

УДК 576.31

БИОХИМИЯ

В. Н. БУШУЕВ, С. Н. КУРОЧКИН, В. А. КОРОЛЬ, Л. П. КАЮШИН,
Е. С. СЕВЕРИН, С. В. ШЛЯПНИКОВ, В. А. ШИБНЕВ

СТРУКТУРА ГИСТОНА H1 И ЕГО ФОСФОРИЛИРОВАННОГО ПО Ser-38 ПРОИЗВОДНОГО В КОМПЛЕКСАХ С ДНК

(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 6 XI 1975)

Согласно современным представлениям, гистону H1 отводится ключевая роль в структурной организации хроматиновых фибрилл (¹, ²). Один из механизмов регуляции и контроля структуры хроматина предполагает постсинтетическую модификацию гистона H1, в частности его фосфорилирование, осуществляемое на различных стадиях развития клетки специфическими протеинкиназами (²). Исходя из этой гипотезы, фосфорилирование гистона H1 является триггером, включающим изменение конформации нуклеопротеида, за счет специфического белок-белкового взаимодействия одной или нескольких молекул гистона H1 (³, ⁴).

Различные типы цикло-АМР-зависимых и цикло-АМР-независимых протеинкиназ принимают участие в фосфорилировании сериновых и треониновых остатков гистонов. Для гистона H1 известно по крайней мере два места модификации молекулы, осуществляемой специфическими протеинкиназами, а именно сериновые остатки полипептидной цепи в положении 38 и 106 (⁵⁻⁸). В этой связи представляется интересным дифференцировать эффект фосфорилирования молекулы гистона H1 по разным центрам на структуру как самого гистона, так и его комплексов с ДНК.

Исследование последовательности аминокислотных остатков, проведенное нами ранее для различных субфракций гистона H1 тимуса телят (⁹), вместе с аналогичными данными, полученными другими авторами для субфракций гистона, выделенного из тимуса кролика (¹⁰), показало, что молекулу гистона H1 можно в первом приближении рассматривать состоящей из четырех независимых участков (табл. 1), характеризующихся ярко выраженным консерватизмом в аминокислотном составе для N-концевого (1-14), центрального (37-106) и С-концевого (107-202) фрагментов молекулы и вариабельностью в участке 15-36.

Молекула гистона H1 в целом характеризуется также уникальным распределением заряженных и аплярных алифатических остатков аминокислот в полипептидной цепи (табл. 1), несомненно влияющим на возможные белок-белковые и белок-нуклеиновые взаимодействия в хроматиновых фибриллах. При рассмотрении взаимодействия гистона H1 с полианионной ДНК матрицей роль двух катионных центров молекулы гистона (15-36) и (107-212) сводится, по-видимому, главным образом к реализации типичных электростатических контактов. Функциональная роль гистона в процессе компактизации хроматина за счет специфической пространственной геометрии белкового компонента в составе нуклеопротеида, в свою очередь, в основном может определяться структурой центрального сегмента (37-106) молекулы. В этой связи не удивителен характер его структуры, свойственный обычно глобулярным белкам, и консерватизм в аминокислотной последовательности в этой части молекулы для разных субфракций гистона, который может быть обусловлен жестким требованием к первичной структуре взаимодействующих участков.

Явная асимметрия в распределении аминокислотных остатков разного типа вдоль полипептидной цепи молекулы гистона H1 позволяет исследовать подвижность различных фрагментов его молекулы, участвующих в

Таблица 1

Распределение аминокислотных остатков в гистоне H1

Остатки аминокислот	Гистон H1			
	1—14	15—36	37—106	107—212
Основные	0	10	11	43
Кислые	3	0	5	2
Алифатические *	0—1	1	16	4
Ароматические	0	0	2	0
Pro	3—4	2—3	2	16
Ala	6	5—6	11	34

* В состав алифатических остатков аминокислот включены только Val, Leu и Ile.

Таблица 2

Отношение интенсивностей п.м.р. линий CH_3 -групп Val, Leu, Ile ($I_{\text{алиф}}$)
к интенсивности линии Ala ($I_{\text{ала}}$)

	H1 0,5 M NaCl	H1+ДНК 0,5 M NaCl	H1+ДНК 5 M мочевины, 0,5 M NaCl	p H1 * 0,2 M NaCl	p H1 *+ДНК 0,2 M NaCl
$I_{\text{алиф}}/I_{\text{ала}}$	0,38	0,32	0,73	0,42	0,55

*pH1 — фосфорилированный по Ser-38 гистон H1.

конформационном переходе, методом протонного магнитного резонанса (п.м.р.).

В диамагнитных системах ширина резонансных линий протонов соответствующих остатков аминокислот в спектре п.м.р. зависит от подвижности химических групп, содержащих данные ядра. Ограничение подвижности аминокислотных остатков в белках, стабилизированных при комплексообразовании или образовании вторичной структуры, приводит к уменьшению времени релаксации и, следовательно, к уширению линий п.м.р. соответствующих протонов (¹⁴).

На рис. 1, 2 представлены спектры п.м.р. нативного и фосфорилированного по остатку Ser-38 гистонов H1 в водно-солевых растворах и их комплексов с ДНК и показано соотнесение линий спектра соответствующим радикалам аминокислотных остатков гистона. Спектры п.м.р. снимали на спектрометре НХ-90 Е фирмы «Bruker» (ФРГ) с фурье-преобразованием. Химические сдвиги (м.д.) даны относительно $(\text{CH}_3)_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$. Суммарный препарат гистона H1 выделен по методу Джонса (¹²) и фосфорилирование его по остатку Ser-38 проведено согласно описанной нами ранее методике (¹³). Комплексы гистона с ДНК получали при смешивании компонентов в 1,5 M NaCl—D₂O, pH 6,5, при весовом соотношении ДНК/белок 1:1 с последующим градиентным диализом до необходимой концентрации соли. Концентрация гистона во всех случаях составляла 7 мг/мл. Анализ линий высокопольной области спектра п.м.р. приведен в табл. 2, в которой сопоставлены относительные величины интенсивностей резонансных линий метильных групп алифатических аминокислотных остатков гистона H1 к интенсивности метильной линии аланина. Последняя величина является мерой структурирования белковой молекулы и обычно служит характеристикой нативности белков, поскольку сигнал протонов CH_3 -группы аланина слабо меняется при различных изменениях среды (¹⁴). Как видно из табл. 1, алифатические аполярные остатки аминокислот сгруппированы главным образом в центральном сегменте молекулы гистона H1, поэтому проводимый нами анализ линий п.м.р. алифатических остатков гистона H1 свидетельствует в основном о степени упорядоченности структуры в центральном участке молекулы гистона.

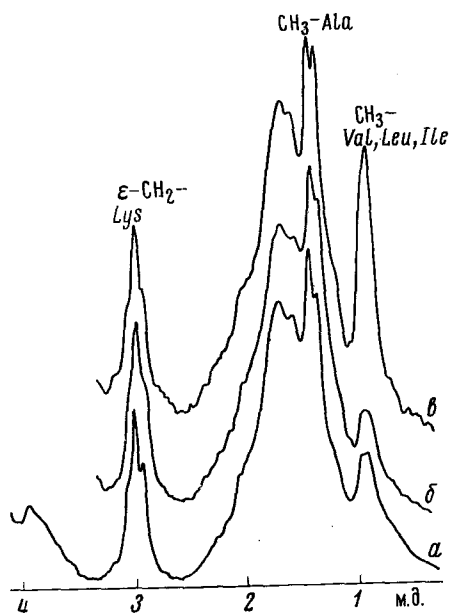


Рис. 1

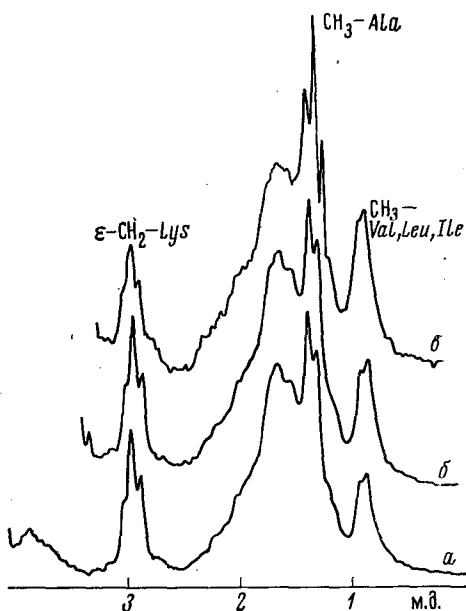


Рис. 2

Рис. 1. Спектр п.м.р. гистона Н1. а — в 0,5 М NaCl; б — в комплексе с ДНК, 0,5 М NaCl; в — в комплексе с ДНК, 0,5 М NaCl 5 М мочевины

Рис. 2. Спектр п.м.р. Ser-38 фосфогистона Н1. а — в 0,5 М NaCl; б — в комплексе с ДНК, 0,5 М NaCl; в — в комплексе с ДНК, 0,2 М NaCl

Сравнение спектров п.м.р. исходного гистона Н1 и его фосфорилированного производного в водно-солевых растворах с различной ионной силой показывает, что остатки аполярных аминокислот гистона во фрагменте молекулы 37—106 обладают ограниченной подвижностью, по-видимому, вследствие образования упорядоченной вторичной структуры.

Анализ первичной структуры гистона Н1 показывает, что одним из наиболее предпочтительных вариантов специфической укладки центрального 37—106 сегмента гистона является модель, в которой обеспечивается образование β-структуры молекулы с взаимодействием Tyr-73 с остатком Leu-84, Asp-74 с Lys-83 и т. д. При этом достигается максимальная компенсация зарядов боковых аминокислотных радикалов этого участка молекулы и создаются условия специфического взаимодействия остатков гидрофобного характера.

Незначительное, но экспериментально достоверное уменьшение интенсивности линий CH_3 -протонов аполярных остатков гистона при образовании комплекса с ДНК наиболее вероятно связано с тем, что при комплексообразовании фрагмент 37—106 молекулы гистона Н1 становится еще более структурированным. В тех же условиях присутствие ДНК приводит к увеличению ширины триплетных линий п.м.р. метиленовых групп остатков лизина, что указывает на стабилизацию этих остатков при взаимодействии с ДНК.

В то же время следует отметить, что водородные связи и гидрофобные взаимодействия аминокислотных радикалов молекулы гистона Н1 также в значительной степени определяют стабилизацию комплекса гистона с ДНК и его вторичную структуру. Добавление к комплексу 5 М мочевины (рис. 1, в) приводит к практически полному разворачиванию белковой молекулы и разрушению комплекса. Этот результат проявляется в спектрах п.м.р. в увеличении относительной интенсивности линий CH_3 -групп остатков валина, лейцина и изолейцина, а также в уменьшении ширины резонансных линий CH_2 -групп лизиновых остатков (табл. 2).

Спектр п.м.р. фосфорилированного по Ser-38 фосфогистона HI качественно подобен спектру немодифицированного HI. Существенные различия, однако, наблюдаются при образовании комплексов гистонов с ДНК. В спектре п.м.р. фосфогистона в комплексе с ДНК (рис. 2) линии протонов CH_2 -групп остатков лизина, так же как и в случае образования комплекса с нефосфорилированной молекулой, уширяются по сравнению со спектральными линиями протонов этих групп в отсутствие ДНК. Однако интенсивность линий CH_2 -радикалов алифатических аполярных остатков, напротив, увеличивается (табл. 2), т. е. в комплексе ДНК с фосфогистоном свободное вращение центрального сегмента молекулы 37–106 менее заторможено. Можно считать, что степень упорядоченности структуры в этой части молекулы гистона при комплексообразовании существенно ниже, чем (1) в нативном гистоне HI, (2) в комплексе нативного гистона с ДНК и (3) в фосфогистоне в отсутствие ДНК.

При повышении ионной силы раствора до 0,5 M спектр п.м.р. комплекса фосфорилированного гистона с ДНК (рис. 2, б) практически не отличается от спектра самого гистона. Следовательно, в отличие от комплекса нативного гистона с ДНК, в тех же условиях фосфорилированный гистон HI взаимодействует с молекулой ДНК очень слабо.

Можно полагать, что фосфорилирование молекулы в участке, граничащем с одним из катионных локусов гистона (15–36), обладающих к тому же наибольшей вариабельностью в аминокислотном составе для разных субфракций гистона, ослабляет электростатический контакт с молекулой ДНК участка гистона 15–36. При этом, как следует из табл. 2, центральный сегмент молекулы гистона 37–106 относительно дезорганизуется, утрачивает в значительной степени вторичную структуру и становится способен к более свободному вращению.

Изложенные данные показывают, что фосфорилирование остатка серина-38 гистона HI приводит к ослаблению связи гистон–ДНК и препятствует образованию вторичной структуры или белок-белковых взаимодействий гистона в нуклеопротеидном комплексе. Этот результат ставит под сомнение выдвинутую ранее гипотезу о конденсации хроматиновых фибрилл, осуществляемой при фосфорилировании гистона HI за счет компактизации белкового компонента^(3,4). Возможно, однако, что фосфорилирование гистонического субстрата по другим центрам, особенно в С-концевой части молекулы, может быть связано с процессом компактизации ДНК-белковых комплексов. Во всяком случае, на основании данных, полученных в настоящей работе при изучении свойств комплекса ДНК гистон HI при проведении специфического фосфорилирования гистона по остатку серина-38 можно сделать вывод об отсутствии влияния этого процесса на компактизацию хроматина.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
13 X 1975

Институт биофизики
Академии наук СССР
Пушкино Московской обл.

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. E. Mirsky, C. Y. Burdick et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 61, 592 (1968).
- ² A. I. Louie, G. H. Dixon, Nature, New Biol., v. 243, 164 (1973). ³ E. M. Bradbury, B. G. Carpenter, H. W. E. Rattle, Nature, v. 241, 123 (1973). ⁴ E. M. Bradbury, R. J. Inglis, H. R. Matthews, Nature, v. 247, 257 (1974). ⁵ T. A. Langan, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 64, 1276 (1969). ⁶ R. S. Lake, J. Cell Biol., v. 58, 347 (1973). ⁷ M. V. Nesterova, L. P. Sashchenko et al., Biochim. et biophys. acta, v. 377, 271 (1975). ⁸ T. A. Langan, Federat. Proc., v. 30, 1089 (1971). ⁹ A. A. Арутюнян, С. В. Шляпников, Е. С. Северин, Биоорганическая химия, т. 1, 1188 (1975). ¹⁰ R. J. Delange, E. L. Smith, Accounts of Chem. Res., v. 5, 368 (1972). ¹¹ E. M. Bradbury, P. D. Cary et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 222, 266 (1973). ¹² E. W. Johns, Biochem. J., v. 92, 55 (1964). ¹³ S. V. Shlyapnikov, A. A. Arutyunyan et al., FEBS Letters, v. 53, 316 (1975). ¹⁴ J. H. Bradbury, N. L. King, J. M. O'Shea, Intern. J. Peptide Protein Res., v. 4, 257 (1972).