

## STUDIUL CANTITATIV ASUPRA GRUPĂRILOR TIOLICE ŞI DISULFIDICE AL FRAȚIUNILOR DE HISTONĂ DIN TIMUSUL DE VIȚEL

V. A. Blazsek

Histonele au fost cunoscute ca proteine lipsite de cisteină (13), recent însă în diferite histone s-au pus în evidență cantități reduse de cisteină (2,6).

În cursul cercetărilor noastre anterioare am constatat că fracțiunea  $F_3$  din histona eritrocitelor de găină conține grupări tiolice (2, 3, 4). Phillips (14), și Jellum (9) au ajuns la rezultate similare și în cazul histonei timusului de vițel.

În continuarea acestor lucrări, ne-am ocupat de urmărirea repartizării grupărilor — SH și — SS — în cele cinci fracțiuni de histonă izolate din timusul de vițel.

### Material și metodă

Grupările tiolice s-au determinat după metoda lui Ellman (7), iar grupările —SS— au fost determinate după reducere cu borohidridă de sodiu prin metoda lui Moore și colab. (12). Valorile medii găsite au fost exprimate în  $\mu\text{M}$  — SH sau —SS— și raportate la 1 g proteină. Toate rezultatele reprezintă media a trei determinări din trei preparate diferite.

Concentrația proteinei s-a determinat cu metoda lui Lowry (1).

Pentru prepararea fracțiilor de histonă ( $F_1$ ,  $F_{2a}$ ,  $F_{2b}$  și  $F_3$ ) s-a folosit metoda de extracție directă din țesut după Johns (11). (Metoda I).

Purificarea fracțiilor astfel obținute s-a efectuat cu ajutorul coloanei cu CM-celuloză (10). (Metoda I-a).

La eluția fracțiunii  $F_3$  s-a introdus o modificare: eluția s-a făcut la două molarități — soluția de HCl 0,015 M și 0,020 M — obținându-se astfel fracțiunile  $F_{3a}$  și  $F_{3b}$ .

Această eluție modificată s-a mai folosit pentru obținerea fracțiilor ( $F_1$ ,  $F_{2a}$ ,  $F_{2b}$ ,  $F_{3a}$  și  $F_{3b}$ ) din histonă crudă preparată din nucleee spălate după metoda expusă într-o lucrare anterioară (4). (Metoda II).

Controlarea omogenității fracțiilor obținute s-a făcut pe gel de amidon, condițiile de analiză fiind descrise în altă lucrare (3).

Tehnica „amprentelor” s-a efectuat după Ingram (8) modificată de noi (5).

### Rezultate

Datele privind repartizarea grupărilor tiolice și disulfidice în fracțiunile de histonă preparate prin metoda I sînt cuprinse în tabelul nr. 1.

Tabelul nr. 1

Valorile medii ale grupărilor tiolice și disulfidice în fracțiunile de histonă preparate prin metode I și Ia

( $\mu$ M —SH sau —SS— / 1 g histonă)

Fracțiunea	F <sub>1</sub>		F <sub>2a</sub>		F <sub>2b</sub>		F <sub>3</sub>		
	I	Ia	I	Ia	I	Ia	I	Ia	
Grupări —SH	2,4	0,0	13,4	0,0	14,0	0,3	34,2	1,8+	2,6++
Grupări —SS—	3,6	4,1	5,5	4,9	2,8	7,3	3,5	18,8+	31,6++

+ Fracțiunea  $F_{3a}$

++ Fracțiunea  $F_{3b}$

Urmărind repartizarea conținutului de grupări tiolice în fracțiunile obținute după metoda I, se observă că fracțiunea  $F_3$  este dotată cu cea mai mare cantitate de —SH. Însă, o cantitate de —SH cu 50 % mai mică a fost găsită și în fracțiunile de  $F_{2a}$  și  $F_{2b}$ , și o cantitate apreciabilă în fracțiunea  $F_1$ . Grupările —SS— se găsesc în cantitate relativ mai mică în aceste fracțiuni.

Din datele experimentale în general se constată creșterea concentrației grupărilor —SS— în fracțiunile purificate pe coloana cromatografică (Metoda Ia). Paralel cu aceasta se înregistrează și o scădere a numărului de grupări —SH libere.

Distribuția grupărilor tiolice și disulfidice pe fracțiunile preparate prin metoda II este prezentată în tabelul nr. 2.

Din datele obținute, reiese creșterea semnificativă a conținutului de grupări —SS— și concomitent scăderea grupărilor —SH în fracțiunile preparate prin metoda II.

Comparînd conținutul de grupări —SH și —SS— din fracțiunile de histonă preparate prin metoda I și cel din fracțiunile de histonă preparate prin metoda II, se constată un conținut mai mare de —SS— în fracțiunile din urmă.

Tabelul nr. 2

Valorile medii ale grupărilor tiolice și disulfidice în fracțiunile de histonă preparate prin metoda II  
( $\mu\text{M}$  —SH sau —SS— / 1 g histonă)

Fracțiunea	F <sub>1</sub>	F <sub>2a</sub>	F <sub>2b</sub>	F <sub>3a</sub>	F <sub>3b</sub>
Grupări —SH	0,0	0,0	0,5	2,3	0,2
Grupări —SS—	3,6	3,2	3,2	15,1	17,0

O altă constatare, care se desprinde din rezultatele obținute este scăderea conținutului total de grupări —SH (—SH + —SS—) în fracțiunile de histonă preparate prin metoda II față de conținutul total de —SH al fracțiilor de histonă preparate prin metoda I, fapt ce reiese din datele prezentate în tabelul nr. 3.

Tabelul nr. 3

Valorile medii ale grupărilor tiolice totale în fracțiunile de histonă  
( $\mu\text{M}$  —SH / 1 g histonă)

Fracțiunea	F <sub>1</sub>	F <sub>2a</sub>	F <sub>2b</sub>	F <sub>3a</sub>	F <sub>3b</sub>	F <sub>3</sub>
Metoda I	9,6	24,4	19,6	—	—	41,2
Metoda Ia	8,2	9,8	14,9	39,4	65,8	—
Metoda II	7,2	6,4	6,9	32,5	34,2	—

Din datele prezentate rezultă că, cromatografierea fracțiilor de histonă îndepărtează o bună parte din proteinele de balast cu conținut tiolic.

Purificarea pe coloană cromatografică a fracțiilor de histonă preparate prin metoda I micșorează conținutul tiolic total al fracțiilor F<sub>2a</sub> și F<sub>2b</sub>, rezultând un conținut în tiol total în general asemănător cu cel din fracțiunile preparate prin metoda II. Faptul că, conținutul tiolic în fracțiunea F<sub>3b</sub> obținută prin metoda I-a este ridicat, indică posibilitatea ca acest conținut de —SH total mărit față de cel al fracțiunii purificate prin metoda II să fie datorit unei impurificări proteice. Prin analiza electroforetică în gel de amidon s-a constatat că fracțiunile F<sub>2a</sub> și F<sub>2b</sub> sînt contaminate cu fracțiunile F<sub>3</sub>.

La electroforeza fracțiunii F<sub>3</sub> se evidențiază două benzi, dintre care una cu mobilitate scăzută corespunzînd fracțiunii F<sub>3a</sub>, iar cealaltă fracțiunii F<sub>3b</sub>, constatări care se desprind și din rezultatele obținute pe coloana cromatografică.

Tipurile de imagineare (amprente) care s-au obținut prin digestia triptică a fracțiilor F<sub>3a</sub> și F<sub>3b</sub> sînt prezentate în fig. 1 și 2, constatîndu-se o asemănare între amprentele acestor fracțiuni.

#### Discuții

Ca o caracteristică generală, se remarcă concentrarea grupărilor —SH pe fracțiunile F<sub>3a</sub> și F<sub>3b</sub>. Faptul, că numărul de grupări —SS— din fracțiunile trecute prin coloană este mai crescut, sugerează posibilitatea că prin cromatografie procesele de oxidare sînt mai accentuate, decît prin tehnică de extragere directă (Me-

V. A. BLAZSEK: STUDIUL CANTITATIV ASUPRA GRUPARILOR TIOLICE SI  
DISULFIDICE AL FRACTIUNILOR DE HISTONĂ DIN TIMUSUL DE VIȚEL

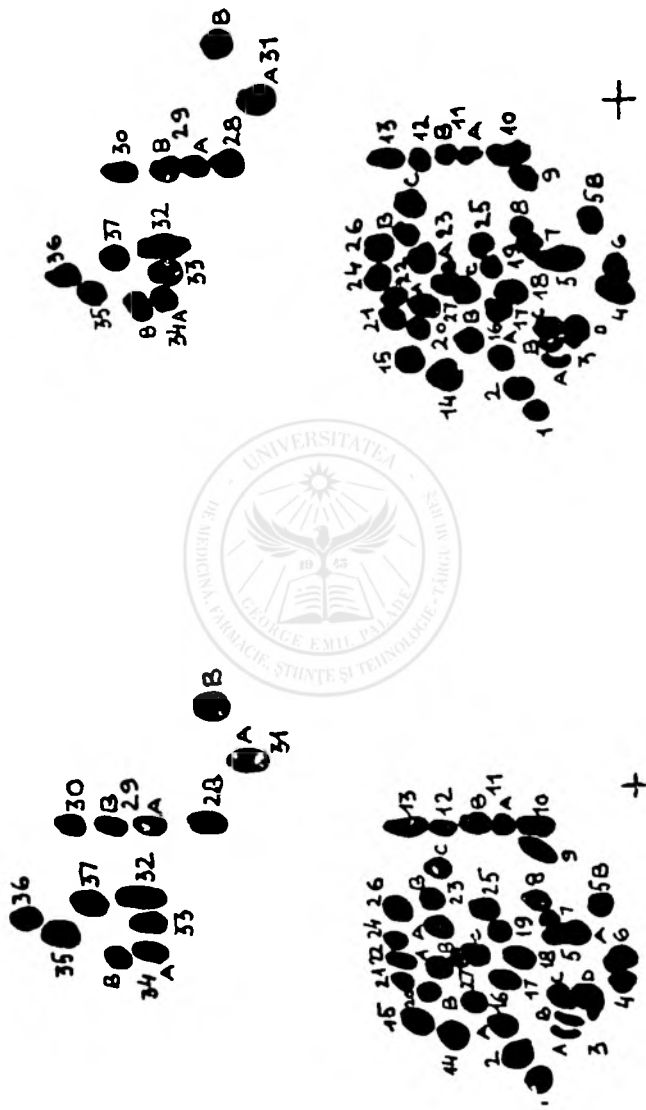


Fig. nr. 1. Amprenta fracțiunii F3a de histonă izolată din timusul de vițel (aspect calitativ)

Fig. nr. 2: Amprenta fracțiunii F3b de histonă izolată din timusul de vițel (aspect calitativ)

toda I). Aceasta se poate datoră, atât structurii suficient de deschise a moleculelor de proteină din fracțiunile  $F_{3a}$  și  $F_{3b}$ , cit și condițiilor de mediu în care s-au preparat fracțiunile amintite.

Din rezultate se constată că, cromatografierea pe CM-celuloză a fracțiunii  $F_3$  (metoda II și metoda III) permite separarea fracțiunii  $F_{3a}$  de  $F_{3b}$  cu conținut identic de grupări tiolice totale. Acest rezultat trebuie interpretat în sensul că, cele două fracțiuni de histonă posedă un număr egal de grupări —SH și se deosebesc numai prin greutatea moleculară și încărcarea lor electrică.

Datele noastre arată că, o singură cromatografiere a fracțiunilor de histonă nu ridică puritatea acestora la gradul dorit, ea este totuși necesară pentru reținerea proteinelor balast cu conținut tiolic. Nu este exclus însă că, cromatografierea fracțiunilor într-un mediu reducător pentru punțile disulfidice ar permite obținerea componentelor historici într-un grad de puritate și mai ridicată.

Constatările asupra prezenței grupărilor —SH reactive în moleculele de histone  $F_{3a}$  și  $F_{3b}$  ne-au permis să facem presupunerea în concordanță cu alți autori că, componentii de histonă amintiți ar putea avea un rol deosebit în procesul de replicare al ADN-ului sau în transferul de informație de la ADN la sistemul de biosinteză al proteinelor.

În acest sens, nu trebuie exclusă posibilitatea că această activitate a histonelor se datorește unui echilibru între grupările —SH și punțile disulfidice, echilibrul schimbându-se după necesitățile proceselor de reglare al transferului de informații genetice.

*Sosit la redacție: 2 decembrie 1970*

#### Bibliografie

1. BAILEY J. L.: Techniques in Protein Chemistry, Ed. Elsevier, Amsterdam, 1962;
2. BLAZSEK V. A., BUKARESTI L.: Experientia (1964), 20, 369;
3. BLAZSEK V. A., BUKARESTI L.: Analyt. Biochem. (1967), 18, 572;
4. BLAZSEK V. A., BUKARESTI L.: Rev. Med. (1970), 16, 2, 183;
5. BLAZSEK V. A.: În curs de redactare;
6. DEAKIN H., MARSH W. H., STOCKEN L. A.: Biochem. J. (1964), 93, 539;
7. ELLMAN G. L.: Arch. Biochem. Biophys. (1959), 82, 70;
8. INGRAM V. M., NEURATH H., TUPPY H.: Proteins Proc. IV. Int. Congr. Biochem. Vienna, Ed. Pergamon Press, London, 1960;
9. JELLMU E.: Biochim. Biophys. Acta (1966), 115, 95;
10. JOHNS E. W., PHILLIPS D. M. P., SIMSON P., BUTLER J. A. V.: Biochem. J. (1960), 77, 631;
11. JOHNS E. W.: Biochem. J. (1964), 92, 55;
12. MOORE S., COLE R. D., GUNDLACH H. G., STEIN W. H.: (cit. 8);
13. MURRAY K. in vol. de BONNER J., Ts'o P.O.P.: The Nucleohistones, Ed. Holden-Day, Inc., San Francisco, 1961;
14. PHILLIPS D. M. P.: Biochem. J. (1965), 97, 669