

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

ОБ ОБРАЗОВАНИИ НУКЛЕОСОМОПОДОБНЫХ СТРУКТУР В ИСКУССТВЕННЫХ ДНК-ГИСТОНОВЫХ КОМПЛЕКСАХ

Исследовалось распределение гистонов в искусственных ДНК-гистоновых комплексах в гомологичных и гетерологичных системах. Показана существенная разница между гидролизатами гомологичных и гетерологичных комплексов, полученными обработкой ДНКазой I. Сделан вывод о реконструкции в гомологичной системе структур, сходных с субъединицами хроматина.

Несмотря на то, что изучение хроматина длится достаточно долгое время, субъединичная структура его была выявлена только в последние два-три года.

Хроматиновые субъединицы, нуклеосомы, были выделены из многих источников и достаточно подробно изучены [1—4]. Их удалось увидеть с помощью электронного микроскопа [3], а также выделить в кристаллическом состоянии [5].

Для выделения нуклеосом обычно использовали мягкую обработку хроматина микрококковыми нуклеазами и ДНКазой II.

После обработки хроматина стафилококковой нуклеазой, с последующим ультрацентрифугированием в градиенте сахарозы выявилась субъединичная структура его, состоящая из частиц, имеющих 11S, 15S, 17S, 19S константы седиментации и соответственно являющихся моно-, ди-, три- и тетрамерами основной хроматиновой субъединицы— нуклеосомы [3, 5, 6].

Анализ нуклеосом показывает, что они состоят из участков ДНК (около 200 пар оснований) и восьми молекул гистонов, по две от каждой фракции, за исключением F1. Предполагается, что если четыре основные фракции главным образом принимают участие в образовании структуры хроматина, то фракция F1 выполняет также определенные регуляторные функции [6].

Реконструкция хроматина из гомологичных ДНК и гистонов приводит к образованию сходных с нуклеосомами структур [7], что свидетельствует о самосборке хроматина, и, вероятно, происходит при избирательном взаимодействии гистонов с определенными последовательностями ДНК.

Целью наших исследований было изучение распределения гистонов в гомологичных и гетерологичных комплексах. Проведенные нами ранее эксперименты по плавлению гомологичных и гетерологичных комплексов выявили существенную разницу как в общей скрепочной активности, так и в распределении гистонов [8—10]. На основании этих

экспериментов нами был сделан вывод об определенной специфичности взаимодействия гомологичного гистона с ДНК.

Поскольку гистоны достаточно сильно защищают ДНК от воздействия нуклеаз, создается возможность отделения комплексированных участков и их дальнейшего изучения. При специфичности взаимодействия разница в распределении должна проявиться в продуктах гидролиза.

Материал и методика. В экспериментах использовали ДНК ТТ (тимуса теленка) и ЭК (эритроцитов кур), выделенные фенольным методом. Содержание белка в препаратах определяли по Лоури, оно составляло менее 1%.

Нефракционированные гистоны ТТ и ЭК получали выделением из соответствующих тканей кислотной экстракцией по Джонсу [11] с последующим отделением от негистонного белка хроматографированием на карбоксиметилцеллюлозе (ЖМЦ «Reanal» и СМ-32 «Watman»). Чистоту гистоновых препаратов определяли по модифицированному Варшавским методу Джонса [12]. Концентрацию гистонов в растворе определяли по Лоури и спектрофотометрически, принимая поглощение раствора гистона с концентрацией 1 мг/мл равным 4,25 ОЕ при 230 нм [13].

Концентрацию ДНК в растворах определяли спектрофотометрически, принимая за коэффициент молярного поглощения $\epsilon_{260} = 6600$. Гомологичные и гетерологичные ДНК-гистоновые комплексы готовили смешиванием, добавлением раствора гистона соответствующей концентрации к раствору ДНК при интенсивном перемешивании в соотношении гистон/ДНК=0,5.

В экспериментах использовалась коммерческая ДНКазы I, высокоочищенная, из селезенки крупного рогатого скота. Активность фермента определяли двумя методами: спектрофотометрически и по Олфрей и Мирскому [14].

Гидролиз ДНК-гистоновых комплексов и ДНП носит ступенчатый характер. В первую очередь гидролизуются свободные от гистонов участки ДНК, а затем, в течение 6—8 час., комплексированные участки. Это позволяет выделять комплексированные участки, останавливая реакцию после 60-минутной инкубации термической инактивацией ДНКазы (15 мин при 55°).

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлена хроматограмма продуктов гидролиза гомологичных и гетерологичных ДНК-гистоновых комплексов (соотношение гистон/ДНК=0,50) при общем количестве ДНКазы 2,5 мг на каждый 1 мг ДНК.

Как видно из рисунка, хроматограммы гидролизатов гомологичных и гетерологичных комплексов сильно отличаются как друг от друга, так и от таковой чистой ДНК (рис. 1, табл. 1).

В гомологичных системах образуются продукты с молекулярным весом 80000—120000 дальтон, полностью отсутствующие в гетерологичных системах (рис. 1, табл. 1). Это свидетельствует об образовании в них специфических структур, недоступных перевариванию ДНКазой.

Однако, поскольку при больших количествах ДНКазы происходит переваривание не только свободных от гистонов участков, но и частичная депротеинизация комплексированных, картина распределения гистонов сильно искажается, что не позволяет делать однозначных выводов. Для предотвращения депротеинизации комплексированных участков нами были проделаны эксперименты по ферментативному гидролизу комплексов в щадящих условиях при весовом соотношении ДНК: ДНКазы=10:1 (рис. 2). При таком соотношении полнота гидролиза

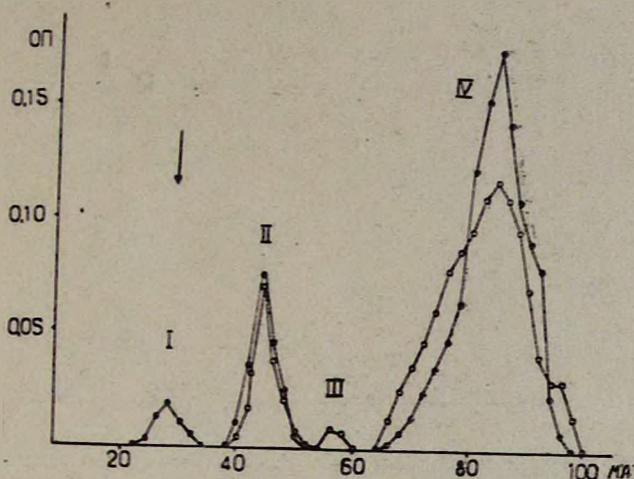


Рис. 1. Хроматограмма гидролизатов ДНК-гистоновых комплексов при соотношении ДНКазы/ДНК=2,5. Колонка 2×30 см с сефадексом G-100.

Исключенный объем здесь и далее показан стрелкой.

●—●—●— гомологичная система; ○—○—○— гетерологичная система.

Таблица 1

Краткая характеристика основных пиков хроматограммы комплексов при соотношении ДНК/ДНКазы=1:2,5

Комплексы	I пик		II пик		III пик		IV пик	
	МВ·10 ³ 100±20,	%	МВ·10 ³ 27±10,	%	МВ·10 ³ 10,	%	МВ·10 ³ 1±0,5,	%
ДНК ТТ (ЭК)	0		0		0		100	
ДНК ТТ+Г ТТ	5		17		0		78	
ДНК ТТ+Г ЭК	0		13		1		66	
ДНК ЭК+Г ЭК	7		20		0		73	
ДНК ЭК+Г ТТ	0		14		2		64	

чистой ДНК практически полностью сохраняется, а депротеинизация либо не происходит, либо происходит чрезвычайно медленно.

Хроматограммы гидролизатов комплексов в щадящих условиях показаны на рис. 2. Для разделения продуктов использовали колонки с сефадексом G-200. Хроматограммы комплексов в этих условиях резко отличаются как от хроматограмм продуктов гидролиза чистой ДНК, так и продуктов гидролиза при избытке ДНКазы. Эта разница выражается в сильном увеличении доли высокомолекулярных ($170-230 \cdot 10^3$ дальтон, 26—43%) частиц и резком уменьшении доли моно- и олигонуклеотидов. Одновременно наблюдается сильное увеличение количества фракций с промежуточными молекулярными весами около 15000 дальтон (табл. 2).

Если для гомологичных систем характерно относительно высокое содержание (41—43%) высокомолекулярных фракций и относительно низкое содержание олигонуклеотидов (23—24%), то для гетерологич-

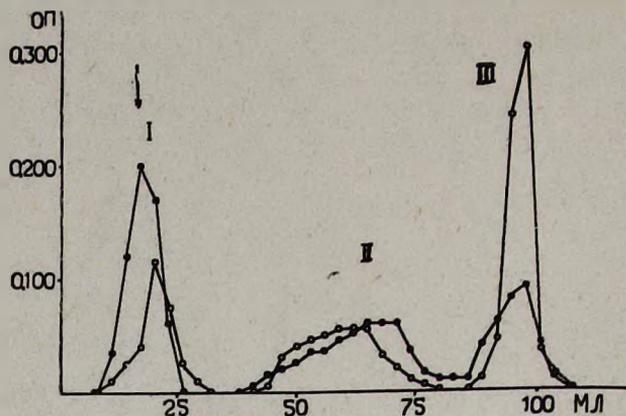


Рис. 2. Хроматограммы гидролизатов ДНК-гистоновых комплексов при соотношении ДНКазы/ДНК=0,1. Колонка 2,2×40 см с сефадексом G-200. ●—●—●—●— гомологичная система; ○—○—○— гетерологичная система.

Таблица 2

Характеристика основных пиков продуктов гидролиза гомологичных и гетерологичных комплексов

Комплексы	I пик			II пик			III пик		
	МВ·10 ³	%	P/N**	МВ·10 ³	%	P,N	МВ·10 ³	%	P/N
ДНК ТТ (ЭК)	—	0	0	—	0	0	1—2,0	100	0
ДНК ТТ+Г ТТ	160—220	43	1,45	3—35	34	0	1—2,0	123	0
Основная доля*	200	—	—	3—13	78	0	—	—	0
ДНК ТТ+Г ЭК	110—200	26	1,77	5—20	36	0,01	1—2,0	38	0
Основная доля	170	—	—	7—20	86	0,01	—	—	—
ДНК ЭК+Г ЭК	140—220	41	1,47	4—40	35	0	1—2,5	24	0
Основная доля	200	—	—	6—20	79	0	—	—	—
ДНК ЭК+Г ТТ	110—200	28	1,80	6—35	32	0,01	1—2,0	40	0
Основная доля	170	—	—	10—25	75	0,01	—	—	—

* Основная доля—МВ и доля основной части пика. (свыше 75% от общего количества пика);

** P/N—весовое соотношение белок/ДНК в пике.

ческих эти показатели составляют соответственно 26—28% и 38—40%.

Совпадение величин общего молекулярного веса и содержания белка с известными литературными данными о структуре хроматиновых субъединиц приводит к мысли, что при комплексировании гомологичных гистонов с ДНК образуются аналогичные структуры.

Далее, полученные высокомолекулярные фракции собирали, концентрировали сефадексом [15] и после депротенинизации в присутствии 6 М мочевины+3 М NaCl полученную смесь разделяли на колонках с сефадексом G-100 (рис. 3, табл. 3).

Выход ДНК с молекулярным весом 80—110000 (120—170 пар соответственно), а также данные о содержании белка (табл. 2) подтверждают данные об образовании нуклеосомоподобных частиц. Постоян-

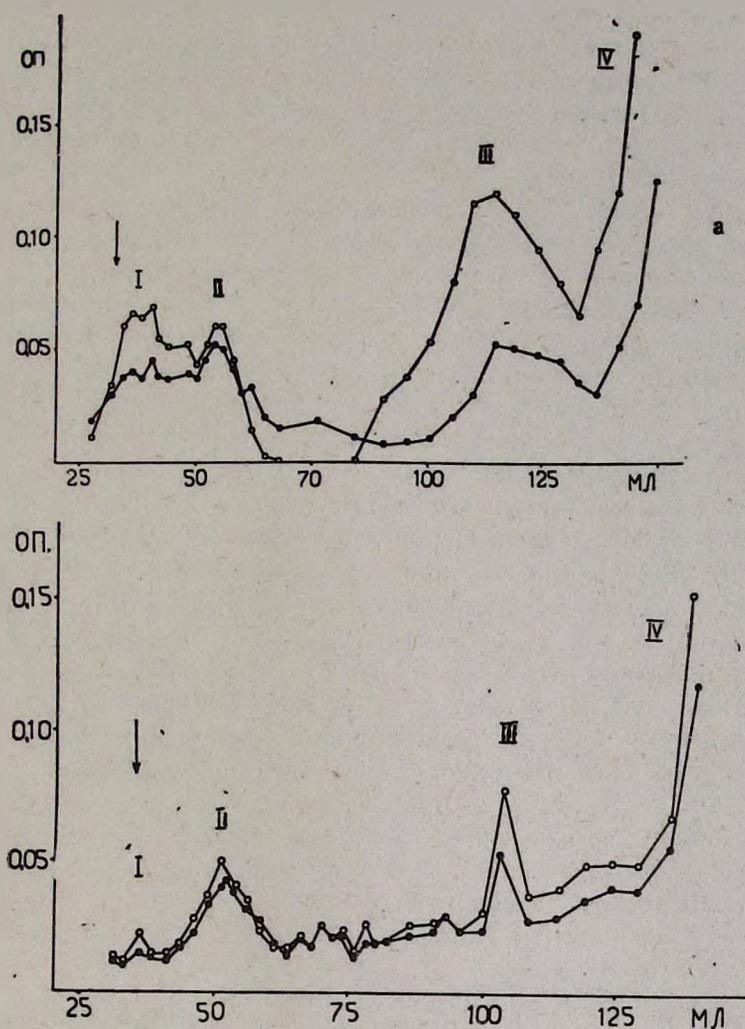


Рис. 3. Хроматограммы высокомолекулярных фракций, диссоциированных хлористым натрием и мочевиной. Колонка $2,2 \times 50$ см с сефадексом G-100. а) гомологичная, б) гетерологичная системы.

●—●—●— при 260 нм; ○—○—○— при 230 нм.

Таблица 3
Молекулярные веса депротенизированных молекул ДНК высокомолекулярных пиков, дальтоны

Комплексы	80—110000	40—60000	40000
ДНК ТТ+Г ТТ	27%	30%	43%
ДНК ТТ+Г ЭК	7%	31%	62%
ДНК ЭК+Г ЭК	25%	31%	44%
ДНК ЭК+Г ТТ	8%	32%	60%

ное общее количество молекулы ДНК с молекулярным весом 40—60000 дальтон во всех экспериментах (30—32%) приводит к выводу, что это участки, с которыми гистон взаимодействует неспецифически, а большая разница в высокомолекулярных фракциях (в 3—4 раза) свидетельствует о высокой избирательности гомологичного гистона к комплексованным участкам.

Интересно также, что аналогичные результаты получаются при выделении взаимодействующих с гистонами F1 участков ДНК [16]. Эти участки, выделенные на мембранных фильтрах, обладали высоким сродством к гомологичному гистону.

Интересные результаты были получены также при сравнении реконструированного на гомологичной и гетерологичной ДНК хроматина [17]. Реконструированный таким образом хроматин обрабатывали стафилакокковой нуклеазой и определяли длину фрагментов ДНК электрофорезом в полиакриламидном геле.

Полученные результаты совпадают с нашими данными и свидетельствуют о главной роли гистонов в формировании хроматиновых субъединиц. Роль остальных хроматиновых белков (в основном негистоновой природы) в формировании структуры нуклеосом, вероятно, невелика.

Из наших данных следует, что нуклеосомоподобные структуры образуются как на гомологичной, так и на гетерологичной ДНК (табл. 2 и 3). Это можно объяснить сродством гистонов к определенным последовательностям ДНК (вероятно, АТ-богатым [16]), которые имеются во всех ДНК.

Однако большое количество нуклеосомоподобных участков в гомологичной системе (в среднем в 3—4 раза) свидетельствует о специфичности взаимодействия гомологичных гистонов и ДНК, а также подтверждает полученные нами ранее результаты [8—10].

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 22.IV 1977 г.

Հ. Ռ. ՎԱՐԴԱՊԵՏՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ, Հ. Ք. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ

ԱՐՀԵՍՏԱԿԱՆ ԴՆԹ-ՀԻՍՏՈՆԱՅԻՆ ԿՈՄՊԼԵՔՍՆԵՐՈՒՄ
ՆՈՒԿԼԵՈՍՈՄՄԱՆՄԱՆ ԱՏՐՈՒԿՏՈՒՐԱՆԵՐԻ ԳՈՅԱՑՄԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հետազոտվել է հիստոնների բաշխումը արհեստական հոմոլոգ և հետերոլոգ ԴՆԹ-հիստոնային կոմպլեքսներում: Հիստոնից ազատ հատվածները մշակվել են պանկրեատիկ ԴՆԹ-ազայով՝ կոմպլեքսի մեջ մտած տեղամասերն անջատելու համար: Հիդրոլիզի արգասիքները հետազոտվել են G—100 և G—200 տիպի սեֆադեքսի սյունիկների վրա: Ապացուցվել է, որ հոմոլոգ և հետերոլոգ սիստեմների հիդրոլիզատները էականորեն տարբերվում են: Հետևաբար, հոմոլոգ սիստեմում գոյանում են քրոմատինի ենթամիավորների նման ստրուկտուրաներ:

ЛИТЕРАТУРА

1. Clark R. J., Felsenfeld G. Biochemistry, 13, 3622, 1974.
2. Kornberg R. D., Thomas J. O. Science, 184, 865, 1974.
3. Oosterhof D. K., Hozler J. C., Rill R. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 633, 1975.
4. Sahasrabudhe C. G., Van Holde K. E. J. Biol. Chem., 249, 1, 152, 1974.
5. Bakayev V. V., Melnickov A. A., Osicka V. D. Nuc. Acid Res., 2, 8, 1401, 1975.
6. Weintraub H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 72, 1212, 1975.
7. Oudet P., Gross-Bellard M., Chambon P. Cell, 4, 281, 1975.
8. Вардапетян Р. Р., Карапетян А. Т. Тез. докл. 3-й научн. сессии Кяроваканского пединститута. Ереван, 1975.
9. Вардапетян Р. Р., Карапетян А. Т., Паносян Г. А. Биологический журнал Армении, 27, 8, 29, 1974.
10. Вардапетян Р. Р., Паносян Г. А., Карапетян А. Т. Конформационные изменения биополимеров в растворах, 93, Тбилиси, 1975.
11. Johns E. W., Phillips D. M. P., Simpson P., Butler J. A. V. Biochem. J. 80, 189, 1961
12. Варшавский А. Я., Михельсаар У. Н., Ильин Ю. В. Мол. биол., 6, 4, 507, 1972.
13. Ohlenbusch H. H., Ollvera B. M., Tuan D., Davidson N. J. Mol. Biol., 25, 299 1967.
14. Олфрей В., Мирски А. Практикум по общей биохимии. Под ред. Филиповича Ю. Б., М., 186, 1975.
15. Бэйли Дж. Методы химии белков, М., 1965.
16. Renz, M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 733, 1975.
17. Axel R., Melchior W., Sollner-Webb B., Felsenfeld G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 10, 4101, 1974.