

УДК 541.963.3:577.323.23

## БИМОДАЛЬНЫЙ ХАРАКТЕР ИЗОТЕРМЫ РАСТВОРИМОСТИ КОМПЛЕКСОВ ГИСТОНА H1 С КОРОТКИМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ

© 2011 г. Т. Н. Бочарова, Н. П. Квитко, Е. А. Смирнова, А. А. Володин\*

*Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва, 123182*

Поступила в редакцию 02.07.2010 г.  
Принята к печати 15.07.2010 г.

**Ключевые слова:** конденсация ДНК, линкерный гистон, олигонуклеотиды.

**BIMODALITY OF THE SOLUBILITY ISOTERM OF HISTONE H1 COMPLEXES WITH SHORT OLIGONUCLEOTIDES, by T. N. Bocharova, N. P. Kvitko, E. A. Smirnova, A. A. Volodin\* (Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123182 Russia; \*e-mail: img@img.ras.ru).**

**Keywords:** DNA condensation, linker histone, oligonucleotides.

Несмотря на многолетние исследования линкерных гистонов во многих лабораториях мира их биологическая роль и многие физико-химические аспекты их взаимодействия с ДНК остаются непонятными. Традиционно гистон H1 и его варианты рассматривали, главным образом, как агенты, обеспечивающие плотную упаковку хроматина и связанную с этим регуляцию транскрипции (см. обзоры [1, 2]). В настоящее время в результате применения современных подходов выявлен высокодинамичный характер поведения линкерных гистонов в ядре и их участие в широком круге процессов, связанных с функционированием генома (см. обзоры [3, 4]). Это требует существенной переоценки молекулярных активностей линкерных гистонов.

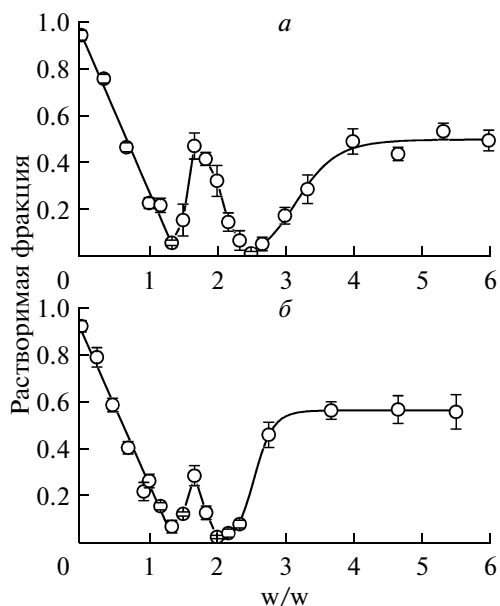
Линкерные гистоны – сильные природные поликатионы и, следовательно, ДНК-конденсирующие агенты. Информация о свойствах конденсированных форм ДНК необходима для понимания механизмов функционирования генетического аппарата клетки, так как конденсация ДНК важна, по-видимому, не только для упаковки и хранения генетической информации, но и способствует действию многих ферментов, участвующих в метаболизме ДНК [5–8]. У исследования конденсатов ДНК есть и прикладной аспект. Так, например, комплексы ДНК с линкерными гистонами рассматривают как перспективные носители для доставки чужеродной ДНК в клетку [9, 10].

Полагают, что главную роль во взаимодействии поликатионов с ДНК играют электростатические силы [11]. При достаточной степени насыщения связанные катионы компенсируют электростатиче-

ский заряд ДНК, что способствует ее осаждению. Однако такое осаждение происходит только в ограниченном диапазоне концентраций поликатиона, выше которого комплексы снова становятся растворимыми. Этот эффект описан в нескольких работах [12, 13] и может быть объяснен инверсией заряда комплекса при связывании избытка положительно заряженного лиганда [12]. Интересно отметить, что осадки комплексов ДНК с низкомолекулярными поликатионами – спермидином и спермином – могут образовывать структурно упорядоченные фазы [12, 14–16].

Агрегаты комплексов ДНК с линкерными гистонами охарактеризованы менее детально, хотя и для них имеются указания на существование структурно упорядоченных форм [17]. Связь этих агрегатов со структурной функцией линкерных гистонов в хроматине остается невыясненной. Их образование может отражать структурную роль гистона в хроматине, где он связывает две нити двуцепочечной ДНК на входе и выходе нуклеосомы [18]. По данным электронной микроскопии комплексы линкерных гистонов с природными ДНК в зависимости от отношения белок/ДНК образуют ряд характерных агрегационных форм, таких как кабель-подобные структуры, тороиды и т.п. (см. например [9, 18]). В работе [19], в частности, наблюдали агрегаты с разными коэффициентами седиментации при весовых отношениях гистон/ДНК приблизительно 0.8 и 2.0. В этих агрегатах нити нуклеобелковых филаментов, по-видимому, уложены регулярным образом, хотя эта регулярность, скорее всего, определена ограниченной гибкостью молекул ДНК, так как сходные формы возникают и при агрегации комплексов ДНК с другими поликатионами [11].

\* Эл. почта: alexvolodin@yahoo.com

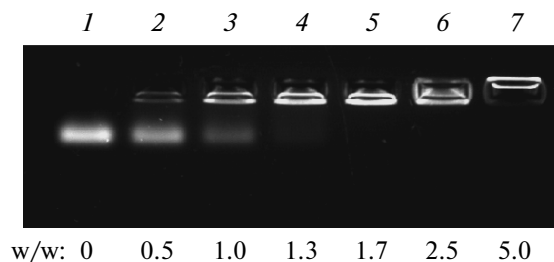


**Рис. 1.** Осаждение комплексов гистона Н1 с олигонуклеотидами центрифугированием. Концентрация ДНК в растворе – 6 мкг/мл (а) и 12 мкг/мл (б). w/w – Весовое отношение гистон/ДНК.

Вопрос о степени и природе структурирования конденсатов требует детального изучения комплексов гистонов с короткими фрагментами ДНК или олигонуклеотидами, когда жесткость молекул ДНК не играет роли, однако, до настоящего времени в литературе представлены только единичные работы, посвященные таким комплексам. Так, в работе [13] изучены комплексы фрагментов ДНК длиной примерно 150 п.н. с линкерным гистонном и протамином. Показано, что осаждение таких комплексов, в отличие от осаждения комплексов с низкомолекулярными катионами, происходит только в очень узком диапазоне отношений белок/ДНК.

В настоящей работе охарактеризованы агрегационные свойства комплексов линкерных гистонов с короткими олигонуклеотидами. Хотя общий характер полученных изотерм растворимости согласуется с описанным ранее [13], в нашей системе они имеют более сложную форму, которая не может быть объяснена в рамках предположения о чисто электростатическом характере взаимодействия линкерных гистонов с ДНК. Существенно меньшая длина фрагментов ДНК, использованных в данной работе, как мы предполагаем, может способствовать образованию конденсатов комплексов с упорядоченной структурой и влиять на эффективность их осаждения.

В работе использовали лиофилизированный препарат гистона Н1 из тимуса телят («Calbiochem», США). Его растворяли в воде и пропускали через гель-фильтрационную колонку с Sephadex G-25. Концентрацию гистона определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции



**Рис. 2.** Электрофорез комплексов гистона Н1 с олигонуклеотидами. Концентрация ДНК в растворе – 6 мкг/мл.

$41000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  при 230 нм [20]. Двунитевые олигонуклеотиды получали отжигом флуоресцентно меченного 21-членника AATGTAAAACAACGGC-CAGTC с комплементарным немеченым, как описано нами ранее [21].

Связывание гистона с олигонуклеотидами, осаждение и электрофорез их комплексов проводили в буфере: 40 мМ Трис-ацетата, рН 7.4, 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Комплексы составляли при комнатной температуре и после короткой инкубации наносили на гель 1.5%-ной агарозы, либо подвергали центрифугированию (16000 g, 3 мин). Объем образца при центрифугировании составлял 30 мкл. После центрифугирования отбирали 15 мкл супернатанта, затем к отобранной и оставшейся в пробирке фракциям добавляли додецилсульфат натрия до концентрации 0.2%, чтобы растворить осадок. По 10 мкл этих растворов переносили в микропланшеты для иммунологических реакций, которые сканировали на фосфо/флуоримаджере Storm 840 («Amersham Bioscience», США). По отношению количества флуоресцирующего материала в верхней и нижней фракциях вычисляли долю растворимого комплекса.

На рис. 1 представлены изотермы растворимости комплексов олигонуклеотидов с гистонном Н1. Видно, что эффективное осаждение комплексов происходит в ограниченном диапазоне отношений белок/ДНК, и кривая титрования имеет бимодальный характер. С максимальной эффективностью осаждение происходит при двух значениях весового отношения гистон/ДНК w/w – 1.3 и 2.5. Кривые титрования отражают зависимость растворимости от отношения гистон/ДНК, а не общей концентрации гистона в растворе, так как двукратное увеличение концентрации олигонуклеотида не приводит к существенному изменению формы изотермы растворимости, нормированной на отношение гистон/ДНК (рис. 1б).

На рис. 2 представлены результаты электрофореза комплексов гистона Н1 с олигонуклеотидами при весовых отношениях гистон/ДНК, соответствующих особенностям на изотермах растворимости. Полное связывание олигонуклеотида белком происходит при w/w = 1.3, соответствующем первому минимуму растворимости комплекса, и сохраняется

при более высоких отношениях. Комплексы олигонуклеотидов с гистоном не входят в гель, а собираются на границах лунок. Причем, если весовое отношение меньше 2.5, они собраны на границе, ближней к аноду (дорожки 2–5), т.е. сохраняют направление миграции, характерное для свободной ДНК. При увеличении весового отношения комплексы меняют направление миграции, и их задержка происходит на границе лунки, ближней к катоду (дорожка 7), что указывает на смену знака заряда комплексов при высоких весовых отношениях гистон/ДНК. Изменение направления миграции происходит при  $w/w = 2.5$ , что соответствует одному из минимумов на изотерме растворимости (см. рис. 1а). Это свидетельствует о близости комплексов к точке электронейтральности. Таким образом, эффективная конденсация комплексов в этих условиях может быть объяснена компенсацией электростатических зарядов гистона и ДНК. В то же время, существование еще одного минимума растворимости комплексов ( $w/w = 1.3$ ) указывает на то, что эффективное осаждение комплексов возможно и в точке, довольно далекой от их электронейтральности.

Возможны два объяснения этого явления, не исключаящие друг друга. Одно из них – существование разных типов укладок комплексов в конденсатах в зависимости от отношения белок/ДНК. О такой возможности свидетельствуют данные по фазово-контрастной микроскопии конденсатов комплексов ДНК со спермидином [12, 14, 15], которые указывают на существование упорядоченных конденсатов, по крайней мере, двух типов. Оптимумы осаждения комплексов гистона H1 с ДНК в этом случае могут соответствовать образованию конденсатов разной структуры. Второе объяснение – бивалентный характер связывания линкерных гистонов с ДНК. В пользу этой возможности говорит кратность двум весовых отношений гистон/ДНК, при которых существуют минимумы на изотерме растворимости. Способность молекулы гистона к одно-временному связыванию двух молекул двунитевой ДНК показана в ряде работ [22, 23]. Бимодальность изотерм растворимости комплексов гистонов с олигонуклеотидами можно объяснить последовательным заполнением этих двух центров связывания при повышении степени насыщения белка олигонуклеотидом. Разумно предположить, что агрегация комплексов гистон-ДНК требует их гомогенности, которой можно достичь либо полным насыщением обоих центров связывания ДНК на молекуле гистона олигонуклеотидом, либо “полунасыщением”, когда каждая молекула гистона связывает олигонуклеотид только в одном из своих центров. При промежуточных весовых отношениях гистон/ДНК в растворе существуют комплексы с разными степенями заполнения молекул гистона олигонуклеотидами, что может быть неблагоприятным для образования конденсатов с упорядоченной структурой.

Наш вывод о близости к электронейтральности комплексов с весовым отношением  $w/w = 2.5$  согласуется с данными работы [13], в которой осаждение комплексов наблюдали в диапазоне  $w/w = 2.0–2.6$ . В этом же диапазоне расположена и точка электронейтральности комплексов. В то же время, авторы работы [13], в отличие от нас, наблюдали только один минимум растворимости. Вероятно, комплексы с более длинными фрагментами ДНК менее эффективно образуют конденсаты с регулярной структурой, и в этом случае процесс происходит только в условиях, при которых ему способствует компенсация заряда ДНК.

Способность молекулы гистона связывать две двунитевые молекулы ДНК, по-видимому, не обусловлена чисто электростатическими эффектами, так как такой способностью обладают и слабозаряженные глобулярные домены линкерных гистонов [22, 24]. С другой стороны, простой компенсацией электростатических зарядов сложно объяснить наличие двух минимумов на изотерме растворимости. Таким образом, бимодальный характер изотермы растворимости комплексов гистона с олигонуклеотидами может быть следствием ситуации, когда в агрегации этих комплексов играют роль как электростатические эффекты, так и структурные факторы.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (10-04-01057).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Готов Б.О., Николаев Л.Г. 1983. Структура, химическая модификация и взаимодействие гистона H1 с компонентами хроматина. *Молекуляр. биология*. **17**, 891–915.
2. Zlatanova J., Yaneva J. 1991. Histone H1-DNA interactions and their relation to chromatin structure and function. *DNA Cell Biol.* **10**, 239–248.
3. Raghuram N., Carrero G., Th'ng J., Hendzel M.J. 2009. Molecular dynamics of histone H1. *Biochem. Cell Biol.* **87**, 189–206.
4. Woodcock C.L., Skoultchi A.I., Fan Y. 2006. Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosome Res.* **14**, 17–25.
5. Gonda D.K., Radding C.M. 1986. The mechanism of the search for homology promoted by recA protein. Facilitated diffusion within nucleoprotein networks. *J. Biol. Chem.* **261**, 13087–13096.
6. Bianco P.R., Bradfield J.J., Castanza L.R., Donnelly A.N. 2007. Rad54 oligomers translocate and cross-bridge double-stranded DNA to stimulate synapsis. *J. Mol. Biol.* **374**, 618–640.
7. Baeza I., Gariglio P., Rangel L.M., Chavez P., Cervantes L., Arguello C., Wong C., Montanez C. 1987. Electron microscopy and biochemical properties of polyamine-compacted DNA. *Biochemistry*. **26**, 6387–6392.

8. Krasnow M.A., Cozzarelli N.R. 1982. Catenation of DNA rings by topoisomerases. Mechanism of control by spermidine. *J. Biol. Chem.* **257**, 2687–2693.
9. Haberland A., Bottger M. 2005. Polycation-mediated transfection: how to overcome undesirable side effects of sticky DNA complexes. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **42**, 97–106.
10. Lucius H., Haberland A., Zaitsev S., Dalluge R., Schneider M., Bottger M. 2001. Structure of transfection-active histone H1/DNA complexes *Mol. Biol. Rep.* **28**, 157–165.
11. Bloomfield V.A. 1997. DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers.* **44**, 269–282.
12. Pelta J., Livolant F., Sikorav J.L. 1996. DNA aggregation induced by polyamines and cobalthexamine. *J. Biol. Chem.* **271**, 5656–5662.
13. Raspaud E., Pelta J., de Frutos M., Livolant F. 2006. Solubility and charge inversion of complexes of DNA and basic proteins. *Phys. Rev. Lett.* **97**, 068 103.
14. Pelta J.Jr., Durand D., Doucet J., Livolant F. 1996. DNA mesophases induced by spermidine: structural properties and biological implications. *Biophys. J.* **71**, 48–63.
15. Sikorav J.L., Pelta J., Livolant F. 1994. A liquid crystalline phase in spermidine-condensed DNA. *Biophys. J.* **67**, 1387–1392.
16. Qiu X., Andresen K., Lamb J.S., Kwok L.W., Pollack L. 2008. Abrupt transition from a free, repulsive to a condensed, attractive DNA phase, induced by multivalent polyamine cations. *Phys. Rev. Lett.* **101**, 228 101.
17. Moran F., Montero F., Azorin F., Suau P. 1985. Condensation of DNA by the C-terminal domain of histone H1. A circular dichroism study. *Biophys. Chem.* **22**, 125–129.
18. Izzo A., Kamieniarz K., Schneider R. 2008. The histone H1 family: specific members, specific functions? *Biol. Chem.* **389**, 333–343.
19. Bottger M., von Mickwitz C.U., Scherneck S., Grade K., Lindigkeit R. 1981. Interaction of histone H1 with superhelical DNA. Sedimentation and electron microscopical studies at low salt concentration *Nucl. Acids Res.* **9**, 5253–5268.
20. Kohlstaedt L.A., Cole R.D. 1994. Specific interaction between H1 histone and high mobility protein HMG1. *Biochemistry.* **33**, 570–575.
21. Volodin A.A., Bocharova T.N., Smirnova E.A., Camerini-Otero R.D. 2009. Reversibility, equilibration, and fidelity of strand exchange reaction between short oligonucleotides promoted by RecA protein from *Escherichia coli* and human Rad51 and Dmc1 proteins. *J. Biol. Chem.* **284**, 1495–1504.
22. Goytisolo F.A., Gerchman S.E., Yu X., Rees C., Graziano V., Ramakrishnan V., Thomas J.O. 1996. *EMBO J.* **15**, 3421–3429.
23. Ellen T.P., van Holde K.E. 2004. Linker histone interaction shows divalent character with both supercoiled and linear DNA. *Biochemistry.* **43**, 7867–7872.
24. Thomas J.O., Rees C., Finch J.T. 1992. Cooperative binding of the globular domains of histones H1 and H5 to DNA. *Nucl. Acids Res.* **20**, 187–194.