

А. В. Сиволоб, С. Н. Храпунов

**ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИЯХ
БЕЛКОВО-НУКЛЕИНОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ
В ХРОМАТИНЕ**

Краткий обзор, посвященный изучению молекулярной организации хроматина флюоресцентными методами. Излагаются результаты исследований хроматина и нуклеосомы при помощи специфических для ДНК и белков флюоресцентных зондов и меток, и также данные собственной белковой флюоресценции, главным образом полученные авторами обзора. Продемонстрированы и обсуждены возможности различных подходов флюоресцентной спектроскопии при изучении белково-нуклеиновых взаимодействий, позволяющих зачастую получать уникальную информацию о структуре и динамике нуклеопротеидных комплексов.

Введение. Хроматин эукариот представляет собой сложноорганизованный нуклеопротеидный комплекс. Принципы его организации хорошо изучены. Первым уровнем организации хроматина является цепь нуклеосом. Нуклеосома включает белковую сердцевину — октамер гистонов H2A, H2B, H3 и H4 (по две молекулы каждого типа) и участок ДНК длиной 146 пар оснований (п.о.), образующий на поверхности октамера 1,8 левого витка сверхспирали [1, 2]. Центральное место в нуклеосоме занимает тетрамер гистонов (H3—H4)₂, взаимодействующий с полным супервитком ДНК, два симметрично расположенных димера H2A—H2B связаны с концевыми участками нуклеосомной ДНК по 20—25 п.о. [3]. Описанную структуру часто называют кор-частицей нуклеосомы. Взаимодействие кор-частицы с одной молекулой гистона H1 приводит к образованию полной нуклеосомы, содержащей два сверхвитка длиной 166 п.о. [1, 2].

Гистон H1 играет также определяющую роль в наднуклеосомной укладке ДНК, конденсируя полинуклеосомную нить в фибриллу толщиной 30 нм [1, 2, 4]. Гистоны, таким образом, являются основными структурными белками хроматина.

Исследования молекулярной организации хроматина и ее динамики имеют большое значение для понимания механизмов функционирования генетического аппарата клетки. Различные спектральные методы, позволяющие изучать тонкие детали молекулярной структуры, оказываются незаменимым инструментом в такого рода исследованиях. Настоящая статья посвящена краткому обзору результатов, полученных при помощи методов флюоресцентной спектроскопии. В первом разделе рассматриваются подходы, не использующие флюоресценцию искусственных меток и зондов и позволяющие изучать состояние ДНК и белков в составе нуклеопротеидных комплексов хроматина. Второй раздел посвящен результатам, полученным, в основном, в нашей лаборатории методами изучения собственной флюоресценции белков.

Флюоресценция меток и зондов. Изучение нуклеинового компонента хроматина. Известны самые разнообразные флюоресцирующие красители, связывающиеся с ДНК. Их применение в исследованиях белково-нуклеиновых комплексов хроматина обусловлено обычно изменением квантового выхода или других параметров их флюоресценции при взаимодействии этих красителей с ДНК и другими нуклеиновыми кислотами.

Наиболее изученными и популярными являются акридин оранжевый и бромистый этидий, связывающиеся с ДНК путем интеркаляции между парами оснований.

Благодаря радикальным отличиям в спектрах флюоресценции акридина при его связывании с ДНК и РНК этот краситель широко используется для определения соотношения двух типов нуклеиновых кислот в хроматине, ядрах и целых клетках [5]. Квантовый

выход флюоресценции этидия повышается примерно в 20 раз при связывании с ДНК [6], что позволяет количественно определять ДНК в составе нуклеопротеидов, в частности, непосредственно в клетках [5].

Оба эти красители часто используют для определения степени доступности ДНК в составе нуклеопротеидов путем анализа изотерм адсорбции. Особенно просто изотермы регистрируются для этидия, так как только интеркалированный краситель дает заметный вклад в измеряемую интенсивность флюоресценции.

Анализ процесса связывания этидия с хроматином и нуклеосомами [7] показывает, что в первую очередь краситель связывается со свободными от гистонов межнуклеосомными участками ДНК, сродство этидия к нуклеосомной ДНК намного ниже. При высокой концентрации этидия начинает связываться с нуклеосомной ДНК, которая имеет две области, различающиеся по сродству к красителю: в первую очередь происходит связывание с концевыми (примерно по 20 п.о.) участками нуклеосомной ДНК, затем связывание с центральным супервитком индуцирует разворачивание нуклеосомы.

В работах [8, 9] исследования затухания анизотропии флюоресценции этидия были использованы для определения торсионной жесткости (жесткости кручения) ДНК в нуклеосоме и хроматине. По этим данным, торсионная жесткость не изменяется при включении ДНК в нуклеосому [8, 9], жесткость ДНК в хроматине возрастает при его переходе в конденсированное состояние [9]. Такой подход может оказаться полезным при изучении динамики молекулярной структуры хроматина, однако к результатам определения торсионной жесткости следует подходить с осторожностью. Во-первых, как указано выше, этидий связывается, в основном, с межнуклеосомными и концевыми нуклеосомными участками ДНК, что не позволяет, по-видимому, оценить среднюю торсионную жесткость всей нуклеосомной ДНК [10]. Во-вторых, метод затухания анизотропии флюоресценции, использованный первоначально для определения торсионной жесткости свободной ДНК [11], дает заниженные оценки жесткости [12, 13].

Другой важной областью применения этидия является его использование для определения уровня торсионных напряжений (или степени сверхспирализации) в ДНК, включенной в структуры с топологическими ограничениями. Простейшим примером такой структуры является кольцевая ковалентно замкнутая ДНК. Хроматин в ядрах клеток эукариот организован в виде петель, жестко закрепленных на скелетных структурах ядра [14, 15], и каждая такая петля топологически эквивалентна кольцевой ДНК. Интеркаляция этидия между парами оснований сопровождается локальным раскручиванием двух соседних пар на определенный угол. Поэтому при наличии в кольцевой ДНК отрицательных сверхвитков (двойная спираль частично раскручена по отношению к равновесному состоянию) интеркалированная молекула этидия частично снимает торсионные напряжения, что увеличивает сродство этидия к отрицательно сверхспирализованной ДНК [16]. Сравнение изотерм адсорбции этидия на сверхспирализованной и релаксированной ДНК позволяет легко определить степень, а также энергию сверхспирализации.

Такой подход был применен для оценки уровня торсионных напряжений в полиденной хромосоме [17].

Флюоресцентные метки в белках. Большинство методов исследования молекулярной структуры хроматина (включая описанные выше) дает информацию об общей форме частиц или о состоянии ДНК в их составе. Это заставляет искать эффективные подходы для изучения белков в составе хроматиновых структур. Одной из возможностей является использование флюоресцентных меток, ковалентно связывающихся с белками. Рассмотрим некоторые полученные при помощи меток результаты, дающие представление о возможности этих методов.

В работе [18] исследовалось связывание с ДНК гистона H1, меченного по N-концу флюоресцеинизотиоцианатом. Флюоресценция метки эффективно тушится при взаимодействии белка с ДНК, что позволяет определять термодинамические параметры связывания. Было показано, что связывание гистона H1 с ДНК характеризуется положительной кооперативностью, определены константа связывания и фактор кооперативности в зависимости от ионной силы раствора. Кооперативность связывания в данном случае может быть объяснена переходом ДНК в компактную форму в присутствии гистона H1 [19]. Следует отметить, что в работе [18] были получены явно заниженные оценки числа ионных контактов гистона H1 с ДНК. Вероятно, это связано с особенностями структуры гистона H1, имеющего глобулярный домен в центральной части полипептидной цепи и два протяженных неупорядоченных концевых участка [20], причем эти три части молекулы могут по-разному взаимодействовать с ДНК [21]. То есть метка по N-концу позволяет следить лишь за этим участком, не давая полной информации о поведении целой молекулы гистона H1.

Для изучения белково-нуклеиновых комплексов хроматина может представлять интерес такой краситель, как флюорескамин. После добавления к водному раствору белка флюорескамин образует интенсивно флюоресцирующий ковалентный комплекс с аминогруппами лизиновых остатков; избыток красителя, реагируя с молекулами воды, превращается в нефлюоресцирующее соединение [22]. Реакция с флюорескаминном может быть использована для определения числа доступных лизиновых остатков в нуклеопротеидах. Например, уровень модификации гистонов флюорескаминном резко возрастает при диссоциации нуклеосом в растворах с высокой ионной силой [22].

В работе Кантора и сотр. [23] проведено детальное исследование зависимых от ионной силы конформационных изменений в нуклеосоме при помощи изучения флюоресценции меток, ковалентно связанных с SH-группами гистона H3. Интенсивность и положение максимума спектра флюоресценции использовавшихся меток чувствительны к полярности окружения. Кроме того, применяли измерения эффективности переноса энергии, дающие информацию о расстоянии между SH-группами двух гистонов H3 в нуклеосоме, и динамическое тушение флюоресценции меток акриламидом, позволяющее определить степень доступности метки для молекул тушителя. На основе этих подходов в работе [23] выявлены четыре зависимые от ионной силы структурные формы нуклеосомы, различающиеся состоянием SH-групп, т. е. конформацией тетрамера гистонов $(H3-H4)_2$: 1) 0,5—5,0 мМ NaCl — нуклеосома декомпактизована, SH-группы экспонированы в раствор; 2) 5,0—100 мМ — компактная форма, SH-группы погружены внутрь белковой сердцевины, сближены между собой и недоступны; 3) 100—350 мМ — незначительная декомпактизация нуклеосомы; 4) в области 600 мМ — развернутая форма нуклеосомы.

Использование меток по SH-группам позволило Дабану и Кантору провести кинетические исследования процесса самосборки нуклеосомы [24, 25], регистрируя во времени интенсивность флюоресценции метки после скачка ионной силы раствора из области, соответствующей диссоциированному состоянию гистонов и ДНК, в область низкой концентрации соли. Было показано, что связывание гистонов с ДНК происходит весьма быстро (за мертвое время кинетического эксперимента), и в этом случае фактически изучалось образование уникальной структуры октамера гистонов, которые уже связаны с ДНК. Этот процесс включает несколько стадий и может быть сопряжен с перераспределением гистонов (особенно H2A и H2B) на ДНК [24]. Первичным моментом сборки является образование комплекса $(H3-H4)_2$ с ДНК, т. е. тетрамер определяет направление сборки нуклеосомы. Однако для формирования ее нативной структуры необходимо присутствие гистонов H2A, H2B; в противном случае возможно образование «тупикового» комплекса H3-H4-ДНК, неспособного превращаться в нативные

нуклеосомные частицы даже при последующем добавлении в систему гистонов H2A и H2B [25].

Итак, применение флюоресцентных меток и зондов позволяет получать уникальную информацию о молекулярной структуре и динамике белково-нуклеиновых комплексов хроматина. Однако всегда возникает вопрос о том, насколько молекула зонда или метки, иногда довольно массивная, пертурбирует изучаемую структуру и, следова-

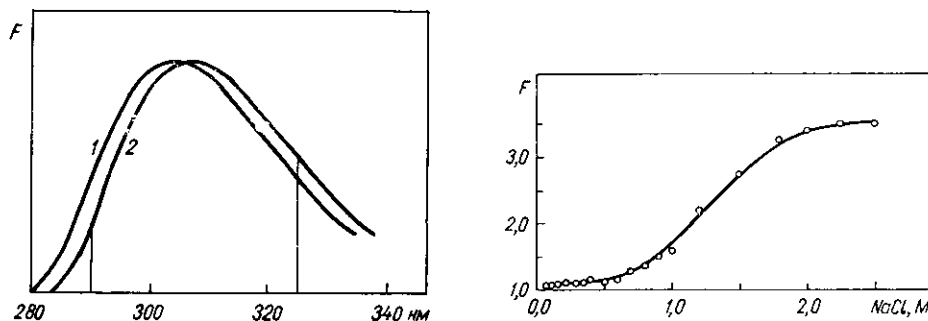


Рис. 1. Спектры флюоресценции тирозина в воде (1) и октамера гистонов $(H2A-H2B-H3-H4)_2$ в 4 М NaCl (2)

Рис. 2. Интенсивность тирозиновой флюоресценции реконструированных нуклеосом в зависимости от ионной силы

тельно, насколько адекватны получаемые результаты. Этот вопрос снимается, когда исследуется флюоресценция естественных флюоресцирующих хромофоров белков — аминокислотных остатков триптофана и тирозина.

Собственная флюоресценция белков. Особенности тирозиновой флюоресценции гистонов. Гистоны не содержат в своем составе остатков триптофана [26] и вся их собственная флюоресценция обусловлена остатками тирозина. До недавнего времени считалось, что положение максимума и форма спектров флюоресценции тирозина в белках неизменны и не зависят от свойств микроокружения. В ряде проведенных в нашей лаборатории исследований [27—34] установлено, что положение максимума спектров тирозина чувствительно к особенностям его микроокружения в растворе и в составе белков. Сдвиги спектра флюоресценции при этом составляют 2—3 нм и их удобно регистрировать двухволновым методом: измеряя так называемый параметр B , представляющий собой отношение интенсивностей флюоресценции на крыльях спектра. На рис. 1 представлены спектры флюоресценции тирозина и октамера гистонов $(H2A-H2B-H3-H4)_2$. Видно, сколь существенно изменяется параметр B при сдвиге спектра.

Детальный анализ спектральных свойств тирозина в модельных соединениях [33] позволил доказать, что определяющую роль в сдвигах спектров флюоресценции играет образование водородных связей. Так, замена водородной связи гидроксильной группы тирозина с молекулами воды, когда гидроксил выступает одновременно в роли донора и акцептора водорода, на преимущественно протон-донорскую связь приводит к существенному длинноволновому сдвигу спектра флюоресценции [33].

В табл. 1 представлены спектральные параметры тирозина, его производных и тирозиновых остатков в составе гистонов в различных условиях по данным работ [28—31, 34, 35]. Как видно из этой таблицы, гистоны могут быть разделены на два класса по спектральным свойствам своих тирозиновых остатков. К первому классу относится гистон H1. Спектр флюоресценции его единственного тирозинового остатка не претерпевает сдвигов ни при каких условиях; в то же время образование нативной структуры белка при увеличении ионной силы приводит к существенному возрастанию квантового выхода флюоресценции. Второй класс составляют коровые гистоны H2A, H2B, H3

Таблица 1
 Параметры спектров тирозиновой флюоресценции

Объект	Условия	<i>B</i>	λ_{max} , нм	<i>q</i>
Тирозин	Вода	1,0	303,4	0,21
Этиловый эфир				
N-ацетилтирозина *	>	1,16	304,1	0,05
Гистон H1	5 мМ трис-HCl	1,05	303,6	0,06
>	1 М NaCl	1,1	304,0	0,20
Димер H2A—H2B	0,1 М NaCl	1,52	305,5	0,085
Тетрамер (H3—H4) ₂	0,1 М NaCl	1,56	305,2	0,074
Октамер (H2A—H2B—H3—H4) ₂	0,1—0,7 М NaCl **	1,54	305,7	0,08
>	2 М NaCl	1,68	306,3	0,085
>	4 М NaCl	1,74	306,5	0,085

* Аналог состояния тирозина в составе полипептидной цепи; близкие значения параметров имеют денатурированные тирозинсодержащие белки; ** условия распада октамера на тетрамер (H3—H4)₂ и два димера H2A—H2B; *B*— параметр спектра флюоресценции; λ_{max} — длина волны максимума спектра; *q*— квантовый выход флюоресценции.

и H4. Их пары образуют стабильные комплексы — димер H2A—H2B и тетрамер (H3—H4)₂, которые, в свою очередь, формируют октамер (H2A—H2B—H3—H4)₂ в 2 М NaCl (или в комплексе с ДНК). Квантовый выход флюоресценции всех этих комплексов, как видно из табл. 1, примерно одинаков, но существенно различается положение максимума спектров. Спектры флюоресценции димера и тетрамера (или их смеси) сдвинуты в длинноволновую область по сравнению с тирозином. Формирование октамера, которое сопровождается вовлечением дополнительного числа тирозиновых остатков в водородные связи [36, 37], приводит к еще более существенному длинноволновому сдвигу. Если для стабильного октамера (в 2 М и выше NaCl, pH около 7,0 и при концентрации белка больше 1 мг/мл) характерно значение параметра *B* около 1,7, то при снижении ионной силы, концентрации белка, pH, а также при повышении температуры или добавлении 2 М мочевины, когда разрушаются специфические контакты между димером и тетрамером с участием тирозиновых остатков, значение параметра *B* снижается до величины порядка 1,5, характерной для не взаимодействующих димера и тетрамера.

В дальнейшем мы обсудим применение флюоресцентной спектроскопии тирозинового хромофора при исследовании гистон-нуклеиновых комплексов.

Флюоресценция тирозина в составе нуклеопротеидов. Характерным свойством, отличающим флюоресценцию тирозина в составе комплексов с нуклеиновыми кислотами, является существенное тушение этой флюоресценции. Такое тушение наблюдается в комплексах с нуклеиновыми кислотами тирозин-содержащих пептидов типа Lys-Tyr-Lys [38—40], поли(Lys-Tyr) [41], гистона H1 [42, 43], октамера гистонов [44, 45], а также в нативных кор-частицах нуклеосом [46, 47]. По данным ЯМР-спектроскопии [38,39] и калориметрических измерений [48], тирозил в составе трипептидов Lys-Tyr-Lys, в отличие от триптофанила, не способен к заметной интеркаляции между основаниями ДНК. Тушение флюоресценции таких трипептидов в комплексе с ДНК нельзя объяснить также образованием водородной связи между тирозином и компонентами нуклеиновых кислот [39]. Наиболее вероятным механизмом тушения считается миграция энергии с тирозина на азотистые основания [39—40]. Как показано в работах [42, 43] для комплексов H1—ДНК, эффективность тушения их флюоресценции зависит от длины волны возбуждающего света: тушение менее значительно при возбуждении флюоресценции в области коротковолновой полосы поглощения тирозина (в области 230 нм) по срав-

нению с длинноволновой полосой (260—280 нм). Физическая сущность этого явления неясна. Поскольку эффективность миграции энергии зависит от взаимной ориентации дипольных моментов электронных переходов в доноре и акцепторе [49], а дипольные моменты, соответствующие двум полосам в спектре поглощения тирозина, взаимно перпендикулярны [50], можно предположить, что обнаруженный эффект обусловлен преимущественной ориентацией тирозинового остатка по отношению к азотистым основаниям ДНК в комплексе Н1—ДНК.

Независимо от природы тушения флюоресценции тирозин-содержащих белков в комплексе с ДНК это тушение является чувствительным и простым индикатором связывания белка с нуклеиновой кисло-

той и может быть использовано для экспериментального определения термодинамических параметров ассоциации. В частности, мы применили измерения тирозиновой флюоресценции гистона Н1 для изучения особенностей взаимодействия его глобулярного домена с ДНК [32, 43].

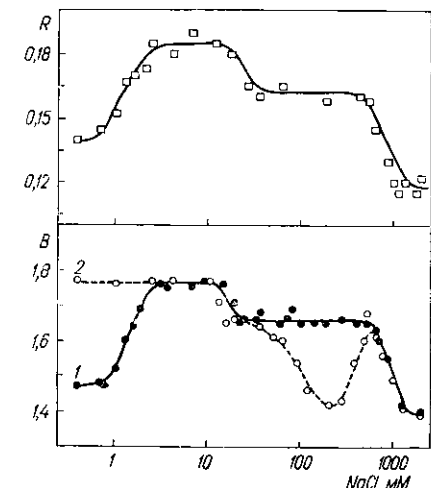


Рис. 3. Зависимости от ионной силы анизотропии флюоресценции R реконструированных полинуклеосом, а также параметра B их спектров флюоресценции в отсутствие (1) и в присутствии (2) гистона Н1

Флюоресценция нуклеосом. Как указывалось во введении, нуклеосома представляет собой комплекс ДНК и октамера гистонов (Н2А—Н2В—Н3—Н4)₂. Изучая тирозиновую флюоресценцию этого комплекса, фактически мы следим за изменениями в белковом компоненте нуклеосомы, не внося каких-либо возмущений в его структуру (в отличие от метода флюоресцентных меток). Ниже рассмотрены, в основном, результаты, полученные в работах [44, 45] на реконструированных нуклеосомах.

Флюоресценция гистонного октамера в комплексе с ДНК существенно потушена, в диапазоне 0,8—2,0 М NaCl, т. е. в области диссоциации коровых гистонов ДНК, интенсивность флюоресценции возрастает в 3,5 раза. Изложенное иллюстрирует рис. 2 из работы [44]. Сходные результаты получены для нативных кор-частиц нуклеосом [46, 47]. Кривая на рис. 2 не изменяется в присутствии гистона Н1 [45] и свидетельствует лишь об изменении в связывании гистонов с ДНК при повышении ионной силы, не давая информации о структурных перестройках октамера в составе нуклеосомы. Значительно более информативными оказываются анизотропия и параметр B спектра флюоресценции.

На рис. 3 представлены зависимости этих параметров от ионной силы для реконструированных нуклеосом из работ [44, 45]. Рассмотрим кривую для нуклеосом в отсутствие гистона Н1 на рис. 3. Характерно, что анизотропия и параметр B изменяются сходным образом. При увеличении ионной силы от 0,5 до 3 мМ наблюдается возрастание параметра B от 1,47 до 1,77. Первое значение близко к величине B для эквимолярной смеси димера и тетрамера, второе — к параметру B для октамера гистонов в 4 М NaCl (см. табл. 1). Возрастание анизотропии флюоресценции, аналогичное приведенному на рис. 3, зарегистрировано также для нативных коровых частиц нуклеосом [46, 47]. Структурный переход в нуклеосоме при низкой ионной силе хорошо известен: снижение концентрации соли до 1 мМ и ниже вызывает набухание кор-частиц нуклеосом [51], частичное разворачивание нуклео-

сомной ДНК [52, 53], изменения в состоянии SH-групп гистона H3 [23] (см. первый раздел), нарушение контактов между гистонами H2B—H4 при сохранении контактов H2A—H2B [54]. Именно последнее обстоятельство, по-видимому, играет главную роль в изменении параметров флюоресценции, поскольку низкие значения V свойственны смеси невзаимодействующих димеров и тетрамеров. Увеличение ионной силы до 3 мМ приводит к восстановлению специфических водородных связей димера H2A—H2B с тетрамером (H3—H4)₂, при этом снижается подвижность тирозиновых остатков (возрастание анизотропии) и увеличивается параметр V . Молекулярные механизмы структурного перехода при низкой ионной силе обсуждаются ниже.

В области ионной силы 3—20 мМ параметр V и анизотропия флюоресценции (см. рис. 3) сохраняют наивысшие значения, соответствующие параметрам свободного октамера в 4 М NaCl. Очевидно, в этой области реализуется наиболее компактное состояние октамера в комплексе с ДНК, характеризующееся наибольшим числом тирозиновых остатков, вовлеченных в водородные связи. В диапазоне 20—30 мМ NaCl фиксируется второй конформационный переход в нуклеосомах (см. рис. 3), в ходе которого наблюдается незначительное снижение параметра V и анизотропии флюоресценции, указывающее на увеличение подвижности части тирозиновых остатков. Эти значения V и анизотропии, сходные с параметрами свободного октамера в 2 М NaCl (см. табл. 1), сохраняются в нуклеосомах до 600 мМ NaCl (см. рис. 3).

В области 600—1200 мМ NaCl происходит диссоциация димера H2A—H2B из нуклеосомы [55]. Ясно, что разрушение октамера гистонов в ходе этой диссоциации обуславливает наблюдаемое снижение параметра V и анизотропии (см. рис. 3), которое сопровождается возрастанием интенсивности флюоресценции (см. рис. 2). Ниже процесс диссоциации анализируется более подробно.

Таким образом, параметры собственной тирозиновой флюоресценции гистонов выявляют три структурные формы нуклеосомы, различающиеся по состоянию контактов между димером H2A—H2B и тетрамером (H3—H4)₂, в различных диапазонах ионной силы раствора: 1) 0,5—3 мМ — «развернутая» форма — разрушенные контакты димера с тетрамером, повышенная подвижность тирозиновых остатков; 2) 3—20 мМ — «компактная» форма — наиболее стабильные контакты димеров с тетрамером, малая подвижность тирозиновых остатков; 3) 20—600 мМ — частичная декомпактизация нуклеосомы, высвобождение небольшой доли тирозиновых остатков.

На рис. 3 приведена также зависимость параметра V для реконструированных полинуклеосом в присутствии гистона H1 из работы [45]. Влияние гистона H1 проявляется в двух областях ионной силы. Во-первых, присутствие гистона H1 в комплексе предотвращает структурный переход в области 0,5—3 мМ. Следовательно, гистон H1 стабилизирует структуру нуклеосомы при низкой ионной силе, что согласуется с данными работ [4, 56]. Во-вторых, в области 100—400 мМ, где компактизирующее действие гистона H1 на ДНК и хроматин максимально [4, 42], наблюдается существенное снижение параметра V комплексов октамер—ДНК—H1 до значений, примерно соответствующих смеси невзаимодействующих димеров H2A—H2B и тетрамера (H3—H4)₂. Данные по тушению флюоресценции полинуклеосом йодидом в 0,15 М NaCl [45] указывают на увеличение доли доступности тирозиновых остатков в случае присутствия гистона H1 в комплексе. Таким образом, гистон H1, компактизуя нуклеосомную нить при физиологической ионной силе, по-видимому, обеспечивает возможность эффективных межнуклеосомных взаимодействий. Эти взаимодействия, в свою очередь, приводят к существенной структурной перестройке октамера гистонов, которая по флюоресцентным параметрам эквивалентна распаду октамера на димеры и тетрамер. В пользу такой интерпретации свидетельствует тот факт, что аналогичные изменения в октамере гистонов зарегистри-

рованы нами при индуцировании межнуклеосомных взаимодействий не гистонами Н1, а другими способами — при воздействии двухвалентных катионов [45] или увеличении концентрации полинуклеосом без гистона Н1 при физиологической ионной силе [44].

Одно из объяснений структурного изменения октамера в условиях компактизации полинуклеосомной нити состоит в следующем. Межнуклеосомные взаимодействия индуцируют разрыв специфических контактов димера Н2А—Н2В с тетрамером (Н3—Н4)₂ с участием тирозиновых остатков. При этом может и не происходить существенного

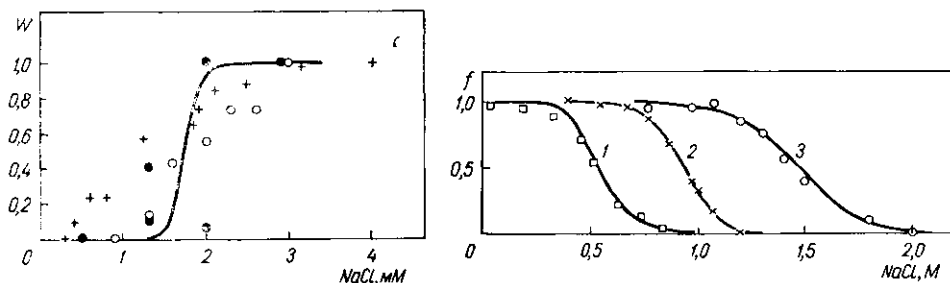


Рис. 4. Теоретическая зависимость вероятности W компактного состояния концевых участков нуклеосомной ДНК от ионной силы (сплошная линия). Приведены экспериментальные данные, полученные методами электрического дихроизма [52] (+), флуоресцентной спектроскопии [44] (O) и нейтронного рассеяния [53] (●)

Рис. 5. Зависимости от ионной силы доли f -связанных с ДНК гистоновых комплексов: димера Н2А—Н2В в отсутствие (1) и в присутствии тетрамера (Н3—Н4)₂ (2), тетрамера (Н3—Н4)₂ (3)

нарушения целостности нуклеосомы. Так, при упаковке нуклеосомных кор-частиц в кристалл взаимодействия между ними вызывают сдвиг одного из димеров по отношению к позиции, симметричной второму димеру [3]. Подобный сдвиг может, в принципе, обуславливать наблюдаемые изменения параметров тирозиновой флуоресценции. Как бы то ни было, полученные в работах [44, 45] результаты позволяют утверждать, что структура октамера гистонов в условиях компактизации хроматина должна существенно отличаться от таковой в растворе 2 М NaCl.

Структурный переход в нуклеосоме в области низкой ионной силы. Выше приведены экспериментальные данные о структурном переходе в нуклеосомах при снижении ионной силы раствора до 1 мМ и ниже. В результате низкосолевого перехода происходит разворачивание концевых (по 20—25 п. о.) участков нуклеосомной ДНК (по данным нейтронного рассеяния [53]) с одновременным разрушением контактов между димером Н2А—Н2В и тетрамером (Н3—Н4)₂ (по результатам флуоресцентной спектроскопии [44] и белок-белковых сшивок [54]). В работе [57] проанализирована зависимость различных вкладов в свободную энергию концевых участков нуклеосомной ДНК от ионной силы. Учитывали энергии изгиба ДНК в нуклеосоме, электростатического расталкивания между концевым участком и центральным супервитком нуклеосомной ДНК, взаимодействий между димером и тетрамером, а также электростатических взаимодействий гистонов с ДНК. На основе этого анализа построена кривая теоретической зависимости вероятности компактного состояния концевых участков от ионной силы, представленная на рис. 4, в сравнении с экспериментальными данными. Видно, что теоретическая модель хорошо согласуется с экспериментом. Она позволяет следующим образом описать механизм структурного изменения в нуклеосоме при низкой ионной силе. При концентрации соли выше 2 мМ компактное состояние концевых участков нуклеосомной ДНК поддерживается за счет взаимодействий димера Н2А—Н2В с тетрамером (Н3—Н4)₂ (димер при этом связан с концевым участком, а тетрамер — с центральным супервитком

нуклеосомной ДНК), а также за счет дополнительных взаимодействий концевых участков ДНК с тетрамером. Снижение ионной силы приводит к значительному увеличению дестабилизирующих вкладов в свободную энергию — возрастает жесткость ДНК и особенно электростатическое расталкивание между соседними супервитками нуклеосомной ДНК. Это приводит к декомпактизации концевых участков нуклеосомной ДНК, которая, срабатывая наподобие раскручивающейся пружины, разрушает целостность октамера гистонов. Как следует из модели, дополнительная нейтрализация фосфатных остатков ДНК за счет положительно заряженных остатков гистона H1 должна приводить к стабилизации структуры, что и наблюдается в эксперименте [45] (см. рис. 3). На основе теоретического анализа и данных флуоресцентной спектроскопии можно сделать также ряд других важных выводов о механизмах стабилизации нуклеосомы [57].

Диссоциация нуклеосомы при высокой ионной силе. Как показано хроматографическими методами [55], диссоциация нуклеосомы начинается в 0,7 М NaCl. При этом первоначально в области 0,7—1,2 М NaCl диссоциирует димер гистонов H2A—H2B, а затем в области 1,2—2,0 М NaCl — тетрамер (H3—H4)₂. Отметим, что речь идет о диссоциации глобулярных областей гистонов, так как взаимодействие с ДНК их неупорядоченных концевых участков нарушается в области 0,6 М NaCl [58, 59]. Тщательное определение термодинамических параметров диссоциации было затруднено из-за отсутствия адекватных методов исследования этого процесса в растворе. Так, измерение интенсивности собственной флуоресценции нуклеосомы [60] не позволяет раздельно регистрировать диссоциацию димера и тетрамера. Это оказывается возможным при одновременном измерении интенсивности флуоресценции и параметра *B*: как видно из рис. 2 и 3, изменение параметра *B* заканчивается при 1,2 М NaCl, когда интенсивность флуоресценции достигает примерно половины своего максимального значения. Ясно, что параметр *B* регистрирует только диссоциацию димера из нуклеосомы, тогда как интенсивность флуоресценции возрастает при диссоциации обоих гистоновых комплексов. Анализ изменения этих параметров, проведенный в работе [61], позволил получить количественные характеристики процесса диссоциации.

На рис. 5 приведены кривые диссоциации димера H2A—H2B и тетрамера (H3—H4)₂ из нуклеосомы, а также кривая диссоциации димера из ДНК в отсутствие тетрамера. На основе этих кривых можно рассчитать константы связывания гистоновых комплексов с ДНК, логарифмические зависимости которых от ионной силы представляют собой прямые линии [61]. По параметрам этих прямых определены

Таблица 2
Термодинамические параметры связывания гистоновых комплексов с ДНК

Комплексы	G^1 , ккал/моль	<i>n</i>
Димер H2A — H2B	—1,9	7
Димер H2A — H2B в присутствии тетрамера (H3 — H4) ₂	—8,1	12
Тетрамер (H3 — H4) ₂	—12,6	8

количества ионных контактов *n* гистонов с ДНК, стабилизирующих комплексы, и свободные энергии взаимодействия в 1 М NaCl G^1 . Результаты представлены в табл. 2. Как видно из рис. 5 и табл. 2, диссоциация димера H2A—H2B из ДНК происходит при заметно меньших концентрациях соли, чем его диссоциация из нуклеосомы; при высокой ионной силе энергия взаимодействия димера с тетрамером значительно

превышает энергию взаимодействия димера с ДНК, что и определяет специфичность связывания димера в нуклеосоме. Число ионных контактов нуклеосомной ДНК с глобулярными областями октамера гистонов оценивается (см. табл. 2) как 32. Это значение близко к числу положительно заряженных остатков октамера, экспонированных в растворитель [62]. То есть все экспонированные катионные остатки октамера взаимодействуют с нуклеосомной ДНК. Ограниченное число катионных остатков, вероятно, образует на поверхности октамера своеобразный «трек», строго определяющий взаимное пространственное расположение белковой сердцевины и ДНК нуклеосомы. Это объясняет высокую степень консервативности аминокислотных последовательностей гистонов в участках, ответственных за формирование глобулярного домена октамера.

Представленные результаты демонстрируют, как нам кажется, богатые возможности методов флюоресцентной спектроскопии применительно к изучению белково-нуклеиновых комплексов. Использование как собственной белковой флюоресценции, так и флюоресценции зондов и меток позволяет получать уникальную информацию о структуре и динамике этих межмолекулярных комплексов, зачастую недоступную другим методам. Так, исследование положения максимума спектра тирозиновой флюоресценции гистонов [44, 45, 57, 61] дало возможность впервые провести систематическое изучение зависимых от ионной силы изменений нуклеосомы и механизмов ее формирования, не оказывая воздействия на эту структуру в ходе эксперимента, обнаружить ранее неизвестную конформационную форму нуклеосомы в условиях межнуклеосомных взаимодействий. Дальнейшее применение флюоресцентной спектроскопии позволит выяснить, мы надеемся, другие важные особенности механизмов белково-нуклеиновых взаимодействий в хроматине.

Резюме. Короткий обзор, посвященный вивченню молекулярної організації хроматину флюоресцентними методами. Викладено результати досліджень хроматину та нуклеосом за допомогою специфічних для ДНК та білків флюоресцентних зондів і меток, а також дані власної білкової флюоресценції, головним чином одержані авторами огляду. Продемонстровано і обговорено можливості різних підходів флюоресцентної спектроскопії при вивченні білково-нуклеїнової взаємодії, що дозволяють одержувати унікальну інформацію щодо структури та динаміки нуклеопротеїдних комплексів.

Summary. The brief review dealt with the investigations of chromatin molecular organization by the fluorescent methods. The results of chromatin and nucleosome studies, which have been obtained by using of proteins and DNA labelling by fluorescent dyes, as well as the data of intrinsic protein fluorescence obtained mainly by the authors, are described. The advantages of the different fluorescent approaches, which allow to obtain a unique information about protein-nucleic acids complexes structure and dynamics, are demonstrated and discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McGhee J. D., Felsenfeld G. Nucleosome structure // *Ann. Rev. Biochem.*—1980.— 49.— P. 1115—1156.
2. Mirzabekov A. D. Nucleosome structure and its dynamic transitions // *Quart. Rev. Biophys.*—1980.— 13, N 2.— P. 255—295.
3. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution / T. J. Richmond, J. T. Finch, D. Rhodes, A. Klug // *Nature.*—1984.— 311, N 5986.— P. 532—537.
4. Thoma F., Koller Th. Unravelling nucleosomes, nucleosome beads and higher order structure of chromatin: influence of non-histone proteins and histone H1 // *J. Mol. Biol.*—1981.— 149, N 4.— P. 709—733.
5. Карнаухов В. Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки.— М.: Наука, 1978.— 207 с.
6. LePecq J.-B., Paoletti C. Fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids // *J. Mol. Biol.*—1967.— 27, N 1.— P. 87—106.
7. Schmitz K. S. A model for the association of intercalating ligands with mononucleosomes and chromatin // *J. Theor. Biol.*—1982.— 98, N 1.— P. 29—43.

8. Wang J., Hogan M., Austin R. H. DNA motions in the nucleosome particle // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1982.— 79, N 19.— P. 5896—5900.
9. Internal motion of deoxyribonucleic acid in chromatin. Nanosecond fluorescence studies of intercalated ethidium / I. Ashikawa, K. Kinoshita, A. Ikegami et al. // *Biochemistry.*— 1983.— 22, N 25.— P. 6018—6026.
10. Сиволоб А. В., Храпунов С. Н. Влияние сверхспирализации ДНК на структуру нуклеосом // *Молекуляр. биология.*— 1991.— 25, № 1.— С. 144—152.
11. Millar D. P., Robbins R. J., Zewail A. H. Torsion and bending of nucleic acids studied by subnanosecond time-resolved fluorescence depolarization of intercalated dyes // *J. Chem. Phys.*— 1982.— 76, N 4.— P. 2080—2094.
12. Shimada J., Yamakawa H. Statistical mechanics of DNA topoisomers // *J. Mol. Biol.*— 1985.— 184, N 2.— P. 319—329.
13. Levene S. D., Crothers D. M. Topological distributions and the torsional rigidity of DNA. A Monte Carlo study of DNA circles // *Ibid.*— 1986.— 189, N 1.— P. 61—72.
14. Hancock R. Topological organization of interphase DNA: nuclear matrix and other skeletal structures // *Biol. Cell.*— 1982.— 46, N 2.— P. 105—122.
15. Cook P. R. The nucleoskeleton and the topology of transcription // *Eur. J. Biochem.*— 1989.— 185, N 2.— P. 487—501.
16. Vanner W. R. Structure and reactions of closed duplex DNA // *Ann. Rev. Biophys. and Bioeng.*— 1978.— 7.— P. 287—313.
17. Шурдов М. А., Свиначук Ф. П., Груздев А. Д. Торсионные напряжения в ДНК полигенных хромосом // *Молекуляр. биология.*— 1989.— 23, № 1.— С. 204—214.
18. Watanabe F. Cooperative interaction of histone H1 with DNA // *Nucl. Acids Res.*— 1986.— 14, N 8.— P. 3573—3585.
19. Сиволоб А. В., Храпунов С. Н. Теоретическое рассмотрение механизмов компактизации ДНК поликатионами // *Биофизика.*— 1989.— 34, № 1.— С. 28—33.
20. Studies on the role and mode of operation of the very-lysine-rich histone H1 in eukaryote chromatin. The three structural regions of the histone H1 molecule / P. G. Hartman, G. E. Chapman, T. Moss, E. M. Bradbury // *Eur. J. Biochem.*— 1977.— 77, N 1.— P. 45—51.
21. Studies on the role and mode of operation of the very-lysine-rich histone H1 (F1) in eukaryote chromatin. The properties of the N-terminal and C-terminal halves of histone H1 / E. M. Bradbury, G. E. Chapman, S. E. Danby et al. // *Ibid.*— 1975.— 57, N 2.— P. 521—528.
22. Bode J. On the reaction of fluorescamine with chromosomal proteins // *Anal. Biochem.*— 1979.— 99, N 2.— P. 274—280.
23. Dieterich A. E., Axel R., Cantor C. R. Salt-induced structural changes of nucleosome core particle // *J. Mol. Biol.*— 1979.— 129, N 4.— P. 587—602.
24. Daban J.-R., Cantor C. R. Structural and kinetic study of the self-assembly of nucleosome core particle // *Ibid.*— 1982.— 156, N 4.— P. 749—769.
25. Daban J.-R., Cantor C. R. Role of histone pairs H2a, H2b and H3, H4 in the self-assembly of nucleosome core particle // *Ibid.*— P. 771—789.
26. Isenberg I. Histones // *Ann. Rev. Biochem.*— 1979.— 48.— P. 159—191.
27. Dragan A. I., Khrapunov S. N. The red shift of tyrosine fluorescence spectrum in polyethylenglycol and urea solutions // *Stud. biophys.*— 1983.— 96, N 2.— P. 127—132.
28. Structure of histone tetramer (H3—H4)₂ / S. N. Khrapunov, A. I. Dragan, A. F. Protas, G. D. Berdyshev // *Int. J. Biol. Macromol.*— 1984.— 6, N 1.— P. 26—34.
29. Пространственная организация димера гистонов H2A-H2B в растворах с различной ионной силой / С. Н. Храпунов, А. И. Драган, А. Ф. Протас, Г. Д. Бердышев // *Молекуляр. биология.*— 1983.— 17, № 5.— С. 992—999.
30. The structure of the histone dimer H2A-H2B studied by spectroscopy / S. N. Khrapunov, A. I. Dragan, A. F. Protas, G. D. Berdyshev // *Biochim. et biophys. acta.*— 1984.— 787, N 1.— P. 97—104.
31. Пространственная организация октамера гистонов (H3-H4-H2A-H2B)₂ / С. Н. Храпунов, А. И. Драган, А. Ф. Протас, Г. Д. Бердышев // *Молекуляр. биология.*— 1985.— 19, № 4.— С. 1011—1019.
32. Драган А. И., Храпунов С. Н. Абсорбционные и люминесцентные исследования межмолекулярных взаимодействий тирозинового хромофора. I. Анализ спектров поглощения и флуоресценции // *Биофизика.*— 1989.— 34, № 1.— С. 7—13.
33. Драган А. И., Храпунов С. Н. Абсорбционные и люминесцентные исследования межмолекулярных взаимодействий тирозинового хромофора. II. Влияние полярности растворителя на спектры флуоресценции хромофора // Там же.— № 2.— С. 187—194.
34. Храпунов С. Н., Драган А. И. Спектроскопия межмолекулярных взаимодействий тирозинового хромофора. III. Классификация состояний остатков тирозина в белках по их электронным спектрам // Там же.— № 3.— С. 357—363.
35. Intrinsic fluorescence, difference spectrophotometry and theoretical studies on tertiary structure of calf histone H1 / S. N. Khrapunov, A. F. Protas, A. V. Sivolob et al. // *Int. J. Biochem.*— 1985.— 17, N 2.— P. 217—222.
36. Thomas G. J., Prescott B., Olins D. E. Secondary structure of histones and DNA in chromatin // *Science.*— 1977.— 197, N 4301.— P. 385—388.
37. Eickbush T. H., Moudrianakis E. N. The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions // *Biochemistry.*— 1979.— 17, N 23.— P. 4955—4964.

38. *Helene C., Dimicoli J.-L.* Interaction of oligopeptides containing aromatic amino acids with nucleic acids. Fluorescence and proton magnetic resonance studies // *FEBS Lett.*—1972.—26, N 1.—P. 6—10.
39. *The role of tyrosine in the association of proteins and nucleic acids* / R. Mayer, F. Toulme, T. Montenay-Garestier, C. Helene // *J. Biol. Chem.*—1979.—254, N 1.—P. 75—82.
40. *Helene C., Lancelot G.* Interaction between functional groups in protein-nucleic acid association // *Progr. Biophys. and Mol. Biol.*—1982.—19, N 1.—P. 1—68.
41. *Protein dissociation from DNA in model systems and chromatin* / M. L. Shiffman, R. A. Maciewicz, A. W. Hu et al. // *Nucl. Acids Res.*—1978.—5, N 9.—P. 3409—3426.
42. *Khrapunov S. N., Sivolob A. V., Kucherenko N. E.* Fluorescence study of the interaction of calf thymus histone H1 with DNA // *Int. J. Biol. Macromol.*—1984.—6, N 4.—P. 199—202.
43. *Храпунов С. Н., Сиволоб А. В., Кучеренко Н. Е.* Особенности взаимодействия гистона H1 с ДНК // *Биополимеры и клетка.*—1986.—2, № 1.—С. 39—45.
44. *Структура октамера гистонов в составе реконструированных полинуклеосом* / С. Н. Храпунов, А. В. Сиволоб, А. И. Драган, Г. Д. Бердышев // *Молекуляр. биология.*—1985.—19, № 6.—С. 1553—1561.
45. *Сиволоб А. В., Храпунов С. Н.* Структура октамера гистонов в составе реконструированных полинуклеосом в присутствии гистона H1 и двухвалентных катионов // *Биополимеры и клетка.*—1987.—3, № 4.—С. 192—201.
46. *Libertini L. J., Small E. W.* Effects of pH on low salt transitions of chromatin core particles // *Biochemistry.*—1982.—21, N 14.—P. 3327—3334.
47. *Libertini L. J., Small E. W.* Effects of pH on the stability of chromatin core particles // *Nucl. Acids Res.*—1984.—12, N 10.—P. 4351—4359.
48. *Quadrioglio F., Giancotti V., Crescenzi V.* On the interaction of oligopeptides containing aromatic amino acids with DNA in aqueous solutions // *FEBS Lett.*—1976.—65, N 3.—P. 345—347.
49. *Лакович Дж.* Основы флюоресцентной спектроскопии.—М.: Мир, 1986.—496 с.
50. *Конов С. В.* Электронно-возбужденные состояния биополимеров.—Минск: Наука и техника, 1965.—184 с.
51. *Conformational changes of the chromatin subunit* / V. C. Gordon, C. M. Knobler, D. E. Olins, V. N. Schumaker // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1978.—75, N 2.—P. 660—663.
52. *Structural changes of nucleosomes in low-salt concentrations* / H.-M. Wu, N. Dattagupta, M. Hogan, D. M. Crothers // *Biochemistry.*—1979.—18, N 18.—P. 3960—3965.
53. *Neutron scattering studies of nucleosome structure at low ionic strength* / E. C. Uberbacher, V. Ramakrishnan, D. E. Olins, G. J. Bunick // *Ibid.*—1983.—22, N 21.—P. 4916—4923.
54. *Martinson H. G., True R. J., Burch J. B. E.* Specific histone-histone contacts are ruptured when nucleosomes unfold at low ionic strength // *Ibid.*—1979.—18, N 5.—P. 1082—1089.
55. *The interaction of core histones with DNA: equilibrium studies* / D. R. Burton, M. J. Butler, J. E. Hyde et al. // *Nucl. Acids Res.*—1978.—5, N 10.—P. 3663—3663.
56. *Fulmer A. W., Fasman G. D.* Ionic strength-dependent conformational transitions of chromatin. Circular dichroism and thermal denaturation studies // *Biopolymers.*—1979.—18, N 11.—P. 2875—2891.
57. *Сиволоб А. В., Драган А. И., Храпунов С. Н.* Теоретическое исследование структурного перехода в нуклеосоме при низкой ионной силе // *Молекуляр. биология.*—1987.—21, № 3.—С. 714—723.
58. *Cury P. D., Moss T., Bradbury E. M.* High-resolution proton-magnetic-resonance studies of chromatin core particle // *Eur. J. Biochem.*—1978.—89, N 2.—P. 475—482.
59. *Walker I. O.* Differential dissociation of histone tails from core chromatin // *Biochemistry.*—1984.—23, N 23.—P. 5622—5628.
60. *Oohara I., Wada A.* Spectroscopic studies on histone-DNA interactions // *J. Mol. Biol.*—1987.—196, N 2.—P. 389—411.
61. *Драган А. И., Сиволоб А. В., Храпунов С. Н.* Природа сил, стабилизирующих структуру нуклеосомы. Исследование процесса диссоциации октамера гистонов от ДНК // *Молекуляр. биология.*—1987.—21, № 3.—С. 724—736.
62. *Ishimura S., Mita K., Zama M.* Essential role of arginine residues in the folding of deoxyribonucleic acid into nucleosome cores // *Biochemistry.*—1982.—21, N 22.—P. 5329—5334.

Киев. гос. ун-т им. Т. Г. Шевченко

Получено 18.04.91