

ОТСУТСТВИЕ НУКЛЕОСОМ И ПОЛНОЕ УДАЛЕНИЕ ГИСТОНОВ В ПОЛИ (А) ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ ХРОМАТИНА *DROSOPHILA MELANOGASTER*

А.Р. ДЖЕРБАШЬЯН

Институт молекулярной биологии НАН РА, 375014, Ереван

Изучали структуру хроматина и содержание гистонов поли (А) последовательностей эмбрионов *Drosophila melanogaster*. Использовали методы анализа стафилококковой нуклеазы, ДНК-азы I и метод *in situ* ковалентной пришивки гистонов к ДНК диметилсульфатом. Выявлено отсутствие нуклеосом и десяти пар нуклеотидных повторов в поли (А) последовательностях хроматина. Гистоновые белки полностью удалены и не пришиваются в поли (А) последовательностях хроматина. Предполагается, что поли (А) последовательности играют регуляторную функцию при транскрипции.

Հետազոտվել են *Drosophila melanogaster* էմբրիոնների բրոնմատինի կառույցը և հիսթոնների առկայությունը պոլի (Ա) հաջորդականություններում: Օգտագործվել են ստաֆիլոկոկային նուկլեազային, ԴՆԹ-ազա I մշակման և *in situ* ԴՆԹ-հիսթոնների դիմեթիլսուլֆատով կովալենտ կապման մեթոդները: Ստացված տվյալները ցույց են տվել, որ պոլի (Ա) հաջորդականություններում բացակայում են նուկլեոսոմները և 10 զույգ նուկլեոտիդային ԴՆԹ սանդղակը: Հիսթոնային սպիտակուցները ամբողջությամբ հեռացված են և չեն կարվում բրոնմատինի պոլի (Ա) հաջորդականություններում: Ենթադրվում է, որ պոլի (Ա) հաջորդականությունները ունեն տրանսկրիպցիայում կարգավորիչ դեր:

Drosophila melanogaster poly (A) chromatin structure and histones content of embryos poly (A) sequences using the methods of staphylococcal nuclease, DNAase I and DNA-histones *in situ* covalent cross-linking by dimethylsulfate have been investigated. The absence of nucleosomes and 10 pairs of nucleotides replays in poly (A) chromatin has been revealed and histones molecules are completely removed. The chromatin poly (A) sequences presumably play regulatory role in transcription.

Хроматин - гистоны - нуклеосомы - поли (А) ДНК

В литературе описаны различные структурные изменения хроматина нуклеосом при транскрипции: разрушение нуклеосом [12, 13], деление их на две половинки [20], образование необычных по размеру [24], разрезание [15], перераспределение [10], утрата (Н2А-Н2В) димеров [5], избирательное удаление молекул гистонов H1 [7].

Имеются также данные, показывающие отсутствие структурных изменений хроматина нуклеосом при транскрипции [16].

В наших исследованиях мы показали различное содержание гистонов в функционально различных участках рибосомного гена *Drosophila melanogaster* [1], используя разработанный нами метод *in situ* ковалентной пришивки ядерных белков к ДНК [19] и наличие специфических негистоновых белков [6].

Специфические негистоновые белки модулируют, разрушают нуклеосомную структуру хроматина при высоких уровнях транскрипции [8, 22]. Это обеспечивает доступ к ДНК молекул РНК полимераз и регуляторных факторов транскрипции [23].

Наши недавние результаты показали разрушение нуклеосом при высоких уровнях транскрипции протоонкогена рецептора эпидермального фактора роста и гена инсулина человека [2, 3].

Исходя из этого, мы предполагаем, что структурные изменения хроматина при высоких уровнях транскрипции бывают разных типов в разных генах, и, по-видимому, зависят от особенностей регуляции транскрипции данного гена.

В данной работе мы изучали структуру хроматина поли (А) последовательностей эмбрионов *D. melanogaster*, используя стафилококковый нуклеазный и ДНК-аза I анализы и блот-гибридизацию.

Методом *in situ* ковалентной пришивки гистонов к ДНК и блот – гибридной изацией изучено также количественное содержание гистонов в поли (А) последовательностях хроматина эмбрионов *D. melanogaster*.

Показано, что в поли (А) последовательностях хроматина эмбрионов *D. melanogaster* отсутствуют нуклеосомы, и гистоны полностью удалены.

Материал и методика. В работе были использованы трисоксиметиламинометан, фенолметансульфонилфлуорид (PMSF) фирмы Sigma, агароза фирмы Bio-Rad, стафилококковая нуклеаза и ДНК-аза I фирмы Serva, нейлоновые фильтры Nuhond фирмы Amersham, нитроцеллюлозные фильтры фирмы Sigma.

Эмбрионы *D. melanogaster* были выращены в течение 16-18 ч как описано в [11].

Выделение очищенных ядер, обработку ядер стафилококковой нуклеазой и выделение фрагментов ДНК проводили по описанному ранее методу [2].

Обработку очищенных ядер ДНК-азой I проводили в растворе 20 мМ трис HCl pH 7.4, 3 мМ MgCl₂, 2 мМ CaCl₂, добавляя ДНК-азу I в концентрации 10 мкг/мг ДНК ядер. Реакцию останавливали добавлением Na-ЭДТА до конечной концентрации 25 мМ и Na-додецилсульфат до конечной концентрации 0.5%.

Ковалентную *in situ* пришивку гистонов к ДНК диметилсульфатом, двумерный электрофорез пришитого хроматина и электроперенос проводили по [1]. Введение метки ³²P в плазмидную ДНК проводили методом ник-трансляции [17], Соутерн блот - по методу [21], гибридную изацию - по методу [9].

Агарозный электрофорез ставили по системе трис-борат (pH 8.0) [4], полиакриламидный гель электрофорез ДНК по методу [18].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены результаты последовательных гибридных изаций электрофоретически разделенных фрагментов ДНК после стафилококкового нуклеазного перевара очищенных ядер эмбрионов *D. melanogaster* с нетранскрибируемой вставкой II типа рибосомного гена *D. melanogaster*, рис. 1 (А), и с поли (Т), рис. 1 (Б). Как видно, гибридная изация с нетранскрибируемой вставкой II типа рибосомного гена дает обычный нуклеосомный повтор. При гибридной изации с поли (Т) картина смазанная и нуклеосомный повтор отсутствует.

На рис. 2 приведены результаты последовательных гибридных изаций электрофоретически разделенных ДНК фрагментов после перевара очищенных ядер эмбрионов *D. melanogaster* с ДНК-азой I, с нетранскрибируемой вставкой II типа рибосомного гена *D. melanogaster* рис. 2 (А), и с поли (Т), рис. 2 (Б).

Гибридная изация с нетранскрибируемой вставкой II типа рибосомного гена *D. melanogaster* выявляет обычный 10 парнуклеотидный повтор, тогда как при гибридной изации с поли (Т) 10 этот повтор отсутствует.

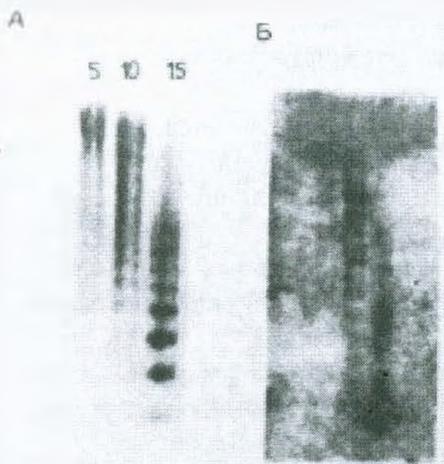


Рис. 1. Микрококково-нуклеазное переваривание ядер эмбрионов *D. melanogaster*, электрофоретическое разделение ДНК, перенос и последовательная гибридная с А - нетранскрибируемой вставкой II типа рибосомного гена и с Б - поли (Т). Сверху цифрами отмечено время перевара в минутах.

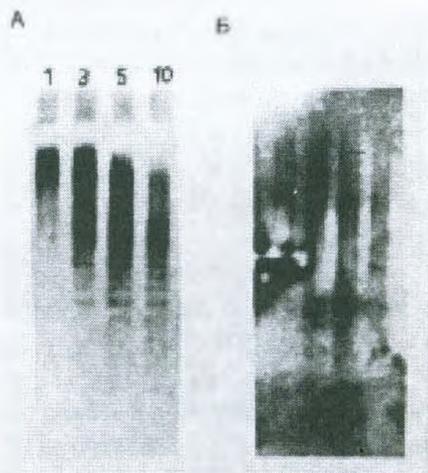


Рис. 2. Переваривание ядер эмбрионов *D. melanogaster* ДНК-азой I, электрофорез ДНК, перенос и последовательная гибридная с А - нетранскрибируемой вставкой II типа рибосомного гена и БС-поли (Т). Сверху цифрами обозначено время перевара в минутах.

Остается ли какая-то часть гистонов в поли (А) блоках хроматина при разрушении нуклеосом или они полностью удаляются из вышеуказанных последовательностей? Для решения этого вопроса была поставлена *in situ* ковалентная пришивка гистонов к ДНК в ядрах диметилсульфатом. Кор гистоновые и гистон Н1 ДНК диагонали были разделены двумерным полиакриламидным гель-электрофорезом и последовательно блот-гибридизированы с нетранскрибирующей вставкой II типа рибосомного гена *D. melanogaster* и с поли (Т). Как видно на рис. 3А, гибридная с нетранскрибируемой вставкой II типа дает полный набор гистонов, (диагональ кор гистонов-2, диагональ гистона Н1-3, вместе с диагональю свободной ДНК (диагональ 1). При гибридной с поли (Т) не выявляются диагонали кор гистонов и гистона Н1, а выявляется

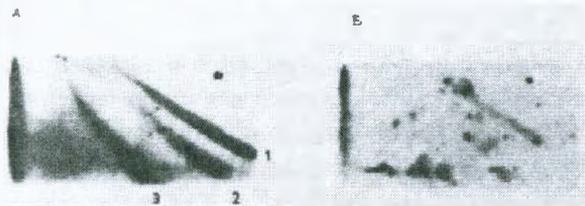


Рис. 3. Ковалентная пришивка гистонов к ДНК, двумерный полиакриламидный гель-электрофорез, электроперенос и последовательная гибридная с А - нетранскрибируемой вставкой II типа рибосомного гена и Б с поли (Т). 1 - диагональ свободной ДНК, 2 - диагональ коровых гистонов, 3- диагональ гистона Н1.

только диагональ свободной ДНК, рис. 3Б (диагональ 1).

Таким образом, при разрушении нуклеосом в поли (А) блоках в хроматине не остаются какие-то количества гистоновых белков, они полностью удаляются. Эти данные показывают, что в поли (А) последовательностях хроматина эмбрионов *D. melanogaster* отсутствуют нуклеосомы и гистоны не пришиваются. Так, известно, что поли (dA) poly (dT) последовательности не образуют нуклеосомы при *in vitro* реконструкции нуклеосом [14]. По-

видимому, сферические особенности поли (А) последовательностей препятствуют образованию нуклеосомных структур. Можно предположить, что поли (А) последовательности в хроматине имеют при транскрипции регуляторную функцию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Джербашьян А.Р., Вашакидзе Р.П., Карпов В.Л., Колчинский А.М., Мирзабеков А.Д. Мол. биол., 22, вып.1, 231-241, 1988.
2. Джербашьян А.Р., Захарян Р.А., Манукян К.Л., Арутюнян К.Г., Казарян Н.П. Биолог. журн. Армении 50, 3-4, 65-69, 1997.
3. Джербашьян А.Р., Захарян Р.А., Арутюнян К.Г., Манукян К.Л., Казарян Н.П. Биолог. журн. Армении 49, 1-2, 115-118, 1996.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Д.Ж. Методы генетической инженерии. М., 1984.
5. Baer B.W., Rhodes D. Nature 301, 482-488, 1983.
6. Belikov S.V., Dzherbashyan A.R., Preobrazhenskaya O.V., Karpov V.L., Mirzabekov A.D. FEBS Lett. 273, 205-207, 1990.
7. Bresnick B.H., Bustin M., Marsaud V., Richard-Foy H., Hager G.L. Nucl. Acids Res. 20, 273-278, 1992.
8. Chasman D.I., Lue N.F., Buchman A.R., LaPointe J.W., Lorch Y., Kornberg R.D. Genes & Dev. 4, 503-514, 1990.
9. Church G.M., Gilbert W. Pror. Natl. Acad. Sci. USA, v. 81, p. 1991-1995, 1984.
10. Clark D.J., Felsenfeld G. Cell 71, 11-22, 1992.
11. Elgin S.C.R., Miller D.W. In "The genetics and biology of Drosophila" M. Ashburner, T. Wright, eds. (Academic Press, New York), v. 2A, p. 112-121, 1978.
12. Franke W.W., Scheer U., Trendelenburg M.F., Spring H., Zentgraf H. Cytobiologie 13, 401-434, 1976.
13. Gallego F., Fernandez-Busquets X., Daban J.-R. Biochemistry 34, 6711-6719, 1995.
14. Kunkel G.R., Martinson H.G. Nucleic Acids Res. 9, 6869-6888, 1981.
15. Lee M.-S., Garrard W.T. EMBO J. 10, 607-615, 1991.
16. Losa R., Brown D.D. Cell 50, 801-808, 1987.
17. Maniatis Y., Jeffrey A., Kleid O. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1184-1189, 1985.
18. Maxam A.M., Gilbert W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 74, p. 560-564, 1977.
19. Mirzabekov A.D., Karpov V.L., Preobrazhenskaya O.V., Bavikyn S. G., Dzherbashyan A.R., Shick V.V., Belyavsky A.V. Current Trends in Life Sciences XII, 1-7, 1983.
20. Prior C.P., Cantor C.R., Johnson E.M., Littau V.C., Allfrey V.G. Cell 34, 1033-1042, 1983.
21. Southern E.M. Y. Mol. Biol. 98, 503-517, 1975.
22. Tsukiyama T., Becker P.B. & Wu C. Nature 367, 525-532, 1994.
23. Tumber T., Sudlow G., Belmont A.S. J. Cell. Biol. 145, 1341-1354, 1999.
24. Xu M., Barnard M.B., Roso S.M., Cockerill P.N., Huang S.-Y., Garrard W.T. J. Biol. Chem. 261, 3838-3846, 1986.

Поступила 24.IX.1999