

С. Р. УМАНСКИЙ, Б. А. КОРОЛЬ, В. И. ТОКАРСКАЯ

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГИСТОНОВ С ДЕНАТУРИРОВАННОЙ И ОБЛУЧЕННОЙ ДНК. ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЕНОМА В КЛЕТКАХ ЭУКАРИОТОВ

(Представлено академиком А. Н. Белоцерским 11 X 1971)

Получено большое количество данных <sup>(2)</sup>, подтверждающих точку зрения Стадман и Стадман <sup>(1)</sup> об участии гистонов в регуляции активности генетического аппарата клетки. Совершенно очевидно, что гистоны играют важную роль в поддержании структуры ДНП <sup>(3)</sup> и в регуляции процесса транскрипции <sup>(4, 5)</sup>, хотя они, вероятно, и не являются специфическими репрессорами. Вместе с тем остается неясным, каков механизм репрессирующего действия гистонов и в чем состоят структурные различия активной и неактивной частей хроматина. В этом плане весьма интересным представляется изучение характера взаимодействия гистонов с денатурированной ДНК, так как в ДНК интенсивно делящихся и активно метаболизирующих тканей удается обнаружить денатурированные участки <sup>(6, 7)</sup>. Кроме того, анализ взаимодействия гистонов с денатурированной ДНК может оказаться полезным для понимания ряда радиобиологических эффектов, поскольку ионизирующая радиация вызывает дестабилизацию вторичной структуры ДНК <sup>(8, 9)</sup>.

ДНК выделяли из тимуса крыс породы Вистар с помощью проназной обработки, депротеинизацией 1% додецилсульфатом натрия и фенолом в присутствии 1 M NaCl и 3-кратной депротеинизацией смесью хлороформ — изоамиловый спирт. После осаждения ДНК перерастворяли, обрабатывали РНКазой и депротеинизировали. Гистоны выделяли из тимуса крыс по методу Боннера <sup>(10)</sup>. Реконструкцию нуклеогистона проводили в 0,01 M трис-HCl-буфере (pH 7,5) аналогично <sup>(11)</sup>. К 100 мкг ДНК с помешиванием добавляли гистоны в конечном объеме 3 мл. Осадок нуклеогистона отделяли центрифугированием и в супернатанте измеряли у.-ф. поглощение при 260 мμ, по которому судили о количестве ДНК, оставшейся в растворе. При смешивании гистонов с денатурированной ДНК осадок формируется не сразу, поэтому смесь инкубировали перед центрифугированием 10 мин. при комнатной температуре. Для получения денатурированной ДНК раствор ДНК в 0,01 M трис-HCl-буфере прогревали 15 мин. на кипящей водяной бане и быстро охлаждали. ДНК облучали при 4° в том же буфере в концентрации 1 мг/мл гамма-лучами Cs<sup>137</sup> на установке ГУПОС (мощность дозы 409 р/мин).

На рис. 1 представлены кривые осаждения нативной и денатурированной ДНК возрастающими концентрациями гистонов. Максимальное осаждение нативной ДНК достигается при отношении гистон/ДНК, равном 2. Для денатурированной ДНК та же величина существенно выше (—3,5). Кроме того, комплекс денатурированная ДНК — гистон перерастворяется в избытке гистонов, что может объясняться способностью денатурированной ДНК связывать «избыточное» количество гистонов за счет неионных взаимодействий между гистонами и «раскрывшимися» основаниями ДНК. Такое избыточное связывание гистонов приводит к перезарядке (появлению общего положительного заряда) и перерастворению реконструированного нуклеогистона. В пользу такого предположения свидетельствует тот

факт, что при проведении комплексования гистонов с денатурированной ДНК в присутствии 50% метанола или 5 M мочевины (агенты, препятствующие образованию гидрофобных и водородных связей) не наблюдается перерастворение нуклеогистона в избытке гистонов.

Из приведенных опытов остается, однако, неясным, чем объясняется относительно слабое осаждение денатурированной ДНК гистонами. Этот эффект может быть связан как с более высокой растворимостью комплекса гистон — денатурированная ДНК, так и с тем, что гистоны слабее взаимодействуют с денатурированной ДНК. Мы сравнивали способность меченых нативной и денатурированной ДНК конкурировать с меченой

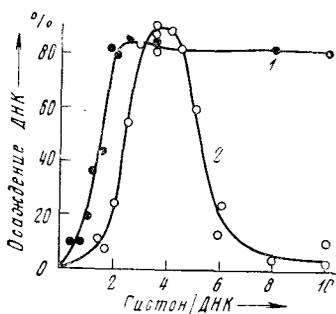


Рис. 1

Рис. 1. Осаждение нативной (1) и денатурированной (2) ДНК гистонами

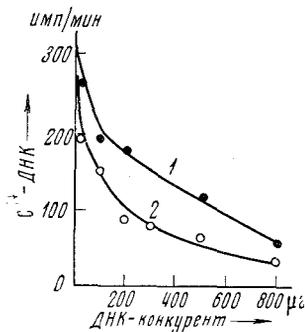


Рис. 2

Рис. 2. Осаждение 100 мкг нативной  $C^{14}$ -ДНК 120 мкг гистонов в присутствии различных количеств меченых нативной (1) и денатурированной (2) ДНК

нативной ДНК за связывание гистонов. Если бы денатурированная ДНК слабее взаимодействовала с гистонами, она должна была бы меньше конкурировать, чем нативная ДНК. Полученные данные представлены на рис. 2. Видно, что денатурированная ДНК конкурирует даже сильнее, чем нативная ДНК. Таким образом, денатурированная ДНК меньше осаждается гистонами, чем нативная, в связи с большей растворимостью нуклеогистона, содержащего денатурированную ДНК. Этот факт имеет, на наш взгляд, большое значение, так как обнаруженный эффект может лежать в основе механизма регуляции активности генома в клетках высших организмов. Предлагаемая гипотеза заключается в следующем.

Известно, что активные и репрессированные участки хроматина содержат одинаковое количество гистонов (<sup>12</sup>) и дерепрессия, таким образом, не связана с удалением гистонов. С другой стороны показано, что матричная активность хроматина в РНК-полимеразной системе зависит от агрегатного состояния хроматина (<sup>13</sup>, <sup>14</sup>). Поэтому высказывалось предположение, что репрессирующее действие гистонов связано именно с их способностью осаждать ДНК. Согласно предлагаемой гипотезе, увеличение скорости синтеза РНК на активных участках хроматина и дерепрессия неактивных генов достигается за счет локального изменения агрегатного состояния ДНК. В основе такого изменения лежит показанная выше более высокая растворимость комплекса гистонденатурированная ДНК. Схематический акт активации гена в предлагаемой модели выглядит следующим образом. Дерепрессор, которым является белок кислой природы, распознает специфический участок молекулы ДНК. Взаимодействие кислого белка с ДНК облегчается тем, что фосфаты ДНК экранированы гистонами. Образуя водородные и гидрофобные связи с основаниями ДНК, дерепрессор дестабилизирует или даже денатурирует соответствующий участок ДНК. Это приводит к такому изменению агре-

гатного состояния ДНК в месте прикрепления дерепрессора, которое делает его доступным для РНК-полимеразы или облегчает ее продвижение вдоль молекулы ДНК. Степень дестабилизации ДНК и соответственно скорость синтеза РНК могут зависеть как от изменения структуры дерепрессора (например, вследствие присоединения специфического индуктора), так и от количества присоединяющихся молекул дерепрессора, если структурным цистонам предшествуют несколько операторов (или акцепторных локусов, по терминологии, предложенной Георгиевым<sup>(15)</sup>).

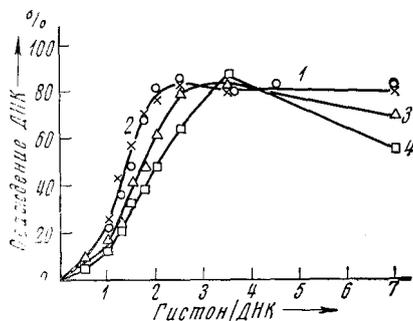


Рис. 3

Рис. 3. Осаждение облученной ДНК гистонами. 1 — контроль, 2 — 1 кр, 3 — 10 кр, 4 — 50 кр

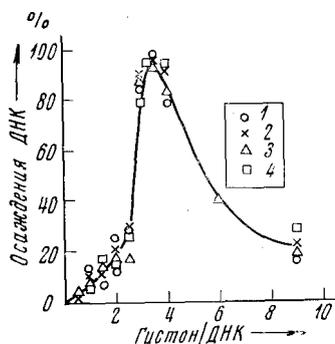


Рис. 4

Рис. 4. Осаждение гистонами облученной ДНК после тепловой денатурации. 1 — контроль, 2 — 1 кр, 3 — 10 кр, 4 — 50 кр

Следующая серия опытов посвящена анализу взаимодействия гистонов с облученной ДНК. На рис. 3 приведены кривые осаждения контрольной и облученной различными дозами ДНК возрастающими концентрациями гистонов. Отчетливые изменения обнаруживаются уже при дозе 10 кр и усиливаются при дозе 50 кр. Для осаждения максимального количества ДНК требуется тем больше гистонов, чем выше доза облучения. Кроме того, комплекс гистон — облученная ДНК обнаруживает тенденцию к перерастворению в избытке гистонов, причем этот эффект также прямо зависит от дозы облучения. Анализируя эти кривые, можно легко убедиться, что облученная ДНК по способности осаждаться гистонами занимает промежуточное положение между нативной и денатурированной ДНК, сближаясь с последней с увеличением дозы облучения. Можно было предположить поэтому, что изменение способности облученной ДНК осаждаться гистонами связано с появлением денатурированных или дестабилизированных участков в облученной ДНК. Чтобы проверить это предположение, облученную ДНК подвергали тепловой денатурации и после этого исследовали осаждение ее гистонами. Из рис. 4 видно, что тепловая денатурация снимает различия между облученной и контрольной ДНК. Таким образом, изменение свойств реконструированного на основе облученной ДНК нуклеогистона скорее всего связано с ее денатурацией или дестабилизацией. Этот эффект представляется интересным по следующим причинам. В работе<sup>(9)</sup> показано, что при облучении ДНК (в концентрации 30  $\mu\text{г}/\text{мл}$ ) до дозы 20 кр в ней не удается обнаружить денатурированные участки. При дозе 50 кр примерно 20% ДНК оказывается денатурированной. Облучение в меньших дозах вызывает дестабилизацию вторичной структуры ДНК, которая может быть выявлена с помощью дополнительных воздействий (температура, формальдегид и пр.). Таким образом, наличие в молекуле ДНК относительно небольшого денатурированного участка или даже дестабилизация вторичной структуры заметно снижает осаждение ДНК

гистонами. Этот факт является еще одним доводом в пользу реальности предлагаемой модели регуляции активности генома в клетках эукариотов. С другой стороны, представленные данные свидетельствуют о том, что облучение, вызывая дестабилизацию или денатурацию молекул ДНК, приводит к изменению агрегатного состояния ДНП клетки. Это, в свою очередь, может привести к нарушению процесса транскрипции — активации синтеза ДНК на активных генах и неспецифической дерепрессии неактивных в норме участков ДНК. Учитывая, что описанные изменения являются результатом непосредственного действия радиации и, вероятно, пусковым механизмом последующих нарушений, можно полагать, что они играют важную роль в радиационном поражении клетки.

Институт биологической физики  
Академии наук СССР  
Пуцшино-на-Оке

Поступило  
11 X 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> E. Stedman, E. Stedman, *Nature*, **166**, 780 (1950). <sup>2</sup> Г. Буш, Гистоны и другие ядерные белки, М., 1967. <sup>3</sup> B. M. Richards, J. F. Pardon, *Exp. Cell Res.*, **62**, 184 (1970). <sup>4</sup> J. Bonner et al., *Science*, **159**, 47 (1968). <sup>5</sup> Л. Н. Анапьева и др., *Мол. биол.*, **2**, 736 (1968). <sup>6</sup> В. С. Дашкевич и др., *Мол. биол.*, **2**, 562 (1968). <sup>7</sup> В. И. Токарская, С. Р. Уманский, П. А. Нелипович, *Биохимия*, **33**, 542 (1968). <sup>8</sup> Д. М. Спитковский и др., *Радиационная биофизика нуклеопротеида*, М., 1969. <sup>9</sup> Н. И. Рябченко и др., *Радиобиология*, **9**, 171 (1969). <sup>10</sup> J. Bonner et al., In: *Methods in Enzymology*, **12B**, 3 (1968). <sup>11</sup> J. A. V. Butler, E. W. Johns, *Biochem. J.*, **91**, 15c (1964). <sup>12</sup> J. H. Frenster, In: *The Cell Nucleus*, London, 1966, p. 24. <sup>13</sup> B. P. Sonnenberg, G. Zubay, *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, **54**, 415 (1965). <sup>14</sup> T. A. Hoare, E. W. Johns, *Biochem. J.*, **119**, 931 (1970). <sup>15</sup> Г. П. Георгиев, *Мол. биол.*, **4**, 17 (1970).