

УДК 577.214

П.А.Ивашкина (4 курс, каф. ФХОМ), Н.П.Терюкова, к.б.н. (ИнЦ РАН)

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О НЕГИСТОНОВЫХ БЕЛКАХ ХРОМАТИНА КАК ФАКТОРАХ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ

Все соматические клетки отдельно взятого организма содержат одинаковую генетическую информацию. В процессе дифференцировки, однако, значительные участки ДНК оказываются инактивированными и лишь небольшая часть генома остается активной в ходе транскрипции. Механизм избирательной активации генов до сих пор однозначно не выяснен, однако экспериментальные данные свидетельствуют о том, что белки хроматина играют важную роль в процессах дифференцировки, онкогенеза и генной регуляции. С начала 70-х годов были проведены многочисленные исследования негистоновых белков хроматина (НГБ), в ходе которых были получены прямые и косвенные доказательства регуляторной роли НГБ. НГБ являются весьма гетерогенной группой белков. Вполне естественно, что белки, входящие в такую гетерогенную группу, выполняют в ядре самые разнообразные функции. Большое число НГБ играет в хроматине структурную роль. Также в состав НГБ входит целый ряд ферментов, таких как: ДНК-полимераза, РНК-полимераза, различные нуклеазы, топоизомеразы, метилазы, протеазы, киназы, поли (АДФ-рибозо) полимераза, ацетилазы, деацетилазы и другие ферменты, субстратами для которых служат как хромосомные белки, так и ДНК. Значительные изменения фракционного состава НГБ происходят в связи с их постсинтетическими модификациями, такими как ацетилирование, метилирование, фосфорилирование и другими. Эти изменения и служат, по-видимому, одной из причин такой значительной гетерогенности этого класса белков. Фосфорилирование негистоновых белков среди всех модификационных процессов играет заметную роль в регуляции активности генетического аппарата. Что касается спектра процессов, в которые вовлекаются фосфорилированные НГБ, то он достаточно широк и включает в себя и регуляцию транскрипции, и контроль клеточного цикла, и изменение структурной организации хроматина в процессах жизнедеятельности клетки. Косвенным указанием на регуляторную роль фосфорилированных белков служат значительные различия их электрофоретических спектров в различных тканях. Другим не менее важным моментом является изменение уровня фосфорилирования в ходе процессов, связанных с дифференцированной экспрессией генов, таких как пролиферация, дифференцировка, опухолевый рост и др. Повышение уровня фосфорилирования НГБ наблюдается в пролиферирующих клетках, в ходе канцерогенеза и опухолевой трансформации. Известно, что процесс опухолевой трансформации характеризуется значительными изменениями антигенного состава тканей: антигенная дивергенция, антигенное упрощение и антигенная реверсия. Не вызывает сомнения тот факт, что воздействие канцерогенами еще до появления опухоли приводит к значительному сдвигу спектров НГБ в сторону опухолевого фенотипа. В связи с этим большой интерес вызывают работы по изучению однократного воздействия канцерогенов и вызванные этим изменения НГБ.

В работе уделяется внимание проблеме гетероорганных антигенов: появление в гепатоцеллюлярных опухолях и печени крыс после однократного введения гепатоканцерогенов гетероорганных антигенов почечной природы. Изучение свойств препаратов НГБ, содержащих гетероорганные антигены почечной природы, показали, что в малигнизированных клетках печени обнаруживаются не свойственные клеткам нормальной печени, но присутствующие в

нормальной почке, фракции НГБ, обладающие фосфопротеинкиназной активностью, гетероорганное по отношению к интактной печени НГБ-антигены почечной природы. Следовательно, эти антигены и есть фосфопротеинкиназы. Была доказана иммунологическая идентичность фракций НГБ, обладающих фосфопротеинкиназной активностью, и НГБ-антигенов почечной природы, с помощью метода радиоактивного мечения и реакции специфической задержки преципитации в агарозе. Определение молекулярной массы этих белков дало в результате, что их основным компонентом является фосфорилированный белок с молекулярной массой около 23 кДа. Обнаружены мембранные гетероорганное антигены почечной природы, которые появляются в одинаковые сроки после воздействия канцерогеном с негистоновыми антигенами. Синтез мембранных белков почечной природы является следствием появления НГБ-антигенов почечной природы.

Были получены препараты негистоновых белков из хроматина нормальных и опухолевых тканей крыс. Из гомогенатов тканей почек и печени извлекали фракции чистых ядер для дальнейшего получения дегистонизированного хроматина (комплекса НГБ-ДНК) и выделения свободных от ДНК препаратов НГБ. Фракционирование НГБ производили на колонках с фосфоцеллюлозой. Элюцию колонки проводили при линейно нарастающей концентрации NaCl от 0.1 до 1.0 М. Использовали фракции, элюируемые 0.4-0.5 М NaCl и соответствующие гетероорганное НГБ-антигенам почечной природы. Проводили эксперименты по изучению влияния НГБ на пролиферативную активность нормальных гепатоцитов крыс. Полученные результаты свидетельствуют о наличии стимулирующего влияния изучаемых факторов на пролиферацию. Методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа определяли специфичность полученных ранее иммуносывороток по отношению к НГБ клеток печени, почек и гепатомы Зайдела. В качестве вторых антител использовали ослиные антитела против IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена. Субстратом для появления цветной реакции служил ортофенилдиамин. Интенсивность развития окраски оценивали при помощи фотометра с вертикальным лучом при длине волны 492нм. Далее планируется изучение негистоновых белков методом масс-спектрометрии, частичное определение аминокислотной последовательности по трипсическим фрагментам, установление физико-химических свойств и роли в развитии опухолевой трансформации.