

Т. П. ЛЕВИТИНА, В. В. ПИНЕВИЧ

КИСЛОТОРАСТВОРИМЫЕ БЕЛКИ ХРОМАТИНА НЕКОТОРЫХ НИЗШИХ ВОДОРΟΣЛЕЙ

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 11 IV 1973)

В связи с интенсивными исследованиями путей регуляции активности генов усилился интерес к изучению белков, связанных с ДНК, в клетках различных организмов. Накоплен большой экспериментальный материал, показывающий, что у представителей почти всех таксономических рангов ДНК связана с белком (¹, ²). Однако есть все основания полагать, что природа белкового компонента различна. В ходе эволюции важнейшие, единые для всех организмов структурно-химические системы, очевидно, возникли одновременно (³). Среди них особое место принадлежит программирующей генетической системе, степень организованности которой возрастает от Про- до Месо- и Eukaryota (⁴). До недавнего времени изучение белков хроматина в основном сводилось к поискам у организмов, находящихся на разных уровнях филогенетического развития, типичных ядерных белков — гистонов. Такая постановка вопроса, с нашей точки зрения, является односторонней, так как сами гистоны, как компонент генетического аппарата, являются продуктом длительной эволюции. В связи с этим интересно отметить работу Пэнима с соавторами (⁵). Они изучали фракцию гистона F₂ из организмов разных таксономических рангов. Все исследованные образцы, выделенные из растений, беспозвоночных и позвоночных до грызунов включительно, содержали один остаток цистеина. Такая же фракция гистонов животных, стоящих на более высоких ступенях эволюции, содержала два таких остатка.

Так как для большинства эукариотических организмов высших таксономических рангов природа белков, связанных с ДНК, в целом изучена, то в настоящей работе исследовались белки дезоксирибонуклеопотеида (ДНП) одного из представителей прокариотических организмов — синезеленой водоросли *Spirulina platensis* (Gom.) Geitl. и двух представителей примитивных растительных организмов Eukaryota — жгутиковой зеленой водоросли *Euglena gracilis* Z. и одноклеточной протококковой водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer. Водоросли выращивали в сосудах ИФР нашей модификации. Продувание осуществляли смесью воздуха с 5% (по объему) CO₂. Для выращивания *Sp. platensis* использовали модифицированную среду Заррука (⁶). *E. gracilis* росла на синтетической среде Крамера и Миерса (⁷). *Chl. vulgaris* культивировали на лабораторной среде Таммийа (⁸).

Из *Sp. platensis* выделяли ДНП по модифицированному нами методу Макино и Цузуки (⁹). Клетки водорослей охлаждали жидким азотом и растирали с кварцевым песком. Растворимые компоненты экстрагировали буфером, содержащим 0,05 M NaCl, 0,005 M MgCl₂, 0,05 M трис-HCl (pH 7,5). Неразрушенные клетки и абразив удаляли центрифугированием при низкой скорости. Надосадочную жидкость центрифугировали 20 мин. при 25 000 g, чтобы удалить крупные частицы. Полученную надосадочную жидкость центрифугировали 90 мин. при 105 000 g для удаления фракции мембран и микросом. Надосадочная жидкость представляет собой темносиний раствор с пурпурной флуоресценцией, ее центрифугировали при

150 000 g 5 час. Конечный темно-синий осадок тщательно диспергировали в исходном буфере без хлористого магния и диализовали против двух литров того же буфера в течение 12 час. Выделение ДНП вели на колонке с сефарозой 4В. Зону содержания его определяли абсорбцией при 260 м. Полученный элюат, содержащий «сырой ДНП», обрабатывали РНКазой (50 мкг/мл) при 4° 1 час, а затем наносили на колонку с сефадексом G-200 для удаления низкомолекулярных белков и фрагментов РНК. Выделение кислоторастворимых белков из очищенного ДНП вели путем обработки 0,1 N H₂SO₄. Экстрагированные белки осаждали холодным 80% этанолом.

Для изучения кислоторастворимых белков, связанных с ДНК, из клеток *E. gracilis* выделяли ядра по модифицированной нами методике Паренти с соавторами ⁽¹⁰⁾. Клетки водорослей суспендировали в буфере, содержащем 10% (по весу) сахарозу, 0,01 M трис-HCl, 0,004 M Mg(CH₃COO)₂ (pH 7,3). К полученной суспензии добавляли тритон X-100 до 2% (по объему) и папаин (2 мг/мл). Пробу оставляли на мешалке при 37° на 1 час. Все последующие операции выполняли при 4°. Полученную суспензию центрифугировали, наслаивая на 40% (по весу) сахарозу, 15 мин. при 3000 g. При этом получалось два осадка — один на границе раздела 10% и 40% сахарозы, а второй на дне пробирки. Нижний осадок промывали исходным буфером, суспендировали в нем, добавляли тритон X-100 до 2% (по объему), несколько капель октилового спирта и оставляли на мешалке на 1 час. Затем повторяли центрифугирование через 40% сахарозу. Нижний осадок вновь суспендировали в буфере с 1% (по объему) тритоном X-100 и октиловым спиртом. Через 1 час пробу повторно центрифугировали через 40% сахарозу. Нижний осадок представлял собой массу сероватого цвета, состоящую из ядер *E. gracilis*. В случае необходимости обработку детергентами и очистку повторяли еще раз. Чистоту ядерной фракции контролировали микроскопированием при окрашивании ацетоорцеином. Полученные препараты промывали несколько раз 0,14 N NaCl для удаления рибосомальных белков и экстрагировали 0,25 N H₂SO₄. Из экстракта белки осаждали холодным 80% этанолом.

Из клеток *Chl. vulgaris* выделяли ДНП и кислоторастворимые белки, связанные с ДНК, и характеризовали их по Кобояси ⁽¹¹⁾. Электрофорез (э. ф.) выделенных белков вели в кислом ⁽¹²⁾ и основном ⁽¹³⁾ гелях с последующим окрашиванием амидошварцем. В качестве контроля использовали стандартный препарат гистонов тимуса теленка. В кислом геле белок оставался на старте при разделении белков, выделенных кислотной экстракцией из ДНП *Sp. platensis*. В случае же основного геля получена одна полоса с низкой относительной подвижностью, что, вероятно, объясняется нейтральной или слабокислой природой этого белка. Наличие каких-либо белков, связанных с ДНК, в клетках синезеленых водорослей до недавнего времени отрицалось целым рядом авторов, делавших такой вывод на основании цитохимических ⁽¹⁴⁾ и электронно-микроскопических ⁽¹⁵⁾ наблюдений. На основании биохимических исследований сделан вывод ⁽⁸⁾ об отсутствии типичных гистонов в синезеленой водоросли *Anabaena cylindrica*. Однако впервые показано, что в клетках этой водоросли ДНК связана с белком. В работе ⁽¹⁶⁾ дана характеристика кислоторастворимых рибосомальных белков двух представителей отдела Цианобактерий — *Anacystis nidulans* и *A. variabilis*. При этом исследованные белки *A. nidulans* (чье систематическое положение крайне неясно) оказались ближе к типичным гистонам. Это не было подтверждено авторами для *A. variabilis*. Кислоторастворимая белковая часть нуклеопротеидного комплекса, выделенного нами из *Sp. platensis*, по э.ф. свойствам оказалась подобна белкам *A. cylindrica*.

При характеристике ядер, выделенных из *E. gracilis*, получены следующие результаты. Микроскопирование окрашенных ацетоорцеином препа-

ратов показало, что ядерная фракция свободна от неразрушенных клеток, хлоропластов и цитоплазмы. Ядра имеют очертания и размеры, сходные с полученными при прижизненном окрашивании. Э.ф. кислоторастворимых ядерных белков в кислом геле дал две полосы, идущих со средней скоростью, и несколько медленных минорных фракций. Следует отметить, что при этом некоторые из полос по относительной подвижности были идентичны соответствующим полосам, типичным для стандартного препарата гистонов. Работа (¹⁷) посвящена выделению гистонов из *E. gracilis*. Однако автор ограничился выделением ДНП из суммарного гомогената клеток. При характеристике же кислоторастворимых белков этого комплекса получена картина, подобная фореграммам кислоторастворимых белков целых клеток и содержащая 10—11 полос. Такое количество фракций существенно выше, чем выявляется для типичных гистонов, и объясняется, вероятно, сильным загрязнением препарата рибосомальными белками. Э.ф. исследование белков, полученных нами кислотной экстракцией чистого препарата ядер *E. gracilis*, дало картину, резко отличную от результатов Нетравали, однако сходную с полученной Элпидиной с соавторами (¹⁸) для представителей жгутиковых простейших — *Trypanosoma lewisi* (зоофлагеллята) и *Astasia longa* (фитофлагеллята). Из очищенных препаратов ядер исследователи выделяли кислоторастворимые белки и характеризовали их э.ф. в геле полиакриламида. При этом оказалось, что основная масса белков имеет подвижность такую же, как и у гистонов тимуса телят, однако представлена меньшим числом интенсивно прокрашивающихся зон. Кроме того, помимо основных фракций в препарате присутствовало небольшое количество дополнительных полос, отличающихся по подвижности от гистонов высших организмов. Представляет интерес тот факт, что аналогичные результаты получены для представителя перидиниевых водорослей *Girardinium cohnii* (¹⁹). Авторам удалось показать, что хроматин *G. cohnii*, выделенный из ядер, содержит небольшое количество основного кислоторастворимого белка, дающего в кислом геле от одной до двух основных и несколько минорных фракций (при увеличении количества наносимого белка). Эта водоросль относится к выделяемой многими исследователями (¹⁹, ²⁰) группе *Mesokaryota*, стоящей, как предполагается, в филогенетическом аспекте между *Pro-* и *Eukaryota*. Своеобразие строения ядерного аппарата *E. gracilis* (ядро хромосомного типа, эвгленоидный тип митоза (²⁰), состав основных хромосомальных белков) позволяет, с нашей точки зрения, если и не отнести ее к *Mesokaryota*, то по крайней мере, говорить о большей близости *E. gracilis* и *Dinoflagellata*, чем предполагалось ранее (²⁰).

При выделении кислоторастворимых белков ДНП *Chl. vulgaris* нами были получены результаты, аналогичные приведенным в статье (¹¹). Однако, в отличие от них, мы трактуем наши данные не как доказательство наличия в клетках *Chl. vulgaris* типичных гистонов. Напротив, мы считаем, что результаты идентификации основных белков ДНП *Chl. vulgaris* скорее позволяют говорить о присутствии в ней гистонодобных белков, отличающихся от истинных гистонов. Это, вероятно, объясняется тем, что *Chl. vulgaris*, несмотря на принадлежность к *Eukaryota*, имеет своеобразный примитивный тип деления ядерного аппарата (цуговый митоз (²¹)).

Полученные данные позволяют заключить, что кислоторастворимые белки, связанные с ДНК, содержатся в клетках всех исследованных водорослей. *Prokaryota* *Sp. platensis* содержит белки нейтрального или слабокислого характера. Белки *E. gracilis*, сходной по многим чертам организации с *Mesokaryota*, ближе к типичным гистонам, хотя и существенно отличаются от них по э.ф. характеристике. Еще более подобны гистонам белки хроматина организма, принадлежащего к *Eukaryota*, но обладающего своеобразным типом митоза, — *Chl. vulgaris*. На основании приведенных результатов можно сделать вывод, что появление гистонов, как одного

из важнейших компонентов хромосом типичных Eukaryota, шло параллельно усложнению хромосомного аппарата и становлению истинного митоза.

Ленинградский государственный университет
им. А. А. Жданова

Поступило
13 III 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Sluyser, *Natuur en tehnol.*, **39**, № 3, 95 (1971). ² E. L. Smith, R. J. de Lange, J. Bonner, *Physiol. Rev.*, **50**, № 2, 169 (1970). ³ D. E. Green, R. F. Goldberger, *Molecular Insights into the Living Progress*, N. Y., 1967. ⁴ E. J. Du Praw, *DNA and Chromosomes*, N. Y.—Sydney, 1970. ⁵ S. Panyim, K. R. Sommer, R. Chalkley, *Biochemistry*, **10**, № 21, 3911 (1971). ⁶ А. А. Михайлов, Н. Н. Верзилин и др., *Научн. докл. высш. школы, биол. науки*, № 2, 67 (1972). ⁷ J. P. Cook, *Methods in Enzymology*, **23**, Photosynthesis, Part a, 67, 1971. ⁸ Н. Tamiya et al., *Algal Culture from Laboratory Pilot Plants*, Carnegie Inst. Wash., Publ. 600, 76 (1953). ⁹ F. Makino, J. Tsuzuki, *Nature*, **231**, № 5303, 446 (1971). ¹⁰ F. Parenti et al., *Biochem. et biophys. acta*, **195**, № 1, 234 (1969). ¹¹ Ю. Кобояси, *J. Japan. Biochem. Soc.*, **35**, № 2, 81 (1963). ¹² D. M. Fambrough, J. Bonner, *Biochemistry*, **5**, № 8, 2563 (1966). ¹³ В. В. Пиневич, Э. П. Берс, Г. Г. Паскель, *Вестн. Ленингр. унив., сер. биол.*, № 21, в. 2, 140 (1968). ¹⁴ N. De Deerpesh, S. N. Ghosh, *J. Histochem. Cytochem.*, **13**, № 4, 298 (1965). ¹⁵ L. V. Leak, *J. Ultrastr. Res.*, **20**, № 3—4, 190 (1967). ¹⁶ Л. В. Гофштейн, Н. П. Юрина, *Сборн. Механизмы регуляции функции клеточного ядра*, Тбилиси, 1972, стр. 39. ¹⁷ M. S. Netrawali, *Exp. Cell Res.*, **63**, № 2—3, 422 (1970). ¹⁸ Е. Н. Элпидина, И. А. Крашенинников, Г. Н. Зайцева, *Сборн. Механизмы регуляции функции клеточного ядра*, Тбилиси, 1972, стр. 131. ¹⁹ P. J. Rizzo, L. D. Nooden, *Science*, **176**, № 4036, 796 (1972). ²⁰ И. Б. Райков, *Кариология простейших*, «Наука», 1967. ²¹ М. А. Пешков, *Сборн. Структура и функции клеточного ядра*, «Наука», 1967, стр. 156.

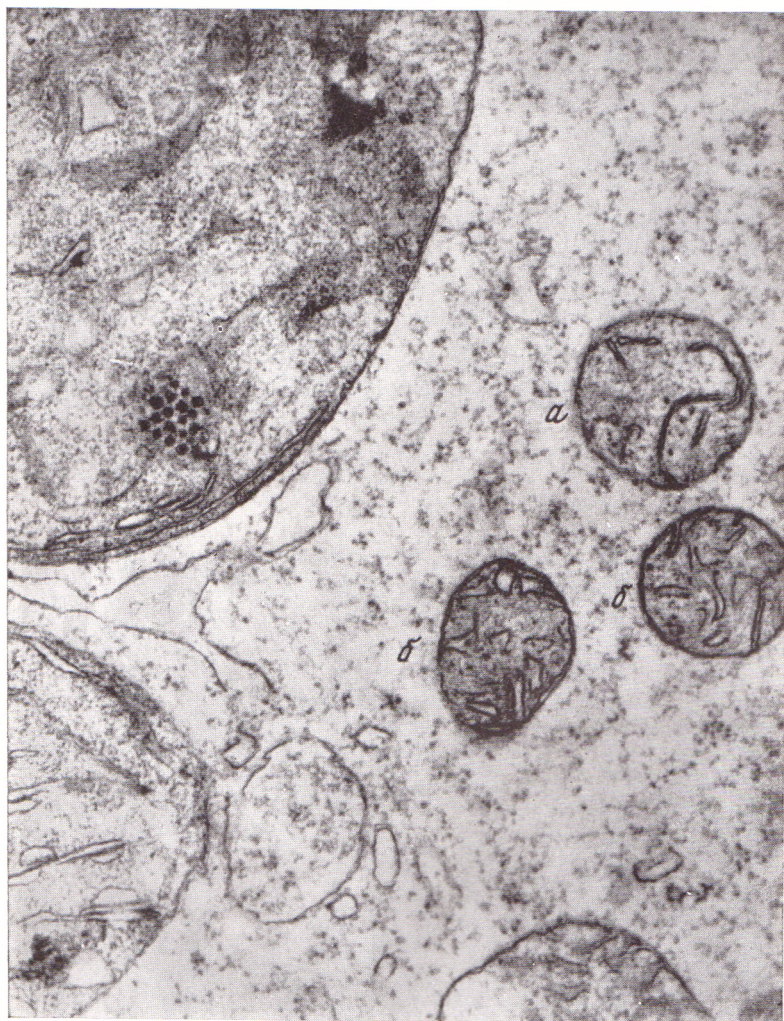


Рис. 1. Клетки ППГ-829. *a* — митохондрия «пшеничного» типа, *б* — «пырейного» типа. 30 000 ×

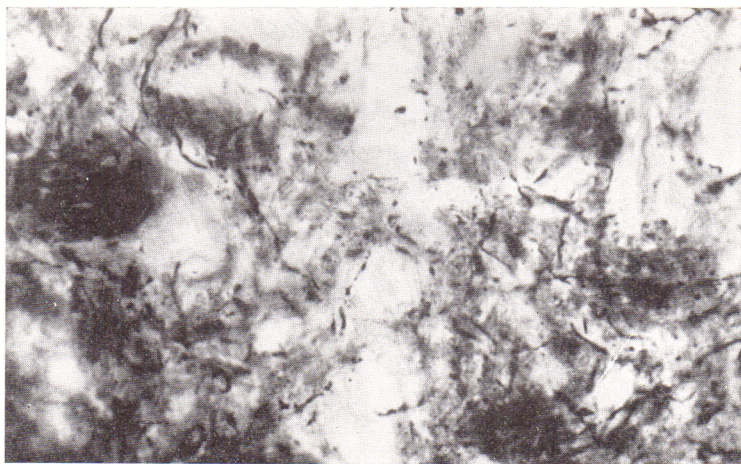


Рис. 2. Фрагментация толстых волокон в ретикулярной формации среднего мозга при разрушении передней лимбической коры. Метод Науга, микрофото, 400×

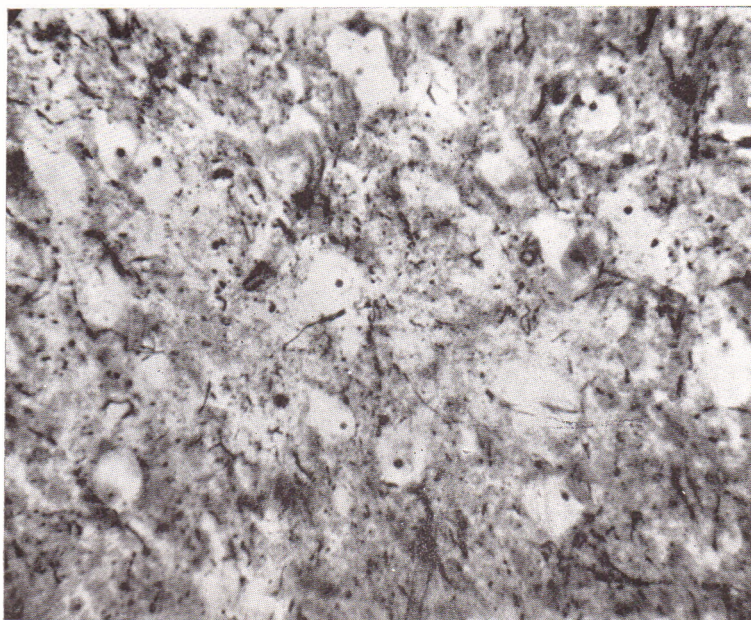


Рис. 3. Дегенерация терминалей в латеральном заднем ядре при разрушении в задней лимбической коре. Метод Финка и Хаймера, микрофото, 400×