

УДК 614.876 + 612.015.348

А. Ф. Протас

Влияние среднемолекулярных пептидов крови на структуру и матричную активность хроматина

Исследовали эффект среднемолекулярных пептидов, выделенных из сыворотки крови лиц, участвовавших в ликвидации последствий аварии на ЧАЭС, на пространственную организацию и матричную активность хроматина ядер нейронов коры головного мозга крыс. Пептиды подавляют репаративный синтез РНК и ДНК, способствуют переходу хроматина в конденсированное состояние, нарушают его нуклеосомную организацию. Показано, что изучаемая группа пептидов связывается с ДНК хроматина кооперативным образом ($K_{ac} = 1,8$ мкмоль/л, $n_{Hill} = 3,8$). С одной нуклеосомой максимально может связаться четыре молекулы пептидов. Связывание пептидов с ДНК носит некооперативный характер, но имеет почти такую же K_{ac} , что и для хроматина.

Введение. В клинико-биохимическом анализе достаточно широко используются так называемые среднемолекулярные пептиды (СМП) крови, представляющие собой вторичные эндогенные пептиды с молекулярной массой 1—5 кДа и обладающие выраженным токсическим действием (обычно применяют парамециевый тест). Присутствие СМП связано с действием протеолитических ферментов крови и клеток. Их повышенное содержание вызывает самые разные нарушения функции систем и органов, начиная с гемодинамических расстройств и кончая анемией. Определение СМП в биологических жидкостях позволяет оценить степень эндогенной интоксикации организма [1—3]. По своим характеристикам они могут быть отнесены к группе цекропиноподобных пептидов, которым присуще токсическое действие либо по отношению к клеточной мембране (литическое действие), либо к ДНК (ингибирование синтеза) [4, 5]. Однако, несмотря на определенный уровень изученности их влияния на ряд биохимических процессов, сведения об эффекте СМП на геном практически отсутствуют. Авторы работы [6] показали, что в сыворотке крови лиц с почечной недостаточностью, подвергшихся действию ионизирующей радиации, присутствуют факторы, подавляющие репаративный синтез ДНК в лимфоцитах. Они могут быть удалены посредством гемодиализа, что тестировалось по наличию эффекта на репаративный синтез ДНК в прямых и перекрестных опытах с лимфоцитами и сывороткой. Наиболее вероятно, что это — результат интоксикации СМП. В связи с изложенным представляется важным изучить влияние СМП на структурно-функциональное состояние хроматина. Особый интерес могут составить исследования на нейронах коры головного мозга, поскольку одно из наиболее выраженных действий СМП обычно проявляется в их причастности к нервно-психическим нарушениям.

Материалы и методы. СМП выделяли из сыворотки крови лиц, участвовавших в ликвидации последствий аварии на ЧАЭС, с дозой облучения 0,2—0,6 Гр. Контрольная и опытная группы составляли 90 и 30 человек соответственно. Белки и другие компоненты сыворотки осаждали 20 %-м раствором трихлоруксусной кислоты. СМП, содержащиеся в надосадочной

фракции, очищали хроматографией на колонках с сефадексом G-10 (предварительно нейтрализовав NaOH до pH 7), G-50 и обратной фазой HPLC-хроматографией на колонке RepRPC 5/5 («Pharmacia», Австрия). Размер колонок с сефадексами — $6 \times 1,4$ см, буфер элюции — 0,15 моль/л NaCl, pH 7. HPLC-хроматографию осуществляли в системе ISCO (США) линейным градиентом концентрации ацетонитрила от 0 до 70 % за 20 мин, 0,1 % о-фосфорной кислоты, скорость элюции 1 мл/мин. Общее содержание СМП в сыворотке крови определяли по реакции Лоури в ТХУ-растворимой фракции. Нейроны и ядра клеток нейронов получали из коры головного мозга крыс линии Вистар по методу [7] с некоторыми модификациями [8]. Скорость синтеза ДНК и РНК регистрировали по включению соответствующих радиоактивных предшественников, как описано ранее [8]. Хроматин фракционировали, обрабатывая ядра ДНКазой II (10 ед/мл), по методу [9]. Получали две растворимые фракции хроматина: первая — супернатант (S1), выделенный после инкубации ядер с ДНКазой и их осаждения, и вторая (S2) — экстракт этого осадка в гипотонической среде. Размеры продуктов гидролиза хроматина ДНКазой определяли хроматографически на Toyosarl HW65 («ToyoSoda», Япония) [10]. Эффект СМП на агрегацию хроматина в присутствии ионов $MgCl_2$ или спермидина выявляли, как описано в [10, 11], по оптическому поглощению при 340 нм; анализировали контрольную фракцию хроматина S2. Взаимодействие СМП с ДНК и хроматином исследовали на колонке $10 \times 0,9$ см с сефадексом G-50, скорость элюции 2 мл/мин, регистрировали оптическое поглощение при 230 нм. О взаимодействии судили по увеличению площади пика ДНК или хроматина в свободном объеме колонки и соответствующему уменьшению пика СМП. Кинетические параметры связывания СМП с ДНК и хроматином рассчитывали с помощью компьютерной программы Enzfitter («Elsevier-Biosoft», Англия). Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами вариационной статистики, используя, в частности, непараметрический метод анализа.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлено распределение содержания СМП у лиц, участвовавших в ликвидации последствий аварии на ЧАЭС. В среднем концентрация СМП в крови превышает норму в 1,5 раза. Судя по известным литературным данным, это может оказывать значительный токсический эффект на различные системы и органы.

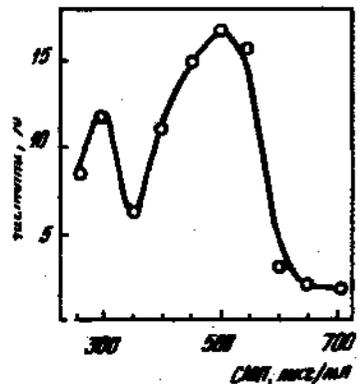


Рис. 1. Содержание (в частотном выражении) СМП в сыворотке крови лиц, участвовавших в ликвидации последствий аварии на ЧАЭС. Данные усреднены до соответствующих величин

В случае, если к изолированным клеткам (обогаченным нейронам) в инкубационную среду добавить СМП, очищенные гель-фильтрацией на сефадексах G-10 и G-50 (данные не приведены, поскольку это общезвестное быстрое фракционирование по молекулярной массе по типу обессоливания) в концентрации 250 мкг/мл, то скорость включения [метил- 3H]ти-

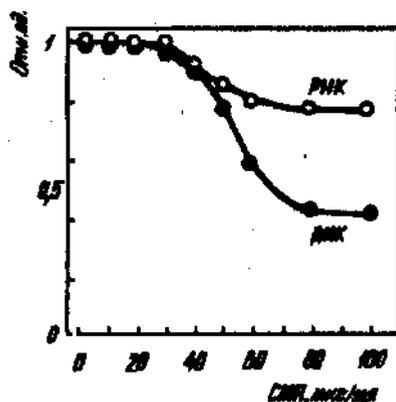
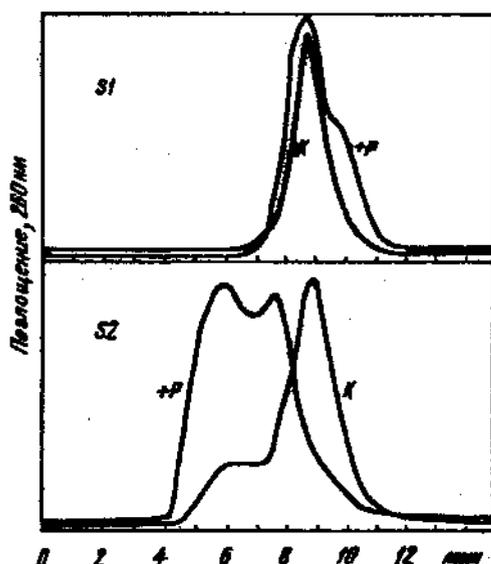


Рис. 2. Обратная фаза хроматография СМ (после фракционирования на G-10 и G-50)

Рис. 3. Влияние СМ на синтез РНК и ДНК в изолированных нейронах

медина снижалась на 60—70 %. Эта особенность была использована в дальнейшем при очистке СМ. Рис. 2 иллюстрирует данные хроматографической очистки СМ на РерРРС. Эффектом подавления синтеза ДНК обладал только пик, элюирующийся в диапазоне 6—9 мин. С точки зрения качества разделения он совершенно не соответствует нормам HPLC-хроматографии. Однако, если принять, что он состоит из достаточно большого числа (минимум 7) пиков, довольно близких по своим свойствам, а именно так представлены в крови СМ, то получаемая картина теоретически будет вполне нормальной. Очищенные подобным образом СМ вызывали снижение скорости синтеза РНК и ДНК. Эффект до некоторого уровня зависел от концентрации СМ (рис. 3). Если учесть, что общий коэффициент очистки СМ равен ~ 8, а верхняя граница нормального содержания СМ в крови составляет 320 мкг/мл, то наличие выраженного достоверного эффекта СМ на матричную активность хроматина (на рис. 3 — 50 мкг/мл) соответствует 25 %-му превышению содержания СМ в сыворотке крови относительно максимальной нормы.

На рис. 4 приведены данные о влиянии СМ на структуру хроматина. В контрольной пробе фракция S1 состояла практически из одного пика



моонуклеосом. В состав фракции S2 входила до 35 % полимерного материала, соответствующего 6—8 нуклеосомам, т. е. нуклеомеру [12], и основной пик моонуклеосом. Препарация изолированных ядер с СМ оказывала определенный эффект на чувствительность хроматина к действию ДНКазы II. Во фракции S1 появляется низкомолекулярное «шлецо», а в S2 пик

Рис. 4. Гель-фильтрация растворимых фракций хроматина после обработки ядер ДНКазой II. К — контроль; +P — препарация с СМ

нуклеомеров и особенно нуклеодисом становится хорошо выраженным, в то время как пик мононуклеосом практически отсутствует. При этом следует учесть, что относительное содержание фракций не изменялось и составляло в обоих случаях 5 % (S1) и 34 % (S2) от общего содержания ДНК. Появление низкомолекулярной компоненты во фракции S1 можно объяснить взаимодействием СМП с ДНК в рамках кор-частицы нуклеосомы, вследствие чего происходит частичное освобождение ДНК от гистонов и появляются дополнительные сайты доступности ДНКазе. Поскольку ДНКазы II гидролизует только двухцепочечную ДНК, надо полагать, что СМП могут довольно эффективно конкурировать с гистонами за фосфаты ДНК, образуя при этом своеобразные стабильные пробелы, свободные от всякого взаимодействия. В то же время эффект СМП на более компактный хроматин в какой-то мере противоположен: СМП способствуют межнуклеосомным контактам и формированию устойчивых наднуклеосомных структур в рамках естественных наднуклеосомных образований, какими являются нуклеодисома и нуклеомер.

Чтобы попытаться выяснить механизмы таких эффектов были проведены исследования по влиянию СМП на агрегацию хроматина в присутствии ионов Mg и полиамина спермидина. Известно, что двухвалентные катионы вызывают внутримолекулярную конденсацию, а полиамины (спермин, спермидин) — латеральную ассоциацию нуклеосомных цепей [11], что позволяет дифференцировать эти процессы и оценивать некоторые структурные свойства хроматина, касающиеся процессов формирования наднуклеосомных образований. СМП значительно модифицируют чувствительность хроматина к действию ионов Mg и спермидина (рис. 5), в частности, наблюдается более высокий уровень его агрегации. Характерно, что при этом СМП самостоятельно не влияли на это свойство хроматина, о чем свидетельствует отсутствие эффекта в нулевой точке, т. е. когда в растворе присутствуют только хроматин и СМП, а $MgCl_2$ или спермидин еще не добавляли.

Таким образом, СМП способствуют переходу хроматина в более компактное состояние, а также формированию стабильных наднуклеосомных структур. Меньшую доступность хроматина действию ДНКазы после инкубации ядер с СМП можно рассматривать как результат определенного воздействия СМП на структуру хроматина и модификации его свойств. Несомненно, это возможно только в том случае, если СМП достаточно специфично взаимодействуют с хроматином. Для исследования этого вопроса были проведены эксперименты по количественной оценке взаимодействия СМП с хроматином, а также со структурными его компонентами — ДНК и гистонами. Прежде всего необходимо отметить, что не удалось выявить какого-либо взаимодействия СМП с гистонами (коровыми и H1) и одноцепочечной ДНК. Взаимодействие СМП с ДНК подчиняется обычным законам лиганд-акцепторного связывания, и зависимость количества связанных СМП от их общей концентрации носит типичный гиперболический характер (рис. 6).

Для корректного проведения расчетов параметров связывания были сделаны следующие допущения. СМП, как уже отмечалось, гетерогенны по молекулярной массе, и средняя молекулярная масса их может быть принята равной 2 кДа или 17 аминокислотным остаткам. Трансформируя полученные графики, были рассчитаны константы ассоциации СМП с ДНК и хроматином, а также стехиометрия связывания и коэффициент Хилла. Максимальный уровень связывания СМП с ДНК составлял 12 мкмоль/л. Если это соотносить с концентрацией ДНК (в ходе измерений концентрацию ДНК и хроматина не изменяли и она составляла 860 мкмоль/л фосфатов ДНК), то получим, что со свободной ДНК СМП связываются в молярном соотношении, равном 1:36. Как известно, молекулярная длина одной пеп-

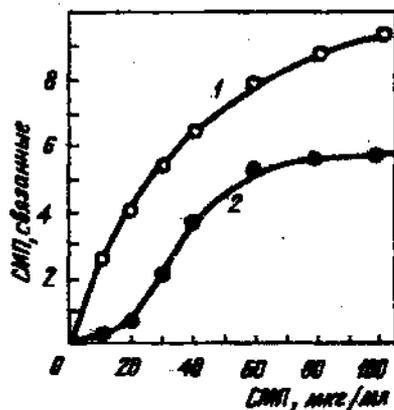
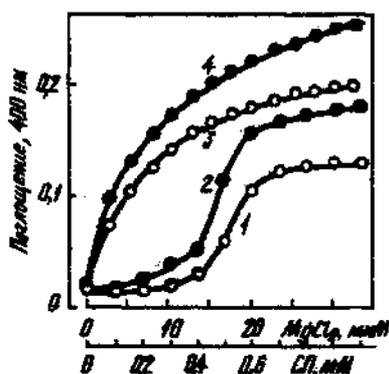


Рис. 5. Влияние СМП на агрегацию хроматина (фракция S2, контроль) под воздействием $MgCl_2$ (1, 2) и спермидина (СП) (3, 4); 1 и 3 — контроль

Рис. 6. Крепкие связывания СМП с ДНК (1) и хроматином (2)

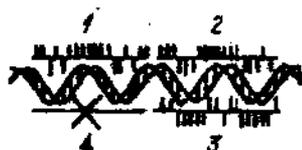


Рис. 7. Возможное взаимное расположение связанных с ДНК СМП. СМП связываются вдоль молекулы ДНК относительно положения 1 в положении 2 или 3, но не 4

тидной связи составляет около 0,29 нм, а расстояние между двумя парами оснований в ДНК — 0,36 нм. На основании этих величин несложно рассчитать, что длина участка ДНК, приходящаяся на один СМП в условиях насыщения, соответствует средней длине одного СМП. Это значит, что СМП способны полностью покрыть молекулу ДНК. При этом характерно, что при условии отсутствия каких-либо преимущественных сайтов связывания на ДНК СМП могут связываться только вдоль молекулы ДНК: относительно положения 1 (рис. 7) — в положении 2 или 3, но не 4. В противном случае должно существовать значительное количество участков ДНК, с которыми СМП вообще не связываются. Кривая связывания СМП с ДНК в составе хроматина имеет S-образный вид (см. рис. 6), т. е. отмечается кооперативный тип связывания с коэффициентом Хилла 3,8. Характерно, что константа ассоциации СМП со свободной ДНК и с хроматином практически совпадает и составляет около 38 мкмоль/л. Это дополнительно подтверждает, что СМП в составе хроматина взаимодействуют практически только с ДНК. Вместе с тем, максимальный уровень связывания СМП с хроматином в два раза ниже, чем со свободной ДНК, и составляет 1 : 73. Исходя из известных размеров нуклеосом хроматина клеток коры головного мозга (около 170 пар оснований), с одной нуклеосомой связываются четыре СМП. По-видимому, в результате связывания происходит частичная диссоциация гистонов и нарушение структуры кор-частицы нуклеосомы. Об этом свидетельствует возникновение дополнительных сайтов ДНК в составе нуклеосомы, доступных действию ДНКазы II (см. рис. 4). Таким образом, СМП способны эффективно влиять на структурную организацию хроматина. Их действие проявляется двояко. С одной стороны, СМП вызывает компактизацию хроматиновых фибрилл и стабилизацию наднуклеосомных; с другой — активно конкурируют с гистонами за ДНК и

частично разрушают нуклеосомы. Вероятно, ингибирование ДНК-полимеразной активности СМП обусловлено именно нарушением пространственной организации хроматина, хотя, естественно, не исключен прямой эффект СМП на ДНК-полимеразу.

Известно, что активность репаративных процессов в клетках мозга очень высока и протекает, в основном, по типу эксцизии [13]. Поэтому уровень репаративного синтеза ДНК определяется двумя независимыми факторами: числом мест инициации репаративного синтеза и размером участка на одной из цепей ДНК, который подвергается последовательно вначале гидролизу ДНКазами, а затем ресинтезу с использованием второй (неповрежденной) цепи как матрицы. В том случае, если имеет место первый вариант, снижение ДНК-синтетической активности под влиянием СМП автоматически приведет к довольно быстрому накоплению нерепарированных изменений в первичной структуре ДНК. Это, в свою очередь, может стать причиной многочисленных стохастических генетических изменений функций клеток и всего организма, включая развитие онкологических заболеваний. В последнее время было показано, что ядерная ДНК репарируется неслучайным образом [14]. В частности, уровень репарации транскрипционно активных участков ДНК репарируется почти в 4 раза более интенсивно, нежели остальная часть. В связи с этим реальный токсический эффект СМП, согласно полученным результатам, значительно выше, несмотря на исходно стохастическую направленность действия. Реализацию второго варианта можно распенивать как включение определенной системы «энергетической экономии», являющейся по своей сути компенсаторной реакцией. В любом случае, причиной обоих изменений могут быть не только изменения свойств ферментов — участников процесса транскрипции и репарации. Вполне возможно, что это обусловлено чисто стерическими препятствиями, т. е. нарушениями в структуре хроматина.

О. Ф. Протас

ВПЛИВ СЕРЕДНЬОМОЛЕКУЛЯРНИХ ПЕПТИДІВ КРОВІ НА СТРУКТУРУ ТА МАТРИЧНУ АКТИВНІСТЬ ХРОМАТИНУ

Резюме

Досліджено ефект середньомолекулярних пептидів, виділених із сироватки крові осіб, що брали участь у ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС, на просторову організацію та матричну активність хроматину ядер нейронів кори головного мозку щурів. Пептиди пригнічують репаративний синтез РНК і ДНК, сприяють переходу хроматину до конденсованого стану, порушують його нуклеосомну організацію. Показано, що пептиди досліджуваної групи зв'язуються з ДНК хроматину кооперативним чином ($K_{ac} = 1,8$ мкмоль/л; $n_{Хіт} = 3,8$). З однією нуклеосомою максимально можуть зв'язатися чотири молекули пептида. Зв'язування пептидів з ДНК носить некооперативний характер, але має майже таку саму K_{ac} , як і для хроматину.

A. Protas

THE EFFECT OF "MEDIUM-SIZED-PEPTIDES" OF SERUM ON CHROMATIN STRUCTURE AND TAMPLET ACTIVITY

Summary

The effect of serum "medium-sized-peptides" on RNA and DNA synthesis and chromatin binding in isolated cortical neurones was investigated. Peptides were purified from the serum of individuals exposed to radioactivity following the Chernobyl accident. It was showed that peptides inhibited RNA and DNA synthesis and altered nucleosomal and supranucleosomal chromatin structure according to test with DNase II. MSP bound chromatin DNA in cooperative manner, an average K_{ass} is 36 g/ml and Hill's coefficient is 3.8. About four can bind with one nucleosome. Binding of peptides with free DNA is not cooperative, but with about the same K_{ass} .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Кшишун А. А., Кудынова А. С., Офитова А. Ф., Мишура Р. Б.* Значение средних молекул в оценке эндогенной интоксикации // *Военно-мед. журн.*—1990.—2.—С. 41—44.
2. *Туликова Э. А.* Эндогенные токсины пептидной природы // *Вопр. мед. химии.*—1983.— № 1.—С. 2—10.
3. *Николайчик В. В., Моин В. М., Кирковский В. В. и др.* Способ определения «средних молекул» // *Лаб. дело.*—1991.—10.—С. 13—18.
4. *Boval H. G.* Antibacterial peptides: key components needed in immunity // *Cell.*—1991.— 65.—Р. 205—207.
5. *Romeo D., Skerlavi B., Bolognesi M., Gmaro R.* Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils // *J. Biol. Chem.*—1988.—263, N 20.—Р. 9573—9575.
6. *Malachi T., Zevin D., Gafter U. et al.* DNA repair and recovery of RNA synthesis in uremic patients // *Kidney Int.*—1993.—44.—Р. 385—389.
7. *Kubat B., Maren G. M., Von der Decken A.* DNA-dependent RNA polymerases from rat brain, in glial and neuronal cell-enriched fractions, after protein restriction // *J. Neurochem.*— 1978.—31.—Р. 114—1148.
8. *Протас А. Ф.* Влияние низких доз облучения на синтез ДНК, РНК и белков в клетках коры головного мозга // *Укр. биохим. журн.*—1995.—35, № 4.
9. *Протас А. Ф., Чагло П. П.* Влияние низких доз внешнего гамма-облучения на структуру хроматина и активность гистон-специфических протеиназ клеток головного мозга крыс // *Радиобиология.*—1991.—31, № 6.—С. 733—738.
10. *Протас А. Ф., Чагло П. П.* Структура и свойства хроматина ядер клеток головного мозга крыс после гамма-облучения в дозе 1 Гр // *Укр. биохим. журн.*—1992.—64, № 34.— С. 34—38.
11. *Marquet R., Colson P., Matten A. M. et al.* Comparative study of condensation of chick erythrocyte and calf thymus chromatin by di- and multivalent cations // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*—1988.—5, N 4.—Р. 839—857.
12. *Кирянов Г. И., Смирнова Т. А., Полякова В. Ю.* Nucleomeric organization of chromatin // *Eur. J. Biochem.*—1982.—124, N 2.—Р. 331—338.
13. *Лихачев А. П.* Возрастные особенности репарации повреждений ДНК, вызванные канцерогенными агентами // *Успехи соврем. биологии.*—1990.—116, № 2(5)—С. 180—191.
14. *Xu J., Manning F. C. R., Patierno S. R.* Preferential formation and repair of chromium-induced DNA adducts and DNA-protein crosslinks in nuclear matrix DNA // *Carcinogenesis.*—1994.— 15, N 7.—Р. 1443—1450.