



Биол. журн. Армении, 4 (62), 2010

ЗАВИСИМОСТЬ АКТИВНОСТИ ПАРП-1 И ИНТЕНСИВНОСТИ ИНТЕРНУКЛЕОСОМАЛЬНОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ ХРОМАТИНА ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ АТФ В ЯДРАХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС

М.А. МЕЛЬНИКОВА-ШАРОВА

Ереванский госуниверситет, биологический факультет, кафедра биофизики
E-mail: melnikova.sharova@ysu.am

Исследовано действие АТФ на активность поли(АДФ-рибозил)полиме-
разы-1 (ПАРП-1) и интенсивность интернуклеосомального расщепления
хроматина изолированных ядер клеток печени крыс.

Показано, что при инкубации изолированных ядер клеток печени в
среде, содержащей АТФ, резко понижается как интенсивность интернуклео-
сомального расщепления хроматина, так и активность ядерной ПАРП-1. По-
вышение содержания АТФ в среде инкубации изолированных ядер до коли-
честв, соответствующих максимальным физиологическим значениям, прак-
тически полностью подавляет не только активность ПАРП-1, но и интернук-
леосомальную фрагментацию хроматина.

Полученные данные позволяют предположить, что АТФ может быть
задействован в процессах ремоделирования хроматина посредством регули-
рования активности хроматин-ассоциированного фермента ПАРП-1.

Клеточное ядро – ДНК – ПАРП-1 – АТФ

Ուսումնասիրվել է ԱԵՖ-ի ազդեցությունը պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզիլ)պոլիմերազ-1-ի (ՊԱՌՊ-1) ակտիվության և քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման ինտենսիվության վրա:

Ցույց է տրվել, որ թե՛ քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման ինտեն-
սիվությունը, թե՛ ՊԱՌՊ-1-ի ակտիվությունը նվազում են, երբ կորիզներն ինկուբացվում են
ԱԵՖ-ի ներկայությամբ: ԱԵՖ-ի քանակի ավելացումն ինկուբացիոն միջավայրում մինչև
մաքսիմալ ֆիզիոլոգիական քանակները, գրեթե լիովին ճնշում է ոչ միայն ՊԱՌՊ-1-ի
ակտիվությունը, այլ նաև քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորումը:

Ստացված տվյալները թույլ են տալիս ենթադրել, որ ԱԵՖ-ը կարող է մասնակցել
քրոմատինի ռեմոդելավորման գործընթացին, կարգավորելով ՊԱՌՊ-1-ի ակտիվությունը:

Բջջակորիզ – ԴՆԹ – ՊԱՌՊ-1 – ԱԵՖ

The effect of ATP on activity of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in isolated
rat liver nuclei and the intensity of internucleosomal chromatin fragmentation were
studied.

It was shown that addition of ATP into nuclei incubation media dramatically
suppressed the internucleosomal DNA fragmentation and inhibited the activity of
nuclear PARP-1. Elevation of ATP content in the incubation medium of isolated
nuclei up to maximal physiological values nearly completely suppressed both of
PARP-1 activity and internucleosomal fragmentation of chromatin.

These data suggest that ATP may be involved in the processes of chromatin remodeling by regulating the activity of chromatin-associated enzyme PARP-1.

CELL Nuclei – DNA – PARP-1 – ATP

PARP-1(поли(АДФ-рибозил)полимераза) является ядерным ферментом с молекулярной массой 116 кДа. Связываясь с молекулами ДНК в линкерных участках Zp –фингерными доменами, PARP-1 активируется и катализирует расщепление НАД⁺ на никотинамид и АДФ-рибозу. Присоединяя молекулы АДФ-рибозы к белкам-мишеням, PARP-1 синтезирует линейные и разветвленные полимеры поли(АДФрибозы).

PARP-1 считается одним из важнейших ферментов, контролирующих локальные изменения пространственной организации хроматина и доступность последнего для различных факторов, определяющих те или иные функции. Тем самым PARP-1 играет значительную роль в биологических процессах, определяющих как успешное выживание клеток, так и их гибель. В частности полагается, что гиперактивация PARP-1 является причиной некротической гибели клеток, вследствие истощения клеточного содержания АТФ. Однако прямые доказательства того, что уменьшение внутриклеточного содержания АТФ является следствием, а не причиной избыточной активации PARP-1, отсутствуют.

Значение АТФ в данном контексте возросло после того, как обнаружилось, что АТФ является аллостерическим ингибитором PARP-1 *in vitro* [4, 7]. Отметим, что PARP-1 является уникальным ферментом, который, не имея протомерных субъединиц, имеет систему аллостерического регулирования. Эта уникальность обусловлена специфической доменной структурой фермента. АТФ осуществляет аллостерическое ингибирование, благодаря тому что почти полностью подавляет аутополи(АДФ-рибоз)илирование PARP-1, при этом не действуя на способность PARP-1 к трансполи(АДФ-рибоз)илированию [6].

Исходя из вышесказанного, мы предположили, что подавление аутополи(АДФ-рибоз)илирования АТФ будет препятствовать процессу отделения молекулы фермента от ДНК, тем самым уменьшая доступность линкерных участков хроматина для внутриядерных эндонуклеаз.

С целью изучения данного вопроса мы исследовали динамику интернуклеосомального расщепления хроматина в ядрах клеток печени крыс в присутствии различных физиологических концентраций АТФ и коррелятивного изменения активности PARP-1 в изолированных ядрах клеток печени крыс (*ex vivo*).

Материал и методика. В работе использованы реактивы фирмы Sigma (США). В качестве экспериментальных животных служили белые беспородные крысы массой 100-120 г. Выделение ядер производили по методу [3]. В качестве стабилизаторов ядерных структур и хроматина в среду выделения ядер добавляли полиамины и хлориды калия и натрия. Среда выделения содержала 0,25 М сахарозу; 0,15 мМ спермин; 0,5 мМ спермидин; 60 мМ KCl; 15 мМ NaCl; 25 мМ Трис pH 7,4.

Плотность ядерной суспензии в исследуемых образцах стандартизировали по оптической плотности проб, растворенных в 0,1 N растворе NaOH. Оптическая плотность ядерной суспензии приводилась в соответствие с поглощением 1мг/мл ДНК.

Для инициации интернуклеосомального расщепления ДНК ядер в среду их инкубации добавляли растворы CaCl₂ и MgCl₂ с тем, чтобы конечная концентрация двухвалентных ионов кальция и магния составляла 1 и 6 мМ соответственно. ДНК выделяли из суспензии ядер по ранее описанной методике [1]. Электрофоретические полосы ДНК выявляли после окраски гелей бромидом этидия.

Для определения относительного содержания ДНК в отдельных электрофоретических полосах была использована специальная компьютерная программа денситометрирования (FUJIFILM, Science lab, Image Gauge V 0.4), разработанная для оценки цифровых фотографий гелей.

Активность ПАРП-1 определяли по модифицированному методу [8]. Метод основан на колориметрическом определении окрашенного продукта реакции НАД⁺ с ацетофеноном (поглощение при длине волны, равной 378 нм). Реакционная среда содержала 2 мл ядерной суспензии в среде выделения, в которую добавляли маточные растворы CaCl₂, MgCl₂ и НАД⁺ с тем, чтобы конечные концентрации указанных веществ составляли 1мМ, 6 мМ, и 0,5 мМ соответственно. АТФ добавляли в реакционную среду так, чтобы конечные концентрации составляли 1мМ, 5 мМ и 10 мМ в конечном объеме 2,5 мл.

Через 8 мин после инициации реакции ядра осаждали из реакционной среды центрифугированием (2 мин 8000 g). Количество остаточного НАД⁺ определяли в аликвотах надосадочной жидкости (700 мкл) последовательным добавлением КОН, ацетофенона и муравьиной кислоты. Конечные концентрации реактивов в реакционной среде составляли 222 мМ, 2,2 % и 44 % соответственно. Стандартный образец содержал все составляющие реакционной среды ПАРП-1 (CaCl₂, MgCl₂ и НАД⁺), за исключением ядерной суспензии. Активность ПАРП-1 определяли количеством НАД⁺, утилизированного ядрами в течение 10 мин [5].

Результаты и обсуждение. Согласно полученным нами данным, АТФ подавляет активность ПАРП-1 в изолированных ядрах (рис 1).

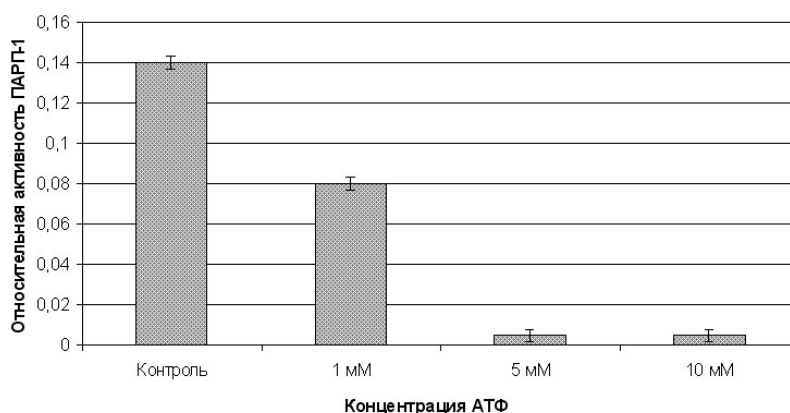


Рис. 1. Действие различных концентраций АТФ (1 мМ; 5 мМ; 10 мМ) на активность ПАРП-1 в изолированных ядрах печени крыс.

Ранее была отмечена зависимость апоптоза от АТФ [2]. Известно, что апоптоз является активным энергозависимым процессом. Отсутствие АТФ или его нехватка в клетке приводит к переключению апоптической программы элиминации клеток на некротическую. Было высказано предположение о том, что АТФ обеспечивает нарастающий приток ионов Ca²⁺ в ядро, что необходимо для активации Ca²⁺/Mg²⁺-зависимой эндонуклеазы и тем самым для успешного завершения “исполнительской” фазы апоптоза.

Электрофоретическим разделением ДНК ядер клеток печени и последующим цифровым денситометрированием соответствующих электрофореграмм нам удалось установить, что АТФ действует на интенсивность фрагментирования ДНК в изолированных ядрах печени. Как выяснилось, присутствие 1мМ АТФ в среде инкубации ядер клеток печени крыс угнетает интернуклеосомальное фрагментирование ДНК. Нами было показано, что наличие в среде более высокой концентрации АТФ (5 мМ) полностью подавляет фрагментацию ДНК Ca²⁺/Mg²⁺-зависимой эндонуклеазой, что видно из соответствующей электрофореграммы (рис. 2) и диаграммы количественного анализа цифровых денситограмм (рис. 3).

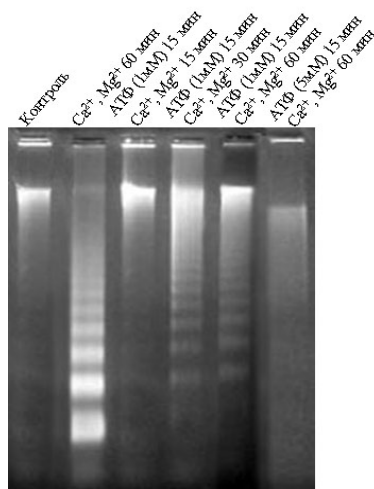


Рис. 2. Действие АТФ (1 мМ, 5 мМ) на процесс интернуклеосомального расщепления хроматина в ядрах клеток печени крыс, инкубированных в присутствии ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} .

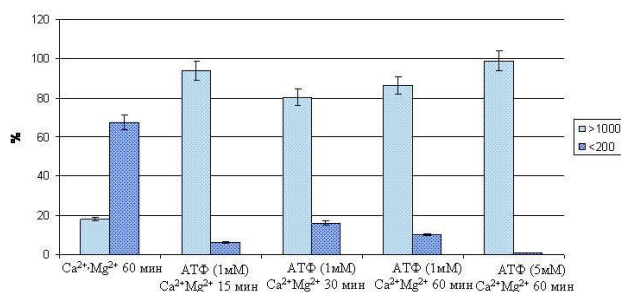


Рис. 3. Сравнение процентного содержания высокополимерных и низкополимерных фрагментов ДНК после инкубации ядер в присутствии АТФ (1 и 5 мМ).

Полученные нами результаты хорошо согласуются с литературными данными, указывающими на ингибицию микрококковой эндонуклеазы АТФ в системе с искусственно сконструированным хроматином. Известно, что зонами атаки этого фермента, как и $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы, являются линкерные или интернуклеосомальные участки хроматина. Авторами этой работы было высказано предположение, что связывание АТФ в домене ауторибозилирования ПАРП-1 способствует укреплению связи ДНК – фермент, экранируя и тем самым уменьшая доступность линкерных участков для эндонуклеазы [4]. Таким образом, данные, полученные нами при исследовании действия АТФ на процесс интернуклеосомального расщепления хроматина в ядрах клеток печени крыс, подтверждают гипотезу, высказанную указанными авторами, исследовавшими влияние АТФ на процесс интернуклеосомального расщепления ДНК в модельных системах *in vitro*.

Поскольку поли(АДФ-рибозил)ирование $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы, осуществляемое ПАРП-1, подавляет активность фермента [9], мы предположили, что эффективность АТФ, как ингибитора процесса интернуклеосомального фрагментирования, резко возрастет, если нам удастся увеличить транскрибозилирующую

активность внутриядерной ПАРП-1. Для этого в среду инкубации изолированных ядер печени вместе с 1мМ АТФ мы добавили 0,5 мМ НАД⁺. Результаты этих опытов подтвердили правоту сделанного предположения, так как в присутствии НАД⁺ 1мМ АТФ полностью подавляет интернуклеосомальное расщепление внутриядерной ДНК (Рис. 4).

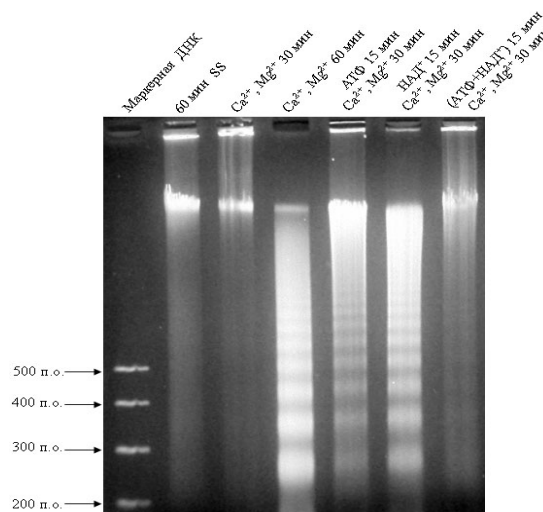


Рис. 4. Совместное действие НАД⁺ и АТФ на интернуклеосомальную фрагментацию ДНК (НАД⁺ 0,5мМ, АТФ 1 мМ).

Ингибируя аутополи(АДФ-рибозил)ирование ПАРП-1 в изолированных ядрах печени крыс, АТФ значительно снижает интенсивность интернуклеосомального фрагментирования, что свидетельствует об уменьшении доступности хроматина для эндонуклеаз. На основании этих данных можно предположить, что истощение содержания АТФ в цитоплазме клеток может инициировать интернуклеосомальное расщепление хроматина, вследствие активации ауторибозилирования ПАРП-1 и связанного с этим увеличения доступности хроматина для эндонуклеаз.

В настоящее время все больше исследователей склоняются к тому, что строгое разграничение апоптической и некротической форм клеточной смерти является условным, поскольку на один и тот же стимул клетки могут реагировать различной формой гибели в зависимости от силы, длительности воздействия или энергетического статуса клеток [10]. В целом, полученные нами данные указывают на то, что ПАРП-1 может являться тем посредником, который согласует процесс внутриядерной деструкции с энергетическим статусом клетки, не ограничивая значение АТФ и НАД⁺ их сугубо энергетической ролью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Artsruni I.G., Matinyan K.S., Melnikova-Sharova M.A., Gevorgyan E.S. Spontaneous internucleosomal DNA fragmentation in isolated nuclei. *Electronic Journal of Natural Sciences*, 1, 10, pp. 13-17, 2008.
2. Dean P. Jones, David J. McConkey, Pierluigi Nicotera, and Sten Orrenius. Calcium-activated DNA Fragmentation in Rat Liver Nuclei. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 11, pp. 6398-6403, 1989.

3. Hewish D.R., Burgoyne L.A. The calcium dependent endonuclease activity of isolated nuclear preparations. Relationships between its occurrence and the occurrence of other classes of enzymes found in nuclear preparations. *Biochemical and Biophysical Res. Com.* 52, 2, pp. 475-481, 1973.
4. Kim M.Y., Mauro S., Ge'vry N., Lis J.T., Kraus L.W. NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell*, 119, 6, pp. 803-814, 2004.
5. Kirsten E., Jackowski G., McLick J., Hakam A., Decker K., Kun E. Cellular regulation of poly(ADP) ribosylation of proteins. I. Comparison of hepatocytes, cultured cells and liver nuclei and the influence of varying concentrations of NAD. *Exp. Cell Res.*, 161, 41-52, 1985.
6. Kun E., Kirsten E., Mendeleyev J., Ordahl C.P. Regulation of the enzymatic catalysis of poly(ADP-ribose) polymerase by dsDNA, polyamines, Mg²⁺, Ca²⁺, histones H1 and H3 and ATP. *Biochemistry*. 45, 3, pp. 210-216, 2004.
7. Kun E., Kirsten E., Hakam A., Bauer P., Mendeleyev J. Identification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 as the OXPHOS-generated ATP sensor of nuclei of animal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366, 568-573, 2008.
8. Putt K.S., Hergenrother P.J. An enzymatic assay for poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) via the chemical quantitation of NA^{D+}: application to the highthroughput screening of small molecules as potential inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 326, pp. 78-86, 2004.
9. Yakovlev A.G., Wang G., Stoica B. A., Boulares H.A., Spoonde A.Y., Yoshihara K., Smulson M.E. A Role of the Ca²⁺/Mg²⁺-dependent Endonuclease in Apoptosis and Its Inhibition by Poly(ADP-ribose) Polymerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 28, pp. 21302-21308, 2000.
10. Zong W.-X., Ditsworth D., Bauer D.E., Wang Z.-Qi and Thompson C. B. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes & Dev.* 18, 1272-1282; 2004.

Поступила 10.09.2010