

4. *Потапов А. П.* Механизм стереоспецифической стабилизации кодон-антикодоновых комплексов на рибосомах в ходе трансляции // Журн. общ. биологии.— 1985.— 46, № 1.— С. 63—77.
5. *Анализ кинетической схемы стадии элонгации белкового синтеза в рамках гипотезы о стереоспецифической стабилизации кодон-антикодоновых комплексов на рибосоме. 1. Скорость элонгации полипептидных цепей / А. П. Потапов, Б. Н. Гольдштейн, С. Р. Сайфуллин, А. В. Ельская // Биополимеры и клетка.— 1987.— 3, № 1.— С. 22—26.*
6. *Volkenstein M. V., Goldstein B. N.* A new method for solving the problems of the stationary kinetics of enzymological reactions // *Biochim. et biophys. acta.*— 1966.— 115, N 2.— P. 471—477.
7. *Nishizuka Y., Lipmann F.* Comparison of guanosine triphosphate split and polypeptide synthesis with a purified *E. coli* system // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1966.— 55, N 1.— P. 212—219.
8. *Stachometry of polypeptide chain elongation / B. Cabrer, M. J. San-Millan, D. Vazquez, J. Modoleil // J. Biol. Chem.*— 1976.— 251, N 6.— P. 1718—1722.
9. *Gavrilova L. P., Spirin A. S.* «Nonenzymatic» translation // *Meth. Enzymol.*— 1974.— 30.— P. 452—462.
10. *Hopfield J. J.* Kinetic proofreading: a new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes required high specificity // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1974.— 71, N 10.— P. 4135—4139.
11. *Thompson R., Stone P.* Proofreading of the codon-anticodon interaction on ribosomes // *Ibid.*— 1977.— 74, N 1.— P. 198—202.
12. *A GTPase reaction accompanying the rejection of Leu-tRNA₂ by UUU-programmed ribosomes. Proofreading of the codon-anticodon by ribosomes / R. C. Thompson, D. B. Dix, R. B. Gerson, A. M. Karim // J. Biol. Chem.*— 1981.— 256, N 1.— P. 81—86.
13. *Yates J. L.* Role of ribosomal protein S12 in discrimination of aminoacyl-tRNA // *Ibid.*— 1979.— 254, N 22.— P. 11550—11554.
14. *Ruusala T., Ehrenberg M., Kurland C. C.* Is there proofreading during polypeptide synthesis? // *The EMBO J.*— 1982.— 1.— P. 741—745.
15. *Изучение стехиометрии распада GTP при синтезе пептида на рибосоме. Стехиометрия гидролиза GTP в процессе элонгации полифенилаланина на полиуридилевой кислоте / Д. Г. Кахнашвили, С. К. Смаилов, И. Н. Гогия, Л. П. Гаврилова // Биохимия.— 1983.— 48, № 6.— С. 959—969.*
16. *Смаилов С. К., Кахнашвили Д. Г., Гаврилова Л. П.* Изучение стехиометрии распада GTP при синтезе пептида на рибосоме. Стехиометрия гидролиза GTP при ложном считывании матрицы на рибосоме (синтез полилейцина на полиуридилевой кислоте) // Там же.— 1984.— 49, № 11.— С. 1868—1873.
17. *Потапов А. П.* О природе скоростьлимитирующих моментов рабочего цикла элонгации и механизме действия белковых факторов элонгации с GTP // *Молекуляр. биология.*— 1982.— 16, № 1.— С. 28—33.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР,
Киев
Ин-т биофизики АН СССР, Пушкино

Получено 26.07.85

УДК 576.315.42

СТРУКТУРА ОКТАМЕРА ГИСТОНОВ В СОСТАВЕ РЕКОНСТРУИРОВАННЫХ ПОЛИНУКЛЕОСОМ В ПРИСУТСТВИИ ГИСТОНА Н1 И ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ

А. В. Сиволоб, С. Н. Храпунов

Введение. На первых двух этапах укладки ДНК в хроматине эукариот происходит формирование нуклеосом (комплексов октамера гистонов (Н2А—Н2В—Н3—Н4)₂ и участка ДНК длиной 146 пар оснований) и дальнейшая компактизация нуклеосомной нити с образованием фибриллы хроматина толщиной 30 нм [1].

В стабилизации второго уровня упаковки хроматина принимают участие гистон Н1 [2], концевые участки коровых гистонов [3, 4] и двухвалентные катионы [5]. Методом межмолекулярных сшивок в компактном хроматине выявляются не только октамер, но и комплексы из 16 и 24 молекул гистонов [6]. Кроме того, глобулярные области гистона Н1 контактируют как между собой [7, 8], так и с нуклеосо-

мами [9]. Следовательно, при компактизации хроматина реализуются тесные межнуклеосомные контакты, и несколько нуклеосом должны находиться в непосредственной близости.

Нуклеосомный повтор ДНК и специфические контакты молекул гистонов с ДНК, по-видимому, не различаются в диспергированной нуклеосомной нити, компактном хроматине и целом ядре [1, 10]. Однако на этих уровнях пространственная организация октамера гистонов и, следовательно, нуклеосом может отличаться.

Таким образом, нерешенным является вопрос: изменяется ли структура нуклеосомы в условиях тесных межнуклеосомных контактов при компактизации хроматина? Для его решения необходимы простая модельная система и адекватный метод, способный «видеть» изменения в организации отдельной нуклеосомы при образовании компактной наднуклеосомной структуры.

Недавно был разработан метод, позволяющий следить за конформационными превращениями тирозинсодержащих белков (не имеющих триптофанилов в своем составе) по изменению положения спектра флюоресценции [11—13]. Измерение параметров тирозиновой флюоресценции позволяет регистрировать структурные изменения гистонов как в растворе [13—17], так и в комплексе с ДНК [18].

В качестве модельной системы выбрана реконструированная полинуклеосомная фибрилла, что продиктовано необходимостью, во-первых, иметь максимально простую систему для правильной трактовки результатов и, во-вторых, гарантировать полное отсутствие в исследуемом материале негистоновых белков, триптофановая флюоресценция которых не позволяет регистрировать тирозиновой флюоресценции гистонов.

Разумеется, данные, полученные при использовании реконструированного материала, следует с осторожностью применять при изучении нативной хроматиновой фибриллы. Однако используемые нами традиционные способы реконструкции позволяют получить нуклеосомы, неотличимые от нативных по ряду физико-химических параметров [19]. Реконструированные полинуклеосомы, так же как и нативный хроматин, сохраняют способность переходить в компактное состояние при добавлении компактизирующих агентов: гистона H1 и двухвалентных катионов [20].

В настоящей работе методами флюоресцентной спектроскопии изучены структурные изменения октамера гистонов в составе комплекса с полимерной ДНК в условиях действия на комплекс компактизирующих агентов — гистона H1 и двухвалентных катионов.

Материалы и методы. В работе использовали высокомолекулярную ДНК тимуса теленка («Worthington», США). Гистон H1 выделяли по методу [21], а октамер гистонов (H2A — H2B — H3 — H4)₂ и димер (H2A — H2B) — по методу [14, 17] из тимуса теленка. Концентрации исходных растворов гистонов и ДНК определяли спектрофотометрически [18]. Реконструкцию ДНК-гистоновых комплексов проводили ступенчатым диализом от 2 М NaCl до низкой ионной силы [18].

Обработка нуклеазой нативного и реконструированного ДНП. Ядра тимуса теленка или реконструированные комплексы обрабатывали микрококковой нуклеазой («Sigma», США) в концентрации 30 или 10 ед. акт/мл соответственно при 37 °С в буфере, содержащем 0,25 М сахарозу, 3 мМ MgCl₂, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, и 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид. Реакцию прекращали, добавляя ЭДТА до 4 мМ, охлаждали до 4 °С и центрифугировали при 3000 об/мин 5 мин. Для получения растворимых фрагментов хроматина к осадку добавляли 1 мМ ЭДТА и инкубировали 30 мин при 4 °С. Для выделения ДНК раствор хроматина инкубировали с 1 %-ным DS-Na, 10 мМ ЭДТА, проназой («Ferrack», ФРГ, 50 мкг/мл) при 37 °С в течение 20 ч. ДНК пять раз экстрагировали смесью хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1) и осаждали 2,5 объемами этанола при 10 °С.

Электрофорез ДНК проводили в геле 1,8 %-ной агарозы в буфере 20 мМ трис-борат, 20 мМ Na-ацетат, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0. Гели окрашивали бромистым этидием (1 мкг/мл) и фотографировали в УФ-свете на пленку Микрат-300 через оранжевый светофильтр.

Флюоресцентные измерения проводили в термостатируемой кювете $0,5 \times 0,5$ см при температуре 20°C на установке, описанной в работе [14], при длине волны возбуждающего света 280 нм.

Сдвиги спектра тирозиновой флюоресценции октамера гистонов регистрировали по изменению параметра

$$B' = \frac{F_{325}/F_{295} \text{ октамер}}{F_{325}/F_{295} \text{ тирозин}}$$

где F_{325} и F_{295} — интенсивности флюоресценции при 325 и 295 нм (на крыльях спектра) для октамера гистонов и тирозина соответственно. К сдвигу спектра тирозиновой флюоресценции наиболее чувствительно отношение интенсивностей при 325 и 290 нм [11], которое и использовали ранее в качестве параметра B для изучения спектральных сдвигов свободного октамера гистонов [17]. Замена F_{290} на F_{295} в случае комплексов октамера гистонов с ДНК продиктована существенной реабсорбцией флюоресценции при 290 нм хромофорами ДНК. Если сдвиг спектров флюоресценции происходит без значительного уширения, то из геометрического рассмотрения спектра связь между параметрами B и B' можно выразить простым соотношением

$$B = B'/(1,39 - 0,39B'), \text{ где } B = \frac{F_{325}/F_{290} \text{ октамер}}{F_{325}/F_{290} \text{ тирозин}}$$

Мы использовали эту формулу для расчета параметра B октамера гистонов, связанного с ДНК, с целью унификации данных, полученных для свободных гистонов и ДНК-гистоновых комплексов. Детали определения параметра B см. в [18].

Данные по динамическому тушению тирозиновой флюоресценции йодидом калия обрабатывали в соответствии с модифицированным уравнением Штерна — Фольмера [22]: $F_0/\Delta F = f_a^{-1} + (K_Q f_a)^{-1} [KI]^{-1}$, где $\Delta F = F_0 - F$; F_0 и F — интенсивности флюоресценции в отсутствие и присутствии тушителя соответственно; f_a — доля доступной тушителю флюоресценции; K_Q — эффективная константа Штерна — Фольмера. Параметры f_a и K_Q определяли по методу наименьших квадратов.

Все растворы имели pH 7,5 и содержали 0,3 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотрептола и трис-НСI в концентрации 0,1 мМ (при концентрации NaCl ниже 5 мМ) или 5 мМ (при концентрации NaCl выше 5 мМ). В опытах использовали молярные соотношения: октамер гистонов : гистон H1 : ДНК (пары оснований) — 1 : 1 : (220 ± 20); октамер : ДНК — 1 : (220 ± 20); димер (H2A — H2B) : ДНК — 1 : (100 ± 20). Концентрация гистонов 0,05 мг/мл.

Результаты и обсуждение. Влияние гистона H1 на структуру октамера в составе реконструированных полинуклеосом. На рис. 1 представлены результаты электрофореза фрагментов ДНК, полученных после гидролиза ядер и реконструированных комплексов микрококковой нуклеазой. На реконструированном материале, как и в случае ядер тимуса телят (рис. 1, а, д), выявляется типичное распределение дискретных полос, указывающее на наличие нуклеосомного повтора. Как и следовало ожидать, размер повтора несколько различается для ядер и реконструированного ДНП. Однако данные рис. 1 указывают, что в реконструированном материале присутствуют периодически расположенные нуклеосомоподобные частицы.

Октамер гистонов (H2A—H2B—H3—H4)₂ содержит 30 тирозиновых остатков, а гистон H1 — один остаток [23]. Поэтому, несмотря на высокую чувствительность интенсивности тирозиновой флюоресценции гистона H1 к его связыванию с ДНК и структурным изменениям [24, 25], следует ожидать, что в измеряемую флюоресценцию комплекса октамер — ДНК — H1 основной вклад вносят тирозилы октамера гистонов. Как видно из рис. 2, независимо от присутствия гистона H1 только диссоциация коровых гистонов в области 0,7—2,0 М NaCl [26] вызывает возрастание интенсивности флюоресценции. Следовательно, регистрируемые изменения флюоресцентных параметров комплекса октамер — ДНК — H1 свидетельствуют о конформационных изменениях октамера гистонов.

Весьма информативным параметром тирозиновой флюоресценции является параметр B , определяющий положение $\lambda_{\text{макс}}$ спектра [11—13,

17, 18]. Параметр B , отражая образование водородных связей ОН-группами тирозина, свидетельствует, в первую очередь, о состоянии специфических контактов димера (H2A—H2B) с тетрамером (H3—H4)₂ в составе октамера [13, 17, 18]. Значения параметра B приведены в табл. 1.

На рис. 3 представлена зависимость параметра B комплексов октамер — ДНК — H1 от ионной силы в сравнении с аналогичной зависимостью, полученной в отсутствие гистона H1 (здесь и далее под ионной силой понимается концентрация одновалентных катионов).

Рассмотрим последовательно изменение параметра B

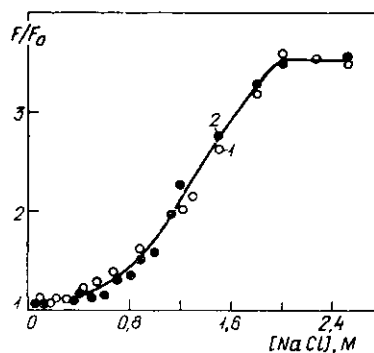


Рис. 1. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК после гидролиза ядер тимуса теленка (а, б) и реконструированных комплексов октамера (H2A—H2B—H3—H4)₂ с ДНК (в—д). Время гидролиза: 15 (а), 5 (б), 15 (в), 5 (г), 2 (д) мин

Fig. 1. Micrococcal nuclease digestion of DNA in calf thymus nuclei (a, б) and reconstituted material (в—д)

Рис. 2. Зависимость интенсивности флюоресценции комплексов октамера гистонов с ДНК от ионной силы в присутствии (1) и отсутствие (2) гистона H1. $\lambda_{изл} = 320$ нм

Fig. 2. Dependence of fluorescence intensity of octamer-DNA complexes upon ionic strength in the presence (1) and absence (2) of H1



в различных интервалах значений ионной силы, которые можно выделить на рис. 3.

1. 0,3 ÷ 3 мМ NaCl. На этом участке для реконструированных полинуклеосом в отсутствие гистона H1 наблюдается структурный переход в октамере гистонов (рис. 3). Снижение параметра B при концентрации одновалентных катионов менее 1 мМ указывает на нарушение специфических контактов димера (H2A—H2B) и тетрамера (H3—H4)₂ [18]. Как показано нами и другими авторами, при этом происходят увеличение подвижности тирозиновых остатков [18, 26], подвижности и степени экспонированности SH-групп гистона H3 [27], разворачива-

Таблица 1

Значения параметра B спектров флюоресценции свободного октамера гистонов (H2A—H2B—H3—H4)₂ [17]

Values of parameter B of free histone octamer (H2A—H2B—H3—H4)₂ fluorescence spectra [17]

Тип комплекса	NaCl, м	B
Октамер «компактный»	4	1,74 ± 0,01
Октамер «рыхлый»	2	1,68 ± 0,01
Смесь димеров (H2A—H2B) и тетрамеров (H3—H4) ₂	0,1—0,4	1,52 ± 0,01

Примечание. Концентрация белка 1 мг/мл.

ние нуклеосомной ДНК [28—30]. Присутствие гистона Н1 в комплексе предотвращает указанный структурный переход, и параметр B при снижении ионной силы сохраняет свое максимальное значение, близкое к его значению для октамера гистонов в 4 М NaCl (рис. 3, табл. 1). Следовательно, гистон Н1 стабилизирует структуру нуклеосомы при низкой ионной силе, что согласуется с данными работ [2, 29, 31]. Для сравнения на рис. 3 приведено изменение параметра B для комплексов ДНК с димером гистонов (Н2А—Н2В). Значение параметра B для комплекса (Н2А—Н2В) — ДНК значительно ниже, чем для комплекса октамер — ДНК, и равно значению параметра B для свободного димера (табл. 1). Кроме того, на кривой 3 отсутствует структурный

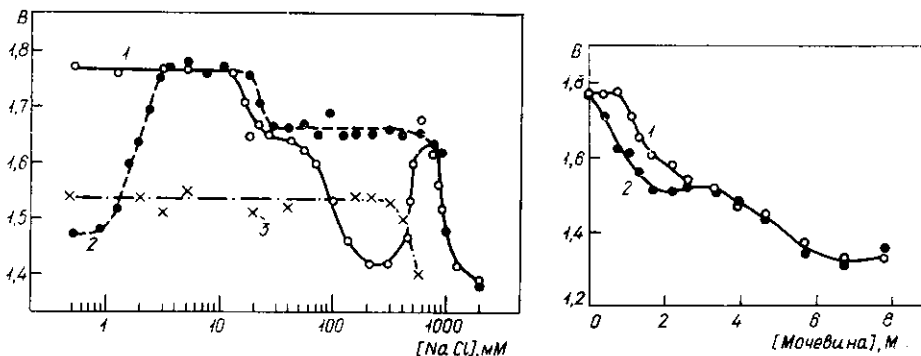


Рис. 3. Зависимость параметра B спектров флуоресценции комплексов октамер — ДНК — Н1 (1), октамер — ДНК (2) и димера гистонов (Н2А—Н2В) с ДНК (3) от ионной силы

Fig. 3. Dependence of parameter B of octamer-DNA-H1 (1), octamer-DNA (2) and H2A-H2B-DNA (3) complexes upon ionic strength

Рис. 4. Зависимость параметра B спектров флуоресценции комплексов октамера гистонов с ДНК от концентрации мочевины в присутствии (1) и отсутствии (2) гистона Н1. Условия: 5 мМ трис-НСl, 0,3 мМ ЭДТА, 0,1 мМ дитиотреитол (рН 7,5)

Fig. 4. Dependence of parameter B of octamer-DNA-H1 (1) and octamer-DNA (2) complexes upon the urea concentration

переход в области 0,3—3 мМ NaCl, который является следствием разворачивания нуклеосомной частицы и хорошо исследован биохимическими, электрофоретическими и гидродинамическими методами [27—34]. Наличие этого перехода на кривой 2 является внутренним тестом на формирование нуклеосом в составе комплексов октамера гистонов и ДНК. Отсутствие изменений на кривой 3 в широком интервале ионной силы лишней раз убеждает в том, что регистрируемые нами перестройки нуклеосомы реализуются в основном на уровне изменения контактов между димером (Н2А—Н2В) и тетрамером (Н3—Н4)₂.

2. В области ионной силы 3—10 мМ NaCl как в отсутствие, так и присутствии гистона Н1 сохраняются постоянное и максимальное значения параметра B (рис. 3). Видимо, при этих значениях ионной силы реализуется состояние октамера гистонов в комплексе с ДНК, примерно соответствующее структуре октамера в 4 М NaCl (табл. 1). Вместе с тем и в этой области концентрации NaCl гистон Н1 оказывает стабилизирующее действие на структуру нуклеосомы. Это демонстрируют приведенные на рис. 4 данные по денатурации октамера гистонов в составе полинуклеосом мочевиной в присутствии и отсутствии гистона Н1 в комплексе. Детектируемый по изменению B (или анизотропии флуоресценции [13]) процесс денатурации октамера проходит в две стадии, на первой из которых (при концентрации мочевины до 2 М) разрушаются контакты димера (Н2А—Н2В) с тетрамером (Н3—Н4)₂, а на второй (выше 4 М мочевины) разрушается нативная структура димера и тетрамера [13]. Тем же закономерностям подчиняется денатурация октамера в комплексе с ДНК [18], причем первый этап денатурации соответствует частичному разворачиванию нуклеосомы [32].

Как видно из рис. 4, первый денатурационный переход для Н1-содержащих полинуклеосом сдвигается в область более высоких концентраций мочевины по сравнению с полинуклеосомами, не содержащими гистона Н1.

3. 10—30 мМ NaCl. При возрастании ионной силы от 20 до 30 мМ NaCl параметр B полинуклеосом в отсутствие гистона Н1 снижается до уровня, соответствующего октамеру гистонов в 2 М NaCl (табл. 1). Присутствие гистона Н1 практически не влияет на переход в области 20—30 мМ NaCl (рис. 3).

Таблица 2

Параметры тушения флюоресценции октамера гистонов йодидом в растворе [17] и в составе реконструированных полинуклеосом

Parameters of histone octamer fluorescence quenching by ions I^- in solution [17] and in reconstituted polynucleosomes

Тип комплекса	NaCl, М	f_a , %	K_Q , М ⁻¹
(Н2А—Н2В—Н3—Н4) ₂ — ДНК	0,15	45	10
(Н2А—Н2В—Н3—Н4) ₂ — ДНК — Н1	0,15	78	8
(Н2А—Н2В—Н3—Н4) ₂	4	38	8
»	2	65	4,5
»	0,1	65	6,6

Примечание. f_a — доля доступной флюоресценции; K_Q — эффективная константа Штерна — Фольмера.

4. 30—600 мМ NaCl. В условиях, когда компактизирующее действие гистона Н1 на ДНК и хроматин максимально ($\sim 0,15$ М NaCl) [2, 33], происходит существенное снижение параметра B комплексов октамер—ДНК—Н1 (рис. 3) до значений, примерно соответствующих смеси не взаимодействующих димеров (Н2А—Н2В) и тетрамера (Н3—Н4)₂ (табл. 1). Следует отметить, что при этом не наблюдается помутнения раствора (возрастания кажущегося поглощения при 320 нм), очевидно, из-за низкой концентрации комплексов (0,05 мг гистонов в 1 мл). При больших концентрациях агрегация усиливается, и помутнение раствора в области 0,15 М NaCl увеличивается. Дополнительно о структурном изменении нуклеосом в 0,15 М NaCl в присутствии гистона Н1 свидетельствуют результаты опытов по динамическому тушению флюоресценции. Данные, приведенные в табл. 2, указывают на увеличение доступности тирозиновых остатков (возрастание доли доступной флюоресценции) в случае присутствия гистона Н1 в комплексе. Как видно из рис. 3, диссоциация гистона Н1 в области 0,4—0,6 М NaCl [33] приводит к возрастанию параметра B до значений, которые он имеет в случае отсутствия гистона Н1 в комплексе.

5. Область выше 600 мМ NaCl. При этом регистрируется независимое от присутствия гистона Н1 снижение параметра B полинуклеосом (рис. 3), связанное с диссоциацией октамера гистонов от ДНК, которая сопровождается его распадом на димеры (Н2А—Н2В) и тетрамер (Н3—Н4)₂ при используемых нами концентрациях гистонов [18].

Влияние двухвалентных катионов на структуру октамера в составе реконструированных полинуклеосом. Эксперименты, описанные выше (рис. 2—4), проводили в присутствии 0,3 мМ ЭДТА. При такой концентрации хелатирующего агента происходит связывание определенного количества двухвалентных катионов, присутствующих в растворах. Мы провели титрование полинуклеосом, растворенных первоначально в 0,1 мМ трис-буфере, двумя хелатирующими агентами — ЭДТА и ЭГТА. Они обладают сходным высоким сродством к ионам Ca²⁺ (константы связывания при рН 7,4 равны $6,5 \cdot 10^7$ М⁻¹ для ЭДТА и $1,5 \cdot 10^7$ М⁻¹ для ЭГТА) и существенно различаются по способности связывать ионы Mg²⁺ (константы связы-

вания равны $6,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ для ЭДТА и $1,3 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$ для ЭГТА [34]. Данные рис. 5 свидетельствуют о том, что значение параметра $B=1,47$, характерное для структуры октамера при 1 мМ NaCl (рис. 3), достигается только при концентрации ЭДТА выше 0,3 мМ. ЭГТА оказывает сходный эффект. Присутствие гистона Н1 делает структуру октамера в составе нуклеосом нечувствительной к действию хелатирующих агентов. По-видимому, конформационный переход октамера в области 1—3 мМ NaCl (рис. 3), регистрируемый также другими методами [26—31], вызван связыванием хелатами присутствующих в составе полинуклео-

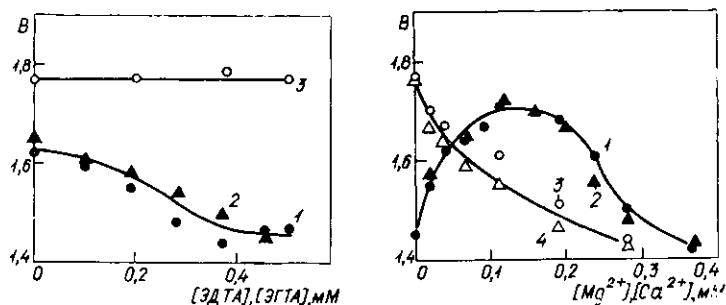


Рис. 5. Зависимость параметра B спектров флюоресценции комплексов октамера гистонов с ДНК от концентрации ЭДТА (1, 3) и ЭГТА (2) в отсутствие (1, 2) и присутствии (3) гистона Н1

Fig. 5. Dependence of parameter B of octamer-DNA (1, 2) and octamer-DNA-H1 (3) complexes upon EDTA (1, 3) and EGTA (2) concentration

Рис. 6. Зависимость параметра B спектров флюоресценции комплексов октамера гистонов с ДНК от концентрации Mg^{2+} (1, 3) и Ca^{2+} (2, 4) в присутствии (3, 4) и отсутствии (1, 2) гистона Н1

Fig. 6. Dependence of parameter B of octamer-DNA (1, 2) and octamer-DNA-H1 (3, 4) complexes upon concentration of Mg^{2+} (1, 3) and Ca^{2+} (2, 4)

сомной нити двухвалентных катионов. В дальнейшем при исследовании действия двухвалентных катионов на структуру нуклеосом мы вводили в раствор 0,3 мМ ЭДТА в целях предварительного «удаления» двухвалентных катионов. Как видно из рис. 6, добавление последних до 0,1 мМ к раствору полинуклеосом в отсутствие гистона Н1 вызывает структурное изменение в октамере, проявляющееся в возрастании параметра B . Дальнейшее увеличение концентрации двухвалентных катионов вызывает снижение параметра B до значений, характерных для не взаимодействующих димера (Н2А—Н2В) и тетрамера (Н3—Н4)₂. Из рис. 6 видно, что действие двухвалентных катионов на Н1-содержащую нуклеосомную нить более эффективно: для комплексов октамер—ДНК—Н1 параметр B снижается при меньших концентрациях двухвалентных катионов. При концентрациях Mg^{2+} или Ca^{2+} более высоких, чем приведенные на рис. 6, начинаются усиление агрегации и увеличение помутнения растворов. Следует отметить, что нами не обнаружено различий в действии Ca^{2+} и Mg^{2+} на исследуемые системы (рис. 5, 6).

Результаты гидролиза реконструированных комплексов микрококковой нуклеазой (рис. 1), наличие «низкосолевого» перехода (0,3—3 мМ NaCl) на рис. 3 (кривая 2) и отсутствие такого перехода для комплексов (Н2А—Н2В)—ДНК (кривая 3) свидетельствуют, что при выбранных условиях реконструкции октамер гистонов и ДНК образуют полинуклеосомную фибриллу.

Результаты, приведенные в настоящей работе, выявляют два типа воздействий гистона Н1 и двухвалентных катионов на структуру октамера гистонов в комплексе с ДНК. Первый из них — это действие указанных агентов на октамер в составе хорошо изученной «низкосолевого» формы нуклеосомы, реализующейся при ионной силе ниже 1 мМ NaCl. Эта форма, по многочисленным данным [18, 26—30], представляет собой частично декомпактизованную нуклеосому. Наличие в комплексе гистона Н1 или присутствие двухвалентных катионов в концен-

трации 0,1 мМ и выше (так же, как и увеличение концентрации NaCl до 3 мМ) приводит к восстановлению специфических контактов димера (Н2А—Н2В) с тетрамером (Н3—Н4)₂ в октамере гистонов (увеличение параметра *B*) в составе реконструированных полинуклеосом (рис. 3, 5). Видимо, уменьшение степени нейтрализации фосфатов в отсутствие гистона Н1, двухвалентных катионов и при существенном снижении концентрации одновалентных катионов приводит к возрастанию электростатического отталкивания между сближенными участками суперспирали нуклеосомной ДНК [28], а также увеличению жесткости ДНК [35] и тем самым является основой декомпактизации нуклеосомы в ходе «низкосолевого» перехода. Стабилизирующее действие гистона Н1 на структуру октамера в составе нуклеосомы при достаточно низкой ионной силе (5 мМ NaCl) подтверждается данными о повышенной устойчивости октамера в составе комплекса октамер — ДНК — Н1 к действию мочевины (рис. 4).

Другим типом наблюдаемых нами эффектов является регистрируемое по снижению параметра *B* спектра флюоресценции и увеличению доступности тирозилов для тушителя структурное изменение октамера в составе полинуклеосом, которое реализуется в присутствии: 1) гистона Н1 при физиологической концентрации NaCl; 2) двухвалентных катионов в концентрации 0,3 мМ и выше; 3) гистона Н1 и двухвалентных катионов в концентрации 0,1 мМ и выше. Возможно, что указанные агенты влияют на структуру октамера в нуклеосоме непосредственно. Для проверки такой возможности необходимо соответствующее исследование на реконструированных моонуклеосомах, которое будет проведено нами в будущем. Тем не менее совокупность данных настоящей работы и работы [18] заставляет высказать и другое предположение. Поскольку все указанные выше условия способствуют, как известно, компактизации полинуклеосомной фибриллы [2, 5, 20, 25], возможной причиной обнаруженного структурного изменения являются междуклеосомные взаимодействия, реализующиеся при компактизации полинуклеосом. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что повышение концентрации полинуклеосом, усиливающее их агрегацию в 0,15—0,2 М NaCl, приводит к снижению параметра *B* практически такому же, как на рис. 3 для случая присутствия в комплексе гистона Н1 [18]. Возможность влияния междуклеосомных взаимодействий на структуру октамера гистонов подтверждается кристаллографическими исследованиями [37]: при упаковке нуклеосомных кор-частиц в кристалл взаимодействие между ними вызывает сдвиг одного из димеров (Н2А—Н2В) по отношению к позиции, симметричной второму димеру. Такой сдвиг может обуславливать наблюдаемые нами изменения параметров тирозиновой флюоресценции октамера гистонов и при компактизации полинуклеосомной нити в растворе.

Независимо от выбора приведенных объяснений полученные результаты позволяют утверждать, что структура октамера гистонов в составе диспергированной полинуклеосомной нити соответствует его структуре в растворе 2 М NaCl, а в условиях действия на хроматин компактизирующих агентов должна существенно от нее отличаться, что согласуется с выводом работы [38]. Обратимые переходы между различными конформационными формами (конформерами) октамера гистонов могут играть важную роль в структурных изменениях хроматина в ходе активации и репрессии генов.

Мы благодарим С. Н. Кадуру за помощь при анализе продуктов гидролиза реконструированных комплексов микрококковой нуклеазой и А. И. Драгана за полезное обсуждение.

THE STRUCTURE OF HISTONE OCTAMER IN THE COMPOSITION
OF RECONSTITUTED POLYNUCLEOSOMES IN PRESENCE OF H1 HISTONE
AND DIVALENT CATIONS

A. V. Sivolob, S. N. Khrapunov

State University, Kiev

Summary

The influence of H1 histone and divalent cations upon the structure of (H2A-H2B-H3-H4)₂ histone octamer in the complex with high-molecular weight DNA has been studied by fluorescence spectroscopy. Changes in the position of tyrosine histone fluorescence spectrum indicate the existence of three structural states of octamer in the nucleosome without H1 histone: «expanded» octamer (I) within 30-600 mM NaCl; «compact» octamer (II) within 3-20 mM NaCl; «unfolded» octamer (III) within less than 1 mM NaCl. Cation agents of different nature (Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ ions, H1 histone), acting either independently or in combination exert a similar effect upon structural rearrangements of nucleosome. The obtained results permit concluding that histone octamer structure in 2 M NaCl is similar to that in disordered nucleosome fiber, but it considerably differs from the octamer state within the compact chromatin.

1. Mirzabekov A. D. Nucleosome structure and its dynamic transitions // *Quart. Rev. Biophys.*— 1980.— 13, N 2.— P. 255—295.
2. Thoma F., Koller Th. Unravelling nucleosomes, nucleosome beads and higher order structures of chromatin: influence of non-histone proteins and histone H1 // *J. Mol. Biol.*— 1981.— 149, N 4.— P. 709—733.
3. Alignment of nucleosomes along DNA and organization of spacer DNA in *Drosophila* chromatin / V. I. Karpov, S. G. Bavykin, O. V. Preobrazhenskaya et al. // *Nucl. Acids Res.*— 1982.— 10, N 14.— P. 4321—4337.
4. Marion C., Roux B., Coulet P. R. Role of histones H1 and H3 in the maintenance of chromatin in a compact conformation. Study with an immobilized enzyme // *FEBS Lett.*— 1983.— 157, N 2.— P. 317—321.
5. Kiryanov G. I., Smirnova T. A., Polyakov V. Yu. Nucleomeric organization of chromatin // *Eur. J. Biochem.*— 1982.— 124, N 2.— P. 331—338.
6. Thomas J. O., Kornberg R. D. An octamer of histones on chromatin // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1975.— 72, N 7.— P. 2626—2630.
7. Расположение гистона H1 в хроматине. Поперечное сшивание центральных глобулярных частей молекул H1 бифункциональным реагентом / Л. Г. Николаев, Б. О. Глозов, В. К. Дашкевич и др. // *Молекуляр. биология.*— 1983.— 17, № 5.— С. 1255—1261.
8. Losa R., Thoma F., Koller Th. Involvement of the globular domain of histone H1 in the higher order structures of chromatin // *J. Mol. Biol.*— 1984.— 175, N 4.— P. 907—914.
9. The structure of histone H1 and its location in chromatin / J. Allan, P. G. Hartman, C. Crane-Robinson, F. X. Aviles // *Nature.*— 1980.— 288, N 5792.— P. 675—679.
10. Stability of the primary organization of nucleosome core particles upon some conformation transition / V. W. Zayetz, S. G. Bavykin, V. L. Karpov, A. D. Mirzabekov // *Nucl. Acids Res.*— 1981.— 9, N 5.— P. 1053—1067.
11. Dragan A. I., Khrapunov S. N. The red shift of tyrosine fluorescence spectrum in polyethylenglycol and urea solutions // *Stud. biophys.*— 1983.— 96, N 2.— P. 127—132.
12. The change in maximum position of tyrosyl fluorescence spectra of RNase A and histone H2A-H2B under denaturation / A. I. Dragan, S. N. Khrapunov, A. F. Protas, G. D. Berdyshev // *Ibid.*— N 3.— P. 187—193.
13. Драган А. И., Храпунов С. Н., Бердышев Г. Д. Анализ динамического равновесия олигомеров гистонов в растворе. Природа сил, стабилизирующих структуру октамера (H2A—H2B—H3—H4)₂ // *Молекуляр. биология.*— 1985.— 19, № 5.— С. 1259—1268.
14. Пространственная организация димера гистонов H2A—H2B в растворах с различной ионной силой / С. Н. Храпунов, А. И. Драган, А. Ф. Протас, Г. Д. Бердышев // *Там же.*— 1983.— 17, № 5.— С. 992—999.
15. The structure of the histone dimer H2A-H2B studied by spectroscopy / S. N. Khrapunov, A. I. Dragan, A. F. Protas, G. D. Berdyshev // *Biochim. et biophys. acta.*— 1984.— 787, N 1.— P. 97—104.
16. Structure of histone tetramer (H3-H4)₂ / S. N. Khrapunov, A. I. Dragan, A. F. Protas, G. D. Berdyshev // *Int. J. Biol. Macromol.*— 1984.— 6, N 1.— P. 31—34.
17. Пространственная организация октамера гистонов (H2A—H2B—H3—H4)₂ / С. Н. Храпунов, А. И. Драган, А. Ф. Протас, Г. Д. Бердышев // *Молекуляр. биология.*— 1985.— 19, № 4.— С. 1011—1020.
18. Структура октамера гистонов в составе реконструированных полинуклеосом / С. Н. Храпунов, А. В. Сиволоб, А. И. Драган, Г. Д. Бердышев // *Там же.*— № 6.— С. 1553—1561.
19. Tatchell K., Van Holde K. E. Reconstitution of chromatin core particles // *Biochemistry.*— 1977.— 16, N 24.— P. 5295—5303.

20. *Watanabe F.* Condensation of polynucleosome by histone H1 binding // *FEBS Lett.*— 1984.— 170, N 1.— P. 19—22.
21. *Johns E. W.* Studies on histones // *Biochem J.*— 1964.— 92, N 1.— P. 55—64.
22. *Lehrer S. S., Leavis P. C.* Solute quenching of protein fluorescence // *Meth. Enzymol.*— 1978.— 49.— P. 222—236.
23. *Isenberg I.* Histones // *Ann. Rev. Biochem.*— 1979.— 48.— P. 159—191.
24. *Особенности третичной структуры молекулы гистона H1 из тимуса теленка / С. Н. Храпунов, А. Ф. Протас, А. В. Сиволоб и др. // Молекуляр. биология.*— 1984.— 18, № 4.— С. 979—987.
25. *Khrapunov S. N., Sivolob A. V., Kucherenko N. E.* Fluorescence study of the interaction of calf thymus histone H1 with DNA // *Int. J. Biol. Macromol.*— 1984.— 6, N 4.— P. 199—202.
26. *Libertini L. J., Small E. W.* Effects of pH on low-salt transition of chromatin core particle // *Biochemistry.*— 1982.— 21, N 14.— P. 3327—3334.
27. *Dieterich A. E., Axel R., Cantor C. R.* Salt-induced structural changes of nucleosome core particle // *J. Mol. Biol.*— 1979.— 129, N 4.— P. 587—602.
28. *Structural changes of nucleosomes in low-salt concentrations / H.-M. Wu, N. Dattagupta, M. Hogan, D. M. Crothers // Biochemistry.*— 1979.— 18, N 18.— P. 3960—3965.
29. *Fulmer A. W., Fasman G. D.* Ionic strength-dependent conformational transitions of chromatin // *Biopolymers.*— 1979.— 18, N 11.— P. 2875—2891.
30. *Neutron scattering studies of nucleosome structure at low ionic strength / E. C. Uberbacher, V. Ramakrishnan, D. E. Olins, G. J. Bunick // Biochemistry.*— 1983.— 22, N 21.— P. 4916—4923.
31. *Burch J. B. E., Martinson H. G.* The roles of H1, the histone core and DNA length in the unfolding of nucleosome at low ionic strength // *Nucl. Acids Res.*— 1980.— 8, N 21.— P. 4469—4487.
32. *Conformational states of chromatin v bodies induced by urea / D. E. Olins, P. N. Bryan, R. E. Harrington et al. // Ibid.*— 1977.— 4, N 6.— P. 1911—1931.
33. *Studies on the role and mode of operation of the very-lysine-rich histone H1(F1) in eukaryote chromatin / E. M. Bradbury, S. E. Danby, H. W. E. Rattle, V. Giancotti // Eur. J. Biochem.*— 1975.— 57, N 1.— P. 97—105.
34. *Fabiato A., Fabiato F.* Calculator programs for computing the composition of the solution containing multiple metals and ligands used for experiments in skinner muscle cells // *J. Physiol.*— 1979.— 75, N 3.— P. 463—505.
35. *Hagerman P. J.* Investigation of the flexibility of DNA using transient electric birefringence // *Biopolymers.*— 1980.— 20, N 7.— P. 1503—1535.
36. *Thoma F., Losa R., Koller Th.* Involvement of the domains of histones H1 and H5 in the structural organization of soluble chromatin // *J. Mol. Biol.*— 1983.— 167, N 3.— P. 619—640.
37. *Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution / T. J. Richmond, J. T. Finch, D. Rhodes, A. Klug // Nature.*— 1984.— 311, N 5986.— P. 532—537.
38. *Hatch C. L., Bonner W. M., Moudrianakis E. N.* Differential accessibility of the amino and carboxy termini of histone H2A in the nucleosome and its histone subunits // *Biochemistry.*— 1983.— 22, N 12.— P. 3016—3023.

Киев. гос. ун-т

Получено 26.12.85

УДК 577.323.722

ВЛИЯНИЕ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ НА МОЛЕКУЛЯРНОЕ ПЛАВЛЕНИЕ ДНК

А. С. Фридман, Д. Ю. Ландо

Молекулы многих белков, противоопухолевых препаратов, ионы металлов и т. д. характеризуются селективным взаимодействием с определенными последовательностями пар оснований [1]. Ранее была разработана теория перехода спираль — клубок ДНК с ярко выраженным блочным строением в присутствии непротяженных невзаимодействующих между собой при адсорбции лигандов с избирательным характером связывания [2—5]. В этих работах задача была сведена к решению алгебраического уравнения. Однако ДНК фагов, вирусов, бактерий не имеет ярко выраженного блочного строения. Расчет кривых плавления комплексов лигандов с имеющей произвольную первичную структуру ДНК позволяет проводить теория, предложенная в работе [6]. Отметим, что в данном случае задача решается численно. Все характеристики перехода определяются путем непосредственного перемножения матриц, число которых равно числу пар оснований в цепи ДНК.