

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

## ИЗУЧЕНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ТРАНСКРИПЦИОННО АКТИВНОГО И РЕПРЕССИРОВАННОГО ХРОМАТИНА С ПОМОЩЬЮ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

*С помощью флюоресцентных зондов пирена и 1,8-АНС изучены конформационные характеристики фракций активного и репрессированного хроматина из печени крыс. Показано, что между хромофорами белков хроматина и введенными в раствор молекулами пирена наблюдается индуктивно-резонансный перенос энергии (ИРПЭ), позволяющий судить о некоторых структурных параметрах белок-липидного взаимодействия. Рассчитаны вероятность переноса энергии с белковых флюорофоров на пирен и доля триптофановых остатков белков, принимающих участие в ИРПЭ. Заметные различия в значениях указанных параметров для рассматриваемых фракций хроматина позволили сделать вывод о более рыхлой упаковке активной фракции, что является необходимой предпосылкой для запуска и осуществления процесса транскрипции, а также о зависимости этого процесса от характера взаимодействия белков и липидов в хроматине.*

**Введение.** Флюоресцентные зонды широко применяются в исследовании клеток, мембран и липопротеинов [1, 2]. Одним из методических приемов в этой области является индуктивно-резонансный перенос энергии (ИРПЭ), с помощью которого изучают взаимное расположение белков, липидов и зондов в мембранах [2, 3].

Нами предпринята попытка использовать явление ИРПЭ для изучения такого сложного надмолекулярного образования в виде структурированного белково-нуклеиново-липидного комплекса, каковым является ядерный хроматин эукариот.

**Материалы и методы.** В работе использовали 3-месячных крыс-самцов линии Вистар (150—200 г). Животных декапитировали в утренние часы под легким эфирным наркозом, извлекали печень и выделяли из нее фракции транскрипционно активного (ТАХ) и репрессированного (РХ) хроматина [4]. Концентрацию ДНК и белка во фракциях хроматина определяли спектрофотометрически [5], общее содержание фосфолипидов — в соответствии с [6], экстрагируя их хлороформ-метанольной смесью.

Структурные различия во фракциях хроматина изучали с помощью флюоресцентных зондов: пирена (перекристаллизованного из метанола) и 1-анилинонафталин-8-сульфоната аммония (1,8-АНС) фирмы «Serva» (Германия). При работе с пиреном ( $2 \cdot 10^{-6}$  М) длина волны возбуждения составляла 334 нм, с 1,8-АНС ( $1 \cdot 10^{-5}$  М) — 386 нм.

При ИРПЭ с белковых флюорофоров на пирен флюоресценцию измеряли на длине волны 330 нм, длина волны возбуждения белков в этом случае составляла 286 нм, а концентрация пирена —  $2 \cdot 10^{-6}$  М.

Измерения проводили на спектрофлюориметре «Hitachi MPF-4» (Япония) в кварцевых кюветах (1 см) при 25 °С.

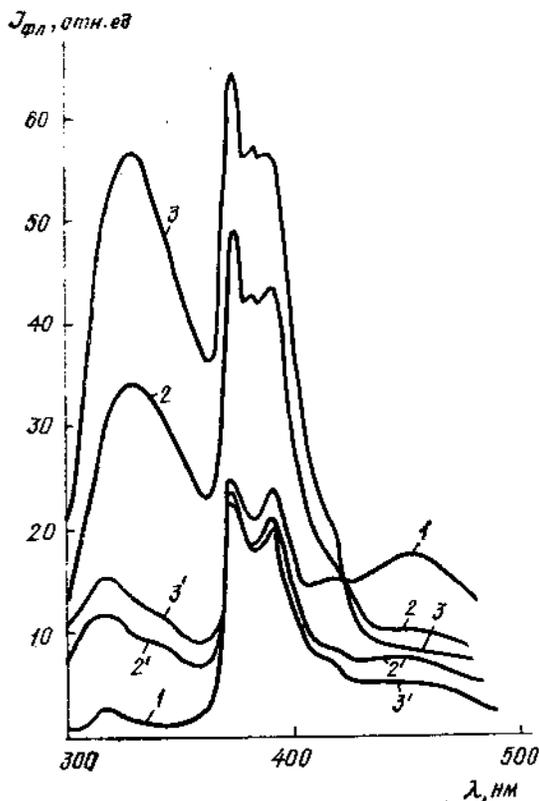
Спектры поглощения фракций РХ (0,03 мг/мл по белку) и ТАХ (0,15 мг/мл по белку) изучали в области 210—370 нм с помощью спектрофотометра «Shimadzu MPS-5000» (Япония) в кварцевых кюветах (1 см).

**Результаты и обсуждение.** По данным литературы [2], благодаря наличию остатков триптофана белок может служить донором энергии

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

в присутствии липидного зонда-акцептора пирена. Вследствие этого по возгоранию флюоресценции зонда либо по тушению триптофановой флюоресценции белка можно судить о некоторых структурных параметрах белок-липидного взаимодействия. В нашем случае реализуется именно такая ситуация: между хромофорами белков хроматина (донорами) и введенными в раствор молекулами пирена (акцепторами) наблюдается перенос энергии.

На рис. 1 приведены спектры флюоресценции пирена при добавлении ТАХ и РХ (биохимические характеристики фракций представлены в таблице), из которых видно, что характер рассматриваемого ИРПЭ



для этих двух фракций хроматина различен. В случае РХ тушение белковой флюоресценции сопровождается заметным уменьшением свечения эксимеров пирена, в то время как флюоресценция мономеров пирена лишь слегка уменьшается. В случае ТАХ наблюдается тушение белковой флюоресценции с одновременным возрастанием свечения мономерной формы пирена за счет переноса энергии с донора, миграции со стороны эксимерной формы (о чем свидетельствует наличие изобестической точки при 425 нм), а также в результате перекрывания полос белковой флюоресценции ТАХ и флюоресценции мономеров пи-

Рис. 1. Спектры флюоресценции растворов: 1 — пирен ( $2 \cdot 10^{-6}$  М); 2 — пирен+ТАХ (0,021 мг/мл по белку); 2' — пирен+РХ (0,021 мг/мл по белку); 3 — пирен+ТАХ (0,063 мг/мл по белку); 3' — пирен+РХ (0,063 мг/мл по белку)

рена. Наблюдаемые различия в ИРПЭ для рассматриваемых фракций хроматина объясняются, по-видимому, как отличающейся природой белковой флюоресценции [7], так и неодинаковым составом белков этих фракций [8].

Вероятность  $W$  переноса энергии с белковых флюорофоров на пирен оценивали по [2] на основании данных рис. 2, измеряя степень тушения флюоресценции донора ( $F_D$ ) в присутствии акцептора энергии:

$$F_D/(F_D)_0 = 1 - W, \quad (1)$$

где  $(F_D)_0$  — флюоресценция донора в отсутствие акцептора.

Результаты расчетов значений вероятности  $W$  переноса энергии приведены в таблице. Согласно [2], более высокое значение вероятности переноса энергии в ТАХ по сравнению с РХ свидетельствует о том, что структура последнего характеризуется большим расстоянием между донором и акцептором, и может быть связано с более развернутой структурой ТАХ по сравнению с РХ [7, 9].

В соответствии с методом, описанным в [2], была оценена также доля белков, участвующих в ИРПЭ. На рис. 3 в двойных обратных координатах приведены зависимости тушения белковой флюоресценции ( $F_{330}$ ) для обеих фракций хроматина, из которых видно, что в выбран-

ном диапазоне концентраций пирена зависимости  $F_0/(F_0-F) = f(1/C_{\text{п}})$  ( $F_0$  и  $F$  — интенсивности флюоресценции хроматина в отсутствие пирена и при его концентрации  $C_{\text{п}}$  соответственно) имеют линейный характер. Экстраполяцией линейного участка зависимости на бесконечную концентрацию пирена получают отрезок на оси ординат, характеризующий параметр  $(F_0/F_0 - F)_{\text{min}}$ , значение которого используют для расчета коэффициента  $\beta$  — доли триптофановых остатков белка, принимающих участие в ИРПЭ:

$$\beta = \alpha (F_0/F_0 - F)_{\text{min}}^{-1} \quad (2)$$

где  $\alpha$  — коэффициент, относящийся только к тушащимся белкам.

Если допустить, что акцептор (гидрофобный зонд пирен), локализуясь в хроматине, распределен в объеме липидных составляющих подобно тому, как это происходит в липопротеинах низкой плотности

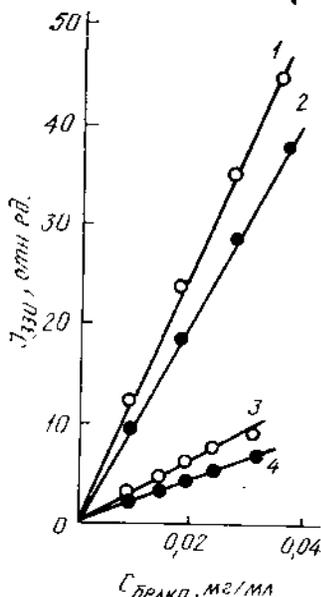


Рис. 2. Зависимость интенсивности собственной флюоресценции белковой составляющей фракций хроматина от ее концентрации: 1 — TAH; 2 — TAH в присутствии  $2,5 \cdot 10^{-6}$  М пирена; 3 — РХ; 4 — РХ в присутствии  $2,5 \cdot 10^{-6}$  М пирена

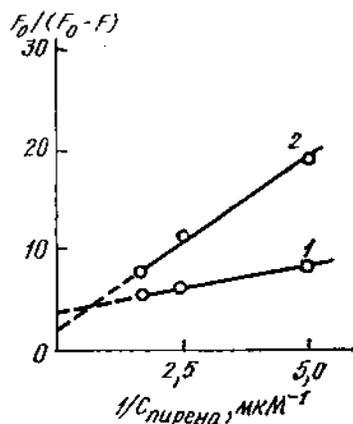


Рис. 3. Зависимость тушения белковой флюоресценции при ИРПЭ от концентрации пирена: 1 — TAH; 2 — РХ

[10], то коэффициент  $\alpha$  может быть принят 0,75 [2]. Тогда значения  $\beta$  для TAH и РХ составляют 0,19 и 0,30 соответственно, т. е. в TAH только 19 % белковой флюоресценции обусловлено триптофановыми остатками, расположенными около липида (не далее 3,6 нм от его поверхности [2]), по сравнению с 30 % в РХ, а структура тушащихся белков, локализующихся вблизи липида в TAH, является более рыхлой, нежели в РХ, что подтверждает представление о менее компактной упаковке TAH (см. выше).

Активационные процессы во внутримолекулярной динамике белков [11] могут определяться также вязкостью микроокружения пирена, облегчая перенос энергии с белков на пирен. Для получения такой важной характеристики, как отношение интенсивностей флюоресценции мономерной и эксимерной форм пирена ( $I_{393}/I_{450}$ ), в спектры флюоресценции пирена, полученные в присутствии хроматина, были введены соответствующие поправки, поскольку длинноволновое крыло полосы белковой флюоресценции захватывает область испускания мономеров пирена. На рис. 4 приведено изменение параметров  $I_{\text{м}}/I_{\text{э}}$  в зависимости от концентрации каждой из фракций (по белку). Видно, что возрастающее рассматриваемого соотношения в РХ заметно ниже, нежели в TAH.

Параметр  $I_m/I_s$  характеризует микровязкость (скорость поступательной диффузии зонда) липидного матрикса биомембран [1]. Однако в нашем случае формальное использование указанного соотношения для характеристики микровязкости требует ряда допущений, основным из которых является подобие структурного состояния липидов во фракциях хроматина и в фосфолипидном бислое. Кроме того, флуоресцентные свойства фракций сравнивали при равной концентрации белков, хотя при этом общее содержание фосфолипидов в ТАХ приблизительно в 2,5 раза выше, чем в РХ (таблица).

Наконец, не исключено, что, как и в случае липидного бислоя [12], люминесценцию пирена может в значительной степени тушить молекулярный кислород, в то время как связывание пирена с белками может

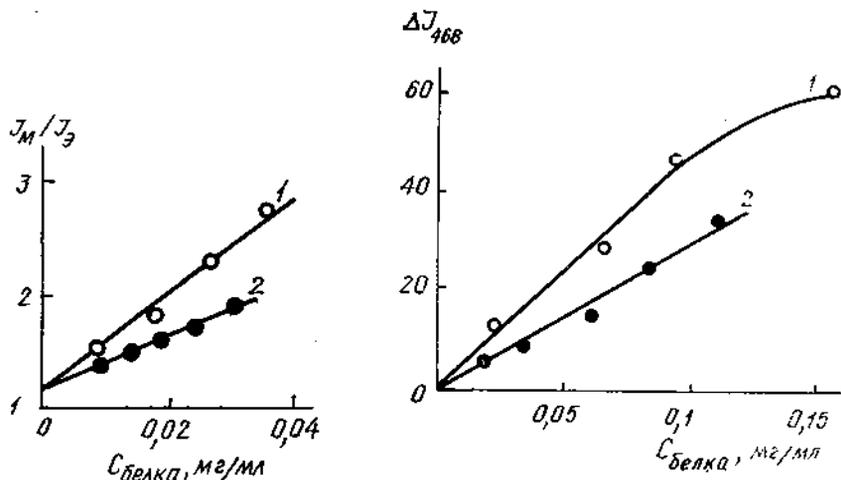


Рис. 4. Зависимость параметров  $I_m/I_s$  пирена от концентрации фракций хроматина (по белку): 1 — ТАХ; 2 — РХ

Рис. 5. Зависимость интенсивности флуоресценции 1,8-АНС от концентрации фракций хроматина (по белку): 1 — ТАХ; 2 — РХ

защищать его от тушения. Поэтому приведенные на рис. 4 результаты следует рассматривать лишь как подтверждение качественных различий в структуре липидных составляющих во фракциях. Тем не менее, если предположить, что допущения относительно структуры белково-липидного комплекса в хроматине соответствуют действительности, то микровязкость липидных образований в ТАХ ниже по сравнению с РХ. Это является еще одним свидетельством более плотной упаковки последнего.

На рис. 5 представлены результаты флуоресцентного зондирования фракций хроматина анионным зондом 1,8-АНС, позволяющие судить о различиях в свойствах поверхности липидных образований во фракциях хроматина. Более высокие значения  $I_{466}$  в ТАХ по сравнению с РХ мо-

Биохимические и физико-химические характеристики фракций хроматина печени крыс ( $n=6 \div 10$ )

| Показатель  | Фракция |      |
|---|---------|------|
|   | ТАХ     | РХ   |
| Доля фракций, %                                     | 9,2     | 90,8 |
| Отношение белок/ДНК                                 | 8,6     | 1,46 |
| Общее содержание фосфолипидов, нмоль/мг белка       | 68,0    | 28,0 |
| Отношение оптических плотностей $D_{230}/D_{260}$   | 1,48    | 0,69 |
| Вероятность переноса энергии ( $W$ )                | 0,19    | 0,11 |
| Доля белков, принимающих участие в ИРПЭ ( $\beta$ ) | 0,19    | 0,30 |

гут свідечувати про те, що дана фракція характеризується як більш високим позитивним зарядом поверхності, так і більшою розривленістю структури, сприяючими ефективному встрайванню 1,8-АНС. Не слід забувати, однак, що певне вплив на розглядаваний показник буде мати і вміст фосфоліпідів у фракціях хроматину, який, як уже зазначалося вище, помітно відрізняється.

Таким чином, флуоресцентні зонди пірен і 1,8-АНС придатні для виявлення відмінностей в структурі транскрипційно активної і репресованої фракцій хроматину. При цьому з використанням явища ІРПЕ з білковими флуорофорами на пірені можливо отримати не тільки якісні, але і кількісні характеристики таких відмінностей. Представлені експериментальні дані дозволяють зробити висновок про важливість ліпід-білкових взаємодій у формуванні структури досліджуваних фракцій хроматину. Принципові відмінності в характері подібного взаємодіяння в цих фракціях в значній мірі обумовлюють формування більш релаксованої розгорнутої структури транскрипційно активної хроматину, що, в свою чергу, є одним з головних факторів, сприяючих і запускаючих процес транскрипції. Важливість білкового і ліпідного компонентів хроматину в визначенні його транскрипційної активності була показана нами раніше на основі декількох інших методических підходів [13]. Подібне положення випливає також з схожої упаковки ДНК у фракціях РХ і ТХХ [9].

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

#### ВИВЧЕННЯ КОНФОРМАЦІЙНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ТРАНСКРИПЦІЙНО АКТИВНОГО ТА РЕПРЕСОВАНОГО ХРОМАТИНУ ЗА ДОПОМОГОЮ ФЛЮОРЕСЦЕНТНИХ ЗОНДІВ

##### Резюме

За допомогою флуоресцентних зондів пірена і 1,8-АНС вивчено конформаційні характеристики фракцій активної та репресованого хроматину із печінки щурів. Показано, що між хромофорами білків хроматину і введеними до розчину молекулами пірена спостерігається індуктивно-резонансний перенос енергії (ІРПЕ), який дає уявлення про деякі структурні параметри білок-ліпідної взаємодії. Розраховано ймовірність переносу енергії з білкових флуорофорів на пірен та частку триптофанових залишків білків, що беруть участь у ІРПЕ. Помітні розбіжності у значеннях згаданих параметрів для розглянутих фракцій хроматину дозволили зробити висновок про більш пухке укладання активної фракції, що є необхідною передумовою для запуску і здійснення процесу транскрипції, а також про залежність його від характеру взаємодії білків і ліпідів у хроматині.

*R. G. Primak, A. G. Goriushko, E. L. Levitsky, Yu. I. Gubsky, S. N. Novikova*

#### STUDY OF CONFORMATIONAL CHARACTERISTICS OF TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE AND REPRESSED CHROMATIN BY MEANS OF FLUORESCENT PROBES

##### Summary

Conformational characteristics of transcriptionally active and repressed chromatin fractions from rat liver were studied by means of pyrene probe and 1,8-ANS. It was shown that there observed inductive-resonance energy transfer (IRET) between chromatin protein chromophores and the pyrene molecules, which were introduced to the solution; this allowed to conclude about some structural parameters of protein-lipid interactions. Probability of energy transfer from protein fluorophores to pyrene and the portion of protein tryptophane residues, which took part in IRET, were calculated. Marked differences in the values of the parameters stated for the chromatin fractions obser-

ved allowed to conclude about less compact package of the active fraction, which was the necessary premise for the launching and realization transcriptional process, as well as about the dependence of this process on the character of the interaction of proteins and lipids in chromatin.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.— М.: Наука, 1980.— 320 с.
2. *Добрецов Г. Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов.— М.: Наука, 1989.— 277 с.
3. *Лакович Дж.* Основы флуоресцентной спектроскопии.— М.: Мир, 1986.— 496 с.
4. *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.
5. *Цанев Р. Г., Марков Г. Г.* К вопросу о количественном спектрофотометрическом определении нуклеиновой кислоты // Биохимия.— 1960.— 25, № 1.— С. 51—59.
6. *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.
7. *Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Примак Р. Г. и др.* Конформационные характеристики и упаковка эндогенных липидов фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина // Укр. биохим. журн.— 1991.— 63, № 2.— С. 83—89.
8. *Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Чабанный В. Н. и др.* Изменения белкового, липидного состава, ДНК- и РНК-полимеразной активности фракций хроматина и ядерного матрикса печени крыс в условиях Д-гиповитаминоза // Там же.— 1990.— 62, № 6.— С. 22—30.
9. *Краевский В. А., Крылов Д. Ю., Разин С. В., Михайлов В. С.* Анализ конформационной подвижности ДНК в транскрипционно активном хроматине // Биофизика.— 1993.— 38, № 1.— С. 108—116.
10. *Добрецов Г. Е.* Исследование пространственной структуры мембран и липопротеинов флуоресцентными зондами // Укр. биохим. журн.— 1984.— 56, № 2.— С. 211—222.
11. *Демченко А. П.* Люминесценция и динамика структуры белков.— Киев: Наук. думка, 1988.— 280 с.
12. *Бекшин Н. Л.* Об использовании пирена в качестве люминесцентного индикатора вязкости модельных и биологических мембран // Науч. докл. высш. шк. С. Биол. науки.— 1987.— № 11.— С. 59—62.
13. *Левицкий Е. Л., Губский Ю. И., Чабанный В. Н. и др.* Биохимические характеристики фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина // Биополимеры и клетка.— 1993.— 9, № 6.— С. 13—21.

Укр. НИИ фармакологии и токсикологии АМН Украины, Киев      Получено 27.07.93