

Е. С. ЛЕВИНА, А. Д. МИРЗАБЕКОВ

# КОВАЛЕНТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ БЕЛКОВ С ДНК В СОСТАВЕ ХРОМАТИНА

(Представлено академиком А. А. Баевым 30 XII 1974)

Несмотря на многочисленные исследования, о структуре хроматина известно немного. Показано, что малая бороздка двойной спирали ДНК в хроматине не заполнена белками (<sup>1, 2</sup>), а гистоны локализованы частью в большой бороздке и частью — вне бороздок ДНК (<sup>2</sup>). По-видимому, гистоны специфически взаимодействуют друг с другом и участвуют в образовании хроматиновых глобул (<sup>3, 4</sup>) или в организации хроматина в виде суперспирали (<sup>5</sup>). Изучение структуры хроматина, кроме того, затрудняется легкостью перераспределения в нем белков (<sup>6</sup>). Для изучения

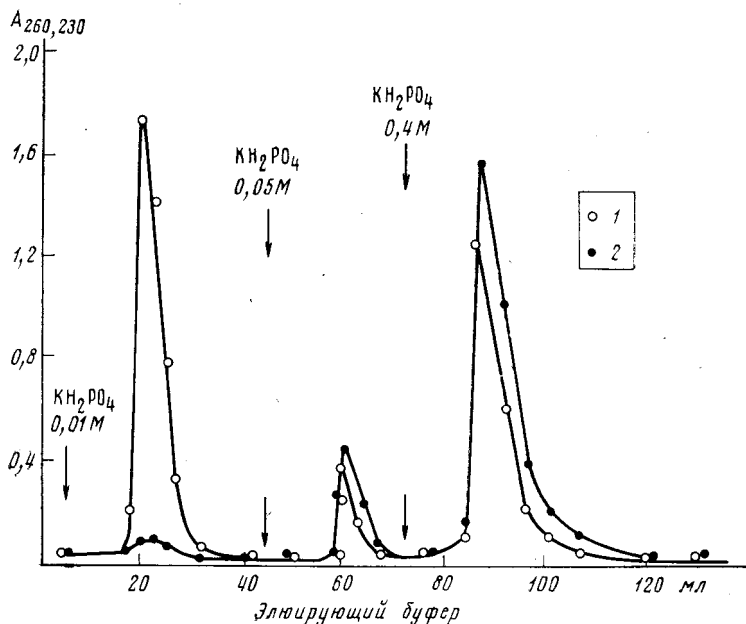


Рис. 1. Выделение ДНК с ковалентно связанными белками хроматографией на октапнатите. Профиль ступенчатой элюции 0,01 M, 0,05 M и 0,40 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  в 2 M KCl и 5 M мочеvine. 1 —  $A_{260}$ ; 2 —  $A_{230}$

распределения белков хроматина вдоль нити ДНК и друг относительно друга перспективно использование ковалентного связывания типа белок — белок и ДНК — белок. Для сшивки белков хроматина применяют бифункциональные реагенты: формальдегид, димидозефиры (см. библиографию в (<sup>7</sup>)). Ковалентное связывание белков с ДНК происходит при облучении их комплексов ультрафиолетовым светом (<sup>8</sup>). Эффективность связывания увеличивается при замещении тимина в ДНК на бромдезоксисурацил (<sup>9</sup>).

В настоящей работе описан новый метод ковалентного связывания белков хроматина с частично апуринизированной ДНК. Легкость отщепления

пуриновых оснований от ДНК достигается их метилированием диметилсульфатом (ДМС). Метод позволяет в достаточно мягких условиях пришить к ДНК в хроматине 30–80% гистонов всех пяти основных фракций и часть негистоновых белков.

Методы. Хроматин получали из тимуса теленка как описано <sup>(11)</sup> и обрабатывали в следующих условиях: 22  $A_{260}$  единицы хроматина инкубировали в 1 мл 0,05 М ЭДТА, 0,01 М какодилатном буфере, рН 7,0, с диметилсульфатом 18 час. при 4°. Затем хроматин дважды промывали центрифугированием в 0,1 М NaCl, 0,05 М ЭДТА, 0,01 М калий-фосфатном

Таблица 1

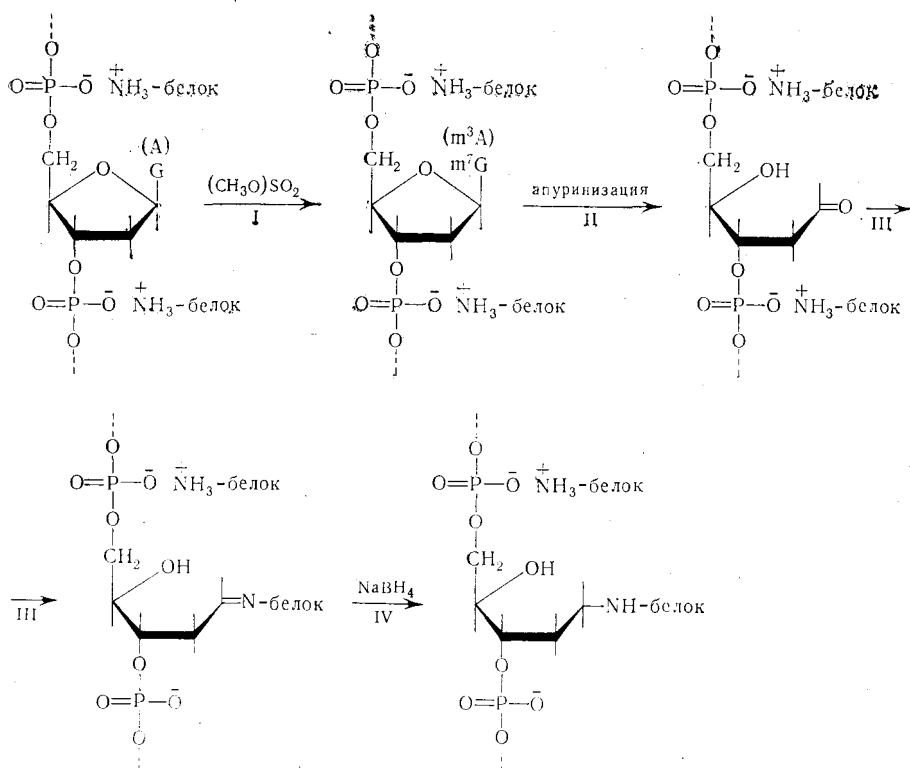
Влияние условий обработки на ковалентное связывание белков с ДНК

| № опыта | ДМС, мм | Апуринизация |          |                      |                       | Весовое содержание белка, % по отношению к ДНК |
|---------|---------|--------------|----------|----------------------|-----------------------|------------------------------------------------|
|         |         | NaCl, М      | т-ра, °С | время инкубации, час | NaBH <sub>4</sub> , М |                                                |
| 1       | —       | 0,10         | 65       | 4                    | —                     | 3–5                                            |
| 2       | —       | 0,10         | 65       | 4                    | 0,15                  | 7–8                                            |
| 3       | 21      | 0,10         | 65       | 4                    | 0,15                  | 60–80                                          |
| 4       | 21      | 1,0          | 65       | 4                    | 0,15                  | 4–9                                            |
| 5       | 21      | 0,10         | 37       | 8                    | 0,15                  | 15–30                                          |

Примечание. Концентрацию белка и ДНК определяли во фракциях, полученных после хроматографии на оксиапатите. Белок определен по методу Лоури, ДНК — спектрофотометрически (21  $A_{260}$  единица = 1 мг). В таблице приведены результаты трех и более опытов.

буфере рН 6,0 и инкубировали в 1 мл того же буфера 4 часа при 65° или 8 час. при 37°. Инкубационную смесь охлаждали до 0°, добавляли свежеприготовленный 1,5 М раствор NaBH<sub>4</sub> до конечной концентрации 0,15 М, выдерживали 30 мин. на холоду и промывали осадок, как описано. Модифицированный хроматин диссоциировали в 2 М KCl, 5 М мочевины и 0,01 М калий-фосфатном буфере рН 6,8 с помощью ультразвуковой обработки и сорбировали на колонку с оксиапатитом из расчета 10  $A_{260}$  единиц ДНК на 1 мл сорбента. Скорость элюции 30 мл·час<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>. Свободные белки хроматина элюировали с колонки последовательно 0,01 М и 0,05 М, а ДНК с ковалентно связанными белками 0,4 М калий-фосфатным буфером, рН 6,8, в 2 М KCl, 5 М мочевины. Полученные фракции диализовали против 2 М мочевины и затем против дистиллированной воды. Электрофорез белков проводили в 7,5% полиакриламидном геле в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия, как описано в <sup>(11)</sup>. Для этого ДНК в составе исходного хроматина или хроматина, обработанного по схеме и фракционированного на оксиапатите (рис. 1), гидролизовали в 2% растворе дифениламина и 66% муравьиной кислоте в течение 18 час. при 30° <sup>(12)</sup>. Дифениламин и муравьиную кислоту удаляли экстракцией диэтиловым эфиром. Раствор, содержащий белки и продукты гидролиза ДНК, концентрировали на пленочном испарителе и диализовали против электродного буфера с 0,1% додецилсульфатом натрия и 0,1% β-меркаптоэтанола. Образцы смеси белков после диализа наносили на гель. По окончании электрофореза и прокрашивания белков раствором Coomassie brilliant blue гели сканировали на хромоскане («Jouce Loeble»).

Результаты эксперимента. Ниже приведена схема метода. При обработке хроматина ДМС происходит метилирование (I), главным образом N7-атома гуанина и, в меньшей степени, N3-атома аденина, равномерно вдоль всей нити ДНК хроматина <sup>(2)</sup>. В выбранных нами условиях достигается метилирование примерно 5% всех оснований ДНК хроматина. Гликозидная связь при метилированных пуриновых основаниях лабильна <sup>(10)</sup> и легко расщепляется при нейтральных значениях рН и повышенной температуре (II). Образующиеся в апуриновых участках ДНК



альдегидные группы остатков дезоксирибозы способны реагировать с аминогруппами молекул белков в хроматине (III) с образованием основания Шиффа. Известно, что значительная часть отрицательно заряженных фосфатных групп ДНК в хроматине нейтрализуется ε-аминогруппами лизина молекул гистонов. Поэтому стерическая близость ε-аминогрупп лизина с фосфатными остатками и расположенными рядом с ними в апуриновых участках альдегидными группами, вероятно, существенно благоприятствует реакции образования основания Шиффа. Восстановление двойной связи  $>\text{C}=\text{N}-$  боргидридом натрия (IV) необратимо стабилизирует ковалентную связь между двумя сшитыми макромолекулами.

Отделение ДНК, ковалентно связанной с белками, от свободных белков проводили с помощью ряда методов: хроматографией на оксиапатите, гель-фильтрацией на сефарозе-4В или ультрацентрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия. Наиболее удобно использовать с этой целью хроматографию на колонке с оксиапатитом после растворения хроматина в 2 M KCl, 5 M мочевины (рис. 1) или в 0,1 M KOH. Результаты анализа хроматина, сшитого в различных условиях и отделенного от несвязанных белков хроматографией на оксиапатите, приведены в табл. 1 и на рис. 2. В исходном хроматине содержание гистонов составляет 1 мг на 1 мг ДНК. В контрольном хроматине, проведенном через все стадии обработки, исключая метилирование, количество белка, связанного с ДНК, составляет 3–8% (табл. 1, опыты №№ 1, 2). В метилированном хроматине, для которого апуринизацию выполняли при 65° в течение 4 час. (выщелчение метилированных оснований происходит на 80%), ковалентно связывается с ДНК 60–80% белков хроматина (опыт № 3). Инкубация метилированного хроматина в присутствии 1 M NaCl, вызывающего диссоциацию комплекса ДНК — белки хроматина (<sup>13</sup>), снижает количество ковалентно связанного с ДНК белка до уровня контроля (опыт № 4). В условиях апуринизации при 37° в течение 8 час. связывается 15–30%

белков (опыт № 5). Снижение эффективности пришивки белков объясняется, вероятно, уменьшением степени апуринизации ДНК, происходящей в этих условиях лишь на 10–15%. Ковалентная связь между белком и ДНК после восстановления  $>C=N-$  связи  $NaBH_4$  стабильна в щелочной среде (0,1 М КОН, 20°, 10 мин.). Изучение «сшитого» хроматина до его обработки  $NaBH_4$  (на стадии III) показало, что двойная связь  $>C=N-$  также стабильна при нейтральном pH, но может быть гидролизована в кислой среде. Это позволяет получить обратимое ковалентное связывание между ДНК и белками.

Результаты анализа пришитых к ДНК белков хроматина методом электрофореза в полиакриламидном геле приведены на рис. 2. Из сравнения картин разделения белков исходного хроматина и «сшитого» хроматина видно, что к ДНК привязываются ковалентной связью гистоны всех фракций и небольшое количество негистоновых белков.

Разработанный метод ковалентного связывания белков хроматина с ДНК с равным успехом был использован нами на хроматине тимуса теленка, хроматине и ядрах клеток асцитного рака Эрлиха мышей. В настоящее время проводится изучение структуры хроматина с помощью описанного подхода.

Авторы выражают благодарность Эрдеи Шаре (Институт биохимии АН ВНР), принимавшей участие на начальных этапах работы.

Институт молекулярной биологии  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
25 XII 1974

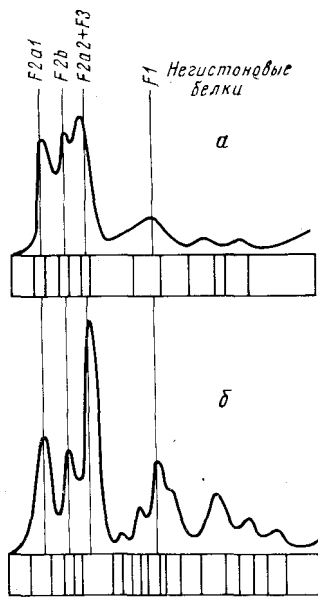


Рис. 2. Электрофорез белков хроматина в полиакриламидном геле (результат сканирования на хромоскане). а — белки, ковалентно связанные с ДНК, б — белки исходного хроматина

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> R. T. Simpson, *Biochem.*, v. 9, 4814 (1970). <sup>2</sup> A. D. Mirzabekov, A. F. Melnikova, *Mol. Biol. Rep.*, v. 1, 385 (1974). <sup>3</sup> R. D. Kornberg, *Science*, v. 184, 868 (1974). <sup>4</sup> A. L. Olins, D. E. Olins, *Science*, v. 183, 330 (1974). <sup>5</sup> J. F. Pardon, M. H. F. Wilkins, *J. Mol. Biol.*, v. 68, 115 (1972). <sup>6</sup> A. Y. Varshawsky, Yu. V. Ilyin, *Biochim. et biophys. acta*, v. 340, 207 (1974). <sup>7</sup> Yu. V. Ilyin, A. A. Bayev jr. et al., *Mol. Biol. Rep.*, v. 1, 343 (1974). <sup>8</sup> N. A. Simukova, E. I. Budowski, *FEBS Letters*, v. 38, 296 (1974). <sup>9</sup> H. Weintraub, *Cold Spring Harb. Symp. of Quant. Biol.*, v. 38, 247 (1973). <sup>10</sup> P. D. Lawley, In: *Progress in Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.*, v. 5, 89 (1966). <sup>11</sup> K. Marushige, J. Bonner, *J. Mol. Biol.*, v. 15, 160 (1966). <sup>12</sup> H. S. Shapiro, E. Chargaff, *Biochim. et biophys. acta*, v. 91, 262 (1964). <sup>13</sup> D. J. A. Tuan, J. Bonner, *J. Mol. Biol.*, v. 45, 59 (1969). <sup>14</sup> J. S. Bhorjee, T. Pederson, *Biochem.*, v. 12, 2766 (1973).