



УДК 547.962.2

ИССЛЕДОВАНИЕ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ АМИНОКИСЛОТНЫХ
ОСТАТКОВ В СУБФРАКЦИЯХ ГИСТОНА FI ТИМУСА ТЕЛЕНКА*Арутюнян А. А., Шляпников С. В., Северин Е. С.**Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР, Москва*

Исследована вариабельность аминокислотных остатков в субфракциях гистона FI тимуса теленка при анализе структур пептидов, выделенных методом пептидных карт из протоолитических гидролизатов N- и C-концевых фрагментов субфракций гистона. Исследование последовательности аминокислотных остатков в полипептидных цепях индивидуальных белков показало наличие определенного консерватизма в C-концевой части молекулы FI гистона. Вместе с тем наблюдается закономерность в заменах аминокислотных остатков в полипептидной цепи N-концевых фрагментов субфракций гистона FI. Наличие этих закономерностей в структурах различных субфракций гистонов, выделенных из разных источников, предполагает их функциональную значимость.

В настоящее время выяснена полная первичная структура всех гистонов, за исключением богатого лизином гистона FI [1]. Для него не расшифрована лишь последовательность аминокислот в C-концевой половине молекулы белка. Исследование структуры N-концевой части гистона FI показало наличие значительной гетерогенности не только в аминокислотной последовательности субфракций гистона, выделенного из различных тканей, но также и в разных субфракциях этого белка, полученного из одного источника. Вместе с тем анализ структур субфракций гистона FI свидетельствует, по-видимому, об относительном консерватизме в последовательности аминокислот в отдельных участках белка. Эти закономерности прослежены в настоящей работе при изучении вариабельности аминокислотных остатков в субфракциях гистона FI тимуса теленка, полученных по известным методикам (см. «Экспериментальную часть»).

Близкая аналогия первичных структур субфракции I гистона FI тимуса теленка (СТ-I) и субфракций III и IV гистона FI тимуса кролика [1] (RT-III и RT-IV) позволяет в принципе исследовать вариабельность аминокислотных остатков в субфракциях I, II и III гистона FI тимуса теленка (СТ-I — СТ-III) путем анализа структуры соответствующих индивидуальных пептидов, выделенных после ферментативного расщепления этих белковых молекул.

В последнее время с появлением новых высокочувствительных реагентов для детектирования аминокислот и пептидов открываются качественно новые возможности для исследования структуры пептидов. В настоящей работе использован оригинальный методический прием выделения гомогенных пептидов из малого количества материала. Сущность разработанного подхода состоит в разделении пептидного гидролизата анализируемой

субфракции гистона методом пептидных карт и в получении с фингерпринта точного зеркального отпечатка, проявление которого с помощью флуорескамина обеспечивает возможность локализации пептидов на исходной пептидной карте. Пептидный материал, выделенный элюцией с бумаги, исследован нами с помощью высокочувствительного метода количественного анализа аминокислот в форме их Dns-производных [2] при ТСХ на полиамидном сорбенте.

Предложенный методический прием выделения пептидов с пятна бумажного фингерпринта в отличие от метода слабого предварительного окрашивания для локализации пятен [3] позволяет получить чистые, не загрязненные при проявлении пептиды, которые могут быть подвергнуты дальнейшему структурному анализу, в частности, с помощью метода Эдмана. Кроме того, использование в качестве реагента для проявления раствора флуорескамина высокой концентрации, в отличие от обычного используемого 0,02%-ного раствора нингидрина или 0,0005%-ного раствора флуорескамина [4], практически сводит на нет риск потери пептида вследствие недоокрашивания, тем более что, согласно нашим наблюдениям, кислые пептиды несколько слабее окрашиваются флуорескаминам.

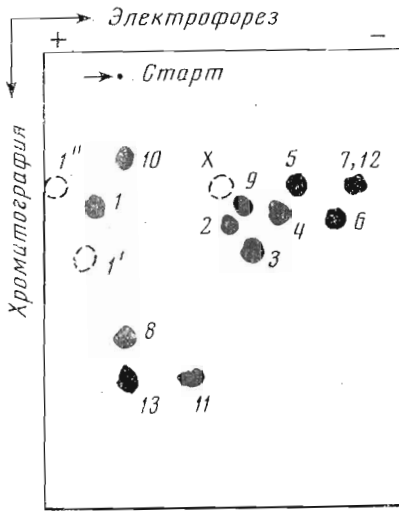
Характер разделения пептидов триптического гидролизата N- и C-концевых фрагментов субфракций гистона FI представлен на рисунке.

Сравнение фингерпринтов пептидных гидролизатов N-концевых фрагментов субфракций гистона FI тимуса теленка показывает наличие качественно аналогичных картин разделения. Основные различия триптических фингерпринтов N-концевых участков субфракций СТ-I, СТ-II и СТ-III обнаруживаются лишь в некоторых пептидах. Так, для всех трех субфракций отличается местоположение единственного отрицательно заряженного пептида (пептид 1). На пептидной карте триптического гидролизата третьей субфракции имеется также пептид (обозначенный X), который отсутствует на остальных фингерпринтах. Пятна остальных пептидов имеют идентичное местоположение (см. рисунок, а).

В табл. 1 приведены результаты аминокислотного анализа пептидов, выделенных из каждого пятна соответствующих фингерпринтов.

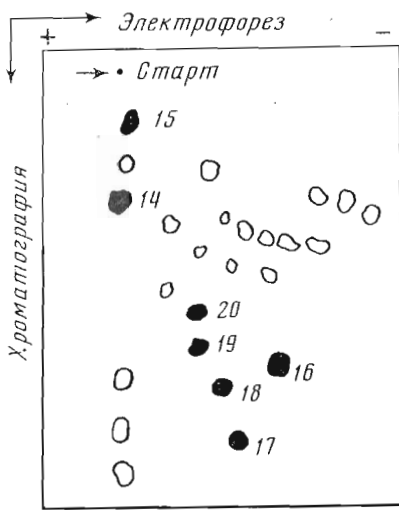
Сравнение аминокислотных составов полученных пептидов с известными структурами субфракции I гистона FI тимуса теленка и субфракции III и IV гистона FI тимуса кролика [1] (см. схему) показывает, что на пептидных картах гидролизатов исследуемых субфракций имеются практически все ожидаемые в соответствии со структурой пептиды в индивидуальном состоянии. Однако в некоторых, одинаковых по расположению пептидах субфракций СТ-II и СТ-III в аминокислотной последовательности наблюдаются замены аминокислотных остатков по сравнению с субфракцией СТ-I. Например, в кислом пептиде 1 N-концевой части обеих субфракций определен один остаток валина. Кроме того, в этом же пептиде субфракции СТ-III дополнительно имеются остатки глутаминовой кислоты и треонина, но отсутствует один остаток аланина и, по-видимому, пролина. В пептиде 3 триптического гидролизата субфракции СТ-III остаток треонина, по-видимому, заменен на аланин, так как именно этот остаток обнаружен в качестве N-концевой аминокислоты этого пептида *. В состав пептида этой субфракции входит также остаток серина. В пептиде 5 триптического гидролизата третьей субфракции отсутствует аргинин, однако, поскольку этот остаток в структуре соответствующих пептидов субфракции СТ-I и СТ-II является, очевидно, C-концевым, то, согласно требованию специфичности триптического гидролиза, можно полагать, что место его в субфракции СТ-III занимает один из найденных остатков лизина. Аналогичный пептид из гидролизата субфракции СТ-II содержит, как видно из сравнения с другими субфракциями, два избыточных остатка лизина и аланина. Этот

* Во всех остальных пептидах N-концевые аминокислоты соответствуют таковым для аналогичных пептидов субфракции СТ-I.

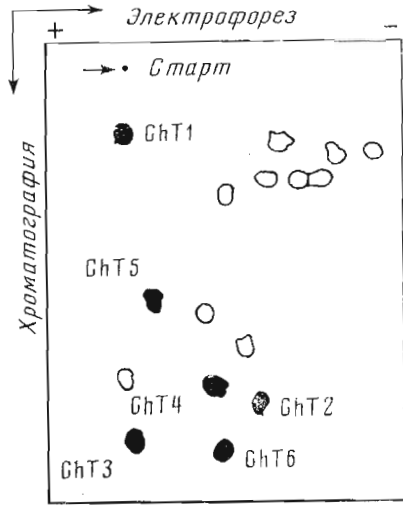


а

Пептидные карты триптического и химотриптического гидролизатов фрагментов субфракции СТ-I—СТ-III: а — триптический гидролизат N-концевого фрагмента молекулы. Штриховой линией показано относительное положение на фингерпринте пептидов 1' и 1'' из аналогичных гидролизатов субфракций СТ-II и СТ-III, а также пептида X из субфракции СТ-III; б — триптический гидролизат С-концевого фрагмента молекулы, черные пятна — местоположения пептидов, анализ которых приведен ниже; в — химотриптический гидролизат С-концевого фрагмента молекулы. Черные пятна — местоположения пептидов, анализ которых приведен ниже



б



в

результат может быть объяснен, если считать, что протеолиз этой субфракции прошел таким образом, что обычно гидролизуемая связь Lys — Lys, приводящая к появлению пептидов 4 и 5, например в субфракции СТ-I и СТ-III, в данном случае частично не расщепляется. Остальные пептиды триптического гидролизата N-концевых фрагментов субфракций гистона FI имеют одинаковый аминокислотный состав и, следовательно, не отличаются для разных субфракций. Исключение составляет пептид X третьей субфракции N-концевой части гистона FI, найти положение которого в первичной структуре на основании настоящих данных оказалось невозможным.

На пептидных картах триптических гидролизатов С-концевых частей субфракций гистона FI тимуса телянка также имеются лишь слабо выраженные различия.

В табл. 2 приведен аминокислотный состав некоторых пептидов из триптического гидролизата субфракции СТ-I, положение которых на фингерпринте приведено на рисунке, б.

Ни для одной из субфракций гистона FI тимуса телянка первичная структура С-концевого фрагмента не определена. Для гистона FI из тимуса кролика известна лишь часть последовательности в субфракции RT-III [1].

Аминокислотная последовательность субфракций гистона F1

RT-III	Ac-Ser-Glu-Ala-Pro-Ala-Glu-Thr-Ala-Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Gly-Lys-Ser-Pro-Ala-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys- ²⁰
RT-IV	Ac-Ser-Glu-Ala-Pro-Ala-Glu-Thr-Ala-Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Lys-Ser-Pro-Ala-Lys-Thr-Pro-Val-Lys-
CT-I	Ac-Ser-Glu-Ala-Pro-Ala-Glu-Thr-Ala-Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Pro-Lys-Ser-Pro-Ala-Lys-Thr-Pro-Val-Lys-
CT-II	←-----1-----2-----3-----
CT-III	←-----(+Val)-----
	←-----(+Val, +Glu, +Thr, +Pro, +Ala)-----(+Ser, +Ala, --Thr)
	←-----30-----40-----
	-Ala-Ala-Lys-Lys-Pro-Gly-Ala-Gly-Ala-Ala-Lys-Arg-Lys-Ala-Ala-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Glu-Leu-Ile-Thr-Lys-
	-Ala-Arg-Lys-Lys-Lys-Ser-Ala-Gly-Ala-Ala-Lys-Arg-Lys-Ala-Ser-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Glu-Leu-Ile-Thr-Lys-
	-Ala-Ala-Lys-Lys-Lys-Lys-Pro-Ala-Gly-Ala-Arg-Lys-Ala-Ser-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Glu-Ile-Thr-Lys-
	←-----4-----5-----6-----7-----8-----
	←-----(+Lys ₂ , +Ala ₂)-----
	←-----(-Arg)-----
	←-----50-----60-----70-----
	-Ala-Val-Ala-Ala-Ser-Lys-Glu-Arg-Asn-Gly-Leu-Ser-Leu-Ala-Ala-Lys-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Gly-Gly-Tyr-
	-Ala-Val-Ala-Ala-Ser-Lys-Glu-Arg-Ser-Gly-Val-Ser-Leu-Ala-Ala-Lys-Lys-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Gly-Tyr-
	-Ala-Val-Ala-Ala-Ser-Lys-Glu-Arg-Ser-Gly-Val-Ser-Leu-Ala-Ala-Lys-Lys-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Gly-Tyr-
	←-----9-----10-----11-----12-----13-----
	←-----
	←-----
	←-----
RT-III	Asp-Val-Glu-Lys-Asn-Asn-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Gly-Leu-Lys-Ser-Leu-Val-Ser-Lys-Gly-Thr-Leu-Val-Gly-Thr-
CT-I	←-----14-----15-----16-----17-----18-----19-----
CT-I	←-----ChT1-----←-ChT2-←-ChT3-←-ChT4-----
	←-----80-----90-----100-----
	-Lys-Gly-Thr-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser-Phe-Lys-(Lys ₂ , Asp, Thr ₃ , Ser ₃ , Glu, Pro ₁₆ , Gly ₄₊₅ , Ala ₃ , Val ₃ , Leu)
	←-----20-----
	←-----ChT5-----

Примечание. Средками обозначены пептиды соответствующих фракций, анализируемых в настоящей работе. Приведено наличие дополнительных остатков аминокислот (со знаком +) или отсутствие каких-либо остатков аминокислот (со знаком --) в пептидах относительно фракции CT-I.

Таблица 2

Аминокислотный состав пептидов триптического гидролизата С-концевого фрагмента субфракции СТ-I

Аминокислоты	Пептиды						
	14	15	16	17	18	19	20
Gly				1,2		1,3	3,3
Ser		1,0 *			2,0		1,6
Thr						2,2	0,9
Val	1,0 *				0,9	1,0	
Asp	0,9	1,8					
Glu	1,0					0,8	
Ala							1,0
Ile			1,0 *				
Leu				1,8	1,0	1,1	
Phe							1,0 *
Lys	0,9		0,9	1,0 *	1,0 *	1,3	1,2
Arg		0,7	0,2				

Примечание: См. табл. 1.

Таблица 3

Аминокислотный состав пептидов химотриптического гидролизата С-концевого фрагмента субфракции СТ-I

Аминокислоты	Пептиды					
	ChT1	ChT2	ChT3	ChT4	ChT5	ChT6
Gly			1,2	1,2	3,4	1,2
Ser				1,0	2,0	
Thr				1,0	2,0	
Val	0,9			1,0	0,8	
Asp	3,0					
Glu	1,1				1,1	
Ala					0,8	
Ile						
Leu		1,0 *	1,0 *	0,9		1,8
Phe					1,2	
Lys	1,0 *	1,0		1,0 *	1,0 *	1,0 *
Arg						

Примечание: См. табл. 1.

Анализ пептидов триптического гидролизата С-концевого фрагмента субфракции СТ-I показал, что на пептидной карте обнаружены все принципиально возможные пептиды, ожидаемые согласно известной структуре аналогичного сегмента субфракции RT-III (см. схему).

Нетрудно видеть, что состав аминокислот некоторых пептидов гистона FI тимуса теленка, а также изученная в ряде случаев их N-концевая последовательность полностью согласуются со структурой, известной для субфракции III этого же гистона, выделенного из тимуса кролика. Это соответствие подтверждается также при сопоставлении результатов анализа отдельных пептидов химотриптического гидролизата С-концевого уча-

стка субфракции СТ-I (табл. 3, рисунок, в) с данными, приведенными выше *. Полная идентичность состава пептидов протеолитических гидролизатов С-концевой части субфракции СТ-I структуре гистона из тимуса кролика позволяет утверждать, что по крайней мере для ограниченной С-концевой части молекулы замены аминокислот в гистоне FI отсутствуют. Возможным исключением является остаток амида аспарагиновой кислоты в положении 78 и (или) 79, который, по-видимому, заменен в субфракции СТ-I на остаток соответствующей кислоты, о чем свидетельствует как электрофоретическая подвижность соответствующего триптического пептида 15, так и гидролизуемость химотрипсином связи 79—80.

Таким образом, анализ варибельности аминокислотных остатков в разных субфракциях гистона FI тимуса теленка, а также аналогичных данных о структуре субфракций гистона FI тимуса кролика показывает наличие определенного консерватизма в первичной структуре белковых молекул. Согласно приведенным результатам, наибольшие различия в первичной структуре субфракций характерны для N-концевой части гистона FI, причем только в определенных участках структуры, а именно от 13- до 38-го остатка, локализована большая часть гетерогенных замен аминокислот. Структура первых 12 членов полипептидной цепи, а также С-концевая область белка очень близки, если не идентичны **. В области от 38 до 73 (тирозинового) остатка аминокислот полипептидной цепи гистона FI наблюдается только одна замена. Остаток серина-57, обнаруженный во всех субфракциях гистона FI тимуса теленка, заменен на аспарагин в субфракции RT-III тимуса кролика. Варибельность в положениях 59 и 71 следует признать гомологичной.

В настоящее время остается неясной функциональная значимость гетерогенности структур субфракций гистона FI. Очевидно, однако, что наличие определенных закономерностей в первичной последовательности гистона FI может быть тесно связано с тонким механизмом, определяющим взаимоотношения между структурой и функцией хроматина. Согласно имеющимся представлениям, гистону FI отводится ключевая роль в структурной организации хроматиновых фибрилл [5].

Сравнительный анализ последовательности аминокислотных остатков субфракций гистона FI показывает, что молекула гистона в первом приближении содержит два основных катионных участка — области в первичной структуре белка от 15- до 36-го и от 107- до С-концевого остатков аминокислот, один анионный — N-концевой участок и центральную часть молекулы (остатки аминокислот от 37- до 107-го) с более равномерным распределением кислых и основных аминокислот.

Положительно заряженный С-концевой фрагмент гистона FI является, по-видимому, центром первичного контакта молекулы с полианионной ДНК-матрицей. Взаимодействие второго катионного участка гистона FI (область от 15- до 36-го остатка) с ДНК является скорее всего специфическим, поскольку именно в этой области молекулы гистона наблюдается максимальная варибельность остатков аминокислот как для отдельных субфракций гистона FI, так и для гистонов FI, полученных из различных источников.

Вместе с тем два остальных условно выделяемых фрагмента молекулы гистона FI, т. е. его N-концевой и центральный участок, показывают ярко выраженный консерватизм в последовательности аминокислотных остатков. В настоящее время мало что известно о функциональной значимости

* Пептид ChT-6 химотриптического гидролизата С-концевого фрагмента субфракции СТ-I по своему составу соответствует структуре Lys-Leu-Gly-Leu в первичной последовательности 83—86 и появляется, по-видимому, в результате ограниченного расщепления связи 84—85.

** Согласно данным работы [1], в пептидах 8 и 13 субфракций RT-III и RT-IV FI гистона тимуса кролика наблюдается соответственно по одной замене остатков аминокислот в положениях 38 и 71 полипептидной цепи. Однако для субфракций гистона FI из тимуса теленка указанных различий в этих пептидах нами не обнаружено.

анионной области гистона F1. Недавно было выдвинуто предположение о функциональной роли центрального фрагмента молекулы F1 гистона в процессе компактизации хроматина, в частности за счет специфического белок — белкового взаимодействия одной или нескольких молекул гистона F1, в составе нуклеопротеидного комплекса [5, 6]. В связи с этим можно полагать, что консерватизм аминокислотной последовательности центрального сегмента гистона F1 может быть обусловлен жестким требованием к первичной структуре взаимодействующих участков белковых глобул. Указанные взаимодействия, по-видимому, играют существенную роль в изменении структуры хроматина в процессе клеточного цикла, именно при переходе от диффузного к компактному состоянию [7]. Вместе с тем, согласно одной из существующих точек зрения, регуляция структурного состояния хроматина осуществляется при фосфорилировании определенных остатков серина молекулы гистона F1 [7, 8]. Эти два процесса, очевидно, могут быть тесно связаны, о чем свидетельствует тот факт, что центрами энзиматического фосфорилирования гистона F1 являются остатки серина-38 и 106, т. е. остатки, расположенные на терминальных границах центрального сегмента молекулы F1 гистона [9, 10]. Можно полагать, что фосфорилирование по этим участкам инициирует процесс компактизации хроматиновых фибрилл, который осуществляется в результате специфического узнавания комплементарных центральных сегментов, отличающихся выраженным консерватизмом их первичной структуры.

Экспериментальная часть

В работе использовали: Dns-Cl, дважды перекристаллизованный из бензола, фирмы «Merck» (ФРГ), полиамидные пластины для ТСХ фирмы «ВДН» (Англия) и протеолитические ферменты фирмы «Worthington» (США). Флуорескамин получен из «F. Hoffman La Roche Inc.» (Швейцария).

Гистон F1, выделенный по методу Джонса [11], фракционировали согласно методике, описанной в работах [12, 13], и индивидуальные препараты субфракций разделяли на N- и C-концевые фрагменты после обработки N-бромсукцинимидом по методу Бустина и Кола [14].

Фрагменты молекулы гистона F1 гидролизovali трипсином или химотрипсином в 1% NH_4HCO_3 при соотношении фермент — субстрат, равном 1 : 80, в течение 12 ч и пептидный материал разделяли методом пептидных карт на ватман 3ММ, проводя электрофорез при рН 5,0 в пиридин-ацетатном буфере (пиридин — уксусная кислота — вода, 1 : 1 : 10) при градиенте напряжения 60 В/см в течение 40 мин и хроматографию в системе пиридин — бутанол — уксусная кислота — вода, 10 : 15 : 3 : 12.

Фингерпринт после хроматографии спрыскивали водой до полного увлажнения, помещали на тонкий жесткий пластик примерно того же размера и сверху настилали последовательно сухой лист бумаги ватман 1 и еще один лист пластика, причем сухой лист бумаги располагали таким образом, чтобы направление его расширения при промокании совпадало с направлением прокатки. Полученный «сэндвич» прокатывали через плотные резиновые ролики. При таком способе увлажнения вспомогательного листа на нем получали отпечаток исходного фингерпринта. Пептиды обнаруживали с помощью 0,01%-ного раствора флуорескамина в ацетоне.

Расположение пептидов на исходном фингерпринте восстанавливали в соответствии с полученным отпечатком, отмечали положение каждого пептида и центральную часть пятна, содержащую примерно 50% всего количества соответствующего материала, вырезали и элюировали водой. Оставшийся после удаления пептидов фингерпринт проявляли 0,01%-ным раствором флуорескамина или 0,5%-ным раствором нингидрина в ацетоне для проверки правильности установления местоположения пептидов.

Для проверки индивидуальности выделенных с бумаги пептидов определяли их N-концевую аминокислоту и N-концевую последовательность дансильным методом [15].

Аминокислотный состав пептидов определяли с помощью метода разделения и количественного анализа аминокислот в форме их Dns-производных [2] с помощью ТСХ на полиамидном слое. Двухмерное хроматографическое разделение Dns-аминокислот проводили на полиамидной пленке (5 × 6,5 см) с использованием модифицированных хроматографических систем, предложенных в работе [16]: вода — муравьиная кислота — пропанол, 100 : 2 : 5; бензол — уксусная кислота — бутанол, 18 : 2 : 1; этилацетат — метанол — уксусная кислота, 20 : 1 : 1.

Сканирование пятен Dns-аминокислот на пластинах проводили щелью 6 × 0,1 мм на спектрофотометре РМQ-11 фирмы «Opton» (ФРГ).

ЛИТЕРАТУРА

1. De Lange R. J., Smith E. L. (1972) *Accounts Chem. Res.*, 5, 368—373.
2. Spivak V. A., Fedoseev V. A., Orlov V. M., Varshavsky Ya. M. (1971) *Anal. Biochem.*, 44, 12—31.
3. Svasti J., Milstein C. (1972) *Biochem. J.*, 128, 427—444.
4. Vandekerckhove J., Montagu M. V. (1974) *Eur. J. Biochem.*, 44, 279—288.
5. Bradbury E. M., Carpenter B. G., Rattle H. W. E. (1973) *Nature*, 241, 123—125.
6. Bradbury E. M., Rattle H. W. E. (1972) *Eur. J. Biochem.*, 27, 270—281.
7. Bradbury E. M., Inglis R. J., Matthews H. R. (1974) *Nature*, 247, 257—261.
8. Lowie A. J., Dixon G. H. (1973) *Nature New Biol.*, 243, 164—168.
9. Langan T. A., Rall S. C., Cole R. D. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 1942—1944.
10. Langan T. A. (1971) *Fed. Proc.*, 30, 1089.
11. Johns E. W. (1964) *Biochem. J.*, 92, 55—59.
12. Kinkade J. M., Jr., Cole R. D. (1966) *J. Biol. Chem.*, 241, 5790—5797.
13. Bustin M., Cole R. D. (1968) *J. Biol. Chem.*, 243, 4500—4505.
14. Bustin M., Cole R. D. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 5291—5294.
15. Weiner A. M., Platt T., Weber K. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 3242—3251.
16. Woods K. R., Wang K. T. (1967) *Biochem. et biophys. acta*, 133, 369—370.

Поступила в редакцию
21.I.1975

INVESTIGATION OF THE VARIABILITY OF AMINO ACID RESIDUES IN SUBFRACTIONS OF CALF THYMUS HISTONE F1

ARUTYUNYAN A. A., SHLYAPNIKOV S. V., SEVERIN E. S.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The variability of amino acid residues in the subfractions of calf thymus histone F1 was investigated by the analysis of peptides isolated with the aid of paper fingerprint method from tryptic and chymotryptic digests of C- and N-terminal fragments. The amino acid sequence determination revealed certain constancy in composition of C-terminal moiety of histone F1. The regularities observed for replacements in the N-terminal parts of histone F1 subfractions from different sources were assumed to be of functional importance.