



АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА С ДНК МЕТОДОМ ФИКСАЦИИ КОМПЛЕКСОВ НА НИТРОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ ФИЛЬТРАХ

Уманский С. Р., Ковалев Ю. И.

Институт биологической физики Академии наук СССР, Пущино

Для изучения взаимодействия негистоновых белков хроматина (НГБ) тимуса и печени крыс с ДНК использован метод фиксации комплексов на нитроцеллюлозных фильтрах. Все исследованные препараты НГБ образуют комплексы с ДНК. Показано, что метод может быть использован для анализа свойств комплексов НГБ — ДНК и для сравнения взаимодействия НГБ с различными ДНК. Ионная сила (0,05 М NaCl и выше) и 5 М мочевины ослабляют взаимодействие НГБ с ДНК. При 0,37 и 45° образуется одинаковое количество комплекса НГБ — ДНК; при 45° комплекс быстро распадается. Основная масса НГБ, взаимодействующих с нативной ДНК, связывается с ДНК неспецифически. Часть НГБ специфически взаимодействует с гомологичной денатурированной ДНК.

В последние годы резко усилился интерес к негистоновым белкам хроматина (НГБ). Было показано, что эти белки, возможно, участвующие в регуляции процесса транскрипции [1—4], способны связываться с ДНК [5—10]. При этом некоторые авторы обнаружили специфическое взаимодействие НГБ с ДНК [5—7].

В последние годы для изучения белок — нуклеиновых взаимодействий широко используется метод, основанный на том, что свободная ДНК не задерживается, а белки и их комплексы с ДНК связываются с нитроцеллюлозными фильтрами [11—14]. До настоящего времени этот метод использовался для анализа комплексов ДНК с некоторыми индивидуальными белками, например с РНК-полимеразой [12], Iac-репрессором [11]. В данной работе предпринята попытка использовать метод фиксации комплексов белок — ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах для изучения взаимодействия НГБ с ДНК.

На рис. 1 представлены результаты опытов по комплексованию различных препаратов НГБ (НГБ1, НГБ2) с гомологичной ДНК. При отношении НГБ1/ДНК, равном 10, НГБ1 печени и тимуса задерживают на фильтрах 40 и 15% ДНК соответственно. Для НГБ2 печени и тимуса эта величина составляет соответственно 28 и 13%. Таким образом, все исследованные препараты НГБ способны задерживать ДНК на фильтрах и, следовательно, взаимодействовать с ДНК. Причем оказалось, что НГБ печени задерживают на фильтрах больше ДНК, чем НГБ тимуса. Объяснить это тем, что НГБ печени взаимодействуют с большим количеством ДНК, чем НГБ тимуса, по-видимому, нельзя, так как связывание комплекса с фильтрами зависит не только от количества НГБ, прореагировавших с ДНК, но и от характера взаимодействия, а также от спо-

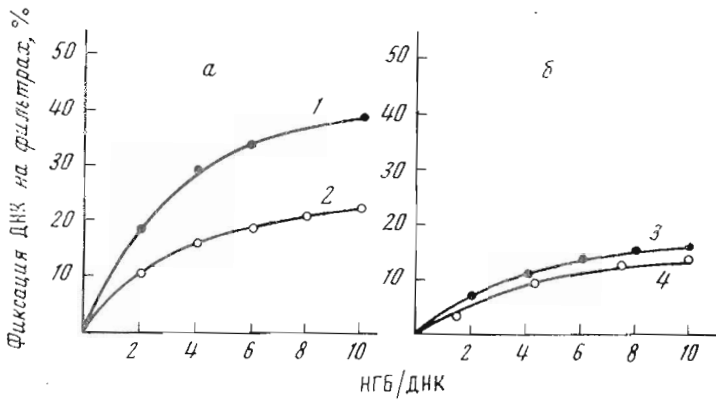


Рис. 1

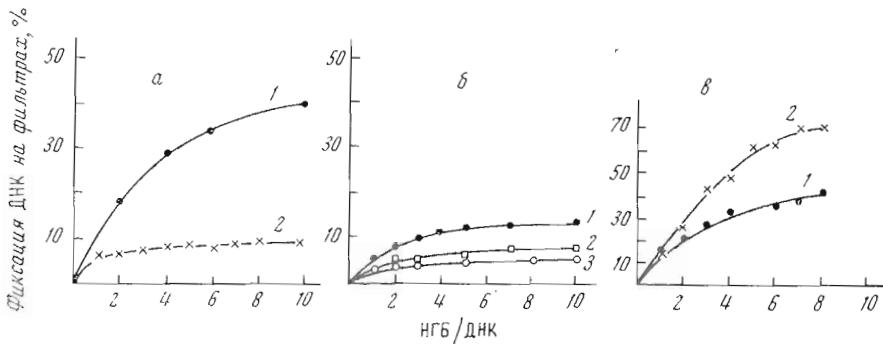


Рис. 2

Рис. 1. Взаимодействие НГБ печени (а) и тимуса (б) крыс с гомологичной ^{14}C -ДНК: 1, 3 — НГБ1, 2, 4 — НГБ2

Рис. 2. Влияние «старения» белков и полимерности ДНК на фиксацию ДНК на фильтрах: а — взаимодействие «свежих» (1) и хранящихся 2 дня при 2° (2) НГБ1 печени с гомологичной ДНК; б — взаимодействие НГБ1 (1) и НГБ2 (2) печени и НГБ 2 тимуса (3) с обработанной ультразвуком гомологичной ДНК; в — взаимодействие НГБ1 печени с ^{14}C -ДНК крысы (1) и ДНК фага Т4 (2)

способности различных НГБ задерживаться фильтрами. Так, после двухдневного хранения в 0,01 М трис-НСI буфере (рН 7,5) при 2° способность НГБ1 удерживать ДНК на фильтрах резко снижается (рис. 2, а). При этом их взаимодействие с ДНК количественно почти не изменяется (данные хроматографии НГБ на колонке с полиакриламидагарозой, содержащей ДНК), но падает способность НГБ задерживаться фильтрами (для выяснения этого вопроса радиоактивно меченные НГБ пропускали через нитроцеллюлозные фильтры без ДНК).

Количество ДНК, задерживающейся на фильтрах, зависит от ее молекулярного веса. Так, при добавлении НГБ1 и НГБ2 печени к ДНК, обработанной ультразвуком, фильтры удерживаются только ~ 15 и $\sim 12\%$ ДНК соответственно (рис. 2, б). Более того, ДНК фага Т4 с молекулярным весом, в несколько раз большим, чем выделенная ДНК крысы, задерживается фильтрами в присутствии НГБ1 печени более эффективно, чем гомологичная ДНК (рис. 2, в). Причины этого эффекта не совсем ясны, однако очевидно, что сравнивать взаимодействие НГБ с различными ДНК по степени их задержки на фильтрах нельзя. Количество ДНК, связанной с фильтрами, уменьшается с увеличением объема жидкости, используемой для отмывки фильтров. Так, при отмывке фильтров 5 мл (вместо 1 мл) 0,02 М трис-НСI буфер (рН 7,2) — 3 мМ MgCl_2 количество ДНК на фильтрах уменьшается вдвое. Подобный эффект наблюдался также и при исследовании комплексов ДНК с Iac -репрессором [15].

Важно, однако, что в стандартных условиях различные препараты НГБ, выделенные одним методом, дают хорошо воспроизводимые результаты. При хранении в замороженном состоянии (-20°) способность НГБ удерживать ДНК на фильтрах не меняется по крайней мере в течение месяца.

На рис. 3 представлены данные о влиянии ионной силы и мочевины на способность НГБ2 задерживать ДНК на фильтрах. В 0,05 и 0,1 М NaCl на фильтрах задерживается существенно меньше ДНК, чем в стандартных условиях, а в 0,3 и 0,6 М NaCl с фильтрами связывается не более 1% ДНК. 5 М мочевины также уменьшает связывание ДНК с фильтрами. Уменьшение задержки ДНК на фильтрах может быть связано как с нарушением взаимодействия НГБ с ДНК, так и с ухудшением связывания комплекса НГБ — ДНК с фильтрами.

Для характеристики взаимодействия НГБ с ДНК, помимо количества ДНК, связываемой с фильтром в условиях насыщения, можно использовать другой показатель — отношение НГБ/ДНК, при котором на фильтрах задерживается половинное количество ДНК — полунасы-

Задержка ДНК на фильтрах (в %) в зависимости от температуры и времени инкубации
Отношение НГБ2 печени/ДНК равно 4

Температура, $^{\circ}$ C	Время инкубации, мин.			
	1	5	10	20
0	27,5	24,7	26,0	26,7
37	26,7	—	25,5	27,7
45	28,2	21,5	18,6	17,2

щающее отношение НГБ/ДНК [15]. Увеличение этой величины свидетельствует об ослаблении взаимодействия НГБ — ДНК. Именно такой эффект наблюдается при комплексовании НГБ с ДНК в 5 М мочевины или в 0,05 М NaCl. Если полунасыщающее отношение НГБ/ДНК не изменяется или уменьшается, то при исследовании взаимодействия индивидуального белка с ДНК это будет свидетельствовать о той же или возросшей силе взаимодействия соответственно. При исследовании комплексования с ДНК смеси белков ситуация осложняется тем, что константы связывания отдельных белков с ДНК могут сильно различаться. При повышении ионной силы слабо взаимодействующие в стандартных условиях белки могут вообще не связываться с ДНК и в силу этого полунасыщающее отношение НГБ/ДНК не изменится или даже уменьшится. По-видимому, именно такой эффект обнаруживается при повышении ионной силы от 0,05 до 0,1 М NaCl и выше. Таким образом, используя два критерия: количество ДНК, задерживаемой на фильтрах в условиях насыщения, и полунасыщающее отношение НГБ/ДНК — можно анализировать влияние различных факторов на взаимодействие НГБ с ДНК. Так, например, было показано, что за 1 мин при 0, 37 и 45° образуется примерно одинаковое количество комплекса НГБ — ДНК; при 0 и 37° его количество не изменяется за 20 мин инкубации, а при 45° уменьшается примерно на 40%.

Оказалось возможным также использовать метод фиксации комплексов ДНК — НГБ на нитроцеллюлозных фильтрах для изучения взаимодействия НГБ с различными ДНК. Для этого сравнивали способность немеченой гомологичной и гетерологичной ДНК конкурировать с гомологичной 14 C-ДНК за связывание НГБ. В качестве конкурентов использовали ДНК тимуса крысы (гомологичная) и ДНК *E. coli* (гетерологичная). Данные одной серии опытов (с НГБ2 тимуса) представлены на рис.

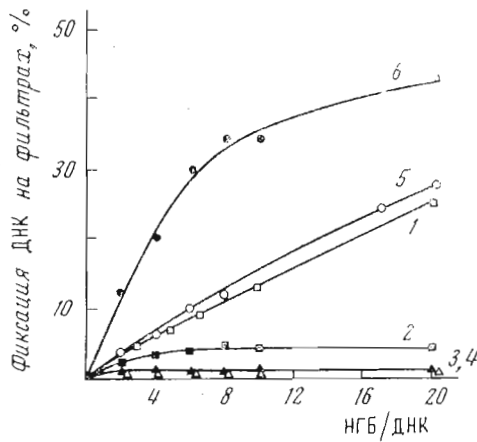


Рис. 3. Влияние ионной силы и мочевины на взаимодействие НГБ2 печени с гомологичной ДНК: 1 — 0,05 М, 2 — 0,1 М, 3 — 0,3 М и 4 — 0,6 М NaCl, 5 — 5 М мочевины, 6 — 0,01 М трис-НСl буфер

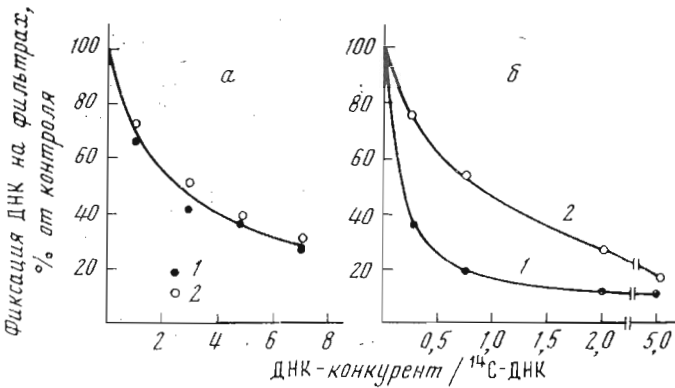


Рис. 4. Конкуренция гомологичной и гетерологичной ДНК с гомологичной нативной ¹⁴С-ДНК за связывание НГБ2 тимуса. ДНК-конкуренты: а — нативная, б — денатурированная; 1 — гомологичная, 2 — гетерологичная

4. Аналогичные результаты были получены и для других препаратов НГБ. Из рис. 4 видно, что гомологичная и гетерологичная нативные ДНК примерно одинаково конкурируют с гомологичной ¹⁴С-ДНК. Таким образом, основная масса НГБ, взаимодействующих с нативной ДНК, связывается с ней неспецифически. Этот вывод хорошо согласуется с данными, полученными другими методами [5, 8, 10]. Так, в опытах Кляйншмита и соавт. [5] лишь 0,1% всех НГБ специфически взаимодействовали с гомологичной ДНК.

Иная картина наблюдается для денатурированных ДНК: гомологичная денатурированная ДНК конкурирует с нативной ¹⁴С-ДНК значительно лучше, чем гетерологичная. (Проводить опыты по конкуренции, используя меченую денатурированную ДНК, сложно, так как она и в отсутствие НГБ эффективно связывается с фильтрами.) Различия между гомологичной и гетерологичной ДНК выражены сильнее при низких концентрациях ДНК-конкурентов. Следовательно, по крайней мере какая-то часть НГБ специфически взаимодействует с гомологичной денатурированной ДНК.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что метод фиксации комплекса ДНК — белок на нитроцеллюлозных фильтрах может оказаться весьма полезным при изучении взаимодействия НГБ

с ДНК. Наиболее существенным ограничением метода является невозможность сравнивать взаимодействие с ДНК различных препаратов НГБ. Вместе с тем метод может быть использован для характеристики свойств комплексов НГБ с ДНК, а также для сравнения взаимодействия НГБ с различными ДНК. Кроме того, метод дает принципиальную возможность выделить ДНК, специфически взаимодействующую с НГБ.

Экспериментальная часть

Выделение ДНК. ДНК из тимуса крыс выделяли, как описано ранее [16]. Для получения меченой ДНК крысам с асцитной гепатомой Заждедя вводили внутривенно 4 раза с интервалами в 6 ч по 50 мккюри ^{14}C -тимидина; через 6 ч после последней инъекции крыс забивали и из асцитных клеток выделяли ДНК. Удельная радиоактивность ДНК составляла $1,7 \cdot 10^6$ имп/мин/мг. Немеченую ДНК из *E. coli* выделяли по методу Мармура [17]. Низкомолекулярную ДНК получали обработкой растворов ДНК с помощью ультразвукового низкочастотного диспергатора УЗДН-1 при 15 кГц 20 раз по 15с с интервалами 45с в водяной бане. Для получения денатурированной ДНК раствор ДНК (200 мкг/мл) в 0,01 М трис-НСl буфере (рН 7,5) 15 мин прогревали на кипящей водяной бане и быстро охлаждали на льду.

Выделение хроматина. Ядра из печени и тимуса крыс, выделенные по методу Шово и др. [18], последовательно отмывали 0,14 М NaCl — 0,01 М трис-НСl буфером (рН 7,5), затем 0,075 М NaCl — 0,024 М EDTA — 0,01 М трис-НСl буфером (рН 7,5) и 3 раза 0,01 М трис-НСl буфером (рН 7,5). После отмывки получали осадок очищенного хроматина.

Выделение НГБ хроматина. НГБ1 хроматина выделяли из печени или тимуса, как описано ранее [19], с некоторыми модификациями. Очищенный хроматин диссоциировали в 2,5 М NaCl — 0,01 М трис-НСl буфере (рН 8,2) и ДНК осаждали ультрацентрифугированием (24 ч при 180 000 g). Надосадочную жидкость, содержащую белки хроматина, диализовали против 0,5 М NaCl — 0,01 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,2) и пропускали через колонку (2 × 18 см) с амберлитом CG-50 тип 1, уравновешенную тем же буфером. Гистоны задерживались колонкой, а НГБ элюировали 0,5 М NaCl — 0,01 М натрий-фосфатным буфером (рН 7,2). Полученные белки (НГБ1) диализовали против 0,01 М трис-НСl буфера (рН 7,5) и хранили при -20° .

НГБ2 выделяли по методу Уанга [20]. Очищенный хроматин диссоциировали в 1 М NaCl — 0,01 М трис-НСl буфере (рН 8,0) и диализовали против 6 объемов 0,01 М трис-НСl буфера. Осадок отделяли центрифугированием, а белки надосадочной жидкости диализовали против 0,5 М NaCl — 0,01 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,2), затем очищали, используя колонку с амберлитом CG-50 тип 1 и хранили при -20° .

Взаимодействие НГБ с ДНК. Проба объемом 0,5 мл содержала 4 мкг ^{14}C -ДНК, 0,02 М трис-НСl буфера (рН 7,2), 3 мМ MgCl₂, 25 мкг бычьего сывороточного альбумина и различные количества НГБ. Смесь 10 мин инкубировали при 37°, а затем пропускали через нитроцеллюлозный фильтр «Супрог 6» (NUPFS, Чехословакия) диаметром 1 см со скоростью 0,5 мл за 12 с. После протекания образца фильтр с той же скоростью промывали 1 мл 0,02 М трис-НСl буфера (рН 7,2) — 3 мМ MgCl₂ и высушивали; радиоактивность фильтра просчитывали в жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-30. При расчете величины радиоактивности учитывали фон, т. е. радиоактивность фильтров, через которые пропускали ДНК без НГБ. Величина фона не превышала 2%. В опытах по конкуренции немеченых ДНК с ^{14}C -ДНК за связывание с НГБ в пробу до НГБ добавляли немеченую ДНК-конкуренцию.

Все основные эксперименты повторяли по 5—6 раз. На рисунках и в таблице приведены данные типичных опытов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gilmour R. S., Paul J. (1969) *J. Mol. Biol.*, **40**, 137—139.
2. Spelsberg T. C., Hnilica L. S. (1970) *Biochem. J.*, **120**, 435—437.
3. Kostraba N. C., Wang T. Y. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **262**, 169—180.
4. Shelton K. S., Allfrey V. G. (1970) *Nature*, **228**, 132—134.
5. Kleinsmith L. J., Heidema J., Carrol A. (1970) *Nature*, **226**, 1025—1026.
6. Teng C. S., Teng C. T., Allfrey V. G., (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 3597—3609.
7. Wakabayashi K., Wang S., Hood G., Hnilica L. S. (1973) *FEBS Lett.*, **32**, 46—48.
8. Patel G. L., Thomas T. L. (1973) *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, **70**, 2524—2528.
9. Chaudhuri S., Stein G., Baserga R. (1972) *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **139**, 1363—1366.
10. Van den Brock H. W. J., Nooden L. D., Sevall J. S., Bonner J. (1973) *Biochemistry*, **12**, 229—236.
11. Riggs A. D., Bourgeois S., Newby R. F., Cohn M. (1968) *J. Mol. Biol.*, **34**, 365—368.
12. Johns O. W., Berg P. (1966) *J. Mol. Biol.*, **22**, 199—209.
13. Микоян В. С., Замчук Л. А. (1973) *Молекулярн. биология*, **7**, 714—719.
14. Yarus M., Berg P. (1967) *J. Mol. Biol.*, **28**, 479—490.
15. Riggs A. D., Suzuki H., Bourgeois S. (1970) *J. Mol. Biol.*, **48**, 67—79.
16. Уманский С. Р., Король Б. А., Токарская В. И. (1972) *Докл. АН СССР*, **205**, 481—484.
17. Marmur J. (1961) *J. Mol. Biol.*, **3**, 208—218.
18. Chauveau J., Moule J., Rouiller Ch. (1956) *Exptl. Cell Res.*, **11**, 317—321.
19. Уманский С. Р., Токарская В. И., Зотова Р. Н., Мпругина В. Л. (1971) *Молекулярн. биология*, **5**, 270—279.
20. Wang T. Y. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 1220—1226.

Поступила в редакцию*
2.VIII.1974

STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN CHROMATIN NONHISTONE PROTEINS AND DNA BY THE METHOD OF COMPLEXES FIXATION ON MEMBRANE FILTERS

UMANSKY S. R., KOVALEV Yu. I.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences
of the USSR, Pushchino*

The method of complexes fixation on membrane filters has been used to study the DNA interaction with chromatin nonhistone proteins (NHP) of rat liver and thymus. All the NHP preparations studied form complexes with DNA. It is shown that the method can be used for the analysis of properties of the NHP-DNA complexes and for comparison of the NHP interaction with different DNA. Ionic strength (0.05M NaCl or higher) and 5M urea were found to reduce NHP—DNA interaction. At 0°, 37° and 45° the NHP-DNA complexes are formed in equal amounts, but at 45° a complex is rapidly destroyed. The essential part of NHP binds to the native DNA nonspecifically; at least part of NHP interacts specifically with homologous DNA

* Статья из портфеля редакции журнала «Биохимия»; дата поступления— 11. IV. 1974.