

Р. Р. ВАРДАПЕТЯН, А. Т. КАРАПЕТЯН, Г. А. ПАНОСЯН

О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ДНК И ГИСТОНОВ В ГОМОЛОГИЧНЫХ И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ СИСТЕМАХ

Получены кривые тепловой денатурации ДНК и ее комплексов с гистонами в различных системах. Обнаружена разница в характере кривых плавления комплексов ДНП, реконструированных из гомологичных и гетерологичных ДНК и гистонов (ДНК ТТ, ЭК и фага СД и гистоны ТТ и ЭК). Предполагается, что гистоны в гомологичных системах распределяются по молекуле ДНК менее равномерно, чем в гетерологичных, что отражается также на способности к ренатурации.

Выдвинутая Стедманами [14] гипотеза о гистонах, как специфических репрессорах, в последнее время подвергается пересмотру вследствие тщетных попыток обнаружить специфическую репрессию, вызванную той или иной фракцией гистонов [11, 12], а также полной расшифровки первичных структур четырех из пяти главных гистоновых фракций из различных объектов, не обнаружившей существенных различий в аминокислотной последовательности гистонов [8, 9].

Однако отсутствие достаточно убедительных данных о тканевой и видовой специфичности гистонов вовсе не отрицает возможность специфического взаимодействия гистонов с ДНК, независимую от специфической репрессорной функции гистонов. Об этом свидетельствуют данные о предпочтительном связывании гистонов с АТ-богатыми участками ДНК [4, 11, 13] и разный характер связывания с ДНК различных гистоновых фракций [7, 9].

Неспецифическая репрессия гистонами, по-видимому, маскирует их специфическое взаимодействие с ДНК. Последнее может быть нескольких типов: взаимодействие, характерное для всех видов гистонов (предпочтительное связывание с АТ-богатыми участками); взаимодействие, при котором гистоновая фракция отличается от другой по способности избирательно связываться с тем или иным участком молекулы ДНК; взаимодействие, специфическое только для гомологичного (т. е. гистона и ДНК, выделенных из одной и той же ткани) гистона.

Из этих трех типов взаимодействия только последнее может иметь отношение к специфической репрессии.

Одним из методов исследования, при помощи которого можно получить информацию о характере и способах взаимодействия различных низкомолекулярных веществ с ДНК, является получение кривых плавления (кривых тепловой денатурации) ДНК и ее комплексов с этими веществами [2, 3].

Целью настоящей работы являлось выявление существования специфичности взаимодействия гистона в гомологичной системе.

Для этого получали кривые плавления нуклеогистоновых комплексов, образованных из гомологичных и гетерологичных гистонов и ДНК.

Материал и методика. Исследовались препараты ДНК тимуса теленка (ТТ), эритроцитов кур (ЭК) и фага СД, выделенных фенольным методом и содержащих менее 1% белка. Нефракционированные гистоны ТТ и ЭК получены выделением из соответствующих тканей кислотной экстракцией по Джонсу и др. [8] с последующим отделением от негистонового белка хроматографированием на карбоксилметилцеллюлозе. Количество негистонового белка в используемых препаратах гистона — менее 1%.

Концентрация гистона в растворе определялась по Лоури, а ДНК — спектрофотометрически (коэффициент молярного поглощения $\epsilon_{260} = 6600$).

Комплексообразование между гистоном и ДНК проводилось медленным добавлением гистона соответствующей концентрации к раствору ДНК при интенсивном перемешивании в соотношении ДНК/гистон = 1:0,5.

Исследуемые препараты растворялись в фосфатном буфере pH 7,1 с концентрацией $[Na^+] = 5 \cdot 10^{-3} M$.

Плавление ДНК и ее комплексов с гистонами осуществлялось в герметически закрытых кюветах спектрофотометра СФ-4А, помещаемых в термостатируемую ячейку с точностью термостатирования $\pm 0,05^\circ$.

Кривые плавления строились по изменению поглощения образцов при 260 нм в зависимости от температуры. Полученные результаты, приведенные на рисунках, статистически обработаны и представляют собой усредненные данные 6 экспериментов. Измерение поглощения образцов проводилось спустя 8—10 мин после установления теплового равновесия в кюветах. Для исключения возможных систематических погрешностей плавление комплексов ДНК с гистонами проводилось одновременно с плавлением образца чистой ДНК.

Ренатурация проводилась двумя способами: «быстрым», когда исследуемый раствор сразу же помещался в ледяную воду, и «медленным», когда охлаждение до комнатной температуры проводилось в течение 5—7 час. При этих способах охлаждения разница оказалась в пределах ошибки (остаточный гиперхром показан кривыми со штрихом).

Результаты и обсуждение. На рис. 1а, б представлены семейства кривых плавления ДНК и ее комплексов в гомологичной — ДНК ТТ+гистон ТТ и ДНК ЭК+гистон ЭК и гетерологичной — ДНК ТТ+гистон ЭК и ДНК ЭК+гистон ТТ-системах. Как видно из рисунка, образованные комплексы плавятся ступенчато, причем ступенька (плато) в случае гомологичной системы расположена выше, чем в гетерологичной. Кроме того, сравнение кривых плавления комплексов показывает, что разность в уровнях ступенек гомологичных систем одинакова и не зависит от вида применяемой ДНК (ср. кривые 2а и 2б с кривыми 3а и 3б).

Одним из возможных объяснений такого характера кривых плавления может быть менее равномерное распределение гистона в гомологичной системе, по сравнению с гетерологичной, так как при одном и том же весовом соотношении гистон/ДНК в гомологичной системе стабилизируется меньшее количество ДНК, чем в гетерологичной.

Ряд авторов [1, 9, 10] предполагает, что гистон при образовании искусственного комплекса с ДНК распределяется равномерно, а ступенчатость кривой плавления объясняет наличием свободных и связан-

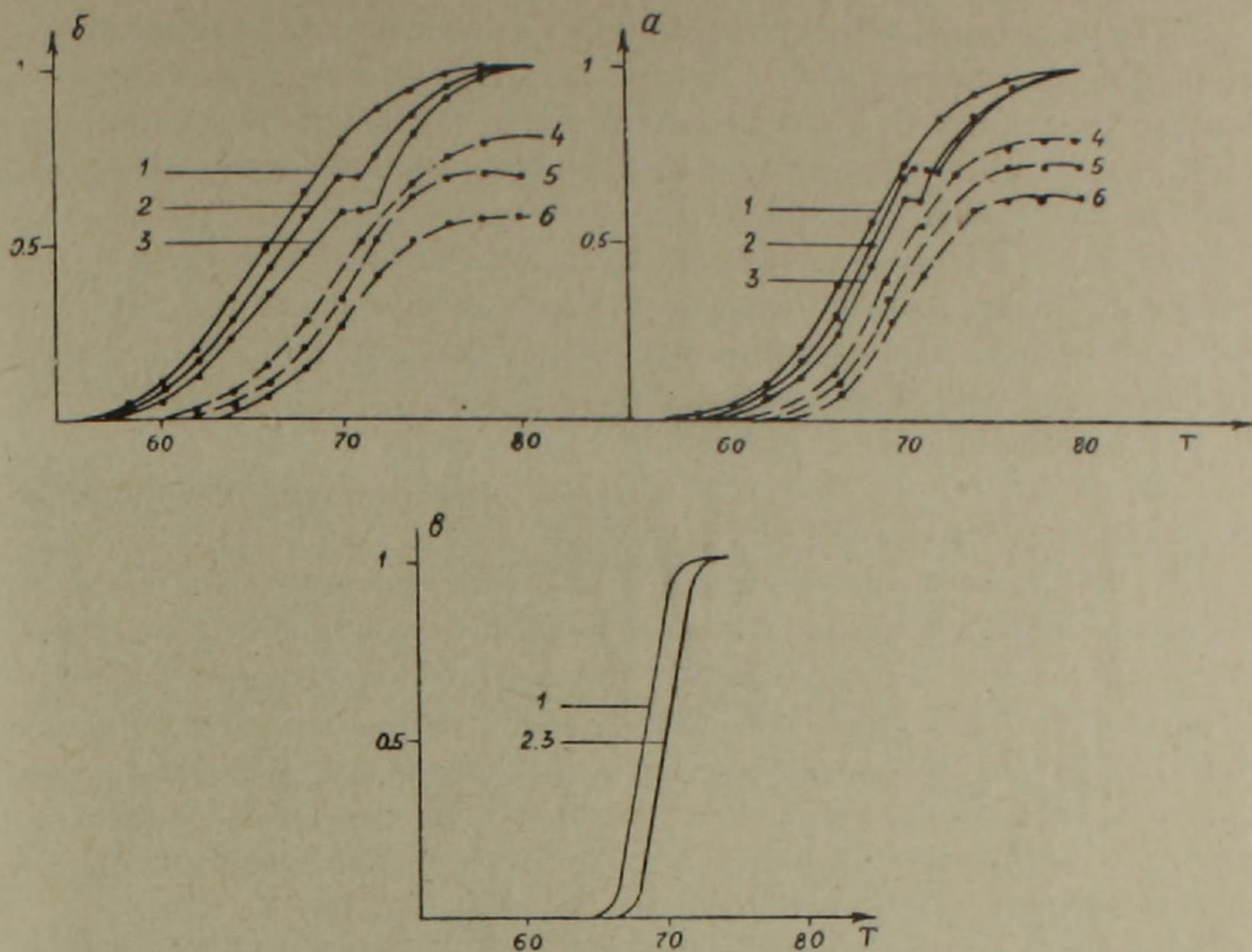


Рис. Кривые плавления и ренатурации ДНК и ее комплексов с гистонами.

По оси ординат — $1 - \vartheta = \frac{D_T - D_0}{D - D_0}$, где D — оптическая плотность, а

по оси абсцисс — температура по Цельсию. а) 1 и 4 — ДНК ТТ; 2 и 5 — ДНК ТТ + гистон ТТ; 3 и 6 — ДНК ТТ + гистон ЭК; б) 1 и 4 — ДНК ЭК; 2 и 5 — ДНК ЭК + гистон ЭК; 3 и 6 — ДНК ЭК + гистон ТТ; в) 1 — ДНК фага СД; 2 — ДНК СД + гистон ТТ; 3 — ДНК СД + гистон ЭК, где: 1, 2 и 3 — кривые денатурации, а 4, 5 и 6 — кривые ренатурации.

ных участков, уровень же ступеньки — количественным соотношением этих участков.

Однако наличие ступеньки в кривой плавления может быть обусловлено также неравномерным распределением гистона вдоль молекулы ДНК, что, в свою очередь, может быть результатом блочного характера используемой нами ДНК [5, 6] и преимущественного связывания гистона с АТ-богатыми участками ДНК [4, 11, 2]. Последнее может быть причиной того, что отдельные блоки на ДНК могут быть свободны от гистонов.

Электронномикроскопические исследования, действительно, показывают неравномерное распределение гистонов в реконструированном дезоксирибонуклеогистоне [12, 19].

В связи с этим представляло определенный интерес выяснение разницы в уровнях ступеней в гомологичной и гетерологичной системах, обусловленной неравномерностью распределения гистона в комплексах. С этой целью были предприняты исследования ренатурационной способности комплексов (рис., кривые 4, 5, 6а и 4, 5, 6б).

Из полученных результатов можно предположить, что ренатурационная способность в первой фазе плавления (до ступеньки) практически не отличается от таковой чистой ДНК. Однако ренатурация, проведенная с точек, соответствующих 2-ой фазе кривой плавления, отличается от ренатурации чистой ДНК.

Как видно из приведенных кривых (рис., кривые 1, 5, 6а и 5, 6б), остаточный гиперхромизм при ренатурации комплексов соответствует уровню ступеньки. Это означает, что вторая фаза на кривой плавления соответствует плавлению блоков ДНК, связанных с гистонами.

В гомологичных и гетерологичных системах ступеньки находятся на разных уровнях, что свидетельствует о различии в количестве занятых гистонами блоков в этих системах.

Так как соотношение гистон/ДНК одинаково в обеих системах, то количество блоков ДНК, связанных с гистонами в гомологичных системах меньше, чем в гетерологичных. Следовательно, гомологичный гистон распределяется по блокам ДНК менее равномерно, чем гетерологичный. Одним из наиболее вероятных объяснений этого факта является предположение о наличии мест предпочтительного (специфического) связывания в гомологичной системе, что вносит свой вклад в неравномерность распределения гистонов вдоль молекулы ДНК.

Проведение эксперимента с фаговой ДНК, результаты которого приведены на рисунке (рис. 1в), подтверждает приведенное предположение о существовании возможного специфического связывания гистона с ДНК, поскольку кривые плавления комплексов ДНК фага СД с гистонами ТТ и ЭК практически совпадают (рис. 1в, 1, 2, 3).

Таким образом, в наших экспериментах обнаружена разница в характере кривых плавления комплексов ДНК, реконструированных из гомологичных и гетерологичных ДНК и гистонов (ДНК, ТТ, ЭК фага СД и гистоны ТТ и ЭК). На основании полученных результатов можно предположить, что гистоны в гомологичных системах распределяются по молекуле ДНК менее равномерно, чем в гетерологичных системах, что отражается также на способности к ренатурации.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 15.VIII 1973 г.

Հ. Ռ. ՎԱՐԴԱՊԵՏՅԱՆ, Ա. Թ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

ՀՈՄՈԼՈԳԻ ԵՎ ՀԵՏԵՐՈԼՈԳ ՍԻՍՏԵՄՆԵՐՈՒՄ ԴՆԹ-Ի ԵՎ ՀԻՍՏՈՆՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՇՈՒՐՁ

Ա մ փ ո փ ո ս մ

Ստացվել է ուսումնասիրվել են ԴՆԹ-ի և տարբեր սիստեմներում հիստոնների հետ նրա կոմպլեքսների ջերմային դենատուրացիայի կորերը: Պարզվել է, որ հոմոլոգ և հետերոլոգ սիստեմների (հորթի թիմուսի ԴՆԹ և հիստոն,

հավելի էրիտրոցիտների ԴՆԹ և հիստոն, ֆազի ԴՆԹ) ԴՆԹ-ի կոմպլեքսների պենատուրացման կորեքը միմյանցից տարբերվում են: Ստացված արդյունքներից կարելի է եզրակացնել, որ հոմոլոգ սիստեմներում հիստոնները ԴՆԹ-ի մոլեկուլի վրա բաշխվում են ավելի անհավասարաչափ, քան հետերոլոգ սիստեմներում, որը և անդրադառնում է նրանց ռենատուրացիայի վրա:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Боннер Д., Хуинг П. В кн.: Гистоны и перенос генетической информации, стр. 28, М., 1968.
2. Карапетян А. Т., Пермогоров В. И., Франк-Каменецкий М. Д., Лазуркин Ю. С. Молек. биология, 6, 867, 1972.
3. Любченко Ю. Л., Трифонов Э. Н., Лазуркин Ю. С., Франк-Каменецкий М. Д. Молек. биология, 5, 772, 1971.
4. Миняг Э. Е., Борисова О. Ф., Волькенштейн М. В., Георгиев Г. Н. Молек. биология, 4, 291, 1970.
5. Шугалий А. В., Франк-Каменецкий М. Д., Лазуркин Ю. С. Молек. биология, 4, 275, 1970.
6. Шугалий А. В., Франк-Каменецкий М. Д., Лазуркин Ю. С. Молек. биология, 5, 766, 1971.
7. Bram S., Rits H. J. Mol. Biol. 55, 325, 1971.
8. Johns E. W., Phillips D. M. P., Simson P., Butler J. A. V. Biochem. J. 80, 189, 1961.
9. Ollus D. E., Ollus A. L. J. Mol. Biol. 57, 437, 1971.
10. Shih T. J., Bonner J. J. Mol. Biol. 48 (2), 469, 1970.
11. Skalka A., Fowler A. V., Hurwitz J. J. Biol. Chem. 241, 588, 1960.
12. Slayter H. S., Shih T. J., Adler A. J., Fasman G. D. Biochemistry, 11, 3044, 1972.
13. Sponar J., Sormova Z. Eur. J. Biochem. 29, 99, 1972.
14. Stedman E., Stedman E. Nature, 166, 780, 1950.