

12. McDaniel R., Sharp K., Erocks D., McLaughlin A. C., Winkler A. P., Cafiso D., McLaughlin S. *Biophys. J.*, **49**, 741—752, 1986.
13. Geho E. L. M., Bangham A. D. *J. Neurochem.*, **29**, 6, 1103—1195, 1976.
14. Rahmann H., Rosner H., Breer U. *J. J. Theoret. Biol.*, **57**, 231—237, 1976.
15. Seyfried T., Ando F., Yu R. K. *J. Lipid Res.*, **19**, 538—543, 1978.
16. Seyfried T. N., Yu R. K. *Mol. and Cell Biochem.*, **68**, 1, 3—10, 1985.
17. Sharp K. A., Brooks D. E. *Biophys. J.*, **41**, 563—566, 1985.
18. Tamir H., Bruner W., Casper D., Raffort M. M. *J. Neurochem.*, **34**, 6, 1719—1724, 1980.
19. Woolley D. W., Gommi B. W. *PNAS USA*, **54**, 3, 959—963, 1967.

Получено 19.VI 1987 г.

Биол. ж. Армения, т. 41, № 4, 1988

УДК 591.813:612.018

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА L-КЛЕТОК МЫШИ, ОБРАЗУЮЩЕГОСЯ НА НЕДОМЕТИЛИРОВАННОЙ ДНК

В. О. АИРАПЕТЯН, Т. А. МАНАМШЬЯН, Г. В. КИРЬЯНОВ

Московский Государственный университет им. М. В. Ломоносова,
межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии в биоорганической химии им. А. Н. Белозерского

Показано, что на недометилованной в ходе репликации ДНК формируется хроматин с аномально повышенной нуклеазочувствительностью и нарушенным межнуклеосомным взаимодействием. Эти особенности структуры сохраняются и после репликации.

Ցույց է տրվում, որ սեպիրկացիայի ընթացքում թերմեթիլացված ԳՆԿ-ի վրա համապատասխան է կոդիվածները նկատմամբ անսովոր բարձր զգայնություն ցուցաբերող քրոմատին, որում բախտված է ներնուկլեոսոմալին փոխազդեցությունները: Գրանցանքի կատարվածության շրջանում նախնական հատկությունները պահպանվում են նաև սեպիրկացիայից հետո:

The chromatin assembled on DNA, undermethylated during replication, is demonstrated to have an abnormally high sensitivity to nucleases. These peculiarities are still maintained after replication.

Хроматин—5-азациитидин—метилирование ДНК.

В последние десятилетие получены многочисленные экспериментальные свидетельства вовлеченности энзиматического метилирования ДНК эукариотических клеток в процессы регуляции экспрессии генов. На примере ряда генов показано, что недометилованность отдельных сайтов гена, прежде всего в 5-области, является необходимым условием экспрессии гена [1]. Характер метилирования тотальной ДНК клетки и определенных последовательностей генома моделируется в онтогенезе, обладает выраженной тканевой и клеточной специфичностью. Главным, хотя, вероятно, и не единственным, механизмом изменения характера метилирования ДНК является модуляция уровня метилирования

Сокращения: 5-аза-С—5-азациитидин

потенциально узнаваемых ДНК-метилазами сайтов модификации в ходе репликации ДНК [8]. Ясно, что в процессе направленного изменения характера метилирования отдельных генов должны принимать участие какие-то факторы, регулирующие сам процесс метилирования. К сожалению, сегодня о таких механизмах можно говорить только как о гипотетических. В то же время возможно экспериментально изменить (снизить) уровень метилирования ДНК в клетке, используя такой ингибитор метилирования, как 5-аза-С. Этот аналог цитидина включается в ДНК в виде трифосфата обычного СТР, но не способен метилироваться. Кроме того, в процессе репликации ДНК образуется стабильный комплекс ДНК-метилазы с 5-аза-С-содержащей ДНК, что еще больше снижает уровень метилирования ДНК [8]. Включение 5-аза-С в ДНК приводит к активизации экспрессии многих генов [11]. Показано, что вызванное 5-аза-С недометилирование ДНК определенных генов является не директивным сигналом для экспрессии, а детерминирующим фактором. Иными словами, недометилирование гена в некоторых сайтах определяет переход его на неактивного состояния и активированное состояние «готовности» к экспрессии [1].

Невыясненным остается вопрос о реализации особенностей метилирования ДНК определенного гена, механизмах сопряжения характера метилирования ДНК и экспрессии гена. Ранее нами было высказано предположение, что посредником в этом сопряжении может быть модуляция структуры хроматина таким образом, что локальные изменения метилирования ДНК приводит к локальным или генерализованным изменениям структуры хроматина. В настоящей статье приводятся результаты исследования структуры хроматина, формирующегося на недометилированной ДНК, синтезированной в клетках мыши в присутствии 5-аза-С.

Материал и методы. L-клетки фибробласты мыши выращивали на поверхности стеклянных флаконов на питательной среде, состоящей из среды 199, (45%) 0,5%-ного гидролизата лактальбумина, (45%) сыворотки крупного рогатого скота с добавлением 100 ед./мл пенициллина и 0,2 мкг/мл стрептомицина (10%). Культуру выращивали до средней плотности ($3 \cdot 10^5$ кл./см²).

В экспериментах с включением радиоактивного изотопа клетки инкубировали с метил-³H-тиминидином ($5-10$ мкКи/мл) с удельной радиоактивностью 154 Ки/мм (СССР) или 21,4 Ки/мм (ЧССР).

В инкубационную среду добавляли также ингибитор метилирования 5-аза-С в концентрации 20 мМ на 4-6 часов. Ядра L-клеток выделяли, как описано ранее [6].

Хроматин и состав ядер гидролизуют микрококковой нуклеазой («Boehringer», ФРГ) в растворе, содержащем 20 мМ трие-НСl (рН 7,4), 0,5 мМ MgCl₂, 0,5 CaCl₂. Инкубацию проводили в течение 10 мин при 37° с разными количествами фермента. Реакцию останавливали быстрым охлаждением до 0° при одновременном добавлении ЭДТА до конечной концентрации 1 мМ. Далее хроматин суспендировали с помощью ультразвука (дезинтегратор MSE, Англия) 15 с при максимальной мощности и центрифугировали при 1500 г в течение 10 мин. В супернатанте определяли долю экстрагируемой и растворимой фракций гидролизата хроматина (св ДНК) [6]. Радиоактивность определяли в диоксановом единичном детекторе на жидкостном счетчике типа Mark-III («Tracor» Егора, Нидерланды). Эффективность измерения (³H) в данной системе составляла 15-30%.

Электрофорез частиц хроматина проводили в трубках в 5% ПААГ [6]. Гели после электрофореза окрашивали в течение 15 мин 0,1%-ным Кумасси R-250 («Serva», ФРГ) в смеси метанол—вода—ледяная уксусная кислота (45:45:10). Невязавшийся краситель отмывали 7%-ной уксусной кислотой. Гели сканировали на спектрофотометре (Hitord-250 (Франция), затем замораживали, разрезали на диски по 0,2 см и после растворения в 1 мл H_2O_2 с 1%-ным NH_3 при 60° в течение ночи определяли их радиоактивность. Смесь нейтрализовали 0,1 М HCl (10—30 мМ), добавляя к ней 10 мл диоксанового сцинтиллятора и определяли радиоактивность, как описано выше.

Результаты и обсуждение. Для выявления возможных изменений в структуре хроматина, формирующегося на недометилированной ДНК, L-клетки инкубировали в присутствии 5-аза-С в концентрации 20 мкМ. Клетки, растущие со «средней» плотностью, в слое активно делятся, так что при инкубации в течение 4—6 ч с 3H -тимидином и 20 мкМ 5-аза-С около 50—80% клеток радиоактивно мечены и, следовательно, включают 5-аза-С в ДНК. При такой длительности инкубации преобладающая часть меченой ДНК выходит из вилки репликации, и хроматин, сформированный на ней, уже лишен тех транзиторных свойств, которыми характеризуется вновь образованный хроматин. Таким образом, при такой постановке опыта особенности структуры хроматина, если таковые будут обнаружены, определяются уже только включением 5-аза-С и недометилированным ДНК, входящей в его состав. Одним из общепотребительных тестов на состояние хроматина является его нуклеазочувствительность. Повышенной нуклеазочувствительностью, как известно, обладает хроматин в вилке репликации в течение нескольких минут после завершения синтеза данной последовательности ДНК [7], а также хроматин активно транскрибируемых генов [6, 9].

Кривая гидролиза ДНК в хроматине микрококковой нуклеазой (рис. 1) показывает, что хроматин, сформированный при инкубации клеток в присутствии 5-аза-С (кривая 1—по радиоактивности), значительно более нуклеазочувствителен, чем суммарный хроматин (кривая 2—по ультрафиолету) в этих же клетках. Различия в доступности, оцениваемые по выходу в процессе гидролиза растворимой фракции, т. е. по степени нуклеазной солиubilизации хроматина, а также по выходу кислоторастворимой фракции, т. е. по глубине гидролиза, выявляются при всех избранных соотношениях ДНК и фермента. Как начальная скорость расщепления ДНК (5-аза-С-содержащей хроматин), так и глубина расщепления в среднем в 1,5—3 раза выше, чем в контроле (суммарный хроматин).

Такие значительные различия в доступности ДНК в составе хроматина, количественно близкие таковым в степени доступности для нуклеазы между суммарным хроматином и хроматином репликации [4], должны соответствовать существенным различиям в структурной организации хроматина.

Информативным в этом плане является анализ продуктов расщепления хроматина при их фракционировании электрофорезом в геле. На рис. 2 представлены электрофореграммы частиц хроматина солиubilизируемых при нуклеазной обработке ядер. Ранее нами было показано, что хроматин ядер, выделенных в присутствии тритона X-100, фрагментируется преимущественно с выщеплением динуклеосом, из которых самой представительной является хромосома—частица с длиной ДНК 320 пар оснований, а также одна из моонуклеосом с длиной ДНК 170 пар оснований [5]. Анализ набора выщепляемых частиц, дина-

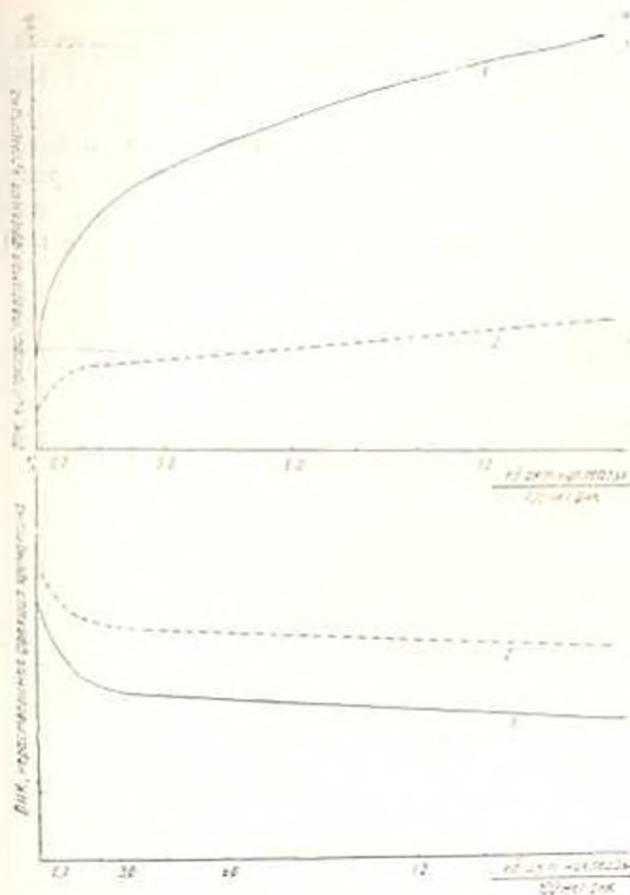


Рис. 1. Гидролиз микросомной нуклеазой хроматина алеток, инкубированных с 5-азациитидином в течение 6 ч. а. выход кислоторастворимой фракцией б. солюбилизация хроматина (увеличение нерастворимой фракции). 1—кривая по радиоактивности ^3H тимидина. 2—кривая по УФ определению.

мики нуклеазного гидролиза и белкового состава частиц хроматина привел к заключению о том, что динуклеосомный характер расщепления (дихроматосомный) отражает специфическое межнуклеосомное взаимодействие в наднуклеосомной фибрилле. Одной из ярко выраженных особенностей гидролиза хроматина ядер, выделенных в присутствии тритона X-100, является отсутствие в наборе субчастиц кор-частицы даже при достаточно жестких условиях гидролиза. Набор частиц, выделяемых из хроматина, сформированного в клетках, инкубированных в присутствии 5-аза-С (6 ч), резко отличается от описанного выше. В условиях достаточно мягкого гидролиза преимущественная часть тотального хроматина (рис. 2, кр. 1) фрагментируется на крупные блоки, соответствующие фрагментам нуклеосомной цепи из 4 и более нуклеосом, а ди- и мононуклеосомы представляют собой минорную фракцию. В то же время весь хроматин, сформированный на метилированной ДНК расщепляется главным образом до мононуклеосом (рис. 2, табл. 1). Аналогично этому, хроматин, сформированный на ДНК клеток, инкубированных в присутствии 5-аза-С в течение 24 ч, т. е. в условиях, когда в клетках, включивших 5-аза-С в ДНК, завершена S-фаза, характеризуется такой же степенью доступности для нуклеазы и таким же характером фрагментации. В обоих случаях обращает на се-

бя внимание факт наличия довольно большого количества материала с подвижностью, соответствующей коровой частице, а также субкоровых фрагментов.

Все это позволяет заключить, что повышенная нуклеазная чувствительность хроматина, синтезированного в клетках в присутствии 5-аза-С, обусловлена как нарушением межнуклеосомных взаимодействий, так и, возможно, большей степенью экспонированности ДНК в самой коровице хромосом.

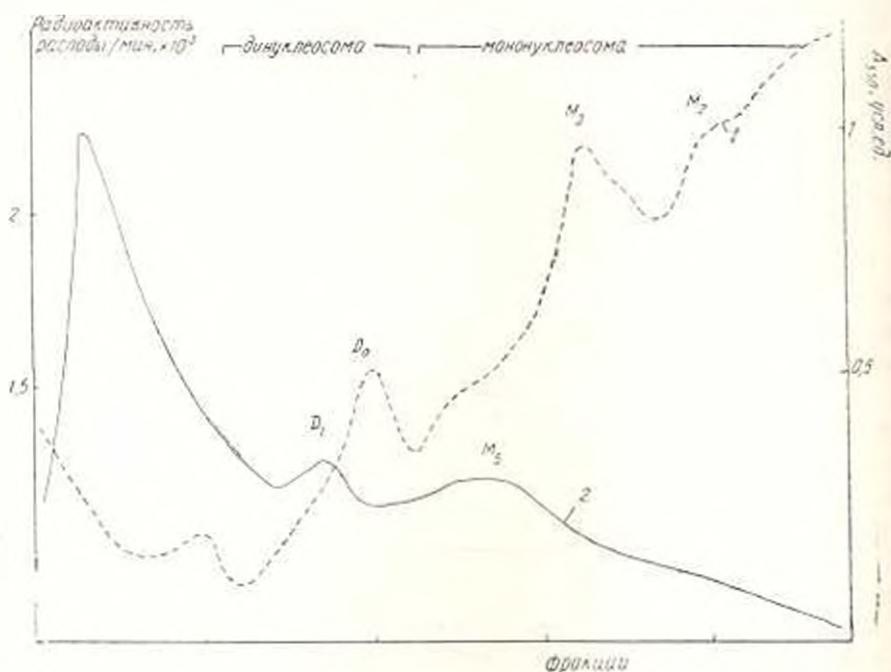


Рис. 2. Электрофореграмма фракций растворимого хроматина, полученной нуклеазным гидролизом ядер клеток, инкубированных с 5-азацитидином в течение 6 ч. 1—радиоактивность; 2—окраска «Кумасси-250».

Оставляя пока в стороне вопрос о причинах изменений структуры хроматина, наблюдающихся в опыте, рассмотрим более подробно модель опыта. Как известно, эффект недометилирования ДНК и активации транскрипции наблюдается, как правило, через два цикла репликации ДНК, т. е. по достижении состояния полной недометилированности сайта (ранее метилированного) в обеих нитях дуплекса ДНК [11]. Мы поставили задачу изучить те изменения структуры хроматина, которые возникают одновременно с включением 5-аза-С и ДНК и, следовательно, с возникновением полуметилированного сайта. Нельзя исключить, что эти изменения могут быть транзиторными и не поддерживаются в хроматине в дальнейшем, после завершения первого этапа репликации ДНК. Для оценки этой возможности мы анализировали структуру хроматина в клетках в условиях чейз-эксперимента (смена среды) спустя 24 и 48 ч после инкубации клеток с 5-аза-С.

В табл. 1 приведены результаты анализа нуклеазочувствительности хроматина в таких условиях. Видно, что различия в доступности ДНК

для гидролиза, хотя и уменьшаются, но остаются существенными. В целом, уровень доступности недеметилированной ДНК и хроматин клеток после 24—48 ч роста на нормальной среде в 1,5—1,8 раза выше, чем для тотального хроматина клеток этой же культуры, и то время как аналогичные значения для хроматина клеток, инкубированных с 5-аза-С в течение 24 ч, составляют 1,6—2,5 (табл. 1). При анализе электрофореграмм растворимой фракции хроматина видно, что и спустя 24 и 48 ч после переноса клеток в среду без 5-аза-С сохраняются резкие различия в наборе субчастиц хроматина, выщепляемых при нуклеазном гидролизе. В то время как тотальный хроматин (рис. 3, кр. по окраске) расщепляется на крупные блоки, соответствующие частицам крупнее, чем моно- и динуклеосома (большая часть материала локали-

Таблица 1. Относительная доступность к нуклеазе хроматина с 5-аза-С замещенной ДНК (радиоактивность) и суммарного хроматина (УФ определение) в разных условиях гидролиза

Условия инкубации	³ H-радиоактивность ДНК растворимой фракции УФ ДНК растворимой фракции		
	мягкий гидролиз	средний гидролиз	жесткий гидролиз
24 ч 5-аза-С	1.6	1.8	2.5
24 ч 5-аза-С + 48 ч отмывки	1.3	1.3	1.8

зована на старте геля). хроматин, сформированный в клетках, инкубированных с 5-аза-С, расщепляется на моно- и динуклеосомы. Хроматин из клеток, инкубированных с 5-аза-С 24 ч. (рис. 3), представлен в геле главным образом мононуклеосомной фракцией, которая составляет от 80 до 90% всего материала (табл. 2), при этом доля кор-частиц и субкоровых фрагментов варьирует в зависимости от глубины гидролиза в пределах 50—80%. Инкубирование таких клеток после смены среды несколько стабилизирует структуру хроматина. Так, через 24 ч после смены среды доля мононуклеосом составляет 60—80%, а кор-частиц и субкоровых фрагментов—25—60%. Близки к этим данным и результаты анализа хроматина клеток после 48 ч чейз-эксперимента. После смены среды в клетках наблюдается также некоторая стабилизация мононуклеосом, уменьшается доля субкоровых фрагментов, более четко выделяется кор-частица, увеличивается представительность других типов мононуклеосом, в частности, наблюдается появление хромосом. В зоне динуклеосом, однако, практически единственной выделяемой частицей является Д0, которая соответствует безопейсерности динуклеосоме как было определено нами ранее [5]. Только в клетках, инкубированных в течение 48 ч после удаления 5-аза-С из среды инкубации, в зоне динуклеосом нуклеазного гидролизата выявляется типичная динуклеосома—Д1.

Таким образом, основные особенности структуры хроматина, возникшие в ходе репликации ДНК в клетках в присутствии 5-аза-С, со-

храняются и после завершения первого цикла репликации ДНК, а также после прохождения клеткой второй S-фазы.

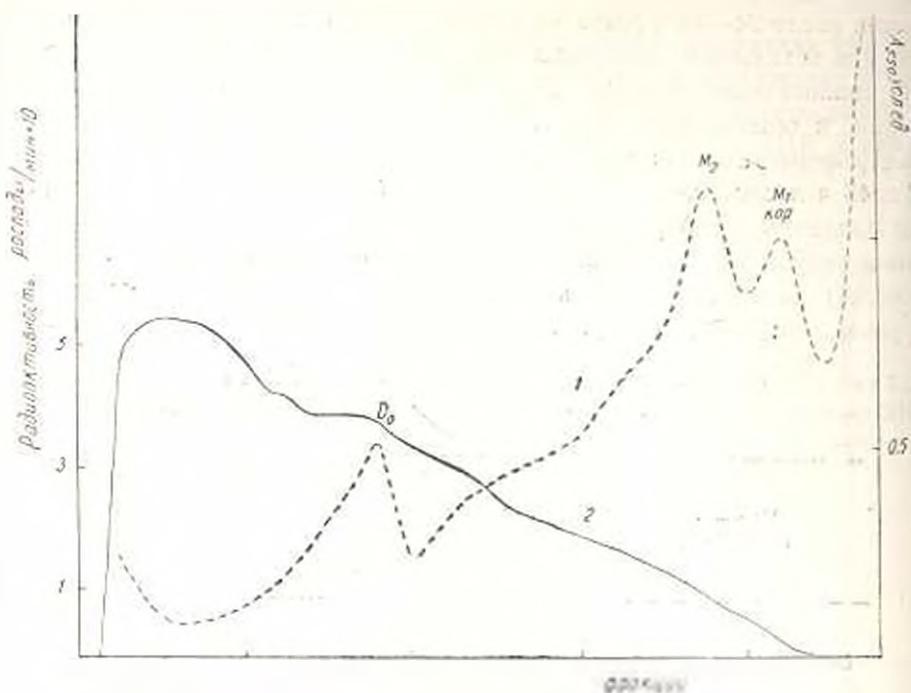


Рис. 3. Электрофоретическая картина фракции растворимого хроматина, полученной нуклеазным гидролизом ядер клеток, инкубированных с 5-азацианом 24 ч + 24 ч после смены среды: 1 — радиоактивность; 2 — окраска «Кумасси-250».

Таблица 2. Глубина гидролиза микрококковой нуклеазой хроматина клеток, инкубированных с 5-аза-С в разных условиях

Условия инкубации клеток	Условия гидролиза			Относительная доля ч-астиц во фракции растворимого хроматина, %
	мягкой	средней	жесткой	
24 ч 5-аза-С	17	21	7	Динуклеоомы Мононуклеоомы Короткие участки в сульфидной фракции (К+СК)
	54	62	82	
24 ч 5-аза-С + 24 ч смены среды	35	27	16	ДНС МНС К+СК
	47	29	31	
	55	48	51	
24 ч 5-аза-С + 48 ч смены среды	34	26	31	ДНС МНС К+СК
	21	33	14	
	56	51	53	

Выявленные особенности структуры хроматина, сформированного в клетках, инкубированных с 5-аза-С, в принципе, близки тем, которыми характеризуется хроматин активно экспрессируемых генов. Декомпактизация хроматина, снятие динуклеосомной структуры являются, по-видимому, обязательным условием его перехода из неактивного со-

стояния в активное. Результаты настоящей работы позволяют сделать вывод, что структурный переход хроматина в активированное состояние может определяться в ходе его сборки на синтезирующейся клетке цедометилированной ДНК. Исследование белкового состава хроматина, сфермированного на цедометилированной ДНК, может пролить свет на причины аномалий в его структуре.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурьянов Я. И., Кирьянов Г. И. Итоги науки и техники, серия «Молекулярная биология», М., 23, 1987.
2. Вайонин Б. Ф. Успехи совр. биологии, 77, 68—90, 1974.
3. Кирьянов Г. И., Смирнова Т. А., Исеева Л. В., Вайонин Б. Ф., Бурьянов Я. И. Биохимия, 46, 1487—1495, 1991.
4. Кирьянов Г. И., Смирнова Т. А., Манамиян Т. А., Ходосовская А. М. Биохимия, 52, 11, 1855—1865, 1987.
5. Кирьянов Г. И., Смирнова Т. А., Манамиян Т. А., Ходосовская А. М. Биохимия, 52, 12, 983—990, 1987.
6. Ходосовская А. М., Исеева Л. В., Смирнова Т. А., Манамиян Т. А., Кирьянов Г. И., Вайонин Б. Ф. Изв. АН СССР, сер. биол., 268—273, М., 1986.
7. Hildebrand C. E., Walters R. A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 72, 1, 3—14, 1976.
8. Jones P. A., Taylor S. M. Nucl. Acids Res., 9, 2941—2947, 1981.
9. Kuo M., Mandel J., Chambon P. Nucl. Acids Res., 7, 2107—2111, 1979.
10. Mandel J. L., Chambon P. Nucl. Acids Res., 7, 2081—2103, 1979.
11. Taylor U., Guntaru P. V., Erlanger B. F., Miller O. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 78, 487—493, 1981.

Получено 3.II 1988 г.

ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ МЕДИ (II) С ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТОЙ МЕТОДОМ ЭПР

Р. А. АСАТУРЯН

Ереванский физический институт ГКАЭ СССР, лаборатория радиационной биофизики

Методом ЭПР изучали комплексобразование между медью (II) и глутаминовой кислотой в связи с известной по данным литературы противоположной активностью их на штаммах саркомы S-37 животных. В зависимости от pH выделены и идентифицированы три типа комплексов, два из которых лабильны, а третий стабилен при нейтральных и щелочных значениях pH. Противоположной активностью могут обладать и основным комплексы типа III. Высказывается предположение, что применение метода EXAFS спектроскопии при изучении структуры этих комплексов позволит непосредственно наблюдать эффект Яна-Теллера.

ԷՊՐ-ի մեթոդով ուսումնասիրվել է պղնձի (II) և գլուտամինաթթվի կոմպլեքսագոյացումը, որը համաձայն գրականության տվյալների, ցուցաբերում է հակառակ ուղղության ակտիվություն սարկոմա S-37 շտամով ուռուցքակիր կենդանիների համար:

pH-ից կախված սեղանով է որոշվել նաև կոմպլեքսների էներգետիկ, որակ-ցիկ էրկաթը շարժունակ էն, իսկ երրորդը կալուն է՝ pH-ի շեղք և հիմնային արժեքների շեղքում: