

УДК 581.19

В. Г. КОНАРЕВ, В. В. СИДОРОВА, И. П. ГАВРИЛЮК

ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ГИСТОНОВ РАСТЕНИЙ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 5 III 1970)

До последнего времени было распространено мнение о том, что гистоны неспецифичны и что различия между гистонами разного происхождения заключаются главным образом в количественном соотношении общих для всех организмов фракций (¹⁻⁴). Лишь недавно появились сообщения об органоспецифичных гистоновых компонентах, а также о наличии у отдельных гистоновых компонентов иммунохимической специфичности (⁵⁻⁹). Неудачи в попытках ряда исследователей выявить иммунохимическую специфичность у гистонов мы объясняем тем, что для иммунизации животных обычно использовались препараты гистонов, получаемые кислотной экстракцией. Такие гистоны несомненно модифицированы в сравнении с нативными и подвержены энзиматической деградации в процессе иммунизации. По этой причине их антигенная активность как правило ослабляется, а иммунохимическая специфичность практически сводится к нулю.

Для получения антител на гистоны и другие компоненты хромосом мы используем нуклеогистоны (ДНП) и суммарный хроматин, где белки нативны и защищены от денатурации и деградирующих факторов. Для проявления детерминантных групп белков — антигенов, заключенных в сложные надмолекулярные комплексы, хроматин, используемый для иммунизации животного, диспергируется в растворах высокой ионной силы (^{10, 11}). Таким путем нами были идентифицированы в хроматине основные белковые компоненты и их комплексы — гистоны, негистоновые белки, липопротеиды и рибонуклеопротеиды (РНП). Было установлено, что тотальные препараты ДНП из тканей содержат по меньшей мере 4 гистоновых антигена, негистоновые белки и РНП. По спектру преципитации ДНП оказался идентичным «стабильной» фракции хроматина, выделяемой из суммарного хроматина раствором 2 M NaCl после удаления лабильной фракции раствором 0,14 M NaCl. Сравнительный иммунохимический анализ ДНП разных органов гороха сыворотками на нативный и диспергированный суммарный хроматин двухдневных проростков показал, что из четырех выявленных гистоновых компонентов по меньшей мере два являются органоспецифичными (¹²). В этой связи несомненный интерес представляет вопрос о степени иммунохимической специфичности гистонов ДНП разного происхождения.

Для получения антител на гистоны и сопутствующие им компоненты кролики иммунизировались суспендированным (в физиологическом растворе) и диспергированным (в 2 M NaCl) хроматином двухдневных проростков гороха обыкновенного (*Pisum sativum*) и пшеницы (*Triticum aestivum*) по схеме, описанной ранее (^{13, 14}). Хроматин выделялся по Боннеру и схемам, разработанным в нашей лаборатории (¹⁵). ДНП для сравнительного анализа выделялся солевой экстракцией из двухдневных проростков разных представителей семейства бобовых, пшеницы и ячменя.

Гомологичные сыворотки в ДНП гороха и пшеницы выявляют четыре гистоновых компонента, один компонент, идентифицированный как РНП, и несколько негистоновых белковых компонентов (рис. 1). В перекрест-

ных реакциях эти сыворотки выявляют только один общий для ДНП гороха и ДНП пшеницы гистоновый компонент. Другими словами, сыворотка на хроматин гороха в ДНП пшеницы выявляет один гистоновый компонент из четырех имеющихся, точно так же как сыворотка на хроматин пшеницы выявляет один гистоновый компонент в ДНП гороха вместо четырех, имеющихся в нем. Остальные гистоны являются специфичными и могут быть обнаружены только «своей», т. е. гомологичной сывороткой. Наличие у гороха и пшеницы общего и специфичных гистонов хорошо проявляется при постановке реакции двойной диффузии «крестом» (рис. 1). Здесь общему гистону сопутствует пока не идентифицированный неспецифический РНП-компонент.

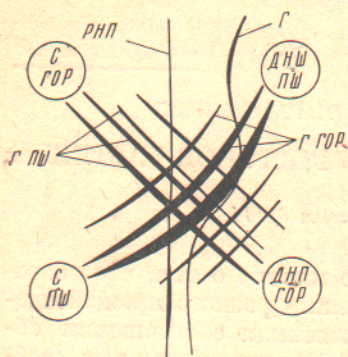


Рис. 1. Спектры преципитации ДНП гороха и пшеницы в реакции двойной диффузии «крестом». С пш — сыворотка на диспергированный хроматин проростков пшеницы; С гор — сыворотка на диспергированный хроматин проростков гороха; Г пш — гистоны пшеницы; Г гор — гистоны гороха; Г — общий, неспецифический гистон

С сывороткой к диспергированному хроматину двухдневных проростков гороха были проведены гомологичная (ДНП *Pisum sativum*) и гетерологичные реакции с ДНП двухдневных проростков следующих представителей: горох абиссинский (*P. abissinicum*), чина (*Lathyrus sativus*), чечевица (*Lens esculenta*), вика (*Vicia sativa*), нут (*Cicer arietinum*), вigna (*Vigna sinensis*), соя (*Glycine hispida*) и люпин (*Lupinus luteus*). Результаты анализов сведены в общую схему (рис. 2). На рис. 3 приведены спектры преципитации отдельных реакций. Как вид-

но, в ДНП всех представителей сыворотки выявляет общий неспецифический компонент РНП и очень слабо — один общий гистоновый компонент. Этими двумя компонентами ограничивается реакция с ДНП люпина (рис. 2). В ДНП сои и вигны выявляется еще один компонент, который

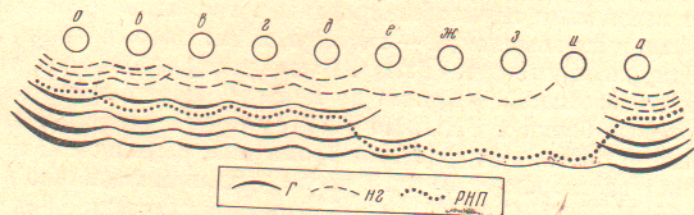


Рис. 2. Спектры преципитации ДНП двухдневных проростков растений семейства бобовых. Проявлены сывороткой на хроматин гороха обыкновенного. Г — гистоны, нг — негистоновые белки. а — горох обыкновенный, б — горох абиссинский, в — чина, г — вика, д — чечевица, е — нут, ж — вigna, з — соя, и — люпин

идентифицирован как белковый негистоновый. К этим трем компонентам в ДНП нута добавляется еще один гистоновый компонент. В ДНП чечевицы, вики и чины, кроме четырех компонентов нута, содержатся еще два гистоновых и один негистоновый компоненты, т. е. ДНП этих растений имеют все гистоновые компоненты гороха и отличаются лишь неполнотой проявления негистоновых белков. Последние в ДНП обоих видов гороха проявляются более интенсивно, чем в ДНП чечевицы, вики и чины. Некоторое различие такого же рода имеет место и между негистоновыми белками гороха обыкновенного и гороха абиссинского.

Результаты сравнительного иммунохимического анализа ДНП представителей семейства бобовых дают возможность судить о степени близости

сти их хроматина и хромосом. Как видно, по иммунохимической специфичности ДНП наиболее близки к гороху чина, чечевица и вигна, принадлежащие к трибе *Viciae*. Несколько дальше от гороха стоит нут, принадлежащий к другой подтрибе этой же трибы. Еще меньше сходства у вигны и сои из трибы *Phaseoleae*. Наименьшее сходство с горохом по антигенному составу ДНП обнаруживает люпин, принадлежащий к наиболее удаленной от виковых трибе *Genistee*.

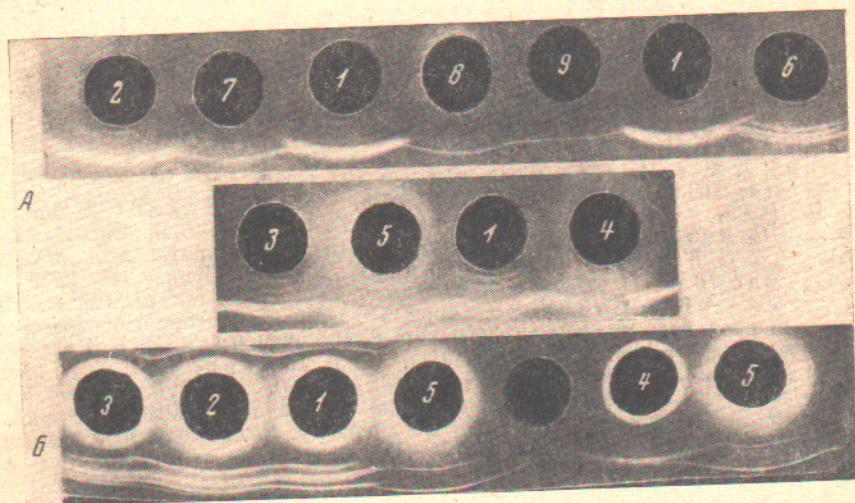


Рис. 3. Спектры преципитации ДНП. А — гороха обыкновенного (1), гороха абиссинского (2), чины (3), вики (4), чечевицы (5), нута (6), вигны (7), сои (8) и люпина (9). Проявлены сывороткой на хроматин гороха обыкновенного. Б — *Tr. aestivum* (1), *Tr. durum* (2), *Tr. turgidum* (3), *Tr. monosocum* (4) и *Hordeum nutans* (5). Проявлены сывороткой на хроматин *Tr. aestivum*

С сывороткой на диспергированный хроматин двухдневных проростков пшеницы *Tr. aestivum* были проведены гомологичные и гетерологичные реакции ДНП двухдневных проростков *Tr. durum*, *Tr. turgidum*, *Tr. monosocum* и *Hordeum nutans* (сорт «Винер»). В гомологичном ДНП выявляются 4 гистоновых, 4 липопротеидных, 1 негистоновый и РНП-компоненты (рис. 3Б). Такой же спектр преципитации дают ДНП *Tr. durum* и *Tr. turgidum* — правда, у последней один липопротеидный компонент отсутствует. В ДНП *Tr. monosocum* отсутствуют два гистоновых компонента. Здесь не проявляются также три липопротеидных и очень ослаблен белковый негистоновый компонент. Спектр преципитации ДНП ячменя представлен одним интенсивным и одним очень слабо выраженным гистоновым компонентом. Здесь хорошо проявляется общий для всех РНП-компонент и очень слабо — один из липопротеидов. Таким образом, резко выраженная видовая специфичность гистонов относительно *Tr. aestivum* обнаруживается только у *Tr. monosocum*. У ячменя, принадлежащего к другому роду семейства, специфичность гистонов еще более отчетлива.

Из представленных данных можно заключить, что гистомам, как и другим белкам, присуща иммунохимическая и биологическая специфичность. При этом степень специфичности отдельных гистоновых компонентов не одинакова. Специфичность одних, вероятно, появляется только на уровне крупных таксонов, специфичность других пока удалось выявить до уровня рода и в отдельных случаях — до вида. Надо полагать, что в иммунохимических реакциях с более дробным делением компонентов удастся выявить и более специфические гистоны растений. Предпосылкой этому являются полученные нами данные о наличии у гистонов органной специфичности (12).

Обнаружение высокой специфичности у гистонов должно послужить стимулом к пересмотру существующих представлений об их роли в регуляции генной активности ДНК. В то же время специфичность гистонов и сопутствующих им компонентов может оказаться важным тестом в изучении вопросов эволюции и таксономии организмов.

Всесоюзный институт растениеводства
им. Н. И. Вавилова
Ленинград

Поступило
5 III 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. M. Fambrough, J. Bonner, *Biochemistry*, 5, 2563 (1966). ² D. M. Fambrough, F. Fujimura, J. Bonner, *Biochemistry*, 7, 75 (1968). ³ D. M. Fambrough, J. Bonner, *Biochim. et biophys. acta*, 175, 113 (1969). ⁴ L. S. Hnilica, W. Johns, J. A. V. Butler, *Biochem. J.*, 82, 123 (1962). ⁵ J. P. S. Agrell, E. G. Christensson, *Nature*, 207, 4997, 638 (1965). ⁶ J. M. Kinkade, *J. Biol. Chem.*, 244, 3375 (1969). ⁷ R. H. Steelwagen, R. D. Cole, *J. Biol. Chem.*, 243, 4456 (1968). ⁸ C. Fukazawa, K. Shimura, *Biochim. et biophys. acta*, 154, 3, 618 (1968). ⁹ L. G. Tomasi, S. E. Kornguth, *J. Biol. Chem.*, 243, 2507 (1968). ¹⁰ В. В. Сидорова, II Всесоюзный биохимич. съезд. Тез. секционных сообщений, 1969, стр. 86. ¹¹ В. В. Сидорова, Сборн. Тр. молодых ученых и аспирантов, Всесоюзн. н.-и. инст. растениеводства, 1969. ¹² В. В. Сидорова, И. П. Гаврилюк, В. Т. Конарев, *Физиол. раст.*, № 2 (1971). ¹³ И. П. Гаврилюк, X. А. Юмагузина и др., *Кн. Нуклеиновые кислоты*, 1966, стр. 290. ¹⁴ И. Ф. Чекмин, И. П. Гаврилюк и др., *Кн. Методы исследования нуклеиновых кислот растений*, 1967, стр. 146. ¹⁵ Г. С. Курамшин, А. И. Смирнова, *Кн. Методы исследования нуклеиновых кислот растений*, 1967, стр. 160.