

Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Intézet, Anatómiai és Műtéttani Tanszék  
(vezető: dr. Maros Tibor egyetemi tanár, docens-doktor, az Orvostudományi Akadémia  
levelező tagja); Marosvásárhelyi Orvostudományi Kutatóközpont  
(vezető: dr. Barbu Zeno egyetemi tanár, docens-doktor,  
az Orvostudományi Akadémia levelező tagja)

## A NUKLEOSZOMÁK TIOL CSOPORTJAINAK OXIDO-REDUKCIÓS ÁLLAPOTA ÉS A GÉN MŰKÖDÉS KÖZÖTTI KAPCSOLAT TANULMÁNYOZÁSA

### I. Ünémészített egy májkromatin SH SH<sub>OX</sub> értékének meghatározása\*

*Blazsek V. S., Buksa K.*

A kromatin bázikus fehérjeivel — a hisztonokkal — kapcsolatos kutatások kimutatták ezek alapvető szerepét a genetikai folyamatokban (1). Az újabb eredmények felvetették annak a lehetőségét, hogy a génműködés szabályozása a hiszton molekulák konformációjának változásán keresztül valósulhat meg (2—5).

Az a régebbi megfigyelésünk, hogy a cisztein is jelen van a H<sub>3</sub>-hiszton molekulájában (6), valamint az a tény, hogy a hisztonok intim kapcsolatban vannak a DNS-molekulával, arra utal, hogy a H<sub>3</sub>-hiszton redukciós-oxidációs állapota is szerepét játszik a genetikai szabályozásban (2, 7). Ebben az összefüggésben különleges jelentőségű az az adat is, hogy csak egyetlen hisztonfajtában, a H<sub>3</sub>-ban található cisztein (7, 8), továbbá, hogy ez az aminosav nemcsak a gerincesek H<sub>3</sub>-hisztonjában (9, 10), hanem a törzsfajlódás alacsonyabb fokán is előfordul (10, 11).

Kimutatható, hogy a H<sub>3</sub> bioszintézise, a többi hisztonfajtaéhoz viszonyítva, a legintenzívebb (12), ugyanakkor a genetikai információk átadását is a legnagyobb mértékben ez a hiszton gátolja (13), különösen az oxidált forma (14). Az is ismeretes, hogy az eukromatin jelentősen több oxidált

\* Ezúton mondunk köszönetet Publik Arankának az értékes technikai segítségért.

H<sub>3</sub>-hisztont tartalmaz, mint a heterokromatin (15—17). Az inter-, illetve metafázisban található sejtekben a H<sub>3</sub>-hisztion oxidációs állapota fajtaspecifikusnak látszik (11). A H<sub>3</sub>-hisztion oxido-redukációs aktivitása igen kifejezett (18, 19). Azokban a sejtekben, ahol regeneráció következte (20—21), hormonhatás miatt (22—26), megtermékenyülés után (20) vagy enzimindukció révén fokozódott a fehérjék bioszintézise, a H<sub>3</sub>-hisztion redukált formájának a mennyisége nagyobb volt.

A kromoszómák szerkezetének újabb feltárt részletei további bizonyítékként szolgálnak a H<sub>3</sub>-hisztion fontos szerepének a génműködésben. Kiderült, hogy a kromoszómák szerkezetét a DNS-duplex által (egy gyöngy-sorhoz hasonlóan) összekapcsolt globuláris hisztion-testek sorozata alkotja. Ilyen típusú szerveződését a kromoszómáknak az eu- illetve heterokromatinban (28, 29), valamint a nyugvó, illetve osztódó sejtekben is megtalálták (30—32). A kromoszómák felépítése nemcsak a magasabbrendűek sejteiben, hanem az alacsonyabbrendűeknél, így az egysejtűeknél, sőt a vírusoknál is hasonló képet mutat (33—36). Így például az SV<sub>40</sub> kromoszómája kör alakú és 21 nukleoszómából épül fel.

A sejtmagok vagy a tisztított kromatin részleges emésztése endonukleázokkal 11—14 S-el ülepedő nukleoszómákat eredményez. A már említett, gyöngy-sorhoz hasonló szerkezetben, az egyes „gyöngyszemeket” neveztek el nu-testeknek (26) vagy nukleoszómáknak (27). A részleges emésztéssel nyert nukleoszómák további kezelése endonukleázokkal egy 140 bázispárból álló DNS-alégséghez vezetett (40—41), ez viszont már ellenállónak bizonyult a nekleáz-hatással szemben. Az ilyen típusú DNS jelenlétét minden esetben nukleoszoma monomerek populációja kísérte és az összes-DNS felét képezte (42—45). Abban az esetben, ha a kromoszoma DNS 10—30 %-át hidrolizálták, akkor főleg nukleoszoma oligomerek voltak kimutathatók (46). A kromoszómák hisztion-testeket tartalmazó (nukleáz-rezistens) és ezeket összekapcsoló (nukleáz-érzékeny) DNS-ből álló szerkezetet az érintetlen sejtmagokban is megtalálták.

A részleges emésztéssel nyert nukleoszómák öt különböző hisztion (H<sub>1</sub>, H<sub>2a</sub>, H<sub>2b</sub>, H<sub>3</sub> és H<sub>4</sub>), valamint egy 200 bázispárból álló DNS-szakaszt tartalmaztak. A további enzimatis kezeléskor ez a részecske egy, négyféle hisztionból H<sub>2a</sub>, H<sub>2b</sub>, H<sub>3</sub> és H<sub>4</sub> és 140 bázispárból álló DNS-szakaszt tartalmazó, úgynevezett hisztion-testre és különböző hosszúságú DNS-töredékekre bomlott. Világossá vált tehát, hogy a hisztion-testeket 40—60 bázispárból álló DNS-láncok (internukleoszómális-DNS) kapcsolják össze (36, 40, 47—51). A hisztion-test tulajdonképpen az említett négyféle hisztion molekulából felépített oktamer és ennek felületén helyezkedik el a 140 bázispárból álló (intranukleoszómális-DNS) DNS-lánc (53—55). Úgy látszik, hogy a H<sub>3</sub>—H<sub>4</sub> molekulából álló tetramér az, ami a hisztion-test alegységét képezi és az intranukleoszómális-DNS tulajdonképpen ennek felületén helyezkedik el. Megállapították, hogy ez a tetramér eleget az eredeti nukleoszómához hasonló szerkezetek képződéséhez, ha ezt a megfelelő DNS-el hozták össze (53—56).

Elképzelhető tehát, hogy a H<sub>3</sub>—H<sub>4</sub> hisztionpárnak lényeges szerepe van az élővilág genetikai folyamataiban, a nukleoszómák szerkezetének kialakításában és fenntartásában. Ezt megerősíti még az a megfigyelés is, hogy a H<sub>3</sub> és H<sub>4</sub> molekuláknál evolúciós szekvencia-konzervativizmus mutatható ki (50).

A kromoszomákban őrzött genetikai információk átadásának mechanizmusa, jóllehet, hogy ezekkel a szerkezetekkel kapcsolatban igen sok morfológiai és molekuláris adatot ismerünk, kevésbé feltárt, a szabályozása pedig ennek még ismeretlenebb. Az előbbieken felsorolt tények arra utalnak, hogy a  $H_3$ -hisztonnak kitüntetett szerepe van a kromoszóma szerkezet kialakításában, míg ennek oxidációs állapota valamilyen módon a kromoszómák genetikai működésével kapcsolatos. Kísérletsorozatunk a  $H_3$ -hiszton genetikai szerepének a tisztázását kívánja elősegíteni.

Jelen dolgozatunkban egérmáj-sejtekből önemésztéssel nyert kromoszóma alegységek oxidációs állapotát vizsgáljuk meg.

### Anyag és módszer

A sejtmagokat normális étrenden tartott, 20—22 g súlyú, fehér egerrek májszövetéből nyertük. A frissen kivett májat fiziológias oldattal fagyasztottuk. Egy kísérlet keretében 10 állat máját egyesítve dolgoztuk fel. Minden műveletet 4 °C-ra hűtött helyiségben végeztünk. A fagyasztott májszövetet Ultra-Turrax típusú homogenizátorral, 60 V-nál 1 percig, majd 45 V-nál 4 percig roncsoltuk, 200 ml 10 %-os zaharóz, 0,1 % Tween 80, 0,1 mM NaEDTA és 10 mM Tris (pH 7,9) összetételű oldatban. Az így nyert homogenizátumot négy réteg gézen átszűrtük, majd 15 percen keresztül 1200 xg-nel centrifugáltuk. Az üledéket 100 ml 10 % zaharóz, 0,1 % Tween 80 és 10 mM Tris (pH 7,5) összetételű oldatban újra homogenizáltuk 45 V-al 1 percig, majd centrifugáltuk mint előbb. Az így nyert magüledéket háromszor mostuk 10 % zaharóz és 10 mM Tris (pH 7,5) összetételű oldattal, minden esetben az előbbihez hasonló módon eljárva.

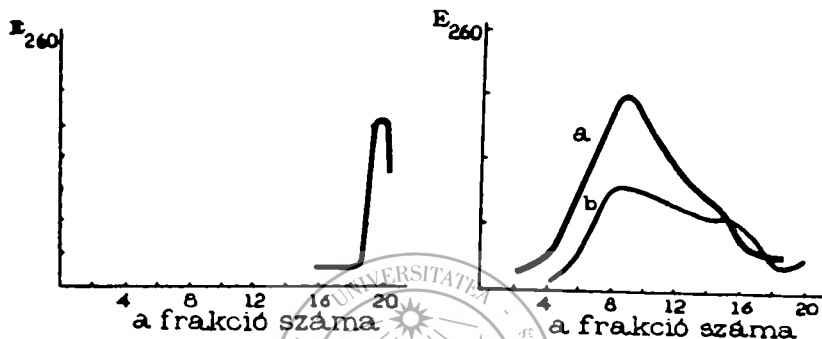
A mosott magvakat először 10 mM glicin (pH 7,5) oldattal, majd 5 mM glicin oldattal és végül 1 mM NaEDTA (pH 7,5) oldattal homogenizáltuk 60 V-nál 10 percig, majd 40 V-nál újra 10 percig (vigyázva a hőmérsékletre). Az így kapott nyers kromatin készítményt 15 percen keresztül 3500 xg-nal centrifugáltuk.

Ezután a kromatin készítményünket (0,6—1,2 mg DNS/ml) endogén nukleázok hatásának tettük ki 10 mM glicin oldatban 37 °C-on 2 órán át (59). Az önemésztéssel nyert készítményt, tisztítása érdekében, zaharóz izokinetikus gradiensben keresztül ülepítettük (57).

Ebből a célból 0,5—1,0 ml készítményt zaharózból Noll szerint (57) készített izokinetikus gradiensre rétegeztük fecskendővel. A gradiens paramétereit:  $C_T = 5\%$ ,  $C_R = 40\%$ ,  $V_M = 11$  ml (a nyers kromatin esetében), illetve  $C_T = 15\%$  vagy  $45\%$ ,  $C_R = 60\%$  vagy  $70\%$ ,  $V_M = 11$  ml (emésztett kromatin). Az ülepítést MOM típusú ultracentrifugában 16 órán keresztül, 45 000 fordulattal, 4 °C-on végeztük. A gradienseket a következő egyenlet alapján számítottuk:  $C_V = C_R - (C_R - C_T) e^{-\frac{V}{V_M}}$ . Minden gradiens 20 frakcióra (0,5 ml) bontottunk (egy gradiens-adapter használatával) 70 %-os zaharóz oldat bevezetésével. A gradiens frakcióit 3,0 ml-re hígítottuk és optikai sűrűségüket 260 nm-nál MOM spektrofotométerrel mértük.

## Eredmények és megbeszélés

A nyers kromatinunkat 5—24 %-os zaha-róz gradiensen keresztül üle-pítve, csak egyetlen csúcs jelentkezett a centrifugacső alján (1. ábra). Ez az eredmény arra utal, hogy az általunk alkalmazott eljárás nem károsítja kimutatható mértékben a kromatin makromolekuláris szerkezetet, mert kisebb kromatin töredékek nem jelentkeznek a gradiens mentén.



1. ábra: A nyers kromatin üle-pítése ultracentrifugában 5—24 %-os zaha-róz gradienssel szemben 16 órán ke-rezstül, 45 000-es fordulattal, 4° C-nál. A kromatin koncentrációja 0,25 mg/ml 10 mM glicin oldatban, pH 7,1. Ülepedési irány balról jobbra.

2. ábra: Az inkubációs idő hatása az önémésztett kromatin ülepedésére 5—24 %-os zaha-róz gradienssel szem-ben, 45 000-es fordulattal, 16 órán keresztül, 4° C-on. *a* görbe = 120 perc, *b* görbe = 15 perc. A kroma-tin koncentrációja 0,30 mg/ml 10 mM glicin oldatban, pH 7,0. Ülepedési irány balról jobbra.

Az önémésztett kromatin, az üle-pítés során már eltérő módon visel-kedett (2. ábra). A gradiens mentén 4—16 ml között széthúzódva kroma-tin töredékek észlelhetők, a súlypont 9 ml-nél figyelhető meg, 2 óras ö-némésztés után. A kromatin bomlástermékeinek sokkal heterogénebb elosz-lása mutatható ki 15 perces önémésztés után, valószínűleg a még jelenlevő kromatin multimerek miatt (2. ábra: *b*-görbe). A DNaze II-el emésztett kromatinból nyert nukleoszomák ülepedési tulajdonságai (58) hasonlóak az általunk önémésztéssel, egérmájból kivont kromatin-alegységek ülepe-dési tulajdonságaihoz. A 9. ml-nél kivett frakció (amit nagyobb mennyi-ségű kromatin —  $E_{260} = 10,0$  — frakcionálása után egy későbbi közlemé-nyünkben közlendő eljárás segítségével analizáltunk) összetétele is meg-erősíti ezt a megállapítást. Az analizisek (57) eredményeit az 1. táblázat-ban tüntettük fel.

A táblázatból kitűnik, hogy a 9. sz. frakció fehérje és DNS aránya megközelíti az egységét. Ismeretes, hogy a DNaze-val nyert nukleoszomák P/DNS aránya (58) 1,03. Ez az érték jellemző a jelenlegi nukleoszoma modellre (52). A másik következtetésünk, ami a készítmény oxidációs ál-lapotára vonatkozik, hogy valószínűleg az összes nukleoszomáknak csak

1. táblázat

Minta	A <sub>230</sub>	Feh.	DNS tart.	Összes SH	Redukált SH	Red. SH Oxid. SH	Oxidált SH
	A <sub>260</sub>	DNS					
		$\frac{g}{g}$	$\%$	$\frac{\mu M SH}{100 \mu g DNS}$	$\frac{\mu M SE}{100 \mu g DNS}$		$\%$
1.	0.61	1.22	45	7.2	6.0	5.0	16.6
2.	0.58	1.07	48	6.5	5.4	4.9	17.0
3.	0.46	0.96	50	6.8	5.4	3.8	20.8
Átlag	0.55	1.08	48	6.8	5.6	4.5	18.1

egy része, mintegy 20% van oxidált állapotban. Az SH'SH<sub>OX</sub> csoportoknak hasonló eloszlását észleltük az intakt kromatinból kivont hisztonekben is (18).

Még nem vethetjük el azt a lehetőséget sem, hogy a 9. sz. frakcióban talált kromatin-alegységek oxidációs állapota, biológiai realitás helyett (a használt eljárás során adódó műtermék. Ezt a problémát úgy kívántuk tisztázni, hogy vizsgálatainkat kiterjesztettük más típusú sejtekre is, valamint egyéb kivonási eljárást is használtunk. Ilyen irányú kutatásainkról a következő közleményünkben számolunk be.

- Irodalom
- Bonner J., Garrad W. T.: *Life Sci.* (1974) 14, 209; 2. Blazsek V.: *Rev. med.* (1975) 21, 2; 3. Gurley L. R. és mtsai: *Subcell. Biochem.* (1978) 5, 37; 4. Levy-Wilson B., Watson D. C., Dickson G. H.: *Nucl. Acid Res.* (1979) 6, 259; 5. Moore M. és mtsai: *BBA* (1979) 561, 248; 6. Blazsek V., Bukaresti L.: *Experientia* (1964) 20, 369; 7. Blazsek V., Bukaresti L.: *Rev. med.* (1970) 16, 183; 8. Blazsek V. A.: *Rev. med.* (1971) 17, 44; 9. Panym S. és mtsai: *BBA* (1970) 214, 216; 10. Blazsek V. A.: Bukaresti L.: *Analyt. Biochem.* (1967) 18, 572; 11. Panym S., Bilek B., Chalkley R.: *J. Biol. Chem.* (1971) 216, 4206; 12. Sadgopal A., Bonner J.: *BBA* (1969) 186, 349; 13. Ono T. és mtsai: *BBA* (1969) 179, 214; 14. Hilton J., Stocken L. A.: *Biochem. J.* (1966) 100, 210; 15. Ord M. G., Stocken L. A.: *Biochem. J.* (1966) 98, 888; 16. Gorovsky M. A., Eckhardt R. A.: *J. Cell Biol.* (1970) 47, 75a; 17. Sadgopal A., Bonner J.: *BBA* (1970) 207, 227; 18. Blazsek V. A.: *Revue Rom. Biochim.* (1972) 9, 95; 19. Hyde J. E., Walker I. O.: *Nucl. Acids Res.* (1974) 1, 203; 20. Ord M. G., Stocken L. A.: *Biochem. J.* (1970) 116, 415; 21. Fitzgerald P. J. és mtsai: *Biochem. J.* (1970) 117, 711; 22. Sekeris C. E. és mtsai: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* (1968) 349, 857; 23. Doenecke B. és mtsai: *Biochem. J.* (1972) 126, 1171; 24. Barker K. L.: *Biochem.* (1971) 10, 284; 25. Trachewsky L. A., Nandi-Majundar L. F., Congote L. F.: *Eu. J. Biochem.* (1972) 26, 543; 26. Olins A. L., Olins D. L.: *Sci.* (1974) 183, 330; 27. Oudet P., Gross-Bellard M., Cambon P.: *Cell* (1975)

- 4, 281; 28. Bostok C. J., Christie S., Hatch F. T.: *Nature* (1976) 70, 146; 29. Howse G. B., Hsie A. W., Olins A. L.: *Exp. Cell Res.* (1976) 100, 424; 30. Hosier J. C., Kaus R.: *Chromosoma* (1976) 57, 95; 31. Wogt V. M., Braun R.: *J. Mol. Biol.* (1976) 106, 567; 32. Wigler M. H., Akxel R.: *Nucl. Acid Res.* (1976) 3, 1463; 33. Gorovsky M. A., Keevert J. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1975) 2, 3536; 34. Lohrn D., Van Holde K. E.: *Sci.* (1975) 188, 165; 35. Germoud J. E. és mtsai: *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1975) 72, 1843; 36. Spadafora C., Noviello L., Geraci G.: *Cell Dif.* (1976) 5, 225; 37. Griffith J.: *Sci.* (1975) 187, 1202; 38. Hewish D. R., Burgoyne L.: *BBRC* (1973) 52, 504; 39. Van Holde K. E., Shaw B. R.: *Nucl. Acid. Res.* (1974) 1, 1579; 40. Axel R.: *Biochem.* (1975) 14, 2921; 41. Sollner-Webb B., Felsenfeld G.: *Biochem.* (1975) 14, 2915; 42. Axel R., Cedar H., Felsenfeld G.: *Gold Spring Harbor Symp.* (1974) 38, 773; 43. Clark R. J., Felsenfeld G.: *Nature (New Biol.)* (1971) 229, 101; 44. Weintraub H.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1975) 72, 1212; 45. Sahasrabuddha C., Van Holde K. E.: *J. Biol. Chem.* (1974) 249, 152; 46. Noll M.: *Nature* (1974) 251, 149; 47. lásd 43.: 48. lásd 39; 49. Kornberg R. D.: *Sci* (1974) 184, 868; 50. Elgin S. C., Weintraub H.: *Ann. Rev. Biochem.* (1975) 44, 725; 51. Pardon J. F. és mtsai: *Nucl. Acid. Res.* (1975) 221, 63; 52. Fintch J. T., Noll M., Kornberg R. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1975) 72, 3320; 53. Camerino-Otero R. D., Sollner-Webb B., Felsenfeld G.: *Cell* (1976) 8, 333; 54. Binna-Stein M., Simpson R. T.: *Cell* (1977) 11, 609; 55. Simon R. H., Camerini-Otero R. D., Felsenfeld G.: *Nucl. Acid Res.* (1978) 5, 4805; 56. Jocarno J. L., Ruis-Carillo A.: *Biochem.* (1979) 18, 768; 57. Blazsek V. A.: előkészületben; 58. Gottesfeld G. M., Murphy R. P., Bonner J.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1975) 72, 4404; 59. Paul I. J., Durksen J. D.: *ABB* (1976) 174, 491.

A szerkesztőségbe érkezett: 1981. március 17-én.

V. S. Blazsek, K. Buksa

## INVESTIGATIONS ON THE RELATIONSHIP BETWEEN THE NUCLEOSOMAL THIOL BISULPHIDE RATIO AND GENETIC ACTIVITY

### I. Assay of the SH'SH<sub>0x</sub> value of chromatin autolysed from the liver of mice

The ultracentrifugation of chromatin autolysed from the liver of mice through a 5–25% sucrose gradient was performed. After a 2 hours' incubation at 37° C. the authors revealed a homogenous distribution of the chromatin particles autolysed in the middle of the gradient.

The value of the protein/DNA ratio shows a moderate oscillation round the value of 1.0. which is a figure comparable with that corresponding with the present nucleosome model.

The findings concerning the thiol/bisulphide equilibrium of the preparations analysed show that some (about 20%) of the nucleosomal thiol groups are oxidized in the bisulphide bridges.