

КАЛОРИМЕТРИЯ ПЛАВЛЕНИЯ ЯДЕР КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫСЫ В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ МАГНИЯ

© 2023 г. Г.Я. Коломийцева*, А.Н. Прусов*,[#], Е.А. Коломийцева**, Т.А. Смирнова*, ***

*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/40, Москва, 119992, Россия

**МИРЭА – Российский технологический университет, просп. Вернадского, 78, Москва, 119454, Россия

***ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАН, Тимирязевская ул., 42, Москва, 127550, Россия

[#]E-mail: prusov@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 03.08.2022 г.

После доработки 27.10.2022 г.

Принята к публикации 01.11.2022 г.

С помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии определили термодинамические параметры деконденсации внутриядерного хроматина клеток печени крысы, индуцированной понижением концентрации ионов магния от 5 до 0 мМ. Процесс плавления хроматина в диапазоне температур 70–100°C происходит в последовательности: плавление кор-гистонов, плавление релаксированной ДНК, плавление топологически напряженной ДНК. Было установлено, что $T_{пл}$ и ΔH отдельных пиков также зависят от концентрации ионов Mg^{2+} в буфере. В ядрах с конденсированным хроматином ионы Mg^{2+} в концентрации 5 мМ существенно в сравнении с развернутым хроматином увеличивали $T_{пл}$ кор-гистонов (на ~7°C), но при этом понижали $T_{пл}$ ядерной ДНК как в релаксированном, так и в напряженном состоянии (на ~2.5°C и ~7.5°C соответственно). При этом в присутствии ионов Mg^{2+} энтальпия плавления пиков существенно увеличивалась. В то же время снижение полимерности внутриядерной ДНК нивелирует стабилизирующее кор-гистоны действие ионов Mg^{2+} . Повышение концентрации ионов Mg^{2+} выше 5 мМ вызывает появление нового пика с $T_{пл}$ выше 100°C, который, возможно, отражает термическое поведение неких Mg-индуцированных агрегатов. Обсуждаются возможные механизмы, объясняющие особенности термического поведения хроматина внутри ядра.

Ключевые слова: ядро, хроматин, катионы Mg^{2+} , дифференциальная сканирующая калориметрия, термодинамика, торсионное напряжение ДНК.

DOI: 10.31857/S000630292302014X, EDN: CBBIGP

Эукариотическая ДНК хранится и функционирует внутри ядра диаметром в несколько мкм в виде динамического комплекса с гистонами и кислыми белками – хроматина, чья структура до сих пор остается главной интенсивно изучаемой, но до сих пор плохо понятой проблемой молекулярной биологии [1].

Структурной единицей хроматина служит нуклеосома, где короткий отрезок ДНК (146 пар оснований) делает 1.75 оборота левовращающей спирали вокруг положительно заряженного октамера гистоновых белков (кор-гистонов H2A, H2B, H3 и H4) с отрезком линкерной ДНК переменной длины в 20–80 пар оснований. Нуклеосомные частицы, объединенные линкерной ДНК, формируют отрицательно заряженную хро-

матиную фибриллу толщиной 10 нм, известную как «бусы на нитке».

Установлено, что концентрация фосфатов ДНК в клетке меняется по клеточному циклу от 50–300 мМ фосфатов в интерфазе до 340–600 мМ фосфатов в митотической хромосоме [2]. Этот процесс, известный как конденсация хроматина (образование структур высшего порядка), чрезвычайно важен не только для эффективного хранения и защиты генетического материала, но и, как полагают, служит одним из способов регуляции генной экспрессии [3], а также необходим для выполнения других важных биологических функций таких как репликация, репарация, рекомбинация и др. [4].

На сегодняшний день действующими являются две парадигмы структур высшего порядка в хроматине – иерархические и полимерные [5–8]. Современные технологии исследования хроматина (криомикроскопия, 3С- и более высокие Hi-C-методики и др.) дают все больше аргументов

Сокращения: ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия, ТЭА – триэтанолламин, NEM – N-этилmaleimид.

для жидкоподобной модели хроматина *in vivo*, которая предполагает, что 10-нм фибриллы конденсируются в нерегулярный и динамический полимерный ансамбль и свидетельствуют в пользу полимерной модели с «межпальцевой» укладкой элементарных 10-нм фибрилл. В зависимости от среды (эндогенных катионов, кроудинга, ионной силы и т.д.) нерегулярная и динамичная 10-нм фибрилла в ядре может формировать различные структуры, включая растянутые, завернутые, пересекающиеся, петлеобразные, колончатые [8].

Точный физический механизм индуцируемых катионами притяжений одноименно заряженных полимеров, лежащий, как полагают, в основе феномена компактизации, все еще остается неясным, хотя в последние годы этой проблеме уделяется особенно много внимания [9]. Предложено несколько электростатических моделей [10–12], но ни одна из них не в состоянии полностью объяснить весь накопленный экспериментальный материал.

В отличие от ДНК, чья индуцируемая поливалентными катионами конденсация *in vitro* интенсивно изучается многие годы [13], эксперименты с хроматином и его составными структурами (кор-частицами, нуклеосомами, выделенным и реконструированным хроматином) относительно немногочисленны [14–19], а исследований взаимодействия катионов с хроматином внутри ядра почти нет из-за ограниченности адекватных методов исследований и трудностей в интерпретации результатов [20, 21].

Вместе с тем известно, что высшая структура хроматина может нарушаться при выделении его из ядер [22], поэтому эксперименты *in vitro* на выделенном хроматине не всегда могут отражать ситуацию *in vivo*.

Магний и кальций — основные двувалентные катионы, участвующие в конденсации хроматина в клетке [23]. Эти ионы используются для выделения ядер с конденсированной структурой хроматина, характерной для его состояния *in situ* [24]. Катионы Mg^{2+} влияют на механические свойства ядер, изменяя их пластичность [25].

Причины компактного состояния ядерного хроматина следует искать в особенностях его структуры и окружения в ядре [26]. Хроматин в ядре находится в ограниченном объеме и в высокой концентрации, в условиях кроудинга и в среде с полиаминами и катионами металлов, totalная концентрация которых значительна (от 2 до 40 мМ) [27–29], и, как теперь показано, имеет пластичную нуклеосомную структуру, обеспечивающую его жидкокристаллическое поведение [30].

В нашей работе мы приводим данные об изменении энергетического состояния хроматиновых доменов внутри ядер клеток печени крысы, индуцируемом ионами магния. Эксперименты бы-

ли выполнены методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на суспензии ядер клеток печени крысы, выделенных в присутствии ионов Mg^{2+} . Результаты дают возможность предположить участие межфибриллярных взаимодействий, индуцируемых магнием, в ослаблении внутрицепочечных взаимодействий ДНК. Сообщается об увеличении магнием стабильности гистонового кора, коррелирующей с дестабилизацией ДНК.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные ядра получали из печени самок белых крыс массой 100–150 г [31]. Гомогенизацию печени и дальнейшие процедуры проводили в растворе №1 следующего состава: 20 мМ ТЭА (триэтаноламин)-HCl, pH 7.6, 30 мМ NaCl и 10 мМ $MgCl_2$, содержащем 10% сахарозы, 0.2 мМ фенилметилсульфонил фторида (Sigma, США) и 4 мМ N-этилmaleимида (NEM) (Sigma, США). Гомогенат центрифугировали при 1000 g 10 мин, осадок смешивали с раствором №2 следующего состава: 20 мМ ТЭА-HCl, pH 7.6, 30 мМ NaCl и 5 мМ $MgCl_2$, содержащим 2.5 М сахарозы, 0.2 мМ фенилметилсульфонил фторида и 4 мМ NEM до конечной концентрации сахарозы 2.1 М и центрифугировали при 50000 g в течение 45 мин. Осадок ядер ресуспендировали в растворе №2 без сахарозы и без NEM и осаждали 5 мин при 1000 g. Выделенные и очищенные таким образом ядра хранили при $-60^{\circ}C$ в 60%-м глицерине. Перед использованием аликвоты ядер промывали раствором, содержащим 20 мМ ТЭА-HCl, pH 7.6, 30 мМ NaCl и 5 мМ $MgCl_2$, и ресуспендировали в соответствующих растворах для ДСК.

Содержание ДНК и РНК в препаратах ядер определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Hitachi-124 (Япония) по методу, описанному в работе [32]. Концентрацию ДНК выражали в молях нуклеотидов, используя молекулярную массу одного нуклеотида 330 Да.

Электрофорез белков выполняли в 15%-м SDS-полиакриламидном геле, электрофорез ДНК проводили в 1%-м агарозном геле в боратном буфере.

Дифференциальная сканирующая калориметрия суспензии ядер. Суспензию изолированных ядер клеток печени крысы (0.5 мг ДНК на мл, или 1.5 мМ нуклеотидов) помещали в платиновую ячейку микрокалориметра ДАСМ-4 (НПО «Биоприбор», Пушино) и сканировали в температурном диапазоне 25–130°C со скоростью 2°C в мин. Суспензии ядер предварительно дегазировали. Ячейку сравнения заполняли соответствующим буфером. Обработку данных проводили в программе «Agina 2», разработанной в НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского

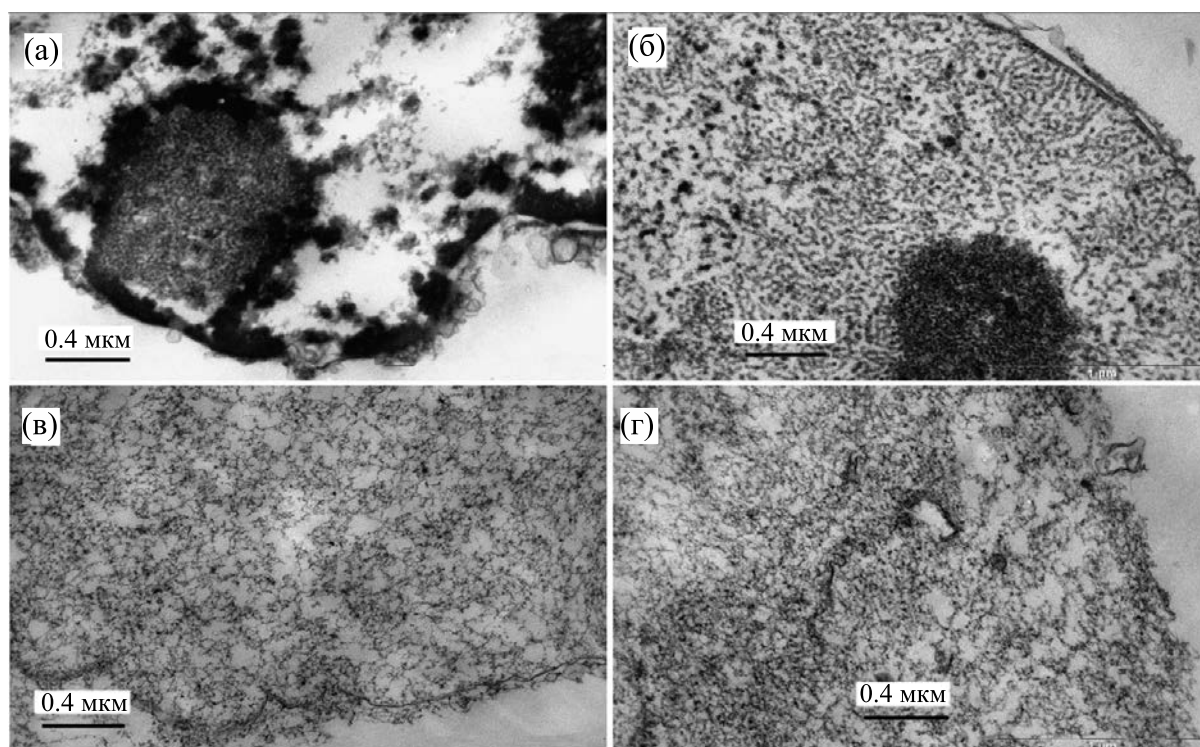


Рис. 1. Электронные микрофотографии изолированных ядер клеток печени крысы в растворе 20 мМ ТЭА, pH 7.6, содержащем 5 мМ $MgCl_2$ (а), 1 мМ $MgCl_2$ (б), 0.1 мМ $MgCl_2$ (в), 1 мМ ЭДТА (г).

МГУ. Программа записывала кривую зависимости избыточной теплоемкости образца от температуры. Из кривой вычиталась приборная базовая линия теплопоглощения буфера и химическая базовая линия, которую вычисляли по формуле $(1 - \alpha) \cdot C_H + \alpha \cdot C_D$, где C_H и C_D — теплоемкости нативного и денатурированного состояний, а α пропорциональна количеству денатурировавшего вещества, т. е. $\alpha = S_1/S$, где S_1 — площадь под пиком, ограниченная кривой сверху, базовой линией снизу и данной температурой справа, а S — общая площадь под пиком. Сигнал (в мкВт) нормировали на концентрацию и скорость прогрева и переводили в стандартные для теплоемкости единицы измерения (кДж/моль·град) путем умножения на коэффициент $k = M \cdot 0.06 / C \cdot V \cdot \nu$, где ν — скорость нагрева в град/мин, V — объем ячейки в мл, C — концентрация макромолекул в мг/мл, M — молекулярная масса образца в кДа.

Деконволюцию термограмм проводили по программе Origin 7.

Электронная микроскопия. Образцы фиксировали 1%-м глутаровым альдегидом в соответствующем буфере (исходный 25%-й глутаральдегид нейтрализовали до pH 7.0 добавлением NaOH) при 4°C в течение 1.5 ч, а затем 1%-м OsO_4 в течение 1 ч, дегидратировали и заключали в эпон. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB

III (LKB, Швеция), контрастировали цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе JEM-1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для характеристики структуры хроматина в выделенных ядрах использовали электронную микроскопию. Выделенные и отмытые от глицерина ТЭА-буфером с 5 мМ $MgCl_2$ ядра переводили в буфера с более низким содержанием ионов Mg^{2+} (< 5 мМ) и после 15 мин выдерживания подвергали электронно-микроскопическому исследованию, показавшему, что если в диапазоне концентраций 5–2 мМ Mg^{2+} ядерный хроматин выглядит как скопление плотных гетерогенных глобулярно-фибриллярных структур диаметром 100–200 нм без заметных морфологических отличий, то при ~1 мМ Mg^{2+} он становится гомогенным с диаметром фибрилл и глобул около 30 нм. Далее при уменьшении концентрации магния до 0.1 мМ хроматин деконденсируется, демонстрируя фибриллы, диаметр которых около 10 нм, и мало отличается от диаметра фибрилл в буфере с ЭДТА (рис. 1).

Изменение конденсации хроматина было подтверждено данными оптических измерений при $\lambda = 630$ нм (рис. 2). Известно, что мутность ядер-

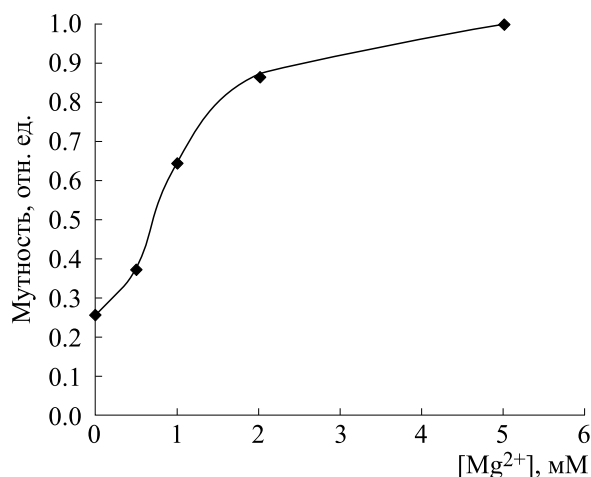


Рис. 2. Нормированная зависимость поглощения при $\lambda = 600$ нм ядерной суспензии от концентрации ионов магния. Поглощение при 5 мМ $MgCl_2$ принято за единицу. Концентрация ДНК в суспензии составляла ~50 мкг/мл.

ных суспензий коррелирует с их морфологией. Поглощение, фиксируемое в длинноволновой области (при длинах волн выше 300 нм), обусловлено рядом эффектов [33], среди которых основной вклад вносит рассеяние внутриядерного хроматина. Как следует из рис. 2, наблюдаемое нормированное поглощение суспензии ядер при 600 нм снижалось почти в четыре раза при уменьшении концентрации ионов Mg^{2+} от 5 мМ до перевода их в буфер с ЭДТА.

Электрофорез белков подтвердил неизменный состав и соотношение фракций гистонов во всем диапазоне используемых концентраций ионов магния во всех изолированных ядрах.

Таким образом, исследуемые образцы ядер содержат разный по компактизации хроматин и могут быть использованы для решения поставленной задачи — термодинамического сравнения плавления компактного и деконденсированного хроматина внутри самого ядра в зависимости от концентрации ионов магния.

Из литературы известно, что профили термического плавления изолированных ядер животных и человека являются многокомпонентными (три-пять пиков), что соответствует плавлению разных доменов ядерного хроматина [34, 35]. Показано также, что интенсивности пиков и их соотношение зависят от стадии клеточного цикла, возраста, природы катионов в буфере и ионной силы [36–39].

На рис. 3 представлены полученные нами экспериментальные зависимости избыточной молярной теплоемкости ΔC_p ядер от t при разных концентрациях ионов Mg^{2+} . При 5 мМ на экспериментальной термограмме видны только два пи-

ка — основной при $T_{пл} \approx 83^\circ C$ и небольшой пик, который выглядит как плечо основного пика при температуре около $94^\circ C$. При снижении концентрации магния уже можно выделить первый пик, сначала как плечо слева от основного пика, и в отсутствие магния в растворе (в присутствии 1 мМ ЭДТА) — как отдельный пик с $T_{пл}$ около $74^\circ C$. На рис. 3б приведены эти же термограммы с деконволюцией на три пика.

По интерпретации, предложенной авторами работы [38], в порядке возрастания $T_{пл}$ в хроматине ядра последовательно плавятся белки кора нуклеосом (пик I), релаксированная ДНК (пик II) и топологически напряженная ДНК (пик III). Следует заметить, что продолжают существовать и другие интерпретации пиков [40–42], хотя для идентификации этих пиков авторы подчас использовали одни и те же биохимические подходы. На основании того, что пик I исчезает под действием протеазы [43] и, в отличие от пиков II и III, не реагирует как ДНК при изменении ионной силы [38], он определяется как пик плавления мажорного белка, коим в ядрах являются гистоны. Поскольку пик III разрушается при небольшом действии нуклеазы [34, 41], а известно, что конденсация хроматина в ядре не меняется из-за расщепления ДНК, пик III не может быть связан с конденсацией хроматина. В то же время величина пика III связана с активностью клетки [37], и при его уменьшении материал пика III переходит в пик II, что может свидетельствовать о плавлении в его составе ДНК в состоянии топологической напряженности, которое чувствительно к действию нуклеазы [34, 38]. Учитывая эти данные, а также собственные результаты по взаимодействию ядер с антибиотиком дистамицином [44], интерпретация, предложенная в работе [38], представляется нам более предпочтительной.

Из рис. 3 отчетливо видно, что в низкой ионной силе при 5 мМ $MgCl_2$ имеет место практическое совмещение пиков I и II. Небольшой размер пика III, по-видимому, связан с недостаточным ингибированием нуклеаз в среде с ионами магния (несмотря на использование NEM) в процессе более длительного в нашем случае выделения ядер по сравнению с более коротким выделением с меньшей очисткой ядер или в присутствии ЭДТА [34, 35, 40]. Вследствие этого часть топологически напряженной ДНК обычно большого пика III переходит в пик II.

То же самое следует из анализа термограмм ядер, полученных без NEM — ингибитора сериновых протеаз, активирующих эндонуклеазы. По данным электрофореза выделенная в присутствии NEM ядерная ДНК имела длину около 20–50 т.п.н., а средняя длина ДНК в препаратах без NEM составляла примерно 1–3 т.п.н. (рис. 4).

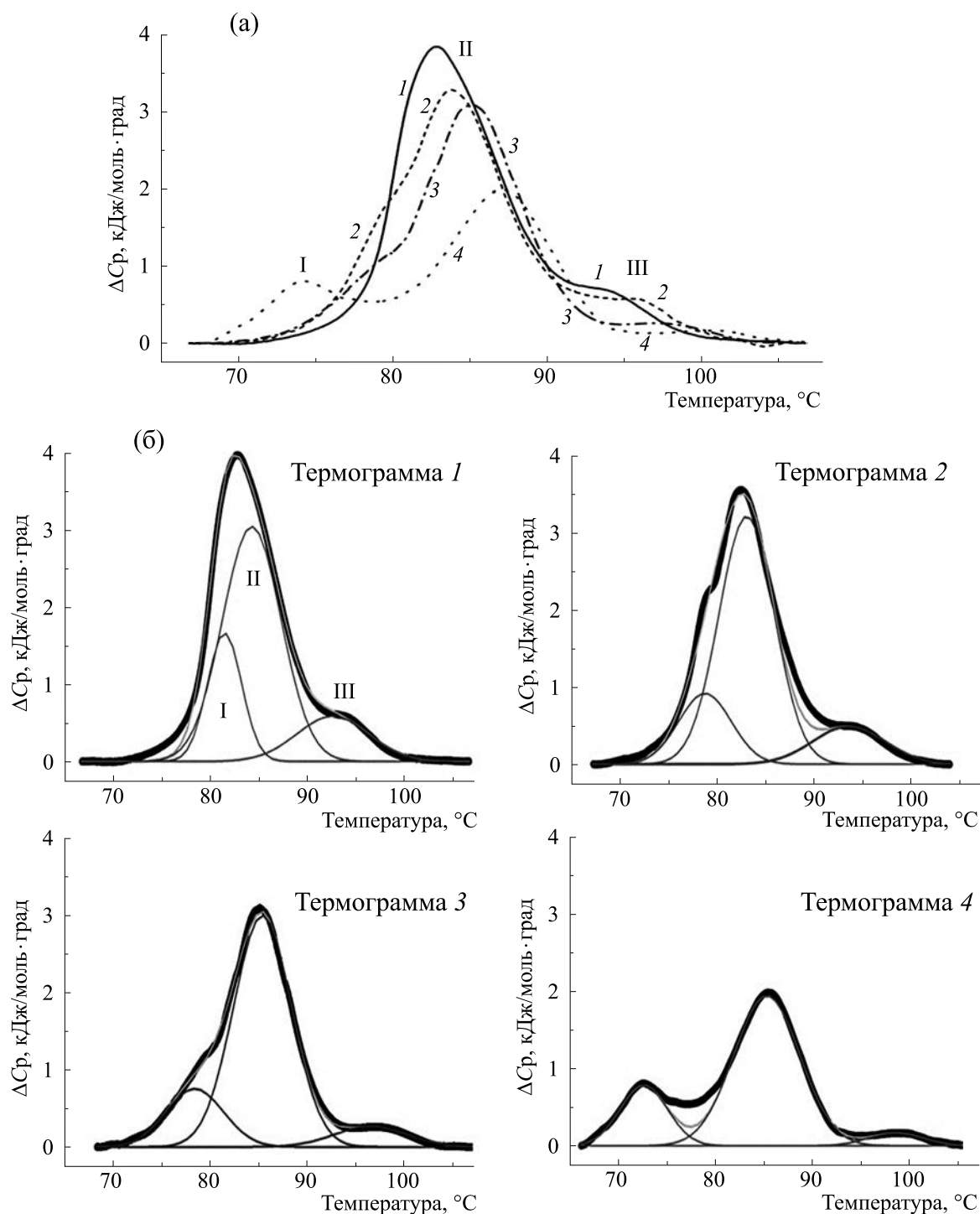


Рис. 3. Термограммы плавления ядер клеток печени крысы: (а) — в растворе 20 мМ ТЭА, рН 7.6, содержащем 5 мМ $MgCl_2$ (кривая 1); 1 мМ $MgCl_2$ (кривая 2); 0.1 мМ $MgCl_2$ (кривая 3) или 1 мМ ЭДТА (кривая 4); (б) — деконволюция тех же термограмм. Кривая, суммирующая компонентные кривые, накладывается на наблюдаемую кривую и почти не видна.

На термограммах этих ядер полностью отсутствовал пик III (рис. 5), пик II уменьшался и немного сдвигался в низкотемпературную область, по-видимому, из-за существенного снижения

молекулярной массы ДНК. Снижение полимерности ДНК сильно сказалось на пике I — он сместился на 7°C в низкотемпературную область в сравнении с контролем и проявился как отдель-

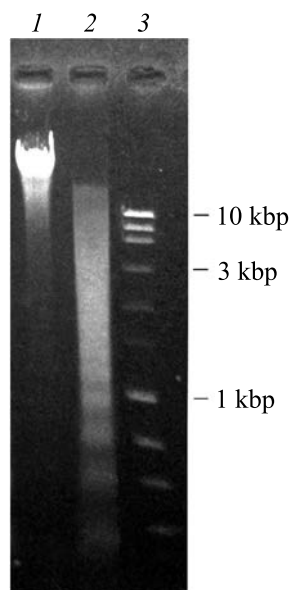


Рис. 4. Электрофорез в 1%-м агарозном геле ДНК из ядер клеток печени крысы в присутствии (дорожка 1) и в отсутствие (дорожка 2) NEM в буфере выделения; дорожка 3 — ДНК-маркеры.

ный пик. Отметим, что его $T_{пл}$ практически совпала с $T_{пл}$ пика I в ядрах с деконденсированным с помощью ЭДТА хроматином (см. рис. 3). Таким образом, можно заключить, что снижение молекулярной массы внутриядерной ДНК нивелирует стабилизирующее кор-гистоны действие ионов Mg^{2+} . Отсюда следует также, что стабилизация кор-гистонов связана с ДНК-гистоновыми взаимодействиями.

Термодинамические параметры кривых плавления на рис. 3 рассчитывали из термограмм по модель-независящей системе $\Delta H = \int C_p \cdot dT$, $\Delta S = \int (C_p/T) \cdot dT$, а изменение свободной энергии

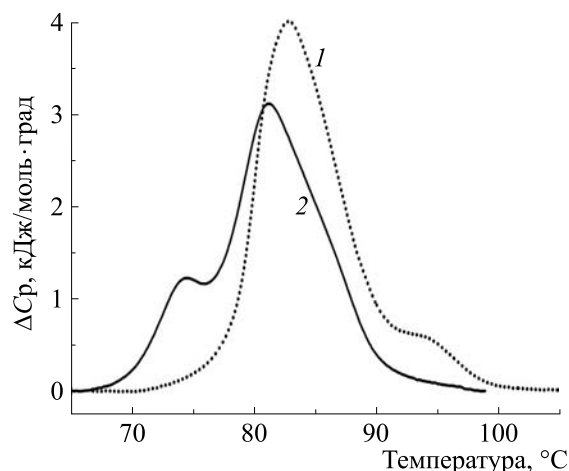


Рис. 5. Термограммы плавления ядер клеток печени крысы: кривая 1 — в 20 мМ ТЭА, pH 7.6 и 5 мМ $MgCl_2$, ядра выделены с NEM; кривая 2 — ядра в том же растворе, но выделены без NEM.

рассчитывали по формуле $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. Суммарные величины этих параметров и значения ΔH и $T_{пл}$ для каждого пика в отдельности для разных концентраций ионов Mg^{2+} в буфере приведены в табл. 1. Из рис. 3 и табл. 1 видно, что $T_{пл}$ ДНК как релаксированной, так и напряженной, увеличиваются с уменьшением концентрации ионов Mg^{2+} в буфере, тогда как $T_{пл}$ белкового пика уменьшается. Максимальные изменения $T_{пл}$ составили для ДНК в пиках II и III — 2.6 и 7.6°C соответственно, тогда как $T_{пл}$ белка в диапазоне 5–0 мМ $MgCl_2$ снизилась на 7.3°C по сравнению с $T_{пл}$ пика I в ядрах при 5 мМ $MgCl_2$. Обращает на себя внимание разница во влиянии магния на плавление релаксированной и топологически напряженной ДНК. Для последней оно существен-

Таблица 1. Термодинамические параметры плавления ядер в растворе 20 мМ ТЭА, pH 7.6 с разным содержанием ионов магния и пиков плавления, полученные в результате деконволюции термограмм

	Суммарные параметры			ΔH			T_m		
	ΔH	ΔS	ΔG	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 1	Пик 2	Пик 3
5 мМ $MgCl_2$	36.6	99.8	6.9	7.4	23.1	5.5	81.5	84.3	92.6
1 мМ $MgCl_2$	35.0	95.4	6.6	6.2	22.9	4.5	80.3	84.6	95.1
0.1 мМ $MgCl_2$	30.3	82.6	5.7	5.5	22.3	2.5	78.4	85.4	96.5
1 мМ ЭДТА	24.2	66.0	4.5	4.8	16.5	1.2	74.2	86.9	100.2

Примечание. Показаны средние значения из двух-трех измерений с ошибкой, не превышающей 0.5°C для $T_{пл}$ и 5% для ΔH (кДж/моль нуклеотидов), ΔS (Дж/моль нуклеотидов·град) и ΔG (кДж/моль нуклеотидов).

но выше. Получается, что в связанных магнием хроматиновых фибриллах напряженная ДНК сильнее дестабилизируется. Повышенная $T_{пл}$ напряженной ДНК по сравнению с релаксированной может служить указанием на то, что напряженность ДНК в ядре определяется положительным торсиональным стрессом, связанным с вращением оси спирали ДНК влево, сжимающим комплементарные цепочки ДНК. В этом случае эффект магния, растягивающий комплементарные цепи ДНК (см. ниже), может сильнее влиять на нестабильное напряженное состояние ДНК, действуя аддитивно с силами, которые стремятся вернуть ДНК в стабильное состояние.

Из данных табл. 1 можно заключить, что индуцируемая понижением концентрации ионов Mg^{2+} декомпактизация ядерного хроматина сопровождается уменьшением суммарной энтальпии на ~ 12 кДж/моль нуклеотидов (сравни ядра в 5мМ $MgCl_2$ и ядра в ЭДТА). Этот вывод не совпадает со сделанным ранее заключением [40], что индуцируемый понижением ионной силы процесс декомпактизации хроматина атермичен и не изменяет ΔH плавления ядерного хроматина. Анализируя данные по плавлению отдельных пиков можно видеть, что наибольшие изменения энтальпии деконденсация вызывает в пике III. Его интенсивность падает почти в пять раз, тогда как наиболее представленный в термограмме пик релаксированной ДНК уменьшается всего лишь в полтора раза. Возможно, эти различия между пиками II и III при разворачивании хроматина и разбухании ядер вызваны потерей важных для стабилизации напряженного состояния ДНК контактов с матриксными структурами ядра. В результате ДНК релаксирует и плавится уже в пике II. При этом соотношения ΔH пика белка и двух пиков ДНК остаются практически неизменными.

Можно представить, что ионы Mg^{2+} взаимодействуют независимо с белком и ДНК хроматина, вызывая такие изменения в структуре каждого из них, из-за которых меняется их стабильность. Однако наблюдаемая отрицательная корреляция в термическом поведении пиков I и II не исключает и возможность модуляции магнием воздействия одного компонента нуклеосомы на стабильность другого, подобно тому, как это, например, происходит при изменении ионной силы [43] и, в частности, за счет изменения под действием магния ДНК-гистоновых взаимодействий.

О понижении $T_{пл}$ основного пика ДНК в ядрах в присутствии ионов Mg^{2+} сообщалось в работе

[45], где авторы плавляли ядра в присутствии ионов Mg^{2+} и этанола. Снижение $T_{пл}$ ДНК ядер в буфере с ионами Mg^{2+} можно заметить на экспериментальных кривых в работе [40]. Оно отмечено на термограммах плавления хроматина в работе [46], хотя сами авторы не обсуждают причины этого эффекта.

Известно, что щелочноземельный металл Mg относится к категории бивалентных металлов, взаимодействующих, главным образом, с фосфатами ДНК и нейтрализующих их [47]. Поэтому ионы Mg^{2+} в низких концентрациях обычно повышают $T_{пл}$ ДНК в растворе, хотя известны и другие противоположные эффекты, зависящие от концентрации как ДНК, так и Mg^{2+} [48, 49]. С другой стороны, известно, что двухвалентные катионы Mg^{2+} и Ca^{2+} в физиологической концентрации не конденсируют чистую ДНК в растворе [13], но могут конденсировать при достаточно больших концентрациях катионов в пленках [50] или в параллельных слоях в 2D-размерном пространстве [51].

Стабильность двухцепочечной ДНК определяется стэкинг-взаимодействиями оснований, их спариванием, свойствами гидратационной оболочки, а дестабилизирует ДНК отталкивание отрицательно заряженных фосфатов. Понижение $T_{пл}$ ДНК означает ослабление некоторых стабилизирующих ее внутрицепочечных взаимодействий и (или) возрастание сил дестабилизирующих.

Мы полагаем, что в ядре именно катион-индуцируемые межфибриллярные взаимодействия вносят основной вклад в дестабилизацию внутриядерной ДНК. Авторы работы [52] предложили электростатическую zipper-модель конденсации-агрегации одноименно заряженных полимеров. Суть ее для ДНК заключается в zipper-подобном выстраивании отрицательно заряженных фосфатов сахарно-фосфатного остова одной молекулы ДНК напротив положительно заряженных катионов, связанных в бороздках ДНК другой молекулы. С помощью предложенной спекулятивной модели авторы объяснили повышение температуры плавления в агрегатах гомологичной и пластичной ДНК в экспериментах по их термической денатурации [53] «идеализацией» структуры ДНК, хотя не исключили возможности, что в присутствии двухвалентных катионов электростатические силы и силы гидратации макромолекул способны индуцировать и пока необъясненный противоположный эффект. По мнению авторов, модель является универсальной и может быть

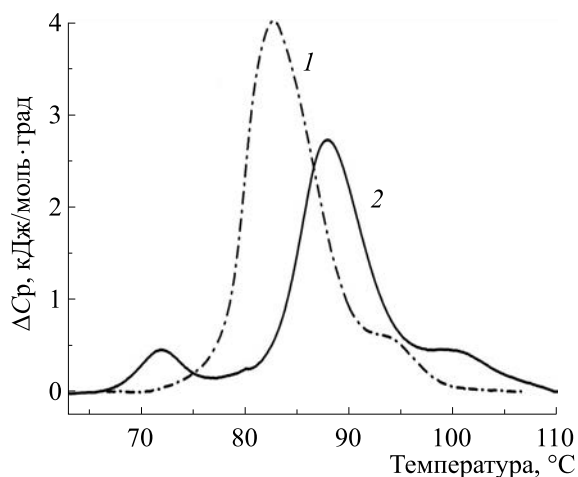


Рис. 6. Термограммы плавления ядер клеток печени крысы: кривая 1 — в 20 мМ ТЭА, pH 7.6 и 5 мМ $MgCl_2$; кривая 2 — перевод ядер из буфера с 5 мМ $MgCl_2$ (1) в буфер с 125 мМ NaCl.

применима как к ДНК, так и к компактизации фибрилл хроматина. Для хроматина по этой модели основной стабильности катион-индуцируемой ассоциации на определенных расстояниях может служить так называемая «структурная гомология» или «структурная комплементарность» фибрилл хроматина [54]. В рамках этой теории, учитывая современные данные о структуре фибрилл хроматина, объяснить снижение $T_{пл}$ в присутствии ионов Mg^{2+} не представляется возможным.

Поэтому наше объяснение сводится к следующему. Уже в нуклеосомах ДНК образует два параллельно расположенных супервитка ДНК, тесно сближенных за счет октамера гистонов, подобно расположению ДНК в пленках [50] или в параллельных слоях между положительно заряженными мембранами [51]. В ограниченном пространстве ядра при конденсации хроматина для достижения высокой плотности упаковки ДНК нуклеосомы вступают во взаимодействия «лицом к лицу» с поверхностями ДНК, увеличивая количество параллельных тесно сближенных супервитков ДНК [30]. В присутствии ионов магния электростатические силы притяжения между фибриллами формируют перпендикулярную оси ДНК силу растяжения между двумя комплементарными цепочками ДНК, ослабляя их взаимодействие. В работе [56] приводится оценка силы притяжения между молекулами ДНК в растворе на расстоянии 29 Å при концентрации магния ~100 мМ. Она составила примерно $-0.02 kT$ на пару оснований, что существенно меньше мини-

мальной энергии денатурации ДНК (примерно $-2 kT$). Видно, что сила притяжения очень слабая, однако в случае хроматина в условиях ядра она может возрасти за счет специфических особенностей катионов магния: их малый размер, жесткая координация и направленность связей, способность создавать прямые связи между фосфатами соседних фибрилл способствуют возникновению жесткой связи каждой из комплементарных цепочек ДНК с соседней молекулой ДНК. Малая растворимость солей фосфатов, образующихся при прямом взаимодействии с магнием по сравнению с гидратированным магнием и их энергетическая выгодность [56] увеличивают силу притяжения между фибриллами, способствуя дополнительному растяжению комплементарных цепей. Эффект растяжения может усиливаться также взаимодействием гистонов и других белков с одной из комплементарных цепочек ДНК. Тем не менее, общий вклад силы притяжения между молекулами в стабильность ДНК, по-видимому, остается небольшим, о чем свидетельствует незначительное снижение $T_{пл}$.

Особая роль магния подтверждается термическим поведением ядерного хроматина при физиологической ионной силе в отсутствии ионов Mg^{2+} (рис. 6). Известно, что ионы натрия конкурируют с ионами магния, вытесняя последние, и в физиологической концентрации сохраняют определенную степень компактизации хроматина (до уровня 30 нм фибрилл). Если ядра, выделенные в присутствии магния, перевести в раствор 20 мМ ТЭА и 125 мМ NaCl, то $T_{пл}$ ядерной ДНК становится выше, чем в растворе с магнием. Опять же, больше возрастает $T_{пл}$ топологически напряженной ДНК. При этом физиологическая ионная сила подавляет взаимодействие гистонов с ДНК, и пик гистонов резко теряет свою стабильность, что выражается в значительном снижении $T_{пл}$ и энтальпии плавления.

Следует заметить, что в литературе рассматриваются и другие механизмы понижения $T_{пл}$ ДНК в присутствии ионов Mg^{2+} . Это, прежде всего, возможное взаимодействие Mg^{2+} с остатками гуанина [48, 49], а также его π-взаимодействия с основаниями [57]. Понижение $T_{пл}$ в присутствии лиганда также обычно наблюдают, когда константа взаимодействия с денатурированной формой макромолекулы превышает ее значение для нативной. Однако установлено, что в случае ионов магния константа связывания с ДНК в нативном состоянии выше, чем с ДНК в денатурированном состоянии [58].

Интересная информация была получена нами при повышенных концентрациях магния (>5 мМ)

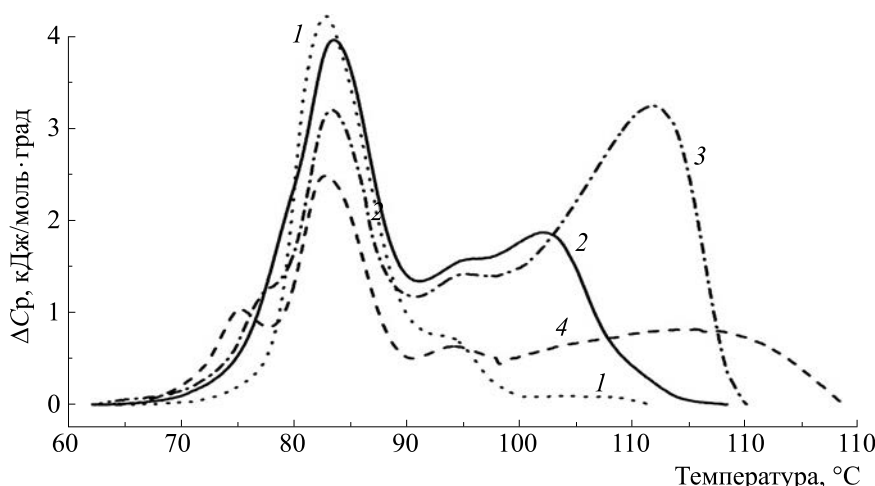


Рис. 7. Изменение термограмм плавления ядер клеток печени крысы в буфере 20 мМ ТЭА, рН 7.6 при увеличении концентрации $MgCl_2$: кривая 1 – 5 мМ, кривая 2 – 10 мМ, кривая 3 – 20 мМ, кривая 4 – 40 мМ.

и нагревании компактных ядер до температуры $130^{\circ}C$.

На термограмме (рис. 7) обнаруживался новый высокотемпературный пик с $T_{пл}$ больше $100^{\circ}C$. Ранее было показано образование агрегатов денатурированной ДНК в присутствии магния в процессе денатурации, но разваливающихся при достижении $T_{пл}$ или насыщающей концентрации магния [59, 60]. Возможно и в нашем случае, что это стабилизированная магнием денатурированная ДНК в составе хроматина, образующая специфические агрегаты с более высокой $T_{пл}$, подобно описанным ранее при плавлении ДНК в присутствии физиологической концентрации натрия и высокой концентрации магния [49]. Однако плавление этих агрегатов происходило до $100^{\circ}C$. В то же время появление этого пика коррелировало с уменьшением интенсивности пика II, что может служить указанием на их взаимосвязь. Таким образом, не исключено, что это – преобразовавшаяся при комнатной температуре некая компактная конденсированная форма хроматина, возможно, ассоциированная и с денатурированной ДНК, которая кооперативно и с большей энтальпией плавится при значительно более высоких температурах. Ее разрушение при дальнейшем увеличении концентрации магния и, соответственно, ионной силы свидетельствует об участии белка в формировании этой структуры путем электростатического взаимодействия между белком и ДНК. Работы в этом направлении продолжаются.

Таким образом, в данной работе с помощью метода ДСК, позволяющего работать с мутными суспензиями ядер, получены термодинамические данные по плавлению внутриядерного хроматина

в присутствии ионов магния. Их анализ позволил предположить, что ионы магния в относительно малых концентрациях в условиях ограниченного пространства и высокой плотности внутриядерного хроматина способны вызывать такие изменения в балансе сил взаимодействия между соседними молекулами ДНК и межцепочечными силами внутри ДНК, которые вызывают ее дестабилизацию и снижение $T_{пл}$. При этом стабилизация октамера гистонов в присутствии магния связана с полимерным состоянием ДНК. Повышенные концентрации магния в условиях кроудинга в ядре, возможно, приводят к формированию особо стабильных конденсатов нуклеопротеидов, плавящихся с увеличенной энтальпией и $T_{пл}$. Из наших результатов можно также заключить, что магний, понижая $T_{пл}$ и ослабляя взаимодействие двух цепочек ДНК, способствует действию ферментов типа полимераз. Известно, что полимеразы создают впереди себя положительное напряжение (торсиональный стресс) в ДНК, препятствующее их движению. Магний, оказывая свое действие на напряженную ДНК сильнее, чем на релаксированную, тем более способствует продвижению полимеразы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.Н. Орлову и В.Н. Мичуриной за помощь в экспериментах с применением ДСК.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

У авторов отсутствует конфликт интересов в финансовой и в какой-либо иной сфере.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с национальными и международными руководящими принципами по уходу и гуманному использованию животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. I. Prieto and K. Maeshima, *Essays Biochem.*, **63** (1), 133 (2019).
2. J. R. Daban, *Biochemistry*, **39**, 3861 (2000).
3. G. Li and D. Reinberg, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **21**, 175 (2011).
4. J. C. Hansen, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **31**, 361 (2002).
5. В. Ю. Поляков, О. В. Зацепина, И. И. Киреев и др., *Биохимия*, **71**, 6 (2006).
6. Z. Zhou, R. Yan, W. Jiang, and J. M. K. Irudayaraj, *Nanoscale Adv.*, **3** (4), 1019 (2021).
7. M. Tark-Dame, R. van Driel, and D. W. Heermann, *J. Cell Sci.*, **124** (6), 839 (2011).
8. K. Maeshima, S. Tamura, J. C. Hansen, and Y. Itoh, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **64**, 77 (2020).
9. M. Egli, *Chem. Biol.*, **9**, 277 (2002).
10. A. A. Kornyshev, D. J. Lee, S. Leikin, and A. Wynveen, *Rev. Mod. Phys.*, **79**, 943 (2007).
11. A. G. Cherstvy, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**, 9942 (2011).
12. Z. J. Tan and S. J. Chen, *Biophys. J.*, **91** (2), 518 (2006).
13. V. A. Bloomfield, *Biopolymers*, **44** (3), 269 (1997).
14. P. M. Schwarz, A. Felthaus, T. M. Fletcher, and J. C. Hansen, *Biochemistry*, **35** (13), 4009-1996).
15. M. de Frutos, E. Raspaud, A. Leforestier, and F. Livolant, *Biophys. J.*, **81** (2), 1127 (2001).
16. C. A. Davey, and T. J. Richmond, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** (17), 11169 (2002).
17. A. Bertin, S. Mangenot, M. Renouard, et al., *Biophys. J.*, **93**, 3652 (2007).
18. N. Korolev, A. Allahverdi, Ye. Yang, et al., *Biophys. J.*, **99**, 1896 (2010).
19. A. Zinchenko, N. V. Berezhnoy, S. Wang, et al., *Nucl. Acids Res.*, **46**, 635 (2018).
20. M. Krafcikova, S. Dzatko, C. Caron, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **141** (34), 13281 (2019).
21. J. Ellenberg, A. Walter, C. Chapuis, and S. Huetol, *J. Struct. Biol.*, **184** (3), 445 (2013).
22. P. J. Giannasca, R. A. Horowitz, and C. L. Woodcock, *J. Cell Sci.*, **105** (2), 551 (1993).
23. T. Ohyama, *Int. J. Mol. Sci.*, **20** (17), 4232 (2019).
24. M. A. Billett and T. J. Hall, *Nucl. Acids Res.*, **6** (8), 2929 (1979).
25. Y. Shimamoto, S. Tamura, H. Masumoto, and K. Maeshima, *Mol. Biol. Cell*, **28** (11), 1580 (2017).
26. S. Schnell and R. Hancock, *Methods Mol. Biol.*, **463**, 3 (2008).
27. R. Hancock, *Biochemistry (Mosc.)*, **83** (4), 326 (2018).
28. R. Strick, P. L. Strissel, K. Gavrilov, and R. Levi-Setti, *J. Cell Biol.*, **155** (6), 899 (2001).
29. N. Korolev, O. V. Vorontsova, and L. Nordenskiöld, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **95**, 23 (2007).
30. S. E. Farr, E. J. Woods, J. A. Joseph, et al., *Nat. Commun.*, **12** (1), 2883 (2021).
31. А. Н. Прусов, Т. А. Смирнова и Г. Я. Коломийцева, *Биохимия*, **80** (3), 427 (2015).
32. А. С. Спирин, *Биохимия*, **23**, 656 (1976).
33. A. Prado, C. Puyo, J. Arlucea, et al., *J. Colloid Interface Sci.*, **177** (1), 9 (1996).
34. N. A. Touchette and R. D. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2642 (1985).
35. C. Balbi, M. L. Abelson, L. Gogioso, S. Parodi, et al., *Biochemistry*, **28**, 3220 (1989).
36. C. Nicolini, A. Diaspro, L. Vergani, and G. Cittadini, *Int. J. Biol. Macromol.*, **10**, 137 (1988).
37. M. Almagor and R. D. Cole, *Biochemistry*, **28**, 5688 (1989).
38. N. A. Touchette and R. D. Cole, *Biochemistry*, **31**, 1842 (1992).
39. A. N. Prusov, G. Ya. Kolomijtseva, and T. A. Smirnova, *Pharmaceut. Biol.*, **55**, 687 (2017).
40. B. Cavazza, G. Brizzolara, G. Lazzarini, et al., *Biochemistry*, **30** (37), 9060 (1991).
41. C. Balbi, P. Sanna, P. Barboro, et al., *Biophys. J.*, **77** (5), 2725, (1999).
42. S. Noriega, G. Budhiraja, and A. Subramanian, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **44** (8), 1331 (2012).
43. M. Almagor and R. D. Cole, *J. Biol. Chem.*, **264**, 6515 (1989).
44. А. Н. Прусов, Т. А. Смирнова и Г. Я. Коломийцева, *Биохимия*, **83** (10), 1534 (2018).
45. Z. Darzynkiewicz, F. Traganos, T. Sharpless, and M. R. Melamed, *J. Cell Biol.*, **68** (1), 1(1976).
46. X. Ni and R. D. Cole, *Biochemistry*, **33** (31), 9276 (1994).
47. I. Sissoëff, J. Grisvard, and E. Guillé, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **31** (2), 165 (1976).
48. Y. P. Blagoi, V. A. Sorokin, V. A. Valeev, et al., *Biopolymers*, **17** (5), 1103 (1978).
49. А. П. Власов, Л. И. Яхонтова и В. Т. Андрианов, *Биофизика*, **36** (3), 437(1991).
50. K. Serec, S. D. Babic, R. Podgornik and S. Tomic, *Nucl. Acids Res.*, **44**, 178456 (2016).
51. I. Koltover, K. Wagner, and C. R. Safinya, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97** (26), 14046 (2000).
52. A. A. Kornyshev and S. Leikin, *J. Chem. Phys.*, **107**, 3656 (1997).
53. A. G. Cherstvy and A. A. Kornyshev, *J. Phys. Chem.*, **109** (26), 13024 (2005).
54. A. G. Cherstvy and V. B. Teif, *J. Biol. Phys.*, **39** (3), 363 (2013).
55. Zh.-L. Zhang, Y. Y. Wu, K. Xi, et al., *Biophys. J.*, **113**, 517 (2017).
56. G. R. Clark, C. J. Squire, L. J. Baker, et al., *Nucl. Acids Res.*, **28** (5), 1259 (2000).
57. L. McFail-Isom, X. Shui, and L. Williams, *Biochemistry*, **37** (49), 17105 (1998).
58. J. E. Morgan, J. W. Blankenship, and H. R. Matthews, *Arch. Biochem. Biophys.*, **246** (1), 225 (1986).
59. G. S. Ott, R. Ziegler, and W. R. Bauer, *Biochemistry*, **14** (15), 3431 (1975).
60. J. G. Duguid, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides, and G. J. Thomas, Jr., *Biophys. J.*, **69** (6), 2623 (1995).

Melting Calorimetry of Rat Liver Nuclei in the Presence of Magnesium Ions**G.Ya. Kolomijtseva*, A.N. Prusov*, E.A. Kolomijtseva**, and T.A. Smirnova*, *****

**Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskie Gory, 1/40, Moscow, 119992 Russia*

***MIREA – Russian Technological University, prosp. Vernadskogo 78, Moscow, 119454 Russia*

****All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Timiryazevskaya ul. 42, Moscow, 127550, Russia*

Differential scanning calorimetry was used to determine thermodynamic parameters of decondensation of intranuclear rat liver chromatin was induced by a decrease in the concentration of magnesium ions from 5 mM to 0 mM. The process of chromatin melting in the temperature range of 70–100°C occurs in the following order: melting of core-histones, melting of relaxed DNA, and melting of topologically constrained DNA. It was found that T_m and ΔH of individual peaks also depend on the concentration of Mg^{2+} ions in the buffer. In nuclei with condensed chromatin, Mg^{2+} ions at a concentration of 5 mM increased significantly the T_m of core histones (by $\sim 7^\circ\text{C}$), as compared to that in unfolded chromatin but at the same time lowered the T_m of nuclear DNA both in the relaxed and constrained state (by $\sim 2.5^\circ\text{C}$ and $\sim 7.5^\circ\text{C}$, respectively). In the presence of Mg^{2+} ions, melting enthalpy for peaks increased significantly. At the same time, a decrease in molecular weights of intranuclear DNA levels out a stabilizing effect of Mg^{2+} ions on core histones. A rise in the concentration of Mg^{2+} ions above 5 mM leads to the appearance of a new peak with T_m above 100°C, which probably reflects the thermal behavior of some Mg-induced aggregates. Possible mechanisms underlying thermal behavior of chromatin inside the nucleus are discussed.

Keywords: nucleus, chromatin, Mg^{2+} cations, differential scanning calorimetry, thermodynamics, DNA torsional stress