

Химические подходы к изучению надмолекулярных биологических структур на примере хроматина

Д.Г.Кнорре, Н.Д.Кобец

Новосибирский институт биоорганической химии

Сибирского отделения Российской академии наук

630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8, факс (383) 234–3677

Рассмотрены химические подходы к изучению структуры хроматина и некоторые аспекты его функционирования. Основное внимание уделено химическим подходам (в первую очередь с использованием метода «ковалентной сшивки нулевой длины») к изучению структуры комплексов гистонов в составе нуклеосом, взаимодействию гистонов и некоторых других белков с хромосомной ДНК. Обсуждены изменения в структуре нуклеосом в ходе транскрипции хроматина. Рассмотрены и проанализированы также полученные в последние годы данные по модификации ДНК и некоторых белков в составе хроматина с помощью реакционноспособных производных олигонуклеотидов.

Библиография — 89 ссылок.

Оглавление

I. Введение	365
II. Исследование межгистоновых контактов в хроматине	366
III. Исследование контактов ДНК с гистонами. Метод «ковалентной сшивки нулевой длины»	367
IV. Исследование функционально активного хроматина	369
V. Исследование хроматина с помощью реакционноспособных производных олигонуклеотидов	370
VI. Заключение	373

I. Введение

Хроматин — одна из наиболее сложных надмолекулярных структур эукариотических клеток — отвечает за хранение, умножение, репарацию и экспрессию генетической информации.¹ Структура хроматина содержит огромное число составляющих компонентов и отличается высокой динамичностью, связанной с кардинальными изменениями происходящими как в процессе клеточного цикла, так и в результате ответа на поступающие к клетке сигналы (митогенные и многие другие). Эукариотическое ядро содержит несколько молекул двунитевой ДНК, распределенной по отдельным хромосомам. Гаплоидный геном человека состоит из $3 \cdot 10^9$ пар нуклеотидов (п.н.). Если считать, что вся эта ДНК находится в В-форме, у которой один виток (10 п.н.) имеет длину 3.4 нм, то общая длина ДНК составляет ~ 1 м, т.е. на весь набор 23 пар хромосом приходится ~ 2 м. Эта ДНК упакована в ядре диаметром ~ 20 мкм. Таким образом, степень компактизации должна составлять примерно пять порядков. В процессе функционирования (при репликации,

транскрипции, репарации, рекомбинации, формировании митотических хромосом) сама ДНК подвергается существенным топологическим перестройкам, и спектр взаимодействующих с ней белков радикально меняется.

Структуру и функцию хроматина на молекулярном уровне практически невозможно исследовать с помощью одних физических методов. Не только целый хроматин, но даже хроматиновые домены, как правило, слишком велики, чтобы их можно было закристаллизовать для рентгеноструктурного анализа, исследовать с помощью спектроскопии ЯМР или обчислить структуру ДНК с помощью молекулярной динамики. Поэтому наиболее удобными для исследования структуры хроматина представляются химические методы. Чтобы получить информацию о структурных перестройках, происходящих в ядре при его функционировании, наиболее перспективным кажется использование метода аффинной модификации хроматина. В первую очередь это касается фотомодификации, позволяющей специфически модифицировать определенные участки хроматина за очень короткое время. Последнее обстоятельство открывает возможность исследовать события, происходящие с компонентами хроматина в процессе его функционирования.

Хроматин представляет собой нуклеопротеидный комплекс ДНК с ядерными белками (с основными белками — гистонами — и некоторыми негистоновыми белками, в том числе с наиболее изученными белками HMG, рассматриваемыми в этом обзоре). Следует отметить, что нуклеопротеидный комплекс, о котором собственно и идет речь, в процессе своего функционирования взаимодействует с большим набором белков, участвующих в матричном синтезе, с белками ядерного матрикса (структурой ядра, которая остается после освобождения его от центрального нуклеопротенда) и др. Их

Д.Г.Кнорре. Академик, профессор, заведующий лабораторией исследования модификации биополимеров НИБХ СО РАН.
Телефон: (383)236–0632, e-mail: knorre@niboch.nsk.ru
Область научных интересов: биоорганическая химия и молекулярная биология белков, нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов.
Н.Д.Кобец. Кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот.
Область научных интересов: молекулярная биология нуклеопротеидов.

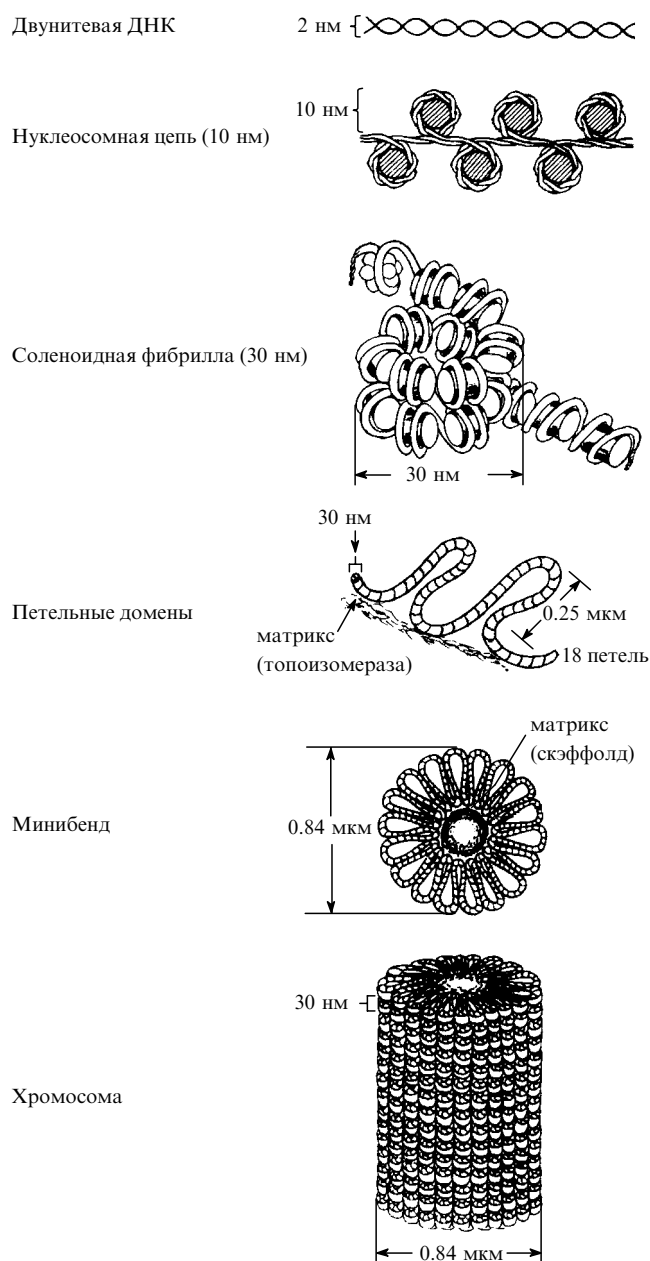


Рис. 1. Схема уровней организации хроматина.⁵

можно рассматривать как белки, ассоциированные с хроматином.¹

Первым уровнем организации хроматина является нуклеосомная фибрилла, имеющая диаметр ~ 10 нм (рис. 1). Она представляет собой нить ДНК, накрученную с определенной периодичностью на комплекс из четырех пар гистонов (октамер), обозначаемых как H2A, H2B, H3 и H4. Эти дискретные, повторяющиеся единицы получают при мягкой обработке ядер или выделенного хроматина нуклеазой микрококков. Полная нуклеосома содержит ДНК длиной до 200 п.н. При этом коровая частица (от английского core — сердцевина) состоит из ДНК длиной 145–146 п.н., образующей 1.75 витка левой суперспирали, связанной с гистоновым октамером. Остальная же часть нуклеосомы рассматривается как линкерная. Структура коровой нуклеосомы изучена с помощью рентгеноструктурного анализа с разрешением $7 \text{ \AA}$.² Линкерный участок ДНК переменной длины связан с гистонem H1. Этот гистон, по-видимому, играет важную роль в формировании следующего уровня

организации хроматина — упаковки нуклеосомной цепи в соленоид (фибриллу, содержащую 6 нуклеосом на 1 виток и имеющую диаметр 30 нм). Хроматин эритроцитов птиц, рептилий, амфибий и рыб помимо гистона H1 содержит линкерный гистон H5. При удалении из ядер всех гистонов (концентрированным раствором хлористого натрия в сочетании с детергентами) ДНК остается связанной с ядерным матриксом, образуя суперспирализованные петли.³ На основании этих результатов сделан вывод, что ДНК в определенных точках прикреплена к белковому остову ядра — ядерному матриксу. При обработке метафазных хромосом 2M NaCl или ионным детергентом с помощью электронной микроскопии показано, что ДНК также образует петельные домены, закрепленные на белках остова хромосомы — «скэффолда».⁴ Таким образом, фибрилла диаметром 30 нм формирует домены в виде 18 радиальных петель в среднем по 60000 п.н. на петлю, которые закреплены на ядерном матриксе. Плотные уложенные стопки этих розеток формируют следующий уровень организации — хроматиду⁵ (см. рис. 1).

Химические подходы к изучению структуры нуклеосом были использованы для решения трех главных вопросов: для установления структуры гистоновых комплексов, установления областей контакта ДНК с гистонами и для изучения перестройки хроматина, связанной с переходом генов в активное или неактивное состояние.

II. Исследование межгистоновых контактов в хроматине

Взаимное расположение гистонов в октамере исследовали в основном методом сшивок с использованием бифункциональных реагентов. Диметилсуберимидат — бифункциональный реагент с достаточно большим «радиусом действия» (10–20 Å) — сшивает практически все гистоновые пары в составе нуклеосомы. Это подтверждает концепцию, согласно которой основой нуклеосомы является гистоновый октамер.^{6–8} С помощью диметилсуберимидата удалось установить контакты Lys74(H2A)–Lys24 и Lys27(H2B), Lys85(H2B)–Lys115(H3) и Lys77(H4), Lys85(H2B)–Lys91(H4).^{9–11} Однако этот специфичный по отношению к лизиновым остаткам реагент из-за слишком большого радиуса действия не позволяет получать информацию о взаимном расположении гистонов в коре. Более информативными в этом отношении оказались эксперименты по химическому сшиванию нуклеосом тетранитрометаном, формальдегидом и с помощью ультрафиолетового облучения.^{9,12–14} Наиболее сильные контакты были обнаружены между гистонами H2A–H2B, H2B–H4 и H3–H3. При облучении нуклеосом ультрафиолетовым светом удается обнаружить контакты гистона H2A (Pro26) с гистонem H2B (Tyr37, Tyr40, Tyr42).¹⁵ Гистоны H4 и H2B сшиваются тетранитрометаном, формальдегидом и облучением ультрафиолетовым светом. При этом наиболее сильные контакты выявляются в С-концевой части гистона H2B и N-концевой части гистона H4. На основании этих результатов был сделан вывод, что гистон H2B имеет два домена, взаимодействующих с другими гистонами. Один домен, находящийся в С-концевой области, взаимодействует с гистонem H4, другой, расположенный в центральной области, взаимодействует с гистонem H2A.⁹ Анализируя многочисленные данные по бифункциональным сшивкам гистонов реагентами разной длины, следует отметить, что ни в одном случае, даже при использовании «длинных» сшивающих реагентов, не было обнаружено контактов гистонов H4–H4. Это позволяет сделать заключение, что основную роль в образовании тетрамера (H3–H4)₂ играют контакты H3–H3. Использование карбодимидов в качестве сшивающих реагентов позволило определить наличие контактов гистонов H1 и H2A.^{16–18} Показано, что при сшивании гистонов в составе нуклеосомной цепи карбодимидом сегмент 74–106 гистона H1 нахо-

дится в контакте с сегментом 58–129 гистона H2A. Более того, в работах^{19–22} с помощью биофункциональных реагентов получены сшивки гистона H1 со всеми коровыми гистонами и особенно с гистонами H3. Это позволяет сделать заключение, что гистоны H3 и H2A расположены на входе–выходе ДНК из нуклеосомного ядра, что согласуется с нуклеосомной моделью, предложенной в работе²³.

III. Исследование контактов ДНК с гистонами. Метод «ковалентной сшивки нулевой длины»

В изучении тонкой организации нуклеосом химическими методами важную роль сыграл цикл работ Мирзабекова с соавт.^{23–31} В основе предложенного подхода лежит реакция метилирования ДНК. Результатом этой реакции является образование производных 7-метилгуанина и 3-метиладенина. Сравнительное изучение кинетики образования производных 7-метилгуанина и 3-метиладенина при метилировании свободной ДНК и ДНК в составе хроматина показало, что гистоны не влияют на алкилирование остатков аденина со стороны малой бороздки. В то же время скорость метилирования остатков гуанина со стороны большой бороздки ДНК в хроматине на 15% ниже по сравнению со скоростью метилирования свободной ДНК.^{27–29} Оценка длины фрагментов ДНК в хроматине, полученных расщеплением модифицированной молекулы по метилированным участкам, показала, что гистоны не экранируют от метилирования достаточно протяженные области ДНК в нуклеосомных цепях. Был сделан вывод, что гистоны на 15% экранируют большую бороздку ДНК в хроматине равномерно вдоль всей ее длины; при этом малая бороздка не экранирована. Об этом же свидетельствуют и данные по связыванию антибиотиков диэтилэкантамина А и нетропсина с малой бороздкой ДНК.³¹

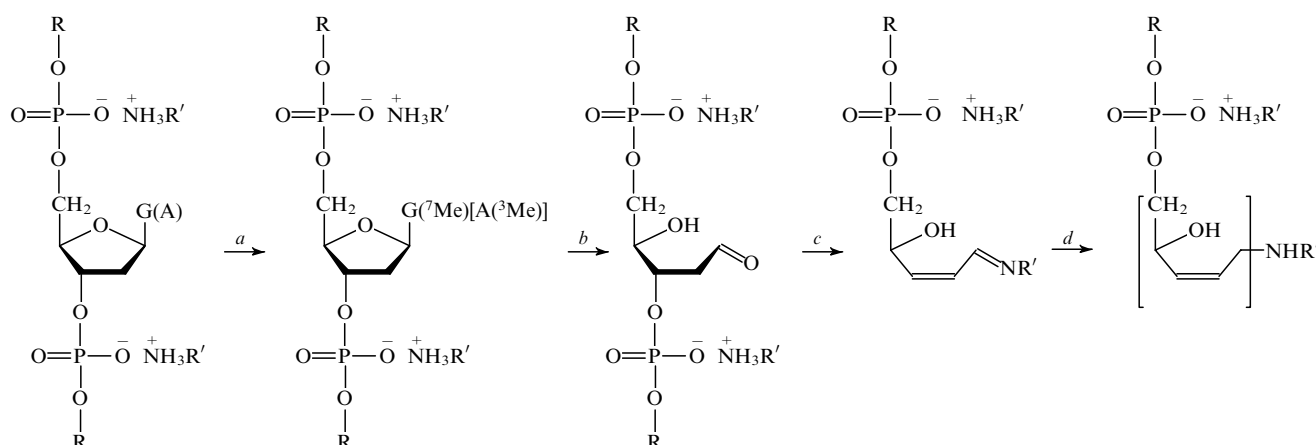
В основе метода определения ДНК–белковых контактов в хроматине лежит химическая сшивка определенных мономерных звеньев в молекуле ДНК с находящимися с ними в прямом контакте аминокислотными остатками гистонов. Эта сшивка (схема 1) достигается а) путем ослабления гликозидных связей дезоксирибозных фрагментов с пуриновыми основаниями за счет метилирования последних по положению 7 гуанина или по положению 3 аденина; б) расщеплением гликозидной связи по модифицированным остаткам с образованием фрагмента дезоксирибозы, содержащего альдегидную группу; в) образованием ковалентной связи частично депурированной ДНК с белком (в частности, оснований Шиффа с ε-аминогруппой соседнего лизино-

вого остатка гистона) с последующим расщеплением полинуклеотидной цепи в точке образования этих производных по реакции β-элиминирования и д) восстановлением образовавшейся ковалентной связи между гистонами и ДНК. Поскольку ковалентная связь образуется непосредственно между дезоксирибозным остатком нуклеотида и аминокислотным остатком гистона без какого-либо спейсера, авторы назвали этот метод сшивки методом «ковалентной сшивки нулевой длины».^{25, 30}

Стадию а — метилирование — проводят диметилсульфатом. Появление положительного заряда в фрагменте 7-метилгуанина или 3-метиладенина позволяет провести гидролиз гликозидных связей молекулы ДНК в точках, подвергшихся модификации, при нейтральных значениях pH и легком нагревании. Образующийся остаток дезоксирибозы представляет собой равновесную смесь открытой альдегидной и кольцевой полуацетальной форм. Взаимодействие альдегидной группы с аминами, расположенными рядом, приводит к ковалентному присоединению фрагмента ДНК к гистону с образованием основания Шиффа. При этом длина пришитого фрагмента ДНК равна расстоянию от его 5'-конца до точки присоединения. При низкой степени модификации ДНК, когда основная масса ДНК пришивается в одной точке, длина этого фрагмента позволяет установить положение точки контакта относительно конца нуклеосомной ДНК. В силу низкой устойчивости основания Шиффа последнее для проведения дальнейших манипуляций целесообразно вначале стабилизировать восстановлением боргидридом натрия или цианоборгидридом до соответствующего алкиламина. Если проводить восстановление иминогруппы после образования первичных сшивок, используя при этом NaBH₄, то число образующихся сшивок будет близким к числу остатков гистидина в молекуле белка, взаимодействующего с ДНК. В связи с этим такой подход иногда рассматривают как гистидиновый метод сшивки. Если же восстановление проводят одновременно с процессом сшивания и в качестве восстановителя применяют NaBH₃CN, то это благоприятствует сшивке молекулы ДНК по остаткам лизина в белке. Этот вариант сшивки называют поэтому лизининовым протоколом.³²

Дальнейшая задача состоит в том, чтобы определить длину образовавшихся фрагментов ДНК и природу гистона, связанного с каждым из них. С этой целью в описываемом цикле работ был применен метод двумерного диагонального электрофореза, который является вторым основополагающим элементом предложенного Мирзабековым и соавт.^{23–31} подхода. В первом направлении проводится электрофорез в полиакриламидном геле всего спитого

Схема 1



R — фрагмент ДНК; R' — фрагмент молекулы белка; а) Me₂SO₄; б) pH 6.8, 45°С; в) образование основания Шиффа; д) NaBH₄ или NaBH₃(CN).

материала в присутствии мочевины и додецилсульфата натрия (SDS) в денатурирующих условиях. При этом фрагменты ДНК, связанные с гистонами, разделяются одновременно и по длине фрагментов ДНК, и в соответствии с размером связанного с ними белка. Иными словами, нуклеопротеиды, содержащие полинуклеотидные фрагменты одинаковой длины, перемещаются с разной скоростью. Этот процесс идет тем медленнее, чем больше размер присоединенного гистона. Затем гель обрабатывают проназой — ферментом, полностью расщепляющим белки. После этого во втором, перпендикулярном направлении происходит фракционирование оставшихся фрагментов ДНК по их длине. В присутствии соответствующих маркеров это позволяет определить длину фрагментов. При этом одинаковые фрагменты, ранее связанные с разными гистонами, смещаются относительно друг друга вследствие их различного смещения при разделении в первом направлении. В результате каждая серия фрагментов ДНК разной длины, соответствующая сшивке с одним и тем же белком, находится на своей прямой линии, расположенной по диагонали. Фрагменты ДНК на этих диагоналях уже не содержат белка, и их можно рассматривать как «белковые тени». По положению диагонали определяют, к какому гистону относится каждый выявленный фрагмент определенной длины. В экспериментах чаще всего используют ДНК, в 5'-конец которой традиционным методом введена изотопная метка. Метод заключается в ферментативном фосфорилировании ДНК с помощью полинуклеотидкиназы — фермента, переносящего радиоактивный остаток [^{32}P]фосфата от [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]АТФ. Разделенные фрагменты определяют радиоавтографически. Детальное описание методики приведено в работе³³. Было показано, что на каждой из цепей ДНК точки контактов ДНК с гистонами расположены на расстояниях, кратных 10 п.н., что соответствует размеру одного витка двойной спирали. Это означает, что гистоновый октамер, на который накручена ДНК, взаимодействует с одной стороной двойной спирали. Противоположный участок должен в этом случае быть экранирован, что и проявляется в чувствительности каждого такого фрагмента к ферменту ДНКазе I.

Расположение гистонов на двух нитях коровой нуклеосомной ДНК, выявленное описанным методом, приведено на рис. 2.³⁴ Каждый гистон образует несколько контактов с ДНК, причем гистоны Н3 и Н4 принадлежат сердцевине коровой частицы, а гистоны Н2А и Н2В находятся ближе к краям нуклеосомного ко́ра. Кроме того, зарегистрированы контакты 3'-концевого участка коровой ДНК с гистонами Н3. Из рис. 2 видно, что гистоновые димеры Н2А–Н2В и гистоновый октамер (Н3–Н4)₂ на двуспиральной молекуле ДНК ко́ра располагаются относительно автономно. Это согласуется с ведущей ролью таких специфических комплексов при сборке нуклеосомы.³⁵ (Предполагается, что нуклео-

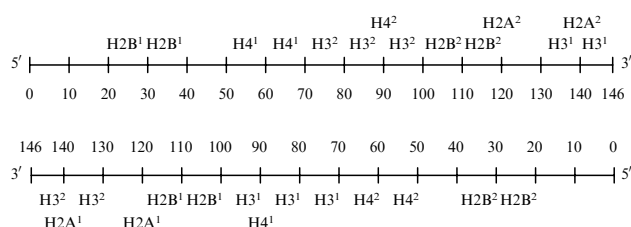


Рис. 2. Симметричная модель расположения гистонов на двух нитях ДНК в составе коровой нуклеосомной частицы. Числа от 0 до 146 определяют расстояние (число нуклеотидных остатков) от 5'-конца ДНК. Каждая из двух копий гистона в одной коровой частице обозначена верхним индексом 1 или 2. Гистоны выстроены вдоль одной нити ДНК в следующем порядке: Н2В_{25,35}–Н4_{55,65}–Н3_{75,85}/Н4₈₈–НВ_{105,115}–Н2А₁₁₈–Н3_{135,145}/Н2А₁₄₅.^{23,26}

сомы собираются при репликации хроматина путем присоединения октамера (Н3–Н4)₂ к ДНК, формируя первичную нестабильную нуклеопротеидную частицу, к которой затем присоединяется димер Н2А–Н2В, стабилизируя нуклеосому.)

Таким образом, получена полная картина контактов каждого из четырех гистонов с молекулой ДНК в составе нуклеосомного ко́ра. Главные структурные элементы нуклеосом, выявленные при таком подходе, в основном идентичны как в составе изолированных нуклеосом, так и в составе интактного хроматина. Сходство первичной организации нуклеосом, выделенных из различных источников, подтверждает консервативность их структуры.^{24,25,36}

Еще в работе Георгиева с соавт.³⁷ была продемонстрирована решающая роль гистона Н1 в конденсации хроматина и в поддержании следующего иерархического уровня организации хроматина — 30-нонаметровой фибриллы. С помощью метода ковалентного связывания нулевой длины на примере хроматина эмбрионов дрозофилы одновременно было установлено расположение на ДНК гистона Н1 и коровых гистонов.^{38,39} Известно, что линкерный гистон Н1/Н5 состоит из трех структурно и функционально различных доменов: центрального глобулярного домена, наиболее эволюционно консервативного, относительно короткого N-концевого домена и высоко основного длинного С-концевого домена (концевые домены являются наиболее изменяемыми частями гистона).^{40,41} Сшивка показала, что гистон Н1 контактирует с концами коровой ДНК. Было установлено, что консервативная глобулярная часть молекулы Н1 взаимодействует с концами нуклеосомной ДНК, а неструктурированные N- и С-концевые участки гистона Н1 взаимодействуют с наружными участками нуклеосомной ДНК. Это позволило предположить, что молекула гистона Н1 является мостиком, связывающим две соседние нуклеосомы, при упаковке нуклеосомной цепи в 30-нонаметровую фибриллу.²⁶

Многие полициклические молекулы с жесткой планарной структурой обладают способностью к интеркаляции, т.е. способностью встраиваться между смежными, расположенными стопкой, парами оснований двойной спирали ДНК. Такие интеркаляторы как акридин преимущественно связываются с линкерным участком ДНК.⁴² Для выявления контактов линкерной ДНК в работе⁴³ было предложено использовать фотоаффинный реагент на основе акридина — AcrNH(CH₂)₃N(COC₆H₄N₃-p)(CH₂)₃NHAc, где Acr — остаток акридина. Облучение комплекса этого реагента с полной нуклеосомой приводит к фотоаффинной модификации в основном белков Н1, Н2А и Н3. Это согласуется с данными по связыванию гистона Н1 с линкерной ДНК и расположением остальных двух гистонов по краям ДНК нуклеосомного ко́ра (см. рис. 2).

В своем первоначальном виде метод ковалентной сшивки нулевой длины дает сведения лишь о том, какой нуклеотидный остаток участвует во взаимодействии с тем или иным гистонами. Однако на примере взаимодействия хромосомной ДНК с гистонами Н5⁴⁴ и Н4^{45,46} продемонстрирована методология определения участвующих в сшивке аминокислотных остатков. С этой целью после проведения сшивки продукт обрабатывали нуклеазами или 66%-ной НСООН с добавлением 2% дифениламина, затем в оставшийся связанный с белком короткий олиго- или динуклеотидный фрагмент вводили метку ^{32}P с помощью полинуклеотидкиназы. После этого проводили определение меченых фрагментов традиционными методами пептидной химии. Было продемонстрировано, что в гистоне Н5 модификации подвергаются в основном остатки гистидина His25 и His62, расположенные в глобулярной части гистона, и N-концевая аминокислота остатка треонина Thr1. В гистоне Н4 сшивка наблюдалась в основном с остатком His18 в составе центрального глобулярного домена.⁴⁶

IV. Исследование функционально активного хроматина

Важным вопросом в исследовании хроматина является установление механизма перестройки, происходящей при его переходе в функционально активное состояние, прежде всего в результате включения в процесс транскрипции. Для идентификации нуклеосом, имеющих отношение к регуляторным и транскрибируемым участкам, эксперименты с применением метода диагонального электрофореза проводятся с использованием немеченой ДНК. Затем образовавшиеся «белковые тени» гибридизуют с зондами, меченными ^{32}P и соответствующими исследуемым участкам. Наиболее детально исследованы гены теплового шока дрожжи, в культуре клеток которой можно нагреванием до температуры 37°C включить транскрипцию белков теплового шока (heat shock proteins, hsp). Это позволяет проводить параллельные эксперименты с активным (транскрибируемым) и неактивным хроматином.^{32, 47–49}

Первые исследования такого рода были проведены с использованием метода ковалентного связывания нулевой длины. Применялись как гистидиновый метод сшивки, так и лизиновый протокол. Результаты оказались неидентичными. При использовании гистидинового метода, когда сшивание ДНК с гистонами в основном реализуется на уровне центрального глобулярного белкового домена, в промоторном, структурном и 3'-фланкирующем участках генов дрожжи, активируемых тепловым шоком, в процессе усиления транскрипции вначале происходит уменьшение содержания коровых гистонов и полное удаление линкерного гистона H1, а в итоге — полное удаление гистонов.⁴⁷ При использовании лизинового протокола, когда реализуются сшивки с гистонами в пределах их концевых доменов, существенного различия в сшивках между активным и неактивным хроматином не наблюдается. Сделан вывод, что при активации транскрипции не происходит полного удаления гистонов с транскрипционно-активного участка хроматина, за исключением промоторной области. (В промоторной области контакты гистонов с ДНК практически отсутствуют: по крайней мере, участки промоторной зоны длиной до 200 п.н. свободны от гистонов.) В процессе усиления транскрипции вначале происходит ослабление контактов с ДНК центральных глобулярных доменов гистонов с сохранением контактов с ДНК N- и C-концевых фрагментов гистонов.³² Таким образом, при переходе от неактивного к транскрипционно-активному хроматину происходит разрыхление или разворачивание структуры нуклеосомы, т.е. имеют место существенные структурные перестройки.

Позднее с этой же целью для сшивания ДНК с белками было использовано УФ-облучение целых клеток. Для гибридизации с «белковыми тенями» применяли ДНК-зонды, представляющие собой промоторный фрагмент ДНК гена теплового шока (hsp-70), участок длиной 900 п.н., входящий в состав транскрибируемой единицы гена hsp-70, и нетранскрибируемый фрагмент рибосомной ДНК. Показано, что даже в условиях интенсивной транскрипции существуют контакты гистона H1 с ДНК. Исключение составляет промоторная область, где контакты ДНК–гистон H1 обнаружены не были. В то же время в случае активного хроматина зарегистрировано взаимодействие промоторного участка с двумя дополнительными белками с молекулярными массами 50 и 100 кДа. По всей видимости, эти белки относятся к факторам, участвующим в регуляции транскрипции. При этом второй из них (100 кДа) связывается в основном с кодирующей нитью, а первый — с комплементарной к ней некодирующей.⁴⁹ Отметим, что сшивка промотора с этими двумя белками наблюдается только в случае активации гена теплового шока и отсутствует в неактивном гене. Показано,⁵⁰ что набор гистонов, модифицированных с помощью азидо-арилбисакридинилспермидина, сшивающихся с активной

фракцией хроматина, которая предпочтительно расщепляется нуклеазами, отличается от суммарного препарата хроматина. В активной фракции хроматина мечению подвергается лишь гистон H1, а гистоны H2A и H3 недоступны для фотоактивного мечения. Это, по всей видимости, подтверждает вывод, что в активной фракции хроматина ДНК менее тесно связана с гистоновым кором, и активный хроматин имеет более рыхлую структуру.

Из негистоновых белков хроматина наиболее хорошо изучены белки HMG (белки с высокой электрофоретической подвижностью). Белки HMG14 и HMG17 (молекулярные массы 10000 и 9247) охарактеризованы как белки транскрипционно-активного хроматина.⁵¹ Известно, что они связываются с нуклеосомами, причем их связывание с нуклеосомами из активного хроматина существенно прочнее. В работе⁵² коровые нуклеосомы и нуклеосомы, содержащие гистон H1, выделяли из хроматина эритроцитов цыпленка, реконструировали их с белками HMG14/17 и проводили ковалентную сшивку белков с ДНК. Анализ сшитого материала диагональным гель-электрофорезом показал, что связывание белков HMG14/17 с нуклеосомами не влияет на распределение гистонов вдоль цепи ДНК ни в составе коровой частицы, ни в составе полной нуклеосомы. Основные точки контакта этих белков с ДНК расположены на расстоянии 25 и 115 нуклеотидов от 5'-конца коровой частицы. В этом же концевом фрагменте коровой ДНК сосредоточены контакты коровых гистонов H2A, H2B и H3 (см. рис. 2). Это коррелирует с данными по сшивкам белков HMG14/17 с коровыми гистонами бифункциональным реагентом — 2-иминотиолоном, — специфичным по отношению к лизиновым остаткам.⁵³ Фотоактивируемый реагент — *N*-гидроксисукцинимидный эфир 3-[(4-азидофенил)дитио]пропионовой кислоты (SADP) сшивал HMG-белки с центральной частью гистона H3.⁵⁴ Авторы работы⁵⁴ использовали белки, выделенные из суспензии клеток крови цыпленка. В эти белки вводили радиоактивную метку путем восстановительного алкилирования $^{14}\text{C}[\text{H}_2\text{CO}]$ и дериватизовали белки с помощью SADP. Ацилирование по остаткам лизина превращало индивидуальные белки HMG14 и HMG17 в фотоактивные аналоги, имеющие на нескольких аминокислотных лизинах фрагмент $\text{N}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SS}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})$. При УФ-облучении в комплексе с нуклеосомами образующийся из азидогруппы нитрен ковалентно связывается с одним из соседних белков. После отделения сшитых белков дисульфидный мостик может быть разрушен реакцией дисульфидного обмена с меркаптоэтанолом. Это облегчает идентификацию гистонов, связывавшихся с HMG-белками. Более длинный реагент — *N*-гидроксисукцинимидный эфир 3-[(1-(2-нитро-4-азидофенил)-2-аминоэтил)дитио]пропионовой кислоты (SNAP) предпочтительно сшивает белки HMG14/17 с гистоном H2A.⁵⁵ По всей видимости, молекулы SNAP и SADP вследствие различия в геометрии и размерах взаимодействуют своими гидрофобными и фотореакционными концами с различными группами поверхности гистонного ко́ра, где гистоны H2A и H3 располагаются близко друг к другу. Полученные результаты показали, что область белков HMG, сшиваемая с гистоном H3, располагается в непосредственной близости к Cys110 гистона H3 на поверхности нуклеосомы. Остаток Cys110 находится в открытом состоянии в конформации, характерной для транскрипционно-активного хроматина.⁵⁶ Это позволяет заключить, что белки HMG14/17, связываясь с нуклеосомой, могут закреплять эту конформацию.

В экспериментах на ядрах из асцитных клеток Эрлиха, фиксированных формальдегидом и подвергнутых ДНК–белковой сшивке, исследовали распределение гистонов на вновь синтезированной цепи ДНК. Последнюю получали в присутствии 5-бромдезоксисуридин-5'-трифосфата, поэтому она содержала остатки 5-бромдезоксисуридина и могла быть выявлена и исследована с помощью поликло-

нальных антител к 5-бромдезоксигуанидину. Было показано, что вновь синтезированный хроматин имеет такую же стехиометрию гистонов, как и основной. Гистон H1 связывается с дочерней цепью ДНК одновременно или сразу же после связывания коровых гистонов, хотя это связывание с вновь синтезированной ДНК несколько слабее, чем в основном хроматине.⁵⁷

В связывании факторов транскрипции с нуклеосомами важную роль играют специальные белки — нуклеоплазмин или его дрожжевой аналог, белок NAP-1 (nucleosome assembly protein). Они способствуют образованию тройного комплекса фактора транскрипции — нуклеоплазмина или NAP-1. Химический подход, основанный на сшивке белков гистонного октамера диметилсуберимидатом, позволил подтвердить, что механизм действия этих белков включает первоначальное освобождение от димера H2A–H2B, после чего происходит освобождение от оставшегося тетрамера гистонов (H3–H4)₂. Эта работа была выполнена с использованием дрожжевого фактора-активатора GAL4-АН, который связывается с определенной последовательностью ДНК, предшествующей гену *lacZ*. Для его исследования была создана специальная конструкция, содержащая фрагмент ДНК со 153 п.н. и сайт связывания GAL4 на расстоянии в 35 п.н. от одного из концов нуклеосомного кода. Оказалось, что стимулирующее действие нуклеоплазмина или белка NAP-1 (в норме они стимулируют связывание фактора GAL4-АН с нативными нуклеосомами) при использовании нуклеосом с гистоновыми октамерами, предварительно сшитыми диметилсуберимидатом, не проявляется. В то же время, если нуклеосомы реконструированы из предварительно сшитого комплекса H2A–H2B с последующим введением остальных коровых гистонов, то функции нуклеоплазмина и NAP-1 не нарушаются. Таким образом, оказывается проблематичной возможность раздельного удаления первой пары гистонов H2A–H2B от остальной его части.⁵⁸ Возможно, это не полное освобождение, а лишь существенное разрыхление связей.

Картирование ДНК–белковых контактов вдоль определенных последовательностей ДНК было выполнено на модели рибосомных генов. Эта модель весьма удобна для решения вопроса о связи регуляции активности гена со структурными перестройками в хроматине.^{59, 60} Гены рибосомной РНК содержатся в клетках дрозофилы в виде 250 копий и организованы в tandemные повторы, в которых единицы транскрипции разделены спейсерами, содержащими повторяющиеся последовательности длиной 239 нуклеотидов, фланкированные сайтами узнавания AluI-рестриктазой. Ферменты рестрикции (рестриктазы) катализируют расщепление ДНК по строго определенным для каждого типа рестриктазы тетра- или гексануклеотидным последовательностям. Эти повторяющиеся последовательности гомологичны промоторным участкам рибосомных генов и играют существенную роль в их транскрипции. При использовании УФ-индуцируемых сшивок и метода гибридизации с «белковыми тенями» были обнаружены два белка с молекулярными массами 50 и 70 кДа, ассоциированными с Alu-повтором.

V. Исследование хроматина с помощью реакционноспособных производных олигонуклеотидов

Исследование аффинной модификации хроматина производными олигонуклеотидов представляет интерес в качестве подхода к изучению строения этого важнейшего вида комплексов ДНК–белок, а также в связи с созданием методов направленного воздействия на определенные гены и мРНК с помощью комплементарных олигонуклеотидов с целью модуляции их экспрессии и осуществления направленного мутагенеза. Этот подход, на примере реакционноспособных

производных олигонуклеотидов был первоначально предложен Гриневой и соавт.⁶¹ для того, чтобы с помощью комплементарного олигонуклеотида направить (адресовать) привязанную химически активную группу на определенный участок нуклеиновой кислоты-мишени. Поэтому первоначально метод получил название комплементарно-адресованная модификация. В настоящее время методы, основанные на воздействии на определенные смысловые участки нуклеиновой кислоты-мишени специфическими олигонуклеотидами, их производными и аналогами, фигурируют в литературе как антисмысловой (антисенс) подход. Этот подход становится эффективным инструментом молекулярно-биологических исследований, а сами соединения рассматриваются как потенциальные лекарственные препараты, в первую очередь как противовирусные и противоопухолевые, действующие на генетические структуры.^{62, 63}

В большинстве случаев антисенс-олигонуклеотиды используются для связывания с одноцепочечными РНК (матричными или вирусными). Возможность воздействовать на ДНК, подавляя действие онкогенов или интегрированных вирусных геномов, существенно увеличила бы перспективность их использования. Поэтому ДНК является привлекательным объектом для применения таких олигонуклеотидных производных.

В связи с этим большие усилия направлены на конструирование олигонуклеотидов, способных к подавлению функции ДНК за счет образования трехнитивных комплексов.⁶³ Однако возможен и альтернативный подход — действие олигонуклеотидных производных на существующие в хроматине расплетенные участки ДНК.

ДНК клеток эукариот в составе хроматина не является строго двуспиральной по всей ее длине. В процессе функционирования клетки (например, в ходе репликации или транскрипции) некоторые участки ДНК могут быть временно расплетенными. В ДНК сложноорганизованных ядерных структур могут появляться одноцепочечные участки, способные взаимодействовать с олигонуклеотидными производными. Такие одноцепочечные участки молекулы ДНК могут возникать либо в результате взаимодействия со специфическими белками, способными расплести двойную спираль, либо в результате наличия в ДНК суперспирализованных доменов. В цикле работ, выполненных в Новосибирском институте биоорганической химии СО РАН и рассмотренных ниже, исследована возможность специфической по последовательности химической модификации ДНК в составе хроматина и интактных ядер с помощью комплементарно-адресованных реагентов.^{64–68}

Для исследования взаимодействия олигонуклеотидов с ДНК хроматина в качестве мишеней в молекуле ДНК выбраны повторяющиеся последовательности, которыми изобилует эукариотический геном, и существование которых является одним из фундаментальных отличий организации генома у высших эукариотических организмов.⁶⁹ В геноме человека имеются короткие (около 300 п.н.), перемежающиеся с уникальными участками повторы, внутри которых содержится участок, узнаваемый рестриктазой AluI.⁷⁰ Они называются Alu-повторами и составляют ~ 3% генома человека ($3 \cdot 10^5$ копий на геном). Левая и правая половины Alu-повтора имеют высокую степень гомологии и фланкированы олигонуклеотидами (до 20 нуклеотидов длиной) участками. Динуклеотидный повтор (dG-dT)_n, к которому комплементарен использованный в описываемом цикле работ олигонуклеотид p(dA-dC)₆, составляет ~ 0.5% генома эукариот. Относительно короткие (до 50 п.н.) участки этого повтора встречаются в эукариотическом геноме с частотой в среднем 1 на 30–100 тысяч пар оснований.^{71, 72} По многочисленным литературным данным (dG-dT)_n-повтор обнаружен в участках перехода В-конформации ДНК в Z-конформацию.^{73–75} При этом такой переход может провоцировать локальное расплетение ДНК в этих

участках хроматина и тем самым может сделать такие участки доступными для комплементарного взаимодействия с соответствующим производным олигонуклеотида, например, с $p(dT)_{16}$, $p(dA)_{16}$, $p(dA-dC)_6$, $pd(TTCTCCTGCCTCAGCCTCTT)$ (комплементарен наиболее консервативному участку семейства Alu-повторов).

На первом этапе исследований использовались производные олигонуклеотидов, в частности $p(dT)_{16}$, к 5'-концевым фосфатным группам которых фосфамидной связью присоединяли реакционноспособную алкилирующую группу — остаток 4-[(N-2-хлорэтил-N-метил)амино]бензиламина. Эксперименты проводили с хроматином, выделенным из клеток грызунов и человека, с метафазными хромосомами и интактными ядрами.

Исследование возможности специфического ковалентного присоединения к ДНК в составе растворимой фракции хроматина клеток плаценты человека производного олиготимидилата, комплементарного полиА-повторам ДНК, широко представленным в эукариотическом геноме, продемонстрировало, что алкилирующее производное модифицирует хроматин при комнатной температуре.⁶⁴ Немодифицированный $p(dT)_{16}$ существенно ингибирует модификацию. В то же время олигонуклеотиды, не комплементарные полиА-повторам, на модификацию не влияют. Это свидетельствует о специфичности взаимодействия. Предварительная обработка хроматина РНКазой А в условиях, обеспечивающих гидролиз полирибонаденилатных последовательностей, присутствующих в составе большинства производимых в хроматине матричных РНК, практически не влияет на уровень модификации тем же реагентом. Следовательно, наблюдаемая модификация относится именно к ДНК.

Показано, что реакционноспособные производные олигонуклеотидов способны специфически модифицировать ДНК как в составе хроматина, так и в составе наиболее плотноупакованных дезоксирибонуклеопротеидов — метафазных хромосом. В тех же условиях выделенная из ядер ДНК не подвергалась модификации.^{65, 76}

В случае модификации Alu-повтора специфичность модификации дополнительно подтверждена данными рестрикционного анализа. Выбранный для модификации олигонуклеотид был комплементарен одному из наиболее консервативных участков Alu-повтора, расположенному внутри фрагмента в 170 п.н., выщепляемого Sau3A-рестриктазой. После модификации хроматина клеток HeLa человека ДНК изолировали и расщепляли рестриктазой Sau3A. Полученные фрагменты разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле. На радиоавтографе геля радиоактивность, привносимая ковалентно присоединенным олигонуклеотидным производным, была обнаружена во фрагменте 170 п.н., тогда как в контрольном эксперименте с производным олигонуклеотида другой последовательности радиоактивность в этом фрагменте обнаружена не была.⁷⁷

Было показано, что предварительная обработка препаратов хроматина S1-нуклеазой, расщепляющей в мягких условиях одноцепочечные участки ДНК с сохранением общей морфологии препаратов, практически полностью подавляет модификацию хроматина производными олигонуклеотидов.^{76, 77} Это свидетельствует о том, что реакция олигонуклеотидных производных с ДНК протекает через стадию образования их комплементарных комплексов с расплетенными участками ДНК хроматина.

Исследование^{67, 68} взаимодействия алкилирующего производного олиготимидилата с хроматином из разных типов клеток (клеток регенерирующей печени крысы, в которых интенсивно идет репликация, и клеток эритроцитов цыпленка, в которых хроматин полностью репрессирован как в транскрипции, так и в репликации) позволило понять природу структурных особенностей ДНК в хроматине, приводящих к образованию зон локального расплетения, по

которым возможна специфическая реакция с олигонуклеотидными производными.

Регенерирующая печень крысы является классическим объектом изучения клеточных процессов в условиях интенсивной репликации. Через 22–24 ч после частичного удаления печени в оставшихся клетках печени наблюдается максимум репликации. Ядра из интактной и регенерирующей печени крысы обрабатывали алкилирующим производным $p(dT)_{16}$. Относительные степени модификации ДНК в обоих случаях оказались одинаковыми. Этот результат свидетельствует о том, что появление репликационных вилков не увеличивает в значительной степени доли полидезоксиденилатных участков, доступных для комплементарно адресованного реагента. Аналогичный результат получен при сравнении степени модификации ДНК по полидезоксиденилатным последовательностям в ядрах из несинхронизированных клеток и клеток, синхронизированных в S-фазе клеточного цикла, в которой идет наиболее интенсивный синтез ДНК.

При дифференциации эритробластов в эритроциты происходит ингибирование репликации и транскрипции. Полностью репрессированный как в транскрипции, так и в репликации хроматин из эритроцитов цыпленка модифицируется по поли(dA)-последовательностям с такой же эффективностью, что и хроматин из регенерирующей печени крысы. Это свидетельствует о том, что активация процессов репликации и транскрипции не увеличивает доступности поли(dA)-участков ДНК для комплементарно адресованной модификации.⁶⁸

Было показано, что наличие ядерной мембраны не препятствует проникновению олигонуклеотида. Степень модификации ДНК как в препарате интактных ядер, так и в составе «суспензионного» хроматина, полученного механическим разрушением ядерной мембраны, примерно одинакова. Логично предположить, что существование расплетенных участков ДНК, содержащих выбранные мишени, скорее всего, определяется уровнем суперспирализации ДНК и зависит от структурно-функциональных характеристик хроматина.

Известно, что растворимая фракция хроматина в буфере, не содержащем двухвалентных ионов металлов, представлена в основном развернутыми нуклеосомными цепями, в отличие от суспензионного хроматина и интактных ядер. Степень модификации ДНК в составе растворимой фракции хроматина оказалась на порядок ниже, чем степень модификации ДНК в составе суспензионного хроматина и интактных ядер.⁷⁶ Это, скорее всего, связано с наличием в составе суспензионного хроматина и ядер петлеобразных структур, образованных дезоксирибонуклеопротеидными фибриллами, закрепленными на ядерном матриксе (это приводит к повышению уровня суперспирализации ДНК), а также с присутствием различных негистоновых белков.

О роли суперспирализации ДНК в процессе адресованного алкилирования хроматина говорят и исследования зависимости относительной степени модификации ДНК в составе интактных ядер от ионной силы раствора. Повышение концентрации NaCl до 0.15–0.2 М приводит к понижению степени модификации ДНК.⁶⁷ В этой области концентраций в клетке наблюдается максимальная активность эндогенной топоизомеразы I — фермента, способствующего релаксации суперспиральной конформации ДНК.

Для исследования влияния изменения структуры хроматина за счет удаления из него определенных групп белков на степень доступности ДНК для аффинной модификации были проведены эксперименты с дезоксирибонуклеопротеидами ДНП-0.35, ДНП-0.6 и ДНП-2.0, полученными из хроматина обработкой последнего соответственно 0.35, 0.6 и 2.0 М растворами NaCl.

Известно, что при обработке хроматина 0.35 М раствором NaCl удается отделить от него фракцию негистоновых

белков, содержащую НМГ-белки. Удаление этой группы белков из хроматина клеток HeLa уменьшает относительную степень модификации поли(dA)- и (dG-dT)_n-участков ДНК адресованными реагентами.

Обработка хроматина 0.6 М раствором NaCl приводит к удалению гистона H1 наряду с рядом негистоновых белков. При этом степень модификации несколько увеличивается. Возможно, это происходит за счет того, что удаление гистона H1, связывающегося с линкерными участками ДНК хроматина, освобождает их. А именно они потенциально более доступны для комплементарно адресованной модификации хлоралкильными производным. При обработке хроматина 2 М раствором NaCl вместе с основной массой негистоновых белков удаляются и все гистоны. При этом относительная степень модификации поли(dA)- и (dG-dT)_n-участков ДНК снижается, но остается существенно выше по сравнению с изолированной ДНК. Полученные при такой обработке хроматина ДНП-2.0 представляют собой структуру, выявляемую на электронно-микроскопических препаратах как фибриллы ДНК, закрепленные в виде петель на ядерном матриксе. Результаты, полученные нами, по всей видимости, свидетельствуют о существовании доступных для модификации участков ДНК, обогащенных поли(dA)- и (dG-dT)_n-повторами специфических хроматиновых белков, сохраняющихся в структуре хроматина при его обработке 0.6 М NaCl, но полностью исчезающих при обработке 2 М NaCl.

Из всех использованных алкилирующих производных олигонуклеотидов наибольшую эффективность для модификации ДНК в составе интактных ядер продемонстрировал олигонуклеотид, содержащий на 3'-конце остаток холестерина (на порядок выше по сравнению с таким же производным олигонуклеотида, не содержащим холестерина остатка).⁷⁸

В дальнейшем было показано, что при образовании специфических комплексов с ДНК в составе хроматина алкилирующие производные олигонуклеотидов модифицируют не только ДНК, но и некоторые белки, расположенные, по-видимому, в зоне контакта с рассматриваемой «мишенью» ДНК.^{76, 77, 79}

Несмотря на интенсивное исследование структуры метафазных хромосом и интерфазного хроматина топография хромосомных белков остается малоизученной. Как правило, в экспериментах по изучению специфического связывания белков с определенными последовательностями ДНК применяют методы задержки в геле, либо аффинную хроматографию на колонках с иммобилизованной ДНК. Условия комплексобразования при использовании этих методов не могут строго соответствовать условиям в клетке. Кроме того, они не отражают зависимость от конформации ДНК, стабилизированной суперспирализацией или взаимодействиями ДНК–белок. Поэтому изучение этими методами динамики белкового окружения последовательностей ДНК в хроматине и процессов регуляции ограничено. Использование метода адресованной модификации может быть перспективным для исследования белкового окружения последовательностей ДНК в расплетенных участках хроматина.

Белки, подвергшиеся специфической модификации в составе хроматина производными олигонуклеотидов, комплементарных поли(dA)-, (dG-dT)_n и Alu-повторам, анализировали с помощью градиентного SDS-электрофореза. Белковые пробы предварительно обрабатывали микрококковой нуклеазой для разрушения ковалентно присоединенного к белку олигонуклеотидного фрагмента. Последний мог бы изменить подвижность модифицированного белка при электрофорезе.

Показано, что в составе ядер из интактной печени крыс модификации алкилирующим производным p(dT)₁₆ подвергаются, по крайней мере, два основных белка со средними молекулярными массами 19–20 и 27–28 кДа.⁷⁹ При добавлении в реакционную смесь 10-кратного по отношению к

реагенту избытка немеченого p(dT)₁₆ алкилирование этих белков ингибируется. В то же время избыток олигонуклеотида pd(CATGCAAAACCTTCCC) такой же длины, но с произвольной нуклеотидной последовательностью, не влияет на процесс алкилирования данных белков. Это указывает на специфичность взаимодействия реагента с белками. Такое взаимодействие может происходить как в составе комплементарного комплекса олигонуклеотида с мишенью ДНК, так и с белками, имеющими сродство к олиготимидилату. Данные анализа белковых компонентов, алкилирующихся производным p(dA)₁₆ в составе хроматина, демонстрируют тот же белковый состав, что и при использовании производных p(dT)₁₆. Это свидетельствует в пользу протекания реакции через образование комплементарного комплекса олигонуклеотидного адреса реагента с соответствующими участками расплетенной ДНК хроматина.

Интересно, что белок с молекулярной массой 19–20 кДа модифицируется реагентом как в составе интактного хроматина, так и в составе ДНП-комплекса, полученного обработкой хроматина 2 М раствором NaCl (ДНП-2.0). Таким образом, этот белок может быть представителем группы белков ядерного матрикса.⁷⁹

Алкилирование ядер производным p(dA-dC)₆ дает совершенно иной набор модифицированных белков. Шесть белков (или групп белков) специфически модифицируются в производные p(dA-dC)₆. Олигонуклеотид такой же длины, но другой последовательности, не влияет на их модификацию.

При обработке ядер клеток HeLa производным p(dA-dC)₆ получен более сложный набор модифицированных белков.⁷⁶ Наряду с белками, предположительно аналогичными модифицированным белкам из печени крыс (молекулярные массы 19.5, 21, 25.5, 31, 33 и > 66 кДа), модифицируется ряд белков, алкилирование которых не ингибируется избытком олигонуклеотида. Поскольку ингибирование модификации избытком олигонуклеотида той же последовательности не исключает возможности алкилирования белков, не расположенных в участках локального расплетения, а имеющих сродство к олигонуклеотиду-адресу, для доказательства специфичности модификации белков в комплементарном комплексе ядра клеток предварительно обрабатывали S1-нуклеазой (в условиях расщепления одноцепочечных участков ДНК хроматина). Результаты исследования показали, что семь белков подвергаются специфической модификации и, по-видимому, расположены в зонах локального расплетения.⁷⁶

В ряде работ^{80–83} показано, что природные полиамины (спермин и спермидин) индуцируют переход ДНК из B- в Z-конформацию и стабилизируют левоспиральную Z-конформацию при физиологических ионных условиях. Исследована⁸⁴ аффинная модификация алкилирующим производным p(dA-dC)₆ хроматина и интактных ядер эукариотических клеток (клеток человека и клеток печени крысы) по (dG-dT)_n-повторам ДНК в физиологических условиях и в условиях с высокими концентрациями спермина и спермидина. Анализ белков хроматина, подвергающихся специфической модификации данным производным олигонуклеотида, показал, что эффективность модификации как ДНК, так и белков возрастает в присутствии высоких концентраций спермина и спермидина и резко снижается после предварительной обработки хроматина S1-нуклеазой в условиях мягкого расщепления односпиральных участков ДНК. Это свидетельствует в пользу того, что реализация B→Z-перехода является одной из причин наличия в ДНК, содержащей повторяющиеся блоки (dG-dT)_n, расплетенных участков, доступных для взаимодействия с комплементарным олигонуклеотидом.

При модификации ядер HeLa производным p(dT)₁₆ получается четыре белка (молекулярная масса 19, 47, 61 и > 66 кДа). Их модификация ингибируется как избытком

немодифицированного олигонуклеотида, так и предварительной обработкой S1-нуклеазой.

При обработке ядер алкилирующим производным — $\text{pd}(\text{TTCTCCTGCCTCAGCCTCTT})$, комплементарным наиболее консервативному участку Alu-повтора, — выявлен ряд белков, модификация которых, по-видимому, протекает при образовании комплементарного комплекса олигонуклеотидного адреса с расплетенными участками ДНК хроматина. Данные по модификации избытком свободного олигонуклеотида и ее ингибированию предварительной обработкой S1-нуклеазой свидетельствуют о специфической модификации белков или групп белков с молекулярными массами 18, 22, 26, 28, 43, 68, 93 и двух белков с молекулярными массами > 94 кДа.

При переходе хроматина из интерфазного состояния в метафазные хромосомы происходят его существенные структурные перестройки, приводящие к возникновению структуры с максимально высоким уровнем компактизации ДНК. Использование реакционноспособных производных олигонуклеотидов для модификации интерфазных ядер и метафазных хромосом четко показывает, что наборы специфически модифицируемых белков для этих двух состояний хроматина существенно отличаются. Так, в составе хромосом не происходит модификации белка с молекулярной массой 28 кДа, однако наблюдается модификация белков с массами 27, 31 и 40 кДа, не подвергающихся модификации в составе интерфазных ядер.

Сравнение наборов алкилированных белков из ядер интактной и регенерирующей печени крыс показывает, что наряду с белками 19–20 и 28–29 кДа в последнем случае появляются два новых модифицированных белка с молекулярными массами 22–23 и 29–30 кДа.⁷⁹

Наблюдаемые различия в наборах модифицированных белков могут быть связаны с изменением доступности белков для алкилирования в ходе структурных перестроек, сопровождающих процесс активации хроматина при репликации, или изменением белкового окружения $\text{poly}(\text{dA})$ -участков ДНК.

Чтобы убедиться, что наблюдаемый набор модифицируемых белков не связан непосредственно с химической природой используемых реагентов, проведены аналогичные эксперименты с производными $\text{p}(\text{dT})_{16}$, к 5'-концам которых вместо алкилирующей группы присоединены фотоактивируемые, содержащие азидогруппу фрагменты — $\text{XC}(\text{O})-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}$, где $\text{X} = 2\text{-NO}_2\text{-5-N}_3\text{C}_6\text{H}_3$, $4\text{-N}_3\text{C}_6\text{H}_4$, $4\text{-N}_3\text{C}_6\text{F}_4$. Во всех случаях получен практически один и тот же набор модифицируемых белков. Степень модификации ДНК при использовании фотоактивируемых реагентов оказалась несколько ниже, чем в случае алкилирующего реагента, а степень модификации белков — существенно выше, чем при использовании алкилирующего производного. Во всех случаях проявлялась специфичность модификации: олиготимидилат, не содержащий реакционноспособную группу, существенно подавлял модификацию.⁸⁵

В последнее время установлено, что среди наиболее широко используемых фотоактивируемых реагентов по своей специфичности к белкам выделяются реагенты, имеющие в качестве фотоактивной группы остаток *n*-азидоанилина. Такие реагенты практически не затрагивают нуклеотидные компоненты.⁸⁶ В связи с этим было проведено⁸⁷ сравнительное исследование спектра белков, модифицируемых производными олиготимидилата, несущими фотоактивную арилазидогруппу — $2\text{-NO}_2\text{-5-N}_3\text{C}_6\text{H}_3\text{C}(\text{O})-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NHp}(\text{dT})_{16}$ (**1**) и $4\text{-N}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NHp}(\text{dT})_{16}$ (**2**). При фотомодификации интактных ядер из клеток HeLa обнаружено, что при практически идентичном спектре модифицируемых белков степень модификации реагентом **2**, содержащим остаток *n*-азидоанилина, оказывается заметно выше.

В этой же работе⁸⁷ с применением реагента **1** проведено сравнение спектра фотомодифицированных белков в составе ядер, выделенных из клеток HeLa, синхронизированных на границе фаз G_1/S , и в составе ядер, выделенных из тех же клеток в S-фазе. Наблюдалось некоторое изменение в спектре модифицированных белков: белок с массой 160 кДа присутствовал только в случае ядер, выделенных из клеток, синхронизированных на границе фаз G_1/S . Эти данные указывают на принципиальную возможность применения фотореакционноспособных производных олигонуклеотидов для исследования изменения белкового окружения в зонах расплетенных последовательностей ДНК и их доступности на разных стадиях клеточного цикла.

Для визуализации участков ковалентного присоединения олигодезоксириботимидилата к хроматину синтезировано производное $\text{p}(\text{dT})_{16}$, одновременно содержащее алкилирующую группу (CIX) на 5'-конце олигонуклеотида и остаток биотина (Bio) на 3'-конце олигонуклеотида — $\text{CIX-p}(\text{dT})_{16}\text{-Bio}$.⁸⁸ Последний обладает исключительно высоким сродством к белку стрептавидину и его конъюгатам. Показано, что введение остатка биотина на 3'-конец алкилирующего производного олигонуклеотида не влияет на его реакционную способность. Эффективность модификации ДНК примерно одинакова как для реагента $\text{CIX-p}(\text{dT})_{16}$, так и для $\text{CIX-p}(\text{dT})_{16}\text{-Bio}$. Этот факт был использован для визуализации участков модификации в клетках с помощью люминесцентного микроскопа. Исследование проведено на клетках HeLa и на клетках гибридных клонов, содержащих хромосомы человека и китайского хомячка.⁸⁹ Модифицированные клетки обрабатывали конъюгатом стрептавидина — флуоресцеинизотиоцианат.

Полученные данные показывают, что при обработке гибридных клеток выявляются два типа специфической люминесценции в ядрах. Наиболее интенсивно светятся ядрышки. В то же время в некоторых клетках можно заметить точечные участки свечения, не связанные с ядрышками, а дискретно распределенные в объеме ядра. Это означает, что наиболее сильной модификации подвергаются зоны активно-транскрибируемого хроматина (ядрышки), в то время как плотноупакованная ДНК в составе гетерохроматина мало доступна для модификации.

При модификации хроматина клеток HeLa обнаружено, что в этих клетках по сравнению с гибридными клетками человек–хомячок общий сигнал от ядра существенно выше. Возможно, это обусловлено интенсивной пролиферацией клеток HeLa. Кроме того, геном гибридной клетки частично инактивирован. Помимо ядрышковых и точечных сигналов в ядрах клеток HeLa выявляется третий тип специфического свечения — свечение примембранной области ядра, которая, как известно, обогащена полиА-участками.

Разработанный нами⁸⁹ метод визуализации участков модификации в хроматине основан на технике гибридизации *in situ*, но существенно отличается от нее. По стандартной технологии препараты для гибридизации сначала фиксируют для сохранения морфологии, а затем ДНК денатурируют для дальнейшей гибридизации с зондом. В используемом методе проводят специфическую по выбранной последовательности ДНК модификацию в составе нативного хроматина или интактных ядер. При этом специфической модификации подвергаются только последовательности ДНК, расположенные в местах ее локального расплетения.

VI. Заключение

Глубокое, с молекулярным разрешением и регистрацией происходящих динамических событий изучение хроматина химическими методами находится еще в начальной фазе. Однако уже на приведенном материале можно видеть, что химические подходы позволяют определить тонкую структуру нуклеопротеидных комплексов, лежащих в основе хро-

матина, вплоть до установления контактирующих между собой аминокислотных остатков в случае белок–белковых взаимодействий и контактирующих аминокислотных и нуклеотидных остатков в составе нуклеопротеидов. Разработана методология определения этих контактов для одного из важнейших функциональных процессов — перехода хроматина в транскрипционно-активное состояние. Несомненно, что эти подходы постепенно займут должное место и при исследовании других важнейших процессов: репликации, репарации, рекомбинации.

Важной чертой химических методов исследования является возможность выявлять новые компоненты нуклеопротеидных комплексов, как это было продемонстрировано на примере обнаружения двух новых белков, взаимодействующих с промоторными участками гена *hsp*. В настоящее время разделение сотни белков методами двумерного электрофореза уже не представляет принципиальных трудностей. Однако установление физических и функциональных связей между белками, а также между белками и нуклеиновыми кислотами в особенности непосредственно в интактном ядре, является задачей, в которой химические подходы, несомненно, окажутся очень продуктивными.

Наконец, как видно и из приведенных данных по изменению спектра белковых контактов при активации транскрипции в хроматине и контактов олигонуклеотидов с белками на разных фазах клеточного цикла, химические подходы открывают перспективу наблюдения за изменениями, сопровождающими переходы между различными состояниями хроматина.

Литература

1. K.E.van Holde. In *Chromatin*. Springer-Verlag, Berlin, 1988. P. 186
2. T.J.Richmond, J.T.Finch, B.Rushton, D.Rhodes, A.Klug. *Nature (London)*, **311**, 532 (1984)
3. P.R.Cook, I.A.Brazell. *J. Cell Sci.*, **19**, 261 (1975)
4. M.Marsden, U.K.Laemmli. *Cell*, **17**, 849 (1979)
5. R.H.Getzenberg, K.J.Pienta, W.S.Ward, D.S.Coffey. *J. Cell. Biochem.*, **47**, 289 (1991)
6. R.D.Kornberg, J.O.Thomas. *Science*, **184**, 865 (1974)
7. A.Stein, M.Bina-Stein, R.T.Simpson. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2780 (1977)
8. C.W.Carter Jr., L.F.Levinger, F.Birinyi. *J. Biol. Chem.*, **255**, 748 (1980)
9. H.G.Martinson, R.True, C.K.Lau, M.Mehrabian. *Biochemistry*, **18**, 1075 (1979)
10. J.D.McGhee, G.Felsenfeld. *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 1115 (1980)
11. J.E.Callaway, R.J.DeLange, H.G.Martinson. *Biochemistry*, **24**, 2686 (1985)
12. H.G.Martinson, R.J.True. *Biochemistry*, **18**, 1947 (1979)
13. H.G.Martinson, M.D.Shettler, B.J.McCarthy. *Biochemistry*, **15**, 2002 (1976)
14. W.M.Bonner, H.B.Pollard. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 282 (1975)
15. R.J.DeLange, L.C.Williams, H.G.Martinson. *Biochemistry*, **18**, 1942 (1979)
16. W.M.Bonner, J.D.Stedman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2190 (1979)
17. D.Ring, R.D.Cole. *J. Biol. Chem.*, **254**, 11688 (1979)
18. T.Boulikas, J.M.Wiseman, W.T.Garrard. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 127 (1980)
19. B.O.Glotov, A.V.Itkes, L.G.Nikolaev, E.S.Severin. *FEBS Lett.*, **91**, 149 (1978)
20. R.G.Hardinson, D.P.Zeitler, J.M.Murphy, R.Chalkley. *Cell*, **12**, 417 (1977)
21. W.M.Bonner. *Nucl. Acids Res.*, **5**, 71 (1978)
22. J.O.Thomas, A.J.A.Khabaza. *Eur. J. Biochem.*, **112**, 501 (1980)
23. A.D.Mirzabekov, V.V.Shick, A.V.Belyavsky, V.L.Karpov, S.G.Bavykin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **42**, 149 (1977)
24. V.V.Shick, A.V.Belyavsky, S.G.Bavykin, A.D.Mirzabekov. *J. Mol. Biol.*, **139**, 491 (1980)
25. A.D.Mirzabekov, V.V.Shick, A.V.Belyavsky, S.G.Bavykin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4184 (1978)
26. А.Д.Мирзабеков. В кн. *Общие проблемы физико-химической биологии. Т. 4. (Итоги науки и техники)*. Изд-во ВИНТИ, Москва, 1985. С. 5
27. A.D.Mirzabekov, A.M.Kolchinsky. *Mol. Biol. Rep.*, **1**, 379 (1979)
28. A.D.Mirzabekov, D.F.San'ko, A.M.Kolchinsky, A.F.Melnikova. *Eur. J. Biochem.*, **75**, 379 (1977)
29. А.М.Колчинский, Д.Ф.Санько, В.В.Шик, А.Д.Мирзабеков, А.Гинейтис. *Молекуляр. биология*, **12**, 365 (1978)
30. E.S.Levina, S.G.Bavykin, V.V.Shick, A.D.Mirzabekov. *Anal. Biochem.*, **110**, 93 (1981)
31. A.F.Melnikova, A.C.Zasedatelev, A.M.Kolchinsky, G.V.Gursky, A.L.Zhuse, S.L.Grohovsky, A.D.Mirzabekov. *Mol. Biol. Rep.*, **2**, 135 (1975)
32. D.V.Nacheva, D.I.Guschin, O.V.Preobrazhenskaya, V.L.Nacheva, V.L.Karpov, K.K.Ebraldise, A.D.Mirzabekov. *Cell*, **58**, 27 (1989)
33. A.D.Mirzabekov, S.G.Bavykin, A.V.Belyavsky, V.L.Karpov, O.V.Preobrazhenskaya, V.V.Shick, K.K.Ebraldise. *Methods Enzymol.*, **170**, 386 (1989)
34. A.D.Mirzabekov. *Gene*, **135**, 111 (1993)
35. I.Isenberg. *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 159 (1979)
36. S.G.Bavykin, I.M.Undritsov, S.I.Usachenko, A.A.Strokov, Yu.F.Bogdanov, A.D.Mirzabekov. *FEBS Lett.*, **228**, 149 (1988)
37. A.J.Varshavsky, V.V.Bakayev, G.P.Georgiev. *Nucl. Acids Res.*, **3**, 477 (1976)
38. A.V.Belyavsky, S.G.Bavykin, E.G.Gogvadze, A.D.Mirzabekov. *J. Mol. Biol.*, **139**, 519 (1980)
39. S.G.Bavykin, S.I.Usachenko, A.O.Zalensky, A.D.Mirzabekov. *J. Mol. Biol.*, **212**, 495 (1990)
40. P.G.Hartman, G.E.Chapman, E.M.Bradbury. *Eur. J. Biochem.*, **77**, 45 (1977)
41. L.Bohm, T.Mitchell. *FEBS Lett.*, **193**, 1 (1986)
42. J.B.Hansen, T.Koch, O.Buchardt, P.E.Nielsen, M.Wirth, B.Norden. *Biochemistry*, **22**, 4878 (1983)
43. P.E.Nielsen. *Biochemistry*, **24**, 2298 (1985)
44. A.D.Mirzabekov, D.V.Pruss, K.K.Ebraldise. *J. Mol. Biol.*, **211**, 479 (1989)
45. K.Ebraldise, A.Mirzabekov. *FEBS Lett.*, **194**, 69 (1986)
46. K.Ebraldise, S.Grachev, A.Mirzabekov. *Nature (London)*, **331**, 365 (1988)
47. V.L.Karpov, O.V.Preobrazhenskaya, A.D.Mirzabekov. *Cell*, **36**, 423 (1984)
48. V.M.Studinsky, A.V.Belyavsky, A.F.Melnikova, A.D.Mirzabekov. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 11187 (1988)
49. S.V.Belikov, A.I.Belgovsky, O.V.Preobrazhenskaya, V.L.Karpov, A.D.Mirzabekov. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 1031 (1993)
50. P.E.Nielsen. *FEBS Lett.*, **135**, 173 (1981)
51. R.Reeves. *Biochem. Biophys. Acta*, **782**, 343 (1984)
52. V.V.Shick, A.V.Belyavsky, A.D.Mirzabekov. *J. Mol. Biol.*, **185**, 329 (1985)
53. G.R.Cook, P.Yau, H.Yasuda, R.R.Traut, E.M.Bradbury. *J. Biol. Chem.*, **261**, 16185 (1986)
54. J.V.Brawley, H.G.Martinson. *Biochemistry*, **31**, 364 (1992)
55. E.Espel, J.Bernues, J.A.Perez-Pons, E.Querol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **132**, 1031 (1985)
56. T.A.Chen, R.Sterner, A.Cozzolino, V.G.Allfrey. *J. Mol. Biol.*, **212**, 481 (1990)
57. S.Bavykin, L.Srebrev, T.Banchev, R.Tsanev, J.Zlatanova, A.Mirzabekov. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3918 (1993)
58. P.P.Walter, T.A.Owen-Hughes, J.Cote, J.L.Workman. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 6178 (1995)
59. S.V.Belikov, A.R.Dzherbashyajan, O.V.Preobrazhenskaya, V.L.Karpov, A.D.Mirzabekov. *FEBS Lett.*, **273**, 205 (1990)
60. S.V.Belikov, A.I.Belgovsky, M.P.Partolina, V.L.Karpov, A.D.Mirzabekov. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 4796 (1993)
61. A.M.Belikova, V.F.Zarytova, N.I.Grineva. *Tetrahedron Lett.*, 3557 (1967)
62. D.G.Knorre, V.V.Vlassov, V.F.Zarytova, A.V.Lebedev, O.S.Fedorov. *Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives* CRS Press, Boca Raton, FL, 1993
63. Д.Г.Кнорре, В.Ф.Зарытова, А.Г.Бадашкева, О.С.Федорова. *Биотехнология. Т. 37. (Итоги науки и техники)*. (Под ред. З.А.Шабаровой). Изд-во ВИНТИ, Москва, 1991

64. В.В.Власов, Е.М.Иванова, Н.Д.Кобец, С.В.Мамаев, С.Г.Шульженко, Л.А.Якубов. *Докл. АН СССР*, **282**, 196 (1985)
65. Н.Д.Беляев, В.В.Власов, Н.Д.Кобец, Е.М.Иванова, Л.А.Якубов. *Докл. АН СССР*, **291**, 234 (1986)
66. V.V.Vlassov, A.A.Godovikov, N.D.Kobets, A.S.Ryte, L.V.Yurchenko, A.G.Bukrinskaya. *Adv. Enzyme Regul.*, **24**, 301 (1985)
67. В.В.Власов, Н.Д.Кобец, Е.Л.Черноловская, Е.М.Иванова, В.М.Субботин, Л.А.Якубов. *Биополимеры и клетка*, **5**, 49 (1989)
68. V.V.Vlassov, N.D.Kobets, E.L.Chernolovskaya, S.G.Demidova, R.G.Borisov, E.M.Ivanova. *Mol. Biol. Rep.*, **14**, 11 (1990)
69. R.J.Britten, D.E.Kohne. *Science*, **161**, 529 (1968)
70. C.M.Houck, F.P.Rinehart, C.W.Schmid. *J. Mol. Biol.*, **132**, 289 (1979)
71. H.Hamada, T.Kakunaga. *Nature (London)*, **298**, 396 (1982)
72. H.Hamada, M.G.Petrino, T.Kakunaga, M.Seidman, B.D.Stollar. *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 2610 (1984)
73. A.Nordheim, M.L.Pardue, E.M.Lafer, A.Möller, B.D.Stollar, A.Rich. *Nature (London)*, **294**, 417 (1981)
74. D.B.Haniford, D.E.Pulleyblank. *Nature (London)*, **302**, 632 (1983)
75. D.J.Arndt-Jovin, M.Robert-Nicou, D.A.Zarling, C.Gryder, E.Weimer, T.M.Jovin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4344 (1983)
76. E.L.Chernolovskaya, N.D.Kobets, R.G.Borisov, T.V.Abramova, V.V.Vlassov. *FEBS Lett.*, **303**, 269 (1992)
77. N.D.Kobets, R.G.Borisov, E.L.Chernolovskaya, V.V.Gorn, V.V.Vlassov. *Antisense Res. Develop.*, **4**, 259 (1994)
78. A.S.Boutorin, L.V.Gus'kova, E.M.Ivanova, N.D.Kobets, V.F.Zarytova, A.S.Ryte, L.V.Yurchenko, V.V.Vlassov. *FEBS Lett.*, **254**, 129 (1989)
79. Н.Д.Кобец, Е.Л.Черноловская, Е.М.Иванова, В.В.Власов. *Биорг. химия*, **17**, 933 (1991)
80. M.Behe, G.Felsenfeld. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1619 (1981)
81. H.H.Chen, M.Behn, D.C.Rau. *Nucl. Acids Res.*, **12**, 2381 (1984)
82. T.J.Thomas, R.P.Messner. *J. Mol. Biol.*, **201**, 463 (1988)
83. T.J.Thomas, U.B.Gunnia, T.Thomas. *J. Biol. Chem.*, **266**, 6137 (1991)
84. Л.Н.Боженко, В.В.Власов, Е.Л.Черноловская, Е.М.Иванова, Н.Д.Кобец. *Биорг. химия*, **24**, 931 (1998)
85. Е.Л.Черноловская, П.П.Черепанов, А.В.Горожанкин, М.И.Добриков, В.В.Власов, Н.Д.Кобец. *Биорг. химия*, **19**, 889 (1993)
86. Т.С.Годовикова, М.В.Березовский, Д.Г.Кнорре. *Биорг. химия*, **21**, 858 (1995)
87. Н.Д.Кобец, А.В.Горожанкин, Т.С.Годовикова, В.Н.Сильников, Д.Г.Кнорре. *Докл. АН*, **349**, 822 (1996)
88. А.В.Горожанкин, Е.М.Иванова, Н.Д.Кобец. *Биорг. химия*, **19**, 81 (1993)
89. Л.Н.Боженко, Е.Л.Черноловская, А.В.Горожанкин, С.И.Байбородин, Е.И.Болоболова, Е.В.Киселева, А.Ю.Керкис, Н.Д.Кобец. *Молекуляр. биология*, **29**, 499 (1995)

THE CHEMICAL APPROACHES TO THE STUDY OF CHROMATIN AS AN EXAMPLE OF A SUPRAMOLECULAR BIOLOGICAL STRUCTURE

D.G.Knorre, N.D.Kobets

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
8, Prosp. Akad. Lavrent'eva, 630090 Novosibirsk, Russian Federation, Fax +7(383)234-3677*

The chemical approaches to the study of the structure and certain aspects of functioning of chromatin are reviewed. The main attention is given to chemical approaches, primarily those based on the method of 'zero length covalent cross-linking', aimed at the investigation of the structure of histone complexes within nucleosomes and the interactions of histones and other proteins with chromosomal DNA. The changes in the nucleosome structure during chromatin transcription are discussed. Recent data on chemical modification of DNA and several chromatin proteins using reactive oligonucleotide derivatives are considered and analysed.

Bibliography — 89 references.

Received 2nd July 1998