

CERCETĂRI POLAROGRAFICE PRIVIND CONȚINUTUL TIOLIC AL ACIZILOR NUCLEICI ȘI AL PROTEINELOR BAZICE NUCLEARE (HISTONE)

V. A. Blazsek, L. Bukaresti

Cercetările lui Brdicka (10) au evidențiat rolul primordial al grupelor -SH în apariția undelor catalitice a proteinelor. După unii autori (10), în această reacție au rol în afara cisteinei și alți aminoacizi (tirozina, arginina, lizina și asparagina). În ultimul timp însă s-au publicat mai multe lucrări care dovedesc că undele catalitice nu apar în lipsa grupei -SH și deci aminoacizii amintiți au numai rolul de a modifica aspectul undelor: *Blazsek și Bukaresti*, 1964 (5); *Zikan și Kalous*, 1966, 1967 (27, 28); *Ruttkay-Nedecky*, 1967 (23). Cu ajutorul metodei polarografice — în condiții de experiență adecvate — cisteina liberă poate fi diferențiată de cea legată de proteine (3, 10).

Deoarece grupa -SH legată de proteine poate fi pusă în evidență în mod specific și cu o sensibilitate mărcată prin metoda polarografică am presupus că, metoda poate fi aplicată în detectarea impurităților de proteină străină cu conținut tiolic, din proteine bazice nucleare (histone), precum și în evidențierea urmelor de proteină din preparate de acizi nucleici. Experiența model efectuată de *Berg* (1) se referă la utilitatea metodei polarografice în acest scop.

Rezultatele noastre obținute pînă acum pot fi sintetizate în lucrarea de față.

Am considerat necesară clarificarea rolului grupei -SH a cisteinei în apariția undelor catalitice. Astfel, am constatat dispariția activității polarografice atît în cazul albuminei din serul bovin cît și în cel al preparatelor de ARN după oxidarea lor cu acidul performic (2). Este cunoscut faptul că acidul cistic obținut în urma oxidării este polarografic inactiv și astfel dispariția unei dovedește rolul *exclusiv* al grupelor -SH în declanșarea activității. Această metodă de oxidare a fost folosită recent și de către *Zikan și Kalous* (28) pentru a dovedi rolul cheie al grupelor -SH în apariția undelor catalitice.

Preparatele deproteinate de acizi nucleici conțin în general impurități proteice în concentrație mai mică de 1 %. Determinarea unei cantități de proteine atît de mici prin metodele uzuale (Lowry, biuret etc.) întîmpină greutăți. După observațiile noastre (2) prin analiza polarografică se pot detecta cu siguranță proteine în concentrație de 0,3 %, pe lîngă ARN-ribosomal obținut din drojdie de bere prin metoda fenolică. ARN-ribosomal din ficatul de vițel și de găină preparat cu metoda fenolică s-a dovedit a fi polarografic inactiv, deci practic lipsit de proteine. În schimb ARN obținut prin metoda Sevag, dodecilsulfat de sodiu sau prin degradare termică a prezentat o netă activitate polarografică (2).

Datele polarografice dovedesc deci clar că, dintre procedeele folosite pentru obținerea ARN numai metoda fenolică asigură un preparat pur, lipsit de proteine.

ADN obținut prin metoda fenolică din eritrocite de găină s-a prezentat din punct de vedere polarografic asemănător cu ARN (3). Din această obser-

vație ar decurge superioritatea metodei fenolice și în cazul ADN. Însă nu pot fi scăpate din vedere următoarele:

1. Unele fracțiuni de histonă (F_1 , F_{2a} și F_{2b}) nu pot fi evidențiate pe lângă ADN, deoarece nu conțin cisteină (5).

2. Fracțiunea F_3 , cu conținut -SH redus (5), este prezentă în cantitate foarte mică în ADN preparat cu fenol, deci punerea ei în evidență nu se poate realiza polarografic.

Histonele au fost cunoscute ca proteine lipsite de cisteină (9), recent însă în histona din timusul de vițel parțial fracționată s-au pus în evidență cantități reduse de cisteină (18).

Este cunoscut că, în cursul hidrolizei acide a proteinelor cisteina se descompune într-o măsură considerabilă. După părerea noastră tocmai datorită acestei descompuneri se poate explica faptul că nu s-a putut pune în evidență cisteina din histone. Metoda polarografică permite însă detectarea sensibilă a cisteinei și din proteine *intacte*, nehidrolizate.

Afirmatia că fracțiunea F_3 conține gruparea -SH se bazează pe cercetările noastre anterioare (1964) asupra histonei din eritrocitele de găină. Aplicând metoda polarografică am constatat că dintre cele patru fracțiuni obținute pe coloana de CM-celuloză numai fracțiunea F_3 conține grupe -SH (5).

Deformarea undelor proteice și scăderea înălțimii lor, observată la concentrații mari de histonă, poate fi explicată prin formarea agregatelor moleculare proteice la pH alcalin. Astfel, formarea complexului Co^{3+} -histonă va fi imposibilă din cauze sterice și proteina polarografic activă va deveni inactivă. Prin aceasta se poate explica de ce în 1936 *Hamer* nu a putut pune în evidență prin metoda polarografică (13) cisteina în histona din timusul de vițel.

Observațiile noastre au fost confirmate de *Phillips* în 1965 (22) și de *Jellum* în 1966 (15), ei au ajuns la rezultate similare și în cazul histonei timusului de vițel.

Comparând activitatea polarografică a fracțiunilor histonice din timus de vițel obținute prin fracționare cu solvenți organici (metoda lui *Johns*), respectiv pe coloana de CM-celuloză, s-au dovedit omogene numai fracțiunile obținute prin ultima metodă (4, 7). Histonă- F_1 conține ca impuritate o proteină nehistonică, iar histonele F_{2a} și F_{2b} conțin histona F_3 (7). Am constatat de asemenea că, fracțiunile impure pot fi în continuare purificate pe coloana de CM-celuloză (7).

Histonele obținute din splina de vițel, din ficatul de șoarece și din tumoarea ascitică Ehrlich au prezentat proprietăți polarografice identice cu cele ale histonei din timusul de vițel (7).

Cu metoda lui *Ellman* recent introdusă pentru dozarea grupelor tiolice am obținut rezultate concordante cu datele polarografice (8).

Histonă- F_1 obținută prin metoda lui *Johns* a fost activă polarografic, pe când histona F_1 , obținută pe CM-celuloză, s-a dovedit *inactivă*. Aceste două fracțiuni n-au putut fi diferențiate pe gel de amidon (7). Impuritatea fracțiunii F_1 a putut fi evidențiată numai prin metoda polarografică, din această cauză considerăm important controlul polarografic al fracțiunilor histonice (6).

Pe baza cercetărilor din ultimii ani, este în formare tabloul unui mecanism care realizează proprietățile genetice ale celulelor. Se cunosc din ce în ce mai multe dovezi care subliniază rolul fundamental al histonelor în acest proces (23). Aceste proteine acționează prin inhibarea activității de templat al ADN (23). Se pare că, acest proces reglator al represării genelor se realizează prin metilarea (16), acetilarea (27), fosforilarea (17) histonelor și în deosebi prin echilibrul 2 histonă-SH \rightleftharpoons histonă-S-S-histonă (23).

Se cunosc mai multe observații după care dintre cele patru componente principale histonice (F_1 , F_{2a} , F_{2b} și F_3), histona F_3 (bogată în arginină) — poate tocmai din cauza conținutului tiolic — are un rol deosebit în acest proces de reglare. Viteza biosintezei histonei bogate în arginină este mai mare decât cea a componentelor bogate în lizină (25). Inactivarea cromatinei celulare poate fi atribuită histonei bogate în arginină (19). Legăturile intermoleculare între grupele -SH modifică efectul de inhibare al histonei F_3 asupra activității de templat (11, 14). Metabolismul proteic și al ARN al cromatinei laxe este mult mai intens decât cel al cromatinei dense (12). Este de remarcat faptul că, histona bogată în arginină obținută din cromatina densă conține mai multe disulfide decât histona F_3 extrasă din cromatina laxă (20).

S-a constatat de asemenea că histona F_3 este acceptorul de metil cel mai activ (16). Hidrocortizonul este legat în cantitățile cele mai mari de către histona F_3 . Cantitatea steroidei legate crește concomitent cu scăderea numărului legăturilor -SS- (26).

Studiul detaliat al conținutului cisteinic al histonelor are o importanță biologică deosebită, cercetările din acest domeniu deschizând drumul spre cunoașterea unui nou proces metabolic al mecanismului de activare a genelor.

Sosit la redacție: 11 martie 1970.

Bibliografie

1. BERG H.: Biochem. Ztg. (1957), 329, 274; 2. BLAZSEK V. A., BUKARESTI L.: Biochim. Biophys. Acta (1962), 61, 970; 3. BLAZSEK V. A., BUKARESTI L.: Rev. Med. (1963), 9, 156; 4. BLAZSEK V. A., BUKARESTI L.: A III-a Conferință Republicană de Chimie, Timișoara 1966, 274; 5. BLAZSEK V. A., BUKARESTI L.: Experientia (1964), 20, 369; 6. BLAZSEK V. A., BUKARESTI L.: Conferința comemorativă de polarografie „Acad. J. Heyrovsky”, București 1967; 7. BLAZSEK V. A., BUKARESTI L.: Analyt. Biochem. (1967), 18, 572; 8. BLAZSEK V. A.: în curs de apariție; 9. BONNER J., T'SO P.O.P.: The Nucleohistones, Holden-Day, Inc., San Francisco, 1964, 15; 10. BREZINA M., ZUMAN P.: Die Polarographie in der Medizin, Biochemie und Pharmazie, Akad. Verlag Leipzig, 1957, 535; 11. FAMBROUGH D. M., BONNER J.: Biol. Chem. (1962), 243, 4434; 12. FRENSTER J. H., ALLFREY V. G., MIRSKY A. E.: Proc. nat. Acad. Sci., (1963), 50, 1026; 13. HAMER D.: Nature (1951), 167, 40; 14. HILTON J., STOCKEN L. A.: Biochem. J. (1966), 100, 210; 15. JEILUM E.: Biochim. Biophys. Acta (1966), 115, 95; 16. KAYS A. M., SHERATZKY D.: Biochim. Biophys. Acta (1969), 190, 527; 17. LANGAN T. A.: J. Biol. Chem. (1969), 244, 5763; 18. MARSH W. H., ORD M. G., STOCKEN L. A.: Biochem. J. (1964), 93, 539; 19. ONO T., TERAYAMA H., TAKAKU F., NAKAO K.: Biochim. Biophys. Acta (1969), 179, 214; 20. ORD M. G., STOCKEN L. A.: Biochem. J. (1966), 98, 888; 21. ORD M. G., STOCKEN L. A.: Biochem. L., Biochem. J. (1968), 107, 403; 22. PHILLIPS D. M. P.: Biochem. J. (1965), 97, 669; 23. REUCK A. V. S. DE, KNIGHT J.: Histones. Their role in the transfer of genetic information, Little, Brown and Company, Boston, 1966, 62; 24. RUTTKAY-NEDECKY G., ANDRELOVA A.: Nature (1967), 213, 564; 25. SADGOPAL A., BONNER J.: Biochim. Biophys. Acta (1969), 186, 349; 26. SLUYSER M.: Biochim. Biophys. Acta (1969), 182, 235; 27. TAKAKU F., NAKAO K., ONO T., TERAYAMA H.: Biochim. Biophys. Acta (1969), 195, 396; 28. ZIKAN J., KALOUS V.: Collection (1966), 31, 4513; 29. ZIKAN J., KALOUS V.: Collection (1967), 32, 246.