

Г. А. ПАНОСЯН

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГИСТОНОВ И ИХ ФРАКЦИЙ С НЕКОТОРЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ

Регуляторная роль гистонов предполагает наличие в клетках большого количества гистоновых молекул, отличающихся друг от друга по своему аминокислотному составу и последовательности аминокислот. Биологическая активность гистонов должна зависеть от расположения вдоль полипептидной цепочки активных группировок, таких как аргинин, лизин и др.

В связи с этим определение гетерогенности гистонов, наличие различных гистоновых фракций в клетке, тканевой и видовой специфичности гистоновых фракций представляется чрезвычайно важным.

В литературе имеются данные, указывающие на наличие в клетках нескольких хорошо определяемых фракций гистонов [5, 11]. Однако до сих пор не доказана тканевая или даже видовая специфичность гистоновых фракций. Хотя и между гомологичными фракциями, выделенными из различных источников, обнаруживаются некоторые различия, тем не менее они не могут считаться достоверными.

Причиной подобной картины являются попытки исследователей установить гетерогенность и специфичность гистонов при помощи определения аминокислотного состава гистоновых фракций. Но данный подход слишком груб для того, чтобы можно было либо утверждать либо, наоборот, отрицать гетерогенность или специфичность гистонов.

Единственным методом, который может непосредственно ответить на вопрос о наличии специфичности гистонов, является определение аминокислотной последовательности в полипептидной цепочке гистоновой молекулы. Однако в настоящее время рано говорить о подобного рода исследованиях, поскольку пока никому не удалось выделить индивидуальный чистый гистон, что является первым необходимым этапом определения аминокислотной последовательности белковой молекулы.

Имеются другие, косвенные методы для определения особенностей гистонов или их фракций, выделенных из различных источников. К таковым относится целый ряд физических и физико-химических методов исследования (электрофорез, ионообменная адсорбция и т. п.). Но и эти методы в основном могут быть использованы для обнаружения различий двух или нескольких гистоновых фракций, являющихся результа-

том скорее аминокислотного состава, чем аминокислотной последовательности.

Однако имеется одна довольно интересная возможность в какой-то мере обнаружить различия между полипептидными цепочками, отличающимися аминокислотной последовательностью, а не составом аминокислот.

Суть идеи заключается в следующем. Если мы имеем две белковые молекулы, отличающиеся только аминокислотной последовательностью, то можно ли обнаружить различия между ними, присоединяя к ним какой-либо дополнительный индикатор, исследование свойств которого как в отсутствии белковой молекулы, так и при наличии ее может дать нам информацию о различной аминокислотной последовательности при сходном аминокислотном составе, т. е. обнаружить различия там, где это невозможно сделать ни химическими, ни другими принятыми физическими методами. Эти индикаторы должны обладать способностью изменять некоторые свои свойства (которые и должны быть исследованы) в зависимости от того, к какой части белковой молекулы они присоединились, как далеко друг от друга отстоят присоединенные к полипептидной цепочке идентичные молекулы индикатора и т. п.

Нам кажется, что подобными индикаторами могут служить хорошо известные как биологам, так и химикам и физикам соединения, поглощающие свет в видимой области, т. е. красители.

Какие у нас имеются основания считать, что красители именно те вещества, которые могут быть использованы для этой цели?

Они широко применяются в биологии для окрашивания клеток и тканей, а также субклеточных структур (витальное окрашивание, люминесцентная микроскопия и др.). Кроме того, установлено, что красители обладают биологической активностью: некоторые из них проявляют бактерицидный эффект [24], другие тормозят развитие опухоли и ингибируют ряд ферментативных систем [1, 31], третьи сами вызывают образование опухоли [20], а четвертые обладают мутагенной активностью [23].

Как цито- и гистохимическое использование, так и биологическая активность красителей частично основана на их способности связываться с белками. В некоторых случаях даже точно доказана корреляция между токсическим эффектом красителя и его способностью связываться с белками [4].

Процесс взаимодействия красителя с белком сложен и разнообразен и зависит от многих факторов (концентрации красителя и белка, рН среды, наличия солей и т. д.) [1—3, 6—9, 13].

Для нас особенно важно, что на процесс взаимодействия красителя с белками существенное влияние оказывает строение самого полимера и происходящие при этом изменения оптических свойств красителя, что легко обнаруживается обычными спектральными методами.

О том, что красители, связываясь с белками, меняют свои оптические свойства, было известно уже давно из гистохимических работ. Этот

феномен был назван метахромазией, под которой понималось изменение цвета красителя при взаимодействии с высокомолекулярными веществами [13].

В дальнейшем это явление было исследовано более подробно уже в модельных опытах с использованием простых систем: смеси красителей и белков в водном или солевых растворах [3, 13].

Было показано, что спектры поглощения и флуоресценции красителей меняются в присутствии различных белков [6—9]. Эти изменения проявляются либо в сдвиге максимумов поглощения, либо в изменении интенсивности максимумов. Изменяется также длительность возбужденного состояния флуоресцирующего красителя и соотношение его мономерных и димерных форм, что в конечном счете сказывается на их спектрах поглощения.

О роли структуры белка, или вообще полимера, в комплексообразовании с красителем говорит уже само основное условие комплексообразования—наличие молекул с достаточно большим числом заряженных групп [13].

Известно, что для образования комплекса белок-краситель существенное значение имеет структура элементарных звеньев полимера. Необходимо, чтобы молекула полимера имела минимальную плотность заряда на поверхности молекулы, что соответствует минимальному расстоянию в 3—5 Å между соседними заряженными группами [13]. Кроме того, большое значение должна иметь вторичная и третичная структуры молекулы полимера, которые обеспечивают ее гибкость, необходимую для «подгонки» расстояния заряженных групп полимера к расстоянию между молекулами красителя [18].

Все сказанное говорит в пользу перспективности использования красителей в качестве индикаторов для определения различий в аминокислотной последовательности между двумя белковыми молекулами, имеющими одинаковый, или почти одинаковый, аминокислотный состав, поскольку плотность поверхностного заряда молекулы, характер распределения этого заряда определяются именно аминокислотной последовательностью.

Что нам известно о взаимодействии гистонов с красителями?

В литературе имеется целый ряд гистохимических исследований, где применяются некоторые анионные красители для определения локализации гистонов в клетке [17, 28]. Очень мало данных о взаимодействии гистонов и красителей в растворе. Леб [22] исследовал взаимодействие зозина с нефракционированным гистоном и некоторыми его фракциями, отличающимися содержанием аргинина и лизина. Лоуренс [21] исследовал взаимодействие нефракционированного гистона (НФГ) тимуса теленка и его фракций с 8-анилинонафтален-1-сульфоновой кислотой. Тот же краситель был использован другими авторами [26] для определения количества белка. Перед нами была поставлена задача исследовать характер и условия взаимодействия различных фракций гистонов с целым рядом красителей.

В настоящем сообщении мы приводим результаты серии опытов по спектрофотометрии смесей трех красителей (флуоресцеина натрия, януса черного и зеленого светлого) с различными фракциями гистона тимуса теленка и гистонами, выделенными из опухолевых клеток. Предварительное сообщение было сделано ранее [12].

Методы исследования. В опытах были использованы нефракционированный гистон (НФГ) тимуса теленка и пять его фракций F_1 , F_{2-1} , F_{2-2} , $F_{2в}$ и F_3 , любезно предоставленных нам доктором Филлипсом (Институт по исследованию рака им. Честер Битти Лондонского университета), и НФГ, выделенный нами прямой кислотной экстракцией из дезоксирибонуклеопротеида двух штаммов асцитной саркомы Йошида, отличающихся чувствительностью к алкилирующим агентам (S- и R-штаммы, чувствительный и резистентный к азотистому иприту и сарколизину) [29, 30]. Очищенные ядра клеток этих двух линий саркомы были получены доктором Т. Коннорсом и сотр. (из того же института). Изолированные ядра разрушали в микроразмельчителе в физиологическом растворе. Очищенному таким образом от растворимых белков осадку, содержащему дезоксирибонуклеопроteid, добавляли 0,25 М раствор соляной кислоты и экстрагировали при медленном помешивании на холоде в течение 18—20 час. Полученный экстракт просветляли пропусканием через бактериальный фильтр. Гистоны из этого экстракта осаждали добавлением шести объемов холодного ацетона, осадок трижды промывали ацетоном и высушивали под вакуумом.

Для сравнения был использован бычий кристаллический сывороточный альбумин.

В качестве красителей были использованы флуоресцеин натрия (Fluoresceinum sodium B. P., английский препарат BDN, LTD), янус черный (Janus Black, Goerge T. Gurr, английский препарат) и зеленый светлый (Light Green SF Yellowish, Edward Gurr LTD, Michrome, английский препарат).

Спектрофотометрия проводилась на спектрофотометре Perkin-Elmer модели UV 137, дающем возможность измерять оптическую плотность начиная с 190 мкм. Определяли спектры поглощения растворов красителя и смеси краситель+белок в дистиллированной воде, рН около 5,8—6,0. Концентрация белка во всех случаях—12,5 мкг/мл, красителя—от 2,5 мкг/мл до 17,5 мкг/мл (концентрации, дающие при разных максимумах оптические плотности, не превышающие 1,0—1,2).

Результаты. а) Флуоресцеин натрия. Спектр поглощения использованного нами препарата флуоресцеина натрия имеет пять максимумов: при длинах волн 1935 Å, 2315 Å, 2730 Å, 3120 Å 4760 Å. Соотношение молярных экстинкций при данных максимумах равно приблизительно 1,0 : 0,64 : 0,26 : 0,13 : 0,36. На рис. 1 приведены результаты измерения поглощения красителя и смеси краситель-белок при всех пяти максимумах (за 100% принята оптическая плотность красителя в водном растворе в отсутствии белка). Наибольшая разница между оптическими плотностями красителя и смеси красителя с соответству-

ющим белком наблюдается при λ_{1935} . При λ_{2315} все исследованные белки слегка понижают оптическую плотность флуоресцеина натрия, за исключением F_{2a1} фракции, которая не влияет на оптическую плотность красителя. При λ_{2730} все фракции гистона тимуса теленка и альбумин не влияют на оптическую плотность красителя, за исключением F_3 фракции и

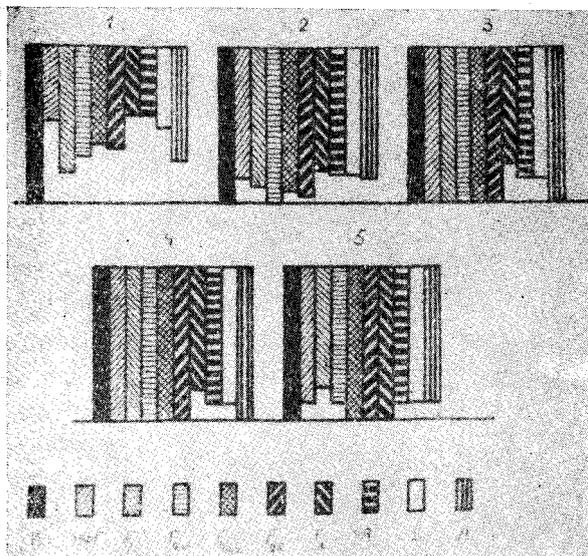


Рис. 1. Влияние наличия белков на оптическую плотность при максимумах поглощения флуоресцеина натрия. 1— λ_{1935} , 2— λ_{2315} , 3— λ_{3120} , 4— λ_{3120} , 5— λ_{4760} ; К — краситель. Концентрация белка — 12,5 мкг/мл, концентрация красителя — от 2,5 мкг/мл до 17,5 мкг/мл.

S- и R-гистонов. Только эти три белка уменьшают оптическую плотность флуоресцеина натрия и при λ_{3120} . При λ_{4760} уже три других белка, F_{2a1} , F_{2b} и F_3 не влияют на поглощение света красителем. Таким образом, для флуоресцеина наиболее чувствительной областью в отношении угнетающего действия белков на оптическую плотность является область далекого ультрафиолета с максимумом поглощения λ_{1935} . В данной области разные фракции гистонов приводят к разной степени уменьшения оптической плотности флуоресцеина. Эта реакция не специфична для гистонов, поскольку альбумин обладает подобным эффектом.

б) Янус черный. Спектр поглощения януса черного имеет три максимума поглощения: при длинах волн 1940 Å 2850 Å и 6000 Å с соотношением оптических плотностей при данных максимумах 1,0 : 0,31 : 0,34. На рис. 2 (1—3) приведены величины оптических плотностей януса черного в отсутствии и в присутствии гистонов и альбумина. Гипохромный эффект наблюдается только при λ_{1910} ; где имеется одно исключение— F_{2a1} фракция; в отличие от всех остальных фракций гистона и альбумина она вызывает гиперхромный эффект. При остальных двух максимумах регулярно обнаруживается гиперхромный эффект.

в) Зеленый светлый. Наиболее интересными оказались результаты, полученные с зеленым светлым. Спектр поглощения этого красителя имеет четыре максимума: при 1940 Å, 3165 Å, 4260 Å, и 6330 Å, с отношением оптических плотностей при данных максимумах 1,0 : 0,23 :

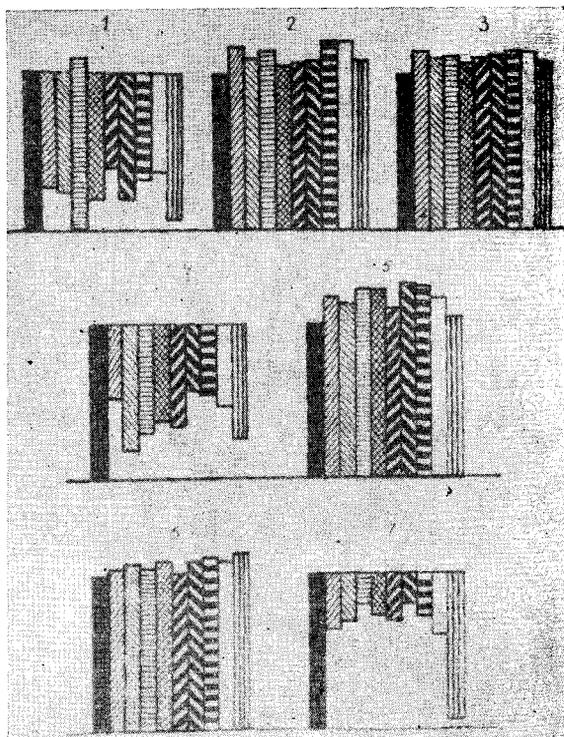


Рис. 2. Влияние наличия белков на оптическую плотность при максимумах поглощения януса черного и зеленого светлого. 1—3—янус черный, 4—7—зеленый светлый: 1— λ_{1940} , 2— λ_{2850} , 3— λ_{6000} . 4— λ_{1940} , 5— λ_{3165} , 6— λ_{4260} , 7— λ_{6330} . Обозначения те же, что и на рис. 1.

0,18 : 0,47. На рис. 2 (4—7) приведены относительные оптические плотности смесей различных гистоновых фракций с зеленым светлым при четырех максимумах. При λ_{1940} , как и в случае с двумя другими красителями, наблюдается гипохромизм для всех исследованных белков. При двух следующих более длинноволновых максимумах — λ_{3165} и λ_{4260} — наоборот, наблюдается гиперхромный эффект. В отличие от первых двух красителей, зеленый светлый в присутствии белков уменьшает оптическую плотность в самой длинноволновой области — λ_{6330} , причем данный гипохромный эффект, по-видимому, специфичен для гистонов, поскольку альбумин в этой области вызывает лишь незначительное уменьшение оптической плотности зеленого светлого.

В табл. 1 приведена степень уменьшения оптической плотности зеленого светлого для разных гистонов и зависимость этого изменения от количества аргинина и лизина в этих белках (аминокислотный состав фракций гистонов приведен по [25], а альбумина—по [16]).

Таблица 1

Гипохромный эффект зеленого светлого при λ_{6336} , вызванный различными белками и зависимость этого эффекта от количества аргинина и лизина

Белок	Аргинин, %	Лизин, %	% гипохромности
НФГ	9,2	15,6	65
F ₁	1,8	26,8	70
F _{2a1}	12,8	10,1	80
F _{2a2}	9,9	11,2	73
F _{2в}	8,0	14,2	70
F ₃	11,8	9,9	80
Альбумин	3,9	9,3	6

Как показывают данные, приведенные в таблице, гипохромный эффект зависит от содержания аргинина и лизина в молекуле белка. Максимальный гипохромный эффект наблюдается при добавлении к красителю F_{2a1} и F₃ фракций, которые содержат соответственно 12,8 и 11,8% аргинина. Отсюда можно было бы предположить, что гипохромный эффект зависит от количества аргинина в молекуле. Однако во фракции F₁ имеется слишком мало аргинина—1,8%, но в этом случае мы не имеем минимального гипохромного эффекта. Но фракция F₁ содержит 26,8% лизина. Весьма вероятно, что слишком большое содержание его в молекуле компенсирует недостаток аргининовых остатков.

Необходимо также отметить, что уменьшение оптической плотности зеленого светлого в смеси с гистоном сопровождается также сдвигом максимума поглощения в сторону длинных волн.

Обсуждение результатов. Приведенные нами результаты показывают, что между различными красителями и разными гистоновыми фракциями, с одной стороны, а также между нефракционированными гистонами, выделенными из различных источников,—с другой, существует определенное взаимодействие при их смешивании, которое отражается на их суммарном спектре поглощения в области 190—650 мкм.

Оптическая плотность при каждом максимуме одного и того же красителя изменяется по-своему. При всех трех красителях наблюдается гипохромный эффект к области первого максимума—1930—1940 Å. В этой области лишь в случае применения януса черного отсутствует гипохромный эффект у альбумина и наблюдается гиперхромный эффект у F_{2a} фракции гистона тимуса теленка.

Очень интересным оказался факт почти полного совпадения сравнительной картины гипохромного эффекта исследованных белков в области далекого ультрафиолета (1940 Å) для двух красителей—флуоресценна натрия и зеленого светлого (ср. рис. 1, 1 и рис. 2, 4). Это говорит о том, что при более подробном исследовании далекой ультрафиолетовой области с использованием более широкого набора красителей и ги-

стоновых и негистоновых белков возможно будет уловить зависимость гипохромного эффекта от структуры белковой молекулы.

Несколько сложнее интерпретация данных по гиперхромному эффекту, наблюдаемому в случаях использования януса черного и зеленого светлого (рис. 2—2, 3 и 5, 6).

При λ_{6330} с использованием зеленого светлого замечается явно специфический гипохромизм в отношении всех исследованных гистонов при почти полном отсутствии гипохромного эффекта в случае альбумина. Говорить что-либо определенное о зависимости гипохромного эффекта от аминокислотного состава белковых молекул преждевременно.

Таким образом, исследованы спектры поглощения смесей трех красителей—флуоресцеина натрия, януса черного и зеленого светлого—с нефракционированным гистоном тимуса теленка и опухолевых клеток крыс, а также пятью фракций гистона тимуса теленка.

Обнаружено, что в водном растворе спектры поглощения смесей красителей и белков несколько изменены по сравнению со спектром поглощения чистых красителей. Эти изменения зависят как от вида красителя, так и вида белка.

Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР

Поступило 2.XI 1968 г.

Չ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

ՈՐՈՇ ՆԵՐԿԵՐԻ ՀԵՏ ՀԻՍՏՈՆՆԵՐԻ ՈՒ ՆՐԱՆՅ ՖՐԱԿՅԻԱՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԳԵՑՈՒԹՅԱՆ ՍՊԵԿՏՐԱՖՈՆՈՄԵՏՐԻԿ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հետազոտված են երեք ներկերի՝ նատրիում ֆլուորեսցեինի, յանուս սևի և բաց կանաչի կլանման սպեկտրները, ինչպես նաև այդ ներկերի խառնուրդները հորթի թիմուսային հիստոնի, սրա հինգ ֆրակցիաների ու առնետների ուսուցքային բջիջների հետ: Ցույց է տրված, որ ներկերի և հիստոնների ջրային լուծույթների խառնուրդներում կլանման սպեկտրները, համեմատած հիստոն չպարունակող ներկերի լուծույթների կլանման սպեկտրների հետ, որոշ չափով փոփոխված են: Այդ փոփոխությունները կախված են ինչպես ներկի, այնպես էլ հիստոնի տեսակից:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Браун А. Д. ДАН СССР, **62**, 263—266, 1948.
2. Браун А. Д. Биохимия, **13**, 409—416, 1948.
3. Браун А. Д. Биохимия, **16**, 399—409, 1951.
4. Браун А. Д., Фельдман Н. Л. ДАН СССР, **68**, 757—760, 1949.
5. Буш Х. Гистоны и другие ядерные белки, ИЛ, 1967.
6. Карякин А. В., Чмутина Л. Д. Изв. АН СССР, Сер. физ., **27**, 791, 1963.
7. Карякин А. В., Чмутина Л. Д. Биофизика, **9**, 515—518, 1964.
8. Карякин А. В., Чмутина Л. Д. Биофизика, **9**, 666—670, 1964.

9. Карякин А. В., Чмутина Л. Д. В кн.: Молекулярная биофизика, М., 228—234, 1965.
10. Кондакова Н. В., Эйдус Л. Х. В кн.: Молекулярная биофизика, М., 217—228, 1965.
11. Паносян Г. А. Биологический ж. Армении, 20, 9, 8—19, 1967.
12. Паносян Г. А. Матер. второй научной конф. Института exper. биологии АН АрмССР, 14—16, 1968.
13. Савастьянова М. В. Успехи химии, 32, 1233—1269, 1963.
14. Сапежинский И. И., Силаев Ю. В., Кузнецова А. В. В кн.: Биоэнергетика и биологическая спектроскопия, М., 26—28, 1967.
15. Чмутина Л. А., Карякин А. В. В кн.: Молекулярная биофизика, М., 234—240, 1965.
16. Юз У. В кн.: Белки, под ред. Г. Нейрата и К. Бейли, 301—405, 1958.
17. Alfert M., Geschwind F. F. Proc. Natl. Acad. Sci, 39, 10, 991, 1953.
18. Brabley D. F., Feisenfeld G. Nature, 184, 1920, 1959.
19. Endo H., Tohda H., Tada M. Sci. Rept. Res. Fnst., Tonaki Univ. ser. C 11 (2), 192, 1963.
20. Gross E. Z. Krebsforsch. 64, 287, 1961.
21. Laurence D. J. R. Biochem. J., 99, 419, 1966.
22. Loeb J., C. R. Acad. Sci, Paris, 258, 5087, 1964.
23. Lueck H., Wallnoefer P., Bach H. Pathol. Microb. 26, 206, 1963.
24. Michaelis L. Einführung in die Farbstoffchemie Für Histologen. Berlin, 1902.
25. Phillips D. M. P. Abst. of a meeting of Brit. Biophys. Soc. on Phys. Studies, of Basic Mol., 1, 1966.
26. Shepperd G. R., Noland B. J. Anal. Biochem. 11, 443, 1965.
27. Sone K. Nippon Negeikagaku Kaishi, 36 (1), 7, 1962.
28. Swift H. In „The nucleohistons“, p. 169, 1964.
29. Ujhazy V., Winkler A. Neoplasma, 12, 11, 1965.
30. Ujhazy V., Winkler A. Folia biologica (Praha), 11, 434, 1965.
31. Weil L., Scibls S. Arch. Biochem. Biophys. 54, 368, 1955.