



Структура и функция биополимеров

УДК 576.16:547.962.2

КОНФОРМЕРЫ ГИСТОНОВ — ОСНОВА СТРУКТУРНЫХ ПЕРЕСТРОЕК ХРОМАТИНА

С. Н. Храпунов

На сегодняшний день исследование структуры хроматина — это, в основном, исследование структуры ДНК в составе хроматина. При этом для понимания структурной организации ДНК в составе хроматина существенными оказались данные, учитывающие пространственное расположение элементов двойной спирали. На первый план выдвинулись топологические и стереохимические проблемы. В частности, известна детальная укладка ДНК в нуклеосоме [1, 2], обсуждаются проблемы изломов ДНК в нуклеосоме: «кинков» [3] и «миникинков» [4], связи «числа зацеплений» с суперспирализацией ДНК [5], гетерогенности линкеров [6], стерической доступности фосфодиэфирной связи для ДНКаз [7]. В то же время белковыми проблемами хроматина являются, в основном, проблемы фракционного состава белков и их модификаций.

Однако изучение фракционного и субфракционного составов белков есть лишь первый шаг на пути понимания функционирования этих белков в составе хроматина, так как функция белков реализуется на уровне их третичной и четвертичной структур. Физика и химия белка дает нам много примеров, когда перестройки на высших уровнях структурной организации белковой молекулы при неизменности фракционного состава позволяют реализовать ту или иную специфическую функцию. Это принцип аллостерической регуляции активности ферментов, реакция полимеризации фибрина, перестройка и взаимодействие белков мышечной группы: миозина, актина, тропомиозина и другие.

Во всех указанных процессах с сохранением фракционного состава специфическая функция белков реализуется при перестройках их третичной и четвертичной структур.

В различных клетках одного организма ДНК неотличима по изучаемым «одномерным» структурным параметрам, за исключением содержания 5-метилцитозина. Однако в разных клетках в составе хроматина ДНК упакована различным образом, изменена ее топология, и в составе ДНК функционируют различные последовательности.

Но нашему убеждению, выяснить механизмы структурных перестроек хроматина, проявляющиеся в итоге в изменении доступности тех или иных локусов ДНК для ферментов и регуляторов, можно лишь выяснив перестройки третичной и четвертичной структур белков хроматина. Наиболее изученной группой белков хроматина являются гистоны. Общепринято, что в связи с консервативностью первичной структуры и отсутствием видовой специфичности фракционного состава гистоны не могут выполнять какой-либо регуляторной генетической функции. В данной работе мы попытаемся показать, что гистоны мо-

гут выполнять регуляторную функцию. Однако реализуется эта функция не путем узнавания специфических нуклеотидных последовательностей (как у других регуляторов), а путем структурных перестроек гистонов в тех участках хроматина, которые подлежат активации либо репрессии. Физико-химической основой возможности таких перестроек может служить наличие у олигомеров гистонов одного типа нескольких структурных форм (конформеров), разделенных невысокими энергетическими барьерами. Конформеры гистонов могут образовываться двумя путями: за счет взаимодействия либо диссоциации предшествующих структур, т. е. за счет изменения четвертичной структуры комплексов, или за счет изменения укладки полипептидных цепей гистонов (изменения их третичной структуры) в составе олигомера без изменения агрегатного состояния комплекса.

Особенности четвертичной структуры гистонов

Общепринято, что в диапазоне рН 7—9 и ионной силы 0,1—2 М NaCl структура олигомеров гистонов соответствует их структуре в составе хроматина. Равновесие олигомеров гистонов можно описать схе-

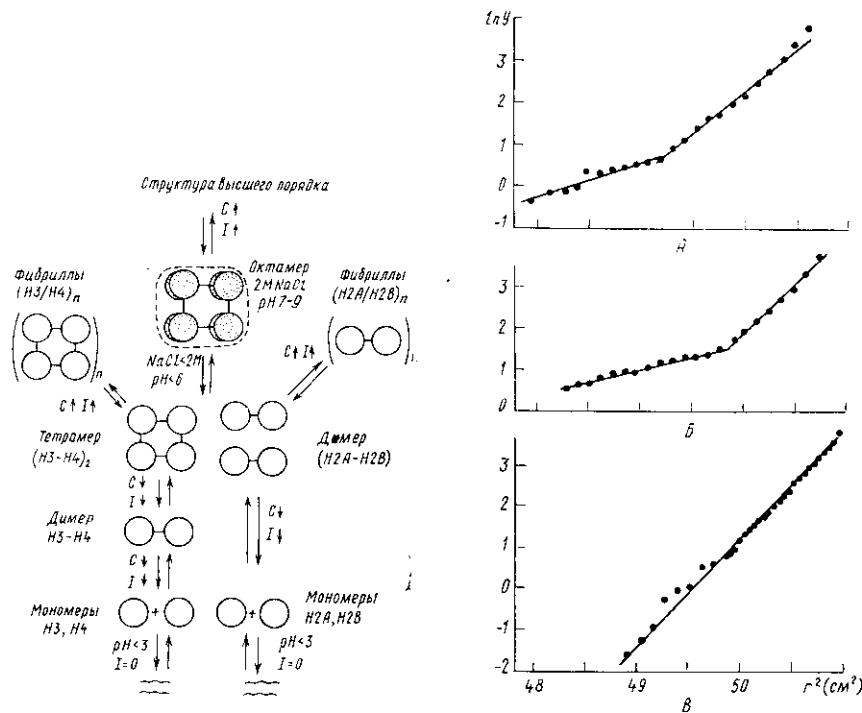


Рис. 1. Равновесие между олигомерами гистонов [10]: тетрамер (H3—H4)₂ и димер (H2A—H2B) существуют при физиологических условиях — рН 7, ионной силе I=0,15 М NaCl и концентрации белка C=1 мг/мл. Стрелки показывают увеличение (↑) или уменьшение (↓) соответствующих параметров.

Fig 1. The structure of histone oligomers [10].

Рис. 2. Равновесное центрифугирование эквимольной смеси коровых гистонов [11] при 2 М NaCl (А); 3 М NaCl (Б); 4 М NaCl (В); r — расстояние от оси вращения центрифуги; Y — параметр, пропорциональный концентрации белка.

Fig 2. Equilibrium centrifugation of the histone octamer [11] in 2 М NaCl (A); 3 М NaCl (B); 4 М NaCl (B).

мой: $\omega \rightleftharpoons H + D \rightleftharpoons T + 2D$, где ω — октамер (H3—H4—H2A—H2B)₂; H — гексамер (H3—H4)₂ — (H2A—H2B); T — тетрамер (H3—H4)₂; D — димер (H2A—H2B).

Изучать данное равновесие сложно, так как межмолекулярные сшивки могут выявлять «недошитый» октамер в виде промежуточных продуктов; гель-хроматография и центрифугирование могут давать го-

могенный пик при наличии сложной многокомпонентной системы частиц, отличающихся своей формой. Кроме того, скоростное центрифугирование влияет на структуру гистонов [8]. Осмотическое давление [9] обычно измеряют при высоких концентрациях белков, когда равновесие смещено в сторону образования октамера. Поэтому вопрос об относительном содержании олигомеров гистонов в растворе 2 М NaCl окончательно не выяснен. При изменении условий (ионной силы, концентрации гистонов) равновесие (см. схему) может смещаться соответственно рис. 1 [10].

Для иллюстрации данных (рис. 1) на рис. 2 приведены результаты равновесного центрифугирования четырех коровых гистонов при различной концентрации соли [11].

Из графиков рис. 2 можно сделать вывод о наличии в растворе 2 М NaCl сложной гетерогенной смеси, отраженной равновесием (см. схему), а в 4 М NaCl основным компонентом смеси является октамер. В составе хроматина в принципе возможно создание условий, направляющих равновесие по любому из путей, указанных на рис. 1.

Особенности третичной структуры гистонов в составе олигомеров

На рис. 3 представлены результаты связывания флуоресцентного зонда 1,8-ANS с димером гистонов (H2A—H2B) [12]. Отсечка на оси абсцисс (рис. 3) показывает количество молекул зонда, связывающегося с димером. В пересчете на содержание димера в растворе эти данные показывают, что одна молекула зонда связана с двумя димерами. Трактовать эти данные можно двояко: либо имеется гетерогенность димеров и не все димеры способны связывать зонд, либо в растворе имеется слабая агрегация димеров. В последнем случае в составе агрегатов блокируются сайты связывания зонда. Агрегация димеров (H2A—H2B) была также выявлена в классической работе Корнберга [13]. Эта агрегация может проявляться также в

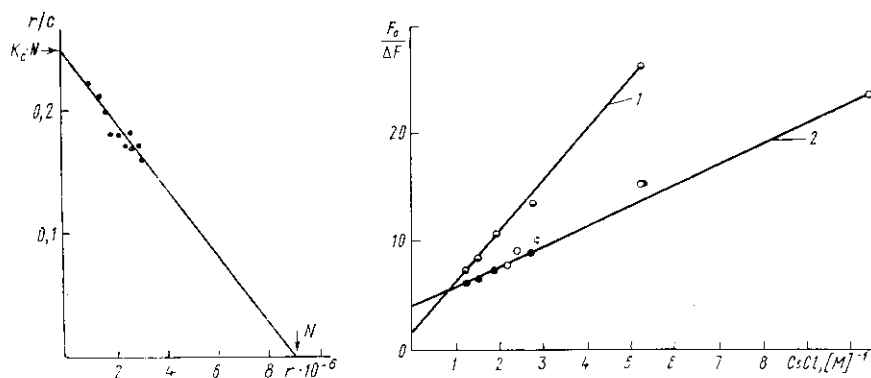


Рис. 3. Связывание 1,8-ANS с димером гистона (H2A—H2B), представленное в координатах Скэтчарда [12]: r , c — концентрации связанного и свободного зонда соответственно; K_c — константа связывания; N — общее количество центров связывания.

Fig 3. Scatchard's plots of the 1,8-ANS binding with the H2A-H2B histone dimer [12].

Рис. 4. Эффективность тушения тирозиновой флуоресценции димера гистонов (H2A—H2B) ионами Cs⁺ [15]: 1 — 0,1 М NaCl; 2 — 0,5 М NaCl.

Fig 4. The fluorescence quenching of H2A-H2B histone dimer by Cs⁺ ions [15].

том, что молекулярная масса димера, определенная методом гель-хроматографии [14, 15], несколько выше определенной по аминокислотному составу. Структура димера (H2A—H2B) может изменяться при увеличении ионной силы среды. Как следует из рис. 4, эффективность тушения тирозиновой флуоресценции гистона (H2A—H2B) изменяется при увеличении концентрации NaCl [15]. Параметры тушения флуоресценции тетрамера (H3—H4)₂ [16, 17] также свидетельствуют об изменении структуры тетрамера при увеличении ионной силы (таблица).

Значительно расширили возможность изучения структуры олигомеров гистонов данные, установленные в работе [18], о чувствительности положения λ_{\max} тирозиновой флюоресценции гистонов к изменению микроокружения тирозина. В результате в работах [15, 19] было показано повышение стабильности димера (H2A—H2B) при увеличении концентрации NaCl. В работах [20—22] проведен теоретический анализ структуры олигомеров гистонов. При этом оказалось, что октамер гистонов может находиться в двух структурных состояниях — глобулярном и линейаризованном (рис. 5).

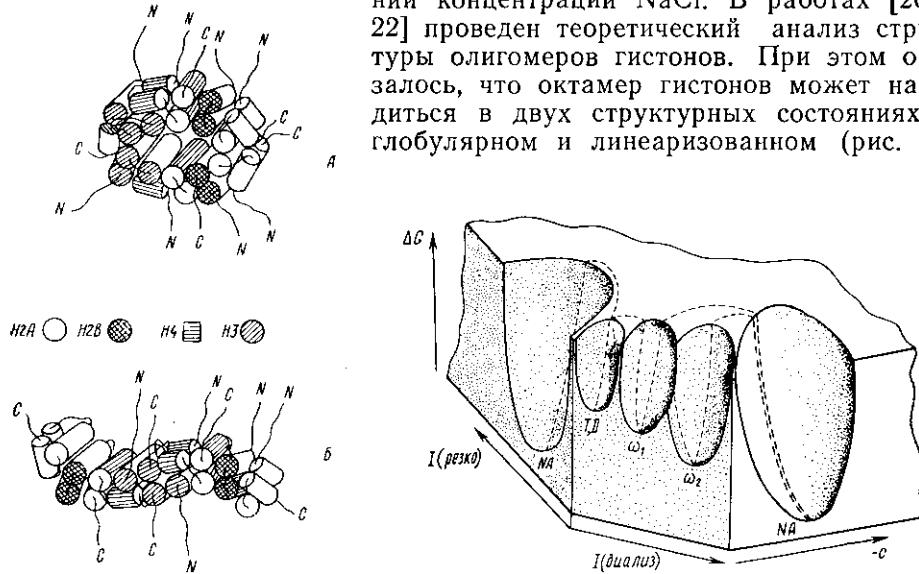


Рис. 5. Модели укладки октамера гистонов, построенные на основании стереохимической теории В. И. Лима [22]: А — глобулярный октамер; Б — линейаризованный октамер; N и C — соответствующие концы полипептидных цепей гистонов.

Fig 5. Globular (A) and linearized (B) models of histone octamer structure constructed on the basis of Lim's stereochemical theory.

Рис. 6. Пространственная модель возможных переходов между локальными метастабильными состояниями олигомеров гистонов: ΔG — относительное значение свободной энергии; I (диализ) — изменение ионной силы диализом; I (резко) — изменение ионной силы добавлением 5 M NaCl или сухой соли; — C — уменьшение концентрации белка при неизменной ионной силе; T, D, ω_1 , ω_2 — преимущественное содержание олигомеров гистонов в соответствии со схемой равновесия; NA — неспецифические агрегаты. Пунктиром обозначены переходы, возможные при физиологических температурах.

Fig. 6. A three-dimensional model of metastable states for histone oligomers.

Вырожденные структурные состояния олигомеров гистонов

Как следует из приведенных выше фактов, олигомеры гистонов могут существовать в нескольких структурных формах. Видимо, эти формы характеризуются близкими значениями свободной энергии, разделенными невысокими барьерами. Преодоление энергетических барьеров возможно при физиологических температурах за счет взаимодейст-

Параметры тушения собственной флюоресценции димера гистонов (H2A—H2B) и тетрамера (H3—H4)₂ [15—17]

Концентрация NaCl, M	Димер (2A—2B)				Тетрамер (H3—H4) ₂	
	Тушение Cs ⁺		Тушение I [−]		Тушение I [−]	
	f_a	K_q	f_a	K_q	f_a	K_q
0,1	60	11	60	7,6	45	11
0,5	25	4	60	5,7	—	—
0,8	—	—	60	6,1	60	4

Примечание. K_q , M^{−1} — константа Штерна-Фольмера; f_a , % — доля флюоресценции, доступная действию тушителя. Степень α -спиральности при указанных ионных силах оставалась неизменной и соответствовала 38 % для димера (H2A—H2B) [15] и 36—37 % для тетрамера (H3—H4)₂ [16, 17].

вия олигомеров гистонов с различными эффекторами (например, негистоновыми белками, либо ионами), а также за счет изменения условий их локального микроокружения в составе хроматина (ионной силы, pH, полярности среды).

Как видно из рис. 6, при увеличении ионной силы диализом возможен переход между энергетическими минимумами, соответствующим смесям $D+T$ (0,1 М NaCl), ω_1 (2М NaCl), ω_2 (4 М NaCl). При резком изменении ионной силы осуществляется переход в потенциальную яму (неспецифические агрегаты). То же самое происходит, если изменять концентрацию белка в растворе с высокой ионной силой. Обратный переход через энергетические барьеры между минимумами, соответствующими неспецифическим агрегатам и нативным олигомерам, невозможен и требует либо предварительной денатурации молекул гистонов (в опытах *in vitro*), либо снижения энергетических барьеров за счет взаимодействия *in vivo* с клеточными эффекторами, например «факторами сборки» [23].

Важность сохранения нативной структуры белков для поддержания структуры хроматина подчеркивается многочисленными данными о влиянии мочевины на структуру хроматина [24]. Так, например, в присутствии 4 М мочевины нуклеосома, как целое, изменяет свою форму, но контакты ДНК—гистоны в кор-частице при этом не изменяются [25]. 4 М мочевина изменяет также структуру октамера гистонов, разрушая набор специфических водородных связей в местах контакта димера (Н2А—Н2В) с тетрамером (Н3—Н4)₂ [26]. Таким образом, изменение структуры октамера гистонов может приводить к конформационным перестройкам нуклеосомы без перераспределения гистонов, которое, вероятно, затруднено в компактном хроматине.

Мы осознали, что структурные изменения олигомеров гистонов, изученные в отсутствие ДНК и вне клетки, могут быть не эквивалентны этим изменениям в комплексе с ДНК в составе хроматина. Однако конформационные потенциалы олигомеров гистонов, установленные в модельных экспериментах, могут реализоваться при определенных условиях и в составе хроматиновой фибриллы. Поэтому постулируемые в данной работе структурные переходы между конформерами гистонов могут играть важную роль в структурных перестройках хроматина в ходе дифференциальной экспрессии генов [27] или в ходе тотальной репрессии генома сперматозоидов [28, 29].

HISTONE CONFORMERS ARE THE FOUNDATION OF STRUCTURAL CHROMATIN REARRANGEMENTS

S. N. Khrapunov

State University, Department of General and Molecular Genetics, Kiev

Summary

Histone oligomers may be in several structural states. Local metabolically stable states of the native conformers insignificantly differ (are degenerated) in an energetic way and are separated by low barriers which may be overcome either under changed conditions (ionic strength, pH, polarity) or during the interaction of histone oligomers with cellular effectors. Structural histone conformer rearrangements occurring at the level of changes in the tertiary and quaternary structures may determine parallel with other factors structural chromatin rearrangements underlying expression and repression of the eucaryote genes.

1. Structure of the nucleosome core particle of chromatin / J. T. Finch, L. C. Lutter, D. Rhodes et al.—Nature, 1977, 269, N 5623, p. 28-36.
2. Primary organization of the nucleosome core particles. Sequential arrangement of histones along DNA / V. V. Shick, A. V. Belyavsky, S. G. Bavykin et al.—J. Mol. Biol., 1980, 139, N 3, p. 491-517.
3. Crick F. H. C., Klug A. Kinky helix.—Nature, 1975, 255, N 5509, p. 530-533.

4. Журкин В. Б. Локальная подвижность двойной спирали ДНК. Сравнение конформационных расчетов с экспериментом.— Молекуляр. биология, 1983, 17, № 3, с. 622—638.
5. Worcel A., Strogatz S., Riley D. Structure of chromatin and the linking number of DNA.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, 78, N 3, p. 1461-1465.
6. Kornberg R. D. The location of nucleosomes in chromatin, specific or unspecific? — Nature, 1981, 292, N 5284, p. 579-580.
7. Periodicity of deoxyribonuclease I digestion of chromatin / A. Prunell, R. D. Kornberg, L. C. Lutter et al.— Science, 1979, 204, N 4395, p. 855—858.
8. Nucleosome core histone complex isolated gently and rapidly in 2 M NaCl is octameric / M. Philip, M. Yamaluddin, R. V. Ramasastry, H. S. Chandra.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, 76, N 10, p. 5178-5182.
9. Stein A., Page D. Core histone association in solutions of high salt.— J. Biol. Chem., 1980, 255, N 8, p. 3629-3637.
10. Sperling R., Wachtell E. J. The histones.— Adv. Protein Chem., 1981, 34, p. 1-60.
11. Butler A. P., Harrington R. G., Olins D. E. Salt-dependent interconversion of inner histone oligomers.— Nucl. Acids Res., 1979, 6, N 4, p. 1509-1520.
12. Храпунов С. Н., Протас А. Ф., Бердышев Г. Д. Гетерогенность структуры димеров гистонов (H2A—H2B).— Биофизика, 1982, 27, № 5, с. 791—794.
13. Kornberg R. D., Thomas J. O. Chromatin structure, oligomers of the histones.— Science, 1974, 184, N 4139, p. 865-868.
14. Ruiz-Carrillo A., Jorcano J. L. An octamer of core histone in solution; central role (H3-H4) tetramer in the self assembly.— Biochemistry, 1979, 18, N 5, p. 760-768.
15. Пространственная организация димера гистонов (H2A—H2B) в растворах с различной ионной силой / С. Н. Храпунов, А. И. Драган, А. Ф. Протас, Г. Д. Бердышев.— Молекуляр. биология, 1983, 17, № 5, с. 992—1000.
16. Structure of histone tetramer (H3-H4)₂. I. Peculiarities of optical absorption, fluorescence and light scattering in response to the changes of ionic strength and pH of the medium / S. N. Khrapunov, A. I. Dragan, A. F. Protas, G. D. Berdyshev.— Int. J. Biol. Macromol., 1984 a, 6, N 1, p. 26-30.
17. Structure of histone tetramer (H3-H4)₂. II Position of λ_{\max} in the tyrosyl fluorescence spectra and tyrosyl accessibility to molecules-quenchers / S. N. Khrapunov, A. I. Dragan, A. F. Protas, G. D. Berdyshev.— Int. J. Biol. Macromol., 1984 b, 6, N 1, p. 31—34.
18. Dragan A. I., Khrapunov S. N. The red shift of tyrosine fluorescence spectrum in polyethylen-glicol and urea solution.— Stud. biophys., 1983, 96, N 2, p. 127-132.
19. The chance of λ_{\max} in tyrosol fluorescence spectra of RNase A and histone dimer (H2A-H2B) under denaturation / A. I. Dragan, S. N. Khrapunov, A. F. Protas, G. D. Berdyshev.— Stud. biophys., 1983, 96, N 3, p. 183-193.
20. Храпунов С. Н., Сиволюб А. В., Бердышев Г. Д. Теоретическое предсказание пространственной укладки полипептидных цепей гистонов H2A и H2B.— Биофизика, 1981, 26, № 1, с. 37—40.
21. Храпунов С. Н., Сиволюб А. В., Бердышев Г. Д. Модель пространственной укладки полипептидных цепей гистонов H3 и H4.— Биофизика, 1981, 26, № 2, с. 242—246.
22. Храпунов С. Н., Сиволюб А. В., Бердышев Г. Д. Теоретическое предсказание укладки полипептидных цепей гистонов H2A, H2B, H3 и H4 в составе октамера.— Биофизика, 1981, 26, № 3, с. 411—414.
23. Laskey R. A., Earnshaw W. C. Nucleosome assembly.— Nature, 1980, 286, N 5775, p. 763-767.
24. Храпунов С. Н., Сиволюб А. В., Кучеренко Н. Е. Особенности белково-нуклеиновых взаимодействий в составе хроматина эукариотов.— Усп. совр. биологии, 1984, 98, № 2(5), с. 163—176.
25. Stability of the primary organization of nucleosome core particles upon some conformational transitions / V. W. Zayets, S. G. Vavykin, V. L. Karpov et al.— Nucl. Acids Res., 1980, 9, N 5, p. 1053-1068.
26. 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, 30, № 1, с. 12—23.
27. Weisbrod H. Active chromatin.— Nature, 1982, 297, N 5864, p. 289-295.
28. Храпунов С. Н., Бердышев Г. Д. Структура и функции основных белков хроматина мужских гамет животных организмов.— Усп. совр. биологии, 1981, 92, № 3(6), с. 323-337.
29. Chromatin structure during male gametogenesis of grass carp / S. N. Kadura, S. N. Khrapunov, V. N. Chabanny, G. D. Berdyshev.— Comp. Biochem. and Physiol., 1983, 74B, N 4, p. 819-823.

Киевский госуниверситет

Получено 06.08.84