

Т. Г. Мозжухина, А. Я. Литошенко

ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ И ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ФРАКЦИЙ ХРОМАТИНА ПЕЧЕНИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Из ядер клеток печени молодых, взрослых и старых крыс выделяли фракции репрессированного (РХ), транскрипционно активного (АХ) и прочно связанного с матриксом (МХ) хроматина. Показано, что при старении относительное количество РХ увеличивается, а АХ — уменьшается и это уменьшение сопровождается ростом величины отношения белок/ДНК. Однако интенсивный и экстенсивный показатели транскрипционной активности у старых крыс уменьшаются во всех трех фракциях хроматина. Вследствие этого при старении уменьшается тотальный синтез РНК; относительный вклад в этот процесс фракции АХ падает, а фракции РХ — возрастает.

Введение. В клетках эукариот генетический аппарат интерфазных ядер представляет собой иерархически организованную компактную структуру — хроматин, который состоит из ДНК, гистонов и негистоновых белков, РНК и липидов [1]. Взаимодействие обоих типов белков с ДНК обеспечивает не только упаковку нитей ДНК в объеме ядра, но и функциональный контроль генов, в частности их экспрессию. Изменения состава этих групп белков, а также их связей с ДНК и другими компонентами клеточного ядра, модулируя структуру хроматина, могут менять как количественные, так и качественные характеристики экспрессии генетической информации. Так, например, конденсированный хроматин, организованный в нуклеосомы и структуры более высокого уровня компактизации, транскрипционно неактивен, тогда как деконденсированный хроматин активно транскрибируется. При этом конденсация может быть выражена в большей или меньшей мере, а расположение конденсированных и деконденсированных участков хроматина в пространстве ядра и относительно друг друга, а также их соотношение меняются в зависимости от физиологического состояния клетки и под влиянием различных химических и физических факторов [1].

Было показано [2, 3], что с возрастом, особенно на поздних этапах онтогенеза, снижается уровень транскрипционной активности хроматина. Однако до настоящего времени остается не выясненным, обусловлено ли это снижение лишь увеличением репрессированных последовательностей (т. е. относительным увеличением количества конденсированного хроматина [4, 5]) и их сверхкомпактизации на наднуклеосомном уровне [6, 7] или и другими факторами, *цис*- и *транс*-эффекторно регулирующими скорость транскрипции. Кроме того, в исследованиях возрастных особенностей структурно-функциональных свойств хроматина не уделялось внимания участкам хроматина, прочно связанным с ядерным матриксом, хотя именно эти участки обогащены транскрипционно активными последовательностями [8].

Цель настоящей работы состояла в изучении возрастных особенностей относительного содержания и транскрипционной активности фракций конденсированного, деконденсированного и связанного с матриксом хроматина печени крыс.

Материалы и методы. В работе использовали самок белых крыс линии Вистар трех возрастных групп (3—4-месячные — молодые, 6—

8-месячные — взрослые и 24—26-месячные — старые), содержащихся на стандартном рационе вивария. Для определения транскрипционной активности животным за 20 мин до забоя внутрибрюшинно вводили $2[^{14}\text{C}]$ -оротовую кислоту (молярная активность $25,2 \cdot 10^4$ МБк/моль) в дозе 3,7 МБк/кг массы.

Ядра из клеток печени выделяли методом [9], включая очистку 1 %-м раствором Тритона X-100. Хроматин фракционировали по методу [4], основанному на последовательной фрагментации хроматина Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой эндонуклеазой и ультразвуком с последующей экстракцией раствором низкой ионной силы — $0,01 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC}$ — $0,15 \text{ M NaCl}$, $0,015 \text{ M}$ цитрат натрия, pH 7,0). В результате получали

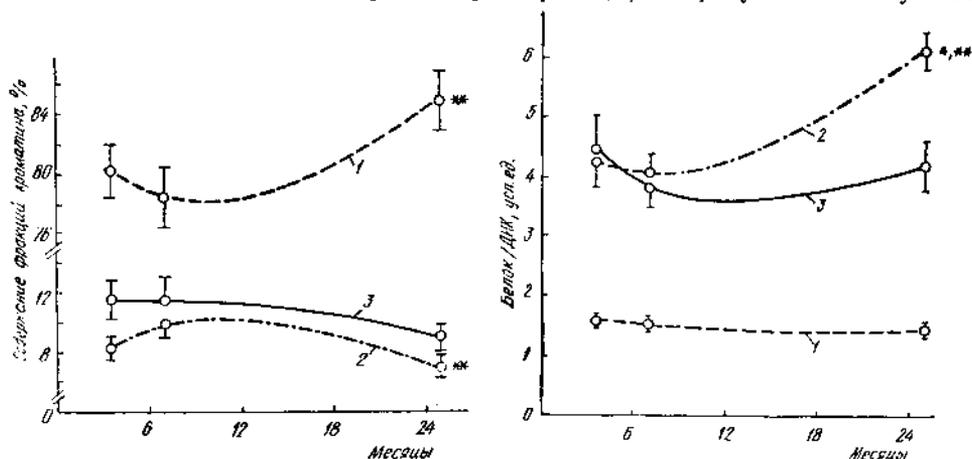


Рис. 1. Изменение относительного содержания фракций РХ (1), АХ (2) и МХ (3) в суммарном хроматине печени крыс разного возраста. Здесь и на рис. 2—5 статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с молодыми и взрослыми животными обозначены соответственно * и **

Рис. 2. Изменение величины отношения белок/ДНК во фракциях РХ (1), АХ (2) и МХ (3) печени крыс разного возраста

фракцию конденсированного хроматина, обогащенную репрессированными последовательностями (РХ), фракцию деконденсированного хроматина, обогащенную активно транскрибируемыми последовательностями (АХ), и неэкстрагируемую прочно связанную с ядерным матриксом фракцию (МХ). Относительное содержание (в %) фракций рассчитывали по количеству в них ДНК. Для оценки транскрипционной активности фракций хроматина, содержащих вновь синтезированную РНК [10], использовали два показателя — интенсивный и экстенсивный. Первый отражает матричную активность фракции, представляющую скорость синтеза РНК единицей длины (массы) ДНК и выражаемую величиной относительной радиоактивности (ОР). Экстенсивным показателем служила эффективность транскрипции, представляющая скорость синтеза РНК всей фракцией хроматина и выражаемая в условных единицах. Для этого определяли удельную радиоактивность (УР): аликвоты фракций хроматина наносили на полоски фильтровальной бумаги Ватман 3ММ или Фильтрак ФН-18, которые погружали в 10 %-й раствор ТХУ, промывали в 5 %-м растворе ТХУ дважды, в этаноле и смеси этанол — эфир (1 : 1), высушивали, после чего измеряли радиоактивность в радиоспектрометре Mark-3 (США). ОР рассчитывали соотношением УР фракции хроматина к УР кислоторастворимой фракции ядер, характеризующей величину пула меченых предшественников РНК в ядрах.

Результаты обрабатывали методом вариационной статистики с применением критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Из данных, приведенных на рис. 1, видно, что подавляющая (около 80 %) часть генетического материала кле-

ток печени независимо от возраста животных находится в репрессированном состоянии и входит в состав конденсированного хроматина. Остальная часть ядерной ДНК почти поровну распределяется между деконденсированным и прочно связанным с матриксом хроматином. Однако при этом у старых крыс относительное содержание фракции РХ выше, а фракции АХ — ниже, чем у молодых и взрослых животных. Относительное содержание МХ с возрастом не изменяется. Таким образом, изменения относительного содержания фракций РХ и АХ обнаруживаются только у старых крыс. Подобный характер возрастной динамики количества фракций РХ и АХ был показан и на животных других видов, в частности на мышах [11]. В другом исследовании, проведенном в той же лаборатории, было обнаружено, что при старении в ядрах печени мышей увеличивается относительное количество фракции МХ [12]. Несоответствие этих данных результатам, приведенным на рис. 1, может определяться видовыми особенностями возрастных изменений структурной организации генетического аппарата, но более вероятной причиной является различный методический подход к изоляции фракции МХ.

Структурное состояние тех или иных участков хроматина и, следовательно, их функциональную активность определяют, в первую очередь, гистоны и негистоновые белки, их количество, соотношение и прочность связи с ДНК. Известно, что АХ содержит существенно больше белков, чем РХ, и разница обусловлена главным образом негистоновыми белками [1]. Данные настоящей работы соответствуют этим представлениям (рис. 2). Во фракции МХ, содержащей последовательности промоторов и оридженов репликации [8, 13], концентрация белков значительно выше, чем в РХ, и близка к таковой в АХ, особенно в печени молодых и взрослых животных, хотя по белковому составу фракции АХ и МХ отличаются, так как последняя обогащена структурными белками ядерного матрикса. С возрастом величина отношения белок/ДНК во фракциях РХ и МХ не изменяется, но значительно увеличивается во фракции АХ печени старых крыс (на 45 и 51 % по сравнению с молодыми и взрослыми животными соответственно).

Учитывая вышеизложенное в отношении роли и значения белков в структурно-функциональной организации хроматина, а также результаты анализа отношения белок/ДНК во фракциях хроматина печени крыс разного возраста, можно предположить, что матричная активность фракций РХ и МХ с возрастом не изменится, а фракции АХ — увеличится лишь в старости.

Определение матричной активности фракций хроматина не подтвердило этого предположения. Так, действительно, у взрослых животных матричная активность ни одной из фракций хроматина статистически значимо не отличается от таковой у молодых животных (рис. 3). Однако у старых крыс величина этого параметра падает по сравнению и с молодыми, и со взрослыми животными во всех фракциях хроматина. Существенно, что снижение при старении матричной активности хроматина печени крыс было обнаружено и в опытах *in vitro* с помощью РНК-полимеразы из *Escherichia coli* [14].

Прежде нами было показано [7], что при старении в печени крыс происходит изменения термоденатурационных и электрофоретических параметров фракций РХ и АХ, обусловленные накоплением и/или усилением связей между молекулами ДНК и гистоновых и негистоновых белков. Вследствие этих количественных и качественных модификаций образуются прочные наднуклеосомные ассоциаты и нарушаются скорость и иерархия структурных переходов, сопровождающих раскручивание нитей ДНК в процессе матричных синтезов. Возможно, что при старении накопление и усиление связей белок — ДНК, часть которых является поперечными ковалентными сшивками, происходят и во фракции МХ, особенно в тех участках, где ядерный матрикс тесно связан с ядерной мембраной, пероксидация липидной компоненты которой может индуцировать образование сшивок [15]. Косвенным подтверждением

такой возможности является уменьшение в гепатоцитах старых крыс контурной длины ядерной мембраны, свободной от конденсированного хроматина [16].

Исходя из уже изложенного, наиболее вероятной причиной снижения в старости матричной активности всех фракций хроматина являются их структурные изменения, обусловленные качественными и количественными сдвигами связей белок — ДНК. Причем во фракциях РХ и МХ возрастные изменения этих связей носят, по-видимому, главным образом качественный характер. Об этом свидетельствует возрастная стабильность величины отношения белок/ДНК в этих фракциях (рис. 2).

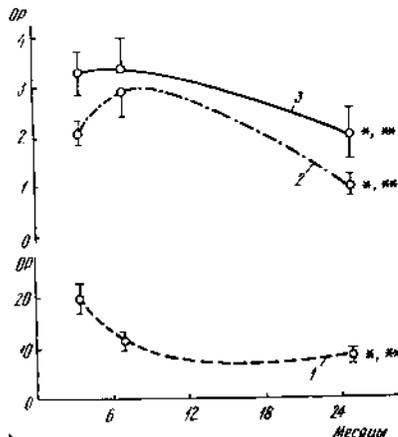
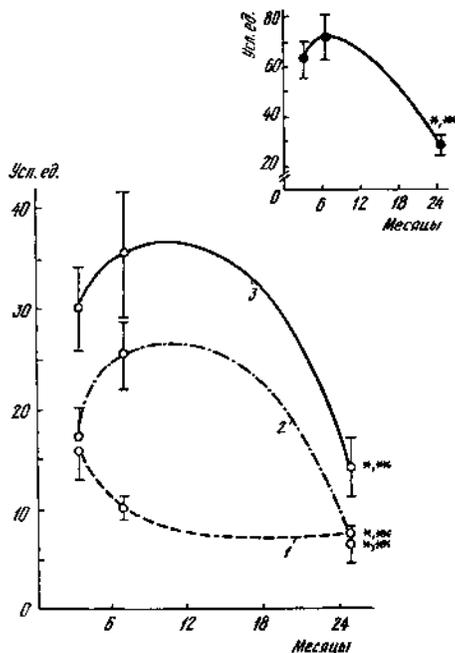


Рис. 3. Изменение матричной транскрипционной активности во фракциях РХ (1), АХ (2) и МХ (3) печени крыс разного возраста

Рис. 4. Изменение эффективности транскрипции суммарного хроматина (вверху) и фракций РХ (1), АХ (2) и МХ (3) в печени крыс разного возраста



Во фракции АХ при старении наряду с качественными, происходят и количественные изменения, так как в этой фракции значительно большее, чем в РХ, количество ДНК стабилизировано структурными негистоновыми белками [7]. Усиление таких связей проявляется не только в снижении матричной активности фракции АХ старых крыс, но и в повышении величины отношения белок/ДНК (рис. 2), поскольку прочно связанные белки, очевидно, выделяются в составе фракции АХ при ее изоляции из ядер.

В результате снижения матричной активности каждой из фракций хроматина у старых крыс по сравнению с молодыми и взрослыми более чем вдвое уменьшается эффективность транскрипции тотального хроматина (рис. 4, вверху). Подобное снижение синтеза РНК при старении было обнаружено и в других исследованиях как *in vivo*, так и *in vitro* [3], хотя в последних изучали изолированные ядра или нефракционированный хроматин. Из данных, приведенных на рис. 4, видно, что эффективность транскрипции снижается при старении во всех фракциях хроматина, однако темп этого снижения неодинаков для различных фракций. Так, в РХ старых крыс величина этого параметра меньше, чем у молодых и взрослых животных, соответственно на 53 и 28 %, в АХ — на 61 и 74 %, в МХ — на 53 и 60 %.

Неравномерность изменений при старении эффективности транскрипции отдельных фракций хроматина как результат, во-первых, разнонаправленности изменений их относительного содержания и, во-вторых, разной степени выраженности снижения в них матричной актив-

ности ведет не только к уменьшению эффективности транскрипции тотального хроматина, но и к тому, что у старых крыс доля фракции РХ в суммарном синтезе РНК (рис. 5) растет, а доля фракции АХ — падает по сравнению со взрослыми животными; доля фракции МХ с возрастом не изменяется. Представляющаяся очевидной пропорциональность изменений относительного содержания РХ и АХ и их долей в эффективности транскрипции тотального хроматина при старении таковой не является, так как сдвиги эффективности транскрипции выражены больше, чем сдвиги относительного содержания фракций, особенно фракции РХ.

Как видно, с возрастом изменяются относительное содержание фракций РХ и АХ и транскрипционная активность всех трех изученных фракций хроматина печени крыс, причем изменения обнаруживаются только у старых животных, что свидетельствует о причинно-следственной связи этих изменений с процессом старения. Снижение при старении транскрипционной активности, показанное на

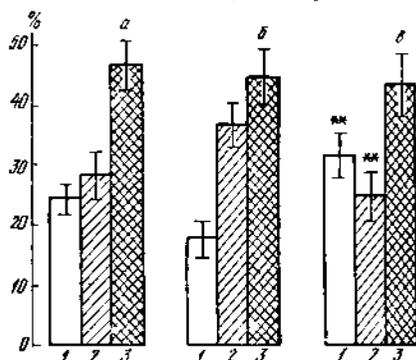


Рис. 5. Изменение доли фракций РХ (1), АХ (2) и МХ (3) в эффективности транскрипции суммарного хроматина печени молодых (а), взрослых (б) и старых (в) крыс

многих типах клеток и тканей животных разных видов [3], некоторые исследователи рассматривают как результат клеточной дифференцировки [17]. Эти представления основываются на том, что в ходе нормального онтогенеза дифференцировка осуществляется путем образования прочных поперечных связей (возможно, сшивок) между молекулами белков хроматина и ДНК, выключая таким образом транскрипцию определенных последовательностей ядерного генома. Иными словами, чем дальше продвинуты клетки в процессе дифференцировки, тем больше в них репрессированных генов. Отсюда следует, что зависящее от возраста снижение синтеза РНК обусловлено нарастающей гетерохроматизацией, т. е. увеличением относительного содержания фракции РХ. Приведенные в настоящей работе данные лишь частично подтверждают эту концепцию. Действительно, доля РХ с возрастом увеличивается, однако это увеличение наблюдается не в ходе всего периода постнатального онтогенеза, а лишь на поздних его этапах, у старых животных.

Примененное в работе разделение хроматина клеток печени на фракции, различающиеся своими структурно-функциональными характеристиками, позволило обнаружить, что снижение транскрипционной активности хроматина при старении обусловлено не только и не столько увеличением относительного содержания фракции РХ, сколько снижением матричной активности каждой фракции. В основе этого снижения лежит накопление поперечных сшивок между молекулами белков и ДНК [7], которые препятствуют инициации транскрипции, затрудняя доступ РНК-полимеразы и *транс*-действующих факторов транскрипции к промоторным участкам генов в МХ, и элонгации синтезирующихся молекул РНК, нарушая деспирализацию ДНК-матриц. Причины и биохимические механизмы образования этих сшивок до настоящего времени окончательно не выяснены [18].

Таким образом, изменения в старости структурной организации фракций хроматина ведут как к тотальному снижению транскрипционной активности клеток, так и к раскоординированию экспрессии генов. Об этом свидетельствуют приведенные выше данные о неравномерности сдвигов эффективности транскрипции каждой из фракций и их вкла-

да в общий синтез РНК в клетках печени, а также результаты определения экспрессии отдельных генов [19]. Следствием этих изменений являются, с одной стороны, снижение функциональных и адаптационных возможностей клеток, что увеличивает вероятность их гибели, и, с другой,— повышение вероятности их трансформации и малигнизации, т. е. феноменов, характерных для поздних этапов онтогенеза. Поэтому можно полагать, что приведенные в работе изменения структурно-функциональных свойств фракций хроматина лежат в основе молекулярных механизмов старения.

Авторы выражают благодарность Е. А. Коваленко за техническую помощь и участие в подготовке статьи к печати.

Работа поддержана грантами ГКНТ Украины 1.06.02/011-92 и 1.06.02/027-93.

Т. Г. Мозжухина, О. Я. Літошенко

ВІДНОСНИЙ ВМІСТ І ТРАНСКРИПЦІЙНА АКТИВНІСТЬ ФРАКЦІЙ ХРОМАТИНУ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

Резюме

З ядер клітин печінки молодих, дорослих і старих щурів виділяли фракції репресованого (РХ), транскрипційно активного (АХ) та зв'язаного з матриксом (МХ) хроматину. Показано, що при старінні відносна кількість РХ збільшується, а АХ — зменшується, і це зменшення супроводжується зростанням величини відношення білок/ДНК. Однак інтенсивний і екстенсивний показники транскрипційної активності у старих щурів зменшуються в усіх трьох фракціях хроматину. Внаслідок цього при старінні зменшується тотальний синтез РНК; відносний внесок у цей процес фракції АХ падає, а фракції РХ — зростає.

T. G. Mozzhukhina, A. Ya. Litoshenko

RELATIVE CONTENT AND TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF LIVER CHROMATIN FRACTIONS OF RATS OF DIFFERENT AGES

Summary

The repressed (RC), transcriptionally active (AC), and matrix-bound (MC) chromatin fractions were isolated from liver cell nuclei of young, adult and old rats. It was shown that relative content of RC increased and that of AC decreased during aging. This decrease was accompanied by a rise of the protein/DNA ratio. Nevertheless, the intensive and extensive transcriptional activity indexes decreased with aging in all chromatin fractions. As a result the total RNA synthesis diminished, with a relative contribution to this synthesis of AC being decrease and of RC being increase.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Збарский И. Б. Организация клеточного ядра.— М.: Медицина, 1988.— 368 с.
2. Plesko M. M., Richardson A. Age-related changes in unsheduled DNA synthesis by rat hepatocytes // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1984.— 118, N 3.— P. 730—735.
3. Thakur M. K. Age-related changes in the structure and function of chromatin: a review // Mech. Ageing Develop.— 1984.— 27, N 3.— P. 263—286.
4. Khilobock I. Yu., Mozzhukhina T. G., Chabanny V. N., Kadura S. N. Some age-related structural peculiarities of fractionated chromatin. Thermal denaturation and electrophoretical analysis // Gerontology.— 1983.— 29, N 1.— P. 9—18.
5. De Clercq L., Delaere P., Remacle C. The aging of the endocrine pancreas of the rat. 1. Parameters of cell proliferation // Mech. Ageing Develop.— 1988.— 43, N 1.— P. 11—24.
6. Хилобок И. Ю., Мозжухина Т. Г., Левицкий Е. Л. и др. Изменение хроматина клеток печени при старении // Вестн. АМН СССР.— 1986.— № 10.— С. 20—25.
7. Mozzhukhina T. G., Chabanny V. N., Levitsky E. L., Litoshenko A. Ya. Age-related changes of supranucleosomal structures and DNA-synthesizing properties of rat liver chromatin // Gerontology.— 1991.— 37, N 4.— P. 181—186.

8. *Mironov N. M., Lobanenkov V. V., Goodwin G. H.* The distribution of nuclear proteins and transcriptionally-active sequences in rat liver chromatin fractions // *Exp. Cell Res.*— 1986.— 167, N 2.— P. 391—399.
9. *Blobel G., Potter V. R.* Distribution of radioactivity between the acid-soluble pool and the pool of RNA in the nuclear, nonsedimentable and ribosome fractions of rat liver after a single injection of labelled orotic acid // *Biochim. et biophys. acta.*— 1968.— 166, N 1.— P. 48—57.
10. *Jackson D. A., Cook P. R.* A general method for preparing chromatin containing intact DNA // *EMBO J.*— 1985.— 4, N 4.— P. 913—918.
11. *Tas S., Tam C. F., Walford R. L.* Disulfide bonds and the structure of the chromatin complex in relation to aging // *Mech. Ageing Develop.*— 1980.— 12, N 1.— P. 65—80.
12. *Tas S., Walford R. L.* Influence of disulfide-reducing agents on fractionation of the chromatin complex by endogenous nucleases and deoxyribonuclease I in aging mice // *J. Gerontol.*— 1982.— 37, N 6.— P. 673—679.
13. *Boulikas T.* Homeotic protein binding sites, origins of replication, and nuclear matrix anchorage sites share the ATTA and ATTTA motifs // *J. Cell. Biochem.*— 1992.— 50, N 2.— P. 111—123.
14. *Yan-Shun D., Zhang C., Chang C.* Связанные с возрастом изменения в синтезе РНК в выделенных ядрах и хроматине печени крысы // *Chin. Biochem. J.*— 1991.— 7, N 1.— P. 95—99.
15. *Дмитриев Л. Ф.* Малоновый диальдегид может контролировать клеточное деление на стадии репликации ДНК (гипотеза) // *Журн. эволюц. биохимии и физиологии.*— 1992.— 28, № 6.— С. 720—730.
16. *Мантейфель В. М., Романенко Е. Б., Бабаджанян Д. П. и др.* Электронно-микроскопическое исследование хроматина в ядрах гепатоцитов крыс при возрастных изменениях генома // *Молекуляр. биология.*— 1988.— 22, № 4.— С. 1087—1096.
17. *Михельсон В. М.* О принципиальной невозможности существенного увеличения видовой продолжительности жизни человека // *Изв. РАН. С. биол.*— 1992.— № 4.— С. 638—640.
18. *Литовченко А. Я.* Триггер процесса старения— в ядре или митохондриях? // *Там же.*— С. 645—648.
19. *Литовченко А. Я., Рогинец Н. В.* Возрастные особенности экспрессии некоторых генов в условиях оксидативного стресса // *Биополимеры и клетка.*— 1993.— 9, № 6.— С. 84—87.

Ин-т геронтологии АМН Украины, Киев

Получено 02.03.94