

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXI, 14

SECTIO D

1976

Zakład Chemii Fizjologicznej, Instytut Chemii Podstawowych, Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Tomasz Borkowski

Marta STRYJECKA-ZIMMER
Halina MARMUROWSKA, Rafał STRYJECKI

Analiza histonów mózgowych zwierząt młodych i dorosłych

Анализ мозговых гистонов животных разного возраста

An Analysis of the Histones Obtained from Calf and Bovine Brains

Na podstawie ostatnio przeprowadzonych badań można sądzić, że histony pochodzące z różnych tkanek i różnych gatunków zwierząt charakteryzują się niejednakową ilością i stężeniem podfrakcji wykrywanych w głównych komponentach i ich strukturą 1 — rzędową (3, 6, 10, 12, 14). Wykazano również wyraźne różnice w obrazach elektroforetycznych histonów pochodzących z tych samych tkanek w trakcie rozwoju osobniczego zwierząt (11, 14). Celem naszych badań była porównawcza analiza histonów izolowanych z jąder komórek mózgowych zwierząt młodych i dorosłych.

MATERIAŁ I METODY

Do doświadczeń używano mózgów cieląt 5—6-tygodniowych i mózgów zwierząt dorosłych (w wieku 3—4 lat). Mózgi, uzyskane natychmiast po dekapitacji zwierząt, umieszczano w pojemnikach z lodem. Całą dalszą preparatykę przeprowadzano w temp. 0—4°C. Jądra komórek mózgowych izolowano metodą sacharozową (9) poprzez dwukrotne wirowanie homogenatów tkankowych w 0,44 M sacharozie w buforze 0,01 M Tris-HCl pH 7,2 z 0,001 M MgCl₂, a następnie w 1,8 M sacharozie w buforze Tris-HCl. Z uzyskanego preparatu jąder komórkowych prowadzono ekstrakcję histonów przy pomocy 0,25 n HCl (15). Kwaśny ekstrakt białkowy frakcjonowano przez kolejne precypitacje TCA do stężenia 5% (frakcja A), a następnie do stężenia 20% (frakcja B). Dla otrzymania histonu całkowitego kwaśny ekstrakt białkowy precypitowano TCA przy końcowym stężeniu 20%. Preparaty białkowe przemywano następnie acetonem i suszono pod próżnią. Pomiarzy zawartości białka wykonywano

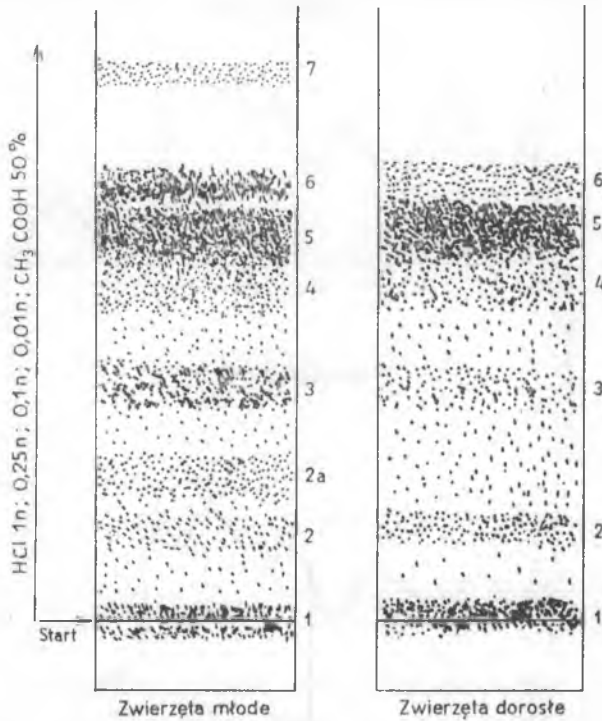
metodą spektrofotometryczną wg W a d e l l a (16) lub metodą L o w r y (8). W otrzymanych frakcjach białek zasadowych oznaczano elektrochromatograficznie po kwaśnej hydrolizie jakościowy skład aminokwasowy (5). Ilościowe oznaczenia aminokwasów zasadowych lizyny i argininy przeprowadzano metodą F i s c h e r a i D ö r f e l a (4). Dla dokładniejszego scharakteryzowania preparatów histonów mózgowych (histonu całkowitego oraz frakcji A i B z mózgów cielęcych i wołowych) rozdzielano je metodą chromatografii gradientowej według B a u e r a (1). Na bibułę Whatmann Nr 1 nanoszono pasmowo około 50 µg białka na 1 cm i rozwijano techniką wstępującą jednokierunkową. Chromatogramy rozwijano kolejno bez suszenia w zestawie układów: HCl 1 n, HCl 0,25 n, HCl 0,1 n, HCl 0,01 n, i CH₃COOH 50%. Chromatografię w każdym układzie prowadzono przez 20 minut. Bibułę po zakończeniu rozwijania suszono i następnie barwiono alkoholowym roztworem biękitu bromofenolowego. Chromatogramy płukano następnie w 0,5% CH₃COOH i suszono nad parami amoniaku. Z chromatogramów wykonywano wykresy densytometryczne przy pomocy densytometru firmy MGF Berlin, typ AKF. Histonu całkowitego i frakcje uzyskane strącaniem TCA dzieliły się w trakcie chromatografii na podfrakcje, dla których określano współczynniki R_f. Dla określenia względnego stężenia białka w poszczególnych podfrakcjach wycinano zabarwione pasma z chromatogramów, eluowano w metanolu, a następnie oznaczano ekstynkcję przy 578 nm w spektrofotometrze „Uvifott”.

WYNIKI BADAŃ

Ze 100 g tkanki mózgowej cieląt otrzymano około 44,8 mg całkowitego białka histonowego, natomiast ze 100 g tkanki zwierząt dorosłych — 49 mg białka. Frakcjonowane strącanie białka zasadowego izolowanego z mózgów cielęcych i wołowych pozwoliło na uzyskanie 2 frakcji. Frakcja A w obu przypadkach stanowiła około 80% histonu całkowitego, a frakcja B, strącająca się przy 20% nasyceniu TCA — około 20% histonu całkowitego. Jakościowe składy aminokwasowe histonów całkowitych i frakcji uzyskanych z jąder komórek mózgowych cieląt były identyczne jak odpowiednich białek zasadowych z mózgów zwierząt dorosłych.

Ze względu na skład aminokwasowy oraz na podstawie rozdziału chromatograficznego na kolumnach z CM-celulozy (16) można stwierdzić, że w skład frakcji A wchodziły histony umiarkowanie lizynowe oraz bogate w argininę. Stosunek liz/arg w mózгах zwierząt młodych wynosił 0,85, a w mózгах zwierząt dorosłych 0,9. Frakcja B zawierała natomiast histony bogate w lizynę, stosunek liz/arg w mózгах zwierząt młodych wynosił 5,25, a dorosłych — 5,8. Histonu całkowitego i ich frakcje dzieliły się w trakcie chromatografii gradientowej na podfrakcje, przy czym liczba podfrakcji i ich stężenie w badanych preparatach białek były niejednakowe. Załączone ryciny ilustrują rozdział chromatograficzny histonu całkowitego uzyskanego z mózгów zwierząt młodych i dorosłych oraz krzywe densytometryczne uzyskane z chromatogramów (ryc. 1, 2, tab. 1).

W histonie całkowitym z mózгów zwierząt młodych wykrywano 8 pod-

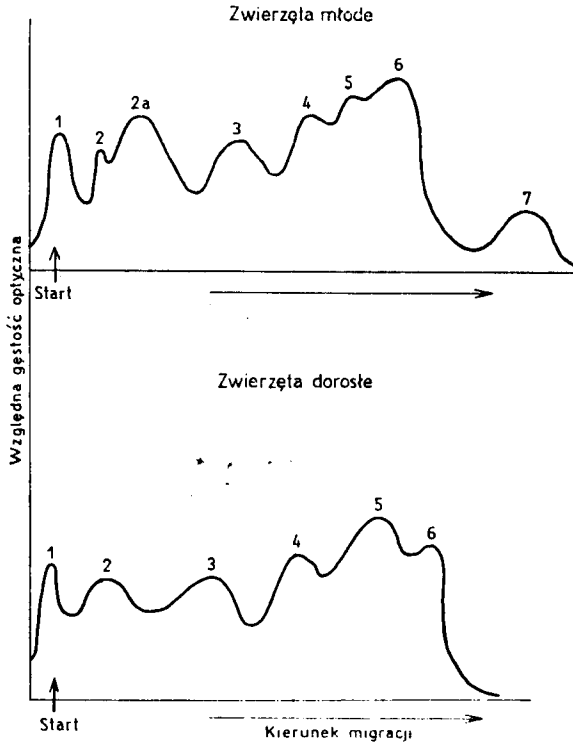


Ryc. 1. Schematy rozdziału chromatograficznego histonów całkowitych z mózgow zwierząt młodych i dorosłych
 Schemes of the chromatographic separation of total histones obtained from calf (on the left) and adult bovine brain

Tab. 1. Wartość R_f i procentowa zawartość podfrakcji w histonie całkowitym
 R_f values and percentage subfraction content in total histones from calf and bovine brains

Nr podfrakcji	Zwierzęta młode		Zwierzęta dorosłe	
	R_f	%	R_f	%
1	0,00	5,2	0,00	8,2
2	0,05	4,7	0,05	4,7
2a	0,18	18,6	—	—
3	0,30	15,5	0,27	14,3
4	0,51	14,8	0,48	25,3
5	0,64	20,5	0,65	36,5
6	0,79	14,2	0,78	11,0
7	1,00	6,5	—	—

frakcji, podczas gdy w histonie z mózgow zwierząt dorosłych tylko 6 podfrakcji, przy czym nie wykazywano obecności podfrakcji 2a i 7. Pozostałe podfrakcje wykazywały znaczne podobieństwa współczynników R_f , można je więc było potraktować jako odpowiadające sobie. W obu preparatach



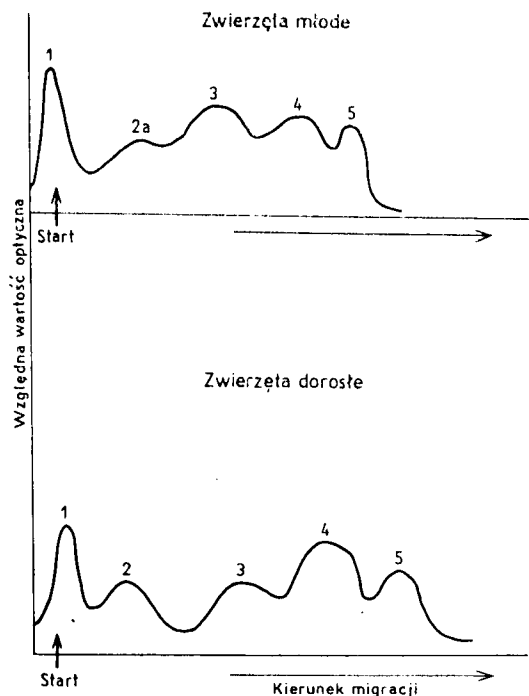
Ryc. 2. Densytometryczny profil rozdziału chromatograficznego histonów całkowitych
Densitometric tracing of chromatographic separation of total histones obtained from calf (top) and adult bovine brain (bottom)

Tab. 2. Wartość R_f i procentowa zawartość podfrakcji we frakcji A histonów mózgowych
 R_f values and percentage subfractions in fraction A histones obtained from calf and bovine brains

Nr podfrakcji	Zwierzęta młode		Zwierzęta dorosłe	
	R_f	%	R_f	%
1	0,00	15,3	0,00	20,0
2	—	—	0,06	11,1
2a	0,16	19,1	—	—
3	0,30	32,3	0,25	20,2
4	0,50	21,2	0,47	34,5
5	0,63	12,1	0,64	14,2
6	—	—	—	—
7	—	—	—	—

najwyższe stężenie białka było we frakcji 5, z tym, że w histonach mózgow wołowych jej stężenie było prawie dwa razy wyższe niż w histonach mózgow cielęcych (ryc. 3, tab. 2).

We frakcji A histonów mózgow cielęcych nie wykazywano podfrakcji



Ryc. 3. Densytometryczny profil rozdzielania chromatograficznego frakcji A histonów
 Densitometric tracing of chromatographic separation of fraction A obtained from calf (top) and adult bovine brain (bottom)

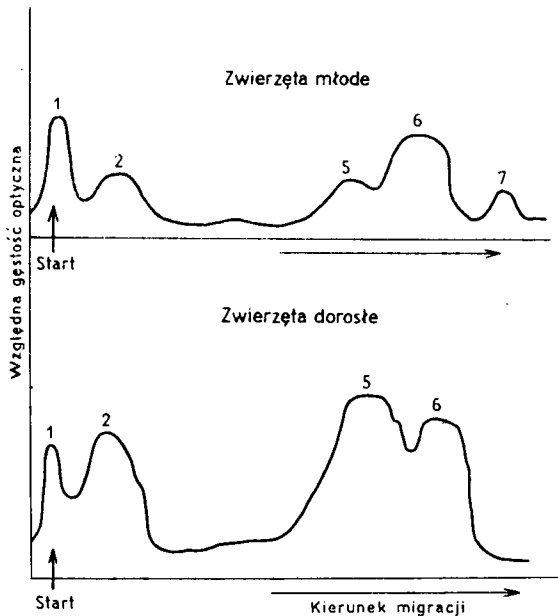
2, 6 i 7, natomiast w histonie z mózgów wołowych nie było podfrakcji 2a i 7 (podobnie jak w preparacie histonu całkowitego) oraz podfrakcji 6. Najwyższe stężenie białka we frakcji A w histonie cielęcym wykazywała podfrakcja 3, a w histonie wołowym podfrakcja 4 (ryc. 4, tab. 3).

Frakcja B białka histonowego cieląt zawierała 5 podfrakcji, a białka

Tab. 3. Wartość R_f i procentowa zawartość podfrakcji we frakcji B histonów mózgowych

R_f values and percentage subfractions in fraction B histones obtained from calf and bovine brains

Nr podfrakcji	Zwierzęta młode		Zwierzęta dorosłe	
	R_f	%	R_f	%
1	0,00	13,5	0,00	15,8
2	0,06	5,0	0,06	18,9
2a	—	—	—	—
3	—	—	—	—
4	—	—	—	—
5	0,65	30,7	0,65	35,8
6	0,81	36,0	0,80	29,5
7	1,00	14,8	—	—



Ryc. 4. Densytometryczny profil rozdziálu chromatograficznego frakcji B histonów
 Densitometric tracing of chromatographic separation of fraction B histones obtained
 from calf (top) and adult bovine brain (bottom)

histonowego zwierząt dojrzałych 4 podfrakcje. Najwyższe stężenie białka w histonie cielęcym stwierdzano w podfrakcji 6, a w histonie wołowym w podfrakcji 5.

Z przedstawionych danych wynika, że histony izolowane z mózgów cielęcych różnią się od histonów izolowanych z mózgów zwierząt dorosłych. Zawierają również dwie dodatkowe podfrakcje 2a i 7 a stężenia pozostałych są niejednakowe.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przeprowadzone badania wykazały, że zawartość histonów całkowitych w przeliczeniu na 100 g tkanki mózgowej cieląt i wołów wykazuje wartości zbliżone. Również frakcjonowanie histonów całkowitych za pomocą różnych stężeń TCA czy na kolumnach z CM-celulozą nie wykazało ilościowych różnic między tkanką mózgową zwierząt młodych i dorosłych. Uzyskane frakcje charakteryzował jednakowy skład jakościowy aminokwasów i stosunek ilościowy lizyny do argininy.

Bondy (2) badając zawartość 3 głównych frakcji histonów uzyskanych drogą frakcjonowanej ekstrakcji (f_1 , $f_{2a} + f_3$ i f_{2b}) w mózгах embrio-

nów kurzych i kurcząt w różnym wieku również nie stwierdził istotnych różnic ilościowych. Uzyskane przez niego wartości były zbliżone do procentowego składu histonu grasicy cielęcej. Natomiast zastosowanie dla rozdzielania histonów chromatografii na Amberlicie IRC-50 lub żelu poliakrylamidowego pozwoliło na wykazanie wyraźnych różnic w ilości i stężeniu frakcji i podfrakcji histonów, związane z rodzajem tkanki, gatunkiem i okresem rozwojowym (3, 6, 10, 11, 12, 14). Badania Seale (13) przeprowadzone na rozwijających się zarodkach jeźowca wykazały istnienie wyraźnych różnic w obrazie elektroforetycznym histonów pochodzących z różnych faz rozwojowych.

W przeprowadzonych przez nas badaniach zastosowanie techniki chromatografii gradientowej okazało się pomocne dla wykrycia różnic ilościowych i jakościowych w obrębie podfrakcji histonów pochodzących z mózgów zwierząt młodych i dorosłych. W mózgach cielęcych wykrywano 8 podfrakcji, a w wołowych 6 podfrakcji. Na podstawie określenia współczynników R_f można wnioskować, że w mózgach cielęcych znajdują się dwie dodatkowe podfrakcje, dla których nie było odpowiednich w histonie wołowym. Ponadto odpowiadające sobie wartościami R_f frakcje wykazują różnice ilościowe w obu badanych preparatach histonowych. Wyniki badań Gaitonde i Martensona (7) przeprowadzonych na mózgach szczurów w różnym wieku wskazują również na możliwość zmian w stężeniu i ilości podfrakcji histonów w trakcie rozwoju osobniczego zwierząt. Istnieje więc uzasadnienie dla sugestii, że w czasie rozwoju i dojrzewania zwierząt wraz ze zmianą funkcji narządów zachodzą zmiany w niektórych własnościach fizykochemicznych zawartych w nich białek zasadowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Bauer K.: *J. Chromatog.* **32**, 529—542, 1968.
2. Bondy S. C.: *Biochem. J.* **123**, 465—469, 1971.
3. Bustin M., Cole R. D.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 4500—4505, 1968.
4. Fischer F. G., Dörfel H.: *Biochem. Z.*, **324**, 544—566, 1963.
5. Fishl J., Segal S.: *Clinica Chimica Acta*, **8**, 399—405, 1963.
6. Franco L., Montero F., Navlet J. M., Perera J., Rejo M. C.: *Eur. J. Biochem.*, **48**, 55—61, 1974.
7. Gaitonde M. K., Martenson R. E.: *J. Neurochem.*, **17**, 551—563, 1970.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr 9. L., Randall R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275, 1951.
9. Mardell R., Harth S., Borkowski T., Mandel P.: *C. R. Soc. Biol.*, **155**, 1096—1099, 1961.
10. Moss B. A., Joyce W. G., Ingram V. M.: *Biochem. J.*, **248**, 1025—1031, 1973.
11. Neidle A., Waelsch H.: *Science*, **145**, 1059—1061, 1964.
12. Panyim S., Bilek D., Chalkley R.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 4206—4215, 1971.
13. Seale R. L., Aronson A. J.: *J. Mol. Biol.*, **75**, 647—658, 1973.

14. Stellwagen R. H., Cole R. D.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 4456—4462, 1968.
 15. Stryjecka M.: *Acta Bioch. Pol.*, **18**, 237—241, 1971.
 16. Stryjecka M.: *Otrzymywanie i charakterystyka histonów z jąder komórek mózgowych — praca doktorska*, 1970.
- Otrzymano 24 IV 1975.

РЕЗЮМЕ

Изучались гистоны, выделенные из ядер мозговых клеток 2-месячных телят и 3-летних коров. Гистоны извлекались из очищенных ядер осаждением 0,25 н HCl и фракционировались при помощи трихлоруксусной кислоты на две фракции (А и Б). Суммарные ядерные гистоны и фракции А и Б при помощи градиентной хроматографии по методу Бауэра делились на подфракции. Кроме того, были выполнены денситометрические диаграммы. Сравнивались качественные и количественные соотношения субфракции в этих белках в процессе постнатального развития животных. Установлены различия в количествах и концентрации белковых подфракций у молодых и взрослых животных.

SUMMARY

Comparative studies on cerebral histones isolated from nuclei of calf and adult bovine brains were performed. Histones were obtained from purified nuclei by acidic extraction, and subsequently fractionated in A and B histone fractions by differential TCA precipitation. Fractions were characterized by the amino acid composition and chromatography according to Bauer. Histones isolated from calf and bovine brains although similar in many aspects differ markedly in the quantitative and qualitative content subfractions.