

Г. А. ПАНОСЯН

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК И ГИСТОНОВ МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ В ДАЛЕКОЙ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ ОБЛАСТИ

Гистоны являются составной частью хромосом ядра клетки. С одной стороны, они участвуют в поддержании нормальной структуры хромосом и с другой—принимают участие в регуляторных механизмах клетки. Как структурная, так и регуляторная функции гистонов могут быть осуществлены только при взаимодействии их с ДНК. О том, что гистоны взаимодействуют с ДНК как *in vivo*, так и *in vitro*, в литературе хорошо известно [1, 2, 5, 6, 9, 10].

Обнаружение отдельных гистоновых фракций [11, 13, 15] и их избирательное действие на различные биохимические системы [7, 8, 11, 12, 14] указывают на то, что между различными фракциями гистона должна существовать функциональная гетерогенность. На последнюю также указывают данные по регуляторной роли гистонов.

С этой точки зрения исследование взаимодействия ДНК с различными гистонами в модельных экспериментах является чрезвычайно важным, поскольку обнаружение различий в процессах связывания между отдельными фракциями гистонов с ДНК и в свойствах образованных комплексов выявит специфичность взаимодействия этих веществ и укажет пути дальнейшего изучения условий и характера комплексообразования и свойств образованных комплексов, а следовательно, пути выяснения роли гистонов в клетке.

Нами было показано [3], что область далекого ультрафиолета (190—240 мкм) является довольно чувствительной в обнаружении различий между отдельными фракциями гистонов. Кроме того, показано, что поглощение гистонов в этой области зависит от условий среды, в которой проводится измерение, и что спектр поглощения различных фракций гистонов зависит от аминокислотного состава. Нами показано также, что опухолевый гистон отличается от нормального своей спектрофотометрической характеристикой в этой области ультрафиолета [4].

Очевидно, что, если условия среды влияют на характер спектра поглощения гистонов в далекой ультрафиолетовой области, взаимодействие между гистоном и ДНК, которое приводит к комплексообразованию, т. е. к образованию дезоксирибонуклеопротеида, также должно в какой-то мере отразиться на спектрофотометрических характеристиках смеси гистонов с ДНК.

В настоящей работе приведены данные исследования спектра поглощения гистонов, ДНК и смеси разных фракций гистонов с ДНК с целью установления специфического взаимодействия между ними и исследования характера комплексообразования.

Материал и методика. Нефракционированный гистон тимуса телят выделялся из нуклеопротеида экстракцией 0,25 N HCl и осаждением ацетоном. Нефракционированный гистон асцитной саркомы Йошида выделялся тем же методом из изолированных ядер, любезно предоставленных нам доктором Коннорсом (Институт Честер Битти). Отдельные фракции гистона тимуса телят были получены доктором Филлипсом (Институт Честер Битти). Использовался английский коммерческий препарат высокополимерной ДНК, выделенной из семенников лосося. Спектры поглощения водных растворов гистонов, ДНК и их смеси были получены регистрирующим двухлучевым спектрофотометром Perkin—Elmer модели UV 137, дающем возможность получения спектра поглощения начиная со 190 мкм.

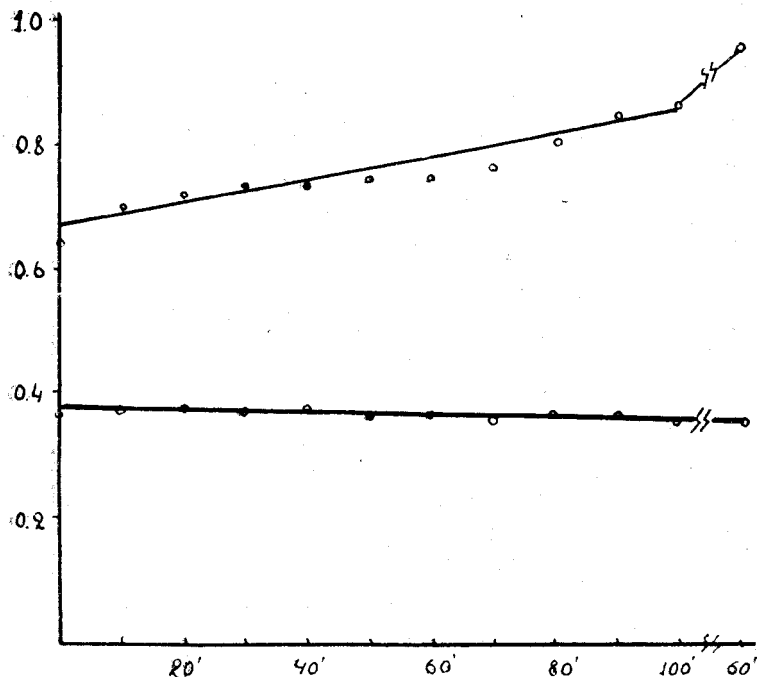


Рис. 1. Изменение оптической плотности водного раствора ДНК во времени. На оси абсцисс — инкубация при комнатной температуре в минутах; значения после перерыва кривой — через 60 минут после нагревания при 60°C. На оси ординат — оптическая плотность. Концентрация — 15 мкг/мл. Верхняя кривая — поглощение при 193 мкм, нижняя кривая — поглощение при 260 мкм.

Результаты. На рис. 1 приведены данные по оптической плотности раствора ДНК при длине волны 193 и 260 мкм в зависимости от времени инкубации при комнатной температуре. Как видно из рисунка, поглоще-

Биологический журнал Армении, XXII, № 10—3

ние при 193 мкм приблизительно в два раза превышает поглощение при 260 мкм и, что более важно, оптическая плотность в области 193 мкм меняется со временем в сторону увеличения, тогда как при 260 мкм она не меняется. Нагревание раствора ДНК в течение 1 часа при 60°C также приводит к увеличению оптической плотности при 193 мкм, но не при 260 мкм. Из этих результатов можно заключить, что поглощение раствора ДНК в далекой ультрафиолетовой области является более чувствительным тестом для определения состояния молекулы ее, чем поглощение в области 260 мкм. Природа изменения оптической плотности при 193 мкм в течение инкубации или при слабом нагревании остается неясной, однако очевидно, что эта область спектра чрезвычайно перспективна для исследования незначительных изменений в структуре молекулы ДНК в растворе, чем область, обычно применяемая для этой цели (область 260 мкм).

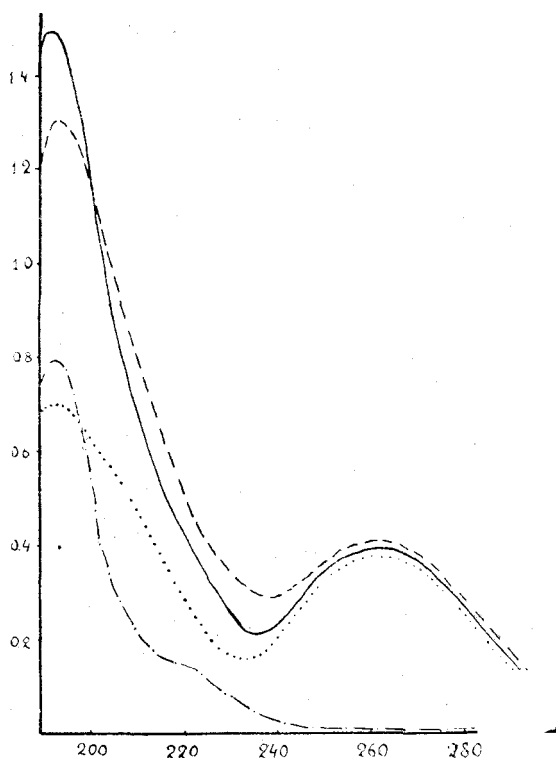


Рис. 2. Спектры поглощения растворов ДНК, нефракционированного гистона тимуса телят и их смеси в воде в области 190—300 мкм. На оси абсцисс — длина волны в мкм, на оси ординат — оптическая плотность. Концентрация: ДНК — 15 мкг/мл, гистон — 10 мкг/мл. Обозначения кривых: ДНК, —.—.— гистон, — — — — гистон + ДНК, — — — — расчетная кривая по сумме поглощений отдельно гистона и ДНК.

Именно поэтому мы далее исследовали спектры поглощения растворов гистонов, отдельных их фракций и их смесей с ДНК с целью обнаружения изменений в спектрах поглощения гистонов и ДНК, которые могут иметь место при комплексообразовании.

На рис. 2 приведены спектры поглощения ДНК, нефракционированного гистона тимуса телят и смеси ДНК+гистон, а также расчетная кривая, представляющая собой результат суммирования оптических плотностей ДНК и гистона в отдельности. Как видно из рис. 2, кривая ДНК+гистон не совпадает с расчетной кривой, обнаруживает большое расхождение, в основном в далекой ультрафиолетовой области. Чтобы оценить это расхождение, мы сравнивали эти две кривые и разницу в оптических плотностях при каждой длине волны выражали в ΔD , причем ΔD —величина положительная, если оптическая плотность смеси ДНК+гистон больше, чем сумма оптических плотностей отдельно раствора ДНК и гистона, и отрицательная, если расчетная величина суммы оптических плотностей больше оптической плотности смеси ДНК+гистон.

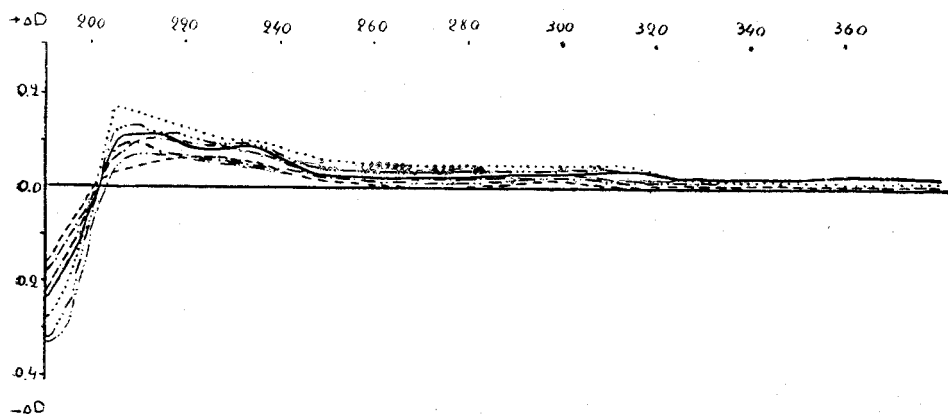


Рис. 3. ΔD для различных фракций и нефракционированного гистона тимуса телят и нефракционированного гистона асцитной саркомы Йошида. По оси абсцисс — длина волны в ммк, по оси ординат — ΔD . Обозначения кривых: — нефракционированный гистон тимуса, — — — — — нефракционированный гистон саркомы, — — — — — F_1 , F_{2a1} , — — — — — F_{2a2} , — — — — — F_{2b} , F_3 .

На рис. 3 приведены величины ΔD при разных длинах волн для нефракционированного гистона тимуса телят и асцитной саркомы Йошида, а также пяти фракций гистона тимуса телят. Из приведенного рисунка видно, что величина ΔD для разных гистоновых фракций значительно различается. В отношении всех фракций гистонов наблюдается двухфазное изменение величины ΔD в зависимости от длины волны. Величина ΔD отрицательна в области 190—203 ммк, затем она становится положительной. В положительной фазе можно наблюдать две области: область с относительно большими значениями ΔD , 203—250 ммк, и относительно малыми, 250—330 ммк. В отрицательной фазе наибольшее значение ΔD наблюдается для фракции F_{2b} и фракции F_3 , а наименьшее — для фракций F_1 и F_{2a2} . Нефракционированный гистон тимуса телят и опухолевый гистон занимают промежуточное положение. В области положительной фазы наибольшее значение ΔD имеют фракции F_{2a1} и F_3 , а наименьшее — фракции F_1 и F_{2b} . Между нефракционирован-

ными гистонами тимуса теленка и асцитной саркомы Йошида не наблюдается существенных различий.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что область далекого ультрафиолета (190—240 мкм) имеет то преимущество перед ближним ультрафиолетом, что, используя эту область, можно обнаружить такие изменения в оптической плотности ДНК, гистонов и смеси ДНК+гистон, зависящие от природы гистоновых фракций, которые невозможно заметить при использовании ближнего ультрафиолета.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 10.1 1968 г.

Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

ՀԵՌԱՎՈՐ ՌԵՏՐԱՄԱՆՈՒՇԱԿԱԳՈՒՅՆ ՀԱՌԱԳԱՅԹՆԵՐԻ ՏԻՐՈՒՅԹՈՒՄ ՍՊԵԿՏՐՈՑՈՏՈՄԵՏՐԻԱՅԻ ՄԵԹՈԴՈՎ ԴՆԹ-Ի ԵՎ ՀԻՍՏՈՆՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԳԵՑՈՒԹՅԱՆ ՌԵՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ստացված են սողմոնի սերմնարաններից անջատված ԴՆԹ-ի ջրային-լուծույթների, հորթի ուրցագեղձից ամբողջական հիստոնների և նրա հինգ ֆրակցիաների, իռլիգա ասցիտային սարկոմայի ամբողջական հիստոնների ու ԴՆԹ-ի խառնուրդների կլանման սպեկտրները հեռավոր ուլտրամանուշակագույն ճառագայթների տիրույթում (190—240 մմկ)։

Ցույց է տրված, որ այդ տիրույթում հաշտնաբերված են ԴՆԹ-ի և հիստոնների ու նրանց խառնուրդների օպտիկական խտության այնպիսի փոփոխություններ, որոնք չեն նկատվում մերձավոր ուլտրամանուշակագույն ճառագայթների տիրույթում (240—330 մմկ)։

Ստացված կլանման սպեկտրները վերլուծվում են ԴՆԹ-ի և հիստոնների կոմպլեքսագոյացման սպեցիֆիկության լույսի տակ։

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гаңелина Л. Ш. Цитология, 7, 155—165, 1965.
2. Паносян Г. А. Биологический журнал Армении, 20, 9, 8—19, 1967.
3. Паносян Г. А. Первая республиканская сессия по общим вопросам молекулярной биологии и биофизики, 41—42, 1967.
4. Паносян Г. А. Биологический журнал Армении, 21, 11, 79—85, 1968.
5. Рапопорт Э. А. Усп. совр. биологии, 59, 57—76, 1965.
6. Сидорова Е. В. Усп. биологической химии, VIII, 117—137, 1967.
7. Allfrey V. G., Littau V. C., Mirsky A. S. Proc. N. A. S., 49, 414—420, 1963.
8. Barr G. C., Butler J. A. V. Nature, 199, 1170—1172, 1963.
9. Bonner J. The molecular biology of development, Clarendon Press, Oxford, 1965.
10. Busch H. Histones and other nuclear proteins. Academic Press, N. Y.—L. 1965.
11. Butler J. A. V. Exptl Cell Res., Suppl. 9, 349—358, 1963.
12. Hindley J. BBRC, 12, 175—179, 1963.
13. Johns E. W. Biochem. J. 92, 55, 1964.
14. Liao M. C., Hnilica L. S., Huribert R. B. Proc. N. A. S. 53, 626—633, 1965.
15. Phillips D. M. P. Progr. Biophys. Biophys. Chem. 12, 211—280, 1962.