

## STUDIAREA AGREGĂRII FRAȚIUNILOR DE HISTONE DIN TIMUSUL DE VIȚEL PRIN ELECTROFOREZĂ ÎN GEL DE AMIDON

V. A. Blazsek

Metoda electroforetică în gel de amidon introdusă de *Smithies* (1), cu o înaltă putere de separare asupra fracțiunilor proteice, prezintă avantaje atât în cercetarea serurilor sanguine, cât și în studierea histonelor. *Neelin* și *Neelin* (2) au constatat că histona din timusul de vițel se separă în 18 fracțiuni prin electroforeză în gel de amidon. *Johns* și colab. (3) au considerat că prezența unui număr atât de mare de fracțiuni histonice se datorește unor produși artificiali, rezultați prin agregarea moleculelor histonice sub influența pH-lui mediului. Din acest motiv ei au efectuat electroforeza în gel de amidon la un pH de 2,3 considerînd că în aceste condiții este evitată formarea agregatelor de molecule de histone. Astfel, la histonele din timusul de vițel s-au diferențiat numai 10 fracțiuni.

---

\* Pe această cale mulțumim Fundației Alexander von Humboldt pentru ajutorul acordat în vederea efectuării cercetărilor.

S-a constatat însă, pe baza vitezei de difuziune a moleculelor de histone și pe baza vitezei sedimentării lor prin centrifugare, că moleculele de histone se pot agrega nu numai într-un mediu bazic, ci și într-un mediu acid (8, 9). Se poate deci conchide că moleculele de histone formează agregate și la pH 2,3.

Recent s-a constatat prin cromatografie că histonele din timusul de vițel sînt alcătuite din 18 fracțiuni (4, 5, 6, 7). Se știe că puterea de separare a electroforezelor în gel de amidon depinde de greutatea moleculară a proteinelor depinzînd și de condițiile de pH. Deci, la studierea electroforetică a histonelor se obțin rezultate optime numai prin utilizarea tamponului cu pH-ul la care mobilitatea moleculelor de histone este maximă.

În lucrarea de față am urmărit migrarea moleculelor de histone din diferite fracțiuni în funcție de pH, obținînd astfel pH-ul optim pentru studierea prin electroforeză în gel de amidon a histonelor.

### Material și metodă

Extracția și purificarea fracțiunilor de histone din timusul de vițel s-a realizat după o metodă descrisă de noi anterior (11).

Electroforeza s-a efectuat în gel de amidon 13 % în soluție de HCl de 0,01 M pentru pH 2,3, sau în tampon de acid formic-formiat de sodiu pentru pH 3,0, acid acetic-acetat de sodiu pentru domeniul de pH cuprins între 4,0 și 5,0,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ — $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pentru pH 6,0 și 7,0, acid barbituric-barbiturat de sodiu pentru pH 8,0 și 9,0 și carbonat-bicarbonat de sodiu pentru pH 10,0 și 11,0. De remarcat că tăria ionică a soluțiilor tampon a fost de 0,025. După 18 ore de migrare la 4,4 V cm și 3,6 mA cm<sup>2</sup>, electroforegramele au fost revelate cu o soluție de Amidoschwarz 10 B. Cantitatea de proteină utilizată a fost de 1,0 mg.

Se știe că în cazul electroforezei de zonă s-au întîmpinat greutăți la determinarea mobilității electroforetice absolute a proteinelor (13). Din acest motiv ne-am propus să comparăm distanțele maxime de migrare (în mm) ale benzilor de proteină din gel la diferite pH-uri. Rezultatele reprezintă media a trei determinări, din trei preparate diferite.

### Rezultate

Influența valorilor pH asupra distanței maxime de migrare (DMM) a fracțiunilor principale de histone din timusul de vițel F1, F2, F3a și F3b este prezentată în fig. nr. 2. Cea mai ridicată valoare a DMM a fracțiunii F<sub>1</sub> se constată la pH 4,0 și valoarea cea mai scăzută la pH 9,0, iar la pH 10,0 se observă apariția a două maxime. Scăderea valorilor DMM ale fracțiunilor F2 și F3 este mai pronunțată decît cea a fracțiunii F1. În cazul acestor curbe valoarea minimă a DMM este atinsă la pH 6,0, în timp ce la valorile pH mai mari decît 6,0, scăderea curbei este nesemnificativă.

Aspectul curbei fracțiunii F1 este similar cu al celorlalte fracțiuni, însă minimul curbei se observă la pH 5,0.

pH-ul mediului afectează nu numai DMM-ul fracțiunilor histonice, ci influențează și numărul componentilor observați pe electroforegrame. Electroforegramele fracțiunilor de histone obținute la pH-uri diferite sînt prezentate în fig. nr. 1. La un pH între 4,0 și 5,0 cele patru fracțiuni principale de histone se separă într-un număr maxim de subfracțiuni. Numărul benzilor detectate pe electroforegrame între pH-ul 2,3 și 4,0 scade treptat, iar peste pH-ul 5,0 această scădere este foarte bruscă.

DMM a moleculelor de histone depinde și de natura tamponului (greutatea moleculară și încărcarea electrică a anionului). Cea mai bună separare și cea mai mare valoare de DMM a fracțiunilor principale de histone au fost obținute în pre-

zența acidului formic (un acid cu greutatea moleculară mică). În acest caz se separă 16 subfracțiuni histonice, iar cu acid acetic 11, cu acid propionic 10, cu acid citric 6 și cu acid citric-acid fosforic 8 subfracțiuni proteice.

### Discuții

Prin studierea vitezei de difuziune a moleculelor de histone sau a vitezei sedimentării lor prin centrifugare a fost evidențiată o tendință marcată de agregare a moleculelor de histone (14). Agregarea fracțiilor F2 și F3 este cea mai mare la pH-ul bazic, această proprietate sub pH 7,0 scade treptat, atingând minimumul la pH 5,0, pe când la pH-urile sub această valoare va fi din nou mai pronunțată. Agregarea fracțiunii F1 cu aceste metode nu se observă nici la punctul izoelectric (14).

Rezultatele obținute de noi au confirmat aceste constatări; între pH-ul 4,0 și 5,0 toate cele patru fracțiuni de histone au un minim de agregare. Spre valorile de pH bazice agregarea fracțiunii F1 este lentă, agregarea fracțiunii F2 este accentuată, în cazul fracțiunii F3 această proprietate devenind mai evidentă (fig. nr. 2).

Între moleculele de histone cu ajutorul electroforezei în gel de amidon putem detecta și diferențe abia perceptibile. O deosebire mai importantă este aceea că fracțiunea F1 mai are un minim de agregare la pH 10,0 (fig. nr. 2). Astfel se poate eventual explica, de ce fracțiunea F1 nu precipită la punctul ei izoelectric, adică la pH 10,0. Din aspectul curbei fracțiunii F1 rezultă că maximul de agregare a acestei fracțiuni se află la pH 9,0, însă procesul de agregare fiind foarte lent, nu duce la formarea de precipitat.

Din ansamblul rezultatelor prezentate mai sus, reiese că sub influența schimbării valorilor de pH ale mediului, agregarea moleculelor de proteină din fracțiunea F1 este lentă, neavând ca rezultat formarea agregatelor mari. Procesul de agregare al fracțiilor de histone F2 și F3 este foarte sensibil față de pH. La o schimbare relativ mică a pH-lui (de la 5,0 până la 6,0) apar agregatele mari, și paralel cu aceasta DMM a fracțiilor suferă o scădere bruscă. Ne-am pus întrebarea dacă, totuși, prezența unui număr mare de subfracțiuni între pH 4,0 și 5,0 se poate atribui formării agregatelor mixte ale moleculelor de histone? Însă deoarece DMM extremă se observă tocmai în intervalul de pH amintit mai sus, formarea agregatelor în aceste condiții este exclusă. Într-adevăr, s-a dovedit și pe cale cromatografică (4, 5, 6, 7) prezența unui număr mare de subfracțiuni provenite din fracțiunile principale ale histonei din timusul de vițel, cu compoziție definită în aminoacizi.

Capacitatea de agregare a moleculelor de histone depinde și de sarcina electrică a anionului din tamponul folosit. S-a constatat (15) că ionii de sulfat au provocat o agregare mai accentuată a moleculelor de histone, decât cei de clorură. Din rezultatele obținute constatăm că, agregarea moleculelor de histone din timusul de vițel poate fi datorată atât sarcinii electrice a anionului din tampon (fig. nr. 3: D și E), cât și greutății lui moleculare (fig. nr. 3: A, B și C). Astfel, mărirea greutății moleculare a anionului din tamponul folosit pentru electroforeză micșorează mobilitatea electroforetică a proteinelor studiate, din contră, mărirea sarcinii electrice a anionului micșorează numărul subfracțiilor de histone, deci micșorează gradul lor de separare electroforetică. Acest fenomen se poate explica prin formarea unor complecși între cationul de histone și anionul tamponului. Aceste date sînt în deplin acord cu cele ale lui Cann și Goad (18), care au găsit interacțiuni similare între albumina din serul de bovină și anionul de borat.

În concluzie, din datele obținute prin cele trei metode independente, putem arăta, că cea mai scăzută capacitatea de agregare a moleculelor de histone din timusul de vițel este între pH 4,0 și 5,0, deci cea mai bună separare a lor se poate obține în intervalul de pH 4,0 și 5,0.

V. A. BLAZSEK: STUDIAREA AGREGĂRII FRAȚIUNILOR DE HISTONE  
DIN TIMUSUL DE VIȚEL PRIN ELECTROFOREZĂ ÎN GEL DE AMIDON

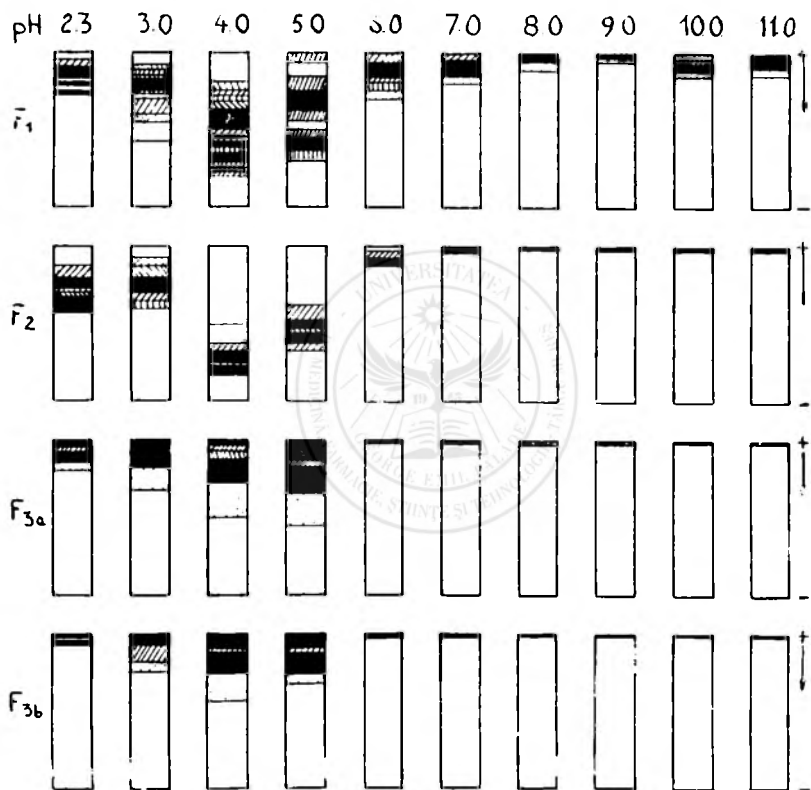


Fig. nr. 1: Electroforegramele pe gel de amidon ale fracțiunilor principale de histone din timusul de vițel la diferite pH-uri

V. A. BLAZSEK: STUDIAREA AGREGARII FRAȚIUNILOR DE HISTONE DIN TIMUSUL DE VIȚEL PRIN ELECTROFOREZĂ ÎN GEL DE AMIDON

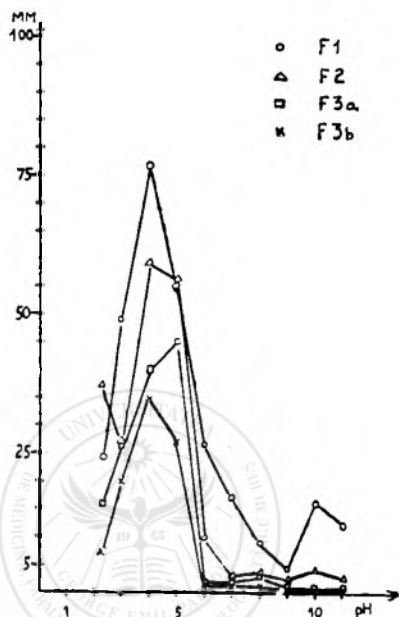


Fig. nr. 2: Variația distanței maxime de migrare în gel de amidon a fracțiunilor principale de histone din timusul de vițel, în funcție de pH

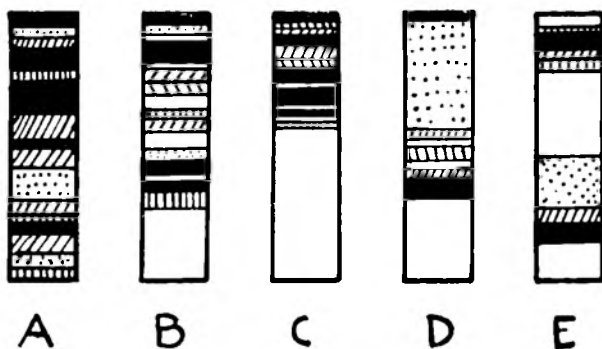


Fig. nr. 3: Electroforegramele pe gel de amidon ale histonelor din timusul de vițel la pH 4,4. A. tampon de format; B. tampon de acetat; C. tampon de propionat; D. tampon de citrat; E. tampon de citrat-fosfat

Este interesant de relevat faptul că, o schimbare pronunțată și bruscă în structura cuaternară a moleculelor de histone apare chiar într-un interval de pH important din punct de vedere biologic (între valorile de pH 6,0 și 8,0). S-ar părea că fracțiunile histonice au un rol biologic diferit în reglarea activității genelor, deoarece fracțiunea F1 are o serie de proprietăți diferite față de alte fracțiuni.

Rolul biologic al diferențelor în capacitatea de agregare a fracțiunilor principale de histone din timusul de vițel va fi clarificat în cursul cercetărilor ulterioare asupra mecanismelor de reglare ale informațiilor genetice în celule.\*

Sosit la redacție: 10 martie 1972.

#### Bibliografie

1. SMITHIES O.: *Biochem. J.* (1955) 61, 629; 2. NEELIN J. M., NEELIN E. M.: *Can. J. Biochem. Physiol.* (1960), 38, 355; 3. JOHNS E. W., PHILLIPS D. M. P., SIMSON P., BUTLER J. A. V.: *Biochem. J.* (1961) 80, 189; 4. KINKADE J. M. jr., COLE R. D.: *J. Biol. Chem.* (1966), 241, 5790; 5. JOHNS K. W.: *Biochem. J.* (1967) 105; 6. JOHNS E. W.: *Europ. J. Biochem.* (1968), 4, 437; 7. MAURITZEN C. M., STARBUCK W. C., SHAROJA I. S., TAYLOR C. W., BUSCH H.: *Biol. Chem.* (1967) 242, 2240; 8. CRUFT H. J., MAURITZEN C. M., STEDMAN E.: *Phil. Trans. B.* (1957), 241, 93; 9. DAVISON P. F., SHOOTER K. V.: *Bull. Chim. Belg.* (1956), 65, 85; 10. BAILEY J. L.: *Techniques in protein chemistry*, Elsevier, Amsterdam, (1962), p. 285; 11. BLAZSEK V. A.: *Rev. Roum. Biochim.* (1972); 12. SMITH I.: *Chromatographic and electrophoretic techniques*, Interscience, New York, 1960, 11, 131; 13. BIER M.: *Electrophoresis*, Academic Press, New York, 1959; 14. PHILLIPS D. M. P., BUTLER J. A. V., HUXLEY H. E., ZIRKEL R. E.: *Progress in biophysics and biophysical chemistry*, Pergamon Press, New York, 1962, 12, 240; 15. UI N.: *Biochim. Biophys. Acta* (1956) 22, 205; 16. CANN J. R., GOAD W. B.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1968) 151, 638.

---

\* Autorul mulțumește și pe această cale prof. dr. E. Kovács pentru prețiosul ajutor acordat în elaborarea lucrării, precum și tov. Publik A. Aranka pentru asistența tehnică.