

Marta STRYJECKA-ZIMMER,
Tomasz BORKOWSKI

**Dynamika fosforylacji histonów mózgu i wątroby kurcząt
w trakcie embriogenezy**

Динамика фосфорилирования гистонов мозга и печени цыплят во время
эмбриогенеза

Phosphorylation of Liver and Brain Histones during Embryogenesis

Histony są białkami, którym przypisuje się centralną rolę w utrzymywaniu struktury chromosomów. Liczne postsyntetyczne modyfikacje, którym ulegają histony wywołują zmiany w strukturze chromatyny i w wielu przypadkach skorelowane są z procesami transkrypcji i mitozy.

W poprzednich naszych pracach stwierdzono fosforylację wszystkich frakcji histonów w tkance mózgowej zwierząt dorosłych (13) oraz znacznie intensywniejszą fosforylację histonów w tkankach embrionalnych (14). Celem obecnej naszej pracy było prześledzenie dynamiki włączania radioaktywnego fosforanu w trakcie embriogenezy do histonów mózgowych i wątrobowych zarodków kurzych.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzano na 5-, 9-, 12-, 15- i 19-dniowych zarodkach kurzych, którym podawano przez komorę powietrzną [^{32}P]P_i po 80 μCi w 0,1 ml 0,9% NaCl. Do jednego eksperymentu używano 50 embrionów. W 4 godz. po podaniu izotopu embriony dekapitowano oraz preparowano mózgi i wątroby. Jądra komórek mózgowych i wątrobowych uzyskiwano wg uprzednio opisanych metod (13). Preparatykę przeprowadzano w temp. 0–4°C. Jądra komórkowe przemywano kilkakrotnie roztworem 0,14 M NaCl w 0,01 M cytrynianie sodu. Histony ekstrahowano przez 1 godz. 0,4n H₂SO₄, a następnie precypitowano 5 objętościami etanolu i pozostawiano na 12 godz. w temp. –15°C. Białka odwirowywano, przemywano zakwaszonym acetonem i suszono pod próżnią. Preparaty białek poddawano frakcjonowaniu wg metody Olivera i wsp. (10) i otrzymywano frakcje: F₁, F_{2b} i F_{3+2a}. Porównawczo, w eksperymencie wykonanym na 15-dniowych embrionach kurzych, przeprowadzano

ekstrakcję histonów całkowitych z jąder komórek mózgowych i wątrobowych za pomocą 0,25n HCl. Białka precypitowano kwasem trójchlorooctowym do stężenia końcowego 20%. Histony frakcjonowano na CM-celulozie, pre-swollen (13). Zawartość białka w uzyskanych preparatach histonów oznaczano metodą Lowry (8). Białka rozdzielano elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym wg Panyima i Chalkleya (11) oraz rejestrowano denzytometrycznie przy użyciu aparatu Kippa i Zonena. Radioaktywność preparatów mierzono w liczniku scyntylacyjnym „Intertechnique” w próbkach zawierających 100–500 μ g białka naniesionego na bibułę Whatmann nr 3 w scyntylatorze o składzie: 5 mg PPO, 0,2 mg POPOP, 5 ml toluenu. Aktywność specyficzną preparatów oznaczano w imp/min/mg białka.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Dane dotyczące wydajności preparatyki przy ekstrakcji histonów z jąder komórek mózgowych i wątrobowych 0,4n H_2SO_4 oraz wbudowywania $[^{32}P]$ do histonów całkowitych i frakcji uzyskanych metodą Olivera zestawiono w tab. 1 i 2.

Tab. 1. Wbudowywanie $[^{32}P]$ do histonów mózgowych w czasie embriogenezy (frakcje preparowano wg Olivera i wsp.)

Incorporation of $[^{32}P]$ into histones of chick embryo brain during embriogenesis (histone fractions obtained by the method of Oliver et al.)

Dni rozwoju embrionalnego	mg białka na 100 g tkanki	Aktywność specyficzna histonów: jąder %	Radioaktywność w imp/min/mg białka			
			histon całkowity	F ₁	F _{2b}	F _{3+2b}
5	170	2,5	5200	—	—	—
9	120	2,2	985	1000	809	443
12	120	2,7	150	165	100	50
15	80	2,0	120	150	120	26
19	70	0,8	100	108	97	20

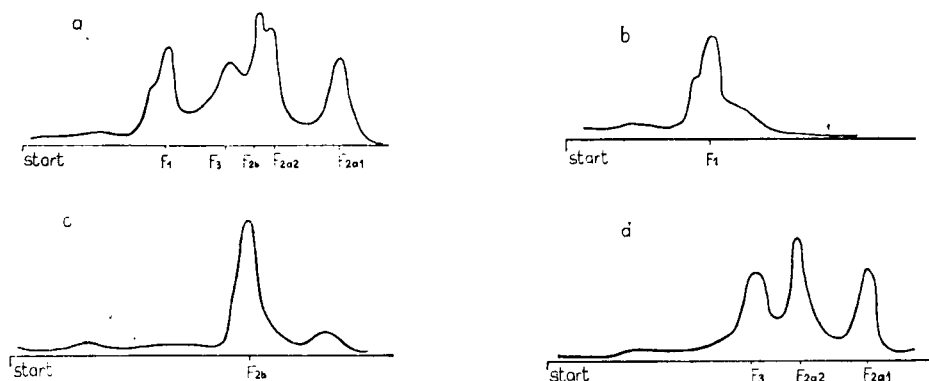
Podane wyniki stanowią średnią z 3 doświadczeń.

Tab. 2. Wbudowywanie $[^{32}P]$ do histonów wątrobowych w czasie embriogenezy (frakcje preparowano wg Olivera i wsp.)

Incorporation of $[^{32}P]$ into histones of chick embryo liver during embriogenesis (histone fractions obtained by the method of Oliver et al.)

Dni rozwoju embrionalnego	mg białka na 100 g tkanki	Aktywność specyficzna histonów: jąder %	Radioaktywność w imp/min/mg białka			
			histon całkowity	F ₁	F _{2b}	F _{3+2b}
9	220	2,6	2370	—	—	—
12	180	1,3	250	515	189	88
15	130	1,3	160	250	190	45
19	110	0,9	90	194	92	31

Podane wyniki stanowią średnią z 3 doświadczeń.



Ryc. 1. Densytometryczny profil rozdziału elektroforetycznego; a — histon całkowity, b — F_1 , c — F_{2b} , d — $F_3 + F_{2a}$
 Densitometric tracing of electrophoretic separation; a — total histone, b — F_1 , c — F_{2b} , d — $F_3 + F_{2a}$

Zarówno ilość uzyskanego białka, jak i intensywność fosforylacji zależą od wieku zarodka. Tkanka mózgowa zarodków 5-dniowych zawiera 2,5 raza więcej białka histonowego w porównaniu z zarodkami 19-dniowymi, podobnie maleje zawartość białek histonowych w tkance wątrobowej między 9 i 19 dniem rozwoju (w przeliczeniu na 100 g świeżej tkanki). Porównanie przeprowadzonej *in vivo* inkorporacji [^{32}P] P_i do histonów całkowitych mózgowych i wątrobowych wykazało, że najintensywniej fosforylują się histony izolowane z tkanek najmłodszych, 5- i 9-dniowych. W trakcie rozwoju embrionalnego stwierdza się znaczny spadek aktywności [^{32}P] w białkach. Zmniejsza się również procent wbudowywania radioaktywnego fosforanu do histonów w stosunku do fosforanu włączanego do całej frakcji jąder komórkowych. W embrionach 5-dniowych aktywność specyficzna histonów mózgowych stanowiła 2,5% aktywności znalezionej

Tab. 3. Wbudowywanie [^{32}P] do frakcji histonów mózgowych i wątrobowych (15-dniowe embriony kurze) (frakcje uzyskane po rozdziale na CM-celulozie)
 Incorporation of [^{32}P] into brain and liver histone fractions of 15-day chicken embryos (fractions separated on columns of CM-cellulose)

	Aktywność w imp/min/mg białka	
	Histony mózgowe	Histony wątrobowe
Histon całkowity	112	140
Frakcja I	53,4	88
Frakcja II	30,4	35
Frakcja III	74,6	94
Frakcja IV	106	175

w jądrach, a w embrionach 19-dniowych zaledwie 0,8%. Aktywność specyficzna histonów wątrobowych w embrionach 9-dniowych stanowiła 2,7% całkowitej aktywności jąder i malała do 0,9% w embrionach 19-dniowych.

Aktywność we frakcjach histonów preparowanych wg Olivera określano po uprzednim sprawdzeniu czystości frakcji za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Frakcje F_1 i F_{2b} wykazywały duży stopień czystości, frakcja F_{3+2a} stanowiła mieszaninę frakcji F_3 , F_{2a1} , F_{2a2} (ryc. 1). We frakcjach histonów uzyskanych zarówno z tkanki mózgowej, jak i wątrobowej najwyższą inkorporację stwierdza się we frakcji F_1 , następnie F_{2b} i najniższą we frakcji F_{3+2a} . Aktywność specyficzna tych frakcji malała proporcjonalnie wraz z dojrzewaniem embrionów.

Aktywności specyficzne frakcji histonów uzyskanych po rozdzieleniu na CM-celulozie zestawiono w tab. 3. Frakcja I z kolumny w elektroforezie w żelu poliakrylamidowym stanowiła czystą frakcję F_1 bogato lizynową, frakcja II z kolumny była identyfikowana z frakcją F_{2b} i F_{2a2} . Frakcja III eluowana z kolumny 0,02n HCl w żelu poliakrylamidowym wykazywała zanieczyszczenie frakcją F_{2a2} . Frakcja IV domywana z kolumny 0,2n HCl zawierała głównie frakcję F_{2b} oraz domieszkę frakcji F_3 . Najwyższą aktywność specyficzną w imp/min/mg białka wykazywała frakcja III, eluowana z kolumny 0,02n HCl, oraz frakcja IV, wmywana z kolumny 0,2n HCl. Wyniki te są zgodne z danymi uzyskanymi przez nas uprzednio (13, 14), gdy frakcje histonów otrzymywano na kolumnach z CM-celulozy.

W szeregu dotąd wykonanych prac wykazano możliwość fosforylacji wszystkich frakcji histonów, przy czym intensywność fosforylacji dla poszczególnych frakcji była różna, zależna od cyklu komórkowego aktywności mitotycznej i metabolicznej tkanek (4, 5, 6, 7, 12, 15). W większości przebadanych tkanek najłatwiej ulega fosforylowaniu histon F_1 , zwłaszcza w komórkach, które ulegają częstym podziałom (1, 2, 3). Wpływ na oznaczanie aktywności [32 P] we frakcjach histonów może mieć również metoda ich preparatyki. Wydaje się, że w czasie rozdzielania histonu na CM-celulozie może dochodzić do wiązania fosforanów z celulozą i wmywania ich HCl o wzrastającym stężeniu.

PIŚMIENNICTWO

1. Balhorn R., Chalkley R., Granner D.: *Biochemistry* **11**, 1094—1097, 1972.
2. Balhorn R., Oliver D., Hohmann P., Chalkley R., Granner D.: *Biochemistry* **11**, 3915—3921, 1972.
3. Bradbury E. M., Inglis R. J., Matthews H. R., Sarnier E. M.: *Eur. J. Biochem.* **33**, 131—139, 1973.
4. Fonagy A., Ord M. G., Stocken L. A.: *Biochem. J.* **162**, 171—178, 1973.

5. Gurley L. R., Walters R. A., Tobey R. A.: *J. Cell Biol.* **60**, 356—364, 1974.
6. Levy-Wilson B., Gjerset R. A., McCarthy B. J.: *Biochim. Biophys. Acta* **475**, 168—175, 1977.
7. Louie A. J., Dixon G. H.: *Biochem. Soc. Trans.* **1**, 682—684, 1973.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265—275, 1951.
9. Marks O. B., Paik W. K., Borun T. W.: *J. Biol. Chem.* **248**, 5660—5667, 1973.
10. Oliver D., Sommer K. R., Panyim S., Spiker S., Chalkley R.: *Biochem. J.* **129**, 349—353, 1972.
11. Panyim S., Chalkley R.: *Arch. Biochem. Biophys.* **130**, 337—346, 1969.
12. Ralczew K. Ch., Miulberg A. A., Aszmarin I. P.: *Biochimija* **40**, 1261—1267, 1975.
13. Stryjecka M., Borkowski T.: *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.* **19**, 173—178, 1971.
14. Stryjecka-Zimmer M., Borkowski T.: *Acta Biochim. Pol.* **21**, 391—395, 1974.
15. Sung M. T., Dixon G. H., Smithies O.: *J. Biol. Chem.* **246**, 1358—1364, 1971.

Otrzymano 14 XII 1977.

РЕЗЮМЕ

Куриные 5, 9, 12, 15 и 19-дневные эмбрионы получали в амниотический мешок меченый фосфор. После 4 часов инкубации определено включение меченого фосфора в разные фракции гистонов, которые получили из мозга и печени методом Оливера. Меченый фосфор обнаружено во всех фракциях гистонов. Наиболее интенсивно включался [^{32}P] во фракцию F_1 гистонов мозга и печени. Одновременно высокую радиоактивность проявляли гистоны, полученные из 5 и 9-дневных эмбрионов. Представлено также, что на распределение меченого фосфора в разных фракциях гистонов имеет особое значение метод фракционирования гистонов.

SUMMARY

Chick embryo after 5, 9, 12, 15, 19 days of incubation were labelled with [^{32}P]P $_i$ for 4 h. Incorporation of [^{32}P]P $_i$ into histone fractions from the brain and liver obtained by the method of Oliver et al. was studied. Radioactive phosphate was associated with all histone fractions. Histones of the brain and liver prepared after 5 and 9 days of incubation showed the highest specific activity level. The specific radioactivity of the fraction F_1 is always higher than the other fractions. It was found that the fractionation method may have an influence on the distribution of [^{32}P]P $_i$ in different histoned fractions.

