

CERCETAREA LEGĂTURII DINTRE RAPORTUL DE TIOL/DISULFURA DIN NUCLEOZOMI ȘI ACTIVITATEA GENETICĂ CELULARĂ. IV. COMPOZIȚIA CHIMICĂ A SUBUNITĂȚILOR DIN CROMATINA DE FICAT DE ȘOARECI

V. A. Blazsek

În cadrul cercetărilor anterioare (1, 2, 3) s-a urmărit prepararea subunităților de cromatină din ficat de șoareci și din celulele tumorale ascitice Ehrlich (TAE), precum și purificarea lor prin cromatografia pe coloană de agaroză. Pe această cale s-a reușit separarea fracțiunilor subcromozomiale cu raportul de absorbție specific la nucleozomi.

Lucrarea de față este continuarea preocupărilor noastre anterioare legate de unele aspecte moleculare ale activității genetice celulare și pentru aceasta ne-am propus să urmărim compoziția chimică a subunităților din cromatina de ficat de șoareci.

Material și metodă

Prepararea cromatinei normale din ficatul de șoareci și purificarea ei printr-o metodă cromatografică pe gel de agaroză s-a făcut după tehnica descrisă în lucrările anterioare (2, 3).

Dozarea compoziției de cromatină fracționată. Raportul de proteină/ADN nucleozomal s-a calculat cu ajutorul formulei generale propuse de Tuan și Bonner (4):

$$\text{Conținutul proteic în g/g} = \frac{E_{P\ 260}^{DNH}}{30,99 \cdot E_{230}^{H\ 1^{\circ}}} \cdot \frac{A_{270}^{DNI}}{A_{230}^{DNI}} - \frac{A_{230}^{ADN}}{A_{260}^{ADN}}$$

unde

$E_{P\ 260}^{DNI} = 6650$ Această valoare a fost calculată pe baza absorbției DNH sintetică (artificială), preparată de noi din histona totală și ADN din ficat de șoareci, raportul H/ADN = 1,08.

$E_{230}^{H\ 1^{\circ}} = 42,5$ (5)

$\frac{A_{230}^{ADN}}{A_{260}^{ADN}} = 0,37$ Această valoare a fost calculată pe baza absorbției de ADN, preparat de noi din ficat de șoareci.

Dozarea grupărilor SH actual-neaccesibil s-a făcut cu reactivul DTNB în uree 4,0 M după metoda Ellman (5), modificată de noi (6) și adaptată la condițiile prezente de lucru:

Amestecul de reacție a conținut 1,0 ml soluție de nucleozom, 0,25 ml tampon fosfați (u = 0,4) pH 7,0, 0,1 ml EDTA (50 mM) în tampon fosfați pH 7,0 (u = 0,1), 1,3 ml soluție de uree (9,22 M) în tampon fosfați pH 7,0 (u = 0,1), 0,35 ml tampon fosfați pH 7,0 (u = 0,1) și 0,02 ml soluție de DTNB (10 mM) în tampon fosfați pH 7,0 (u = 0,1). După o

incubație de 15 min. la temperatura camerei, absorbanta soluției s-a măsurat la 412 nm față de martor lipsit de nucleozomi.

Dozarea grupărilor SH s-a făcut și în absența ureei (SH-actual accesibil).

Dozarea grupărilor SH (total) s-a făcut prin folosirea borohidridei de sodiu ca agent reducător după metoda Cavallini (7), modificată de noi (6) și adaptată la condițiile prezente de lucru:

Amestecul de reacție a conținut 1,0 ml soluție de nucleozom, 0,25 ml tampon fosfați pH 7,0 ($u = 0,4$), 0,15 ml EDTA (50 mM) în tampon fosfați pH 7,0 ($u = 0,1$), 1,95 ml soluție de uree (9,22 M) în tampon fosfați pH 7,0 ($u = 0,1$), 0,3 ml NaBH_4 (5%). După o incubatie de 30 min. la 40°C, reacția s-a oprit printr-un adaos de 0,1 ml HCl 5 N. Amestecul s-a incubat din nou la 40°C timp de 10 min., după ce acidul clorhidric a fost neutralizat printr-un adaos de 0,1 ml NaOH 5 N. Apoi s-a adăugat 0,5 ml acetona și 0,1 ml tampon fosfați pH 7,0 ($u = 0,1$), precum și 0,03 ml soluție de DTNB (10 mM) în tampon fosfați pH 7,0 ($u = 0,1$). După o incubatie de 15 min. la temperatura camerei, absorbanta soluției s-a măsurat la 412 nm față de martor, lipsit de nucleozomi.

Dozarea s-a făcut și în absența ureei (SH-total accesibil).

Calcularea conținutului de SH s-a făcut pe baza ecuației

$$\frac{A_{412}^{\text{DTNB}}}{A_{230}^{\text{DNH}}} = 147, \text{ obținind conținutul de tiol în } \mu\text{M SH}/100 \text{ ug ADN.}$$

Calcularea conținutului de SS s-a exprimat ca o diferență între tiol-total (în prezența NaBH_4) și tiol-actual (fără NaBH_4).

Calcularea conținutului proteic și a ADN al preparatelor nucleozomale s-a făcut prin utilizarea factorului de 4,25 unități de A_{230} pentru un mg proteină și factorul de 20 unități de A_{260} pentru un mg ADN. Valoarea de A_{230} a trebuit să sufere o ajustare din cauza contribuției de ADN la valoarea absorbției la 230 nm. În acest scop s-a folosit ecuația

$$\frac{A_{230}^{\text{DNH}}}{A_{230}^{\text{DNH}}} = 2,40 \text{ (7).}$$

Rezultate și discuții

Pentru studierea compoziției de fracțiuni obținute, recoltarea probelor s-a realizat din subfracțiunea nr. 3 din piscul I, care a prezentat un raport de absorbție în jur de 0,50 (2).

Rezultatele dozărilor chimice și datele compoziției fracțiunilor cromatografice din ficatul de șoareci sînt redată în tabelele nr. 1 și 2.

Cifrele expuse în coloana 1 a tabelelor sînt valorile raportului de absorbție a diferitelor probe recoltate din piscuri și calculate din datele absorbției la 230 nm, respectiv la 260 nm. Coloana 2 conține valorile raportului de conținut proteic/conținut ADN, iar coloana 3 arată valorile conținutului de ADN în fragmente de cromatină. Coloanele 4 și 5 conțin date asupra conținutului SH-total și SH-actual exprimate în $\mu\text{M SH}/100 \text{ ug ADN}$ ($= 10^{-9} \text{ M ADN}$), iar ultimele coloane 6 și 7, conțin valorile raportului de SH-actual și SH-total, precum și ale conținutului de SH-oxidat.

Tabelul nr. 1

Compoziția chimică a subunităților de cromatină normală
(în absența ureei)

Nr. probei	$\frac{A_{230}}{A_{260}}$	$\frac{P}{ADN}$	Cont. in ADN	SH-total	SH-actual	$\frac{SH-act.}{SH-total}$	SH-ox.
		g g	%	$\frac{\mu M SH}{100 \text{ ug ADN}}$	$\frac{\mu M SH}{100 \text{ ug ADN}}$		%
1.	0,56	0,95	51	0,83	0,80	0,96	3,6
2.	0,51	0,71	59	0,93	0,90	0,96	3,6
3.	0,60	1,15	47	0,96	0,81	0,84	7,5
4.	0,58	1,05	49	1,00	0,95	0,95	7,5
5.	0,58	1,05	49	0,91	0,91	1,00	0,0
Media	0,56	0,98	51	0,92	0,87	0,94	4,4

După cum am mai semnalat, un conținut egal de histonă cu ADN este o caracteristică a modelului actual de nucleozom (1, 2, 8). Faptul că conținutul ADN în fragmente cromatografice de cromozom prezintă o cifră mai mare (51%, tabelul nr. 1), decît cel din fracțiunea obținută prin ultracentrifugare (48%, 11), ne-a condus la concluzia că metoda cromatografică pe gel de agaroză este mai adecvată pentru studiile noastre. Din datele consemnate în tabelul nr. 1 rezultă că conținutul tiolic-actual (accesibil de către moleculele de DTNB) în subunități intacte (în absența ureei) din cromatina normală este egal cu o grupare tiolică pe nucleozom (tabelul nr. 1).

Dublarea conținutului tiolic-total, față de tiol-actual al subunităților de cromozom s-ar putea explica prin eliberarea unei grupări tiolice neaccesibile prin desfacerea structurii intacte a particulelor de către uree (tabelul nr. 2).

Tabelul nr. 2

Compoziția chimică a subunităților de cromatină normală
(în prezența ureei)

Nr. probei	$\frac{A_{230}}{A_{260}}$	$\frac{P}{ADN}$	Cont. in ADN	SH-total	SH-actual*	$\frac{SH-act.}{SH-total}$	SH-ox.
		g g	%	$\frac{\mu M SH}{100 \text{ ug ADN}}$	$\frac{\mu M SH}{100 \text{ ug ADN}}$		%
1.	0,56	0,95	51	3,64	1,59	0,43	56,3
2.	0,51	0,71	59	3,24	1,76	0,45	45,6
3.	0,60	1,15	47	3,84	1,76	0,45	54,1
4.	0,58	1,05	49	4,49	1,89	0,42	57,9
5.	0,58	1,05	49	3,93	1,71	0,43	56,4
Media	0,56	0,98	51	3,82	1,74	0,43	54,0

În prezența ureei, conținutul tiolic-total al particulelor este o cifră de patru ori mai mare, decât cifra de tiol-actual accesibil, arătînd prezența grupărilor disulfurice neaccesibile, adiționale (tabelele nr. 1 și 2). Astfel, conținutul tiolic oxidat-neaccesibil în subunitățile de cromozom este de două ori mai mare, decât cantitatea grupărilor tiolice actuale (accesibile) (tabelul nr. 2).

Un fapt interesant este existența unei grupări disulfurice neaccesibile (față de moleculele de DTNB) în structura intactă. Acest rezultat permite să se presupună o legătură secundară între corpurile histonice învecinate în suprastructura cromozomială, formîndu-se prin aceasta o suprastructură adițională. În consecință, o grupare tiolică va deveni neaccesibilă față de DTNB.

Din datele arătate rezultă posibilitatea ca cel puțin două, din cele patru grupări tiolice ale corpului histonic, să fie implicate în unirea componentelor lui.

După părerea noastră, ca o ipoteză, lanțul histonic de H_3 este sintetizat sub formă redusă, al cărui rest de cisteină se oxidează în ultima fază a biosintezei nucleozomilor, prin formarea punților disulfurice intermoleculare.

Bibliografie

1. Blazsek V. A.: Rev. med. (1981), 27, 209;
2. Blazsek V. A.: Rev. med. (1982), 28, 67;
3. Blazsek V. A.: Rev. med. (1983), 29, 88;
4. Tuan D. Y. H., Bonner J.: J. Mol. Biol. (1969), 45, 59;
5. Ellman G. L.: Arch. Biochem. Biophys. (1953), 82, 70;
6. Blazsek V. A.: Rev. Roum. Biochim. (1972), 9, 95;
7. Cavallini D., Graziani M. T., Dupre S.: Nature (1966), 212, 294;
8. Ionescu-Varo M., Dimitriu Gh., Deliu C.: Biologie celulară, București, 1981.

Sosit la redacție: 23 februarie 1984.

V. A. Blazsek

RESEARCH ON THE RELATIONSHIP BETWEEN THE NUCLEOSOMAL THIOL DISULPHIDE RATIO AND THE CELLULAR GENETIC ACTIVITY. IV. CHEMICAL COMPOSITION OF THE CHROMATIN SUBUNITS FROM MOUSE LIVER

The data show that the available-thiol content (accessible by DTNB molecules) in intact subunits (in the absence of urea), obtained from normal chromatin (mouse liver), by a chromatographic method on agarose gel, is equal to one thiol group per nucleosome. The doubling of the available-thiol content of the subunits of chromosome, in the presence of urea, might be accounted for by the release of a formerly inaccessible thiol group due to the breaking up of the intact structure of the particles by the urea.

In the presence of urea, the total-thiol content of the particles is a figure four times greater than the figure of accessible-thiol, indicating the presence of additional inaccessible disulphide groups. Thus, the oxidized thiol content (inaccessible) in the chromosomal subunits is twice as high as the amount of available-thiol groups (accessible).