

20. Lukashin A. V., Vologodskii A. V., Frank-Kamenetskii M. D. Comparison of different theoretical description of helix-coil transitions in DNA.— *Biopolymers*, 1976, 15, N 9, p. 1841—1844.
21. Zasedatelev A. S., Gursky G. V., Volkenstein N. V. Binding isotherms of small molecules to DNA.— *Stud. biophys.*, 1973, 40, N 1, p. 79—82.
22. Zimm B. H., Bragg J. K. Theory of the phase transition between helix and random coil in polypeptide chains.— *J. Chem. Phys.*, 1959, 31, N 2, p. 526—535.
23. Флору П. Статистическая механика цепных молекул.— М.: Мир, 1971.—358 с.

Ин-т биоорган. химии АН БССР, Минск

Получено 22.10.84

УДК 612.398.145.1:612.015.3:547.962.2:576.315.42

## РОЛЬ ПОЛИАНИОНОВ КАК КОНФОРМОНОВ И КОНКУРЕНТОВ ДНК В ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА

В. Д. Папонов

При исследовании хроматина, который можно рассматривать как генетический аппарат клеток [1], прежде всего приходится сталкиваться с многокомпонентностью его химического состава и динамичностью структурной организации, что проявляется в процессах транскрипции генов, репликации ДНК и репродукции хромосом в делящихся клетках. Многокомпонентность и динамичность структуры хроматина затрудняют его изучение и описание. В этой связи может оказаться полезной классификация компонентов хроматина, разделяющая их по составу на поликатионы и полианионы, а по времени пребывания в комплексе с ДНК — на перманентные и транзитные. Однако даже такая простейшая классификация осложняется тем, что белки хроматина являются носителями как отрицательных, так и положительных зарядов, а относительное количество этих зарядов может меняться за счет ферментативной модификации. Тем не менее основные белки, в частности гистоны, часто относят к поликатионам, а кислые белки — к полианионным компонентам хроматина. К полианионным компонентам относятся РНК и другие полифосфаты, а также сульфированные полисахариды. Важнейшим полианионом хроматина является ДНК.

На основе вышеуказанной классификации компонентов хроматина в настоящей работе сделана попытка проанализировать характер их взаимоотношений с акцентом на выяснении роли полианионных факторов, обнаруженных в некоторых клетках в виде комплексов с молекулами, составляющими внехромосомный пул гистонов.

Во-первых, это могут быть отношения типа «слуги — господ». Действительно, перманентные и транзитные компоненты хроматина могут служить соответственно постоянным и временным интересам ДНК, хранящей в себе наследственную информацию и выдающей ее в ходе транскрипции. В этом случае полианионные и поликатионные компоненты хроматина предназначены для организации необходимого конформационного состояния ДНК или хромосомной фибриллы. Такие компоненты, создающие новую конформацию у субстрата, с которым они взаимодействуют, можно назвать конформонами (по аналогии с репликасами, транскриптами и т. д.), оставив термин «конформеры» для обозначения структурных вариантов самого субстрата, реализующихся в разных условиях, т. е. для обозначения конформационных изомеров [2]. В англоязычной литературе в качестве синонима конформонам, хотя и с более широким смыслом, существует термин «shaperon» — формирователь.

Представления о том, что определенные компоненты хроматина (названные выше конформонами) могут изменять конформацию ДНК или структурное состояние участков фибрилл хроматина (нередко го-

воят о конформации хроматина), сейчас широко приняты, и на их основе пытаются объяснить дифференциальную экспрессию генов и ее регуляцию [3].

Однако помимо отношений типа «слуги — господ» нельзя упускать из виду возможность существования в генетическом аппарате, как и вообще в клетке, отношений, основанных на принципе конкуренции компонентов. Примером таких отношений является конкуренция между гистонами при их связывании с ДНК *in vitro*.

Можно было бы считать, что самое первое свидетельство в пользу существования этого явления получено в 1964 г. Джонсом и Батлером [4], которые сообщили, что при добавлении к ДНК 4-кратного весового избытка суммарного препарата гистонов в комплекс с ДНК вступает только фракция гистона I3 (H3). Однако, как показали позднее наши эксперименты [5], в этих условиях в комплекс с ДНК вступают все фракции суммарного препарата гистонов, за исключением H1. Впервые возможность конкурентных отношений между гистонами при их связывании с ДНК доказана в 1969 г. в лаборатории И. П. Ашмарина [6]. Однако эти исследователи ограничились изучением влияния индивидуальных фракций гистонов на связывание с ДНК гистона H1.

Нами были изучены конкурентные отношения между гистонами при их связывании с ДНК в условиях, когда все фракции могут формировать специфические комплексы друг с другом. Анализ конкурентоспособности гистонов и их комплексов, спонтанно возникающих в конкретной среде, за связывание с ДНК позволил впервые прямым способом определить ряд сродства гистонов и их специфических комплексов к ДНК в физиологической среде [5]:  $(H3-H4)_n > (H2A-H2B)_n > H3 > H4 > H2A > H2B > H1$ . Отличие этого ряда от ряда, полученного Ашмариним и Муратчаевой [6] в условиях, когда только две фракции гистонов могли конкурировать за связь с ДНК, доказывает принципиальное значение взаимной ассоциации гистонов в определении их относительного сродства к ДНК. Именно поэтому данные об относительном сродстве гистонов к ДНК, полученные путем изучения последовательности диссоциации гистонов хроматина или последовательности их связывания с ДНК при изменении среды, говорят о сродстве гистонов к ДНК только косвенно, так как в разных средах меняется ассоциация гистонов друг с другом.

Анализ относительной конкурентоспособности гистонов за связь с ДНК можно проводить в любой конкретной среде. В частности, в воде, где молекулы гистонов не ассоциируют друг с другом, ряд относительного сродства гистонов к ДНК имеет вид:  $H4 \sim H3 > H2A > H2B \sim H1$  [5]. Установленный нами характер относительного сродства гистонов к ДНК находит признание, поскольку простота экспериментального подхода делает выводы очевидными [1, 7].

Открытие явления конкуренции гистонов за ДНК имеет практическое значение для исследователей, использующих искусственные нуклеогистоны, полученные из суммарного препарата гистонов и ДНК. Дело в том, что в настоящее время широко применяют для получения искусственных нуклеогистонов смеси с высоким весовым отношением гистоны/ДНК, достигающим в ряде случаев восьми [8, 9]. Однако нами показано [10], что в смеси с 1,5—2-кратным весовым избытком суммарного препарата гистонов над ДНК гистон H1 не связывается с ДНК. Уже при отношении гистон/ДНК > 1 вместо нуклеогистона, содержащего все гистоновые фракции, исследователи должны получать комплекс, обедненный гистонами H1 [10], и, следовательно, имеющий суперструктуру, существенно отличную от ожидаемой, поскольку H1, как известно, играет принципиальную роль в организации нуклеогистона.

В результате конкуренции гистонов за ДНК добавление к хроматину в физиологическом растворе суммарного препарата гистонов в количестве, равном уже имеющемуся в хроматине, приводит к полному удалению из хроматина гистона H1 [11]. Этот факт имеет принципи-

альное теоретическое значение, поскольку в ядрах некоторых клеток отношение гистон/ДНК достигает 3,3 [12] и даже 20 000 [13]. В работах, описывающих такие ситуации, вопрос о конкуренции гистонов за ДНК в ядрах клеток не обсуждается. Внимание сосредоточено на полианионных компонентах клеточных ядер, которым отводится роль конформонов, организующих избыточные гистоны в октамерные комплексы со специфической конформацией [14]. Предполагают, что полианионные ядерные компоненты могут служить «факторами сборки хроматина», участвуя в формировании (shapeons) и в транспортировке к ДНК специфических октамерных комплексов гистонов [14—17].

Между тем неоднократно показано, что добавление к хроматину в среде низкой ионной силы полианионов (тРНК, ДНК, гепарина) приводит к последовательному переходу фракций гистонов на полианион [18, 19]. Нам удалось показать, что в среде физиологической ионной силы можно тоже вызвать под влиянием полианиона (гепарина) диссоциацию не только гистона Н1, что было обнаружено ранее [18], но также гистонов Н2А и Н2В [20]. Содержание гистона Н4 в комплексе с ДНК по результатам электрофоретического анализа при этом не изменялось. Таким образом, конкурентная диссоциация гистонов от ДНК хроматина под влиянием полианиона происходит с разрушением нуклеосомного октамера (Н3—Н4—Н2А—Н2В)<sub>2</sub>.

Конечно, наши эксперименты с гепарином не отвергают полностью возможность перехода гистонов от полианионных «факторов сборки хроматина» к ДНК в виде октамеров, но они поднимают вопрос о необходимости строгого экспериментального обоснования этой гипотезы. Против транспортировки гистонов к ДНК в виде октамеров «факторами сборки хроматина» говорят также данные о последовательной посадке фракций Н3+Н4 и Н2А+Н2В на ДНК в ходе ее репликации и репродукции хромосом [21]. Это вынуждает сторонников «факторов сборки хроматина» признавать, что пути сборки хроматина *in vivo* могут быть сложнее, чем они считали ранее [22].

В то же время функциональный смысл факторов, находящихся в комплексе с внехромосомными гистонами, может все-таки состоять в сборке гистоновых октамеров или наномеров Н1—(Н3—Н4—Н2А—Н2В)<sub>2</sub>, но не для последующей их транспортировки к ДНК, а для предотвращения конкуренции избыточных гистонов за ДНК, которая могла бы привести, как это происходит в условиях *in vitro*, к сборке хроматина, лишённого гистона Н1 или даже содержащего только гистоны Н3 и Н4 при высоком избытке суммарного препарата гистонов над ДНК [5, 23, 24]. Таким образом, упомянутые полианионные факторы, конкурируя с ДНК за внехромосомные гистоны и собирая их в идентичные комплексы, не способные конкурировать друг с другом за ДНК в силу своей идентичности, могут осуществлять депонирование избыточных гистонов. Гистоны, необходимые для сборки репродуцирующихся хромосом по мере деления клеток, могут освободиться ферментативной деградацией «факторов депонирования гистонов».

#### THE ROLE OF POLYANIONS AS DNA CONFORMONS AND COMPETITORS IN CHROMATIN ORGANIZATION

V. D. Paponov

Institute of Medical Genetics, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

#### S u m m a r y

Polyanionic components of cell nucleus participating in chromatin organization may be divided into two classes. The first class of permanent and transitive conformons provides specific conformations of DNA fragments and/or special states of corresponding sites of chromatin fibers for a long and short period of time, respectively. The second class of polyanions fulfils the role of competitors with DNA for the chromatin components. So-called «factors of chromatin assembly» occurring in some cells as complexes with mole-

cules of nonchromosomal histone pool are representatives of the second class of the nuclear polyanions. The functional role of formation of the above complexes may be in prevention of histone competition for DNA, which causes in vitro the assembly or reorganization of chromatin into the nucleoprotein completely devoid of the histone H1 even at 1.5-2-fold weight excess of the whole histone over DNA.

1. Канунго М. Биохимия старения.— М.: Мир, 1982.—294 с.
2. Химический энциклопедический словарь / Под ред. И. Л. Кнунянц.— М.: Сов. энцикл., 1983.—792 с.
3. DNA structure and gene regulation / R. D. Wells, T. C. Goodman, W. Hillen et al.— Progr. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol., 1980, 24, p. 167—267.
4. Johns E. W., Buller J. A. V. Specificity of the interactions between histones and deoxyribonucleic acid.— Nature, 1964, 204, N 4961, p. 853—855.
5. Папонов В. Д. Конкурентное связывание гистонов с ДНК и проблема самосборки хроматина.— Биохимия, 1980, 45, № 9, с. 1539—1548.
6. Ашмарин И. П., Муратчаева П. С. О конкурентных взаимоотношениях фракций гистонов при взаимодействии с ДНК.— Там же, 1969, 34, № 6, с. 1250—1256.
7. Samal B. Transcription of eukaryotic genome.— N. Y.: Acad. Press, 1980.—370 p.
8. Voordouw G., Kalif D., Eisenberg H. Studies on Col E<sub>1</sub>-plasmid DNA and its interactions with histones: sedimentation velocity studies of monodisperse complexes reconstituted with calf-thymus histones.— Nucl. Acids Res., 1977, 4, N 5, p. 1207—1223.
9. Суперспирализация кольцевой ковалентно замкнутой ДНК в присутствии гистонов H2A, H2B, H3 и H4 или протамина и экстракта из эмбрионов *Drosophila melanogaster* / Р. П. Вашакидзе, К. Г. Карпенчук, В. И. Нактинис и др.— Биохимия, 1980, 45, № 4, с. 718—722.
10. Конкуренция гистонов за ДНК и ее возможная роль в самосборке эу- и гетерохроматина / В. Д. Папонов, П. С. Громов, В. В. Богданов, Д. М. Спитковский.— Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1981, 91, № 5, с. 548—550.
11. Папонов В. Д., Громов П. С., Спитковский Д. М. Избирательная утрата гистона H1 — новая реакция хроматина на добавленный суммарный гистон в среде физиологической ионной силы.— Там же, 1982, 94, № 11, с. 31—33.
12. Grellet F., Delseny M., Guillon Y. Histone content of germinating pea embryo chromatin decreases as DNA replicates.— Nature, 1977, 267, N 5613, p. 724—726.
13. Woodland H. R. Histone synthesis during the development of *Xenopus*.— FEBS Lett., 1980, 121, N 1, p. 1—7.
14. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA / R. A. Laskey, B. M. Honda, A. D. Mills, J. T. Finch.— Nature, 1978, 275, N 5679, p. 416—420.
15. An acidic protein which assembles nucleosomes in vitro is the most abundant protein in *Xenopus* oocyte nuclei / A. D. Mills, R. A. Laskey, P. Black, E. M. De Robertis.— J. Mol. Biol., 1980, 139, N 3, p. 561—568.
16. Nelson T., Hsieh T.-S., Bruttig D. Extracts of *Drosophila* embryos mediate chromatin assembly in vitro.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, 76, N 11, p. 5510—5514.
17. Nelson T., Wiegand R., Bruttig D. Ribonucleic acid and other polyanions facilitate chromatin assembly in vitro.— Biochemistry, 1981, 20, N 9, p. 2594—2601.
18. Варшавский А. Я., Микельсаар У. Н., Ильин Ю. В. Структура дезоксирибонуклеопротеидов хроматина. IV. Перераспределение белков в системах ДНП—ДНК, ДНП—РНК и ДНП—ДНП.— Молекуляр. биология, 1972, 6, № 4, с. 507—519.
19. Структурные модификации хроматина под влиянием полианионов / П. С. Громов, В. Д. Папонов, Н. А. Соколов и др.— В кн.: Молекулярные механизмы генетических процессов: Тез. докл. III Всесоюз. симпозиум. М., 1976, с. 47—48.
20. Диссоциация и декомпактизация хроматина гепарином в среде «физиологической» ионной силы / В. Д. Папонов, П. С. Громов, П. А. Краснов и др.— Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1980, 90, № 9, с. 325—328.
21. Worcel A., Han S., Wong M. L. Assembly of newly replicated chromatin.— Cell, 1978, 15, N 3, p. 969—977.
22. Earnshaw W. C., Rekvig O. P., Hannestad K. Histones synthesized for use in early development of *Xenopus laevis* are stored as a complex with antigenic properties similar to those of the octamer core of nucleosomes.— J. Cell Biol., 1982, 92, N 3, p. 871—876.
23. Папонов В. Д., Громов П. С., Рупасов В. В. Различна ли прочность связи гистоновых фракций с ДНК? — Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1980, 90, № 8, с. 163—165.
24. On mechanisms determining the interrelationships between DNA and histone components of chromatin / V. D. Paponov, P. S. Gromov, N. A. Sokolov et al.— Eur. J. Biochem., 1980, 107, N 3, p. 113—122.

Ин-т мед. генетики АМН СССР, Москва

Получено 09.08.84