

Г. А. ПЛНОСЯН, Э. М. НАЗАРЯН, Д. М. ДЖАВРՇԻԱՆ

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЗЕЛЕННОГО ПРОЧНОГО С ГИСТОНАМИ И ДРУГИМИ БЕЛКАМИ

В свое время одним из авторов этой статьи было высказано предположение о том, что известное в литературе изменение оптических свойств красителя при взаимодействии с биополимерами в растворе [5, 7] может быть использовано для определения структурных особенностей биополимеров [2, 4]. Подобный метод, как предполагалось, мог оказаться особенно плодотворным в тех случаях, когда использование других методов исследования структурных особенностей макромолекул было бы затруднено по тем или иным причинам.

В свете вышесказанного определенный интерес представляет изучение взаимодействия красителей с гистонами—основными белками ядер клеток многоклеточных и некоторых одноклеточных организмов.

О том, что гистоны взаимодействуют с некоторыми красителями, было известно относительно давно. Эти данные были известны, в основном, из гистохимических работ, в которых гистоны окрашивались в слабощелочной среде анионным красителем зеленым прочным [6, 8]. На этом взаимодействии и основан широко распространенный метод гистохимического окрашивания гистонов в тканях и клетках.

Ранее одним из нас [2, 4] было показано, что из трех использованных красителей—зеленого светлого, януса черного и флуоресценна натрия—только зеленый светлый (т. е. краситель, связывающийся с гистоном) изменял свои оптические свойства при смешивании с растворами гистона. При этом было обнаружено, что разные фракции гистона тимуса теленка, а также гистоны, выделенные из клеток двух опухолевых линий, по-разному влияют на оптические свойства зеленого светлого, вызывая различную степень гипохромного и гиперхромного эффекта при максимумах поглощения.

В настоящем сообщении приводятся данные по взаимодействию гистона и других белков с зеленым прочным в растворе (об оптических свойствах растворов зеленого прочного смотрите [1]).

Материал и методика. Получение нефракционированного гистона тимуса теленка (НФГ) и гистона чувствительной и резистентной к азотистому иприту линий саркомы Ношида (S-гистон и R-гистон) было описано ранее [3]. Отдельные фракции гистона тимуса теленка (F_1 , F_{2a1} , F_{2a2} , F_{2b} , F_3) были нам любезно предоставлены доктором Филлипсом (Институт, Честер Битти, Лондон).

В опытах использованы препараты зеленого прочного английской фирмы «Михром», польский препарат бычьего сывороточного альбумина и препарат протаминсульфата отечественного производства. Спектр поглощения растворов зеленого прочного с белками получен с помощью саморегистрирующего спектрофотометра СФ-10. В опытах обычно использовался раствор гистона (или другого белка) в концентрации 1 мг/мл и раствор зеленого прочного в концентрации 0,375 мМ, приготовленные на дистиллированной воде, рН около 6,0. Концентрация раствора зеленого прочного выбрана такой, чтобы в конечном разбавлении оптическая плотность при использовании 1 мм кюветы не превышала 1,0—1,2. В опытах по влиянию рН на взаимодействие зеленого прочного и гистона были использованы 0,1 М цитратный буфер, рН 3,0, и 0,1 М боратный буфер, рН 12,4.

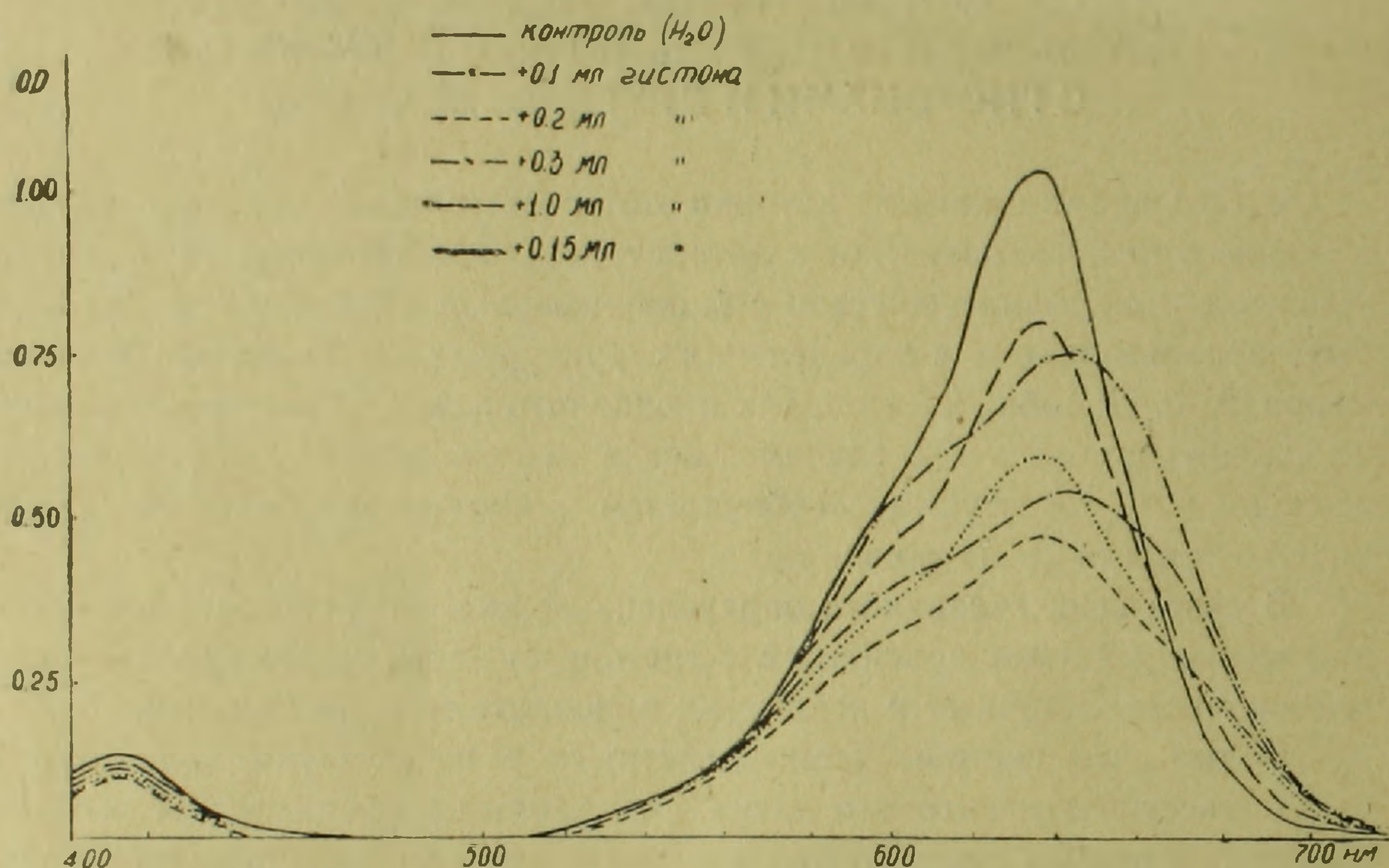


Рис. 1. Спектры поглощения зеленого прочного и смеси зеленого прочного с различными концентрациями гистона тимуса телянка. На оси ординат—оптическая плотность, на оси абсцисс—длина волны в нм. Конечная концентрация зеленого прочного—0,25 мМ, раствор гистона—1 мг/мл, общий объем—3 мл. Растворы приготовлены на дистиллированной воде.

Результаты и обсуждение. В наших экспериментах с зеленым светлым [2, 4], а также в предварительных опытах с зеленым прочным было показано, что добавление к водному раствору этих красителей небольших количеств гистона приводит к уменьшению оптической плотности при максимумах поглощения. На рис. 1 приведен спектр поглощения водного раствора зеленого прочного в концентрации 0,250 мМ в отсутствии и при наличии разных количеств НФГ тимуса телянка.

Из приведенных на рисунке кривых видно, что добавление гистона приводит к уменьшению оптической плотности зеленого прочного при двух максимумах поглощения: 412 нм и 636 нм. Поскольку коротковолновый максимум менее интенсивен и относительно слабо реагирует на добавление гистона, нами принимался во внимание только длинноволновый максимум при 636 нм.

Для анализа концентрационных отношений между зеленым прочным и гистонами мы использовали два варианта опытов. В одном варианте к определенному количеству зеленого прочного (2 мл 0,375 мМ раствора) добавлялись разные количества гистона (от 0,1 мл до 1,0 мл раствора гистона в концентрации 1 мг/мл). При этом определялась оптическая плотность смеси и сдвиг максимума (рис. 2). Другой вариант опытов заключался в том, что к постоянному количеству водного раствора гистона (0,2 мл) добавлялись увеличивающиеся количества раствора зеленого прочного (рис. 3). В этом случае об эффекте гистона судили по степени

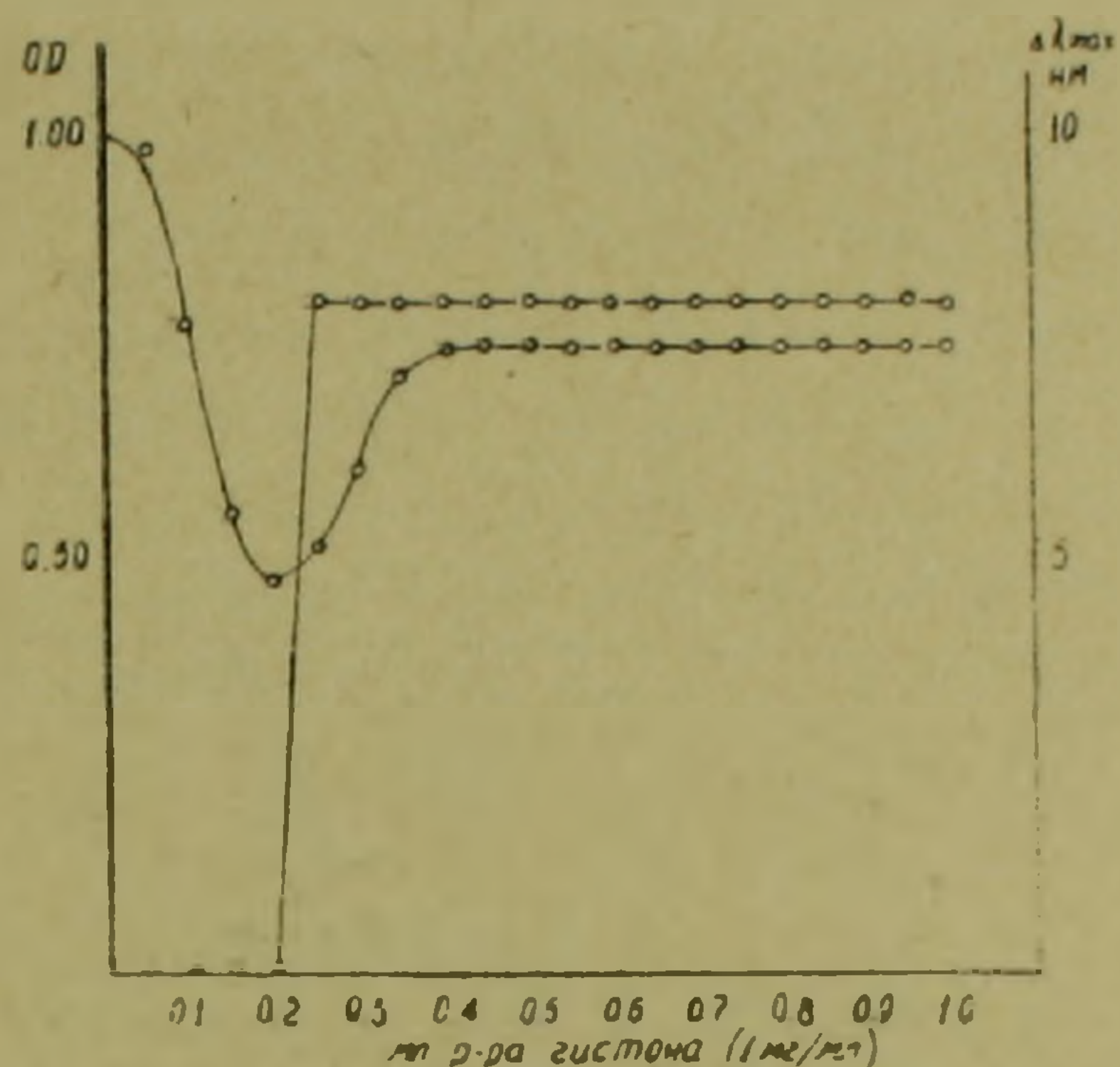


Рис. 2. Зависимость оптической плотности зеленого прочного от концентрации гистона. На оси ординат — оптическая плотность и сдвиг максимума в нм, на оси абсцисс — мл раствора гистона (1 мг/мл). Концентрация зеленого прочного — 0,25 мМ; общий объем — 3 мл. 1 — оптическая плотность, 2 — сдвиг максимума.

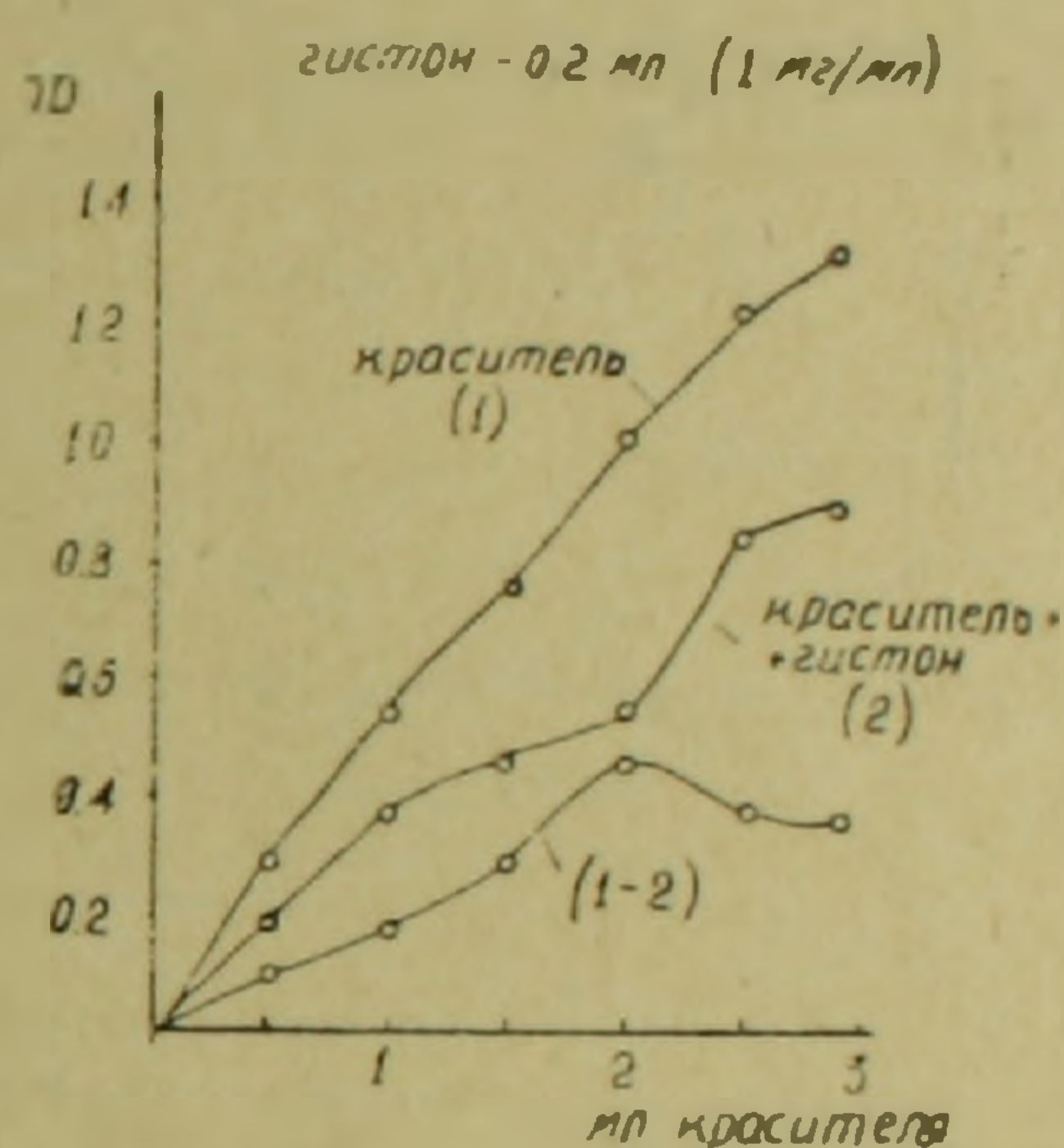


Рис. 3. Оптическая плотность увеличивающихся концентраций зеленого прочного в присутствии гистона. На оси ординат — оптическая плотность, на оси абсцисс — мл красителя (0,375 мМ). Объем смеси — 3 мл.

уменьшения оптической плотности и разности оптических плотностей контрольных и опытных растворов. Оба варианта показали одну и ту же зависимость, а именно: между зеленым прочным и гистонами имеется четко выраженная концентрационная зависимость, заключающаяся в том, что максимальное уменьшение оптической плотности имеет место при добавлении к 2 мл раствора зеленого прочного 0,2 мл раствора гистона.

При добавлении увеличивающихся количеств гистона к постоянному количеству зеленого прочного наблюдаются три хорошо выраженные фазы изменения оптической плотности зеленого прочного: фаза уменьшения оптической плотности, фаза повышения и фаза постоянного относительно низкого уровня ее. Интересно отметить, что в I фазе, а также в точке минимальной оптической плотности максимум поглощения находится при длине волны 636 нм, тогда как переход во II фазу тотчас же приводит к сдвигу в длинноволновую область приблизительно на 8 нм (рис. 2).

Чтобы проверить, в каких условиях может иметь место подобное взаимодействие, смесь зеленого прочного и гистона готовилась не на дистиллированной воде, а в кислой (рН 3,0) и щелочной (рН 12,4) средах (рис. 4а). Как видно из рисунка, аналогичная, но более резко выражен-

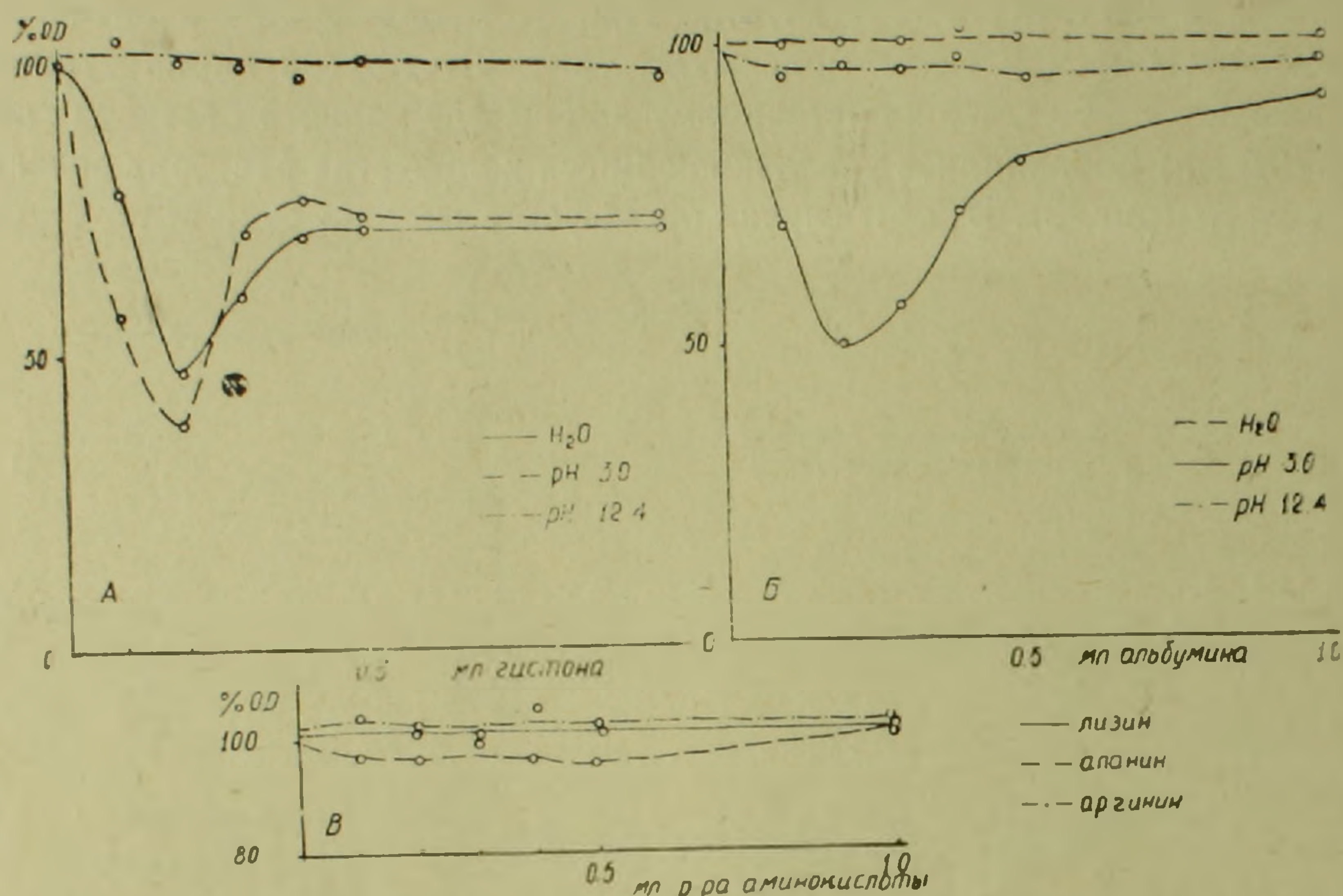


Рис. 4. Оптическая плотность зеленого прочного в присутствии гистона, альбумина и аминокислот при разных рН. На оси абсцисс—мл добавленного вещества (концентрация 1 мг/мл), на оси ординат—оптическая плотность в % к контролю (зеленый прочный 0,250 м.М).

ная, реакция имеет место при рН 3,0 и отсутствует при рН 12,4. Это говорит о том, что во взаимодействии зеленого прочного и гистона решающее значение имеет степень диссоциации и количество аминогрупп. Об этом свидетельствуют также данные опытов, проведенных с альбумином. (рис. 4б)—альбумин реагирует с зеленым прочным только при рН 3,0, но не в дистиллированной воде или в среде с рН 12,4.

Однако не только наличие аминогрупп имеет значение в подобной реакции. В трехфазном изменении оптической плотности зеленого прочного, кроме наличия диссоциированных аминогрупп, большое значение имеет также полимерная природа белковой молекулы. В доказательство можно привести эксперименты с добавлением к раствору зеленого прочного увеличивающихся количеств лизина, аргинина и аланина (эти аминокислоты составляют вместе около 40% всех аминокислот гистона тимуса телят). Результаты этих экспериментов приведены на рис. 4в, из которого видно, что ни одна из исследованных аминокислот не влияет на оптическую плотность зеленого прочного.

Поскольку макромолекулярная структура имеет большое значение для реакции гистона с зеленым прочным, было интересно определить

влияние денатурации гистоновой молекулы на ее способность связываться с зеленым прочным, тем более что из литературы известен факт увеличения способности макромолекул связывать красители при тепловой денатурации. С этой целью была поставлена серия опытов, в которых параллельно получались кривые зависимости оптической плотности зеленого прочного от наличия гистона, выдержанного в течение 2 час. при комнатной температуре и прокипяченного в водяной бане в течение того же времени (рис. 5).

Кипячение растворов гистона, как выяснилось, не приводит к существенному изменению способности гистоновой молекулы связываться с зеленым прочным, имеет место лишь небольшое уменьшение оптической плотности в третьей фазе. Эти данные еще раз подтверждают известную в литературе стабильность гистоновой молекулы по отношению к денатурационным воздействиям и указывают на сравнительно простую третичную структуру гистонов.

Поскольку при относительно небольших количествах гистона в растворе зеленого прочного наблюдается уменьшение оптической плотности (1 фаза), то было бы естественным предположить, что при этом могут

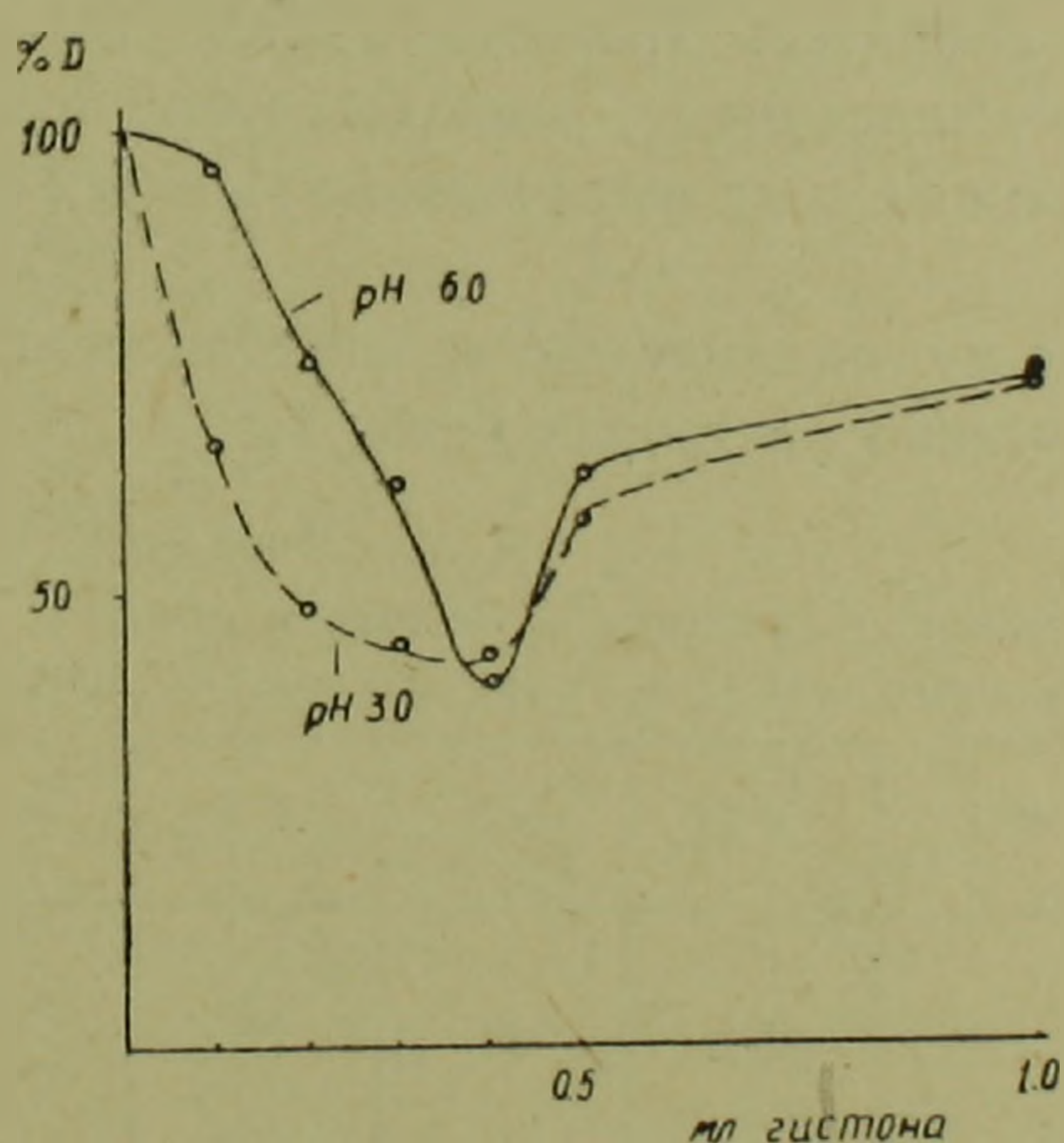


Рис. 5. Влияние тепловой денатурации на оптическую плотность смеси зеленого прочного с гистонам. Обозначения те же, что и на рис. 2. Оптическая плотность выражена в % к контролю.

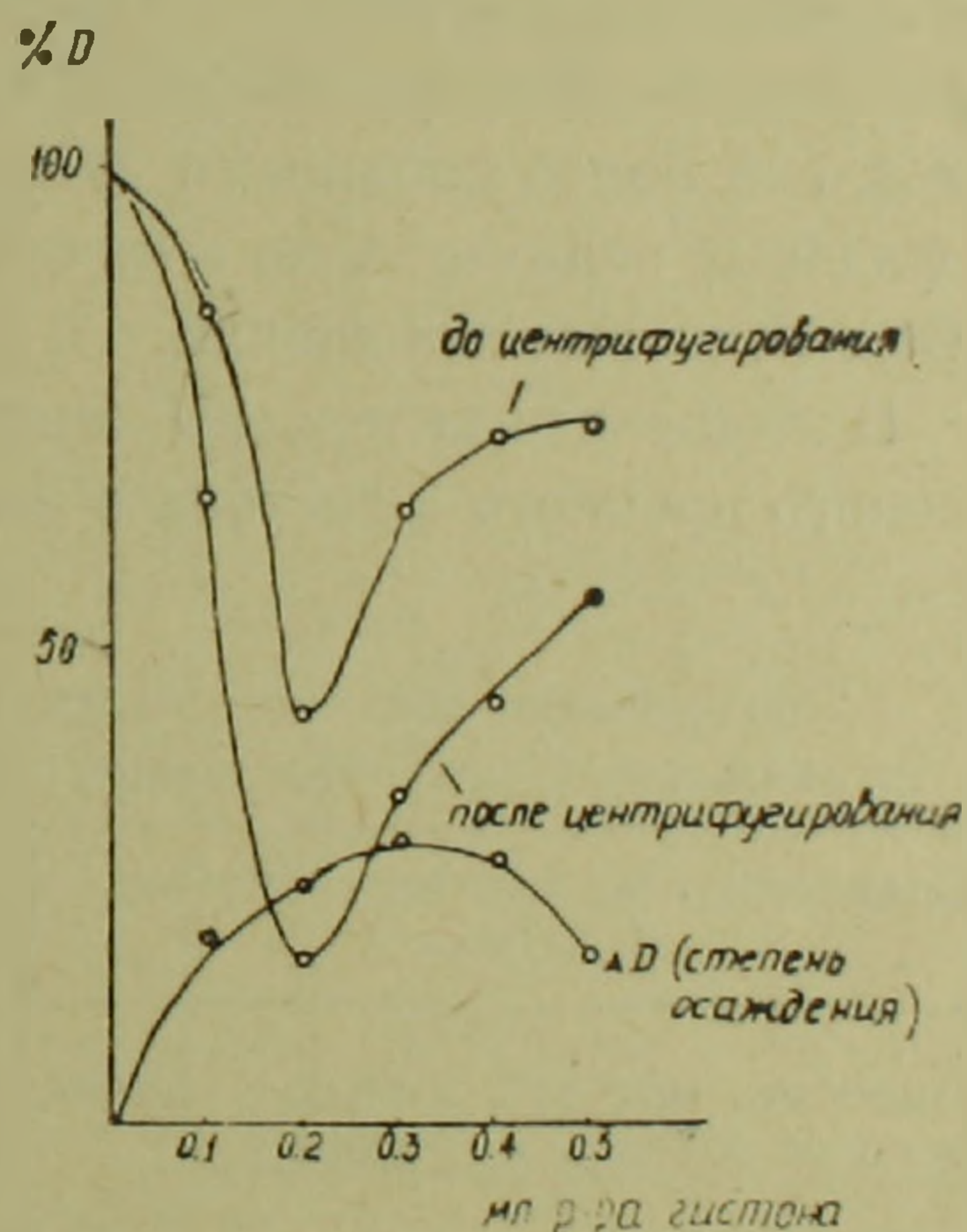


Рис. 6. Оптическая плотность смеси зеленого прочного с гистонам до и после центрифугирования. Обозначения те же, что и на рис. 5.

образоваться агрегаты комплексов гистонов с зеленым прочным, которые либо выпадают в осадок, либо вызывают так называемый «эффект проскока». Нами было отмечено образование заметных на глаз агрегатов, которые не оседали, а находились во взвешанном состоянии, и которые исчезали при добавлении либо избытка красителя, либо избытка

белка. Таким образом, уменьшение оптической плотности можно было бы объяснить «эффектом проскока», а переход во вторую фазу—растворением агрегатов. С целью показать, что мы имеем дело с понижением растворимости образованных комплексов в первой фазе и увеличением растворимости агрегатов во второй, мы провели эксперименты с центрифугированием смеси зеленого прочного с увеличивающимися концентрациями гистона. Как видно из рис. 6, после центрифугирования при 18 000 об/мин в течение 30 мин оптическая плотность надосадочной жидкости резко снижается, что указывает на образование осадка. При этом в первой фазе реакции обнаруживается определенная корреляция между понижением оптической плотности и степенью осаждения комплекса, тогда как во второй фазе подобная корреляция отсутствует; в начале второй фазы повышение оптической плотности не сопровождается понижением осаждаемости комплекса, а наоборот, количество осаждаемого материала увеличивается. То же самое относится и к концу второй фазы, когда увеличение оптической плотности почти прекращается, в то время как количество осаждаемого материала резко уменьшается. Этот эксперимент, а также данные по сдвигу $\lambda_{\max}$ во второй фазе говорят о том, что повышение оптической плотности в этой фазе не может быть объяснено увеличением растворимости комплекса краситель-гистон; оно обусловлено более сложными взаимоотношениями, зависящими не только от фазовых переходов, но и от связанных (или не связанных) с ними краситель-белковых отношений.

В этой связи интересны данные по соотношению количества молекул зеленого прочного и гистона в изученных растворах (табл 1).

Таблица 1.

Соотношение количеств молекул зеленого прочного и гистона и степень их связывания (мол. вес зеленого прочного — 809; мол. вес гистона ~ 15000)

Количество мл раствора гистона, 1 мг/мл	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Количество молекул зеленого прочного на молекулу гистона	112	56	37	28	22
% связывания зеленого прочного с гистоном	35	82	65	55	45

Из табл. 1 видно, что во взаимодействии зеленого прочного с гистонном мы имеем дело с двумя совершенно различными реакциями: в первой реакции увеличение количества молекул красителя приводит к увеличению комплексообразования (или агрегирования); во второй оно, наоборот, приводит к уменьшению комплексообразующей (или агрегирующей) способности.

Поскольку в экспериментах часто бывает необходимым использовать гистоновые препараты в смеси с другими белковыми молекулами представляло определенный интерес исследовать влияние других белков, не взаимодействующих в данных условиях с зеленым прочным, на комплек-

сообразование гистона с красителем. На рис. 7 представлены результаты этого эксперимента, по данным которого присутствие альбумина сильно влияет на гипохромный эффект смеси гистона с зеленым прочным. При относительно высоких концентрациях альбумина происходит даже сдвиг концентрационных соотношений зеленого прочного и гистона, что указывает, очевидно, на определенное взаимодействие между молекулами альбумина и гистона, влияющее на процесс комплексообразования гистона и зеленого прочного.

Основной целью этой работы было использование метода комплексообразования белков с красителем для выявления гетерогенности и специфичности гистонов. На рис. 8 приведены кривые зависимости оптической плотности зеленого прочного от концентрации для различных фракций гистона тимуса телят, S- и R-гистона и протаминсульфата. Данные, приведенные на рисунке, ясно указывают и на сходство и на различия между полученными кривыми. По характеру кривых тимусные гистоны отличаются лишь высотой минимальной точки, за исключением фракции F_{2b} . R- и S-гистоны, в отличие от всех остальных, обнаруживают резко сдвинутые вправо минимумы, с сохранением общего характера

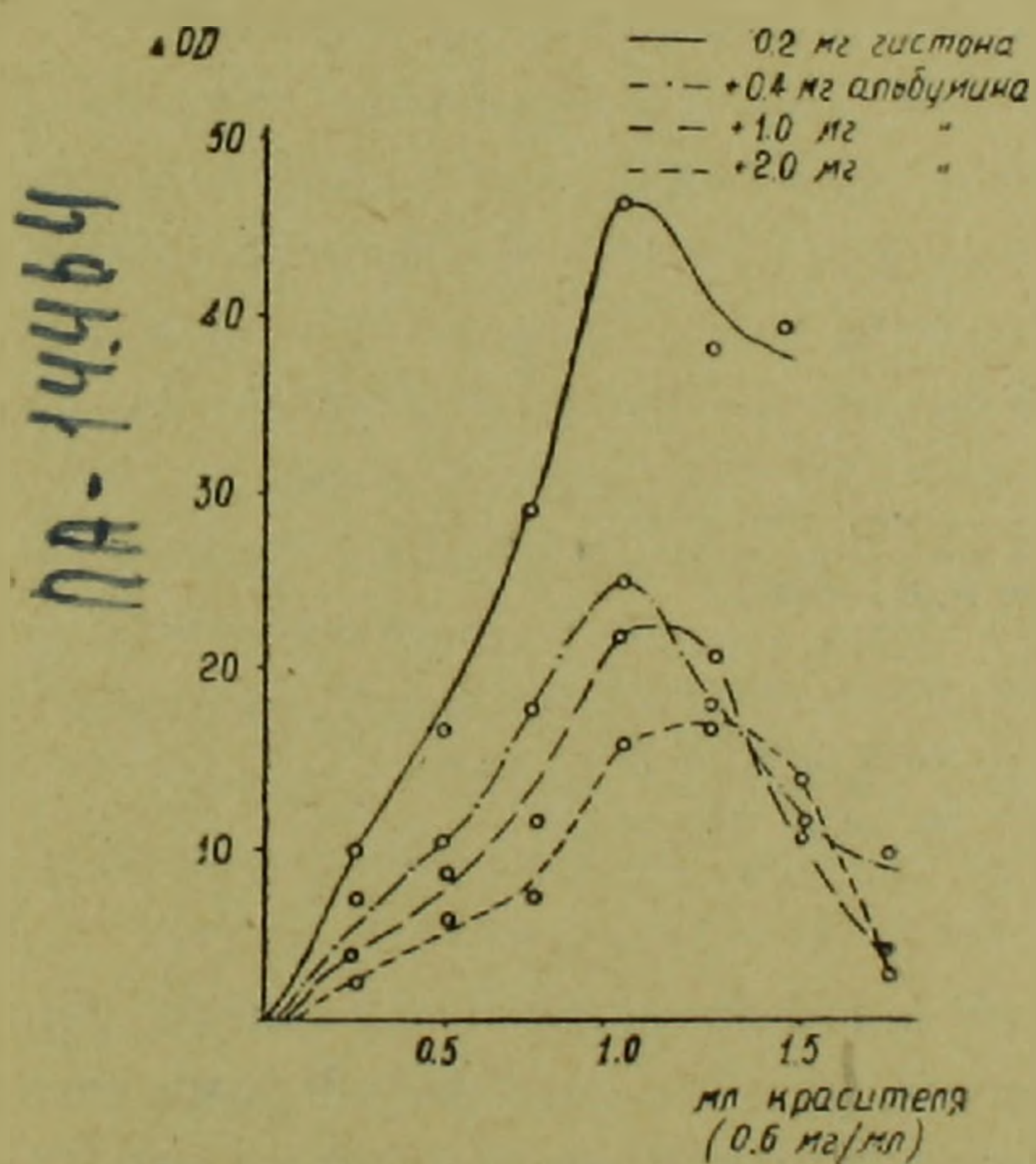


Рис. 7. Влияние присутствия различных концентраций альбумина на оптическую плотность смеси зеленого прочного и гистона. На оси ординат— ΔD (рис. 3), на оси абсцисс—мл раствора красителя (0.750 мМ).

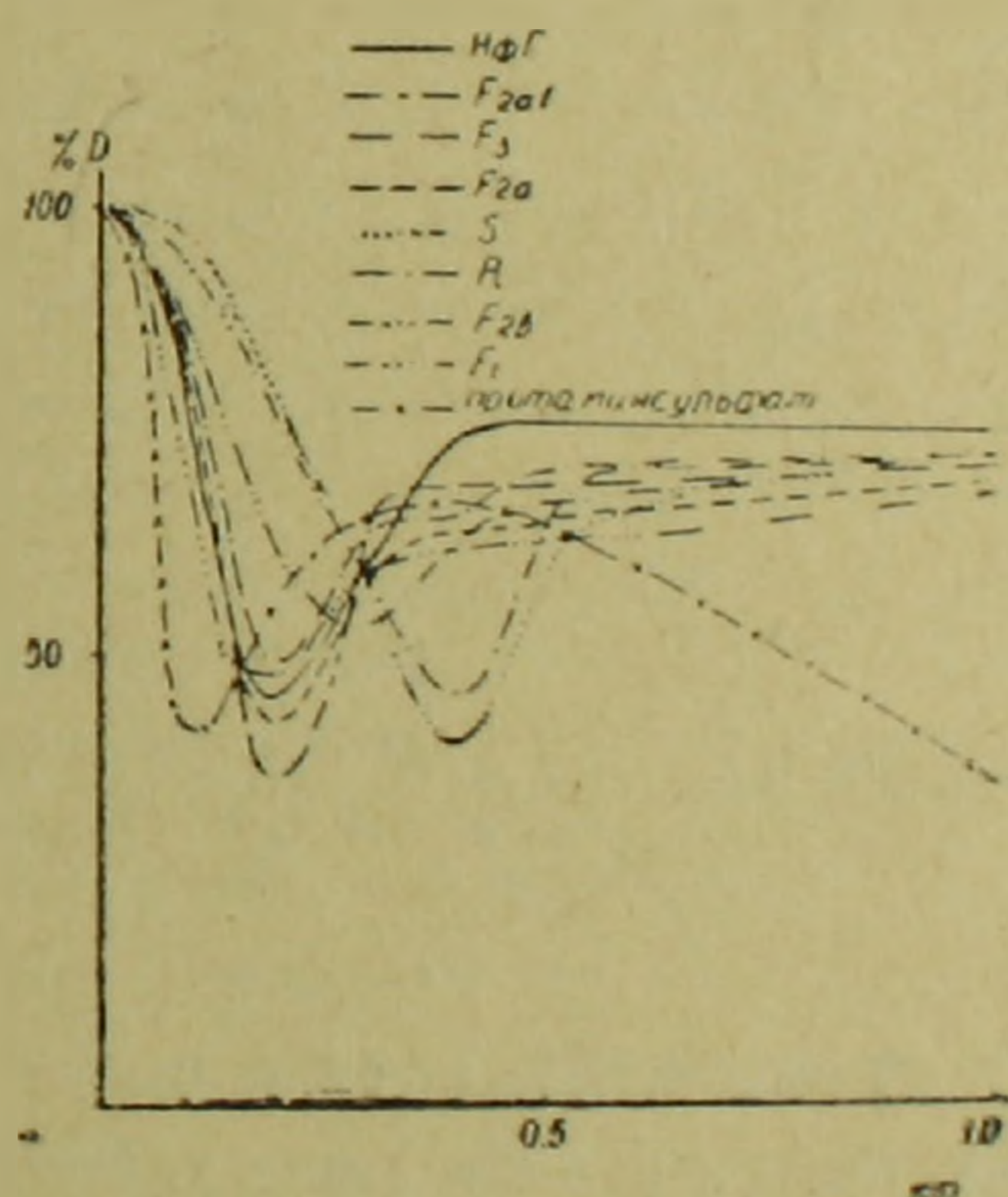


Рис. 8. Зависимость оптической плотности зеленого прочного от концентрации различных гистоновых фракций, R- и S-гистона и протаминсульфата. На оси ординат—оптическая плотность в % к контролю, на оси абсцисс—мл гистона.

кривых. Протаминсульфат проявляет некоторые новые свойства, выражающиеся в укорочении III фазы за счет вторичного резкого уменьшения оптической плотности.

Таким образом, используемый нами метод является довольно чувствительным для обнаружения гетерогенности и специфичности гистонов. Особенно интересны в этом отношении опухолевые гистоны. Сильный сдвиг минимальной точки вправо для опухолевых гистонов оказался настолько неожиданным, что вынудил нас предположить наличие в составе его (многократно проведенного на чистоту) белков, которые не дают в дистиллированной воде реакции с зеленым прочным (аналогично альбумину). С целью проверки этого предположения была получена кривая зависимости оптической плотности зеленого прочного от концентрации S-гистона в кислой среде, где присутствие негистонового белка должно было бы привести к резкому сдвигу точки минимальной оптической плотности влево. Полученные данные (рис. 9) показывают, что это-

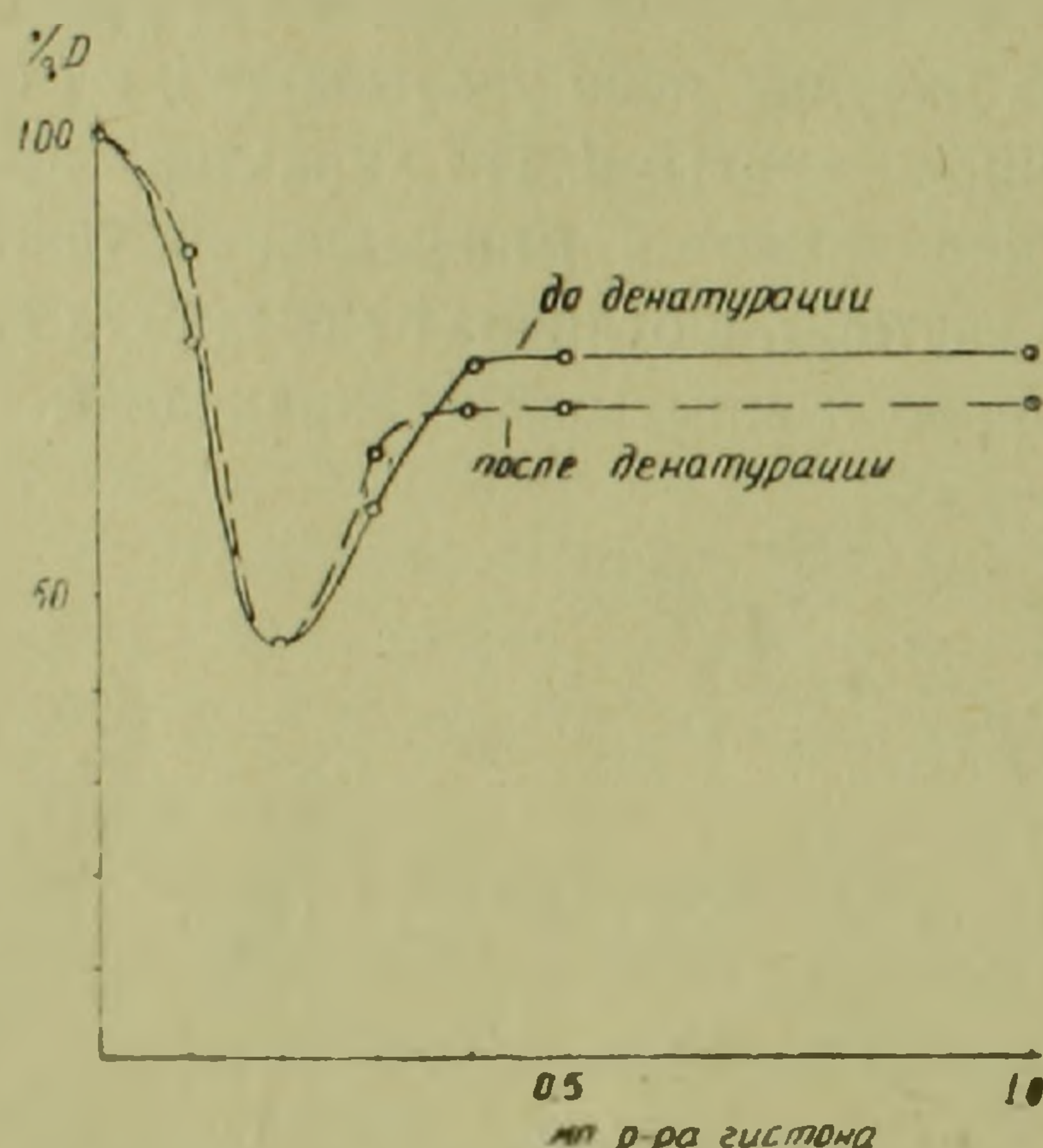


Рис. 9. Оптическая плотность смеси зеленого прочного и S-гистона при pH 6,0 и pH 3,0. Обозначения те же, что и на рис. 8.

го не происходит, хотя в целом кривая в I фазе сдвигается влево (что наблюдается и в случае с гистонами тимуса телят, рис. 4а). Кроме того, точки минимальной оптической плотности для протаминсульфата, гистона тимуса телят и опухолевых гистонов, приведенные на рис. 8, указывают скорее на особенности строения молекул, чем на изменение их количества.

Таким образом, увеличивающиеся концентрации гистона приводят к характерному трехфазному изменению оптической плотности раствора зеленого прочного. В наблюдаемом эффекте решающее значение имеют диссоциированные аминокислотные группы и полимерная природа реагирующего с красителем соединения. Различные фракции гистона тимуса телят, протаминсульфат, а также гистоны, выделенные из опухолевой ткани, имеют характерные кривые зависимости оптической плотности зеленого

прочного от концентрации. В этом отношении особенно отличаются опухолевые гистоны.

Использование метода определения характера взаимодействия красителей с гистоном является перспективным для исследования гетерогенности и специфичности гистонов.

Ереванский государственный университет

Поступило 23.1 1970 г.

Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ, Է. Մ. ՆԱԶԱՐՅԱՆ, Զ. Մ. ԺԱՎԻՇՅԱՆ

ՀԻՍՏՈՆՆԵՐԻ ԵՎ ՈՒՐԻՇ ՍՊԵՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՀԵՏ ԱՄՈՒՐ ԿԱՆԱՇԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՍՊԵԿՏՐՈՑՈՏՈՄԵՏՐԻԿ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒՄԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Սպեկտրոֆոտոմետրիկ մեթոդով լուծույթում հետազոտված է ամուր կանաչ ներկի փոխազդեցությունը հիստոնների, ալբումինի և պրոտամինսուլֆատի հետ: Որոշված է նրանց փոխազդեցության պայմաններն ու բնույթը:

Հիստոնի կոնցենտրացիայի ավելացումը հանգեցնում է ամուր կանաչի լուծույթի օպտիկական խտության եռաֆազ բնույթի փոփոխության: Առաջին ֆազում նստող նյութի քանակի ավելացման հետ մեկտեղ դիտվում է օպտիկական խտության անկում: Երկրորդ ֆազում օպտիկական խտությունը մասամբ վերականգնվում է, որը չի ուղեկցվում դոյացող ներկ-սպիտակուց կոմպլեքսի լուծելիության ավելացմամբ: Միաժամանակ դիտվում է $\lambda_{\max}$ -ի շեղում՝ դեպի երկարալիքները, որը վկայում է հիստոնի հետ ամուր կանաչի փոխազդեցության բնույթի կտրուկ փոփոխման մասին: Երրորդ ֆազը բնութագրվում է համեմատաբար կայուն, բայց ստուգիչի համեմատությամբ ավելի ցածր օպտիկական խտությամբ:

Դիտվող էֆեկտի ժամանակ որոշակի նշանակություն ունեն ներկի հետ փոխազդող միացության դիսոցվող ամինախմբերը և պոլիմերային բնույթը:

Հորթի վահանագեղձի հիստոնի տարբեր ֆրակցիաները (F_1 , F_{2a} , F_{2a1} , F_{2b} , F_3), պրոտամինսուլֆատը, ինչպես նաև ուռուցքային հյուսվածքից անջատված հիստոնները, ունեն կոնցենտրացիայից կախված ամուր կանաչի օպտիկական խտության բնորոշ կորեր: Այդ տեսակետից հատկապես տարբեր են ուռուցքային հիստոնները:

Հիստոնների հետերոգենության ու սպեցիֆիկության հետազոտման համար ներկերի ու հիստոնների միջև փոխազդեցության բնույթի որոշման առաջին մեթոդի օգտագործումը հեռանկարային է:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Джавришян Д. М., Назарян Э. М., Хачатрян Р. Г., Паносян Г. А. Ученые записки ЕрГУ. Естественные науки (в печати).
2. Паносян Г. А. Материалы II научн. конф. ИЭБ АН АрмССР, 14, 1968.
3. Паносян Г. А. Биологический журнал Армении, 22, 10, 32, 1969.
4. Паносян Г. А. Биологический журнал Армении, 23, 2, 1970.

5. Савастьянова М. В. Успехи химии, 32, 1233, 1963.
6. Alfert M., Geschwind I. I. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 39, 10, 991, 1953.
7. Bradley D. F., Felseefeld G. Nature, 184, 1920, 1959.
8. Swift H. In „The melecobstones“, p. 169, Ed. by Banner J., Tsio P., San-Francisco, 1964.