

УДК 612.017.12—092+616—003.8

Р. А. Банникова

ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРА ОСНОВНЫХ ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА АЛЛОАНТИГЕНЫ КОЖИ

В литературе имеются данные [1] о трансформации антигенности белков аллосенсибилизированных лимфоцитов, а также об изменении электрофоретического спектра растворимых белков клеток лимфоидных органов [5]. При этом необходимо отметить, что белоксинтезирующий аппарат клетки во всех его аспектах изучен недостаточно, хотя четко показана роль РНК и ДНК в формировании иммунного ответа и иммунологической памяти на гетеро- и аллоантигены [2, 9].

Вместе с тем до настоящего времени нет единого мнения о механизме участия ядерных белков в регуляции активности генов и процессе формирования иммунного ответа. Высказана мысль о том [8], что отрицательно заряженные фосфатные группы кислых белков, взаимодействуя с положительно заряженными молекулами гистонов, вытесняют их из комплекса с ДНК. Общеизвестными функциями нуклео- тивных гистонов считается их способность стабилизировать молекулу ДНК, защищать ее от действия различных повреждающих факторов, выключать ее из транскрипции, участвовать в формировании нуклео- сом и более сложных структур хроматина [4, 11]. Учитывая положение [3] о том, что антигенный стимул мобилизует не только специфические иммунные защитные резервы клетки, но и приводит к перестройке функции генетического материала, т. е. к регулируемому синтезу новых компонентов, мы поставили перед собой задачу изучить качественные и количественные сдвиги в спектре гистонов как одного из звеньев белоксинтезирующего аппарата, выделенных из лимфоцитов лимфоузлов в процессе формирования первичного и вторичного иммунного ответа на аллоантигены кожи.

Методика исследований

Исследования проведены на 73 кроликах массой 1,5—2 кг. Эффект первичной аллосенсибилизации воспроизводили внутрибрюшинным введением 30 мг водорастворимого кожного антигена, вторичной — повторным его введением с интервалом 2 нед после первой инъекции. Выделение ядер из лимфоцитов лимфоузлов осуществляли по [14], хроматина — по [16], гистонов — по [15]. Электрофорез проводили в блоках 15% полиакриламидного геля по [13] в течение 3,5 ч при силе тока 2 мА на трубочку и напряжении 80—120 В. Доза нанесения суммарных гистонов на трубочку 80—100 µг белка. Электрофоретический спектр основных ядерных белков лимфоцитов лимфоузлов в полиакриламидном геле изучали у пяти групп животных (одна контрольная и четыре опытных): I — интактные животные; II — при формировании первичного иммунного ответа к алдоантигену на 3 сут; III — на 7 сут; IV — при формировании вторичного иммунного ответа на 3 сут; V — на 5 сут.

Электрофореграммы обрабатывали на денситометре типа «Хромоскан 200/201» (Англия). Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью непараметрического критерия U [7].

Результаты исследований и их обсуждение

При выделении суммарных гистонов из лимфоцитов лимфоузлов кроликов и разделении их в 15% полиакриламидном геле мы учитывали ряд трудностей, связанных со сложностью достижения полной экстракции гистонов из хроматина, опасностью деградации гистонов во

время выделения, сорбцией некоторого количества белка на геле и агрегации гистоновых молекул друг с другом во время электрофореза.

Гели подвергали презлектрофорезу в течение 4—5 ч, удаляющему все заряженные частицы кроме H^+ и CH_3COO^- .

При сравнении количественных соотношений отдельных фракций гистонов, выделенных из лимфоузлов intactных животных и на фоне различных сроков первичной аллосенсибилизации, отмечается тенденция к статистически достоверному увеличению фракции H1 до 19,2 % с увеличением срока аллосенсибилизации до 7 сут ($p < 0,05$; табл. 1). При этом соответственно уменьшается доля совместно идущих фракций H3 и H2B до 38,5 % по сравнению с контролем (50 %). Фракции H2A и H4 претерпевают незначительные изменения.

Таблица 1

Процентное соотношение гистоновых фракций при формировании иммунного ответа на аллоантиген

№ пп	Серия опыта	Статистический показатель	H1	H3+H2B	H2A	H4
1	Intactные животные	$M \pm m$	$12,9 \pm 1,5$	$50,0 \pm 4,0$	$24,6 \pm 1,8$	$12,5 \pm 1,5$
2	3 сут (первичный иммунный ответ)	$M \pm m$ p_1	$11,4 \pm 1,2$ $< 0,05$	$46,5 \pm 3,5$ $< 0,05$	$30,0 \pm 2,1$ $< 0,05$	$12,1 \pm 1,6$ $> 0,05$
3	7 сут (первичный иммунный ответ)	$M \pm m$ p_1 p_2	$19,2 \pm 2,8$ $< 0,05$ $< 0,05$	$38,5 \pm 4,8$ $< 0,05$ $< 0,05$	$30,2 \pm 2,5$ $< 0,05$ $> 0,05$	$12,1 \pm 1,8$ $> 0,05$ $> 0,05$
4	3 сут (вторичный иммунный ответ)	$M \pm m$ p_1 p_2 p_3	$16,8 \pm 2,7$ $< 0,05$ $< 0,05$ $< 0,05$	$41,0 \pm 6,3$ $< 0,05$ $< 0,05$ $= 0,05$	$29,3 \pm 3,0$ $< 0,05$ $> 0,05$ $> 0,05$	$12,9 \pm 1,5$ $= 0,05$ $= 0,05$ $= 0,05$
5	5 сут (вторичный иммунный ответ)	$M \pm m$ p_1 p_2 p_3 p_4	$13,2 \pm 2,4$ $= 0,05$ $< 0,05$ $< 0,05$ $< 0,05$	$43,5 \pm 3,7$ $< 0,05$ $< 0,05$ $< 0,05$ $= 0,05$	$30,6 \pm 3,2$ $< 0,05$ $> 0,05$ $> 0,05$ $> 0,05$	$12,7 \pm 2,1$ $> 0,05$ $= 0,05$ $> 0,05$ $> 0,05$

Проводя количественную характеристику долей отдельных фракций в составе суммарных гистонов, выделенных из лимфоцитов лимфоузлов на 3 сут при формировании первичной аллосенсибилизации, нельзя не отметить, что все фракции практически остаются без изменений по сравнению с контролем.

При электрофорезе суммарного гистона (на фоне 7 сут аллосенсибилизации) фракция H1 проявляет тенденцию к разделению на две подфракции, т. е. в качественном отношении фракция H1 отличается определенной гетерогенностью по сравнению с контролем и серией на фоне 3 сут аллосенсибилизации. Некоторое относительное увеличение доли гистона H1 в составе суммарного гистона, сопровождающееся соответствующим уменьшением фракций H3 и 2HB, а также тенденцией к разделению фракции H1 на подфракции, с увеличением срока аллосенсибилизации до 7 сут, возможно, связано с усилением пролиферации лимфоидных клеток, сопровождающимся увеличением синтеза клеточных белков под влиянием антигенной стимуляции. Формирование вторичного иммунного ответа к аллоантигенам кожи также сопровождается тенденцией к увеличению фракции H1. Так, доля фракции H1 при формировании вторичного иммунного ответа на 3 сут составляет 16,8 % по сравнению с серией исследований у intactных животных (12,9 %) и с серией исследований на 5 сут (13,2 %).

Фракции H3+H2B, H2A и H4 меняются очень незначительно.

Сравнивая серии нами, выделенными формирования первичных, нельзя не отметить, что на 3 сут при вторичном формировании фракции H1 на 7 сут данных, полученных иммунного ответа (1).

В качественном вторичном иммунном ответе наблюдается тенденция к увеличению доли фракции H1.

Среди основных самой медленной элементарности, обусловленной остальными фракциями (2) большим содержанием характером св. протеазами; 5) выражающей согласно полученным данным подвижность (О) тактных животных), при формировании в 3 сут при формировании вторичного и до 0,43 на него ответа, разделяя фракции H3 во фракции H2A серии исследования.

Относительная электрофор

№ пп	Серия опыта	Статистический показатель
1	Intactные животные	M
2	3 сут (первичный иммунный ответ)	M P_1
3	7 сут (первичный иммунный ответ)	M P_1 P_2
4	3 сут (вторичный иммунный ответ)	M P_1 P_2 P_3
5	5 сут (вторичный иммунный ответ)	M P_1 P_2 P_3 P_4

Обнаруженное на ее гетерогенность с удлинением срока п также в ранние сроки

Сравнивая серии исследований, проведенных с суммарными гистонами, выделенными из лимфоцитов лимфоузлов кроликов в процессе формирования первичного и вторичного иммунных ответов на аллоантигены, нельзя не обратить внимание на то, что рост фракции Н1 на 3 сут при вторичном иммунном ответе, тем не менее, ниже, чем доля фракции Н1 на 7 сут при первичном (19,2 %), хотя значительно выше данных, полученных на 3 сут в процессе формирования первичного иммунного ответа (11,4 %).

В качественном отношении фракция гистона Н1 (на 3 сут при вторичном иммунном ответе) отличается от аналогичных фракций других серий тенденцией к разделению на две-три подфракции.

Среди основных гистоновых фракций Н1 отличается от других самой медленной электрофоретической подвижностью, что, по всей вероятности, обусловлено: 1) увеличенным почти вдвое по сравнению с остальными фракциями молекулярным весом (приблизительно 21 000); 2) большим содержанием лизина; 3) отличным от других фракций гистонов характером связывания с ДНК; 4) наибольшей атакуемостью протеазами; 5) выраженной способностью делиться на подфракции. Так, согласно полученным нами данным, относительная электрофоретическая подвижность (ОЭП, в см) фракции Н1 составляет 0,30 (у интактных животных), несколько увеличивается до 0,35 на фоне 5 сут при формировании вторичного иммунного ответа и до 0,37 на фоне 3 сут при формировании первичного иммунного ответа, достигает значительного увеличения до 0,40 на фоне 7 сут при формировании первичного и до 0,43 на фоне 3 сут при формировании вторичного иммунного ответа, разделяясь на одну-две подфракции (табл. 2). Подвижность фракции Н3 во всех сериях существенно не изменяется. Подвижность фракций Н2А и Н2В варьирует незначительно независимо от серии исследования.

Таблица 2

Относительная электрофоретическая подвижность фракций гистонов при формировании иммунного ответа на аллоантиген

№ пп	Серия опыта	Статистический показатель	Н1			Н3	Н2В	Н2 А	Н4
			1	2	3				
1	Интактные животные	M			0,30	0,52	0,65	0,75	0,80
2	3 сут (первичный иммунный ответ)	M P ₁			0,37 <0,05	0,56 <0,05	0,65 >0,05	0,71 <0,01	0,79 =0,05
3	7 сут (первичный иммунный ответ)	M P ₁ P ₂	0,33		0,40 <0,05 <0,05	0,57 <0,05 =0,05	0,65 >0,05 >0,05	0,73 =0,01 <0,05	0,82 >0,05 <0,05
4	3 сут (вторичный иммунный ответ)	M P ₁ P ₂ P ₃	0,09	0,12	0,43 <0,01 <0,01 <0,05	0,57 <0,05 >0,05 >0,05	0,68 <0,05 <0,05 <0,05	0,76 =0,05 <0,05 =0,05	0,80 >0,05 =0,05 >0,05
5	5 сут (вторичный иммунный ответ)	M P ₁ P ₂ P ₃ P ₄			0,35 =0,05 =0,05 <0,05 <0,05	0,53 =0,05 =0,05 <0,05 <0,05	0,67 <0,01 =0,05 =0,05 =0,05	0,75 >0,05 <0,05 =0,05 >0,05	0,81 =0,01 >0,05 >0,05 >0,05

Обнаруженное нами увеличение доли фракции Н1, сопровождающееся ее гетерогенностью (делением на подфракции), в соответствии с удлинением срока первичной аллосенсибилизации (от 3 до 7 сут), а также в ранние сроки после вторичной аллосенсибилизации (3 сут),

может свидетельствовать об отличии функции фракции Н1 от функций остальных гистоновых фракций.

Так, получены данные о том, что гистон Н1 стабилизирует структуру хроматина [12], а удаление фракции Н1 существенно повышает матричную активность ДНК [6]. Показано также, что под влиянием 10^{-7} моль цАМФ происходит усиленное фосфорилирование фракции Н1 [10]. Анализируя полученные нами данные с позиций современных достижений учения о гистонах, можно предположить, что под влиянием трансплантационных аллогенных антигенов кожи на фоне активной пролиферации лимфоидных клеток, сопровождающейся увеличением синтеза клеточных белков в ядрах лимфоцитов, осуществляется усиленное фосфорилирование ядерных белков и в первую очередь гистона Н1. Включение фосфатных групп в гистоны снижает их репрессорную активность по отношению к матричной активности ДНК, что проявляется в увеличении количества суммарных нуклеиновых кислот в лимфоидных тканях при формировании трансплантационного иммунитета на первичный аллоантигенный стимул, согласно [9].

Выводы

1. В процессе формирования первичного иммунного ответа к аллоантигенам кожи на 7 сут происходит перестройка фракционного состава основных ядерных белков (гистонов), что проявляется в увеличении содержания фракции Н1, в отличие от интактных кроликов и животных на 3 сут аллосенсибилизации.
2. Формирование вторичного иммунного ответа на 3 сут после введения аллоантигенов кожи сопровождается ростом фракции Н1, однако менее выраженным, чем на 7 сут при первичном иммунном ответе.

R. A. Bannikova

VARIATIONS IN SPECTRUM OF MAIN LYMPHOCYTIC NUCLEAR PROTEINS IN FORMATION OF AN IMMUNE RESPONSE TO SKIN ALLOANTIGENS

Summary

Qualitative and quantitative shifts in the electrophoretic spectrum of main nuclear proteins (histones) isolated from lymphonodus lymphocytes were studied in rabbits during formation of primary and secondary immune responses to skin alloantigens. The portion of the H1 fraction was found to increase, which was accompanied by its heterogeneity (division into subfractions) in accordance with prolongation of the allosensibilization period from 3 to 7 days in formation of the primary immune response and at early stages of the secondary immune response formation (3 days). This shows that the function of the H1 fraction differed from functions of other histone fractions and participated in the mechanism of immune response formation.

Advanced Training Institute
for Doctors, Kiev

Список литературы

1. Антоненко В. Т. Роль сенсибилизированных трансплантационными антигенами лимфоцитов в реакции тканевой несовместимости. — В кн.: Особенности проявления тканевой несовместимости при трансплантации органов: Материалы. I Всесоюз. симпозиум (ноябрь 1971). М.: Б. и., 1971, с. 9—11.
2. Антоненко В. Т., Лисняк И. О. РНК та її роль у перенесенні імунітету. — Фізіол. журн., 1977, № 6, с. 840—847.
3. Антоненко В. Т. Современные вопросы проблемы иммунологической реактивности в патологии. — В кн.: Актуальные проблемы современной патофизиологии. Киев: Наук. думка, 1981, с. 14—16.
4. Бердышев Г. Д., Дуброва Ю. Е., Карпинчук К. Г. Строение, функции и эволюция генов. — Киев: Наук. думка, 1980. — 215 с.
5. Бойко Ю. Я. Растворимые белки клеток тимуса и лимфатических узлов в условиях аллотрансплантации кожи и применения АЛС. — В кн.: Патологическая физиология тканевой несовместимости. М.: Б. и., 1976, с. 16—20.

6. Георгиев Г. П. Исследования в области биологии АН.
7. Гублер Е. В., Генкин в медико-биологическом.
8. Клейнсмит Л., Стейнгонов. — В кн.: Молекулярная иммунология.
9. Коврикова Н. П. Учение о несовместимости.
10. Тюленев В. И., Палиевский. — В кн.: Фосфорилирование ядерных белков. вып. 4, с. 72—75.
11. Храпунов С. Н., Бердников. — В кн.: Функции гистонов.
12. Cole R. D., Lawson C. M. — In: Chromatin and DNA. — C. 263.
13. Panyim S., Bilek D., et al. — J. Biol. Chem., 1970, 245, 1155.
14. Schow L. M. Y., Huang C. — In: Studies of extreme pH-conditions in the preparation of pig cells. — P. 4530—4536.
15. Senshu T., Iwai K. — In: Cellulose chromatography and its application to the study of cell components.
16. Spelsberg T. C., Steggel. — In: J. Biol. Chem., 1970, 245, 1155.

Центральная научно-исследовательская лаборатория Киевского института усовершенствования врачей

6. Георгиев Г. П. Исследования структуры геномов эукариотов в Институте молекулярной биологии АН СССР. — Молекуляр. биология, 1977, 2, вып. 6, с. 1274—1282.
7. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев в статистике в медико-биологических исследованиях. — Л.: Медицина, 1973.—141 с.
8. Клейнсмит Л., Стейн Г., Стейн Дж. Хромосомные белки и регуляция активности генов. — В кн.: Молекулы и клетки. М.: Мир, 1977, вып. 6, с. 45—65.
9. Коврикова Н. П. Участие нуклеиновых кислот в формировании трансплантационного иммунитета. — В кн.: Тез. докл. II Всесоюз. симпоз. по ранним проявлениям тканевой несовместимости. Звенигород, 25—26 ноября. 1976. М.: Б. и. 1976, с. 165—166.
10. Тюленев В. И., Паливода О. Ю., Белік Я. В. Вплив циклічних нуклеотидів на фосфорилування ядерних білків клітин мозку щурів. — Доп. АН УРСР. Сер. Б, 1981, вип. 4, с. 72—75.
11. Храпунов С. Н., Бердышев Г. Д. О возможном способе регуляции генетической активности гистонами. — Цитология и генетика, 1976, 10, № 2, с. 167—169.
12. Cole R. D., Lawson G. M., Hsiang M. W. H1 histone and the condensation of chromatin and DNA. — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1978, 42, pt. 1, p. 253—263.
13. Panyim S., Bilek D., Chalkley R. An electrophoretic comparison of vertebrate histones. — J. Biol. Chem., 1971, 246, N 13, p. 4206—4215.
14. Schow L. M. Y., Huang R. C. A description of two procedures which avoid the use of extreme pH-conditions for the resolution of components isolated from chromatin prepared from pig cerebellar and pituitary nuclei. — Biochemistry, 1970, 9, N 23, p. 4530—4536.
15. Senshu T., Iwai K. Fractionation of calf thymus histone by a new method of CM-cellulose chromatography. — J. Biochem., 1969, 67, N 2, p. 473—485.
16. Spetberg T. C., Steggle A. W., D'Malley B. W. Progesterone-binding components of chick oviduct. — J. Biol. Chem., 1971, 246, N 13, p. 4188—4197.

Центральная научно-исследовательская
лаборатория Киевского института
усовершенствования врачей

Поступила в редакцию
20.01.82