5,6-бензкумарин-5-урацил спричинював повний дисбаланс молекулярної організації хроматину в ядрах клітин карциноми та печінки щурів у процесі розвитку онкозахворювання.

Вступ. Процес обмеженого специфічного протеолізу гістонів вважається одним з первинних факторів контролю структури і функціональної активності хроматину. Майже абсолютну специфічність до гістонових білків проявляють міцно асоційовані з хроматином протеїнази, які відрізняються за молекулярною масою і екстрагуються 0,5—0,7 М NaCl [1]. Припускають, що функція даних ферментів якоюсь мірою пов'язана з участю в процесах регуляції експресії генів [2, 3].

Дана робота присвячена вивченню особливостей протеолізу окремих фракцій гістонів в ізольованих ядрах клітин карциноми Герена та печінки щурів-пухлиноносіїв у процесі розвитку онкозахворювання та при застосуванні модуляторів вільнорадикальних процесів хроматину.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були білі безпородні щури-самці масою 100—130 г. Трансплантацію тваринам карциноми Герена здійснювали методом підшкірного введення в область стегна 30 % суспензії пухлинних клітин у фізіологічному розчині. Через 6 днів пухлиноносіїв розділили на три групи: 1 — дослідний контроль (ДК), це щури з трансплантованою карциномою Герена; 2 — пухлиноносії, які отримували фітопрепарат (ФП); 3 — пухлиноносії, яким вводили 5,6-бензкумарин-5-урацил (БКУ) [4]. Вказані засоби запропоновані кафедрою біохімії Чернівецького національного університету [5, 6]. Контролем вважали здорових тварин.

Декапітацію проводили на 7, 14, 21-шу добу після трансплантації карциноми під легким ефірним наркозом.

Ядра виділяли з гомогенату печінки і пухлини за методом [3]. Чистоту ядер контролювали мікроскопічно.

Міцно зв'язані з хроматином білки екстрагували з ядер 0,5 М розчином хлориду натрію. Протеолітичну активність визначали, реєструючи вміст розчинних у 20 %-й трихлороцтовій кислоті продуктів гідролізу гістонів після інкубації дослідної проби з водним розчином сумарного препарату гістонів. За одиницю активності брали кількість

© М. М. МАРЧЕНКО, Г. П. КОПИЛЬЧУК, О. В. ГРИГОР'ЄВА, 2002

(мг) гістонів, що гідролізуються за 1 год при температурі 37 °С у перерахунку на 1 мг білка дослідної проби [2].

Суспензії ядер інкубували при 37 °С протягом 1 год. Реакцію зупиняли додаванням 5 н H_2SO_4 до кінцевої концентрації 0,25 н. Кислотні екстракти відокремлювали центрифугуванням при 10000 *g*. Кислоторозчинні білки осаджували додаванням до супернатанту чотирьох об'ємів 95 %-го етилового спирту. Гістони аналізували електрофоретично в 20 %-му ПААГ за методом Леммлі [7].

Маркерами слугували гістони печінки та пухлини, отримані в присутності інгібітора серинових протеїназ (ФМСФ).

Електрофореграми аналізували за допомогою обладнання та програмного забезпечення фірми «Bio-Rad» (США).

Результати і обговорення. У відповідь на розвиток карциноми Герена активність зв'язаних з хроматином протеїназ у печінці щурів-пухлиноносіїв вже на 7-му добу з часу прищеплення пухлини знижувалася в 1,2 разу порівняно з нормою, залишаючись на такому рівні впродовж подальшого експерименту (рис. 1).

Щодо особливостей гідролізу окремих фракцій гістонів в ізольованих ядрах печінки, то електрофоретичний аналіз показав (рис. 2), що у здорових тварин частковому ендогенному протеолізу піддавалися лінкерні гістони, особливо субфракція H1o, та відбувалися зміни у перерозподілі корових фракцій H3 та H2A, відносний вміст яких знизився порівняно з маркерами приблизно в 1,5—1,8 разу. Протеїнази, специфічні до H2B, залишалися в неактивному стані. Поява на електрофореграмі смуг в зоні молекулярних мас 12,7 та 12,2 кДа, а також підвищення інтенсивності забарвлення білкових смуг, що відповідають гістону H4, очевидно, пов'язані з акумуляцією тут продуктів гідролізу фракцій H1, H3 та H2A, а поява смуги 9,3 кДа не виключає можливості протеолізу самої фракції H4.

Електрофоретичний профіль гістонових білків ізольованих ядер печінки хворих щурів не виявляв якісних змін у порівнянні зі здоровими тваринами. Відмінності стосувалися лише кількісного перерозподілу субфракцій лінкерного гістону, що, на нашу думку, може бути суттєвим для підтримання специфічної структури активних і неактивних ділянок хроматину. Відносний вміст гістону H1 підвищувався в 1,8 разу, знижувалась інтенсивність забарвлення смуг в області молекулярних мас 12,7 та 12,2 кДа. Процентний вміст гістону H4 максимально наближався до значень на електрофоретичному треку маркерів. Всі наведені вище факти свідчать про зниження рівня гідролізу лінкерної фракції у

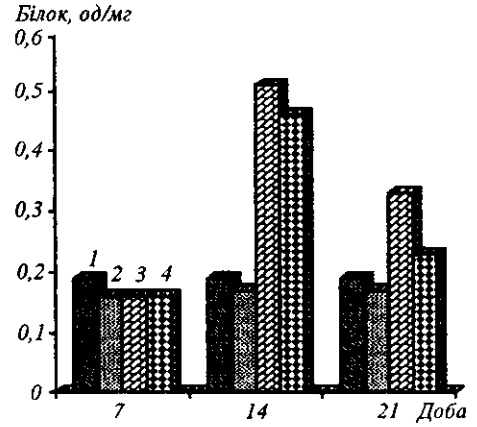

Рис. 1. Активність ядерних гістон-специфічних протеїназ печінки щурів-пухлиноносіїв: *1* — контроль; *2* — дослідний контроль; *3* — пухлиноносії, яким вводили фітопрепарат; *4* — пухлиноносії, яким вводили хімічний препарат

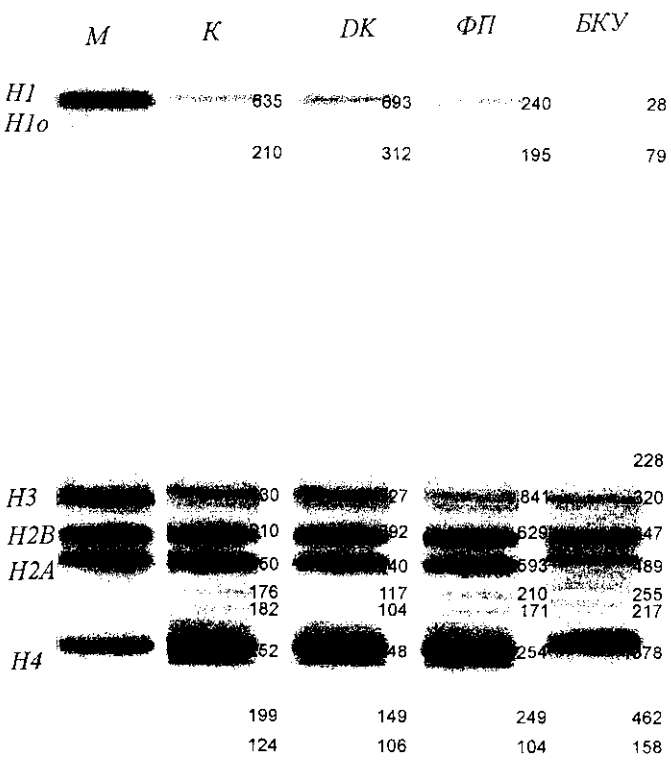

Рис. 2. Протеоліз окремих фракцій гістонів ізольованих ядер печінки пухлиноносіїв: *M* — маркерний сукупний гістон; *K* — контроль; *ДК* — дослідний контроль; *ФП* — дослідна група тварин, що отримували фітопрепарат; *БКУ* — дослідна група тварин, що отримували хімічний препарат. Цифрами вказана інтенсивність поглинання світла в зонах локалізації білка (OD)

ядрах печінки пухлиноносіїв. При цьому активність протеїназ, специфічних до корових гістонів, залишалася на рівні здорових тварин.

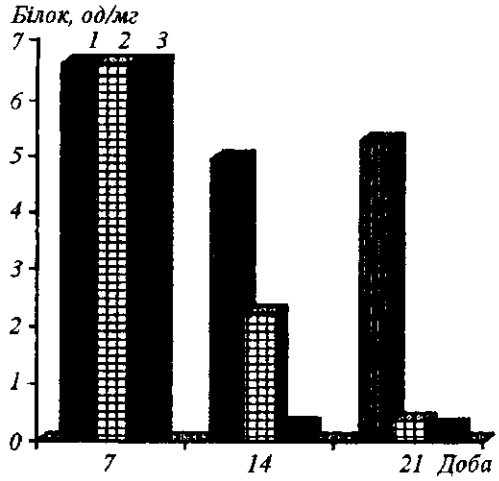

Рис. 3. Активність ядерних гістон-специфічних протеїназ карциноми Герена у щурів: *1* — дослідний контроль; *2* — пухлиноносії, яким вводили фітопрепарат; *3* — пухлиноносії, яким вводили хімічний препарат

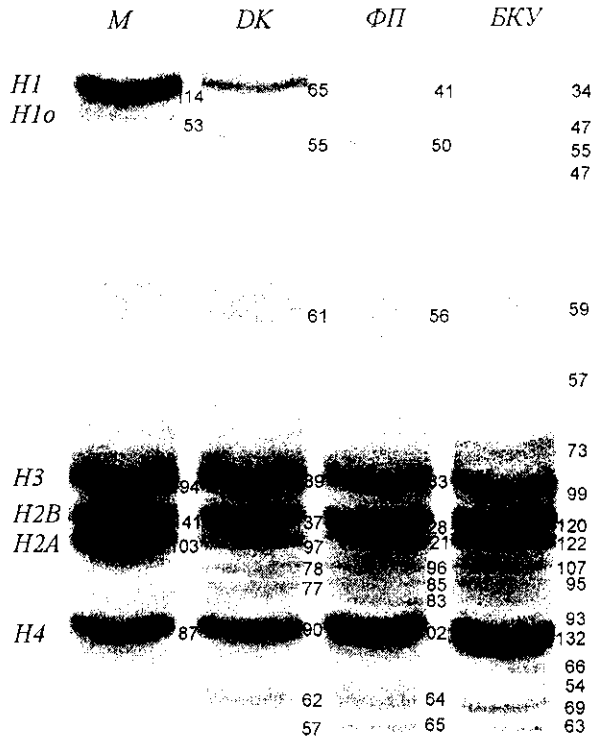

Рис. 4. Протеоліз окремих фракцій гістонів ізольованих ядер карциноми Герена щурів: *М* — маркерний сукупний гістон; *ДК* — дослідний контроль; *ФП* — дослідна група тварин, що отримували фітопрепарат; *БКУ* — дослідна група тварин, що отримували хімічний препарат. Цифрами вказана інтенсивність поглинання світла в зонах локалізації білка (OD)

Підвищення вмісту фракції H1 у хроматині пов'язують зі зниженням його транскрипційної здатності [8, 9].

Треба відмітити, що картина електрофоретичного розподілу гістонів ядер печінки пухлиноносіїв не змінювалася в процесі розвитку онкозахворювання. Очевидно, що показане нами зниження загального рівня ендогенного ядерного протеолізу гістонових білків відбувалося саме за рахунок лінкерної фракції.

У пухлині проходив більш активний протеоліз лінкерного гістону (рис. 4), ніж у печінці, про що свідчило зниження відносного вмісту цієї фракції приблизно в 2 рази порівняно з контролем та поява на електрофореграмі нової білкової смуги в області молекулярної маси 17,7 кДа, де, очевидно, накопичувалася частина продуктів гідролізу фракції H1. Можливо, в ядрах пухлинних клітин активувалася інша, ніж у печінці, протеїназа, специфічна до H1.

В ядрах карциноми відбувався посилений протеоліз корового гістону H2A, чого не спостерігалося в печінці пухлиноносіїв. Частина продуктів деградації фракції H2A акумулювалася у вигляді двох білкових смуг між H2A та H4, а частина — в зоні молекулярних мас 9,4 та 8,8 кДа. Поява згаданих поліпептидних фрагментів не могла бути спричинена протеолізом гістону H4, оскільки інтенсивність забарвлення відповідної йому смуги аналогічна до контролю.

Високий ступінь деградації лінкерної фракції, що спостерігався в даному випадку, може призводити до порушення наднуклеосомної організації хроматину, рівня спіралізації молекули ДНК, що в свою чергу викликає зміни в регуляції експресії геному [8]. Протеоліз корового гістону H2A пов'язаний із дестабілізацією структури самої нуклеосоми [10].

Отже, наведені результати свідчать про те, що в ядрах неопластично трансформованих клітин відбувається значна дестабілізація хроматину. Останнє, ймовірно, призводить до дисбалансу в регуляції його функціональної активності.

Застосування модуляторів вільнорадикальних процесів хроматину змінювало загальну активність зв'язаних з хроматином протеїназ та протеоліз окремих груп гістонів як у печінці, так і в пухлині (рис. 3).

В результаті дії фітопрепарату картина перерозподілу гістонових фракцій ізольованих ядер печінки пухлиноносіїв була максимально наближеною до контролю.

Зовсім по-іншому проявлялася дія природного модулятора в пухлині. Результатом його впливу було зниження активності зв'язаних з хроматином

протеїназ щодо сумарних гістонів (рис. 3). Це може спричинювати послаблення транскрипційної здатності хроматину [8, 11]. Водночас посилювався протеоліз окремих фракцій: повністю деградував Н1, підвищувався гідроліз гістонів Н3 та Н2А. Між Н2А та Н4 з'явилися три нові смуги, що, ймовірно, пов'язано з накопиченням продуктів активного гідролізу названих вище фракцій. Частина поліпептидних фрагментів, що відщепилися від Н1, Н2А та Н3, зосередилася в області молекулярних мас гістону Н4, про що свідчило розширення відповідної йому смуги на електрофореграмі.

Отже, фітопрепарат поглиблював деструктивні процеси в хроматині клітин пухлини, нормалізуючи ендогенний ядерний протеоліз у печінці хворих тварин. Хімічний агент викликав повний дисбаланс молекулярної організації хроматину в ядрах клітин карциноми та печінки пухлиноносіїв.

Результатом дії БКУ в печінці хворих щурів було підвищення рівня активності гістоноспецифічних протеїназ приблизно в 2,5 разу через 6 діб після його введення (рис. 1). Спостерігалася активація протеолітичних ферментів, специфічних до окремих фракцій (рис. 2). Особливою активністю відрізнялася протеїназа, специфічна до Н1. Відбувалася повна деградація цієї фракції, причому частина продуктів її гідролізу накопичувалася у вигляді зовсім нової білкової смуги з молекулярною масою 15,8 кДа. Зменшувався відносний вміст гістонів Н3 та Н2А. Результатом протеолізу згаданих вище фракцій було утворення поліпептидних фрагментів в області гістону Н4 та з молекулярними масами, нижчими за 9,2 кДа.

У пухлині процеси протеолізу окремих фракцій гістонів під впливом БКУ відбувалися значно активніше (рис. 4). Про це свідчило повне зникнення білкових смуг на електрофореграмі, які відповідають лінкерній фракції, і поява в зоні молекулярних мас між 20,6—15,3 кДа шести нових білкових смуг, які, очевидно, відповідають продуктам розпаду гістону Н1. Відзначався посилений протеоліз усіх корових гістонів, які розщеплювалися на фрагменти з молекулярними масами 13,0; 12,55; 11,51 та 11,01 кДа та чотири фрагменти 10,21—8,83 кДа.

Отже, в ядрах пухлинних клітин хімічний модулятор спричинював значне підвищення активності протеолітичних ферментів, специфічних до гістонових фракцій, на фоні зниження рівня гідролізу сумарних гістонів зв'язаними з хроматином протеїназами (рис. 3). Ймовірно, що посилення гідролізу окремих фракцій гістонів відбувалося за рахунок активації ядерних ендогенних протеїназ, не асоційованих з хроматином.

Отримані нами експериментальні дані дещо розширюють уявлення щодо ролі протеолізу окремих фракцій гістонів у регуляції функціональної активності хроматину в процесі розвитку онкозахворювання та при зміні антиоксидантного статусу організму.

Висновки. У відповідь на розвиток карциноми Герена активність зв'язаних з хроматином протеїназ у печінці щурів-пухлиноносіїв знижувалася на 7-му добу з часу прищеплення пухлини в 1,2 разу порівняно з нормою, залишаючись на цьому рівні впродовж подальшого експерименту.

На фоні сталої картини якісного розподілу гістонів та продуктів їхнього гідролізу ізольованих ядер печінки пухлиноносіїв спостерігалось підвищення вмісту лінкерного гістону в 1,8 разу порівняно з контролем.

В ядрах неопластично трансформованих клітин відбувалася посилена деградація гістону Н1 та корової фракції Н2А.

Фітопрепарат поглиблював деструктивні процеси в хроматині клітин пухлини, нормалізуючи ядерний протеоліз у печінці пухлиноносіїв.

Хімічний агент 5,6-бензкумарин-5-урацил спричинював повний дисбаланс молекулярної організації хроматину в ядрах клітин карциноми та печінки щурів у процесі розвитку онкозахворювання.

M. M. Marchenko, G. P. Kopil'chuk, O. V. Grigorjeva

Histone hydrolysis in insulated nuclei of carcinoma and in liver cells of rats with Heren's carcinoma at tumor growth

Summary

The features of proteolysis of separate histone fractions in insulated nuclei of carcinoma and in liver cells of rats with Heren's carcinoma were studied at tumor growth as well as upon the usage of modulators of free-radical processes in chromatin. The histone electrophoretic profile of insulated nuclei obtained for the liver cells of rats with Heren's carcinoma did not show qualitative changes in comparison with normal animals. The differences concerned only quantitative redistribution of the linker histone subfractions. The enhanced degradation of the H1 histone and H2A core fraction was revealed in the transformed cells nuclei. A phytoreagent activated the destructive processes in the tumor cell chromatin, normalizing the endogenous nuclear proteolysis in liver of the tumor carriers. A chemical reagent 5,6-benzcumarin-5-uracil caused complete disbalance of chromatin molecular organization in the nuclei of the carcinoma and liver cells during the oncogenesis.

М. М. Марченко, Г. П. Копильчук, О. В. Григорьева

Гидролиз гистонов в изолированных ядрах клеток печени и трансплантированной карциномы Герена у крыс-опухоносителей в процессе развития онкозаболевания

Резюме

Изучали особенности протеолиза отдельных фракций гисто-

нов в изолированных ядрах карциномы Герена и печени крыс-опухоленосителей в процессе развития онкозаболевания и при использовании модуляторов свободнорадикальных процессов хроматина. Электрофоретический профиль гистоновых белков изолированных ядер печени больных крыс не выявил качественных изменений по сравнению со здоровыми животными. Отличия касались только количественного перераспределения субфракций линкерного гистона. В ядрах неопластически трансформированных клеток происходила усиленная деградация гистона H1 и коровой фракции H2A. Фитопрепарат углублял деструктивные процессы в хроматине клеток опухоли, нормализуя эндогенный ядерный протеолиз в печени опухоленосителей. Химический агент 5,6-бензкумарин-5-урацил вызывал полный дисбаланс молекулярной организации хроматина в ядрах клеток карциномы и печени крыс в процессе развития онкозаболевания.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Garrels J. I., Elgin S. C. R., Bonner J.* A histon protease of rat liver chromatin // Biochem. and Biophys. Res. Communs.—1972.—46, N 2.—P. 545—551.
2. *Протас А. Ф., Чаяло П. П.* Выделение гистон-специфической пртеиназы из ядер клеток мозга крыс // Укр. биохим. журн.—1991.—63, № 5.—С. 99—102.
3. *Горюхина О. А., Гончарова В. П., Степанова И. С., Резцова В. В.* Протеиназная активность ядер различных тканей в отношении эндогенных гистонов // Биохимия.—1979.—44, № 3.—С. 504—512.
4. *Марченко М. М., Копильчук Г. П., Григор'єва О. В.* Активність цитоплазматичних протеїназ клітин печінки щурів з трансплантованою карциномою Герена в процесі росту пухлини та за дії лікувальних засобів // Укр. біохім. журн.—2000.—72, № 3.—С. 15—19.
5. *Марченко М. М., Николюк І. Д., Бевзо В. В.* Стан антиоксидантної системи організму щурів та корекція його препаратом із лікарських рослин у динаміці росту карциноми Герена // Укр. біохім. журн.—1999.—71, № 6.—С. 76—80.
6. *Марченко М. М., Копильчук Г. П., Григор'єва О. В.* Активність цитоплазматичних протеаз пухлинної тканини щурів з трансплантованою карциномою Герена за дії лікувальних засобів різної природи // Доп. НАН України.—2000.—№ 3.—С. 192—194.
7. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227.—P. 680—685.
8. *Глотов Б. О., Николаев Л. Г.* Структура, химическая модификация и взаимодействие гистона H1 с компонентами хроматина // Молекуляр. биология.—1983.—17, № 5.—С. 891—910.
9. *Куцый М. П., Газиев А. И.* Активируемая ДНК и нуклеотидтрифосфатами протеиназа ядерного матрикса печени крысы, специфическая к гистону H1 // Молекуляр. биология.—1988.—22, № 5.—С. 1430—1436.
10. *Тюленев В. И., Каноплич А. А., Руденко О. А.* Влияние мочевины на протеолиз гистона H2A ядер тимуса теленка // Укр. биохим. журн.—1991.—71, № 2.—С. 42—46.
11. *Бойков П. Я., Сидоренко Л. И., Шевченко Н. А.* Активация хроматина и протеолиза гистонов при подавлении синтеза белков в клетках печени // Биохимия.—1983.—48, № 1.—С. 23—32.

УДК 616.006577.7
Надійшла до редакції 05.02.01