

УДК 577—23

В. О. АЙРАПЕТЯН, Т. А. МАНАМШЬЯН, Г. И. КИРЬЯНОВ

## АНАЛИЗ БЕЛКОВОГО СОСТАВА ХРОМАТИНА L-КЛЕТОК, СФОРМИРОВАННОГО НА НЕДОМЕТИЛИРОВАННОЙ ДНК

В хроматине, образующемся в L-клетках на недометилизованной в ходе репликации ДНК, наблюдается резкое уменьшение относительного содержания гистона H1 и негистоновых белков (НГБ) без снижения их синтеза. Обеднение вновь синтезированного хроматина гистонам H1 НГБ может отражать изменение характера их взаимодействия с недометилизованной ДНК, что и определяет наблюдаемое явление релаксации фибрилл хроматина.

Эпизодическое метилирование ДНК эукариотической клетки в последнее время рассматривается как механизм негативной регуляции экспрессии генов. Недометилизованность сайтов 5' области—регуляторной части гена, возникающая в ходе дифференцировки клеток в онтогенезе,—является обязательным условием экспрессии [1].

Неясным остается вопрос о том, как клетка узнает столь тонкие изменения первичной структуры ДНК. Ранее нами было высказано предположение, что в сопряжении изменения метилирования ДНК и активации экспрессии медиаторная роль принадлежит структуре хроматина [1]; таким образом, локальное изменение метилирования ДНК приводит к соответствующим изменениям хроматина данной последовательности гена (ДНК), что и опосредует возможность его экспрессии.

Мы показали, что хроматин, сформированный в ходе репликации на недометилизованной ДНК в условиях инкубации клеток с ингибитором метилирования ДНК 5-аза-цитидином (5-аза-С), характеризуется свойствами транскрипционно-активного хроматина: резко повышенной нуклеазо-доступностью, отсутствием или сильным ослаблением межнуклеосомных взаимодействий [2]. Такие резкие изменения структуры хроматина неясны. Известно, что как межнуклеосомные взаимодействия, так и наднуклеосомная компактизация хроматина определяется в частности внекоровым гистонам H1. Мы поставили задачу изучить особенности белкового состава хроматина, формирующегося в клетках в ходе репликации ДНК в присутствии 5-аза-С.

Клетки культуры мышинных фибробластов (L-клетки) инкубировали на стадии активной пролиферации в присутствии 5-аза-С в концентрации 10 и 50 мкМ в течение 4 часов. Одновременно в среду инкубации добавляли <sup>35</sup>S-метионин в концентрации 50 мкКи/мл для радиоактивного мечения новообразованных белков. Из клеток после инкубации выделяли ядра, как описано в [2], ядра отмывали от нехроматинных белков, а затем суммарные белки хроматина выделяли, лизируя ядра 2,5 М мочевиной с 1% SDS, 1 мМ PMSF в 0,0625 М трис-HCl, рН-

6,8 и 2% β-меркаптоэтанола. Лизат отделяли от нерастворимой части центрифугированием и проводили электрофорез в пластине (5% концентрирующий гель с 0,1% SDS, 2,5 М мочевины, 15% разделяющий гель с 1% SDS, 2,5 М мочевины), как описано в [2].

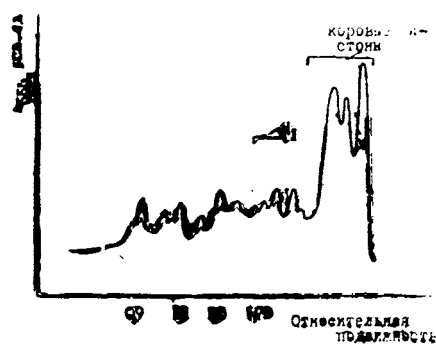


Рис. 1. Сканограмма геля, окраска «Кумасси R-250».

После электрофореза гели окрашивали красителем Кумасси R-250, фотографировали, сушили и получали радиоавтограф на рентгеновской пленке РМ-1. Негатив снимка окрашенного геля сканировали на приборе LKB UltraScan XL с машинным обчетом площади пика каждой белковой зоны (рис. 1). Автограф геля сканировали на приборе LKB UltraScan XL также с машинной обработкой относительной площади каждой белковой зоны. Сопоставляли данные, полученные из анализа сканограмм суммарного белка хроматина клеток, инкубированных с 5-

аза-С с аналогичными данными для суммарного белка хроматина, полученного из клеток, инкубированных с <sup>35</sup>Сметхионом без 5-аза-С в течение 24—32 часов. Определение сканограммы белков хроматина (коровых гистонов, гистона Н1 и негистоновых белков), выявляемых по окраске (рис. 1) в разных препаратах (опытных и контрольных), показывают, что относительное содержание отдельных белковых фракций в суммарном хроматине, т. е. в хроматине вне репликации не подвергается существенным изменениям (данные не приведены). Таким образом, побочные эффекты, которые может вызвать присутствие 5-аза-С в клетке, не распространяются на структуру хроматина. В то же время относительное содержание некоторых белков хроматина, сформированного на недометилированной в присутствии 5-аза-С ДНК, резко отличается от контрольного (табл. и рис. 2). Прежде всего обращает на себя внимание общее снижение содержания всех негистоновых белков. Сильному уменьшению подвергается содержание в таком хроматине гистона Н1. При обеих избранных концентрациях агента относительное содержание гистона Н1 (Н1/Н4) уменьшается примерно в 2—2,5 раза и распространяется на все субфракции гистона Н1.

Источник хроматина	Отношение радиоактивности белков к Н4				
	суммарный Н1	субфракции Н1			НГБ
		а	б	с	
контрольные клетки	1,4	0,54	0,37	0,49	0,8
клетки с 5-аза-С, 10 мкМ	0,59	0,28	0,17	0,14	0,28
клетки с 5-аза-С, 50 мкМ	0,57	0,33	0,25	—	0,17

Таким образом, выявленная нами релаксированность хроматина, сформированного на недометилированной ДНК, может на самом деле определяться резким уменьшением содержания в нем гистона Н1 и, возможно, некоторых НГБ. В принципе это может объясняться, по крайней мере, двумя причинами: неспецифическим—непрямым действием (ингибирование синтеза гистона Н1 и НГБ) или специфическим—

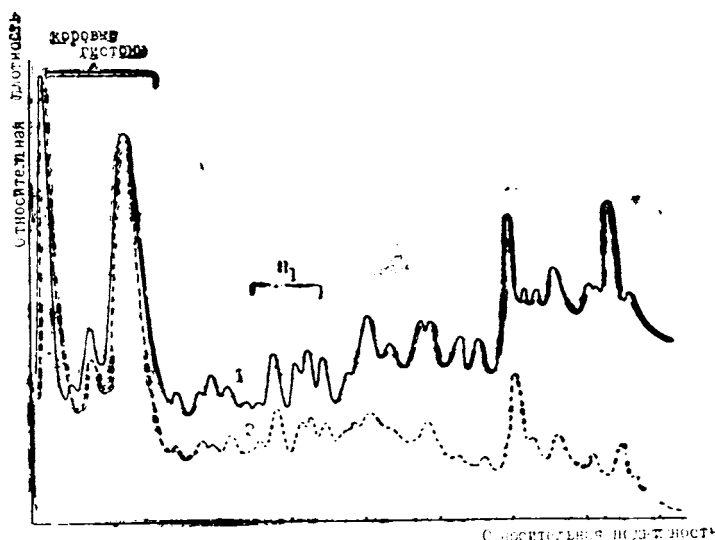


Рис. 2. Сканогамма автографа геля: 1—белки хроматина контрольных клеток; 2—белки хроматина клеток, инкубированных с 5-аза-С.

изменением характера взаимодействия гистона H1 (и НГБ) с упомянутой ДНК. Первая возможность, как показывает прямое определение (данные не приведены), может быть исключена. Следовательно, можно полагать, что именно включение 5-аза-С в ДНК и сопряженное с этим ее недометилирование нарушают аффинность гистона H1 и некоторых негистоновых белков к ДНК.

ЕГУ, МГУ

Поступило 25.01.1988

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бурьянов Я. И., Кирьянов Г. И. Структурно-функциональные основы энзиматического метилирования ДНК.—Итоги науки и техники: Сер.: Молекулярная биология. М.: Изд-во ВИНТИ, 1987, т. 23.
2. Ходосовская А. М., Исаева Л. В., Смирнова Т. А., Манамшьян Т. А., Кирьянов Г. И., Ванюшин Б. Ф. Особенности организации вновь синтезированного хроматина, формирующегося на недометилированной ДНК.—Изв. АН Арм. ССР: Сер.: Биологическая. М.: Изд-во АН СССР, 1986, с. 868—875.

#### Ա մ փ ո ւ փ ու մ

Մկանբի L-բջիղներում օեպլիկացիայի ընթացքում թերմեթիլացված ԴՆԹ-ի վրա սինթեզված բրոմատինում դիտվում է հիստոն H<sub>1</sub> և ոչ հիստոնային սպիտակուցների հարաբերական պարունակության խիստ անկում առանց նրանց սինթեզի արգելակման: Նոր սինթեզված բրոմատինի աղբատացումը հիստոն H<sub>1</sub>-ով և ոչ հիստոնային սպիտակուցներով կարող է արտացոլել նրանց փոխազդեցության բնույթի փոփոխությունը թերմեթիլացված ԴՆԹ-ի հետ, որը և բնորոշում է բրոմատինային ֆիբրիլի օելաքսացիան:

#### SUMMARY

Drastic improvement of relative quantities of histone H1 and nonhistone proteins in chromatin formed in L-cells has been observed on DNA undermethylated during replication, their synthesis being unaffected. The improvement of the newly synthesized chromatin in histone H1 and nonhistone proteins may reflect the changes of their interaction character with undermethylated DNA, which explain the detected chromatin fibre rela-