

11. Паносян А. Г., Григорян С. В., Давтян Д. Г., Геворкян Г. А., Габриелян Э. С. Бюлл. экспер. биол. и мед., 11, 561—563, 1986.
12. Платонов В. И. Автореф. канд. дисс., М., 1984.
13. Саркисян Т. Ф. Цитология и генетика, 21, 2, 108—111, 1987.
14. Chilovi F., Dohrilla G. Ital. J. Gastroenterol., 17, 3, 275—277, 1985.
15. Schlesinger M., Hyrd D. N., Zamir R., Brautbar C. Tissue Antigens, 24, 1, 67—66, 1985.

Поступило 1.IX 1987 г.

Биол. ж. Армении, т. 41, № 1, 38—45, 1988

УДК 577.963.3

НУКЛЕАЗОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И ТЕРМИЧЕСКАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ ХРОМАТИНА, ЛИШЕННОГО ГИСТОНА H1. ПРИ АКТИВАЦИИ

М. А. ДАВТЯН, П. О. ВАРДЕВАНЯН, С. Г. ТИРАЦЯН, Г. Х. ШЕНЬ

Грепетский государственный университет, кафедра биохимии,
кафедра биофизики

Исследования показали, что в хроматине, лишенном гистона H1, в течение 6 недосаженной жидкости, содержащей негистоновые белки вместе с гистоном H1, при негорковальной индукции, вызванной введением смеси аминокислот, и при индукции гидрокортизоном. Показано, что при введении животным смеси аминокислот существенно уменьшается относительное содержание гистона H1. Индукция как смесью аминокислот, так и гидрокортизоном в разной степени затрагивает уровень организации хроматина, чувствительного к действию ДНКазы I, и отражается на параметрах плавления хроматина, лишенного гистона H1.

Ցույց է տրվում, որ աֆինալիզների բառնությունը ներթափանցում է հեմո-
լիզում H1, ֆրակտոնի փոքրամասնական պարունակության գրգռման համարժեք
գրգռման, ինչպես աֆինալիզների բառնությունով, առկա է ֆերոնդրոնգրգռման,
տարրեր չափով է պայմանավորված քրոմատինի կազմավորման մոնոարդանի փուլ, որը
զգայուն է Գեորգիա 1-ի նկատմամբ և անդրադարձելով է —H1-ի ներկայությամբ պա-
րամիտների վրա:

It was demonstrated that by introducing amino acids mixture essential reduction of relative contents of histone H1 was observed. Induction, by amino acids mixture and by hydrocortison, in different extent affected the level of chromatin organization, sensitive to DNAase effect, and was reflected on melting chromatin, void of histone H1.

Ключевые слова: хроматин, гистон H1, нуклеазочувствительность, термическая денатурация.

Выявление роли гистона H1 в организации и функционировании хроматина является одной из актуальных и дискутируемых проблем [8], наиболее важной стороной которой является выяснение взаимоотношений этого гистона и транскрипционно активного хроматина. Исследование хроматина, лишенного гистона H1 (X-H1), может дать существенную информацию при выяснении нуклеосомной структуры хроматина в модельных экспериментах по изучению ДНК-белкового взаимодействия и выявлению роли гистона H1 в образовании структур высшего порядка [17]. В настоящее время известно, что гистон H1 в основном связан с

ликерными участками хроматина [12]. Показано, что он может взаимодействовать также и с кором, при этом стабилизируя и защищая ДНК внутри и вне кора нуклеосом [12].

Активация хроматина в ряде случаев сопровождается редукцией гистона H1 либо его модификацией и замещением на негистоновые белки HMG1 и HMG2.

Ранее нами было показано, что введение животным смеси аминокислот приводит к активации хроматина, что отражается на выходе нуклеазочувствительных участков хроматина и его активной фракции S_2 , а также на параметрах плавления активного хроматина [2]. Исследование хроматина, лишенного гистона H1, может дать более существенную информацию о роли последнего и о степени вовлеченности разных структурных организаций хроматина в процесс его активации при введении смеси аминокислот.

Материал и методы. Исследования проводили на белых беспородных крысах с массой тела 100–150 г. Опытных животных забивали через 1 и 5 ч после введения гидрокортизона и смеси аминокислот [2] хроматин из ядер печени крыс выделяли как описано в работе [18]. Удаление гистона H1 из хроматина производили добавлением 0,6 М раствора NaCl [19]. Избирательную экстракцию гистона H1 из хроматина осуществляли по методу Джобса [11]. Тотальный гистон экстрагировали 0,25 N HCl [7].

Гидролиз ядер хроматина (ДНКазы I фирмы «Serva», ФРГ) проводили добавлением ДНКазы I до конечной концентрации 200 ед/мл (удельная активность 2000 ед/мг) [3] при 37° в течение 3–10 мин. реакции останавливали быстрым охлаждением до 4°. Кислоторастворимую фракцию получали в надосадочной жидкости после центрифугирования при 5000 об/мин. Процентное содержание гидролизованной ДНК определяли спектрофотометрически по увеличению оптической плотности при длине волны 260 нм. Для учета вклада эндогенных нуклеаз хроматин параллельно инкубировали в тех же условиях без добавления нуклеазы. Тотальный гистон и гистон H1 анализировали с помощью электрофореза в системе мочевины—ПААГ [6, 16].

Плавление хроматина и X-H1 осуществляли в термостатируемой ячейке спектрофотометра Unicam SP-8-100 (Англия) после дигликолиза соответствующих образцов против 0,1XSSC в течение 24 ч при 4°. Дифференциальные кривые плавления (ДКП) строили как описано в работе [14].

Результаты и обсуждение. Исследование особенностей активации генома при негормональной индукции, вызванной введением смеси аминокислот, по сравнению с таковой при введении гидрокортизона интересно тем, что оно может пролить свет на понимание механизмов и выявление различий в активном хроматине при разных формах индукции [2]. Обработка ДНКазой I и термическая денатурация X-H1 может выявить вклад отщепляемых фракций белков в его структурную организацию, с одной стороны, и X-H1—с другой, при изменении характера его упаковки [5, 15].

Определение соотношений компонентов хроматина может дать существенную информацию о его функциональном состоянии. Отношение белок/ДНК в наших экспериментах в контрольном хроматине равно $1,6 \pm 0,07$, отношение H1/ДНК— $0,19 \pm 0,02$. После удаления гистона H1 отношение белок/ДНК приобретает значение порядка $1,02 \pm 0,02$, что согласуется с данными других авторов [19]. Определение относительного содержания гистона H1 показывает, что активация хроматина

при введении смеси аминокислот сопровождается снижением относительного содержания гистона III (H/ДНК) по сравнению с контролем (от $0,19 \pm 0,01$ до $0,13 \pm 0,01$). В случае же индукции гидрокортизоном оно незначительно.

При обработке хроматина 0,6 М NaCl гистон III полностью удаляется, и чем свидетельствует сравнение электрофореграмм тотального гистона и гистона, экстрагированного из осадка после высокоскоростного центрифугирования (рис. 1). Коровые же гистоны остаются в хро-

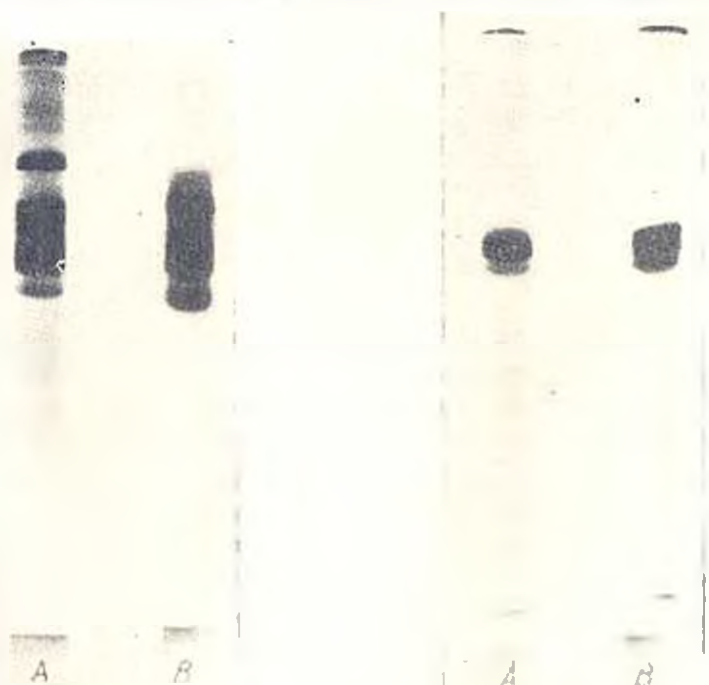


Рис. 1. Электрофореграмма гистонов, выделенных из тотального хроматина intact-тотального хроматина intactных животных (А) и осадка после высоко- (А) и NaCl-растворимого материала надоса- скоростного центрифугирования (В) дочерей жидкости и сате высокоскоростного центрифугирования, осадочного гистона.

матине, как это видно при сравнении электрофореграмм гистона III, полученного из тотального хроматина, и кислоторастворимого материала супернатанта (рис. 2).

Таким образом, препараты хроматина из контрольных и опытных групп животных различаются по соотношению гистона III, а разное его количество может привести к различию в структурной организации хроматина у этих групп животных, поскольку гистон III играет ключевую роль в организации высших уровней упаковки хроматина. Известно, что ДНКазы I преимущественно гидролизуют активный хроматин, и изменение его активности при разных формах индукции должно в той или иной мере отражаться на кинетике гидролиза ДНКазой I [3].

Результаты, приведенные в табл. 1, показывают, что X-III проявляет значительно большую чувствительность к действию ДНКазы I, чем тотальный хроматин, обнаруживающий в свою очередь более высокую

Таблица 1. Выход гидролизованной ДНК ядер, хроматина и хроматина, лишённого гистона H1 из печени крыс, %

Время работы, мин	К			АК			ГК		
	ядра	ХР	Х-Н1	ядра	ХР	Х-Н1	ядра	ХР	Х-Н1
3	9.6 ±0.5	13.7 ±0.9	28.3 ±1.1	15.4 ±1.1	23.0 ±2.2	45.6 ±2.2	11.0 ±0.8	15.9 ±0.1	34.7 ±2.3
5	15.4 ±0.9	16.6 ±0.8	37.0 ±0.9	23.0 ±0.4	31.2 ±2.5	58.2 ±2.8	17.1 ±0.9	18.3 ±0.2	40.6 ±1.6
10	24.5 ±0.2	28.0 ±1.0	41.6 ±1.3	31.2 ±0.5	48.6 ±2.7	62.2 ±2.5	28.3 ±0.9	33.1 ±1.0	45.1 ±2.5

Условные обозначения: К—контрольные животные; АК—животные, которым вводили смесь аминокислот; ГК—животные, которым вводили гидрокортизон; ХР—тотальный хроматин.

нуклеазочувствительность, чем ядра. Исследование кинетики расщепления хроматина ДНКазой 1 показывает, что в течение 3 мин инкубации интактного хроматина печени крыс с ферментом при 37° в кислоторастворимую фракцию переходит почти 15% ДНК. ДНК же Х-Н1 за это время расщепляется до кислоторастворимых продуктов примерно на 30%. При дальнейшей инкубации доля кислоторастворимой фракции постепенно возрастает, достигая через 10 мин 28% при расщеплении тотального хроматина и 41,6% при расщеплении Х-Н1. Следовательно, ДНК тотального хроматина печени крыс значительно более резистентна к ДНКазе 1.

Дальнейшие эксперименты проводились в условиях ограниченного гидролиза ДНК и контрольном хроматине для предотвращения появления заметного количества кислоторастворимого материала, чтобы не затухать небольшие различия, проявляемые на начальной стадии гидролиза, когда происходит преимущественное разрушение нуклеазой транскрипционно активных участков хроматина. Из результатов, приведенных в табл. 1, видно, что при введении смеси аминокислот происходят такие изменения в хроматине, которые заметно изменяют тестируемую в наших условиях чувствительность к ДНКазе 1 как ядра, так и хроматина и Х-Н1. Возрастание чувствительности ДНК ядра и хроматина при введении смеси аминокислот к действию ДНКазы 1 свидетельствует об активации хроматина, и эта активация затрагивает уровень организации хроматина, чувствительный к действию ДНКазы 1. Однако возрастание нуклеазочувствительности хроматина и Х-Н1 при этом происходит не в одинаковой мере (в случае с хроматином выход гидролизованной ДНК увеличивается на 9,3%, а в случае с Х-Н1—на 17,2% по сравнению с контролем), т. е. изменения в хроматине при активации, вызванной введением смеси аминокислот, могут быть обусловлены вымываемыми при экстракции 0,6M NaCl компонентами. Индукция хроматина гидрокортизоном также отражается на чувствительности к ДНКазе 1, хотя и в меньшей мере (возрастание выхода гидролизата в случае с хроматином на 2,2%, в случае с Х-Н1 на

64% (по сравнению с контролем), чем индукция, вызванная введением смеси аминокислот.

При сопоставлении этих результатов с полученными ранее при изучении действия ДНКазы II [2] (незначительное возрастание доли нуклеотидо-растворимой фракции), а также с результатами работ ряда авторов [3, 5], утверждающих, что индукция гидрокортизоном либо незначительна, либо вовсе не отражается на чувствительности к действию нуклеазы, можно прийти к выводу о том, что активация гидрокортизоном происходит не за счет разрыхления хроматина, а за счет специфической активации генома. Возрастание же чувствительности к ДНКазе I X-III может быть результатом лабильзации и изменения конформации самих нуклеосом, либо возрастание количества меньших по размеру олигомеров нуклеосом [1].

Для подтверждения этого предположения было осуществлено плавление X-III (рис. 3). Из приведенных на рис. ДКП видно существенное изменение профиля плавления в области 50—60° и в интервале 80—90°, что привело к увеличению площади под интегральными кривыми плавления активных фракций S_2 . Отметим, что значения площадей под интегральными кривыми плавления фракции S_2 увеличиваются больше при введении смеси аминокислот. Площади же под кривыми плавления X-III больше при индукции гидрокортизоном (табл. 2). Эта инверсия значений площадей активной фракции S_2 и X-III при активации гидрокортизоном и смесью аминокислот может быть интерпретирована следующим образом: после выделения активной фракции S_2 мы оперируем фактически только с активным материалом, при изучении же X-III имеем дело и с активными, и неактивными участками хроматина. Этот факт сам по себе еще раз указывает на глубокие различия в механизмах активации хроматина при введении гидрокортизона и смеси аминокислот, с одной стороны, и в изменениях активных фракций — с другой. В пользу этого предположения свидетельствуют также изменения в профилях ДКП соответствующих препаратов хроматинов.

Удаление гистона III оказывает более существенное влияние на термическую денатурацию X-III по сравнению с тотальным хроматином (рис. 4). Наблюдается возрастание количества участков, плавящихся при низких температурах [9], в частности, при температуре плавления чистой ДНК и ниже. По-видимому, уменьшение термостабильности участков ДНК вследствие удаления гистона III является причиной возрастания доли легкоплавких участков хроматина. Отмеченные выше структурные перестройки хроматина при удалении гистона III и могут быть причиной повышенной чувствительности X-III к действию ДНКазы I.

Известно, что те или иные температурные интервалы кривой плавления хроматина характеризуют плавление определенных участков. Так, при температурах ниже температуры плавления свободной ДНК плавятся участки, связанные с негистоновыми белками, а при более высоких температурах плавятся нуклеосомы [1, 4, 10]. Учитывая этот факт, мы предложили метод зонного анализа хроматина [10], суть которого заключается в условном разделении кривой плавления на зоны,

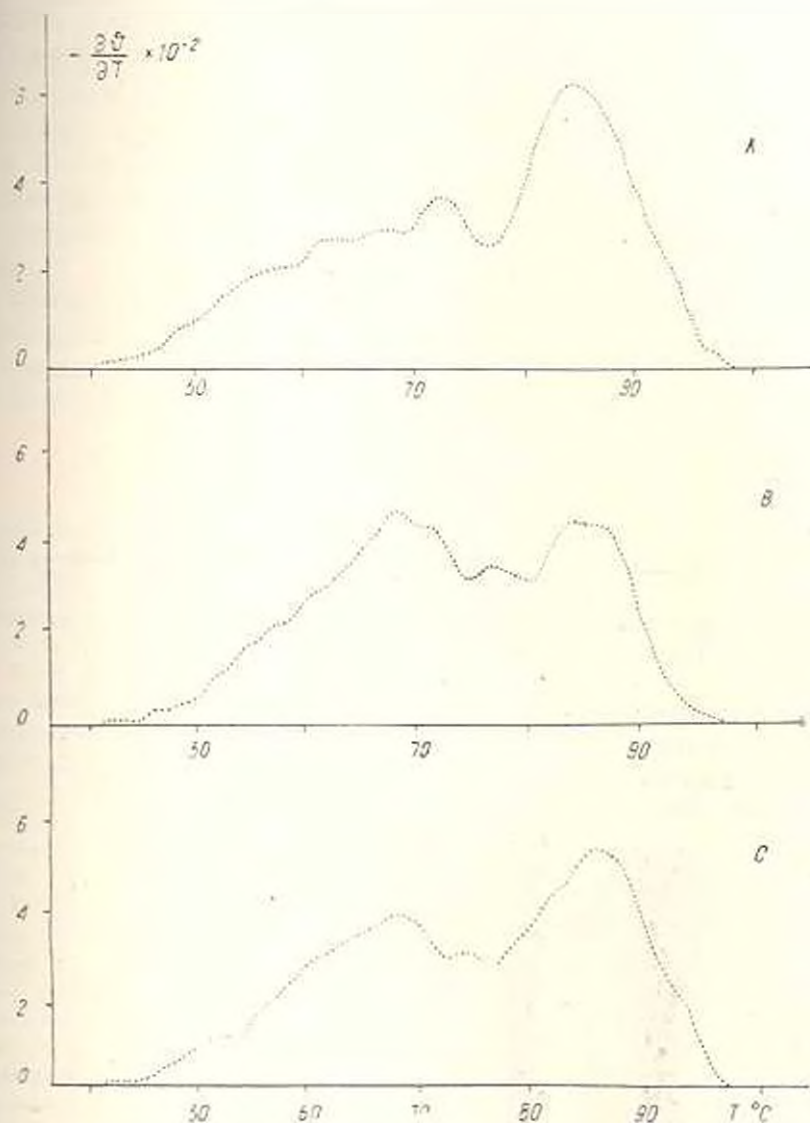


Рис. 3. ДКП тотального хроматина интактных животных (—) и X-HI (---).

Таблица 2. Значения площадей под интегральными кривыми плавления (J) фракций активного хроматина (S_2) и X-HI

	К		ЛК		ГК	
	S_2	X-HI	S_2	X-HI	S_2	X-HI
M	34.1	30.3	43.0	32.7	40.0	35.8
m	0.2	0.3	0.5	0.5	0.6	0.3

M—среднее арифметическое значение, m—средняя статистическая ошибка.

характеризующие плавление различных участков хроматина, что делает возможным выявление изменений в структуре хроматина непосредственно из кривых плавления. В данном случае из ДКП можно выя-

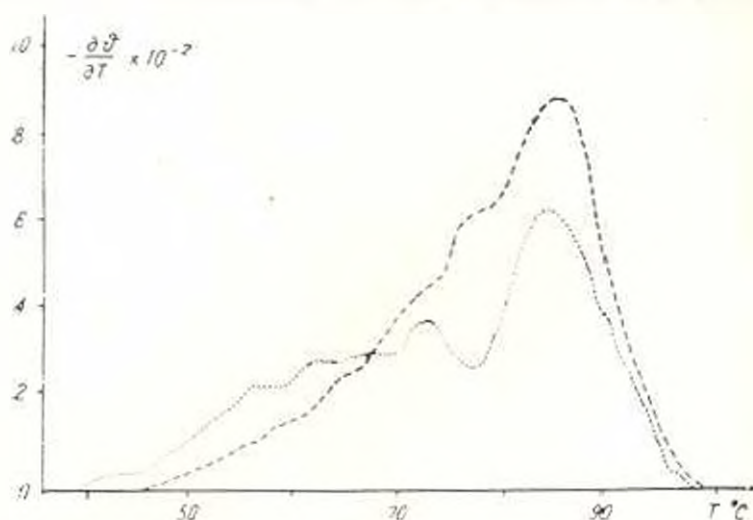


Рис. 4 ДКП X-III intactных животных (А), животных, которым вводили смесь аминокислот (В), гидрокортизон (С)

вить две основные зоны: до 75 градусов и выше. В соответствии с этим после несложных расчетов получим для контроля 45,4 и 54,7%, при индукции смесью аминокислот—55,4 и 44,6%, а гидрокортизоном—47,1 и 52,9% соответственно.



Рис. 5 Электрофореграмма негистоновых белков надкадочной жидкости, полученной после высокоскоростного центрифугирования, после удаления гисточа III: (А)—контрольных животных, (В)—животных, которым вводили смесь аминокислот, (С)—гидрокортизон.

Учитывая вышесказанное, можно допустить, что активация генома смесью аминокислот или гидрокортизоном обусловлена изменениями в составе или организации нуклеосом и (или) вымыванием при экстракции 0,6 М NaCl компонентов, каковыми кроме гисточа III являются не-

гистоновые белки. Электрофорез негистоновых белков надосадочной жидкости после удаления гистона H1 (рис. 5) показал ряд изменений в белковом спектре опытных крыс в зонах, обозначенных х, у, z, б, γ. В случае с негистоновыми белками из Х-Н1 животных, которым вводили смесь аминокислот, наблюдается исчезновение полос б и γ и появление х, у и z. При гидрокортизоновой же индукции уменьшается зона γ и появляются те же три полосы, но х менее выражена. Следует полагать, что уменьшение или исчезновение б и γ связано с дерепрессией хроматина.

Обобщая вышесказанное, отметим, что индукция, вызванная введением смеси аминокислот и гидрокортизона, в разной степени затрагивает уровни организации хроматина. Введение смеси аминокислот существенно снижает содержание гистона H1 в хроматине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вардевичян П. О. Канд. дисс. Ереван, 1983.
2. Давтян М. А., Вардевичян П. О., Тиранцян С. Г., Шбиб Г. Х. Биохимия, 52, 5, 737, 1987.
3. Караванов А. А. Биополимеры и клетка, 1, 3, 141, 1985.
4. Паносян Г. А., Тиранцян С. Г., Вардевичян П. О., Вардапетян Р. Р. Докл. АН СССР, 265, 3, 765, 1982.
5. Романов Г. А., Жаворонкова Е. Н., Савельев С. В., Ванюшин Б. Ф. Проблемы эндокринологии, 30, 6, 38, 1984.
6. Туроварова Л. В., Воробьев В. И. Молекулярная биология, 14, 2, 338, 1980.
7. Bonner J., Chalkley R., Dahmus M. et al. In: Methods in Enzymology, 12, 3, 1968.
8. Caron F., Thomas J. O. A. Mol. Biol., 146, 13, 1981.
9. Defer N., Kitzis A., Kruh J. et al. Nucl. Acid. Res., 4, 2293, 1977.
10. Dimitrov S. J., Pashev J. G., Markov G. G. Eur. J. Biochem., 115, 545, 1981.
11. Johns E. W. Biochem. J., 92, 55, 57, 1961.
12. Ishimi Y., Ohba Y., Yamada M. J. Biochem., 89, 1981.
13. King J., Laemli U. K. J. Mol. Biol., 61, 465, 1971.
14. Panosyan G. A., Vardevanyan P. O., Vardapetyan R. R., Karapetyan A. T. Studia Biophysica, 94, 3, 237, 1982.
15. Pantazis P. Preparative Biochemistry, 10, 5, 121, 1980.
16. Panyun S., Chalkley R. Arch. Biochem. & Biophys., 130, 2, 337, 1967.
17. Smerdon M. J., Lieberman M. W. The J. of Biol. Chem., 255, 2480, 1981.
18. Umansky S. R., Kovalev Y. J., Tokarskaya V. J. Biochem. Biophys. Acta, 383, 212, 1975.
19. Watanabe K., Iso K. J. Mol. Biol., 151, 113, 1981.

Поступило 26.VII 1987 г.