

УДК 577.155.2

ДОСЛІДЖЕННЯ НУКЛЕАЗНОЇ АКТИВНОСТІ КЛІТИННИХ ЛІЗАТІВ МЕТОДОМ РЕНАТУРАЦІЇ БІЛКІВ У ПОЛІАКРИЛАМІДНОМУ ГЕЛІ

Ю. Кіт, Г. Шуваєва, В. Дрель, Н. Ігуменцева, Л. Дробот

*Інститут біології клітини НАН України,
вул. Драгоманова, 14/16, м. Львів 79005, Україна,
e-mail: kit@biochem.lviv.ua*

Метод аналізу ферментативної активності в поліакраламідному гелі ґрунтується на високоефективному розділенні білків ДСН-електрофорезом із наступною їх ренатурацією і детекцією ферментативної активності. Його ми використали для аналізу експресії нуклеаз в клітинах у культурі ліній НЕК293; NIH/3T3; U937. З'ясовано, що в клітинах НЕК293 експресуються нуклеази молекулярною масою 47 і 45 кДа. Описано локалізацію цих нуклеаз у ядрах клітин. Доведено, що препарати гістонів, оброблені денатурвальними агентами, можуть гідролізувати ДНК.

Ключові слова: культури клітин, клітинне ядро, нуклеази, електрофорез.

Нуклеази є ферментами катаболізму нуклеїнових кислот, які відіграють важливу роль у процесах відтворення і реалізації генетичної інформації. За субстратною специфічністю нуклеази поділяють на рибонуклеази (РНК-ази), дезоксирибонуклеази (ДНК-ази) і неспецифічні нуклеази, які здатні гідролізувати як ДНК, так і РНК [3]. Відомі два типи нуклеаз: ендонуклеази, які гідролізують нуклеїнові кислоти до олігонуклеотидів, та екзонуклеази, які гідролізують нуклеїнові кислоти до нуклеотидів. Описані ферменти, які мають одночасно як екзо-, так і ендонуклеазну активності [3]. Нуклеази мають широку різноманітність молекулярних форм. Рівень експресії нуклеаз зазнає значних змін залежно від фізіологічного стану клітин [6]. Особливо високий рівень активності нуклеаз (зокрема, ДНК-аз) простежується в апоптичних клітинах, які мають фрагментацію хроматину [6]. З'ясовано, що цей процес пов'язаний як із експресією генів специфічних Ca²⁺-залежних ДНК-аз, так і з активацією цитоплазматичних ендонуклеаз, їхнім транспортом у ядро [6]. З огляду на це клітинний склад нуклеаз (спектр нуклеаз) є важливим показником внутрішньоклітинних процесів.

Оскільки нуклеази суттєво відрізняються між собою фізико-хімічними характеристиками (молекулярна маса, спорідненість до біоструктур клітини, ступінь посттрансляційної модифікації), то порівняння спектрів нуклеаз у клітинах – достатньо складне завдання, бо потребує виділення й очищення окремих нуклеаз. Для дослідження спектрів ферментів зручний метод ідентифікації їхньої активності в поліакриламідному гелі (ПААТ) після електрофоретичного

розділення білків (метод „зимограм”). Якщо для цього використати електрофорез за наявності додецил-сульфату натрію (у системі Леммлі), то можна отримати гомогенні білки у вигляді електрофоретичних зон. Під час відмивання гелю від детергента частково відбувається ренатурація білків і відновлення їхньої ферментативної активності [4]. Попередньо вполімеризована в поліакриламідний гель високомолекулярна нуклеїнова кислота може бути субстратом для ренатурованих нуклеаз, які після забарвлення гелю специфічними щодо нуклеїнових кислот барвниками (етидій бромід, метиленовий голубий, піронін) можна виявити як незабарвлені зони. Цим методом досліджено спектр рибонуклеаз у крові й секретах людини (молоко, слина, спинномозкова рідина, сеча) [4], а також визначено ДНК-гідролізувальну активність антитіл молока людини [2]. Нашою метою було дослідження методом ренатурації білків у ПААГ спектра нуклеаз у трьох лініях клітин: ембріональні клітини нирки людини (НЕК293), псевдонормальні ембріональні фібробласти миші (NIN/3T3), клітини гістоцистної лімфони людини (U937).

Для отримання клітинних лізатів клітини двічі промивали охолодженим забуференим фізіологічним розчином (ЗФР) і лізували на льодовій бані протягом 20 хв у буфері, що містив 10 ммоль Трис-НСІ, рН 7.5, 150 ммоль NaCl, 1% тритон X-100, 5 ммоль EDTA, 50 ммоль NaF, 1 ммоль Na₃VO₄, 1 ммоль фенілметансульфонілфторид (PMSF) („Fluka”), 5 ммоль бензамідин, 25 мкг/мл апротиніну („Sigma”), 10 мкг/мл лейпептину („Sigma”), 1 мкг/мл пепстатину („Fluka”). Детергент-нерозчинну фракцію осаджували центрифугуванням при 12000 об./хв протягом 15 хв. До 10 мкл (40 мкг білка) надосадової рідини додавали такий же об'єм денатуруючого буфера, який містив 100 ммоль Трис-НСІ, рН 6,8, 2% 2-меркаптоетанол, 2% ДСН-Na, 20% гліцерин. Білки розділяли ДСН-електрофорезом у градієнті концентрації ПААГ, який містив 1 мг/мл ДНК тимуса теляти (Sigma USA). Ренатурацію білків і визначення положень нуклеаз на гелі виконували за методом, описаним у [2]. Після електрофорезу гель двічі промивали 7М сечовиною по 30 хв і двічі буфером, що містив 20 ммоль Трис-НСІ рН 7,4, 75 ммоль NaCl. Гель інкубували протягом доби при 37°C у 20 ммоль Трис-НСІ рН 7,4, 50 ммоль NaCl, 10 ммоль MgCl₂ і фарбували 1% розчином піроніну у 7% оцтовій кислоті. Надлишок фарби відмивали дистильованою водою й ідентифікували нуклеази як прозорі смуги на зеленому фоні негідролізованої ДНК (рис.1, б). Для визначення положення білків гель фарбували Coomassie R-250 (рис. 1, а). Під час аналізу електрофореграм з'ясовано, що в електрофоретичному спектрі лізатів клітин НЕК293 наявні зони гідролізу в ділянці білків молекулярною масою 47 і 45 кДа (рис. 1, доріжки 1а, 1б). У спектрі лізатів клітин NIN/3T3 і U937 слабо виражені зони гідролізу простежувались на межі чутливості методу (рис. 1б, доріжки 4, 5, 6). Використані як маркери молекулярних мас препарати лактоферину й імуноглобулінів крові людини (рис. 1, а, доріжки 8, 9) також не виявляли значної нуклеазної активності (рис.1, б, доріжки 8, 9). Отримані результати свідчать про те, що в клітинах НЕК293 нуклеази, стійкі до дії йонних

детергентів. Важливим фактором функціональної активності нуклеаз є їхня локалізація в клітині [1, 3, 6]. Оскільки відомо, що нуклеази беруть участь у реалізації апоптичних подій, то наступним кроком нашої роботи було дослідження нуклеазної активності в ізольованих ядрах клітин НЕК293.

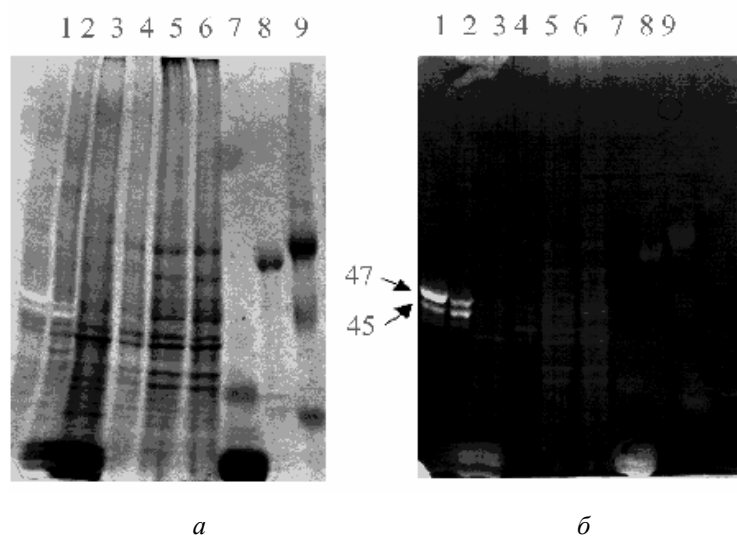


Рис.1. Визначення нуклеазної активності білків у ПААГ (5 – 20%) після їхнього розділення електрофорезом у системі Леммлі й наступної ренатурації: *а* – гель зафарбований Coomassie R-250, *б* – гель, зафарбований ругопіп Y: 1 – лізати клітин НЕК293, 2 – детергент-розчинна фракція ядер НЕК293; 3 – детергент – нерозчинна фракція ядер НЕК293; 4 – лізати клітин НН/3Т3; 5,6 – лізати клітин U937; 7 – гістони; 8 – лактоферин (70 кДа); 9 – імуноглобуліни (72, 50, 25 кДа).

Ядра виділяли згідно з працею [5]. Для цього до осаду клітин НЕК293 додавали охолоджений на льоді гіпотонічний буфер лізису 20 ммоль Трис-НСІ рН 7,4, 10 ммоль КСІ, 1 ммоль DTT з інгібіторами протеаз (1 ммоль EGTA, 1 ммоль EDTA, 10 ммоль β-гліцерофосфат, 2 ммоль MgCl₂, 10 ммоль КСІ, 1 ммоль ортованадату натрію, 1 ммоль PMSF, пепстатину, лейпептину й апротиніну по 10 мкг/мл) і через 30 хв гомогенізували в гомогенізаторі Даунса. Ядра осаджували центрифугуванням лізату в розчині буфера лізису за наявності 1 ммоль сахарози при 1600 g 15 хв і промивали у гіпотонічному буфері. Ядра обробляли розчином 1 % Nonidet P-40 (NP-40) у гіпотонічному буфері, розчинну й нерозчинну фракції розділяли центрифугуванням при 10000 g 15 хв. Згідно з літературними даними до детергент-розчинної фракції входять білки нуклеоплазми, ядерних мембран і, частково, хроматину [1]. Осад складається з білків хроматину й ядерного матриксу

[1]. Під час аналізу електрофоретичних спектрів нуклеаз отриманих фракцій (рис. 1, *a*, доріжки 2, 3) у детергент-розчинній фракції виявлені нуклеази молекулярною масою 47 і 45 кДа (доріжка 2*b*). Подібні нуклеази простежувались у електрофоретичному спектрі загальноклітинного лізату НЕК293 (доріжка 1*b*). З рис. 1, *b* видно, що нуклеазу р47 і р45 нема в електрофоретичному спектрі білків ядер нерозчинних у NP-40 (доріжка 3*b*). Згідно з отриманими результатами виявлені нами нуклеази в клітинах НЕК293 можуть міститися як у цитоплазмі, так і в ядрі. Ці нуклеази, найімовірніше, локалізовані в нуклеоплазмі, або входять до складу мембранних структур ядра.

На підставі аналізу електрофореграм виявлено, що в електрофоретичному спектрі білків ядерної фракції, нерозчинної в NP-40 (рис. 1, *a*, доріжка 3) утворюються зон гідролізу в ділянці розділення гістонів (рис. 1, *b*, доріжка 3). Загально-відомо, що гістони формують структуру нуклеосом і тому їхня ДНК-гідролізувальна активність здається досить дивною. Ми припустили, що нуклеазну активність проявляють білки близької з гістонами молекулярної маси. Та оскільки виділені за допомогою екстракції розчином сірчаної кислоти препарати гістонів також проявляли нуклеазну активність (доріжки 7*a*, 7*b*), то це припущення здається малоімовірним. Однак є дані, що гістони виявляють РНК-гідролізуючу активність [3], тому ймовірно, що саме вони каталізують гідроліз ДНК у ПААГ. Можливо, що процеси денатурації і наступної ренатурації гістонів призводять до утворення молекулярних структур, які можуть не тільки зв'язуватися з ДНК, але й якимось чином її гідролізувати. Для перевірки цієї гіпотези препарати гістонів, які люб'язно надав нам д-р. біол. наук М.Д.Луцик, денатурували двома способами. Передусім ми спробували відтворити умови денатурації гістонів і ДНК у поліакриламідному гелі. Для цього гістони розчиняли в 1% ДСН-*Na* до концентрації 1мг/мл і послідовно діалізували 7 моль сечовини й буфера для ренатурації білків (20 ммоль Трис-*HCl* рН 7,4, 75 ммоль *NaCl*). Таким же способом денатурували й ДНК тимуса теляти. Іншим способом гістони денатурували нагріванням до 110°C упродовж 1 хв. Отримані препарати гістонів інкубували з ДНК упродовж 12 год при 23°C у буфері для ренатурації, який містив 5 ммоль *MgCl*₂; після інкубації до зразків додавали протеїназу К (0,5 мг/мл) і додатково інкубували 30 хв при 37°C. Продукти розділяли електрофоретично в 6% ПААГ у ТАЕ-буфері. Після електрофорезу гель фарбували розчином бромистого етидію. Під час аналізу електрофореграм (рис. 2) виявлено, що інкубація ДНК з гістонами призводить до утворення характерних для фрагментованої ДНК електрофоретичних треків (доріжки 2, *b*). У цьому разі денатурація гістонів нагріванням значно підсилює цей процес (доріжка 4), а денатурація гістонів ДНС призводить до інгібування гідролізу. Можливо, це пов'язано з суттєво нижчою ефективністю ренатурації білків, оброблених ДНС в умовах діалізу, порівняно з їхньою ренатурацією в акриламідному гелі. Денатурація ДНК розчином 1% ДНС-*Na* не впливала на її гідроліз препаратом гістонів (доріжка 6), але інгібувала гідроліз гістонами, денатурованими нагріванням (доріжки 7, 8). З аналізу

отриманих результатів можна припустити, що денатурація гістонів (обробка сірчаною кислотою, нагрівання, електрофорез у денатуруючих умовах) індукує їхню ДНК-гідролізуючу активність. Сьогодні ми не можемо простежувати чи інтактні гістони здатні гідролізувати ДНК. Передусім через це, що завдяки їхній високій спорідненості до ДНК виділення препаратів гістонів без застосування денатурує агентів є проблематичним. На жаль, нам не вдалося знайти літературних посилань на ДНК-гідролізуючу активність нативних або денатурованих гістонів. Тому з'ясування механізмів каталізу гідролізу ДНК за наявності гістонів потребує детальнішого дослідження.

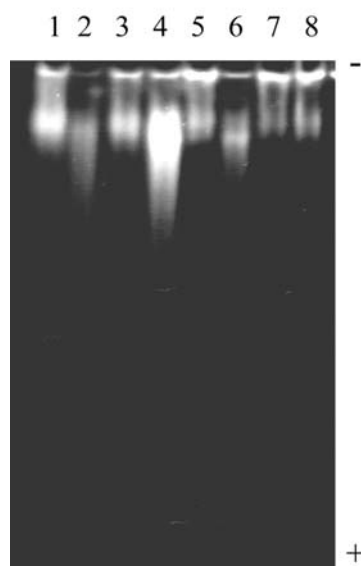


Рис. 2. Електрофорез у 6% ПААГ у буфері ТАЕ рН 8,3 продуктів гідролізу ДНК тимуса теляти в разі інкубації з препаратами гістонів: 1 – ДНК; 2 – ДНК + гістони; 3 – ДНК + гістони, денатуровані ДНС; 4 – ДНК + пістони, денатуровані нагріванням; 5 – ДНК, денатурована ДНС; 6 – ДНК, денатурована ДНС, + гістони; 7 – ДНК, денатурована ДНС, + пістони, денатуровані ДНС; 8 – ДНК, денатурована ДНС, + пістони, денатуровані нагріванням.

Отже, внаслідок досліджень виявлено таке: у клітинах ссавців наявні нуклеази, які здатні після денатурації відновлювати свою активність; в ембріональних клітинах нирки людини НЕК293 експресуються нуклеази молекулярною масою 47 і 45 кДа, які можуть бути як у цитоплазмі, так і в ядрі; препарати гістонів після денатурації можуть каталізувати гідроліз ДНК тимуса теляти *in vitro*.

1. *Збарский И.Б.* Организация клеточного ядра. М.: Медицина, 1988.
2. *Канишкова Т.Г., Семенов Д.В., Власов А.В.* и др. ДНК- и РНК-гидролизующие антитела из молока человека и их возможная биологическая роль // Молекулярная биология. 1997. Т. 31. С. 1082–1091.
3. *Шанот В.С.* Нуклеази. М.: Медицина, 1968.
4. *Bischoff K.M., Shi L., Kennelly.* The detection of enzyme activity following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis // Analytical Biochemistry. 1998. Vol. 260. P. 1–17.
5. *Kharbanda S., Bharti A., Pei D. et. al.* The stress response to ionizing radiation involves c-Abl-dependent phosphorylation of SHPTP1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996 Vol. 93. P. 6898–6901.
6. *Khodarev N.N., Sokolova I.A., Vaughan T.M.* Mechanisms of induction of apoptotic DNA fragmentation // Int. J. Radiat. Biol. 1998. Vol. 73. P. 455–467.

STUDY OF EXPRESSION NUCLEASES IN CELLS OF MAMMALS BY METHOD OF PROTEIN RENATURATION IN POLYAKRYLAMIDE GEL

Yu.Kit, G.Shuvayeva, V.Drel', N.Igumentseva, L.Drobot

*Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine,
Dragomanov st. 14/16, L'viv 79005, Ukraine,
e-mail: kit@biochem.lviv.ua*

The method of analysis of enzymatic activity in polyacrylamide gel bases on high performance separation of proteins SDS-electrophoresis with their subsequent renaturation and detection of enzymatic activity. It was used for analysis of an expression of nucleases in cells in culture of lines HEK293; NIH/3T3; U937. It was found that in HEK293 cells were expressed nucleases with molecular weights 47 and 45 kDa. The localization of these nucleases in cell nuclei was shown as well. It was found, that the fractions of histones after denaturation are catalyzed of DNA degradation.

Keywords: Culture of cells, nuclei, nucleases, electrophoresis.

Стаття надійшла до редколегії 27.07.2001

Прийнята до друку 10.07.2001