

ГИСТОН H1 И ТРАНСКРИПЦИОННО АКТИВНЫЕ УЧАСТКИ ХРОМАТИНА

А. А. Караванов

Введение. Вопрос о роли гистона H1 в организации хроматина в ядрах является одним из наиболее интересных и обсуждаемых вопросов в обширной литературе по хроматину. Важной и одновременно наиболее спорной стороной этого вопроса является проблема взаимоотношений этого гистона и транскрипционно активного хроматина. В ряде работ на основании нескольких косвенных критериев утверждалось, что гистон H1 присутствует в транскрипционно активных участках хроматина в модифицированной форме. Уже в ранних исследованиях, сопоставлявших количественные и качественные особенности гистона H1 и его субфракций в различных тканях и на разных стадиях клеточного цикла, были получены данные, позволяющие предположить, что гистон H1 может играть не только пассивную роль в организации компактных структур хроматина, но и более специфическую, непосредственно относящуюся к процессам активации и репрессии [1]. Анализ этой проблемы продолжается и в настоящее время [2—4].

С другой стороны, при изучении транскрипции хроматина *in vitro*, начиная с самого раннего периода и по настоящее время, стало очевидным, что H1 ограничивает транскрипцию в хроматине [5—8]. Однако необходимо отметить, что эти данные получены на препаратах хроматина, а не на препаратах интактных ядер, т. е. на развернутом хроматине, лишенном высоких порядков упаковки, характерных для него в ядрах эукариот. В то же время косвенные данные о значении высоких порядков упаковки хроматина в ядрах для организации транскрипционно активных участков были получены Полом с сотр. [9]. Из результатов исследований этих авторов следовало, что при работе с выделенным хроматином феномен повышенной чувствительности активных в транскрипции участков хроматина к действию ДНКазы I [10] становится невоспроизводимым.

Кроме того, было продемонстрировано, что при обработке микрококковой нуклеазой хроматина и ядер выявляются различия в белковом составе нуклеосом, в том числе принадлежащих транскрипционно активному хроматину [11]. Переход исследователей к работе с ядрами эукариот дал первые указания на то, что гистон H1 может вообще отсутствовать в транскрипционно активных участках хроматина. Удаление значительных количеств гистона H1 из ядер эритробластов не приводит к потере специфичности гидролиза ДНКазой I глобиновых генов, активно экспрессируемых в этих клетках [12].

В данной работе исследована роль высоких порядков упаковки хроматина на уровне интактных ядер и гистона H1 в организации транскрипционно активных участков. В качестве основного подхода использовали избирательную чувствительность транскрипционно активных участков к действию ДНКазы I при ограниченном гидролизе ядер (5—20 %) этим ферментом.

Материалы и методы. Ядра выделяли из селезенки белых беспородных мышей по методу, описанному ранее [13]. Процедура выделения ядер включала гомогенизацию ткани в растворе 0,25 М сахарозы, 4 мМ MgCl₂ с последующим центрифугированием при 5000 об/мин (К-23, «Janetzki», ГДР). Осадок клеток дважды обрабатывали раствором 0,25 М сахарозы, 2 мМ MgCl₂, 0,2 % -ного тритона X-100. Ядра собирали центрифугированием и чистоту полученного препарата контролировали микроскопически, используя окраску светлым зеленым и акридиновым оранжевым.

Выделение хроматина из ядер производили после отмывки очищенного препарата ядер последовательно в растворах: а) 10 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4, 5 мМ MgCl₂; б) 0,075 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4, 5 мМ ЭДТА; в) 10 мМ трис-HCl, pH 7,4,

5 мМ ЭДТА. Затем ядра вскрывали механическим разрушением в гомогенизаторе Даунса в растворе 5 мМ ЭДТА в воде и оставляли для набухания на холоде в течение 1 ч. Набухший хроматин центрифугировали при 25000 об/мин, ротор SW-27, центрифуга Spinco-L2 65B («Beckman», США). Все операции проводили строго на холоде и в присутствии ингибитора протеаз — 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторида.

Гидролиз ядер и хроматина нуклеазой (ДНКазы I фирмы «Serva», ФРГ) проводили следующим образом. Препараты ядер или хроматина тщательно отмывали буферным раствором (10 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, 5 мМ MgCl₂) до тех пор, пока уровень оптической плотности при 260 мкм не становился ниже 0,2 ОЕ. Суспензию ядер или хроматина доводили до концентрации по ДНК 10 мг/мл (~200 ед. A₂₆₀) в том же растворе. ДНКазу I добавляли к суспензии до концентрации 200 ед./мл, удельная активность 2000 ед./мг. Гидролиз вели при 37 °С в течение времени, указанного в тексте. Реакцию останавливали быстрым охлаждением до 4 °С и центрифугированием при 5000 об/мин. Надосадочную жидкость собирали (S1) и определяли процент гидролиза ДНК спектрофотометрически по увеличению оптической плотности при A₂₆₀ надосадочной жидкости или по методу Спирина [14]. Для анализа белков надосадочной жидкости их осаждали добавлением 50 %-ной трихлоруксусной кислоты до конечной концентрации 20 % в течение ночи при -20 °С. Затем собирали центрифугированием, отмывали ацетоном, смесью ацетон — эфир (2 : 1), эфир — ацетон (2 : 1) и эфиром, после чего высушивали либо под струей азота, либо под вакуумом над парафином.

Белки анализировали двумя методами электрофореза в полиакриламидном геле: в 15 %-ном геле толщиной 0,6 мм в присутствии DS-Na по методу Леммли [15] и в системе уксусная кислота — мочевина по методу Чолкли [16]. Гели фиксировали и красили в смеси, содержащей 25 % изопропанола, 10 % уксусной кислоты, 0,05 % Кумасси яркого голубого R-250 («Serva», ФРГ). Фон удаляли отмывкой в 10 %-ной уксусной кислоте. Избирательную экстракцию гистона H1 из ядер проводили по методу Коула [17]. Содержание белка определяли по методу Лоури [18].

Результаты и обсуждение. На значение высоких порядков упаковки хроматина в ядрах для поддержания «правильной» в функциональном смысле структуры указывают результаты следующего эксперимента (рис. 1). Мы проводили сравнение кинетики гидролиза хроматина в составе интактных ядер селезенки мыши и хроматина, выделенного из тех же ядер, с помощью обработки 5 мМ ЭДТА и мягкой гомогенизации. Условия обработки в отношении концентраций ДНК и фермента были идентичными. Из рисунка хорошо видно, что кинетика действия фермента при переходе от интактных ядер к хроматину резко меняется и, что особенно важно, она различается на первых этапах гидролиза, т. е. когда происходит преимущественное разрушение ДНКазой I транскрипционно активных участков хроматина [10]. Здесь необходимо указать также, что если кинетика действия фермента на интактные ядра остается постоянной при неизменных условиях гидролиза, то ки-

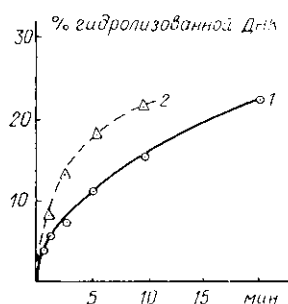


Рис. 1. Кинетика гидролиза ДНК (1) и хроматина (2) ядер селезенки мыши ДНКазой I.

Fig. 1. Hydrolysis kinetics of DNA (1) and chromatin (2) in mouse spleen nuclei by DNase I.

нетика гидролиза хроматина ДНКазой I является фактически невозпроизводимой, меняясь от эксперимента к эксперименту. Именно эта нестабильность служит доказательством того, что разница в кинетике, наблюдаемая нами, определяется в первую очередь изменениями в уровне высокой упаковки хроматина, а не просто увеличением доступности ДНК для действия ДНКазы I. Подтверждением этого положения может служить сопоставление белков, высвобождаемых из ядер и хроматина при гидролизе ДНКазой I до одинаковой степени. Результаты такого эксперимента приведены на рис. 2 (см. вклейку). Видно, что при гидролизе ДНК ядер и хроматина до ~10 % электрофоретические профили

белков, высвобождаемых в надосадочную жидкость, резко различаются: выявляется целый ряд несовпадающих компонентов и меняется количественный вклад отдельных белков.

Таким образом, как собственные, так и данные литературы указывают на значение высоких порядков упаковки хроматина и большую адекватность данных, полученных в экспериментах с интактными ядрами, по сравнению с таковыми, полученными на хроматине.

Переход к работе с ядрами эукариот дал некоторые сведения о том, что гистон H1 может отсутствовать в составе транскрипционно активных участков хроматина [12]. Анализ белков, высвобождаемых из ядер при гидролизе их микрококковой нуклеазой в условиях, обеспечивающих избирательное разрушение транскрипционно активных участков хроматина, также продемонстрировал крайне сниженное содержание гистона H1 среди этих белков [19, 20].

При исследовании этого вопроса мы использовали аналогичный подход, т. е. изучали белки, переходящие из ядер клеток селезенки мыши в надосадочную жидкость (*S1*) при ограниченном гидролизе ДНКазой I. Электрофорез белков *S1* в присутствии DS-Na (рис. 3, см. вклейку) демонстрирует значительное число высвобождаемых из ядер компонентов. Видно, что в зоне подвижности гистона H1 выявляется одна полоса, занимающая по подвижности промежуточное положение между H1а- и H1б-подфракциями. Однако, как видно из рис. 4 (см. вклейку), эта полоса представляет собой ДНКазу I, внесенную в инкубационную смесь. Совпадение подвижности фермента и гистона H1 в использованных условиях электрофореза обусловлено аномальной подвижностью сильно положительно заряженного гистона H1. Это перекрывание полос, соответствующих ферменту и гистону H1, не позволяет сделать в этом случае какого-либо заключения или достаточно обоснованного предположения о наличии или отсутствии гистона H1 во фракции хроматина, избирательно гидролизуемой ДНКазой I. Для исключения маскирования ферментом гистона H1 и для более точного определения момента его появления в *S1*-белках был проведен следующий эксперимент (рис. 5, см. вклейку). Ядра клеток селезенки мыши гидролизовали ДНКазой I последовательно до различной степени. Белки *S1* на каждой стадии гидролиза подвергали электрофорезу, удливив время разделения в 1,5 раза, что должно было обеспечить разделение гистона H1 и фермента (молекулярные массы 19000 и 31000 соответственно). Можно видеть, что на ранних этапах гидролиза гистон H1 полностью отсутствует. Однако при 15 %-ном гидролизе видно появление рядом с полосой, соответствующей ферменту, двух полос подфракций гистона H1. Увеличение степени гидролиза до 20 % приводит к увеличению количества этого гистона в *S1* и к появлению третьей полосы, вероятно, соответствующей H1⁰-подфракции. Таким образом, эти данные указывают на отсутствие или очень сниженное количество гистона H1 во фракции хроматина, избирательно гидролизуемой ДНКазой I, т. е. транскрипционно активной. Однако для более однозначного заключения необходимо было исключить возможность удержания гистона H1 внутри ядра. Для этого были проанализированы белки *S2*, т. е. белки, оставшиеся в ядре после гидролиза ДНКазой I, но высвободившиеся из хроматина. С этой целью ядра после гидролиза их ДНКазой I приблизительно на 10—12 % собирали центрифугированием, *S1* удаляли, а затем вскрывали в слабо притёртом гомогенизаторе тефлон-стекло в присутствии 5 мМ ЭДТА. Осадок вскрытых ядер удаляли центрифугированием, а надосадочную жидкость (*S2*) собирали, лиофилизировали и полученные таким образом белки подвергали электрофорезу (рис. 6, см. вклейку). Можно видеть, что в этом случае в *S2* выходят сердцевинные гистоны и некоторая часть гистона H1. Однако гистон H1 явно количественно недопредставлен по сравнению с сердцевинными гистонами. Таким образом, эти данные подтверждают сделанное выше заключение об отсутствии или крайне сниженном количестве гистона H1 в транскрипционно активной фракции хроматина.

В дальнейшем при исследовании белков, связанных с гистоном H1 в ядрах *in vivo*, нами был получен несколько неожиданный результат. В этих экспериментах мы использовали следующий подход. Ядра селезенки мыши подвергали экстракции при pH 3,0 в условиях физиологической ионной силы. Как было показано [17, 21, 22], этот метод позволяет избирательно удалить из ядер почти полностью гистон H1, при этом структура ядер [21] и хроматина [22] не подвергается значительным изменениям. Затем ядра отмывали несколько раз буферным раствором (10 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM трис-HCl, pH 7,4), возвращая таким образом pH среды к нейтральному. После этого ядра подвергали экстракции буферным раствором (0,35 M NaCl, 10 mM трис-HCl, pH 7,4) в течение 30 мин на холоде. Экстрагированные белки диализировали против воды, лиофилизировали и анализировали с помощью электрофореза. Ядра после такой экстракции подвергали обработке 0,4 н. HCl в течение 2 ч для получения остаточных гистонов и белков. Электрофоретический анализ результатов такого эксперимента приведен на рис. 7 (см. вклейку). Видно, что после удаления гистона H1 (дорожка 2) в 0,35 M NaCl из ядер выходит некая часть сердцевинных гистонов, которые в обычных условиях выходят только при ионной силе свыше 1 M NaCl. Для того, чтобы установить, являются ли эти гистоны чисто случайной или специфической фракцией, 0,35 M NaCl-экстракт подвергали электрофорезу в системе уксусная кислота — мочевиная [16]. При этом оказалось (рис. 8, б, см. вклейку), что в зонах подвижности, характерных для гиперацетилированных форм гистонов, выявляется целый ряд компонентов, которые практически полностью отсутствуют среди фракции остаточных гистонов (рис. 8, а). Особенно хорошо это видно в зоне гистона H4. Обогащенность ацетилированными формами гистонов именно транскрипционно активного хроматина в настоящее время хорошо обоснована в литературе [23, 24]. Таким образом, если принять, что выявленные компоненты (рис. 8, б) действительно обогащены гиперацетилированными формами гистонов, то логично предположить, что удаление гистона H1 приводит к лабильности связи этих форм гистонов с хроматином.

С нашей точки зрения, свидетельством в пользу того, что экстрагируемая 0,35 M NaCl фракция в данном случае обогащена гиперацетилированными формами гистонов, является тот факт, что они практически не выявляются среди белков, оставшихся в ядрах (рис. 8, а), несмотря на сверхчувствительный метод окрашивания гелей — серебряные, использованный в этих экспериментах. Не совсем типичная картина распределения гиперацетилированных компонентов (рис. 8, б) может объясняться вкладом некоторых негистоновых белков и/или продуктов деградации гистонов. Однако здесь необходимо подчеркнуть, что данные о гиперацетилировании выходящих в этих условиях гистонов являются косвенными и требуют более прямого подтверждения в опытах с C¹⁴-ацетатом. Такие опыты в настоящий момент проводятся.

Для корректной интерпретации этих данных большое значение имеет количественный аспект, так как появление этих гистонов возможно за счет выхода из ядер фрагментов нуклеосомной ДНК как результата эндонуклеолиза в ходе экстракции. Количественные определения показали, что соотношение белок/ДНК в 0,35 M NaCl-экстракте более 100, а гистон/ДНК — не менее 30, что исключает такую возможность.

Таким образом, если принять с указанными выше оговорками, что удаление гистона H1 способствует высвобождению фракции гистонов, обогащенной гиперацетилированными формами в 0,35 M NaCl, то полученные в настоящей работе данные приводят к парадоксальному заключению. С одной стороны, гистон H1 либо отсутствует в транскрипционно активных участках, либо его количество крайне снижено; с другой — его присутствие необходимо для поддержания стабильного связывания модифицированных форм гистонов, расположенных в этих участках. Это противоречие, фактически неразрешимое при рассмотрении первого уровня упаковки хроматина, легко устраняется при перехо-

де к высоким уровням. Существование петельной организации хроматина на этом уровне подсказывает возможное участие гистона H1 (или его блоков [25]) самого по себе или вместе с негистоновыми белками в организации упорядоченных «правильных» петель транскрипционно активного хроматина. Иными словами, редкие молекулы гистона H1, расположенные по длине транскрипционно активной петли хроматина или у основания такой петли, взаимодействуют с молекулами гистона H1 и негистоновыми белками соседних, плотно упакованных в ядре фибрилл хроматина. Это обеспечивает такую конформацию петли ДНК, которая способствует стабильности взаимодействия этой петли с модифицированными молекулами гистонов. Такое предположение является, безусловно, рабочей гипотезой. Тем не менее, оно не противоречит ни результатам настоящей работы, ни известным литературным данным. Более того, оно выглядит логичным в свете приведенных выше данных [25] о существовании блоков гистонов H1 на уровне высоких порядков упаковки хроматина в ядре. В последнее время Лучником с соавт. [27] продемонстрировано, что внесение незначительного количества разрывов ДНКазой I в минихромосому вируса ОВ-40, релаксирующее суперспираль петли ДНК, приводит к диссоциации гистонов из транскрипционно активной фракции. Эти данные также подтверждают высказанное выше предположение.

HISTONE H1 AND TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE CHROMATIN REGIONS

A. A. Karavanov

N. K. Koltzov Institute of Developmental Biology,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

The method of limited digestion of mouse spleen nuclei with DNase I combined with electrophoretic analysis of proteins released from nuclei is used to investigate the participation of H1 histone in the organization of transcriptionally active chromatin regions. The data obtained show that transcriptionally active chromatin regions digested under applied conditions do not contain at all or contain insignificant amounts of H1 histone. Surprisingly, 0.35 M NaCl extraction of nuclei following selective extraction of H1 histone at pH 3.0 is also found to result in the release of nucleosomal core histones possibly enriched in hyperacetylated species. It is proposed that while H1 histone is not involved in the organization of transcriptionally active regions at the level of primary nucleosome fibre it may play an essential role in their organization at higher levels of chromatin packaging in nuclei participating in the stabilization of interactions between modified species of histones and DNA.

1. Sluzzer M. The H1 histones.—Trends Biochem. Sci., 1977, 2, N 1, p. 202-204.
2. Cooper J., Palmer R. D., Spaulding S. W. Effect of thyrotropin on P³² labelled histone H1 and H3 in specific population of nucleosomes in thyroid gland.—Nucl. Acids Res., 1981, 9, N 16, p. 3389-3401.
3. Wilkinson D. J., Shiude B., Hohmann Ph. Cell specific phosphorylation of H1 histone subtypes among different Chinese hamster cell lines in interphase.—J. Biol. Chem., 1982, 257, № 5, p. 1427-1452.
4. Binding of benz(a)pyren to histones and altered affinity of histone H1 for DNA / J. C. Jenson, J. Fitzgibbon, L. Brennan, G. W. Litman.—Biochemistry, 1982, 21, N 1, p. 601-607.
5. Kozlov Ju. V., Georgiev G. P. Stepwise removal of protein from DNA complex and depression of the genome.—Nature, 1970, 228, N 5266, p. 245-247.
6. Spelsberg T. L., Hnilica L. S. Proteins of chromatin in template restriction.—Biochim. et biophys. acta, 1971, 228, N 1, p. 212-218.
7. Chromatin as a template for RNA synthesis in vitro / Y. Groner, G. Monroy, M. Jaculet, G. Hurwitz.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, 72, N 1, p. 194-199.
8. Cedar H., Solange A., Zurucki F. Control of RNA synthesis by chromatin proteins.—Nucl. Acids Res., 1976, 3, N 7, p. 1659-1670.
9. Properties of transcriptionally active chromatin / G. D. Birnic, J. Paul, E. J. Moliner, R. S. Gilmour.—Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1978, 42, p. 597-603.

10. *Weintraub H., Groudine M.* Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation.— *Science*, 1976, **193**, N 4256, p. 848-856.
11. *Levy W. B.* Effects of nuclear disruption on the macromolecular composition of nucleosome subfractions.— *Nucl. Acids Res.*, 1979, **7**, N 8, p. 2239-2254.
12. *Weisbroad S., Weintraub H.* Isolation of subclass of nuclear proteins responsible for conferring a DNase I sensitive structure of globin chromatin.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**, N 2, p. 630-634.
13. *Hymmer W. C., Kuff P. C.* Isolation of nuclei from mammalian tissues through the use of Triton X-100.— *J. Histochem. and Cytochem.*, 1964, **12**, N 2, p. 359-363.
14. *Спириин А. С.* Спектрофотометрическое определение содержания суммарных нуклеиновых кислот.— *Биохимия*, 1961, **26**, № 1, с. 61—69.
15. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.— *Nature*, 1970, **227**, N 5254, p. 680-685.
16. *Panyim S., Chalkley R.* High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1969, **130**, N 1, p. 337-346.
17. *Cole R. D., Lawson G. M., Hsiang M. W.* H1 histone and condensation of chromatin and DNA.— *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1978, **42**, p. 253-263.
18. *Protein measurement with the Folin phenol reagent / D. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall.*— *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, N 1, p. 265-275.
19. *Levy W. B., Dixon G. H.* Partial purification of transcriptionally active nucleosomes from trout testis cells.— *Nucl. Acids Res.*, 1978, **5**, N 11, p. 4155-4163.
20. *Lentansky K.* Nuclear proteins in genetically active and inactive parts of chromatin.— *FEBS Lett.*, 1978, **89**, N 1, p. 93-97.
21. *The effects of salt concentration and H1 depletion on the digestion of calf thymus chromatin by micrococcal nuclease / W. O. Weisheit, J. I. Allen, G. Reidel, K. Van Holde.*— *Nucl. Acids Res.*, 1979, **6**, N 5, p. 1843-1862.
22. *Azarin F., Yumca R.* Structural organization of calf thymus chromatin depleted of histone H1 by acidic treatment.— *FEBS Lett.*, 1981, **139**, N 1, p. 67-71.
23. *Davie J. R., Candido E. P.* DNase I sensitive chromatin is enriched in the acetylated species of histone H4.— *FEBS Lett.*, 1980, **110**, N 1, p. 164-168.
24. *Weisbroad S. T.* Properties of active nucleosomes as revealed by HMG 14 and 17 chromatography.— *Nucl. Acids Res.*, 1982, **10**, N 6, p. 2017-2042.
25. *Repeating oligonucleosomal units. A new element of chromatin structure / A. V. Itkes, B. O. Glotov, L. G. Nikolaev, S. R. Preem.*— *Nucl. Acids Res.*, 1980, **8**, N 3, p. 507-527.
26. *Oakley B. R., Kirsh D. R., Norris N. R.* A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels.— *Analyt. Biochem.*, 1980, **105**, N 2, p. 361—363.
27. *Лучник А. Н., Бакаев В. В., Югай А. А.* Гиперчувствительность к ДНКазе I упруго напряженной ДНК в составе транскрипционно активных минихромосом вируса SV-40.— *Докл. АН СССР*, 1984, **274**, № 3, с. 754—757.

Ин-т биологии развития им. Н. К. Кольцова,
Москва

Получено 17.07.84