Г. А. ПАНОСЯН

ИССЛЕДОВАНИЕ ДНК-ГИСТОНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В РЕКОНСТРУИРОВАННЫХ СИСТЕМАХ

Приводятся обзор результатов экспериментов по изучению специфичности ДНК-гистонового взаимодействия в гомологичных и гетерологичных системах, проведенных в лаборатории автора. Методами плавления ДНК-гистоновых комплексов, ультрацентрифугирования, хроматографирования на колонках с сепадексом, определения ГЦ-состава и другими методами показано, что гомологичный тотальный гистон связывается с ДНК несколько иным способом, чем гетерологичный и что это различие обуславливается участками ДНК, обогащенными АТ-парами.

На современном этапе развития биологической науки, несмотря на значительные достижения в области молекулярной биологии, биофизики, биохимии и генетики, практически ничего не известно о механизмах регуляции генетического аппарата эукариотов. Схема Жакоба и Моно, сыгравшая огромную роль в понимании природы регуляторных процессов у прокариотов, оказалась слабым фундаментом для построения более или менее приемлемых теорий или гипотез, объясняющих возможные механизмы регуляции синтеза макромолекул у высших организмов.

Именно поэтому с такой легкостью была принята, несмотря на довольно слабую аргументацию, гипотеза Стедманов [1, 2] о регуляторной роли гистонов—основных белков хроматина высших организмов.

Последующая почти 30-летняя история исследования гистонов вынудила пересмотреть гипотезу Стедманов. Постулированная ранее высокая гетерогенность гистонов оказалась результатом несовершенства методических приемов, и вся гетерогенность гистонов была сведена к наличию пяти основных гистоновых фракций с несколькими подфракциями одного из них и к появлению дополнительной гетерогенности, являющейся следствием вторичной модификации гистоновых молекул.

Поскольку ограниченное число разных гистоновых молекул ни в коей мере не соответствует огромному количеству репрессированных и действующих генов, то идея наличия в клетках эукариотов специфических гистонов-репрессоров, подобных бактериальным репрессорам, была полностью отвергнута. Этому также способствовало обнаружение большого сходства в аминокислотном составе и в последовательности аминокислот четырех из пяти основных гистоновых фракций, выделенных из разных органов и тканей.

Однако, наряду с отрицанием существования специфических гистонов-репрессоров, появилась явная тенденция к полному отрицанию вообще какого-либо специфического взаимодействия между гистонами и ДНК. Такой подход не может не отразиться отрицательно на иссле-

ловании многих вопросов, связанных с выяснением природы ДНК-гистоновое взаимодействие, особенностей распределения гистонов вдоль молекулы ДНК, роли гистонов в структурировании и активировании хроматина при разных функциональных состояниях и т. д.

При детальном анализе этого вопроса наблюдается неверное смешение многими исследователями трех различных понятий: специфической репрессорной функции, видовой и тканевой специфичности и специфичности взаимодействия гистонов с ДНК. Отсутствие доказательств в пользу специфической репрессии гистонами еще не означает отсутствия специфического взаимодействия вообще.

Имеющийся в литературе фактический материал тем не менее указывает не только на возможность, но и необходимость специфического взаимодействия гистонов с ДНК. Само наличие гетерогенности гистонов и блочное строение ДНК поднимает вопрос о специфичности ДНК-гистоновое взаимодействие.

Выявлению в экспериментальных условиях специфичности взаимодействия мешает общий положительный заряд гистона, который создаст сильный фон неспецифического взаимодействия: гистон комплексирован с любой ДНК, в том числе с вирусной и бактериальной.

Тем не менее результаты наших экспериментов и других исследований показывают, что разные гистоновые фракции по-разному реагируют с ДНК [3]. При этом образуются комплексы, отличающиеся физико-химическими свойствами, обуславливаются различия в способности конкурировать с актиномицином, взаимодействовать с денатурированной ДНК, комплексироваться с фракциями ДНК, различающимися количеством повторяющихся последовательностей и т. д. Все эти данные указывают на то, что разные гистоновые фракции по-разному распределяются вдоль молекулы ДНК, что может быть результатом более предпочтительного связывания с некоторыми участками ДНК отдельных фракций гистонов.

На основании этих результатов нами был сделан вывод о существовании нескольких порядков взаимодействия гистонов с ДНК: неспецифическое взаимодействие, специфическое взаимодействие первого порядка (характерное для всех гистонов, предпочтительно связываемых с АТ-богатыми участками), специфическое взаимодействие второго порядка (характерное для каждой фракции гистона в отдельности, обеспечивающее специфическое «узнавание» этими фракциями отдельных участков молекулы ДНК) и специфическое взаимодействие высшего порядка (обеспечивающее «предпочтительное» связывание гомологичного гистона) [3].

При этом предполагалось, что каков бы ни был характер специфического взаимодействия гистона с ДНК (включая даже специфическое взаимодействие высшего порядка), он еще не говорит о специфической репрессорной функции гистонов, т. е. о регуляторной функции последнего. Структурная (или любая другая) роль гистонов не исключает специфичности взаимодействия на любом уровне.

Для исследования специфичности взаимодействия гистонов и ДНК можно использовать различные методы. Мы в своих исследованиях руководствовались следующими соображениями. Не исключено, что специфичность гистонов, если она существует, обусловлена не одной какой-либо фракцией, а всей совокупностью основных гистоновых фракций, представляющей собой сложную комплексную систему. Именно последняя и только она, а не каждый из гистонов в отдельности, обуславливает специфичность взаимодействия. Поэтому в своих экспериментах мы использовали, главным образом, тотальный, нефракционированный гистон и только отдельные фракции гистонов использовали для сравнения.

Другим решающим моментом в нашей работе являлся сравнительный анализ различных характеристик гомологичных и гетерологичных ДНК-гистоновых комплексов. Если взаимодействие между гистонами и ДНК, выделенными из одного источника, отличается по каким-либо критериям от взаимодействия между гистонами и ДНК, выделенными из разных источников, то это должно однозначно указывать на специфичность взаимодействия.

Руководствуясь этими соображениями, мы в дальнейшем на кафедре биофизики ЕГУ провели ряд исследований по определению характера плавления реконструированных гомологичных и гетерологичных дезоксирибонуклеогистоновых систем [4—7].

В наших экспериментах были использованы ДНК тимуса теленка, эритроцитов кур и печени крыс и гистоны, выделенные из тех же объектов. Содержание белка в препарате было менее 1%. Гистоны, выделенные из соответствующих тканей кислотной экстракцией, отделяли от негистоновых белков хроматографированием на карбоксиметилцеллюлозе и проверяли на чистоту электрофоретически в полиакриламидном геле.

Исследуемые препараты гистонов и ДНК, растворенные в $5 \cdot 10^{-3}$ М фосфатном буфере при pH 7,0, подвергали комплексообразованию либо медленным добавлением гистона к раствору ДНК при интенсивном перемешивании, либо градиентным диализом из 2 М NaCl.

Полученные таким образом комплексы (гомологичные и гетерологичные) плавил в герметически закрытых кюветах спектрофотометра, помещенных в термостатируемую ячейку, и кривые плавления сравнивали между собой. При этом отмечали температуру плавления T_m и общую скрепочную активность. Последняя определялась как интегральная площадь между кривыми плавления чистой ДНК и ее гистоновыми комплексами и позволяла судить о суммарных изменениях во всем интервале плавления.

В этих экспериментах, прежде всего, была обнаружена значительная разница между плавлением гомологичных и гетерологичных ДНК-гистоновых комплексов, которая увеличивалась с увеличением соотношения гистон/ДНК, достигая максимальных значений в $6-12^\circ$ на разных участках кривой при соотношении гистон/ДНК от 0,5 до 0,75, и затем уменьшалась при дальнейшем увеличении относительного содержания гистона. Более высокие температуры плавления отмечаются в гетерологичных системах.

При одинаковом соотношении гистон/ДНК наблюдаемая разница, вероятно, может быть объяснена неодинаковым распределением гистонов вдоль молекулы ДНК.

Данное предположение в определенной степени подтвердилось в наших экспериментах по ренатурации денатурированных комплексов, в которых определялись свободные от гистонов участки.

Увеличивая ионную силу раствора, мы получили смещение участка в начале кривой плавления, соответствующего плавлению свободной ДНК. Анализ такого смещения показал, что эти участки обогащаются ГЦ-парами при добавлении гистона. Иначе говоря, и в наших экспериментах наблюдается хорошо известный в литературе факт предпочтительного связывания гистонов с АТ-богатыми участками.

Эти данные подтвердились также результатами экспериментов по определению общей скрепочной активности при комплексовании гистонов с различными ДНК, отличающимися ГЦ-составом.

Полученная нами двухфазная кривая плавления показывает, что при комплексовании на ДНК остаются довольно протяженные свободные участки, которые обогащены ГЦ-парами. Иными словами, наблюдаемая разница в кривых плавления гомологичных и гетерологичных систем должна быть обусловлена неодинаковым взаимодействием гистонов с АТ-богатыми участками.

Для подтверждения вышесказанного был поставлен следующий вариант опыта. Зная, что при плавлении чистой ДНК вначале плавятся АТ-богатые участки (или блоки), мы предположили, что если за специфическое взаимодействие гистонов, выражающееся в разнице плавления гомологичной и гетерологичной систем, ответственны АТ-богатые участки ДНК, то при постепенном удалении этих участков наблюдаемая разница в плавлении должна уменьшаться. Действительно, при предварительном расплавлении ДНК до 60, 62, 64 и 66° (денатурация АТ-богатых участков) постепенно уменьшается и, наконец, полностью исчезает разница в кривых плавления гомологичных и гетерологичных комплексов.

Другой вариант опыта по определению роли АТ-богатых участков в специфичности взаимодействия гомологичного гистона с ДНК заключается в следующем. После получения гомологичных и гетерологичных комплексов, последние центрифугировали при 1800—11000 g, затем в надосадочной жидкости и в осадке определяли соотношение гистон/ДНК и ГЦ-состав ДНК, а также получали кривые плавления материала, оставшегося в надосадочной жидкости после центрифугирования.

Результаты этой серии экспериментов показывают, что во всех случаях температура плавления ДНК, находящейся в надосадочной жидкости, выше, чем свободной ДНК. Второй компонент кривой плавления (т. е. плавление комплекса) постепенно с увеличением скорости седиментации уменьшается и практически исчезает при 110000 g. Одновременно уменьшается разница между температурой плавления супернатантов гомологичных и гетерологичных систем.

Таким образом, одновременное увеличение ГЦ-состава в супернатанте и обнаружение основной части гистона в материале, выпадающем в осадок, указывает на предпочтительное связывание гистонов с АТ-богатыми участками ДНК. Примечательно, что, несмотря на более высокое содержание белка в осадке гомологичных систем, в ДНК этих осадков содержится больше свободных участков. Этот вывод подтверждается также в экспериментах по определению связывания актиномина Д с гомологичными и гетерологичными комплексами: с гомологичными комплексами актиномина связывается в больших количествах, т. е. в них имеется больше свободных участков ДНК.

Другая большая серия экспериментов была проведена по определению характера нуклеазного переваривания гомологичных и гетерологичных дезоксирибонуклеогистонов. В течение последних нескольких лет выделены и изучены так называемые хроматиновые субъединицы — нуклеосомы [8—10]. Подобные субъединичные структуры образывались и при реконструировании нуклеогистонов [11], что указывает на возможность самосборки хроматиновых структур, а следовательно, на предполагаемую роль гистон-гистонового взаимодействия и избирательной посадки гистоновых комплексов на ДНК.

В наших экспериментах гомологичные и гетерологичные комплексы ДНК и гистонов тимуса теленка и эритроцитов кур подвергали воздействию высокоочищенной ДНКазой I из селезенки крупного рогатого скота. После неполного гидролиза продукты его хроматографировали на колонке Сефадекса G-100 и G-200. Результаты этих экспериментов показали, что в гомологичных системах образуются продукты с молекулярным весом 80—120 000 дальтон, которые полностью отсутствуют в гидролизатах гетерологичных систем.

Гидролиз, проводимый в щадящих условиях (при относительно низких концентрациях фермента и непродолжительности воздействия), показал, что для гомологичных систем характерно относительно высокое содержание высокомолекулярных фракций (170—230 000 дальтон) — до 41—43% и низкое содержание олигонуклеотидов — 23—24%. Тогда как в тех же условиях переваривания гетерологичных комплексов наблюдается образование тех же продуктов гидролиза соответственно до 26—28 и 38—40%.

Депротенизация высокомолекулярной фракции продуктов гидролиза 6 М мочевиной с 3 М NaCl приводит к выходу ДНК с молекулярным весом 80—110 000 дальтон, что соответствует 120—170 пар оснований, т. е. длине участков молекулы ДНК, входящих в состав нуклеосом. Относительно большее количество подобных отрезков ДНК в гомологичной системе указывает на определенную степень избирательности ДНК-гистонового взаимодействия при образовании нуклеосомоподобных структур в реконструированных гомологичных системах.

Полученные нами экспериментальные данные, демонстрирующие разный характер взаимодействия гистонов с ДНК в гомологичной и ге-

терологичной системах и участие в специфичности этого взаимодействия АТ-богатых участков ДНК, обобщены в таблице.

Таблица

Сводные данные, демонстрирующие разный характер взаимодействия ДНК и гистонов в гомологичной и гетерологичной системах и участие АТ-богатых участков в этом взаимодействии (при гистон/ДНК=0.75)

Изученные параметры	Гомологичная система		Гетерологичная система	
	тимус теленка (ДНК и гистон)	эритроциты кур (ДНК и гистон)	ДНК тимуса теленка и гистон эритроцитов кур	ДНК эритроцитов кур и гистон тимуса теленка
Температура плавления комплекса	86°	84°—85°	86°	86°
Общая скрепочная активность (усл. ед.)	38,0	45,1	55,2	65,5
ГЦ-состав и досадочной жидкости при				
30 000 г	0,58	0,51	0,54	0,48
70 000 г	0,68	0,66	0,66	0,64
110 000 г	0,75	0,70	0,75	0,69
(свободная ДНК)	0,44	0,42	0,44	0,42
ГЦ-состав осадка при				
30 000 г	0,38	0,38	0,39	0,39
70 000 г	0,37	0,36	0,37	0,38
110 000 г	0,40	0,39	0,39	0,38
Количество высокомолекулярного материала (нуклеосомоподобных частиц) после нуклеазной обработки (% от общего количества ДНК в исходном комплексе)	43	41	26	28

На основании имеющегося материала трудно делать какие-либо конкретные предложения о возможных механизмах, лежащих в основе специфического взаимодействия гистон—ДНК в гомологичной системе (специфичности взаимодействия высшего порядка). Однако представленный материал с достаточной убедительностью говорит о существовании подобного взаимодействия.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 17.VIII 1977 г.

Գ. Հ. ՓԱՆՈՅԱՆ

ՎԵՐԱԿԱՌՈՒՑՎԱԾ ՍԻՍՏԵՄՆԵՐՈՒՄ ԴՆԹ-ՀԻՍՏՈՆԱՅԻՆ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա մ փ ն փ ու մ

Բերվում է համընդհանուր և հետհրդրոգիական համակարգերում ԴՆԹ-հիստոնային փոխազդեցության սպեցիֆիկության (յուրատիպության) ուսումնասիրության և քապերիմենտի արդյունքների քննարկումը:

ԴնՅ-հիստոնային կոմպլեքսների հալեցման, ուտրացենտրիֆուգացման սեֆադեքսի վրա բրոմատոգրաֆիայի, ԳՏ-կազմի որոշման և այլ մեթոդներով ցույց է տրված, որ հոմոլոգիական հիստոնը ԴնՅ-ի հետ կապվում է մի փոքր այլ ձևով, քան հետերոլոգիական հիստոնը, և որ հոմոլոգիական և հետերոլոգիական հիստոնի կապվածության այդ տարբերությունը պայմանավորվում է ԴնՅ-ի տեղամասերով, որոնք հարստացված են АТ զույգերով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Stedman E., Stedman E. Symp. Soc. Exptl. Biol. I, 232, 1947.*
2. *Stedman E., Stedman E. Nature, 166, 780, 1950.*
3. *Паносян Г. А. Автореф. докт. дисс., Ереван, 1973.*
4. *Вардапетян Р. Р., Карапетян А. Т., Паносян Г. А. Биологический журнал Армении, 27, 8, 29, 1974.*
5. *Вардапетян Р. Р., Паносян Г. А., Карапетян А. Т. В сб. «Конформация изменения биополимеров в растворах, 93, Тбилиси, 1975.*
6. *Вардапетян Р. Р., Паносян Г. А., Хачатрян А. Т. Биологический журнал Армении, 30, 8, 1977.*
7. *Вардапетян Р. Р., Паносян Г. А., Торосян М. Р., Татикян С. Ш. Биологический журнал Армении, 30, 9, 1977.*
8. *Clark R. J. Felsenfeld G. Biochemistry, 13, 3622, 1974.*
9. *Konberg R. D., Thomas J. O. Science, 184, 865, 1974.*
10. *Oosterhof D. K., Hozler J. C., Rill R. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 633, 1975.*
11. *Oudet P., Gross-Bellard M., Chambon P. Cell, 4, 281, 1975.*