

ПЛАВЛЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ ДНК С ГОМОЛОГИЧНЫМИ И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМИ ГИСТОНАМИ

Г. А. ПАПОСЯН, Р. Р. ВАРДАПЕТЯН, П. О. ВАРДЕВАНЯН

Исследованы параметры плавления комплексов ДНК ТТ и ЭК с гомологичными и гетерологичными гистонами. С увеличением количества гистонов наблюдается повышение общей скрепочной активности и других параметров плавления. Показана зависимость ДНК-гистонового взаимодействия от ГЦ-состава ДНК. Частичная денатурация ДНК существенно отражается на характере плавления комплексов. Полученные результаты свидетельствуют о наличии определенной специфичности во взаимодействии гомологичного гистона с ДНК.

Одним из способов изучения структуры и функций нуклеогистонов является исследование методом плавления взаимодействия комплексов ДНК как с тотальными гистонами, так и с отдельными гистоновыми фракциями. Исследование плавления этих комплексов может дать ответ на такие вопросы как скрепочная активность гистонов, термическая стабильность комплексов, распределение гистонов вдоль молекулы ДНК, избирательность взаимодействия их с определенными последовательностями ДНК и т. д.

Проведенные нами ранее эксперименты по плавлению комплексов ДНК с нефракционированными гистонами (НФГ) выявили существенную разницу в плавлении гомологичных и гетерологичных комплексов [1].

Настоящая работа посвящена исследованию некоторых особенностей взаимодействия гомологичного гистона с ДНК методом плавления.

Материал и методика. В экспериментах использовали ДНК ТТ (тимуса теленка), ЭК (эритроцитов кур), СЛ (спермы ласухи) и ПС (печени сазана) с ГЦ-составами 0,44, 0,42, 0,49, 0,39 соответственно, выделенные фенольным методом. Содержание белка в препаратах определяли по Лоури, оно составляло менее 1%.

Нефракционированные гистоны (НФГ) ТТ и ЭК получали выделением из соответствующих тканей кислотной экстракцией по Джонсу [2] с последующим отделением от негистонного белка хроматографированием на карбоксиметицеллюлозе (КМЦ), «Reanal» (Венгрия) и СМ-32 «Waltman» (Англия). Чистоту гистоновых препаратов определяли гелем электрофорезом по модифицированному Барнаевским методу Джонса [3]. Концентрацию гистонов в растворе определяли по Лоури, а также спектрофотометрически, принимая поглощение раствора гистона 1 мг/мл равным 1,25 ОЕ при 230 нм [4], а концентрацию ДНК — спектрофотометрически, принимая коэффициент молярного поглощения $\epsilon_{260} = 6600$.

Исследуемые препараты растворялись в $5 \cdot 10^{-2}$ М фосфатном буфере, рН 7,0. Все препараты перед употреблением диализовались при 4° в течение 48 час. при соотношении диализат/буфер = 1/1000.

Комплексообразование между гистонами и ДНК проводили медленным добавлением гистона соответствующей концентрации к раствору ДНК, при интенсивном перемешивании в весовых соотношениях гистон/ДНК, равных 0,25, 0,5, 0,75, и 1,00. Реассоциированные комплексы приготавливались градиентным диализом из 2 М NaCl.

Плавление ДНК и ее комплексов с гистонами проводили в герметически закрытых кюветах спектрофотометра СФ-4А, помещаемых в термостатическую ячейку с точностью термостатирования $\pm 0,1^\circ$. Температуру в кюветах определяли с помощью медь-константановой термопары.

В экспериментах по плавлению комплексов гистонов с предварительно частично денатурированными молекулами ДНК комплексообразование проводили в кюветах добавлением гистона соответствующей концентрации, предварительно нагретого до той же температуры, а растворы перемешивали в кюветах специальной мешалкой.

Кривые плавления, приведенные на рисунках, строили по изменению поглощения образцов при 260 нм в зависимости от температуры; они представляют собой усредненные данные 6 экспериментов. Измерение поглощения образцов проводили спустя 8—10 мин после установления теплового равновесия в кюветах. Для исключения возможных систематических ошибок, плавление комплексов ДНК с гистонами проводили одновременно с плавлением образца чистой ДНК.

Общую скрепочную активность (ОСА) определяли как интегральную площадь между кривыми плавления чистой ДНК и ее гистоновыми комплексами при выбранных масштабах графика. Этот параметр позволяет определять суммарные изменения по всем интервалам плавления и довольно сильно увеличивает чувствительность метода.

Эксперименты проводили и гомологичных (ДНК и гистоны выделены из одного источника) и гетерологичных (ДНК и гистоны выделены из разных источников) комплексах.

Результаты и обсуждение. Установленная нами ранее разница в плавлении гомологических (гом.) и гетерологических (гет.) ДНК-гистоновых комплексов, практически не наблюдаемая при весовом соотношении гистон/ДНК = 0,25, достигает максимума в интервале весовых соотношений 0,50—0,75 и практически исчезает при весовом соотношении 1,00.

При сопоставлении кривых плавления нуклеогистонов с одинаковым соотношением гистон/ДНК наблюдаются более высокие температуры плавления (T_m) гетерологичных нуклеогистонов по сравнению с гомологичными (рис. 1).

Поскольку соотношение гистон/ДНК одинаково для обеих систем, то разницу в плавлении этих систем можно, вероятно, объяснить только неодинаковым распределением гистонов вдоль молекулы ДНК при комплексообразовании. Это предположение подтверждается экспериментами по ренатурации денатурированных комплексов [1] и при определении свободных от гистонов участков в комплексах [5].

Увеличение ионной силы приводит к смещению участка кривой плавления до ступеньки, из чего следует, что на этих участках плавятся практически свободные от гистонов отрезки ДНК. При определении температуры плавления этих участков, выявилась их обогащенность ГЦ-па-

рами, что хорошо согласуется с данными о предпочтительном взаимодействии гистонов с АТ-богатыми участками ДНК [6—12] и др.

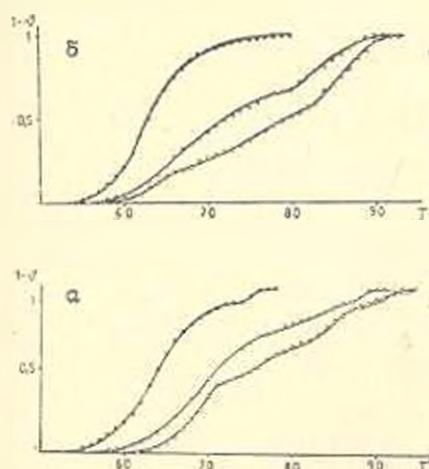


Рис. 1. Кривые плавления комплексов ДНК ТТ (а) и ЭК (б) с гистонами ГТ и ЭК при весовом соотношении гистон/ДНК=0,75. По оси абсцисс температура, по оси ординат относительный гиперхром. ●—●—●—свободная ДНК, ○—○—○—гомологичная система, △—△—△—гетерологичная система.

Изменение ГЦ-состава плавящихся до ступеньки молекул ДНК в зависимости от соотношения гистон/ДНК показано в табл. 1.

Таблица 1
Зависимость ГЦ-состава свободных от гистонов участков ДНК от соотношения гистон/ДНК

Соотношение гистон/ДНК	ДНК ТТ				ДНК ЭК			
	Тм		ГЦ-состав		Тм		ГЦ-состав	
	гом.	гет.	гом.	гет.	гом.	гет.	гом.	гет.
Свободная ДНК	64,0	64,0	0,44	0,44	63,0	63,0	0,42	0,42
0,25	64,5	65,5	0,45	0,47	63,5	64,5	0,43	0,44
0,50	65,5	67,0	0,47	0,50	65,0	66,0	0,46	0,48
0,75	69,0	70,0	0,54	0,56	67,0	70,5	0,50	0,55
1,00	73,0	73,5	0,62	0,63	70,0	71,0	0,58	0,60

Как видно из таблицы, максимальная разница между ГЦ-составами свободных от гистонов участков гомологичных и гетерологичных комплексов наблюдается в интервале соотношений гистон/ДНК (0,50—0,75). Вероятно, это именно тот интервал, где избирательность взаимодействия проявляется максимально, поскольку количество гистона относительно мало, и неспецифическое взаимодействие не маскирует специфическое. При низких соотношениях гистон/ДНК (0,25) общее коли-

чество гистонов недостаточно для выявления специфичности, а при высоких (1.0) неспецифическое взаимодействие практически полностью маскирует специфическое. Аналогичная картина наблюдается при определении ОСА (табл. 2).

Таблица 2
Зависимость ОСА гистонов от ГЦ-состава ДНК (в условиях единицах ОСА)

Гистон ДНК	ДНК ПС с ГЦ 0,39	ДНК ЭК с ГЦ 0,42			ДНК ТТ с ГЦ 0,44			ДНК СЛ с ГЦ 0,49
	гет. гис- тон ТТ	гом. гис- тон ЭК	гет. гис- тон ТТ	Δ	гом. гис- тон ТТ	гет. гис- тон ЭК	Δ	гет. гис- тон ТТ
0,25	20,4	14,3	17,6	3,3	10,9	15,8	4,9	9,5
0,50	41,5	24,7	40,6	15,9	13,7	30,9	17,2	17,0
0,75	77,1	45,1	65,5	20,4	38,0	55,2	17,3	30,6
1,00	59,3	66,7	77,9	9,2	70,8	73,0	2,2	45,2

Для исследования ОСА гистонов в зависимости от ГЦ-состава ДНК нами были проведены эксперименты по плавлению комплексов гетерологичных гистонов (гистон ТТ) с ДНК СЛ и ДНК ПС. Данные этих экспериментов также приведены в табл. 2.

Неуклонное повышение температуры плавления с увеличением соотношения гистон/ДНК и данные о предпочтительном взаимодействии гистонов с АТ-богатыми блоками ДНК приводят к выводу о главной роли АТ-последовательностей в специфическом взаимодействии.

В экспериментах с реконструированными днализом комплексами разность между кривыми плавления гомологичных и гетерологичных систем возрастает, что свидетельствует о более избирательном взаимодействии гистонов с ДНК.

Таким образом, эксперименты показали, что гистоны, комплексуясь с ДНК, оставляют свободными довольно большие участки, обогащенные ГЦ парами. Отсюда можно сделать естественный вывод, что разница, наблюдаемая в плавлении гомологичных и гетерологичных комплексов, обусловлена неодинаковым взаимодействием гистонов с АТ-богатыми участками ДНК.

Для исследования зависимости ОСА гистонов от ГЦ-состава ДНК нами были проделаны эксперименты по плавлению комплексов гистонов с частично денатурированными молекулами ДНК. Мы использовали факт линейного увеличения ГЦ-состава нерасплавленных участков ДНК одновременно с увеличением температуры. Эксперименты были проведены с ДНК ТТ и ЭК, предварительно расплавленными до 60, 62, 64 и 66°.

Как видно из результатов плавления, ОСА гистонов с повышением температуры предварительного расплавления ДНК уменьшается. Одновременно наблюдается резкое уменьшение разности между кривыми плавления гомологичных и гетерологичных комплексов. Если при 60° эта разность достигает значительной величины, то при предварительном расплавлении до 66° она уменьшается или вовсе исчезает (табл. 3).

Таблица 3

Зависимость ОСА от температуры предварительного расплавления ДНК
(соотношение гистон/ДНК, 0,50)

T	ДНК ЭК					ДНК ТТ				
	ГЦ*	гом.	гет.	Δ	гет./гом.	ГЦ*	гом.	гет.	Δ	гет./гом.
25	0,42	24,7	40,6	15,9	1,64	0,44	13,7	30,9	17,2	1,25
40	0,48	15,0	25,9	20,9	1,73	0,49	20,4	21,1	10,7	2,07
62	0,50	16,0	20,1	4,1	1,31	0,51	9,2	14,5	5,3	1,58
64	0,53	10,3	13,1	2,8	1,27	0,53	6,7	8,5	1,8	1,27
66	0,56	7,8	10,2	2,4	1,30	0,55	6,6	6,7	0,1	1,02

T — температура предварительного плавления ДНК до добавления гистона.

ГЦ* — расчетный ГЦ состав нерасплавленных участков.

Нами были проведены также эксперименты по плавлению комплексов гистонов с ренатурированными до 0° на точки плавления молекулами ДНК. Из рис. 2 видно, что несмотря на ренатурацию разница между гомологичными и гетерологичными комплексами практически отсутствует, а плавление сходно с плавлением комплексов, приготовленных с предварительно расплавленной ДНК.

Полученные результаты дают основание полагать, что гомологичные и гетерологичные гистоны по-разному взаимодействуют с молекулами ДНК. Одновременно наблюдается выраженная двухфазность плавления; первая фаза соответствует плавлению свободных, а вторая — комплексированных участков.

Гистоны, предпочитательно связываясь с АТ-богатыми участками, увеличивают средний ГЦ-состав свободных участков [6—12]. Труднее интерпретировать наблюдаемую разницу в плавлении гомологичных и гетерологичных комплексов. Более высокий уровень ступеньки в гомологичной системе свидетельствует о большей кооперативности во взаимодействии гистонов с ДНК.

Вероятно, гомологичные гистоны при добавлении к ДНК предпочтительно взаимодействуют с участками, уже занятыми гистонами, оставляя большинство блоков ДНК свободными от гистонов до определенной концентрации, а гетерологичные гистоны взаимодействуют даже с АТ-последовательностями ГЦ богатых блоков, более равномерно распределяются по ДНК и тем самым увеличивают ГЦ-состав свободных участков на большую величину, чем гомологичные [7] (табл. 1).

Поскольку в настоящее время достаточно однозначно показано, что первая фаза плавления соответствует чистой ДНК [8, 11—13], то посредством определения ее T_m можно с достаточной точностью вычислить ГЦ-состав свободных от гистонов участков.

При повышении ионной силы первая фаза плавления смещается в область высоких температур, а разница между гомологичными и гетерологичными комплексами уменьшается. Возможно, в этом случае исчезает ряд факторов, ответственных за специфическое взаимодействие гистонов с ДНК. Вероятнее всего это изменение В-конформации ДНК или

деформация молекулы на отдельных, возможно, АТ-богатых участках, или и то и другое.

Значительный интерес представляет зависимость ОСА от ГЦ-состава ДНК. Сравнивая полученные результаты по плавлению комплексов гистонов с ДНК различного ГЦ-состава в гетерологичных системах, можно обнаружить следующую закономерность: скрепочная активность гистонов линейно возрастает с уменьшением ГЦ содержания. Эта закономерность наблюдается при всех соотношениях гистон/ДНК и подтверждает предпочтительность во взаимодействии гистонов с АТ-богатыми участками ДНК. Труднее объяснить пересечение полученных для различных соотношений гистон/ДНК прямых в одной точке, соответствующей ГЦ содержанию в 56—57% (рис. 2).

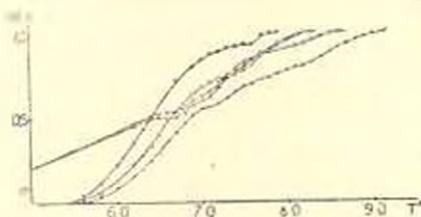


Рис. 2. Плавление комплексов гистонов ТТ и ЭК с ренатурированными из точки T_m молекулами ДНК ТТ, при равном соотношении гистон/ДНК = 0,50. ●—●—●— ДНК ТТ, ○—○—○— ДНК ТТ+гис. ТТ, ▲—▲—▲— ДНК ТТ+гис. ЭК, ◐—◐—◐— ДНК ТТ рен. + гис. ТТ, △—△—△— ДНК ТТ рен.+гис. ЭК.

На наш взгляд, это указывает на то, что для комплексов гистонов с ДНК необходимо минимум четыре АТ, из каждых десяти взаимодействующих с гистонами пар оснований. Результаты, полученные при плавлении комплексов гистонов с частично денатурированными молекулами ДНК, хорошо согласуются с полученными прямыми и подтверждают данное предположение.

Эксперименты по плавлению комплексов гистонов с ренатурированными молекулами ДНК показывают роль ренатурированных участков и специфическом взаимодействии.

Несмотря на ренатурацию, разница между плавлениями гомологичных и гетерологичных систем практически отсутствует. Поскольку разница в ОСА между системами в данном случае оказывается больше, чем для неренатурированной ДНК (2,4 вместо 1,8), то можно рассчитать вклад ренатурированных участков и увеличения ОСА.

Из экспериментов следует, что за основную долю специфичности (около 80%) ответственны участки ДНК с АТ содержанием 65—100% (уровень ренатурации из T_m — 64° — 20%, T_m ренатурированных участков — 57,5, АТ содержание 65 — 100%), а на участки с АТ содержанием 47 — 65% приходится 20% специфического взаимодействия (2,4 ед. ОСА на 16).

Таким образом, особенности во взаимодействии гомологичных гистонов с ДНК являются не артефактом, а результатом специфического

взаимодействия. В реконструированных нуклеогистонах специфичность как и кооперативность взаимодействия гистонов выражена гораздо сильнее. Специфичность проявляется вследствие большей кооперативности при взаимодействии гомологичных гистонов с ДНК, что приводит к менее равномерному распределению гистонов в гомологичной системе и отражается на кривых плавления.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 27.IX 1977 г.

ՀՈՄՈԼՈԳ ԵՎ ՀԵՏԵՐՈԼՈԳ ԳԵԹ-ՀԻՄՏՈՆԱՅԻՆ
ԿՈՄՊԼԵՔՍՆԵՐԻ ՀԱՂՄԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ, Հ. Ի. ՎԱՐԴԱՊԵՏՅԱՆ, Պ. Հ. ՎԱՐԴԵՎԱՆՅԱՆ

Ստացվել է ուսումնասիրվել է հոմոլոգ և հետերոլոգ սիստեմներում ԳԵԹ-հիստոնային կոմպլեքսների համան կորերի տարբերությունը, որը թույլ է նշմարված հիստոն-ԳԵԹ 0,25 կշռային հարաբերություններում, հասնում է մարսիմոմի 0,50—0,75 հատվածում և գրեթե չի նկատվում 100 հարաբերություններում:

Բարդ համան կորերի անսլիզը դրսևորեն հետազոտվում է մեր մշակած ընդհանուր ամրակային ակտիվություն որոշող պարամետրի օգնությամբ (Ը և Ա): Հիստոնների Ը և Ա կախվածությունը ԳԵԹ-ի ԳՑ պարունակությունից ունի զծային բնույթ և արտացոլում է հիստոնների խնամակցությունը ԳԵԹ-ի ԱՏ հարուստ հատվածների նկատմամբ:

INVESTIGATION OF DNA MELTING WITH HOMOLOGIOUS
AND HETEROLOGIOUS HISTONES

G. H. PANOSYAN, H. R. VASIDAPETYAN, P. H. VARDEVANYAN

The parameters of DNA CT and CE melting with homologious and heterologious histones have been investigated. Change of total fastening activity and other parameters of melting may be observed with the increase of the amount of histones.

The dependence of DNA histone interaction on G—C composition of DNA and partial denaturation of DNA has also been shown.

The obtained results show that there is certain specificity in the interaction of homologious histone with DNA.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Варձապետյան Ք. Ք., Կարապետյան Ա. Գ., Փանոսյան Գ. Ա. Биологический журнал Армении, 27, 8, 29, 1974.
2. Johns E. W., Philips D. M. P., Simons P., Butler I. A. V. Biochem. J., 80, 189 1961.
3. Варшавский А. Я., Микельсаар У. П., Ильин Ю. В. Молек. биол., 6, 4, 507, 1972.
4. Ohlenbush H. H., Olivera B. M. J. Mol. Biol., 25, 229, 1967.
5. Варձապետյան Ք. Ք., Փանոսյան Գ. Ա., Խաչատրյան Ա. Գ. Биологический журнал Армении, 30, 7, 39, 1977.

6. Leng M., Felsenfeld G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 56, 1325, 1966.
7. Gottesfeld J. M., Melvin C. R., David C. R., David M. R., Vivian M., William V. Biochemistry, 11, 8, 1422, 1972.
8. Shih T. Y., Bonner J. J. Mol. Biol., 48, 3, 469, 1970.
9. Renz M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 733, 1974.
10. Sponar J., Sormova Z. Eur. J. Biochem., 29, 99, 1972.
11. Li H. J. Biopolymers, 11, 4, 835, 1972.
12. Subtrana Y. A. J. Mol. Biol., 74, 363, 1972.
13. Leffak M., Hwan J. C., Shih T. Y. Biochemistry, 13, 6, 1116, 1974.