

Сравнительный анализ структуры и свойств гистонов H1 и H1⁰

А. Ф. Протас

Национальный университет «Киево-Могилянская Академия», Украина
254070, Киев, ул. Сковороды, 2

Исследовали структуру и свойства гистонов H1 и H1⁰ из клеток коры головного мозга крыс. В растворе в условиях, близких к физиологическим, гистоны H1 и H1⁰ имеют константы тушения флуоресценции акриламидом 1,4 и 2,0 М⁻¹, константы связывания с 1,8-АНС — 14,6 и 5,5 мМ. Способность к агрегации в растворе у H1⁰ значительно ниже. При обработке ядер метил-4-меркаптобутиримидатом в полимеры сшиваются преимущественно H1. Сделан вывод о том, что функция гистона H1⁰ в хроматине может реализоваться преимущественно на локальном уровне. Это обусловлено более компактной пространственной организацией глобулярной части гистона H1⁰.

Введение. После известного периода очень активного изучения структуры хроматина и его компонентов остался нерешенным ряд проблем, в частности, взаимосвязь между гетерогенностью гистонов и структурно-функциональной организацией хроматина. В первую очередь, это касается гистона H1⁰.

Известно, что структура хроматина нейронов коры головного мозга имеет ряд специфических черт. Это почти полное отсутствие линкерной ДНК и в два раза меньшее содержание гистона H1, нежели обычно, причем значительную его часть (около 20 %) составляет гистон H1⁰ [1]. В таких условиях роль варианта гистона (в данном случае H1⁰) в общей структуре хроматина, несомненно, становится весьма существенной.

Структура и свойства гистона H1 в настоящее время изучены довольно подробно как в составе хроматина, так и в растворе. Известно, что функция гистона H1 реализуется через образование своеобразного полимера вдоль хроматиновой фибриллы [2]. В составе хроматина и в растворе молекулы гистонов H1 взаимодействуют между собой глобулярными фрагментами [3—5]. Этому соответствует наличие на поверхности молекулы гидрофобного сайта взаимодействия с флуоресцентным зондом АНС (1,8-анилинонафталиносulfонат) [5]. Гистон H1⁰ по первичной структуре

ближе к гистону H5, нежели к H1 [6]. На этом основании считают, что он, аналогично гистону H5 в эритроцитах, обеспечивает дополнительную репрессию хроматина. Содержание H1⁰ увеличивает при снижении способности клеток к пролиферации и старении [7], а также в отдаленный период после гамма-облучения низкими дозами [8]. Это сопровождается определенными изменениями в пространственной организации хроматина. Однако определить реальную роль гистона H1⁰ в этих изменениях не представляется возможным в связи с отсутствием исследований, проливающих свет на его свойства и возможные механизмы действия.

Материалы и методы. Ядра из коры головного мозга крыс выделяли в сахарозной среде [9]. Гистоны H1 и H1⁰ выделяли экстракцией 5 %-м раствором HClO₄ и разделяли методом препаративного электрофореза [10]. Из геля гистоны экстрагировали электроолюцией на аппарате «Экстрафор» («LKB», Швеция). Собственную флуоресценцию гистонов и флуоресценцию АНС регистрировали при $\lambda_{возб} = 278$ и 365 нм, $\lambda_{эм} = 303$ и 365 нм соответственно. Константы тушения собственной флуоресценции акриламидом и константы связывания зонда рассчитывали, как описано в работе [5]. Об агрегацию гистонов судили по оптической плотности при 330 нм. Измерения проводили на спектрофлуориметре F-4000 («Hitachi», Япония) и спектрофотометре DU-65 («Beckman», США). Ковалентные сшивки гистонов в составе

ядра осуществляли с помощью метил-4-меркапто-бутиримидата (ММБИ) аналогично методу, описанному в [11], гистоны экстрагировали 5 %-м раствором HClO_4 и разделяли электрофоретически [10], денситометрию гелей проводили на денситометре Camag TLCII («Donaу», Швейцария).

Результаты и обсуждение На рис. 1 представлены результаты зависимости интенсивности флюоресценции связанного АНС от ионной силы раствора. Ранее было показано [4], что третичная структура гистона H1 (из тимуса теленка) зависит от ионной силы и при концентрации NaCl выше 50 мМ является практически полностью сформированной. Согласно аналогичным исследованиям флюоресцентных свойств H1 , при этой концентрации обнаруживается некоторое особое его состояние, проявляющееся в высоком уровне связывания АНС [5]. Приведенные результаты хорошо согласуются с этими данными. Отличительной особенностью гистона H1^0 является более низкая интенсивность флюоресценции связанного АНС в диапазоне физиологических концентраций NaCl . На основании титрования раствора гистонов в 100 мМ NaCl АНС (рис. 2) определены константы связывания АНС с гистонами. Для гистона H1^0 константа значительно ниже (таблица). То есть степень гидрофобности определенного локуса на поверхности глобулярной части молекулы, который регистрируется с помощью АНС, значительно меньше у гистона H1^0 . Наиболее вероятно, что это обусловлено некоторыми отличиями в пространственной организации гистонов. Для решения этого вопроса были исследованы степени компактности третичной структуры гистонов методом тушения их собственной флюоресценции. Хорошо известно, что гистоны

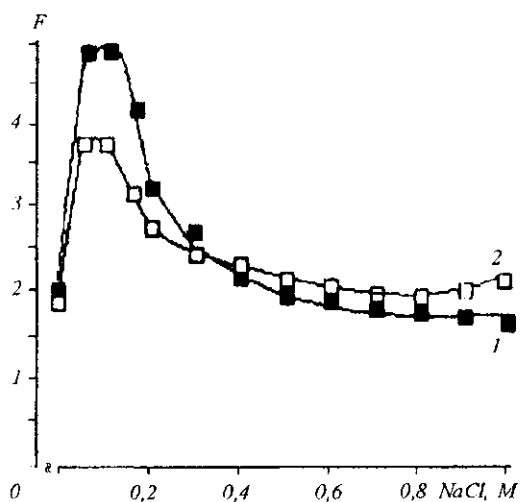


Рис. 1. Влияние ионной силы раствора на интенсивность флюоресценции АНС (F) в присутствии гистонов H1 (1) и H1^0 (2)

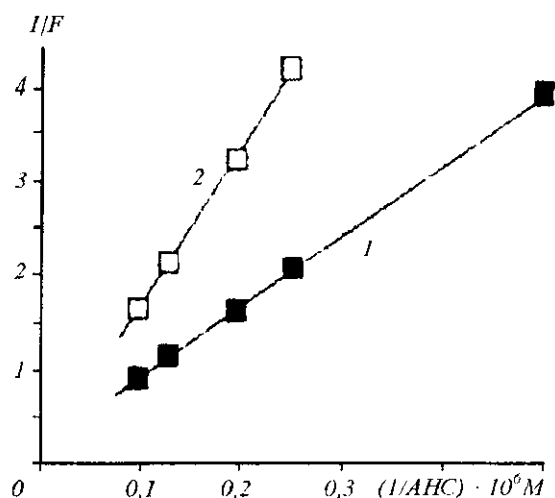


Рис. 2. Графики связывания АНС с гистонами H1 (1) и H1^0 (2) (в двойных обратных координатах); F — интенсивность флюоресценции АНС

H1 из разных тканей и организмов содержат один Туг, входящий в состав глобулярной части. Таким образом, он является удобным естественным зондом, отражающим особенности структуры глобулы. На основании этого определены параметры тушения флюоресценции остатка тирозина в составе гистонов акриламидом (рис. 3, таблица). Акриламид — нейтральный агент, способный проникать даже в наиболее гидрофобные зоны белков. Оказалось, что остаток Туг в H1^0 менее доступен акриламиду, нежели в H1 . Следовательно, глобулярные части молекул гистонов несколько различаются по пространственной организации. В частности, у H1^0 она значительно более компактна.

Уникальным свойством гистонов H1 является их способность к образованию высокомолекулярных агрегатов в растворе в присутствии кристаллов NaCl [4]. Очевидно, что аналогичные полимеры образуются в составе хроматина. H1 и H1^0 существенно различаются по способности к формированию агрегатов в растворе (рис. 4, таблица). До некоторой концентрации NaCl общий ход кривых примерно одинаков, однако далее увеличение размеров агрегатов гистона H1^0 резко тормозится, тогда как H1 — продолжается практически с линейной зависимостью. Следовательно, H1^0 способен агрегировать только до некоторого минимального уровня.

Выше отмечалось, что в составе хроматина гистоны H1 образуют своего рода полимер вдоль 30 нм фибриллы. Это показано с помощью бифункциональных сшивающих агентов. Результаты ис-

следований на ядрах нейронов демонстрируют, что ММБИ сшивает в полимеры гистоны H1 и H1⁰ не равновероятно (рис. 5, таблица). В противном случае в мономерах их соотношение было бы таким же, как в интактных ядрах. При этом следует учесть, что ММБИ имеет достаточно большую молекулярную длину. Поэтому в какой-то степени возможно образование и неспецифических сшивок неконтактирующих молекул.

Параметры гистонов H1 и H1⁰ в растворе и в составе хроматина

Параметр	H1	H1 ⁰
Константа связывания с АНС	14,6 мМ	5,5 мМ*
Константа тушения акриламидом	1,4 М ⁻¹	2,0 М ⁻¹ *
Интенсивность агрегации, ΔA ₄₀₀ /Δ[NaCl] (при [NaCl] > 0,1 М)	0,009 М ⁻¹	0,062 М ⁻¹ *
Доля в хроматине интактном	76,8 %	23,2 %*
после сшивания ММБИ (мономеры)	38,6 %	63,4 %

Примечание. * p > 0,05, отличия достоверны.

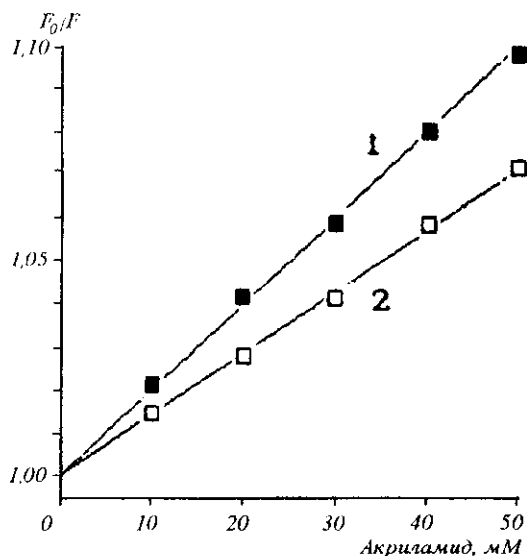


Рис. 3. Графики Штерна-Фольмера тушения флуоресценции гистонов H1 (1) и H1⁰ (2) акриламидом. F и F₀ — интенсивность флуоресценции в присутствии и без акриламида соответственно

Таким образом, гистоны H1 и H1⁰ существенно различаются по способности к образованию полимеров в растворе и хроматине. Несомненно, существует прямая связь между этими свойствами и выявленными различиями в пространственной организации. Большая компактность глобулярной части H1⁰ создает предпосылку для ограничения потенциальных сайтов гистон-гистоновых контактов. Этому хорошо соответствуют результаты по сни-

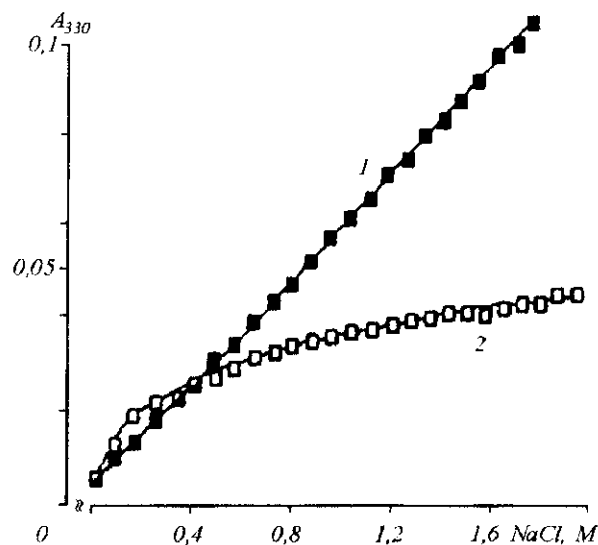


Рис. 4. Агрегация гистонов H1 (1) и H1⁰ (2) при добавлении кристаллов NaCl

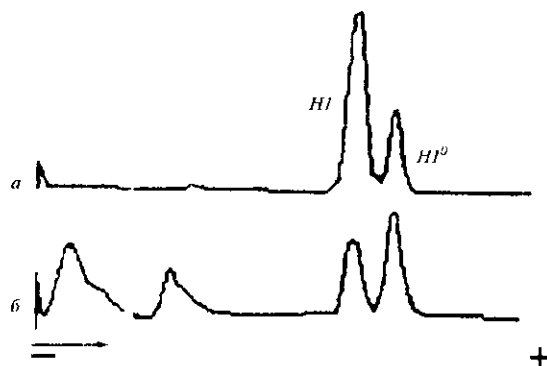


Рис. 5. Результаты электрофореза гистонов интактных (a) и после обработки ядер ММБИ (б)

жсному уровню связывания АНС. Возможно, что функция гистона $H1^0$ ограничивается только стабилизацией нуклеосомы и образованием хроматосомы. Это свойство может иметь большое значение для упорядочения надмолекулярной структуры хроматина нейронов. Ранее было показано [11], что в нейронах довольно хорошо выражена нуклеомерная структура хроматина. После мягкой обработки ядер ДНКазой I в растворимых фракциях присутствуют только моонуклеосомы, нуклеомеры и высокополимерная фракция. Промежуточные фрагменты как с одной, так и другой стороны нуклеомеров отсутствовали. Возможно, что $H1^0$ локализуется в местах перехода одного нуклеомера в другой, образуя своеобразный межнуклеомерный нуклеосомный линкер. В этом случае именно гистон $H1^0$ обеспечит более дискретное наднуклеосомное строение хроматина.

Аналогичное неравномерное расположение вдоль хроматиновой фибриллы показано для гистона H5. При любых обстоятельствах специфические свойства гистона $H1^0$ делают структуру хроматина нейронов еще более рыхлой, нежели это следует из общего пониженного содержания гистонов H1. Несложно предположить, что это может иметь функциональное значение.

В заключение необходимо отметить, что полученные результаты являются существенной предпосылкой для пересмотра функции гистона $H1^0$ в составе хроматина, в частности, как дополнительного репрессора. Известно, что уровень транскрибируемости генов в клетках мозга значительно выше, нежели в других тканях [12]. В связи с этим такая функция (репрессора) противоречит высокой матричной активности генома в нейронах. По крайней мере, если таковая и существует, то она реализуется только на локальном уровне. К тому же важно и общее содержание гистонов H1. Если $H1^0$ присутствует как избыточная часть, то репрессирующее воздействие будет несомненным. Если же имеет место такая ситуация, как в нейронах, когда лишь в половине нуклеосом присутствует тот или иной гистон H1, то роль $H1^0$ может быть и противоположной.

О. Ф. Протас

Порівняльний аналіз структури та властивостей гістонів $H1$ і $H1^0$

Резюме

Досліджували структуру та властивості гістонів $H1$ і $H1^0$ клітин кори головного мозку щурів. У розчині за умов, близьких до фізіологічних, гістони $H1$ і $H1^0$ мають константи гасіння флюоресценції акриламідом $1,4$ і $2,0 M^{-1}$, константи зв'язування з $1,8$ -АНС — $14,6$ і $5,5$ M . Здатність до агрегації в розчині у $H1^0$ значно нижча. При обробці ядер метил-4-меркаптобутиримідатом в полімери зшивається переважно $H1$. Робиться висновок стосовно того, що функція гістону $H1^0$

хроматині може реалізуватися переважно на локальному рівні. Це обумовлено компактнішою просторовою організацією глобулярної частини гістону $H1$.

A. F. Protas

Comparative analysis of histone H1 and $H1^0$ structure and properties

Summary

The properties of histones H1 and $H1^0$ from rat brain cortex free in solution and in chromatin were studied. Histones H1 and $H1^0$ have the constants for quenching of own fluorescence with acrylamide $1,4 M^{-1}$ and $2,0 M^{-1}$ and the binding constants K_{ass} with $1,8$ -ANS $14,6$ M and $5,5$ M . Histone $H1^0$ forms high-molecular weight aggregates in solution with NaCl crystals very poorly as well as polymers in chromatin. It is supposed that histone $H1^0$ function in chromatin is realised on a local site.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Терпиловская О. Н., Иванов В. А. Структурно-функциональная организация хроматина нервных клеток млекопитающих // Успехи соврем. биологии.—1990.—110, № 1(4).—С. 118—133.
2. Thoma F., Koller T. Unrevealed nucleosomes, nucleosome beads and higher order structure of chromatin: influence of nonhistone component and histone H1 // J. Mol. Biol.—1981.—149, N 4.—P. 709—733.
3. Николаев Л. Г., Глотов Б. О., Дашкевич В. К. и др. Расположение гистона H1 в хроматине. Сшивание бифункциональными реагентами N- и C-концевых половин молекулы // Молекуляр. биология.—1984.—18, № 3.—С. 736—742.
4. Khrapunov S. N., Protas A. F., Sivolob A. V. et al. Intrinsic fluorescence, difference spectrophotometry and theoretical studies on tertiary structure of calf thymus histone H1 // Int. J. Biochem.—1985.—17, N 2.—P. 217—222.
5. Протас А. Ф., Храпунов С. П., Бердышев Г. Д. Взаимодействие молекул гистонов H1 в растворе // Укр. биохим. журн.—1986.—58, № 5.—С. 22—26.
6. Person J. R., Cole R. D. Histone $H1^0$ accumulates in growth-inhibited cultured cells // Nature.—1981.—20, N 8.—P. 2298—2301.
7. Medvedev Zh. A., Medvedeva M. N. High $H1^0/H1$ histone ratio in spontaneous hepatomas in ageing mice // IRCS Med. Sci.—1980.—N 8.—P. 431.
8. Протас А. Ф. Влияние низких доз радиации на структурно-функциональное состояние хроматина клеток коры головного мозга // Радиобиол. съезд (Киев, 20—25 сентября 1993 г.): Тез. докл.—Киев, 1993.—С. 840—841.
9. Осадчая М. М. Методы биохимических исследований.—Л.: Медицина, 1982.—С. 36—43.
10. Parnum S., Chalkley R. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones // Arch. Biochem. and Biophys.—1969.—130, N 1.—P. 132—155.
11. Протас А. Ф., Чапало П. П. Влияние низких доз внешнего гамма-облучения на структуру хроматина и активность гистон-специфических протеиназ клеток головного мозга крыс // Радиобиология.—1991.—31, № 6.—С. 733—738.
12. Лишакин В. В., Ванюшин Б. Ф. Дифференциальная активность генов в мозге животных и биохимические механизмы ее регуляции // Успехи соврем. биологии.—1984.—98, № 3(6).—С. 323—337.

УДК 575:547.962.2

Поступила в редакцию 11.12.96