



УДК 577.175.53.015:547.963:577.112.856

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА ТЕТРАГИДРОКОРТИЗОЛ–АПОЛИПОПРОТЕИН А-I НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ С ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ ДНК И НА СКОРОСТЬ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА В ГЕПАТОЦИТАХ

© 2001 г. Л. Е. Панин[#], Ф. В. Тузиков*, Н. А. Тузикова*, И. Ф. Усынин, О. И. Гимаутдинова*Научно-исследовательский институт биохимии СО РАМН,
630117, Новосибирск, ул. Акад. Тимакова, 2;*** Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" МЗ
РФ, пос. Кольцово Новосибирской обл.*

Поступила в редакцию 09.07.1999 г. Принята к печати 13.07.2000 г.

Предложен механизм активации биосинтеза белка в гепатоцитах под влиянием кондиционной среды непаренхимных клеток (НП-клеток) печени, инкубированных в присутствии липопротеинов высокой плотности, кортизола и липополисахаридов. Установлено, что повышение скорости биосинтеза белка связано с образованием комплекса тетрагидрокортизол–аполипопротеин А-I (ТНС–ароА-I) в макрофагах, обладающих 5 α - и 5 β -редуктазной активностью и входящих в состав НП-клеток печени. С помощью метода малоуглового рентгеновского рассеяния показано, что взаимодействие комплекса ТНС–ароА-I с эукариотической ДНК может приводить к разрыву водородных связей между комплементарными парами азотистых оснований и образованию однонитевых участков в структуре ДНК, способных к связыванию с ДНК-зависимой РНК-полимеразой. Взаимодействие высококооперативно и носит насыщающий характер, при этом связывается до шести молекул фермента на одну молекулу ДНК.

Ключевые слова: кортизол; тетрагидрокортизол; биосинтез белка; липопротеины; аполипопротеин А-I; ДНК; малоугловое рентгеновское рассеяние.

ВВЕДЕНИЕ

Резидентные макрофаги входят в состав клеточных элементов стромы различных органов и тканей наряду с эндотелиоцитами, фибробластами, плазматическими клетками и др. В организме они образуют систему мононуклеарных фагоцитов, основным назначением которой является освобождение тканей от чужеродного материала и от продуктов деградации клеток при их повреждении или гибели. В печени эта система представлена клетками Купфера. Сегодня хорошо известно, что клетки Купфера, являясь резидентными макрофагами печени, принимают участие в реализации многообразных функциональных связей с паренхимными клетками, в частности, клетки Купфера активируют синтез гепатоцитами белков острой фазы воспаления. Один из них – С-реактивный белок, связываясь с хроматином, способствует удалению продуктов ядерного распада из зон некроза [1]. Кроме того, клетки Купфера вместе с гепатоцита-

ми участвуют в метаболизме гемоглобина, стероидных гормонов и ряда других соединений [2, 3].

Ранее нами был предложен кооперативный механизм, описывающий одновременное участие ЛПВП и глюкокортикоидов в регуляции экспрессии генов и биосинтеза белка в гепатоцитах, который реализуется в клетках Купфера [4]. В опытах *in vivo* было показано, что стимуляция липополисахаридами клеток Купфера и резидентных макрофагов других тканей приводит к кооперативному захвату из крови ЛПВП и глюкокортикоидов с помощью рецепторопосредованного эндцитоза. В дальнейшем в макрофагах происходит дезинтеграция ЛПВП с ресекрецией в межклеточную среду аполипопротеина А-I, а глюкокортикоиды восстанавливаются с образованием тетрагидросоединений при участии 5 α - и 5 β -редуктаз [2, 5]. Оба продукта образуют комплекс, который принимает участие в усилении биосинтеза белка в гепатоцитах. Однако механизм взаимодействия этого комплекса с эукариотической ДНК оставался неясным. Поэтому целью данной работы было изучение структурных изменений эукариотической ДНК при взаимодействии ее с комплексом ТНС–ароА-I, возможности в данных условиях ее комплексообразования с РНК-полимеразой и усиления таким образом биосинтеза белка в гепатоцитах и других клетках печеночного синусоида.

Сокращения: ароА-I – аполипопротеин А-I; DMEM – минимальная среда Игла в модификации Дюльбекко; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ЛПС – липополисахариды; МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние; НП-клетки – непаренхимные клетки; РНК-полимераза – ДНК-зависимая РНК-полимераза; ТНС – тетрагидрокортизол.

[#] Автор для переписки (тел.: (383-2) 32-27-35; факс: (383-2) 35-68-11; e-mail: ibch@cyber.ma.ncs.ru).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работах [4, 6] нами было показано, что совместное действие ЛПВП и глюкокортикоидов повышает эффективность включения [^3H]уридина в общий пул РНК и [^{14}C]лейцина в общий белок. Эти результаты были получены на переживающих срезах печени, сохраняющих все особенности межклеточных взаимоотношений целого органа. В условиях *in vivo* кооперативный механизм взаимодействия ЛПВП и глюкокортикоидов запускался при стимулировании резидентных макрофагов липополисахаридами или декстрансульфатом [7]. В НП-клетках при стимуляции *in vivo* резидентных макрофагов липополисахаридами скорость биосинтеза белка увеличивалась незначительно [4].

В данной работе мы изучали механизм кооперативного эффекта ЛПВП и глюкокортикоидов на клетках печеночного синусоида. Из результатов, представленных в табл. 1, видно, что ни ЛПС, ни кортизол, ни ЛПВП отдельно друг от друга не повышают скорость биосинтеза белка в первичной культуре гепатоцитов в питательной среде ДМЕМ. Не оказывает также эффекта совместное добавление этих соединений в среду инкубации гепатоцитов. Инкубация НП-клеток по отдельности с ЛПС, кортизолом или ЛПВП с последующим переносом кондиционной среды в первичную культуру гепатоцитов также не приводила к повышению скорости биосинтеза белка в последних. Только кондиционная среда НП-клеток после инкубации их совместно с ЛПС, кортизолом и ЛПВП значительно увеличивала скорость биосинтеза белка в гепатоцитах. Полученные результаты свидетельствуют о том, что кооперативный эффект ЛПВП и глюкокортикоидов в регуляции биосинтеза белка в печени формируется в НП-клетках и, в первую очередь, в резидентных макрофагах.

Известно, что в клетках Купфера происходит восстановление $\Delta^4,3$ -кетогруппировки в кольце А глюкокортикоидов и образование тетрагидросоединений [2]. Кроме того, именно клетки Купфера, а не эндотелиоциты усиленно поглощают ЛПВП третьего подкласса после стимуляции их ЛПС [8], причем белковый компонент этой фракции ЛПВП в значительной степени состоит из ароА-1. Учитывая эти обстоятельства, мы провели инкубацию гепатоцитов, клеток Купфера и эндотелиоцитов с различными биологическими добавками. Как видно из табл. 2, кортизол и ТНС не увеличивают скорость биосинтеза белка ни в одном из типов клеток, а ароА-1 повышает скорость включения [^{14}C]лейцина в белок только в клетках Купфера. При этом комплекс кортизол–ароА-1 ингибирует биосинтез белка в гепатоцитах, а комплекс ТНС–ароА-1 значительно увеличивает скорость биосинтеза белка также только в гепатоцитах. Эти результаты еще раз говорят о том, что формирование кооперативного эффекта при взаимодействии ЛПВП и глюкокортикоидов в печени происходит в макрофагах и связано с об-

Таблица 1. Влияние биологических добавок на биосинтез белка в культуре гепатоцитов (длительность инкубации 24 ч)

Добавка в среду ДМЕМ*	Скорость биосинтеза белка, имп./мин на лунку	
	Контроль (среда ДМЕМ)	Инкубационная среда НП-клеток
Без добавок	19790 ± 1190	18610 ± 1790
ЛПС	18490 ± 1190	17740 ± 1530
Кортизол	17750 ± 1460	14780 ± 980
ЛПВП	17890 ± 1410	16470 ± 680
ЛПВП + кортизол + ЛПС	18810 ± 1950	33940 ± 5210**

* Условия эксперимента см. "Эксперимент. часть". В каждом опыте проводилось по 9 измерений.

** Достоверные изменения ($P < 0.05$) по отношению к контролю.

Таблица 2. Влияние биологических добавок на биосинтез белка в клетках печени разных типов

Биологическая добавка	Скорость биосинтеза белка, имп./мин на лунку		
	Гепатоциты	Клетки Купфера	Эндотелиальные клетки
Контроль (без добавок)	3492 ± 171	1420 ± 102	1580 ± 193
Кортизол	3190 ± 62	1381 ± 135	1474 ± 192
ТНС	3630 ± 122 [#]	1540 ± 312	1220 ± 190
ароА-1	3840 ± 93 ^{#*}	2790 ± 420*	1636 ± 175
Кортизол + ароА-1	3083 ± 60*	1832 ± 193	1550 ± 84
ТНС + ароА-1	4860 ± 503*	1890 ± 390	1350 ± 302

В каждом опыте проводилось по 5–10 измерений.

* – достоверные измерения ($P < 0.05$) по отношению к контролю; [#] – достоверные измерения ($P < 0.05$) по отношению к группе ТНС + ароА-1.

разованием биологически активного комплекса ТНС–ароА-1, который и повышает скорость биосинтеза белка в гепатоцитах.

Для того чтобы глубже понять этот механизм, мы изучали структурные изменения эукариотической ДНК при взаимодействии ее с комплексом ТНС–ароА-1 и РНК-полимеразой методом МУРР. Ранее этот метод мы применяли для исследования взаимодействий специфических тРНК-синтаз с тРНК [9, 10], метилтрансфераз с олигонуклеотидами [11, 12], для оценки структурных изменений в ЛПВП [13], определения фракционного состава липопротеинов в нативной плазме и сыворотке крови [14, 15]. Было показано, что метод МУРР позволяет получать ценную информацию о механизме молекулярных взаимодействий, в частности, дает возможность определять стехиометрию и константы равновесия макромолекулярных комплексов, структурные и дисперсные характеристики макромолекул и их агрегатов.

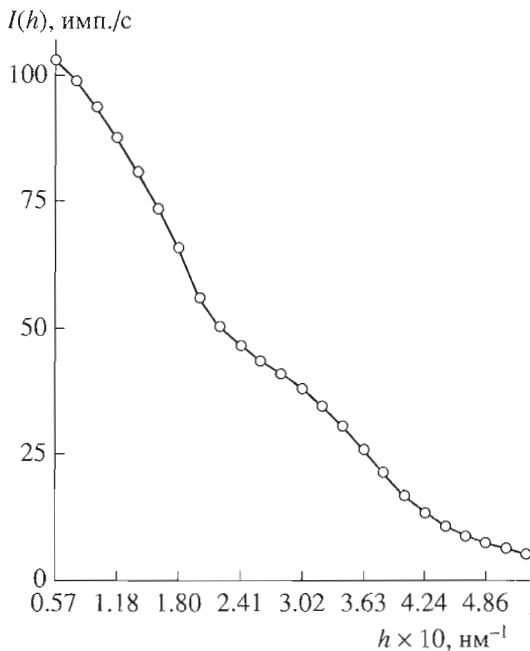


Рис. 1. Рентгенограмма МУРР раствора РНК-полимеразы. Концентрация РНК-полимеразы 4.16 мг/мл. Введены поправки на фон и коллимацию рентгеновского пучка, проведено сглаживание.

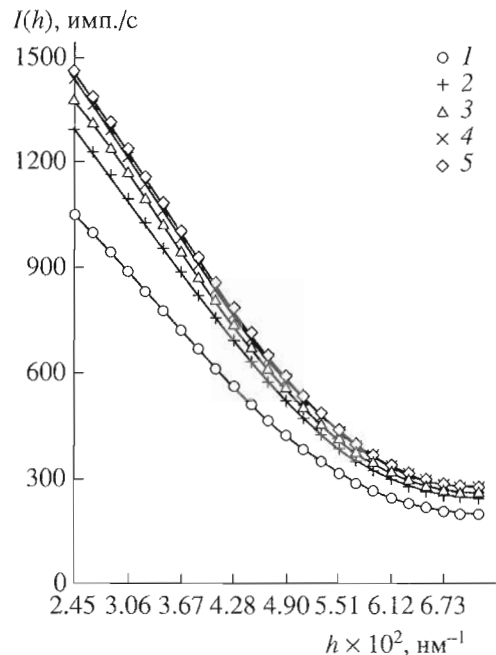


Рис. 2. Рентгенограммы МУРР растворов свободной ДНК (1) и смесей 1–4 ДНК с араА-I и РНК-полимеразой в присутствии ТНС (кривые 2–5 соответственно). Измерения рентгенограмм смесей проводили при 37°C. Концентрации компонентов в смесях 1–4 приведены в табл. 4.

Рентгенограммы МУРР показали (рис. 1, 2), что препараты используемых в работе РНК-полимеразы и нативной ДНК монодисперсны. Структура РНК-полимеразы хорошо изучена различными методами, в том числе методами рентгеновского и нейтронного малоуглового рассеяния [16–18], а в работе [18] успешно исследовались специфические комплексы РНК-полимеразы с олигонуклеотидами длиной 130 п.о., с использованием уникальных возможностей МУРР. Значение радиуса инерции (R_g) для РНК-полимеразы фага Т7, полученное нами из данных МУРР (6.83 ± 0.15 нм), близко к величине R_g 6.67 нм, надежно определенной для β^1 -субъединицы РНК-полимеразы *E. coli* другими авторами [16].

Ранее нами было показано, что молекула араА-I имеет вытянутую форму с отношением осей эл-

липсоида b/a , равным 3.6, а значение молекулярной массы (27.5 кДа), вычисленное из данных МУРР, близко к известному в литературе (28 кДа) [19]. Известно, что свободная ДНК в растворе имеет структуру гауссовского клубка [20] с полостями, заполненными растворителем. Поэтому значение радиуса инерции R_g 39.2 ± 0.5 нм, полученное из данных МУРР для нативной ДНК из печени крыс, отражает полный объем, занимаемый клубком двойной цепи ДНК с изгибами, а фактическая величина молекулярной массы M_s (26 ± 2) $\times 10^6$ Да соответствует литературным данным [21].

Для оценки эффектов взаимодействия РНК-полимеразы и араА-I с ДНК методом МУРР использовали их равновесные смеси в присутствии и в отсутствие тетрагидрокортизола. На рис. 2 и в табл. 3, 4 приведены соответственно рентгенограммы МУРР и значения структурных характеристик образующихся рассеивающих частиц. Из экспериментальных данных были вычислены значения R_g и $I(0)$ для разных смесей ДНК с араА-I и РНК-полимеразой (табл. 3, 4). Как видно из рис. 2 и табл. 3, 4, заметное взаимодействие ДНК с араА-I и РНК-полимеразой при данной точности измерений интенсивностей МУРР отмечалось только в присутствии тетрагидрокортизола. Характер изменения значений $I(0)$ показывает, что в данном случае в смесях происходит образование сложных комплексов. Размер сложного комплекса P_nS (здесь P –

Таблица 3. Средние значения радиуса инерции (R_g), интенсивностей рентгеновского рассеяния в нулевой угол ($I(0)$), полученные из данных МУРР для смесей РНК-полимеразы (C_p 0.140 мкМ) и ДНК (C_s 0.043 мкМ), в присутствии (+) и в отсутствие (–) ТНС и араА-I в смесях*

ТНС	араА-I	РНК-полимераза	R_g , нм	$I(0)$, имп./с
–	–	–	39.1 ± 0.5	1450 ± 11
–	–	+	38.8 ± 0.7	1485 ± 15
–	+	+	39.3 ± 0.6	1490 ± 12
+	+	–	39.2 ± 0.4	1605 ± 10

* [араА-I] 3.55 мкМ; [ТНС] 1.2 мкМ.

РНК-полимераза; S – агрегаты ДНК с ТНС и ароА-I; n – число молекул Р в комплексе) также в пределах точности измерений соответствовал размеру молекул ДНК в свободном состоянии (R_g 39.2 ± 0.6 нм) (табл. 3, 4), а достоверно изменялись только значения $I(0)$, связанные с концентрацией и молекулярной массой комплексов P_nS , уравнением (1) как описано в работах [9–15, 20]:

$$I(0) \sim NM_k^2, \quad (1)$$

где N , M_k – соответственно число и молекулярная масса участвующих в рассеянии комплексов P_nS .

Известно, что о целостности вторичной структуры ДНК можно судить по наличию дифракционного максимума в области углов $h \sim 2.66 \text{ нм}^{-1}$ [20] на рентгенограмме МУРР, соответствующего диаметру двойной цепи ДНК (~2.2 нм). Из рис. 3 видно, что при $h \approx 2.7 \text{ нм}^{-1}$ на рентгенограммах МУРР для препаратов нативной ДНК и для смесей ДНК с ароА-I и РНК-полимеразой без ТНС четко наблюдается дифракционный максимум, а от аналогичных смесей в присутствии ТНС величина пика достоверно снижается. Это может свидетельствовать о нарушении вторичной структуры ДНК в результате ее взаимодействия с комплексом ТНС–ароА-I. Для оценки стехиометрии образующегося в результате взаимодействия РНК-полимеразы (Р) с исходным комплексом ДНК + ароА-I + ТНС (S) сложного комплекса P_nS мы использовали упрощенную схему [11, 12]:



где n – число молекул РНК-полимеразы, которое связалось в комплексы P_nS . Исходя из оценок, полученных нами в экспериментах МУРР (табл. 4), а также опираясь на результаты работы [18], можно предположить, что равновесие в этих взаимодействиях существенно сминуто в сторону образования комплексов, т.е. оно высококооперативное. Тогда параметр n в схеме (2) при образовании комплексов P_nS в смесях с повышением концентрации белка (C_p) будет возрастать вплоть до некоторого максимального значения. Используя уравнение (1) для оценки значений параметра n в каждой смеси белка с ДНК, можно получить выражение:

$$n = M_S(T_{i0} - 1)/M_P, \quad (3)$$

где $T_{i0} = (I_i(0)/I_0(0))^{1/2}$; $I_i(0)$, $I_0(0)$ – интенсивности рассеяния в нулевой угол ($h = 0$) от i -й смеси и исходного препарата ДНК, соответственно; M_P и M_S – молекулярные массы РНК-полимеразы и ДНК.

Ранее [22] с помощью данной методики при тех же концентрациях компонентов (в отсутствие РНК-полимеразы) мы получили значение n для ароА-I при его комплексообразовании с ДНК в присутствии ТНС, равное 54 ± 1 . В табл. 4 приведены результаты расчета значений параметра n и оценки баланса C_p/C_S для всех используемых в работе смесей РНК-полимеразы с ДНК в присутствии ароА-I и ТНС. Видно, что величина n в смесях

Таблица 4. Средние значения радиуса инерции (R_g), интенсивностей рентгеновского рассеяния в нулевой угол ($I(0)$), числа молекул РНК-полимеразы (n) в комплексах P_nS , полученные из данных МУРР, при разных концентрациях РНК-полимеразы (C_p) в смесях

Смесь	C_p , мкМ	R_g , нм	$I(0)$, имп./с	n	C_p/C_S
1	0.140	39.0 ± 0.6	1764 ± 5	2	3
2	0.238	38.9 ± 0.7	1881 ± 7	4	5
3	0.380	39.2 ± 0.5	1960 ± 8	5	9
4	0.568	39.7 ± 0.8	1988 ± 8	6	13

Измерения проводили в присутствии ТНС в смесях. Для комплекса ДНК + ароА-I (без ТНС) $I(0) = 1605 \pm 9$ имп./с. Р – РНК-полимераза, S – агрегаты ДНК (C_S 0.043 мкМ) с ароА-I и ТНС. [ароА-I] 3.55 мкМ; [ТНС] 1.22 мкМ.

не превышает значений баланса и в смеси 4 достигает своего максимального значения, равного 6 ± 1 , соответствующего стехиометрии 6 : 1 образующегося комплекса P_nS .

Таким образом, в работе определены структурные характеристики РНК-полимеразы, нативной ДНК и их комплексов в присутствии ароА-I и тетрагидрокортизола. Логично предположить, что при действии комплекса ТНС–ароА-I вероятным изменением вторичной структуры является разрыв водородных связей между парами азотистых оснований. По-видимому, РНК-полимераза фага Т7 находит в такой ДНК с измененной вторичной структурой свои участки связывания.

Впервые показано, что тетрагидропроизводные глюкокортикоидов являются биологически активной формой гормона, которая принимает участие в

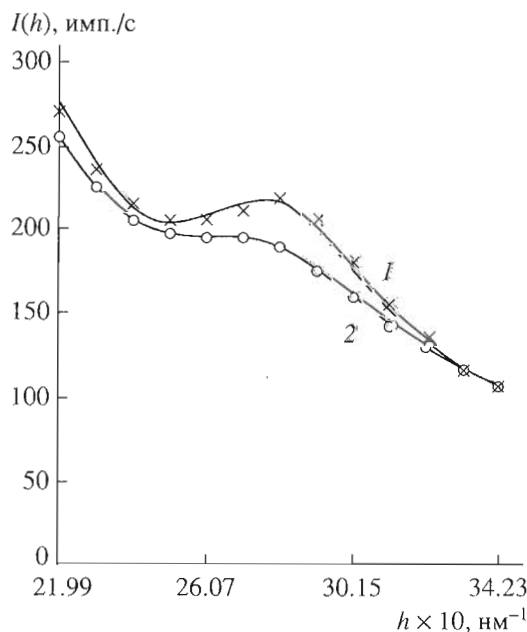


Рис. 3. Рентгенограммы МУРР в области дифракционного пика при $h = 2.66 \text{ нм}^{-1}$ смесей ДНК с ароА-I и РНК-полимеразой без ТНС (1) и в присутствии ТНС (2). Концентрации компонентов см. смесь 4 в табл. 4.

повышении уровня экспрессии генов в составе комплекса тетрагидрокортизол-ароА-I. В этом случае, ароА-I выполняет роль целевого переносчика гормона, а восстановленная форма гормона способствует разрыву водородных связей между парами азотистых оснований ДНК, приводя к локальной ее денатурации и создавая предпосылки для взаимодействия РНК-полимеразы с однонитевыми участками ДНК. Предлагаемый механизм повышения уровня экспрессии генов может являться причиной активации биосинтеза белка в гепатоцитах под влиянием комплекса ТНС-ароА-I.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использовали коллагеназу (Boehringer Mannheim, Германия), НЕРЕС (Serva, Германия), [^{14}C]лейцин (Чехия), ЛПС *Serratia marcescens* (продигиозан, завод химфармреактивов, Москва), питательную среду DMEM и эмбриональную сыворотку (НПО "Вектор", Новосибирск).

РНК-полимераза фага Т7 выделена и любезно предоставлена В.Н. Анкиловой (НИБХ СО РАН).

Выделение клеток печени. Эксперимент выполнялся на крысах-самцах линии Wistar массой 180–200 г. Клетки печени выделяли по методу [23] в нашей модификации [24], используя рециркуляционную перфузию органа 0.03% раствором коллагеназы. После диссоциации ткани гепатоциты отделяли от НП-клеток с помощью дифференциального центрифугирования. НП-клетки фракционировали в элютриаторном роторе JE-6 на центрифуге J2-21 (Beckman, США) при скорости вращения ротора 2500 об./мин. Для отмывки купферовских и эндотелиальных клеток через раздельную камеру ротора прокачивали среду DMEM со скоростью 22 и 42 мл/мин, соответственно [25]. Подсчет клеток проводили в камере Горяева. Жизнеспособность клеток оценивали методом исключения трипанового синего [23], а чистоту клеточных фракций определяли с помощью световой и электронной микроскопии. Полученные клетки ресуспендировали в среде DMEM, pH 7.4, содержащей 15 мМ НЕРЕС, 10% эмбриональной сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина. Инкубацию проводили в CO_2 -инкубаторе в течение 24 ч, используя 24-луночные планшеты (Linbro, Германия), покрытые коллагеном I типа. Конечная плотность гепатоцитов в первичной культуре составляла 700, а эндотелиоцитов и макрофагов 7000 клеток на 1 мм^2 .

Измерение скорости биосинтеза белка в культуре клеток. За 2 ч до окончания инкубации в лунки с клетками добавляли 20 мкл [^{14}C]лейцина из расчета 3.7×10^4 Бк/мл. Через 2 ч реакцию останавливали добавлением 0.2 н. NaOH. Содержимое каждой лунки переносили на мембранные фильтры для определения связанной с белком радиоактивности. Препаративное выделение ЛПВП из плазмы крови осуществляли с помощью изо-

плотностного ультрацентрифугирования в растворе KBr [26] в роторе 75-Ti на ультрацентрифуге L5-75 (Beckman). ЛПВП в среду инкубации добавляли из расчета 100 мкг на 1 мл среды, кортизол и тетрагидрокортизол – в конечной концентрации 10^{-5} М, а ЛПС в концентрации 7.5 мкг на 1 мл среды инкубации.

Получение РНК-полимеразы. Препарат РНК-полимеразы фага Т7 выделяли из клеток *E. coli*, содержащих клонированный ген РНК-полимеразы из бактериофага Т7. Чистота препарата составила не менее 90% по данным SDS-ПААГ, удельная активность $200000 \text{ ед./OE}_{260}$. За единицу активности РНК-полимеразы принимали количество фермента, катализирующее включение 1 нмоль нуклеозидтрифосфата в кислотонерастворимый продукт за 1 ч при 37°C в реакционной смеси объемом 100 мкл следующего состава: 40 мМ Трис-НСI, pH 7.5, 6 мМ MgCl_2 , 2 мМ спермидин-НСI, 10 мМ дитиотреит, 1 мМ нуклеозидтрифосфаты (каждый из 4-х), 1 мкг плазмиды, содержащей Т7-промотор.

Анализ данных малоуглового рентгеновского рассеяния. Ранее было показано, что глюкокортикоиды образуют комплексы с аполипопротеином А-I (K_a 0.4×10^{-6} М) [27]. Комплексы ароА-I с ТНС получали, выдерживая их смесь (молярное соотношение 3 : 1) в 0.05 М калий-фосфатном буфере, pH 7.4, в течение 5 мин при комнатной температуре. ДНК из печени крыс выделяли по [28] и анализировали методом электрофореза в 0.3% агарозном геле. Измерения малоугловых рентгенограмм проводили на дифрактометре фирмы "Siemens" (Германия). Длина волны рентгеновского излучения (λ) 0.154 нм (CuK_α). Использовали гомогенные препараты ароА-I, РНК-полимеразы и ДНК с исходными концентрациями 0.30, 4.16 и 3.12 мг/мл, соответственно. Для изучения эффектов взаимодействий нативной ДНК с РНК-полимеразой в присутствии ароА-I предварительно готовили смеси растворов ДНК, ароА-I и его комплексов с глюкокортикоидами (кортизолом и тетрагидрокортизолом) с разной концентрацией фермента. Температура исходных препаратов образцов при измерении рентгенограмм 20°C , а смесей ДНК с РНК-полимеразой 37°C . Малоугловые рентгенограммы измеряли в угловом диапазоне: $0.0245 \leq h \leq 3.423 \text{ нм}^{-1}$, где $h = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$, 2θ – угол рассеяния. В рентгенограммы вносились поправки на фоновое рассеяние, коллимацию, проводилось их сглаживание.

Достоверность полученных результатов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости $P < 0.05$.

Авторы выражают глубокую благодарность Ю.А. Панкову (НИИ экспериментальной эндокринологии ЭНЦ РАМН, Москва) за любезно предоставленный препарат тетрагидрокортизола.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Robey R.A., Jones K.D., Tanaka T., Liu T.J. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 7311–7316.
2. Sawyer N.J., Oliver J.T., Troop R.S. // *Steroids.* 1963. V. 2. P. 213–227.
3. Schlepper-Schafer J., Raffelsiefer A., Kolb-Bachofen V. // *Cells of the Hepatic Sinusoid* / Eds E. Wisse, D. Knook, K. Decker. Leiden, The Netherlands: Kupffer Cell Foundation, 1989. V. 2. P. 115–119.
4. Панин Л.Е., Усыннин И.Ф., Трубицына О.М., Харьковский А.В., Соколова М.В., Останина Л.С. // *Биохимия.* 1994. Т. 59. С. 353–359.
5. Юдаев Н.А., Афиногенова С.А., Крехова М.А. Биохимия гормонов и гормональной регуляции. М.: Наука, 1976. С. 171–227.
6. Панин Л.Е. // *Вопр. мед. хим.* 1987. Т. 33. С. 96–102.
7. Панин Л.Е. // *Бюлл. СО РАМН.* 1996. № 2. С. 62–69.
8. Панин Л.Е. // *Бюлл. СО РАМН.* 1998. № 3. С. 5–10.
9. Tuzikov F.V., Zinoviev V.V., Malygin E.G., Ankilova V.N., Moor N.A., Lavrik O.I. // *FEBS Lett.* 1988. V. 232. P. 107–110.
10. Тузиков Ф.В., Тузикова Н.А., Вавилин В.И., Зинovieв В.В., Малигин Е.Г., Фаворова О.О., Заргарова Т.А., Судомоца М.А., Киселев Л.Л. // *Молекулярн. биология.* 1991. Т. 25. С. 740–751.
11. Tuzikov F.V., Zinoviev V.V., Vavilin V.I., Malygin E.G. // *Studia Biophysica.* 1988. V. 125. P. 169–172.
12. Tuzikov F.V., Zinoviev V.V., Vavilin V.I., Malygin E.G. // *Biopolymers.* 1996. V. 38. P. 131–139.
13. Тузиков Ф.В., Панин Л.Е., Тузикова Н.А., Поляков Л.М. // *Биол. мембраны.* 1996. Т. 13. С. 71–78.
14. Тузиков Ф.В., Тузикова Н.А., Панин Л.Е., Никитин Ю.П., Крылова И.Н. // *Биол. мембраны.* 1998. Т. 15. С. 421–433.
15. Тузиков Ф.В., Тузикова Н.А., Панин Л.Е., Никитин Ю.П. // *Вестник РАМН.* 1998. № 3. С. 42–47.
16. Stockel P., May R.P., Strell I., Cejka Z., Hoppe W., Heumann H. // *Eur. J. Biochem.* 1980. V. 112. P. 411–417.
17. Meisenberger O., Heumann H., Pilz I. // *FEBS Lett.* 1981. V. 123. P. 22–24.
18. Heumann H., Lederer H., Baer G., May R.P., Kjems J.K., Crespi H.L. // *J. Mol. Biol.* 1988. V. 201. P. 115–125.
19. Gordon J.I., Smith D.P., Andy R., Alpers D.H. // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. P. 971–978.
20. Сверзун Д.И., Фейгин Л.А. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. М.: Наука, 1986. С. 50–279.
21. Уотсон Д. Молекулярная биология гена. М.: Мир, 1978. С. 285–288.
22. Панин Л.Е., Тузиков Ф.В., Тузикова Н.А., Гимаутдинова О.И., Поляков Л.М. // *Биофизика.* 2000. Т. 45. С. 611–619.
23. Seglen P. // *Methods in Cell Biology* / Ed. D.M. Prescott. New York: Academic Press, 1976. V. 13. P. 29–83.
24. Усыннин И.Ф. Новые методы научных исследований в клинической и экспериментальной медицине / Ред. В.П. Казначеев. Новосибирск: Изд-во СО АМН СССР, 1980. С. 96–98.
25. Knook D.L., Blansjaar N., Sleyster E.Ch. // *Exp. Cell Res.* 1977. № 109. P. 317–329.
26. Hatch F.T., Lees R.S. // *Adv. Lipid. Res.* 1968. V. 6. P. 2–68.
27. Панин Л.Е., Биушкина М.Г., Поляков Л.М. // *Бюлл. экспер. биологии и медицины.* 1992. Т. 112. С. 34–36.
28. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 272.

The Effect of Tetrahydrocortisol–Apolipoprotein A-I Complex on the RNA Polymerase Interaction with Eukaryotic DNA and the Rate of Protein Biosynthesis in Hepatocytes

L. E. Panin^{*,#}, F. V. Tuzikov^{**}, N. A. Tuzikova^{**}, I. F. Usynin^{*}, and O. I. Gimautdinova^{*}

^{*}*Institute of Biochemistry, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Akad. Timakova 2, Novosibirsk, 630117 Russia*

^{**}*State Scientific Center of Virology and Biotechnology Vector NPO, Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, 630559 Russia*

A mechanism of activation of protein biosynthesis in hepatocytes was proposed as effected by the conditioned medium of nonparenchymal liver cells incubated in the presence of high density lipoproteins, cortisol, and lipopolysaccharides. It was found that the increase in the biosynthesis rate was associated with the formation of the tetrahydrocortisol–apolipoprotein A-I (THC–apoA-I) complex in macrophages, which display 5 α - and 5 β -reductase activity and are constituents of nonparenchymal liver hepatocytes. Using the small-angle X-ray scattering technique, it was shown that the THC–apoA-I–eukaryotic DNA interaction may break hydrogen bonds between pairs of complementary nucleic bases and cause the formation of single-stranded DNA fragments capable of binding to DNA-dependent RNA polymerase. The interaction is highly cooperative and has a saturating mode, up to six enzyme molecules being bound per DNA molecule.

Key words: apolipoprotein A-I, cortisol, DNA, lipoproteins, protein biosynthesis, small-angle X-ray scattering technique, tetrahydrocortisol

[#] *To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (383) 232-2735; fax: +7 (383) 235-6811; e-mail: ibch@cyber.ma.ncs.ru.*

The full English version of the paper is published in *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 2, and is also available (free) at <http://www.maik.ru/>.