

Պ.Օ. ՎԱՐԴԵՎԱՆՅԱՆ, Գ.Ա. ՓԱՆՕՅԱՆ, Մ.Ա. ՓԱՐՏԱԴԱՆՅԱՆ,
Բ.Գ. ԲՕՅԴՋՅԱՆ, Ա.Բ. ԿԱՐԱՓԵՏՅԱՆ

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ХРОМАТИНА ПРИ АКТИВАЦИИ ГЕНОМА

Показана возможность применения дифференциальных кривых плавления в изучении структуры хроматина при различных функциональных состояниях на примере генома пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Выделена и исследована активная фракция хроматина изолированных зародышей пшеницы. Показано, что при проращении зародышей пшеницы имеет место значительное снижение температуры плавления нуклеосомной части активной фракции, а также возрастание количества легкоплавких участков по сравнению с аналогичной фракцией из сухих зародышей.

Кривые плавления хроматина отличаются большой сложностью. Это связано с наличием у хроматина суперструктуры и, как следствие этого, появлением в нем межнуклеосомных взаимодействий, а также дополнительных взаимодействий ДНК с гистонами и негистоновыми белками. Все это делает весьма информативным использование термической денатурации для выявления динамических изменений в ДНК и хроматине, происходящих при различных функциональных ситуациях [1–4].

В настоящее время структура растительного хроматина с точки зрения генной регуляции все еще остается недостаточно изученной. Нет достоверных данных о возможностях фракционирования растительного хроматина, основанного на чувствительности к микрококковой нуклеазе, или о наличии гиперчувствительных сайтов к ДНКазе I [5, 6].

Ранее [2] было показано, что проращение изолированных зародышей пшеницы сопровождается рядом функциональных изменений и структурных перестроек в хроматине. Однако прямого ответа относительно изменений в самих нуклеосомах нет. В связи с этим актуально исследование изменений в олигонуклеосомах, получаемых ограниченным расщеплением ДНКазой II хроматина изолированных зародышей пшеницы при его активации.

Материалы и методы. Исследования проводили на зародышах пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Безостая 1. Изолированные по методу [7] зародыши помещали на питательную среду, содержащую 0.9% агара, 1% глюкозы и 0.01% стрептомицина в предварительно стерилизованные чашки Петри в темноте при 26°C в течение 24 и 48ч. После высева зародышей в чашки Петри добавляли раствор, содержащий 5мМ Трис–HCl, pH=7.4; 20мМ KCl, 20 мкг/мл сахарозы, а в опытных вариантах также 10⁻⁴М ГК₃ (гибберелловую кислоту A₃, “Serva”, Германия).

Хроматин из сухих зародышей выделяли по методу, описанному в работе [8]. Для сохранения максимально нативной структуры фракций транскрипционно активных олигонуклеосомных фрагментов хроматина и для обеспечения их постоянного выхода применяли условия мягкого гидролиза ДНКазой II (“Serva”).

Термическую денатурацию ДНК и олигонуклеосом проводили на спектрофотометре Pye Unicam SP-8-100 (Англия), как описано в [7]. Образцы перед

плавлением диализировали против 0.1xSSC в течение ночи при 4°C. Дифференциальные кривые плавления (ДКП) получали путем численного дифференцирования нормированных кривых [9].

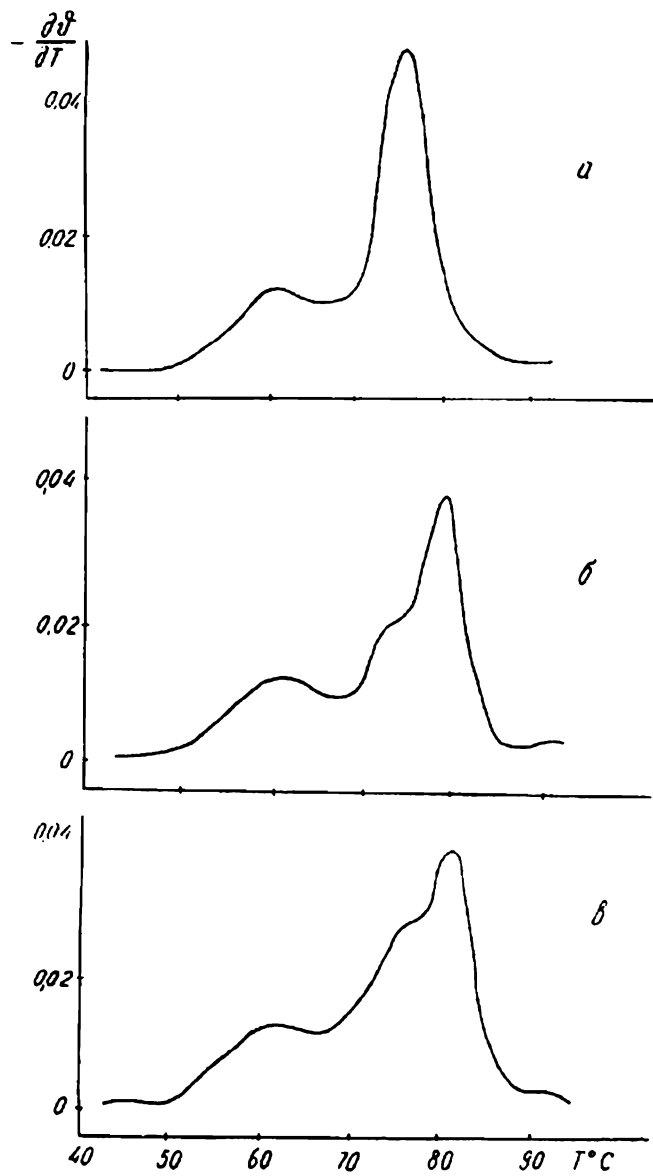


Рис. 1. Дифференциальные кривые плавления: (а) мононуклеосом, (б) динуклеосом, (в) тринуклеосом, выделенных из хроматина пшеницы.

Результаты и их обсуждение. Можно полагать, что есть много возможностей использования количественных данных по термической денатурации в проведении детального анализа ДНК-белкового взаимодействия. Однако при этом есть ряд факторов, ограничивающих возможности их применения. Во-первых, это экспериментальные проблемы, связанные с трудностями при появлении

мутности, приводящей к искажениям результатов; во-вторых, это неточности, связанные с локализацией отдельных пиков на ДКП. Вдобавок хроматин является сложным надмолекулярным образованием. И если принять во внимание трудности в проведении анализа хроматина с учетом взаимодействия ДНК – белок, с одной стороны, и белок-белкового – с другой, в зависимости от температуры, то становится ясно, что решение этого вопроса крайне затруднительно. Однако необходимо добавить, что главные особенности плавления хроматина в большей мере обусловлены гистонами, чем негистоновыми белками. Более того, гистоны в процессе плавления находятся в составе коровой частицы (кроме гистона H1) и распределены вдоль молекулы ДНК независимо от последовательности азотистых оснований. К тому же, как оказалось, ДКП коровых частиц, выделенных из хроматина, имеют двухфазный профиль плавления с двумя хорошо разрешаемыми пиками [8].

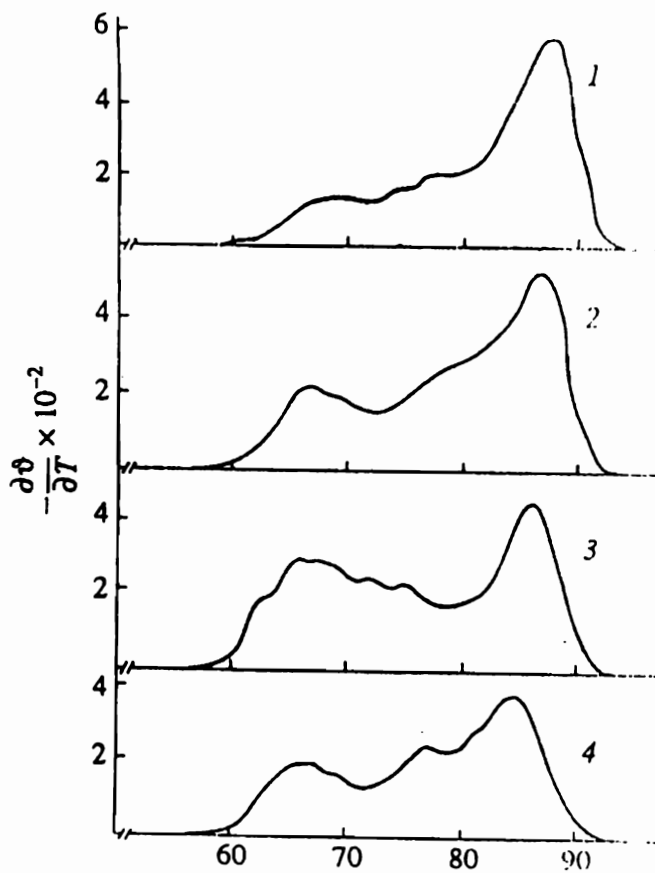


Рис. 2. Дифференциальные кривые плавления фракции А хроматина из сухих (1), прорастающих в течение 24 ч. (2), 48 ч. (3) и обработанных гиббереллином (4) зародышей пшеницы.

На основании вышесказанного можно полагать наличие двух переходов для коровой частицы: вначале плавятся ДНК-овые концы коровой частицы, после чего следует плавление комплекса ДНК – коровый гистон. Если продолжить аналогию, то для ди- и тринуклеосом можно выделить уже, по крайней мере, три перехода, первый из которых будет соответствовать выплавлению ДНК на концевых участках, второй – выплавлению ДНК в линкерных участках, третий –

плавлению комплекса ДНК – коровый гистон. В наблюдаемую картину может вносить дополнительную сложность присутствие гистона H1, который способен связываться с двумя витками ДНК в нуклеосоме и взаимодействовать с линкерной ДНК и ДНК коровой частицы (см.рис.1).

Получаемые при этом данные могут относиться только к локальным взаимодействиям в пределах моно-, ди- и тринуклеосом и не могут иметь отношения к дальним взаимодействиям, приводящим к образованию структур высшего порядка за счет взаимодействия между прилегающими витками в 30 нм фибрилле, как это полагалось ранее [10].

Прорастание изолированных зародышей пшеницы сопровождается разрыхлением структуры хроматина [2], что должно приводить к увеличению количества активной фракции. Как видно из рис. 2, прорастание зародышей в течение 24 ч. отражалось на ДКП фракции А. Так, имело место значительное снижение температуры плавления нуклеосомной части фракции А, плавящейся в интервале 80–90°C, а также наблюдалось возрастание количества легкоплавких участков по сравнению с ДКП сухих зародышей (60–70°C). Дальнейшее прорастание приводило к усилению наблюдаемых изменений. ДКП фракции А обработанных фитогормоном (гиббереллином) зародышей занимало промежуточное положение между соответствующими профилями плавления из “одно”-и “двудневных” зародышей.

С целью количественного анализа изменений, происходящих в активной фракции А (значительное количество транскрибируемой ДНК обогащено АТ-парами [11]) при прорастании в отсутствие и в присутствии гиббереллина, мы использовали метод зонного анализа ДКП [1]. ДКП были условно разделены на зоны, в каждой из которых рассчитывали долю расплавленной ДНК(см.табл.). Зоны были подобраны по наблюдаемым основным переходам. В интервале до 60°C, отражающем денатурацию обогащенных АТ-парами последовательностей, доля расплавленной ДНК фракции А несколько больше для ДНК однодневных и двудневных зародышей по сравнению с сухими. Обработка зародышей гиббереллином приводила к увеличению этого эффекта.

Доля расплавленной ДНК фракции А в соответствующих температурных зонах

Вариант	<60°C	60-70°C	70-80°C	>80°C
сухие зародыши	5.7±0.1	37.0±0.2	54.7±0.3	2.6±0.1
прорастающие зародыши				
24ч.	7.8±0.2	41.3±0.1	48.2±0.1	2.7±0.1
48ч.	8.3±0.2	42.4±0.2	47.1±0.2	2.2±0.1
24ч. в присутствии 10 ⁻⁴ М ГК	9.2±0.2	40.2±0.2	44.5±0.1	6.1±0.1

Доля расплавленной в зоне 60–70 °С ДНК фракции у однодневных и двудневных зародышей также больше, чем у сухих. У зародышей, обработанных гиббереллином, она занимает промежуточное положение между сухими и однодневными контрольными зародышами. Температура перехода в этой зоне отражает плавление участков, содержащих умеренное количество АТ-пар.

Участок плавления 70–80°C отражает денатурацию последовательностей ДНК, обогащенных ГЦ-парами. Доля расплавленной в этой зоне ДНК у прорастающих в отсутствие и в присутствии гиббереллина зародышей по сравнению с таковой из сухих зародышей существенно ниже. Обработка фитогормоном приводила к увеличению доли участков, плавящихся при температуре выше 80°C.

Таким образом, как само прорастание, так и обработка зародышей гиббереллином существенно отражались на параметрах плавления ДНК, выделенной из фракции А. В случае действия фитогормона наблюдали возрастание доли "легкоплавких" (обогащенных АТ-парами) и "тугоплавких" (возможно, обогащенных ГЦ-парами) участков.

Указанные сдвиги могут быть следствием как изменения содержания ГЦ-пар, так и увеличения количества метилцитозина [1,12]. Последнее также может контролировать транскрипцию при прорастании и обработке зародышей гиббереллином, т.к. показана корреляция между экспрессией отдельных генов и уровнем их метилированности [12,13]. На основании полученных данных можно заключить, что обработка гиббереллином сопровождается дерепрессией участков генома, отличных от таковых при прорастании в отсутствие экзогенной ГК. Обработка гиббереллином приводит к изменениям физико-химических параметров нуклеосом по сравнению с таковыми при прорастании изолированных зародышей пшеницы.

Обобщая вышеизложенное, можно констатировать, что использование техники высокоразрешенных ДКП является хорошим инструментом в выявлении структурно-функциональных сдвигов при активации хроматина. При этом отметим, что использование ДКП в исследовании хроматина позволяет дифференцировать нуклеосомы с разной стабильностью, что делает весьма информативным термическую денатурацию в выявлении динамических изменений при различных функциональных ситуациях. Подобный подход представляется перспективным в скрининге биологически активных соединений, действующих на растительный хроматин.

Кафедра биофизики

Поступила 14.02.2000

ЛИТЕРАТУРА

1. Vardevanyan P.O., Panosyan G.A., Tiratsuyan S.G., Babayan Yu.S., Vardapetyan R.R. – *Studia Biophysica*, 1983, v.97, №3, p.209.
2. Паносян Г.А., Тирацуйан С.Г., Вардеванян П.О., Вардапетян Р.Р. – *ДАН СССР*, 1982, т.265, №3, с.765.
3. Балаян М.А., Вардеванян П.О., Пепоян А.З., Минасбекян Л.А., Парсаданян М.А., Карагезян К.Г. – *Биол. мембраны*, 1997, т.14, №5, с.506.
4. Нанагюлян С.Г., Таслахчян М.Г., Парсаданян М.А., Минасбекян Л.А., Вардеванян П.О. – *Проблемы современной ботаники и микологии. Сб. статей, посвященный 75-летию кафедры ботаники ЕГУ, Ер.*, 1999, с.130.
5. Lee M.S., Garrard W.T. – *EMBO Journal*, 1991, v.10, №3, p.607.
6. Manfred K., Amasino R.M. – *Plant Physiol.*, 1989, v.91, №2, p.451.
7. Вардеванян П.О., Тирацуйан С.Г., Вардеванян А.О., Бояджян Б.Г., Паносян Г.А. – *Физиол. раст.*, 1995, т.42, №2, с.290.
8. Simon J.H., Becker W.M. – *Biochim. et Biophys. Acta*, 1976, v.454, №1, p.154.
9. Вардеванян П.О., Карапетян А.Т., Терзкян Г.А., Вардапетян Р.Р., Дanelян Э.А. – *Биополимеры и клетка*, 1990, т.6, №4, с.48.
10. Бавыкин С.Г. – *Молекулярная биология (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР)*, 1988, т.26, с.3.
11. Travers A.A. – *BioEssays*, 1994, v.16, №9, p. 657.
12. Johnson C.A., Goddard G.P., Adams R.L. – *Jour. of Biochemistry*, 1995, v.305, №111, p.791.
13. Finnegan E.J., Gender R.K., Peacock W., Dennis E.S. – *Annu.Rev.Plant Physiol. and Mol. Biol.*, 1998, v.49, p.223.

Պ.Հ. ՎԱՐԴԵՎԱՆՅԱՆ, Գ.Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ, Մ.Ա. ՓԱՐՍԱԴԱՆՅԱՆ,
Բ.Գ. ԲՈՅԱԶՅԱՆ, Ա.Թ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ

ՔՐՈՍՄԱՏԻՆԻ ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԱՅԻՆ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԳԵՆՈՍԻ ԱԿՏԻՎԱՑՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ

Ա մ փ ո փ ո մ

Ցորենի (*Triticum aestivum* L.) գենոմի օրինակով ցույց է տրված հալման դիֆերենցիալ կորերի կիրառման հնարավորությունը տարբեր ֆունկցիոնալ վիճակներում գտնվող քրոմատինի ուսումնասիրություններում: Անջատված և ուսումնասիրված է ցորենի մեկուսացված սաղմերի քրոմատինի ակտիվ ֆրակցիան: Ցույց է տրված, որ ցորենի սաղմերի ծլման ժամանակ տեղի է ունենում ակտիվ ֆրակցիայի նուկլեոսոմային մասի հալման ջերմաստիճանի զգալի իջեցում, ինչպես նաև դյուրահալ հատվածների քանակության ավելացում չոր սաղմերի համապատասխան ֆրակցիայի համեմատ:

ЗАН СССР, 265, № 3, 765 (1980).