

Е. П. ХАРЧЕНКО, И. П. АШМАРИН

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ
АКТИНОМИЦИНА D И ЭТИДИЙБРОМИДА ХРОМАТИНОМ
ПЕЧЕНИ ПОЗВОНОЧНЫХ***(Представлено академиком Е. М. Крепсом 20 II 1975)*

Известно, что хроматин содержит участки ДНК, доступные связыванию различных красителей, поликатионов, воздействию ДНКаз⁽¹⁻⁶⁾. В настоящее время пока трудно однозначно утверждать, являются ли эти «открытые» участки в хроматине результатом определенного (регулярного) распределения хромосомальных белков либо они являются теми активными участками хроматина, которые транскрибируются *in vivo*.

К проверке первого предположения можно было бы подойти, оценивая косвенно долю «открытых» участков ДНК в хроматине из одного и того же органа животных, находящихся на различных ступенях эволюционного развития, по связыванию с актиномицином D (AD) и этидийбромидом (ЭБ). Такой подход имеет два преимущества. Первое заключается в том, что посредством связывания красителей имеется возможность проанализировать долю открытых участков в хроматине животных, геном которых существенно отличается по содержанию ДНК и, по-видимому, по соотношению структурных и неструктурных генов. В первую очередь эти различия в соотношении структурных и неструктурных генов можно ожидать у птиц и амфибий, ибо геном последних существенно больше генома птиц, и в то же время адаптивные возможности амфибий, обусловленные «земноводным» образом жизни, очевидно, выше. Второе преимущество состоит в том, что AD в основном связывается с ГЦ-парами в ДНК. Что касается ЭБ, то для него не свойственно предпочтительное связывание с какой-либо определенной парой комплементарных оснований. В случае сопоставления животных с одинаковым нуклеотидным составом ДНК (а позвоночные характеризуются близостью значений нуклеотидного состава ДНК) данные по титрованию обоими красителями, может быть, позволят выявить, какие из участков (обогащенные ГЦ- или АТ-парами) преимущественно открыты в хроматине.

Исходя из этих предположений, мы проанализировали связывание AD и ЭБ хроматином печени крысы, голубя, черепахи и лягушки.

Хроматин из печени получали путем предварительного выделения ядер из клеток, обработанных 0,5% тритоном X-100, с последующими промываниями в растворе 0,25 M сахара: 0,01 трис pH 7,5 : 0,003 M CaCl₂. После очистки ядра промывали 0,05 M трис-буфером pH 7,5, а затем в 0,01 M глицине. Ядра оставляли на ночь в 0,01 M глицине. Легким озвучиванием (частота 22 кГц, интенсивность 5 Вт/см²) в течение 20 сек. хроматин переводили в растворимое состояние и далее центрифугировали при 25 000 g в течение 30 мин. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость использовали для титрования AD⁽⁷⁾ и ЭБ^(8, 9). Связывание ЭБ и AD оценивали спектрофотометрически по оптической плотности, внося поправку на мутность и поглощение, обуславливаемые самим хроматином. В случае титрования AD изменение оптической плотности измеряли при 425 нм по Клейману и Хуангу⁽⁷⁾, принимая для свободного AD $E_{425} = 2,48 \cdot 10^4$. Связывание ЭБ с хроматином измеряли при 460 нм по Уорингу⁽⁸⁾ и Леквину и Селиджи⁽⁹⁾ с некоторыми модификациями. Для свободного ЭБ E_{460} принимали за $4,8 \cdot 10^3$ ⁽⁸⁾.

Кривые титрования обоими красителями (графики Скетчерта) построены, исходя из принципов расчета, приведенных Пикокком и Скереттом⁽¹⁰⁾, и представлены для AD и ЭБ на рис. 1. Данные рисунков по свя-

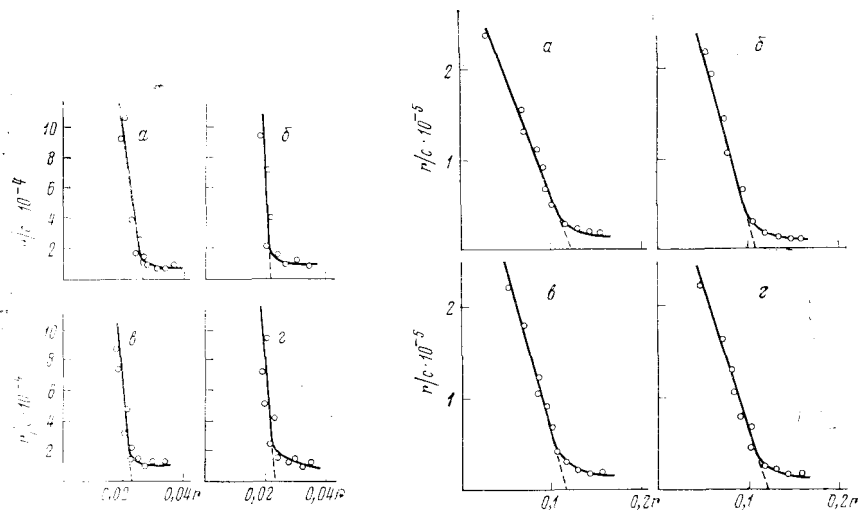


Рис. 1. Титрование хроматина печени позвоночных актиномицином D (слева) и этидий-бромидом (справа) (r — общая концентрация красителя, c — концентрация свободного красителя). а — крыса, б — голубь, в — черепаха, г — лягушка

зыванию числа молекул красителей (n) на 10^3 нуклеотидов приведены в табл. 1. Как видно из этих данных, хроматин печени крысы, голубя, черепахи и лягушки связывает сходные количества молекул красителя в пересчете на 10^3 нуклеотидов как в случае АД, так и ЭБ.

Для интерпретирования выявленного сходства хроматина крысы, голубя, черепахи и лягушки по связыванию с красителями целесообразно учитывать данные о размерах их геномов, нуклеотидного состава их ДНК и доле повторяющихся последовательностей в геноме и транскрибируемой

Таблица 1
Число молекул (n) связавшегося с хроматином красителя
в расчете на 10^3 нуклеотидов (данные из графиков
Скетчерта, рис. 1)

Источник хроматина	Размер генома, пг ДНК ⁽¹¹⁾	Нуклеотидный состав ДНК, % ГЦ-пар ⁽¹²⁾	n	
			актиномицин D	этидийбромид
Крыса	3	42	26	121
Голубь	1	40	21	112
Черепаха	3	44	22	115
Лягушка	6	42	24	122

доле. Это несколько затрудняется неполнотой сведений о доле повторяющихся последовательностей в геноме и транскрибируемой доле генома по всем четырем исследованным видам. Однако сравнение этих характеристик у других видов тех же классов животных позволяет, хотя бы приближенно, дать оценку полученным данным.

Так, близость значений нуклеотидного состава ДНК и числа молекул красителя, приходящихся на 10^3 нуклеотидов, для всех четырех видов свидетельствует о том, что исследованные виды не отличаются преимущественной доступностью для связывания с красителями нуклеотидных последовательностей, обогащенных АТ- или ГЦ-парами.

С другой стороны, геном лягушки примерно в 6 раз больше генома голубя. Если допустить, что связывание красителя коррелирует с числом генов в печени, доступных транскрибированию, то, исходя из данных по титрованию хроматина красителями обоих видов, следует признать, что число доступных («открытых») красителям последовательностей в печени лягушки в 6 раз больше по сравнению с голубем.

Менее резкими являются различия по этим же показателям у лягушки и крысы — примерно всего лишь в 2 раза. Однако, если учесть, что у крысы доля транскрибируемых участков по тесту гибридизации ⁽¹³⁾ в 3 раза меньше, чем у цыплят, то, по-видимому, отличие от амфибий и здесь хорошо выражено.

Вполне возможно, что сходство хроматина исследованных четырех видов позвоночных по удельному связыванию с красителями является следствием однотипного распределения белков по длине ДНК. Подтверждением такого предположения могут служить, во-первых, данные о чередующемся расположении структурных и неструктурных генов ^(14, 15), во-вторых, данные о распределении белков в хроматине. Так, результаты ⁽¹⁶⁾ свидетельствуют о блочном распределении по ДНК аргинин-богатых гистонов; по ⁽¹⁷⁾ следует, что на каждые 200 нуклеотидов в хроматине приходится по 8 молекул гистонов.

Предпринятые в последнее время успешные попытки фракционировать хроматин на матрично активный и неактивный ^(15, 18) не свидетельствуют об обедненности матрично активных участков в отношении белков, и, более того, в них выявлены дополнительные негистоновые белки, отсутствующие в матрично активных фрагментах хроматина. К тому же титрование AD репрессированного хроматина зрелых эритроцитов птиц выявило то же число молекул AD, связываемого с хроматином, что и в случае хроматина других тканей не с заблокированным хроматином ⁽¹⁹⁾.

Наконец, в пользу регулярного распределения хромосомальных белков в хроматине свидетельствует тот факт, что трудно представить регулярную укладку дезоксирибонуклеопroteида в одинаковую для всех эукариотов структуру (форму) хромосом без упорядоченного распределения информативных и неинформативных нуклеотидных последовательностей и хромосомальных белков в них.

Таким образом, полученные данные по сравнительному анализу связывания красителей с хроматином печени позвоночных являются косвенным доказательством в пользу предположения о том, что «открытые» для них участки в хроматине обусловлены однотипным распределением хромосомальных белков по ДНК, и, в то же время, дают основания для предположения о большем абсолютном количестве доступных транскрипции участков хроматина у амфибий по сравнению с птицами (с млекопитающими различия эти менее выражены). Для более определенной оценки потребуется, видимо, привлечение других методов изучения доли транскрибируемых участков.

Институт эволюционной физиологии
и биохимии им. И. М. Сеченова
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
12 II 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. J. Clark, G. Fenselfeld, Nature New Biol., v. 229, 101 (1971). ² R. F. Itzhaki, H. K. Cooper, Biochem. J., v. 125, 101p (1971). ³ R. F. Itzhaki, Europ. J. Biochem., v. 47, 27 (1974). ⁴ R. F. Itzhaki, Biochem. J., v. 122, 583 (1971). ⁵ R. F. Itzhaki, Biochem. J., v. 125, 209 (1971). ⁶ G. Schmidt, P. J. Cashion et al., Arch. Biochem. and Biophys., v. 149, 513 (1972). ⁷ L. Kleiman, R. C. Huang, J. Mol. Biol., v. 55, 503 (1971). ⁸ M. J. Waring, J. Mol. Biol., v. 13, 269 (1965). ⁹ P. F. Lurquin, V. L. Seligy, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 46, 1399 (1972). ¹⁰ A. R. Peacocke, J. N. H. Skerrett, Trans. Farad. Soc., v. 52, 2621 (1956). ¹¹ H. Rees, R. N. Jones, Int. Rev. Cytol., v. 32, 53 (1972). ¹² А. С. Антонов, В кн.: Строение ДНК и положение организмов в системе, М., Изд-во МГУ, 1972. ¹³ B. J. McCaarthy, J. T. Nishiura et al., Cold Spring Harbor Symp., v. 38, 763 (1973). ¹⁴ E. H. Davidson, R. J. Britten, Quart. Rev. Biol., v. 48, 565 (1973). ¹⁵ J. Bonner, W. T. Garrard et al., Cold Spring Harbor Symp. v. 38, 303 (1973). ¹⁶ A. J. Varshavsky, G. P. Georgiev, Biochim. et biophys. acta, v. 281, 66 (1972). ¹⁷ R. D. Kornberg, Science, v. 184, 868 (1974). ¹⁸ E. C. Murphy jr., S. H. Hall et al., Biochemistry, v. 12, 3843 (1973). ¹⁹ Б. А. Поспелов, А. Б. Пунышев, Молекулярная биология, № 7, 390 (1973).