

CERCETAREA LEGĂTURII DINTRE RAPORTUL DE TIOL-DISULFID NUCLEOZOMAL ȘI ACTIVITATEA GENETICĂ CELULARĂ

II. Izolarea subunităților de cromatină din ficatul de șoareci prin cromatografia pe coloană de agaroză

V. A. Blazsek

În cadrul cercetărilor precedente (1) s-a urmărit izolarea nucleozomilor din cromatina autolizată de ficat de șoareci. Datele experimentale au arătat că metoda de autodigestie produce un preparat de subunități ale cromatinei de ficat de șoareci cu caracteristicile de ultracentrifugare și compoziție chimică similare cu nucleozomii obținuți prin digestia nucleazică exogenă. O altă constatare care se referă la echilibrul tiolic disulfidic al preparatelor analizate a fost că, grupările tiolice sînt oxidate parțial (aprox. 20%) în punțile disulfidice.

Eterogenitatea privind grupările SH și SS, aflată în structura nucleozomală, pune problema dacă aceasta corespunde unei realități biologice sau se datorește unei alterări cauzate de procesul folosit de noi în cursul izolării subunităților.

Pentru a aduce precizări suplimentare în această direcție, în lucrarea de față, prepararea subunităților din ficatul de șoareci s-a făcut pe cale distinctă de cea folosită în cercetările precedente (1).

Material și metodă

Prepararea cromatinei. Cromatina s-a preparat din țesutul de ficat provenit de la un număr de 10 șoareci albi, în greutate medie de 20—22 g, ținuți la regim alimentar normal. Cromatina crudă s-a obținut din nucleee spălate după metoda descrisă în lucrarea precedentă (1).

Purificarea cromatinei s-a făcut prin precipitarea ei, la o concentrație de Mg^{2+} 10 mM, din soluția de cromatină crudă. Precipitatul de cromatină a fost spălat de două ori cu o soluție de Mg^{2+} 5 mM prin omogenizare la 40 V (Ultra-Turrax), timp de 30 de secunde și centrifugare la 3500 x g timp de 10 minute. Solubilizarea cromatinei s-a făcut într-o soluție de tampon de glicină 5 mM cu un conținut de NaEDTA 10 mM. După dizolvarea completă a precipitatului, soluția obținută s-a dializat față de tampon glicină 10 mM timp de 18 ore. Dializatul a fost centrifugat la 10 000 x g timp de 15 minute. Operația descrisă a fost repetată din nou. Preparatul de cromatină purificată menținut la o temperatură de 1°C mai mult de o săptămână, nu a fost folosit în cadrul experiențelor.

Tratarea enzimatică a cromatinei purificate. Soluția de cromatină purificată (0.6—1.2 mg DNH/ml) s-a ținut la o temperatură de 37°C într-un tampon de glicină 10 mM, pH 7.5, cu un conținut de Mg^{2+} 1 mM și DNază I (36 ug/ml; NBC; cristalizată 2 X). Durata tratării enzimatică se va discuta la capitolul Rezultate și discuții. Tratarea enzimatică a preparatelor a fost întreruptă printr-o răcire rapidă pînă la 0°C a ames-

tecului. Subunitățile de cromatină s-au precipitat, spălat și solubilizat conform capitolului Purificarea cromatinei.

Pentru obținerea agarozei s-a dovedit că metoda cea mai adecvată cerințelor noastre este cea a lui Russel (5).

Cromatografia pe coloană de agaroză. S-a folosit o coloană tip. Sephadex K 15:30 încărcată cu agaroză perlată (40—140 mesh). Gelul de agaroză de 20% a fost perlat după indicațiile lui Bengtsson (6). S-a aplicat o cantitate de 1.0—1.5 ml din soluția cercetată, în funcție de concentrația cromatinei (3.0—8.0 O.D._{260nm} unități/coloană). Eluția s-a realizat cu tamponul de glicină 10 mM, pH 7.5, la 4°C. S-au cules probe de 3 ml cu o viteză de eluție de 0.3—0.4 ml/min. Concentrația DNH în fracțiunile culese s-a determinat prin spectrofotometrie (11) la 260 nm.

Rezultate și discuții

Pentru standardizarea condițiilor de degradare a cromatinei prin acțiunea DNazei I s-au studiat unele aspecte cinetice ale reacției. În acest scop, s-a urmărit influența concentrației de DNază I asupra ADN-deproteinizat (7) din ficat de șoareci. În cadrul experiențelor s-a folosit o concentrație egală de ADN cu cea aflată în preparatele de cromatină folosite de noi. Pe baza rezultatelor obținute s-a ales o concentrație de 40 ug/ml DNază, întrucât la această concentrație de enzimă ADN deproteinizat a atins valoarea de 100%, a fragmentării după 2 ore de incubare. S-a arătat că DNaza I produce din cromatină fragmente similare cu cele obținute dintr-o cromatină tratată cu nucleaza micrococcică (8,9). Deci, gelul perlat de agaroză s-a dovedit a fi un suport convenabil și pentru separarea subunităților de cromatină. Proprietățile sale mecanice

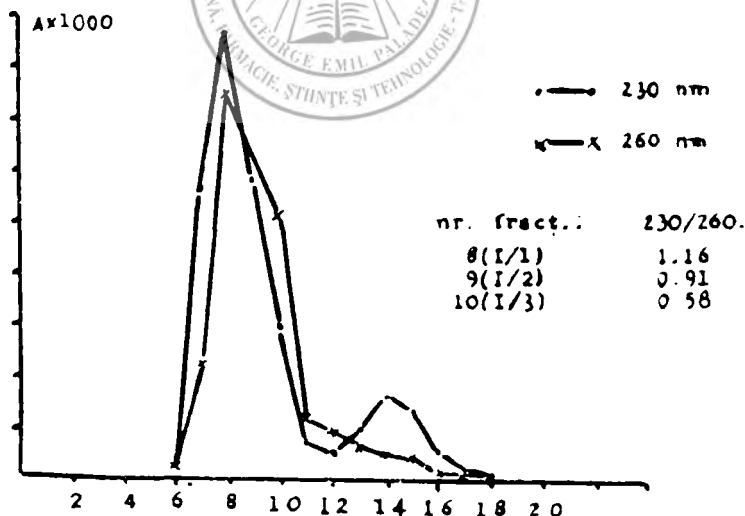


Fig. nr. 1: Cromatografierea cromatinei din ficat de șoareci pe gel de agaroză. Concentrația de cromatină 0,400 mg ADN/coloană în soluție de glicină, pH 7,2, 10 mM.

bune, permit o viteză de scurgere suficient de mare și în cazul gelului cu o porozitate avansată cauzată de concentrația mică de agaroză. Gelul poate fi refolosit după o prealabilă spălare cu eluentul folosit.

Pentru eliminarea eventualelor variațiuni în profilul de separare a diferitelor cromatine studiate, din cauza constanțelor de coloană, s-a folosit o singură coloană cu spălarea ei repetată în cadrul unui lot de experiență.

În cazul cromatinei normale de ficat, tratată cu DNază I, se constată două piscuri bine individualizate (fig. nr. 1). Primul pisc este eluat deja în probe de la nr. 7 pînă la nr. 10 și maximul se află la proba nr. 8. Această grupă de nucleohistonă (raportul de absorbție de 230/260 nm este în jur de 1.00, o valoare specifică unei nucleohistone) este formată din trei subfracțiuni de cromatină cu diferite valori ale raportului de absorbție la 230/260 nm. Urmărind variația raportului de 230/260 nm se observă că aceasta se micșorează de la proba nr. 9 (1/2), atingînd valoarea caracteristică de nucleozom la proba nr. 10 (1/3). Din poziția volumului de eluție se deduce că subfracțiunea I/1 (din proba nr. 8) ar putea reprezenta fragmenti de cromatină cu o greutate moleculară mai mare decît cei din subfracțiunea I/3. Din valoarea de 0.58 a raportului se deduce prezența monomerilor de cromozom.

Piscul II pe profilul cromatografic este eluat în probele cu nr. 13—15 cu un maxim la proba nr. 14. El este alcătuit exclusiv din proteine. Această părere reiese din faptul că raportul de absorbție al acestuia este în jur de 3.0. Prezența piscului II în cromatinele degradate cu DNaza I s-ar putea datora prezenței impurificării de DNază I folosită și care nu a fost eliminată prin purificarea prin precipitare, deoarece la cromatografierea DNazei I pe coloană de agaroză rezultă un singur pisc în jur de probe nr. 14 și 15 cu raportul de absorbție similar cu cel obținut în cazul cromatinelor cercetate (fig. nr. 2). Un fapt interesant

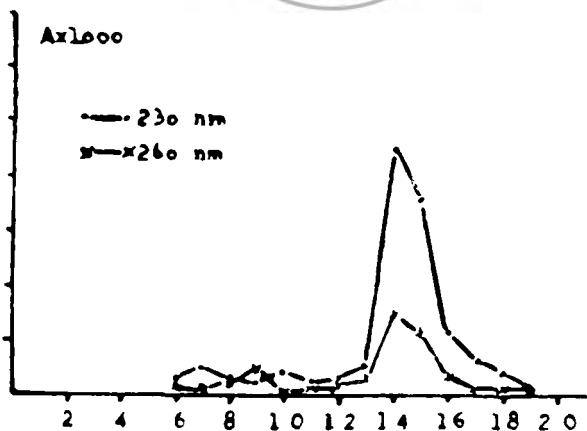


Fig. nr. 2: Profilul cromatografic pe gel de agaroză al DNazei I. Concentrația de proteină de 0,250 mg DNază I/coloană în soluție de glicină, pH 7, 2, 10 mM

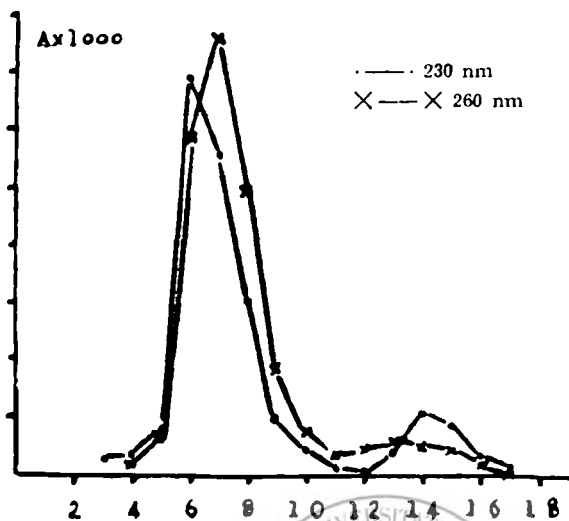


Fig. nr. 3: Profilul cromatografic pe gel de agaroză al cromatinei neatınse din ficat de șoareci. Concentrația de cromatină de 0,500 mg ADN/coloană în soluție de glicină, pH 7,2, 10 mM.

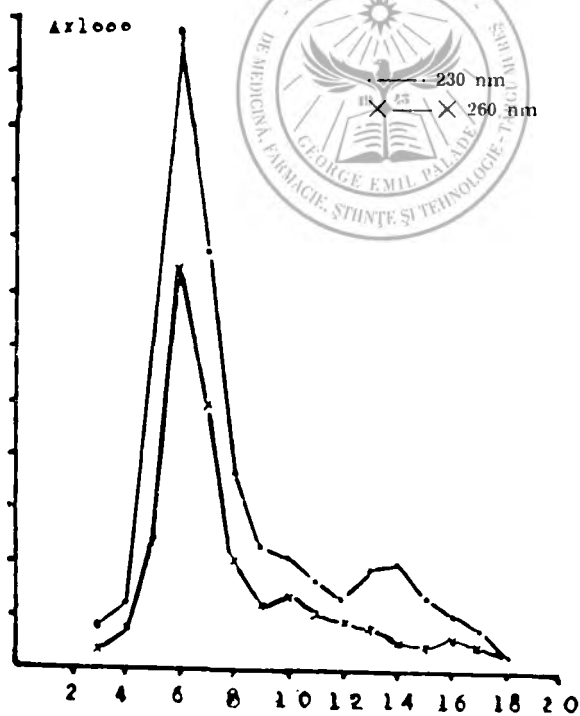


Fig. nr. 4: Profilul cromatografic al cromatinei autolizate din ficat de șoareci pe gel de agaroză. Concentrația de cromatină de 0,380 mg ADN coloană în soluție de glicină, pH 7,2, 10 mM.

este că în cazul cromatinei autolizate apare un pisc identic cu piscul II de la cromatina degradată cu DNază I (fig. nr. 3). Nu se știe încă, dacă piscul II din cromatina autolizată constă din histone, care se eliberează în cursul degradării ADN internucleozomal sau (și) din proteine de altă natură (endonucleaze).

Profilul cromatografic de cromatină neatinsă prezintă diferențe semnificative (fig. nr. 4) față de cea tratată. Maximul piscului I este deplasat spre proba nr. 6 și raportul respectiv de absorbție prezintă o variație în jur de 1.60, totodată, și în acest caz se poate detecta piscul II, însă într-o mărime mică. Comparând localizările piscurilor I a diferitelor cromatine, se constată că piscul I de cromatină autolizată ocupă un loc intermediar între cele studiate. Se vede clar că maximul acestui pisc se află în proba nr. 7 (fig. nr. 3).

Datele noastre asupra fracționării cromatinelor degradate aduc argumente în favoarea folosirii metodei cromatografice pe gel de agaroză pentru purificarea acestor particule genetice. Pe această cale se poate separa, în mod foarte rapid, fracțiuni subcromoziale cu raportul de absorbție specific la nucleozomi. Rezultatele dozărilor chimice privind compoziția fracțiunilor cromatografice arătate în prezenta lucrare vor fi redată într-o lucrare ulterioară.

Sosit la redacție: 22 ianuarie 1982

Bibliografie

1. Blazsek V. A.: Rev. med. (1981), 27, 209; 2. Araki C.: J. Chem. Soc. Japan (1937), 58, 1338; Hjertén S.: Biochim. Biophys. Acta (1962), 62, 445; 4. Egorov A. M., Vakhobov A. Kh., Cherny U. Ya.: J. Chrom. (1970), 46, 143; 5. Russel B., Mead T. H., Polson A.: Biochim. Biophys. Acta (1964) 86, 169; 6. Bengtsson S., Philipsson L.: Biochim. Biophys. Acta (1964), 79, 399; 7. Cantoni G. L., Davies D. R.: Proceedings in Nucleic Acids Research, Harper et Row publ., New York, 1966, 539; 8. Kirby K. S.: Biochem. J. (1975), 66, 495; 9. Yolles R. S., Freeman G.: Biochim. Biophys. Acta (1967), 138, 506; 10. Simpson R. T., Whitlock J. P.: Nucl. Acid Res. (1967), 3, 117; 11. Blazsek V. A.: în curs de publicare.

V. A. Blazsek

RESEARCH ON THE RELATIONSHIP BETWEEN THE NUCLEOSOMAL THIOIOL DISULPHIDE RATIO AND THE CELLULAR GENETIC ACTIVITY.

II. ISOLATION OF CHROMATIN SUBUNITS FROM MOUSE LIVER THROUGH CHROMATOGRAPHY ON AGAROSE COLUMN

The data obtained during fractionation of chromatins degraded with DNase I stand for the use of the method of chromatography on agarose gel in purifying these genetic particles. This is a very rapid way of separating subchromosomal fractions with the absorption rate specific to nucleosomes.