

Ю. И. Губский, Р. Г. Примак, А. Г. Горюшко, Е. Л. Левицкий

## ИЗУЧЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ ФРАКЦИЙ ХРОМАТИНА ПЕЧЕНИ КРЫС МЕТОДАМИ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДИРОВАНИЯ

*С использованием методов флюоресцентного зондирования фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина печени крыс установлена различная способность к связыванию зондов с этими фракциями. Увеличение сродства флюорескамина (зонда, специфичного для гистоновых белков) к фракции репрессированного хроматина и бромистого этидия (зонда, специфичного для ДНК) к транскрипционно активной фракции позволяет утверждать важность ДНК-гистоновых контактов, в первую очередь, с гистоном H1 в молекулярных механизмах активации транскрипции в клетках эукариот. Наряду с этим, обнаружение большей доступности зонда для негистоновых белков к которым относятся РНК-полимеразы, во фракции активного хроматина подтверждает значимость структурного состояния и количества молекул этих ферментов в механизмах активации генома.*

**Введение.** Функциональные различия между активно транскрибируемыми последовательностями и транскрипционно низкоактивными участками в геноме обусловлены в основном высшими порядками структурной организации хроматина [1—3]. Недавно была показана важность изменений белкового компонента хроматина для определения различий в транскрипционной активности его фракций [4]. Однако остается невыясненным вклад отдельных компонентов хроматина в механизм его активации.

Данная работа является продолжением ранее начатых исследований конформационных характеристик двух функционально различных фракций ядерного хроматина — транскрипционно активного (ТАХ) и репрессированного (РХ) [5—7]. Однако, если в предыдущих работах обнаруженные существенные различия в конформации фракций касались в основном суммарных характеристик белковой и липидной составляющих, то цель настоящего исследования — выявление структурных особенностей гистоновых, негистоновых белков, а также ДНК в составе фракций хроматина, различающихся по уровню транскрипционной активности.

**Материалы и методы.** В работе использовали крыс-самок линии Вистар 3-месячного возраста (150—200 г). Животных декапитировали под легким эфирным наркозом в утренние часы, извлекали печень и выделяли из нее фракции ТАХ и РХ [8]. Концентрацию ДНК и белка во фракциях хроматина определяли спектрофотометрически [9].

Структурные особенности белков во фракциях хроматина изучали с помощью зонда флюорескамина («Tetra», Украина) и диффузионного тушителя флюоресценции — акриламида («Reanal», Венгрия) при длинах волн возбуждения 390 и 286 нм соответственно.

Состояние ДНК во фракциях хроматина оценивали по связыванию с бромистым этидием («Seriva», ФРГ) как по спектрам флюоресценции при длине волны возбуждения 490 нм, так и спектрам поглощения в диапазоне 340—600 нм.

Измерения проводили на спектрофотометре «Shimadzu MPS-5000» (Япония) и спектрофлуориметре «Hitachi MPF-4» (Япония) в кюветках с длиной оптического пути 1 см при 20 °С.

<sup>14</sup>C-Оротат (900 МБк/ммоль, Венгрия) и <sup>14</sup>C-лейцин (1,9 ТБк/ммоль, «Изотоп», Россия) вводили внутривенно за 30 мин до декапитации

© Ю. И. Губский, Р. Г. Примак, А. Г. Горюшко, Е. Л. Левицкий, 1994

в дозе 4,0 и 1,3 МБк на 1 кг массы соответственно. Радиоактивность определяли, как описано ранее [10]. Результаты выражали в расп/мин на 1 мг ДНК или белка хроматина соответственно.

Экспериментальные данные обрабатывали методами непараметрической статистики [11].

**Результаты и обсуждение.** В табл. 1 приведены данные, иллюстрирующие различную степень транскрипционной активности фракций РХ и ТАХ. Для ТАХ величина включения  $^{14}\text{C}$ -орота в РНК более чем в 20 раз выше по сравнению с РХ. Включение  $^{14}\text{C}$ -лейцина в белки

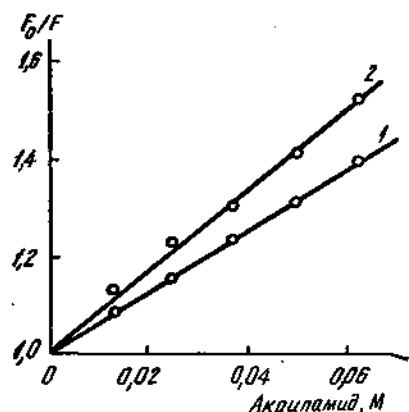


Рис. 1. Тушение собственной белковой флуоресценции РХ (1) и ТАХ (2) акриламидом в координатах Штерна—Фольмера

Таблица 1  
Включение меченых предшественников синтеза РНК и белка во фракции хроматина печени интактных крыс ( $n=4-8$ )

Условия эксперимента	Фракция хроматина	
	РХ	ТАХ
$^{14}\text{C}$ -Оротат, расп/мин на 1 мг ДНК	1717	35599*
$^{14}\text{C}$ -Лейцин, расп/мин на 1 мг белка	487	1788*

\*  $p < 0,01$  (по сравнению с РХ).

ТАХ также происходит более интенсивно ( $\sim$  в 4 раза) по сравнению с РХ, что свидетельствует о большей скорости синтеза белков активной фракции.

Для характеристики состояния негистоновых белков фракций хроматина использовали явление тушения белковой флуоресценции акриламидом. Условия регистрации собственной флуоресценции (длина волны возбуждения 286 нм) позволяют сделать вывод о том, что, в соответствии с [12], мы наблюдали исключительно флуоресценцию триптофановых остатков. Кроме того, поскольку гистоны не содержат в своем составе остатков триптофана и вся их собственная флуоресценция обусловлена остатками тирозина [13], гистоновые белки, таким образом, оставались вне поля зрения при регистрации тушения белковой флуоресценции акриламидом, обусловленной в данном случае негистоновыми белками.

Результаты тушения собственной белковой флуоресценции фракций хроматина приведены на рис. 1. Полученные зависимости в координатах Штерна—Фольмера [12] являются прямыми линиями, указывая на то, что мы имеем дело с одним типом флуорофоров и наблюдаем динамическое тушение. Степень доступности флуоресцентных центров негистоновых белков в ТАХ заметно выше, нежели в РХ: 8,5 и 6,3  $\text{M}^{-1}$  соответственно (табл. 2). Другими словами, негистоновые белки в ТАХ обладают более высокой подвижностью, чем в РХ, что согласуется с нашими данными, полученными ранее относительно важности вклада изменений структурного состояния белков хроматина в уровень его транскрипционной активности, а также о большем содержании негистоновых белков в активной фракции хроматина [4].

Для изучения структурного состояния белково-нуклеиновых комплексов во фракциях хроматина использовали краситель флуорескамин, образующий интенсивно флуоресцирующий ковалентный комплекс с аминогруппами лизиновых остатков [14], которыми богаты гистоновые белки хроматина. Проведенные исследования показали, что, в отличие от индивидуальных гистоновых белков, где время встраивания флуорескамина составляет около 30 с [14], во фракциях РХ и ТАХ встраивание продолжается в течение 60 мин (рис. 2). С учетом времени, необходимого для встраивания зонда, было проведено флуориметри-

ческое титрование растворов флюорескамина РХ- и ТАХ-фракциями (в 0,01 SSC), результаты которого представлены на рис. 3. Как можно видеть, количество доступных лизиновых остатков в нуклеопротеидах РХ значительно выше, нежели в ТАХ, при равной концентрации белка. Ранее было показано, что в РХ содержится большее количество гистонов по сравнению с ТАХ, в первую очередь, гистона Н1 [4], что и нашло свое отражение в экспериментах с флюорескамином. Таким образом, флюорескамин вполне пригоден для изучения не только индивидуальных гистоновых белков, но и для более сложных биообъек-

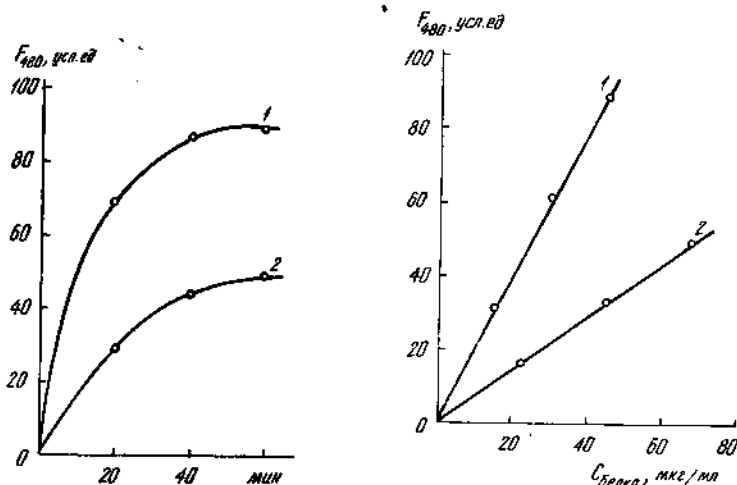


Рис. 2. Кинетика встраивания флюорескамина ( $C=2,5 \cdot 10^{-2}$  мг/мл) во фракциях РХ (1) и ТАХ (2)

Рис. 3. Зависимость интенсивности флюоресценции флюорескамина ( $C=2,5 \cdot 10^{-2}$  мг/мл) от концентрации белка во фракциях РХ (1) и ТАХ (2)

тов — фракций РХ и ТАХ, включающих различное количество лизиновых остатков, являющихся субстратом для связывания флюорескамина.

Результаты определения степени встраивания флюорескамина в белки хроматина (см. табл. 2) свидетельствуют о большей степени средства зонда к фракции РХ ( $\sim$  в 3 раза), что согласуется с большим содержанием гистоновых белков в этой фракции, в особенности гистона Н1 [4], который, в отличие от других гистонов, не формирует гистоновый октамер нуклеосомы и, таким образом, может быть одним из основных субстратов связывания флюорескамина.

Для изучения структурного состояния ДНК во фракциях РХ и ТАХ было проведено флюоресцентное зондирование бромистым этидием, хорошо известным флюоресцентным зондом, образующим комплексы с нуклеиновыми кислотами [15—17]. В рассматриваемых фракциях хроматина ДНК имеет различную упаковку [4] и, следовательно, различную доступность для зонда. Для выяснения способности ДНК, содержащейся в РХ и ТАХ, к комплексообразованию с бромистым этидием использовали методику [15], позволяющую определить величину числа мест ( $N$ ) и константу связывания ( $K_c$ ). Результаты определений приведены в табл. 2, откуда следует, что ДНК во фракции РХ образует менее прочные комплексы с бромистым этидием ( $\sim$  в 2 раза) по сравнению с ДНК в ТАХ, при этом число мест связывания в РХ значительно больше, чем в ТАХ. Это свидетельствует о том, что доступность положительно заряженного катиона бромистого этидия в ДНК во фракции ТАХ больше, чем в РХ, и может быть обусловлено различной структурной упаковкой ДНК изучаемых фракций. Последнее, в свою очередь, может являться одним из факторов, определяющих неодинаковый уровень транскрипционной активности (см. табл. 1). Подтверждением этому является сопоставление величин полученных нами констант с приведенными в литературе для индивидуального препарата

ДНК, выделенной из тимуса теленка [16]. Величины констант связывания бромистого этидия с препаратом ДНК на два порядка выше, чем в рассматриваемых фракциях. Это позволяет заключить, что способность к связыванию положительно заряженного катиона бромистого этидия с ДНК возрастает по мере освобождения ее от связи с белками и другими компонентами в хроматине.

Для более детального изучения процесса взаимодействия ДНК во фракциях хроматина с бромистым этидием было проведено спектрофотометрическое титрование раствора бромистого этидия РХ и ТАХ,

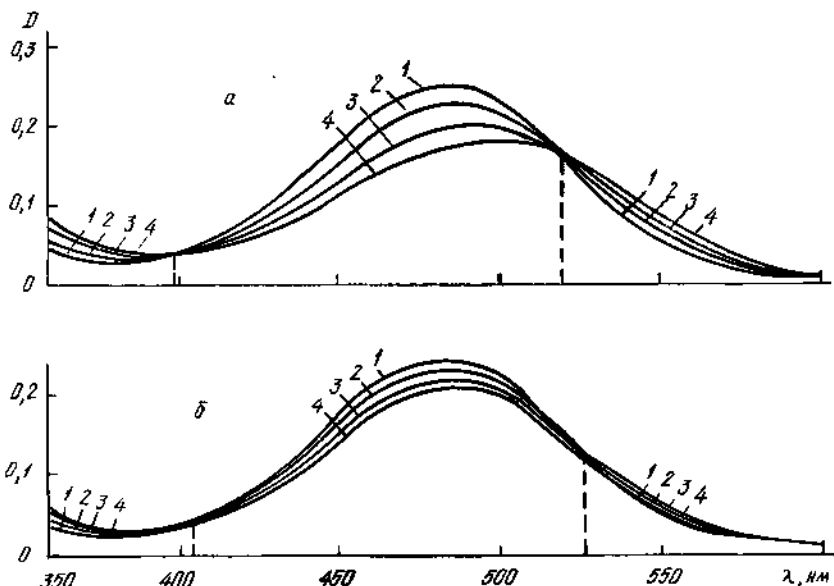


Рис. 4. Спектры поглощения бромистого этидия ( $C=5 \cdot 10^{-5}$  М) при взаимодействии с фракциями РХ (а) и ТАХ (б). Концентрация (мг/мл) ДНК во фракциях составляла для РХ: 1—0; 2— $7,4 \cdot 10^{-3}$ ; 3— $1,5 \cdot 10^{-2}$ ; 4— $2,2 \cdot 10^{-2}$ ; для ТАХ: 1—0; 2— $2,0 \times 10^{-3}$ ; 3— $7,0 \cdot 10^{-3}$ ; 4— $1,2 \cdot 10^{-2}$

результаты которого приведены на рис. 4. Видно, что при образовании комплекса бромистого этидия с ДНК хроматина наблюдается снижение оптической плотности раствора при 485 нм и ее возрастание в длинноволновой и коротковолновой областях спектра с наличием изобестических точек 405—415 нм и 515—520 нм. Эти данные свидетельствуют об образовании одной из форм комплекса, который, в соответствии с данными литературы [17], является результатом электростатического взаимодействия катиона бромистого этидия с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК. При этом различная эффективность комплексообразования в РХ и ТАХ наглядно проявляется на приведенных спектрах поглощения в величинах изменения оптиче-

Таблица 2

Физико-химические характеристики фракций хроматина, полученные с помощью флуоресцентного зондирования ( $n=4-8$ )

Показатель	Фракция хроматина	
	РХ	ТАХ
Константа связывания с бромистым этидием, $M^{-1} \cdot л$	$4,1 \cdot 10^4$	$9,3 \cdot 10^{4*}$
Число мест связывания с бромистым этидием, М/мг	$3,1 \cdot 10^{-5}$	$8,7 \cdot 10^{-6*}$
Штерн-Фольмеровская константа тушения акриламидом, $M^{-1}$	6,3	8,5*
Степень астраивания флуорескамина, усл. ед.	65	24*

\* См. табл. 1.

ской плотности растворов, подтверждая данные, полученные с помощью флуориметрии.

Таким образом, результаты настоящей работы позволили уточнить и расширить опубликованные ранее данные об особенностях структурной упаковки фракций РХ и ТАХ [4, 7], являющихся одним из факторов, определяющих различия в их транскрипционной активности. Помимо обогащения гистоновыми белками, в особенности гистонем Н1, которые рассматриваются в качестве одних из основных факторов ингибирования транскрипции в клетках эукариот [18], фракция РХ имеет также меньшую степень связывания с бромистым этидием, что может быть результатом более эффективного взаимодействия ДНК этой фракции с гистонем Н1 по сравнению с фракцией ТАХ, что в конечном итоге может вызывать значительное увеличение транскрипционной активности ТАХ по сравнению с РХ (см. табл. 1).

Полученные с помощью флуоресцентного зондирования результаты расширяют современные представления о механизмах активации транскрипции в клетках эукариот. Они подтверждают высказанные ранее предположения и экспериментальные данные о значительном вкладе ДНК-белковых взаимодействий (в особенности о роли гистона Н1 в этих процессах) в механизмы активации транскрипции в клетках эукариот [17, 19] наряду с возможным увеличением концентрации РНК-полимераз в активно транскрибируемых участках генома. Косвенным подтверждением этому являются наши сведения об увеличении количества и доступности для зонда негистоновых белков ТАХ, в состав которых входят и РНК-полимеразы.

*Ю. І. Губський, Р. Г. Примак, Г. Г. Горюшко, Є. Л. Левицький*

#### ВИВЧЕННЯ КОМПОНЕНТІВ ФРАКЦІЇ ХРОМАТИНУ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ МЕТОДАМИ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДУВАННЯ

##### Резюме

З використанням методів флуоресцентного зондування фракцій транскрипційно активної та репресованої хроматину печінки щурів встановлено різну здатність зв'язування зондів з цими фракціями. Збільшення спорідненості флуорескаміну (зонда, специфічного для гістонових білків) до фракції репресованого хроматину та бромистого етидію (зонда, специфічного для ДНК) до фракції транскрипційно активної хроматину дозволяє стверджувати важливість ДНК-гістонових контактів, у першу чергу, з гистонем Н1 у молекулярних механізмах активації транскрипції у клітинах еукариот. Поряд з цим, виявлення більшої доступності зонда для негістонових білків, до яких відносяться РНК-полімерази у фракції ТАХ, підтверджує значення структурного стану та кількості молекул цих ферментів у механізмах активації геному.

*Yu. I. Gubskiy, R. G. Primak, A. G. Goryushko, E. L. Levitsky*

#### THE STUDY OF THE COMPONENTS OF THE RAT LIVER CHROMATIN FRACTIONS BY FLUORESCENT PROBING METHODS

##### Summary

Using fluorescent probing of transcriptionally active and repressed rat liver chromatin fractions different extent of fluorescent probes bounding with fractions was determined. Augmented bounding of fluorescamin (specific to histones) with repressed chromatin and ethidium bromide to transcriptionally active one permit to suppose the important role of DNA-histones contacts in determination of the activity in transcription of nuclear chromatin fractions in eukaryotic cells. Besides that it was shown more accessibility of fluorescent probe to nonhistone proteins in transcriptionally active chromatin fraction. In view of that RNA polymerases are nonhistone proteins, it may be consider the importance of structural organization and quantity of these enzymes molecules for the genome activation mechanisms.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Студитский В. М., Бежавский А. В., Мельников А. Ф. и др. Структура минимальных нуклеосом, расположенных на транскрибируемых участках генома // Молекуляр. биология.—1988.—22, № 3.—С. 706—717.
2. Reeves R. Transcriptionally active chromatin // Biochim. et biophys. acta.—1984.—782, N 2.—P. 343—393.
3. Reeves R., Jones A. Genomic transcriptional activity and the structure of chromatin // Nature.—1976.—260, N 5551.—P. 495—500.
4. Левицкий Е. Л., Губский Ю. И., Чабаный В. Н. и др. Биохимическая характеристика фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина // Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 6.—С. 11—19.
5. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Примак Р. Г. и др. Конформационные характеристики и характер упаковки эндогенных липидов фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина // Укр. биохим. журн.—1991.—63, № 2.—С. 83—89.
6. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Примак Р. Г., Величко А. Н. Изменение структурного состояния фракционированного хроматина печени при активации перекисного окисления липидов // Биополимеры и клетка.—1991.—7, № 3.—С. 89—94.
7. Примак Р. Г., Горюшко А. Г., Левицкий Е. Л. и др. Изучение конформационных характеристик транскрипционно активного и репрессированного хроматина с помощью флуоресцентных зондов // Биополимеры и клетка.—1994.—10, № 1.—С. 41—46.
8. Чихиржина Г. И., Домкина Л. К., Чигарева Н. Г., Ашмарин И. П. Солюбилизация хроматина эндогенным  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимым фактором. Активность труднорастворимого хроматина // Молекуляр. биология.—1976.—10, № 6.—С. 1303—1310.
9. Цанев Р. Г., Марков Г. Г. К вопросу о количественном спектрофотометрическом определении нуклеиновой кислоты // Биохимия.—1960.—25, № 1.—С. 151—159.
10. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн Н. Б. и др. Функциональная активность фракционированного хроматина печени крыс при однократном введении тетрахлорметана // Вопр. мед. химии.—1989.—35, № 4.—С. 119—124.
11. Ашмарин И. П., Васильев И. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов.—Л.: Изд-во ЛГУ, 1975.—78 с.
12. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии.—М.: Мир, 1986.—496 с.
13. Сиволоб А. В., Храпунов С. Н. Флуоресцентная спектроскопия в исследованиях белково-нуклеиновых взаимодействий в хроматине // Биополимеры и клетка.—1992.—8, № 1.—С. 89—100.
14. Vode J. On the reaction of fluorescamine with chromosomal proteins // Anal. Biochem.—1979.—99, N 2.—P. 274—280.
15. Lawrence J. J., Louis M. Ethidium bromide as a probe of chromatin structure // FEBS Letters.—1974.—40, N 1.—P. 9—12.
16. Le Pecq J. B., Paeletti C. A. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids // J. Mol. Biol.—1967.—27, N 1.—P. 87—106.
17. Le Pecq J. B. Use of ethidium bromide for separation and determination of nucleic acids for various conformational forms and measurement of their association with enzymes // Meth. Biochem. Anal.—1971.—20.—P. 41—86.
18. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др. Основы биохимии.—М.: Мир, 1981.—1878 с.
19. Matthews H. Modification of histone H1 by reversible phosphorylation and its relation to chromosome condensation and mitosis // Mol. Asp. Regul.—1980.—1.—P. 235—254.

Ин-т фармакологии и токсикологии АМН Украины. Киев

Получено 23.05.94