

УДК 577.113.576.315.612.82

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ ЦИТОЗОЛЯ ЭМБРИОНАЛЬНОГО
И ВЗРОСЛОГО МОЗГА НА ДНК-ПОЛИМЕРАЗНУЮ
АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЯДЕР МОЗГА

ИВАНОВ А. П., КАПРАЛОВ А. А., БАРЫК О. Я., ГУБЧЕНКО С. В.

Институт биоорганической химии и нефтехимии АН Украины, Киев

Исследовали влияние цитозоля мозга и его фракций, полученных осаждением сульфатом аммония и ионообменной хроматографией на ДЭАЭ сефадексе А-50, на ДНК-полимеразную активность изолированных ядер. Обнаружены различия в действии суммарного цитозоля мозга эмбрионов, новорожденных и взрослых животных на включение метки в ДНК. В цитозоле мозга эмбрионов крупного рогатого скота обнаружен ряд фракций, увеличивающих ДНК-полимеразную активность изолированных ядер. При этом соответствующие фракции, выделенные из цитозоля взрослого мозга такого действия не оказывают. Наряду с этим выделены фракции, обладающие противоположным действием: ингибирующим при выделении из цитозоля эмбрионов и активирующим при выделении из цитозоля взрослого мозга. Было проведено сравнительное исследование этих фракций на РНК-полимеразную активность. Предполагается, что некоторые из выделенных фракций могут принимать участие в процессах репликации ДНК и пролиферации, происходящих в клетках эмбрионального мозга.

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что в различных тканях организма содержатся вещества, способные оказывать влияние на процессы пролиферации клеток. Такие соединения обнаружены, в частности, среди растворимых компонентов тканей, экстрагируемых из них буфером с низкой ионной силой [1, 2] и, по-видимому, входящих в состав цитоплазмы. В их состав входят наряду с низкомолекулярными модуляторами [3] ряд белков, обладающих способностью как активировать [4, 5], так и ингибировать пролиферацию [6, 7]. Однако в настоящее время эти белки не выделены и механизмы их действия окончательно не установлены. Одним из подходов к выделению белков, участвующих в регуляции пролиферации может быть исследование механизмов репликации ДНК. Известно, что удвоение молекулы ДНК является необходимым условием начала деления клетки. В связи с этим можно предположить, что белки, оказывающие влияние на синтез ДНК играют определенную роль и в регуляции клеточного деления.

Показано, что в процессах синтеза ДНК, наряду с ДНК-полимеразой—ферментом, непосредственно осуществляющим реакцию синтеза участвует ряд регуляторных белков, среди которых обнаруживаются

как активирующие [8, 9], так и ингибирующие [10, 11] синтез ДНК. По крайней мере, некоторые из этих белков имеют цитоплазматическую природу [11, 12].

Хорошей моделью для выделения белков, оказывающих влияние на синтез ДНК и исследования их возможной связи с пролиферативной активностью являются клетки головного мозга, характеризующиеся этим свойством на эмбриональной стадии и в течение раннего постнатального периода развития [13, 14] и значительным падением ее уровня на последующих стадиях эмбриогенеза [15]. Вероятно, одной из причин изменения интенсивности течения процессов репликации клеток мозга в ходе развития могут быть сдвиги в качественном и количественном содержании белков цитозоля, принимающих участие в репликации ДНК.

Исходя из данных о присутствии в составе цитозоля белков, участвующих в регуляции клеточного деления и синтеза ДНК, исследовали влияние суммарного цитозоля мозга животных и отдельных фракций белков цитозоля на ДНК-полимеразную активность изолированных ядер мозга и попытались выделить фракции, оказывающие воздействие на этот показатель. Для выявления белков с различным эффектом действия в зависимости от стадии развития животного, что может быть обусловлено происходящими при этом изменениями процессов репликации, нами также были предприняты исследования по изучению сравнительного действия белков цитозоля, выделенных из мозга эмбрионов и взрослых коров.

Материалы и методы

В работе использовали мозг эмбрионов и взрослых особей крупного рогатого скота, а также крыс-самцов массой 150—200 г.

Ядра мозга и печени получали по описанному методу [16], ткань гомогенизировали в 0,25 М сахарозе, приготовленной на ТКМ-буфере (50 мМ трис-НСI, рН 7,4, 25 мМ КСI, 5 мМ MgСI₂). Для получения цитозоля гомогенат ткани, приготовленный с использованием ТКМ-буфера в соотношении 1:4 центрифугировали при 800g в течение 10 мин, надосадочную жидкость центрифугировали последовательно при 15000g 15 мин и 103000g 2 ч.

При осаждении цитозоля сульфатом аммония использовали его концентрации, составляющие 25%, 50%, 75% от насыщения. Полученные фракции после диализа подвергали ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе А-50, с использованием в качестве буфера наанессии 0,1 М NaCl, 20 мМ трис-НСI (рН 7,4), 1 мМ ЭДТА. Элюцию осуществляли ступенчатым градиентом NaCl, приготовленным на том же буфере, используя концентрации 1 М, 1,5 М и 2 М.

Изучение транскрипции в изолированных ядрах проводили по методу [17]. При этом инкубационная среда содержала 0,12 М КСI, 0,25 мМ Mg ацетат, 0,5 мМ каждого из нуклеозидтрифосфатов—АТФ,

СТР, dGTP, и 0,05 мМ Н-УТР (удельная радиоактивность 940 ТБк/моль).

При определении ДНК-полимеразной активности среда инкубации содержала 50 мМ трис-НСI (рН 7,4), 6 мМ MgCl₂, 15 мМ KCl, 6 мМ меркаптоэтанол, 2 мМ АТР, по 200 мкМ каждого из dАТР, dСТР, dGТР и 20 мкМ [С]—dTTP.

При определении как РНК-, так и ДНК-полимеразной активности инкубационная среда, конечный объем которой составлял 100 мкл, содержала 50 мкл суспензии ядер при концентрации 1—2 мг, ДНК/мл и 25—35 мкг белка исследуемой фракции. Температура инкубации составляла 25°C в случае исследования РНК-полимеразной активности и 37°C при исследовании ДНК-полимеразной активности. По окончании времени инкубации аликвоты наносили на диски фильтровальной бумаги Whatman 1 мм, которые помещали в охлажденную на льду 10% ТХУ и 1% пирогосфат натрия (из расчета 15—30 мл на 1 фильтр) и инкубировали во льду 10 мин. Раствор сливали и фильтры ополаскивали 2 раза по 5 мин раствором 5% ТХУ—1% пирогосфат натрия, затем ацетоном высушивали на воздухе и определяли радиоактивность, используя сцинтилляционную жидкость ЖС-1. Определение количества белка проводили по Lowry и соавт. [13], а их электрофорез осуществляли на ПААГ [14] с использованием градиента концентрации акриламида 7,5—22%.

Результаты и обсуждение

При исследовании эндогенной ДНК-полимеразной активности изолированных ядер мозга и печени взрослых крыс в зависимости от времени инкубации обнаружен линейный характер реакции в течение первых 30 мин с последующим выходом на плато (рис. 1), в связи с чем дальнейшие исследования проводили при экспозиции 30—40 мин. Примечательно, что в этих экспериментах ядра мозга проявляют значительно более низкую эндогенную ДНК-полимеразную активность по сравнению с ядрами в печени в полном соответствии с данными литературы о низком уровне синтеза ДНК в этой ткани [18, 19]. При исследовании влияния на ДНК-полимеразную активность изолированных ядер мозга эмбрионов, новорожденных и взрослых крыс, а также печени последних суммарного цитозоля этих тканей, обнаружен стимулирующий эффект цитозолей мозга новорожденных и печени на этот фермент во всех исследованных ядрах (рис. 2). Цитозоль мозга взрослых крыс стимулировал ферментативную активность лишь ядер эмбрионов, а цитозоль мозга эмбрионов приводил к увеличению включения метки в ядра мозга эмбрионов и его уменьшению в ядрах печени. Полученные результаты соответствуют данным литературы об изменении интенсивности течения реакций синтеза ДНК в процессе онтогенеза и присутствии в экстракте эмбриона мозга факторов, модулирующих ДНК-полимеразную активность [4, 15, 20].

Обнаруженный во всех случаях эффект активации ДНК-полимеразной активности цитозолей мозга новорожденных и цитозоля печени, по-видимому, связан с достаточно высоким уровнем синтеза ДНК, наблюдаемым в печени и мозгу новорожденных животных [18, 19]. По всей вероятности, этот факт может свидетельствовать об определенном сходстве механизмов действия факторов цитозоля мозга и печени и отсутствии зависимости характера их действия от тканевой специфичности.

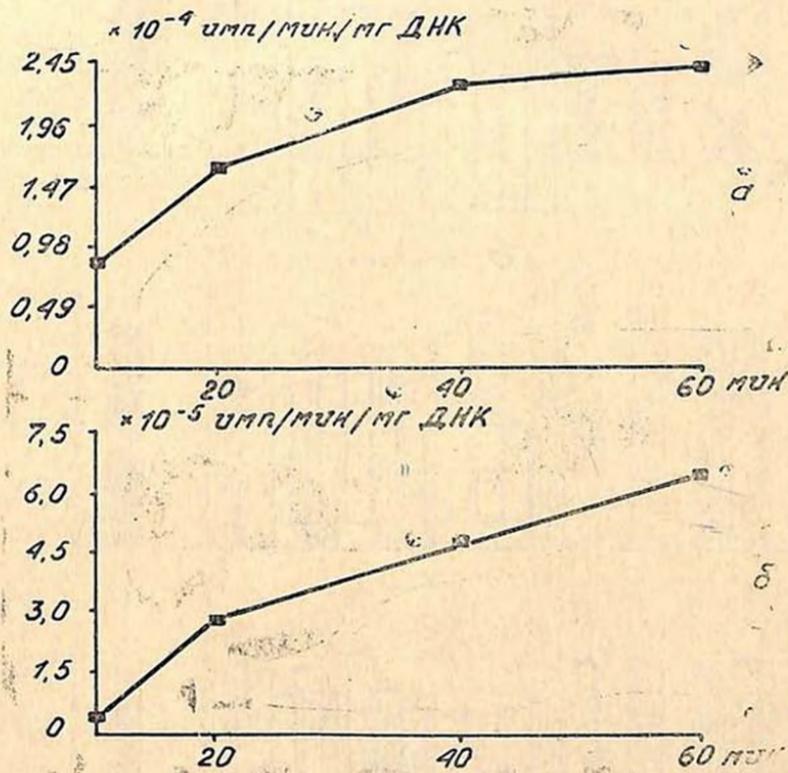


Рис. 1. Зависимость ДНК-полимеразной активности изолированных ядер от времени инкубации: *a*—ядра клеток мозга крыс, *б*—ядра клеток печени крыс.

Исходя из предположения, что обнаруженные различия в действии на ДНК-полимеразную активность цитозолей мозга взрослых и эмбрионов могут быть обусловлены различиями в их белковом составе, мы предприняли попытку выделить отдельные фракции белков цитозоля и выявить особенности их действия на ДНК-полимеразную активность ядер с отмеченной целью. После осаждения цитозоля мозга эмбрионов крупного рогатого скота и взрослых коров различными концентрациями сульфата аммония полученные фракции подвергли ионообменной хро-

матографии с обозначением вначале концентрации сульфата аммония, которой эта фракция осаждалась, затем концентрации соли, которой она элюировалась с сорбента (фракцию, не осаждаемую 75%-ным сульфатом аммония, обозначали п. 75).

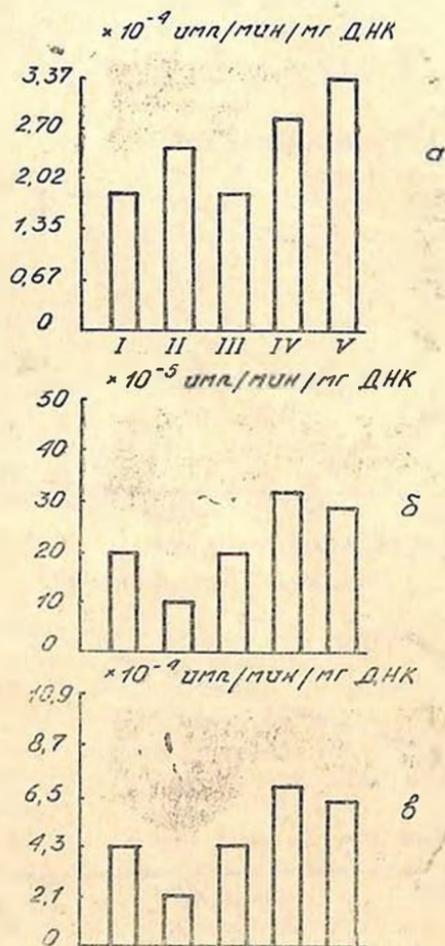


Рис. 2. Влияние цитозоля на ДНК-полимеразную активность изолированных ядер: а—ядра мозга взрослых крыс; б—ядра эмбрионального мозга крыс; в—ядра печени крыс. I—без добавок; добавление цитозоля: II—эмбрионального мозга, III—взрослого мозга, IV—мозга новорожденных, V—печени.

При анализе влияния фракций, полученных из цитозоля эмбрионального мозга на ДНК-полимеразную активность ядер, выявлены две фракции, увеличивающие этот показатель при добавлении в инкубационную среду, содержащую ядра как эмбрионального и взрослого мозга коров, так и мозга крыс (рис. 3, 4). К ним относятся фракции

$\times 10^{-4}$ умр/мгн / мг ДНК

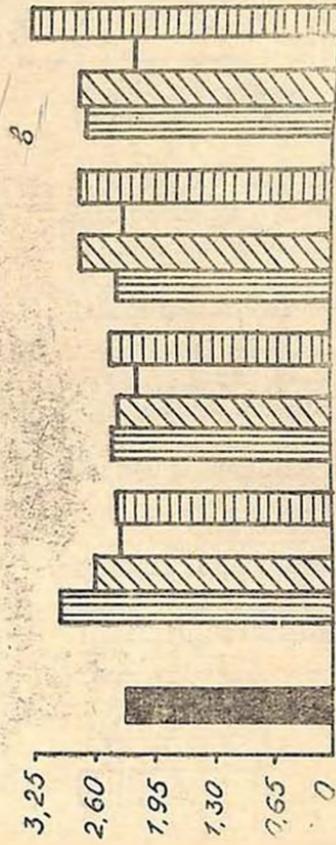
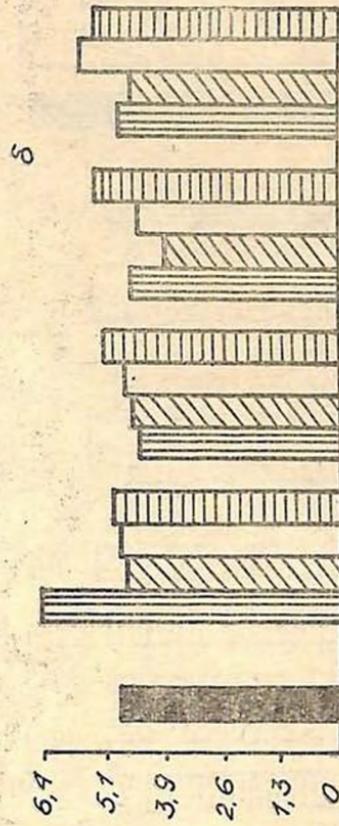
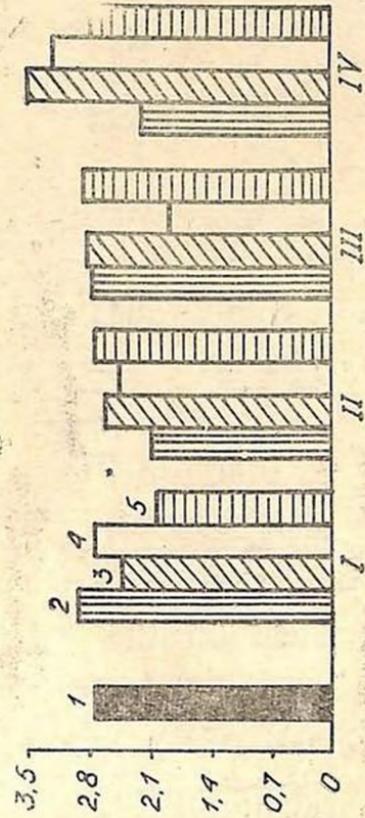


Рис. 3. ДНК-полимеразная активность, изолированных ядер в присутствии фракций, полученных после хроматографии на ДЭАЭ-сепадексе цитозоля эмбрионального мозга: α —ядра мозга крупного рогатого скота, δ —ядра мозга эмбриона теленка, σ —ядра мозга крыс. Здесь и на рис. 4, 5 1—V—фракции, элюируемые 0,1 М NaCl, 1,0 М NaCl, 1,5 М NaCl и 2,0 М NaCl соответственно, 1—контроль, 2—25, 3—50, 4—75, 5—сывяше 75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

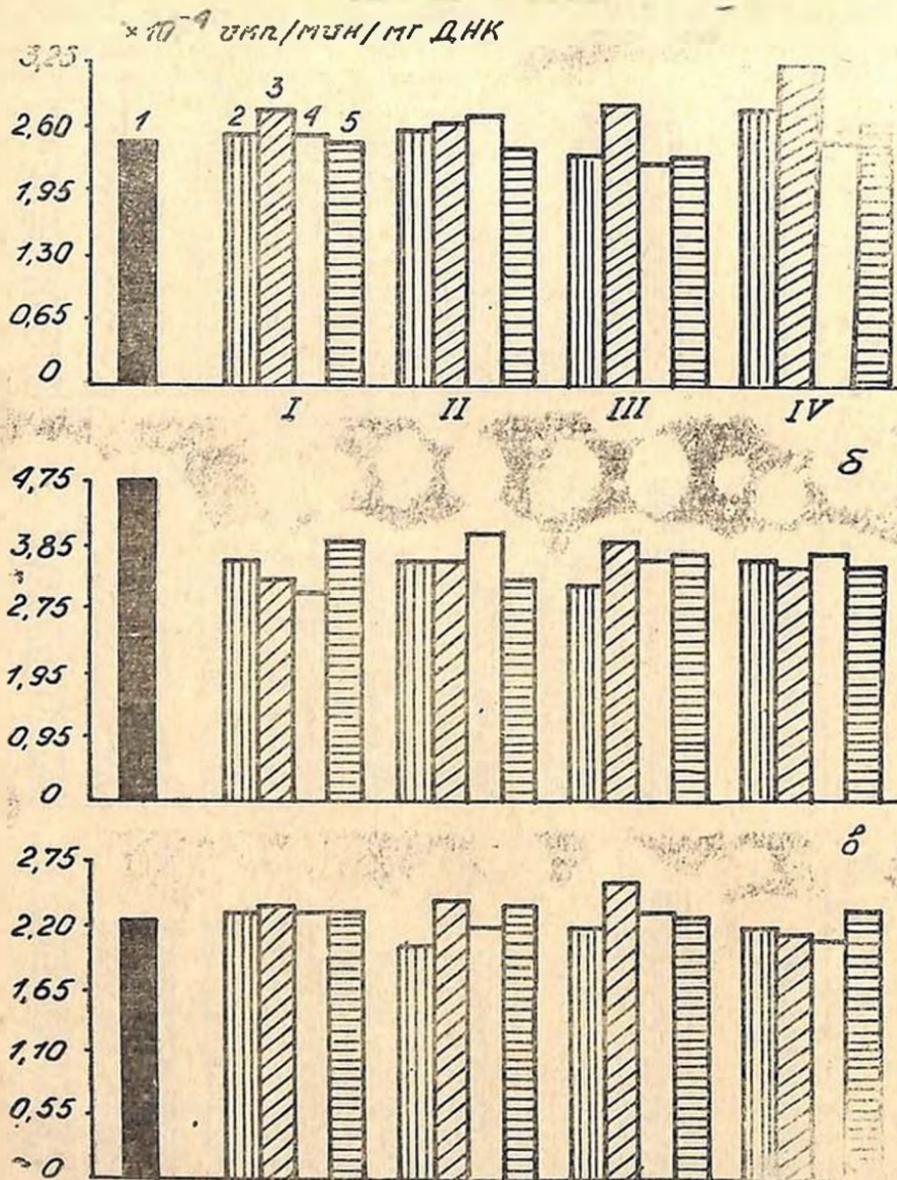


Рис. 4. ДНК-полимеразная активность изолированных ядер в присутствии фракций, полученных после хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе цитозоля взрослого мозга. а—ядра мозга крупного рогатого скота; б—ядра мозга эмбриона телянка; в—ядра мозга крысы.

25.0,1; п. 75.1,5, а фракция 75.2 характеризуется активирующим действием при использовании ядер мозга эмбрионов крупного рогатого скота и взрослых коров. Среди других интерес представляет фракция 50.1,5, ингибирующая ДНК-полимеразную активность всех исследованных ядер и ряд фракций различного действия в зависимости от места выделения ядер.

Полученные данные позволяют заключить о присутствии в цитозоле эмбрионального мозга факторов как активирующих ДНК-полимеразную активность, так и ингибирующих в зависимости от тканевой принадлежности ядер и стадии их развития.

Изучение эффектов аналогичных фракций, выделенных из цитозоля взрослого мозга, на ДНК-полимеразную активность обнаружило ингибирующее действие или полное отсутствие какого-либо влияния на этот фермент. Исключения составляли лишь фракции 50.0,1; 50.1,5; 50.2,0; п. 75.2,0; в случае ядер крупного рогатого скота и фракция 50.1,5 в случае использования ядер мозга крыс.

Примечательно, что фракции 25.0,1; п. 75.1,5; 75.2,0, выделенные из цитозоля взрослого мозга, не оказывают стимулирующего действия на ДНК-полимеразную активность ядер в отличие от соответствующих фракций цитозоля мозга эмбриона. Наряду с этим, в цитозоле взрослого мозга присутствуют и другие фракции, действие которых на ДНК-полимеразную активность ядер отличалось от такового соответствующих фракций цитозоля эмбрионального мозга. Так, например, в этом случае фракция 50.1,5 оказывает стимулирующее действие на активность изученного фермента.

При исследовании влияния выделенных фракций на ДНК-полимеразную активность изолированных ядер мозга крысы и эмбриона теленка (рис. 5) были обнаружены противоречивые результаты. Несмотря на однотипность эффектов ряда фракций (например, фракции 50.1,5) в отношении ДНК- и РНК-полимеразной активности изолированных ядер, большая часть их демонстрирует противоположное влияние на эти активности (в том числе, фракции 25.0,1 и п. 75.1,5), и причиной которого может быть существование разных механизмов действия этих факторов. По нашему мнению, те из исследованных фракций, которые обладают сходным действием на обе эти активности, действуют неспецифически, влияя на процессы, общие для этих двух реакций. Они могут воздействовать на структуру хроматина, оказывать влияние на активность ферментов, связанных с обменом нуклеотидов, принимать участие в процессах транскрипции, предшествующей репликации и т. д. В состав же фракций (25.0,1; п. 75.1,5), оказывающих влияние на ДНК- и не влияющих на РНК-полимеразную активность, могут входить белки, действующие непосредственно на процесс синтеза ДНК. При их электрофоретическом исследовании обнаружен достаточно гетерогенный белковый состав (данные не представлены). Последнее не позволяет полностью исключить возможность маскирования в цитозоле взрослого животного действия белков, влияющих на

синтез ДНК за счет изменения количества других белков, входящих в состав этих фракций.

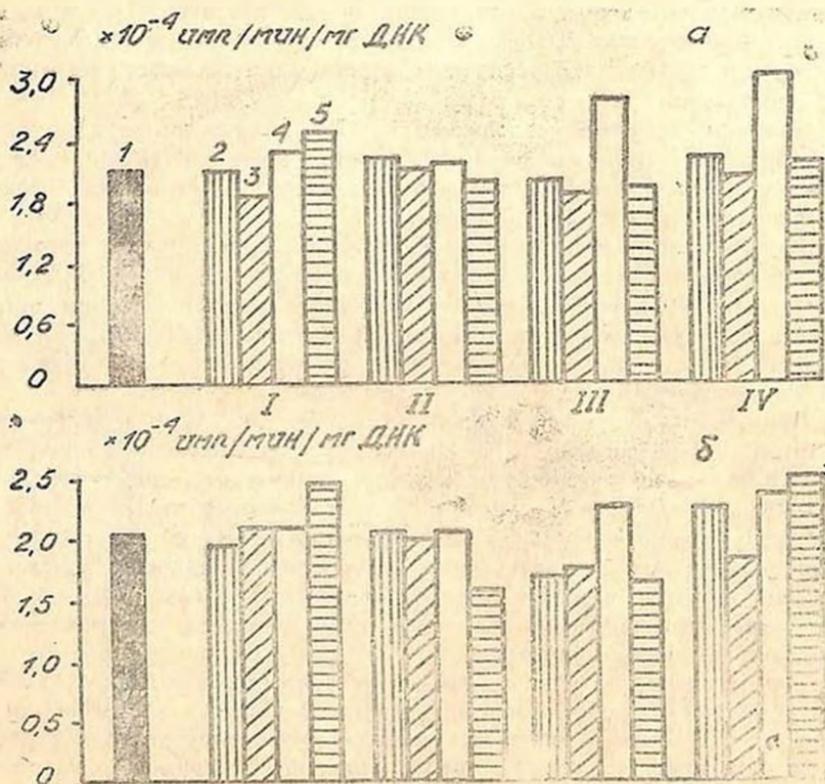


Рис. 5. ДНК-полимеразная активность изолированных ядер в присутствии фракций, полученных после хроматографии на ДЭАЭ-соединенного цитозоля эмбрионального мозга, а—ядра мозга крысы; б—ядра мозга крупного рогатого скота.

Таким образом, полученные данные позволяют прийти к выводу, что в цитозоле эмбрионального мозга содержится ряд фракций, действие которых на ДНК-полимеразную активность изолированных ядер мозга отличается от действия соответствующих фракций цитозоля мозга взрослых животных. К ним относятся например, фракции 25.0.1; п. 75.1.5; 50.1.5.

Учитывая данные о том, что предшествующий клеточному делению репликативный синтез ДНК происходит в основном в клетках эмбрионального мозга, составляя там около 90% общего синтеза ДНК [18], а в мозге взрослых животных имеет место, главным образом, репаративный синтез ДНК [21], можно предположить, что в состав этих фракций входят белки, действие которых связано с увеличением про-

лиферативной активности. Среди них могут быть как ДНК-полимераза или ее субъединицы, так и белки, регулирующие ее активность.

Исходя из того, что интересующие нас белки оказывают влияние на синтез ДНК, можно предположить, что их можно дополнительно очистить с помощью методов, используемых для выделения ДНК-связывающих белков. Имеющиеся в литературе данные о связи пролиферации и дифференцировки клеток позволяют предположить, что исследование этих белков может также способствовать выяснению молекулярных механизмов процесса дифференцировки [22].

В то же время необходимо подчеркнуть, что далеко не все процессы синтеза ДНК, протекающие в клетках мозга, связаны с пролиферацией, они могут иметь прямое отношение и к происходящему в ядрах нейронов повышению количества ДНК с 2 до 3,5n (n—количество ДНК в гаплоидном наборе хромосом) [23]. К особенностям синтеза ДНК в мозгу относится также интенсивное включение радиоактивных предшественников в строгие этапы синтеза и столь же быстрое их исчезновение, что предположительно можно связать с наличием в мозгу быстро обменивающейся фракции ДНК [23]. Таким образом, для доказательства правомерности влияния изученных нами фракций, воздействующих на синтез ДНК и процессы пролиферации, необходимо проведение специальных исследований на уровне культуры клеток.

THE ACTION OF CYTOSOL PROTEINS OF EMBRYONAL AND ADULT BRAIN ON DNA-POLYMERASE ACTIVITY OF BRAIN NUCLEI.

IVANOV A. P., KAPRALOV A. A., BARYK O. Y., GUBCHENKO S. V.

Institute of Bioorganic Chemistry and Oil Chemistry, Acad.
Sci. of the Ukraine, Kiev

It was studied the action of cytosol and its fractions obtained by the precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and ion-exchanger chromatography on DNA-polymerase activity of isolated nuclei. We observed the discrepancies in the action of total cytosol of embryonal, newborn or adult animals on the label's incorporation in DNA. It was found some fractions increased DNA-polymerase activity of isolated nuclei in the embryonal cytosol. The same fractions obtained from the adult cytosol didn't act in such a way. There were obtained also some fractions acted in the opposite way. They inhibited DNA-polymerase activity when obtained from the embryonic cytosol and activated it when obtained from the adult cytosol. We have studied also the influence of these fractions on RNA-polymerase activity. It was suggested that the investigated fractions were able to take part in the processes of DNA replication in embryonal brain cells.

1. *Gospodarowicz D., Moran J.* Annu. Rev. Biochem., v. 45, p. 531—558, 1976.
2. *Витакер А.* Среды для культивирования клеток млекопитающих. Новые методы культивирования животных тканей, М., Наука, с. 7—36, 1976.
3. *Кусень С. И., Стойка Р. С.* Молекулярные механизмы в действии полипептидных факторов роста, М., Наука, с. 236, 1985.
4. *Li I., Ozawa E., Dev, Growth, Differ.* v. 27, p. 717—728, 1985.
5. *Sensenbrennen M., Labourdette G., Pettmann B., Perrault F., Beznard F. J., Physiol.*, v. 82, p. 288—293, 1987.
6. *Sharifi B. G., Johnson T. C., Khurana V. K., Bascom C. C., Pleenor T. J., Chou H. H. J.* Neurochem., v. 46, p. 461—469, 1986.
7. *McMahon J. B., Farrelly J. G., Thomas type P.* Proc. Nat. Acad. Sci. v. 79, p. 451—455, 1982.
8. *Roberts J. M., D'Urso G.* Science, v. 214, № 4872, p. 1486—1489, 1988.
9. *Myers Ch. A., Patel P. I., Miller M. R.* Exp. Cell. Res., v. 143, p. 227—236, 1983.
10. *Roberts J., Weintraub H.*—In: Eucaryotic DNA Replicat., Cold Spring Harbor (N. Y.), p. 191—196, 1988.
11. *Rao P. N., Sunkara P. S.*—In: Cell. Cycle Regul., New York e a p. 133—147, 1978.
12. *Limas O. J.* Amer. J. Physiol., v. 238, № 1, H66—H72, 1980.
13. *Lowry O. H., Rezebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J.* Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
14. *Laemmli U. K.* Nature, v. 227, № 5259, p. 680—686, 1970.
15. *Mastromei G., Eliasson R., Reichard P. J.* Mol. Biol., v. 151, p. 627—643, 1981.
16. *Гюленев В. Н., Капралов А. А., Белик Я. В., Смерчинская Л. С., Биохимия*, т. 48, № 5, с. 827—832, 1983.
17. Транскрипция и трансляция. Методы.—М. Мир, 1987.
18. *Третьяк Т. М.* Успехи соврем. биол., т. 100, вып. 1(4), с. 20—28, 1985.
19. Biochemical correlates of brain structure and function (ed. A. N. Davidson, I...), N. Y., San Francisco, Acad. Press, 1976.
20. *Laskey R.* Mol. Cell. Biol. Int. Repts., v. 7, p. 547—548, 1983.
21. *Korr H., Schultze L.* Exp. Brain Res., v. 74, 3, p. 573—578, 1989.
22. *Nishimuni Y., Kosaka M., Nishina Y., Sumi T., Sakuda M., Takeda M., Masu-moto K.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 163, № 3, p. 1290—1297, 1989.
23. *Ашапкин В. В., Ванюшин Б. Ф.* Успехи совр. биол., т. 33, вып. 3(6), с. 323—328, 1984.

Поступила 22, XI, 1991,