

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577. 152. 24

(ADP-РИБОЗА)ПОЛИМЕРАЗА ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС:  
ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА

Заалишвили Т. М., Сабелашвили Д. Ш.

Институт молекулярной биологии и биологической  
физики АН ГССР, Тбилиси

В эукариотической клетке ядерный фермент поли (ADP-рибоза) полимераза, субстратом которой является NAD, ковалентно модифицирует различные белки [1, 2]. Изучение NAD-зависимого ADP-рибозилирования макромолекул и функционального значения данного процесса в последнее время выдвинулось в число интенсивно разрабатываемых научных проблем. Накопленные в литературе данные указывают на участие обратимой посттрансляционной модификации белков путем ADP-рибозилирования в клеточной пролиферации, дифференцировке, репарации ДНК и т.д. [2]. Изучение закономерностей функционирования очищенной (ADP-рибоза)полимеразы *in vitro* несомненно окажет значительное влияние на установление ее биологической функции.

(ADP-рибоза)полимераза выделена из различных органов, однако методика очистки фермента из нервной ткани в доступной нам литературе не встречалась. Ранее нами был предложен метод очистки поли (ADP-рибоза)полимеразы из неочищенных ядер головного мозга крыс [3].

Целью настоящей работы были разработка более простого и доступного метода получения (ADP-рибоза)полимеразы из очищенных ядер головного мозга крыс, позволяющего получить ферментный препарат за короткий период времени, и изучение некоторых его свойств.

(ADP-рибоза)полимеразную активность определяли в среде, содержащей: 50 mM трис-HCl (pH 8,0), 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 5mM β-меркаптоэтанол, 0,9 nM [<sup>14</sup>C]NAD (280 мКи/мм), по 40 мкг ДНК и тотального гистона тимуса теленка и препарат фермента [3, 4]. Конечный объем реакционной среды был равен 0,4 мл. Инкубацию проб проводили при 25° в течение 10 мин. Реакцию останавливали охлаждением и одновременным добавлением 10-кратного объема 10%-ной ТХУ. Кислотонерастворимый осадок собирали на стеклянные фильтры GF/C («Whatman», Англия) и промывали холодной 10%-ной ТХУ и 95%-ным этиловым спиртом. Радиоактивность измеряли в жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-4000 («Intertechnique», Франция) в толуоле, содержащем 0,5% PPO и 0,03% POPOP.

Метилирование ДНК тимуса теленка проводили в 5 mM трис-HCl (pH 7,4). 0,4 мкг ДНК/мл инкубировали с 1 mM диметилсульфатом в течение 1 ч при 25°, после чего ДНК осаждали этиловым спиртом. Осадок ДНК растворяли в 5 mM трис-HCl (pH 7,4) и диализовали против этого же

буфера.

Апуриновую ДНК получали инкубированием раствора ДНК в 0.1 н. HCl при 60° в течение 25 мин.

Денатурацию ДНК проводили путем обработки в 5 мМ трис-HCl (pH 7.4) при 98° в течение 5 мин и последующим быстрым охлаждением [7].

Белок определяли по модифицированному методу Lowry [5] и по Bradford [6], а ДНК спектрофотометрически и по Burton [7].

Для получения ДНК-агарозного геля использовали процедуру, описанную Bendich, Bolton [8].

Ядра из цельного головного мозга крыс массой 120 — 150 г выделяли методом Chauveau и соавт. [9].

Все растворы содержали фенилметилсульфонилфторид в концентрации 0.1 мМ. pH буферных растворов доводили при 25°. Все процедуры проводили при 2—4°.

(ADP-рибоза)полимеразу экстрагировали добавлением к ядерному препарату буферного раствора, содержащего 50 мМ трис-HCl (pH 7.6), 0.35M NaCl, 1 мМ β-меркаптоэтанол, 1 мМ NaN<sub>3</sub> (буфер А), и постоянным перемешиванием в течение 40 мин. Суспензию центрифугировали при 15000g в течение 30 мин. Надосадочную жидкость использовали для аффинной хроматографии на колонке ДНК-агарозы (1.2 × 5 см), которая содержала 8 мг ДНК. Для удаления нуклеиновых кислот экстракт ядер наносили со скоростью 20 мл/ч на колонку ДЭАЭ-ц (2 × 4 см), которая была уравновешена буфером А, содержащим 0.3 М NaCl. К колонке с ДЭАЭ-ц была непосредственно присоединена колонка с ДНК-агарозой, куда поступал элюат с первой колонки для дальнейшей аффинной хроматографии. Колонка ДНК-агарозы была также уравновешена буфером А, содержащим 0.3 М NaCl. Белки, связавшиеся с ДНК-агарозой, элюировали буфером А, содержащим 1 М NaCl, порциями по 1 мл. Фракции, обладающие поли(ADP-рибоза)полимеразной активностью, объединяли и анализировали против буферного раствора А, содержащего 0.2 М NaCl.

Таблица 1

Очистка (ADP-рибоза) полимеразы головного мозга крыс

| Стадия очистки                           | Количество белка (мг) | Активность |                       | Степень очистки | Выход, % |
|------------------------------------------|-----------------------|------------|-----------------------|-----------------|----------|
|                                          |                       | общая, ед. | удельная, ед/мг белка |                 |          |
| 0.35 М NaCl экстракт очищенных ядер      | 35                    | 665        | 19                    | 1               | 100      |
| Хроматография на ДНК-агарозе             | 0.96                  | 184        | 192                   | 10.1            | 27.7     |
| Хроматография на гелевой сепарации Cl-6B | 0.032                 | 74.6       | 2330                  | 123             | 11.2     |

Примечание. \*За единицу ферментативной активности принимали включение 1 пмоль NAD в кислотонерастворимый материал за 1 мин.

Как видно из табл. 1, где представлены результаты, полученные в процессе очистки (ADP-рибоза)полимеразы, после хроматографии на колонке ДНК-агарозы удельная ферментативная активность возрастает в 10.1 раз, а выход фермента по активности составляет 27.7 % по

сравнению с ядерным экстрактом.

Для дальнейшей очистки (ADP-рибоза)полимеразы диализат наносили со скоростью 10 мл/ч на колонку голубой сефарозы CL-6B ( $1,2 \times 3$  см), уравновешенную буферным раствором А, содержащим 0,2 М NaCl. (ADP-рибоза)полимеразу элюировали с колонки буферным раствором А, содержащим 1 М NaCl, порциями по 0,5 мл. На этой стадии удельная полимеразная активность возрастает в 123 раза, а выход фермента составляет 11,2%.

На рисунке представлено влияние ионов магния (а) и спермина (б) на (ADP-рибоза)полимеразную активность.  $MgCl_2$  при концентрации 10—20 мМ стимулирует (ADP-рибоза)полимеразную активность приблизительно в 3 раза, тогда как спермин при оптимальных концентрациях (2,5—5 мМ) активирует фермент приблизительно на 150%. Как видно из рисунка, (ADP-рибоза)полимераза проявляет достаточно высокую активность и в отсутствие в реакционной среде катионов, что говорит о том, что они не являются необходимыми компонентами для функционирования полимеразы.

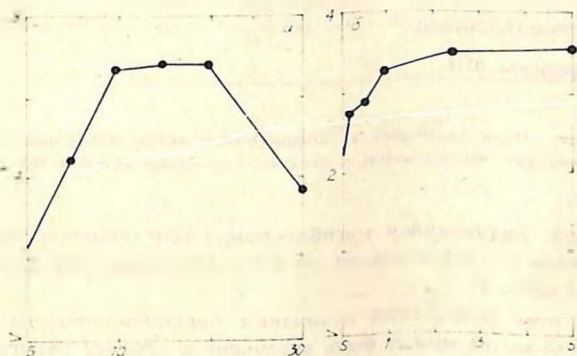


Рис. Влияние концентрации  $MgCl_2$  (а) и спермина (S, мМ) (б) на (ADP-рибоза)полимеразную активность (V, включение  $[^{14}C]NAD$  имп/мин  $\cdot 10^{-3}$ )

(ADP-рибоза)полимераза проявляет оптимум действия при pH 8,0—8,5 и температуре 25° (данные не представлены).

Хранение при 4° очищенной поли(ADP-рибоза)полимеразы в течение недели приводит к понижению ферментативной активности приблизительно на 40%.

Поскольку (ADP-рибоза)полимераза ассоциирована в ядре с хроматином [1,2], представляло определенный интерес исследовать влияние различных форм ДНК и гистонов на (ADP-рибоза)полимеразную активность. Как видно из табл. 2, без внесения в реакционную среду ДНК тимуса телят, полимераза не проявляет активности, тогда как суммарная фракция гистонов тимуса телят частично стимулирует фермент. Денатурированная и метилированная ДНК стимулируют поли(ADP-рибоза)полимеразную активность значительно слабее по сравнению с нативной. В

присутствии апуриновой ДНК (ADP-рибоза)полимераза, также как и в случае отсутствия нативной ДНК, в реакционной среде не проявляет каталитическую активность.

Интересным представляется и значительная стимуляция поли(ADP-рибоза)полимеразной активности при фрагментации ДНК ДНКазой I (табл.2). При внесении в реакционную среду панкреатической ДНКазы (У.А. 2000 ед/мг белка) полимеразная активность увеличивается на 81,5%.

Таблица 2  
Потребность (ADP-рибоза) полимеразы в различных компонентах реакционной системы

| Условия проведения поли(ADP-рибоза) полимеразной реакции | Ферментативная активность <sup>о</sup>                                 |       |
|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------|
|                                                          | Включение [ <sup>14</sup> C] NAD в кислотонерастворимый продукт, пмоль | о     |
| Полная реакционная среда                                 | 7,00                                                                   | 100   |
| + Тимидин (5 мМ)                                         | 0                                                                      | 0     |
| + ДНКазы I (1 ед)                                        | 12,7                                                                   | 181,5 |
| - ДНК                                                    | 0                                                                      | 0     |
| - гистоны                                                | 4,19                                                                   | 59,9  |
| - ДНК + гистоны                                          | 0                                                                      | 0     |
| - ДНК + денатурированная                                 | 2,86                                                                   | 40,9  |
| - ДНК + метилированная                                   | 2,69                                                                   | 38,5  |
| - ДНК + апуриновая ДНК                                   | 0                                                                      | 0     |

*Примечание.* \*Поли (ADP-рибоза) полимеразную активность определяли в условиях, описанных в методах исследований, в реакционную среду вносили 0,3 мкг очищенного фермента.

Тимидин, являющийся ингибитором (ADP-рибоза)полимеразы различных органов [1, 10], в нашем случае также подавляет ферментативную активность (табл. 2).

Полученные результаты позволяют предположить, что (ADP-рибоза)полимераза мозга может быть вовлечена в процесс репарации ядерной ДНК, поскольку различные повреждения в ДНК модулируют полимеразную активность.

## POLY(ADP-RIBOSE)POLYMERASE OF RAT BRAIN: ISOLATION AND PROPERTIES

Zaalishvili T. M., Sabelashvili D. Sh.

*Institute of Molecular Biology and Biological Physics,  
Georgian Academy of Sciences, Tbilisi*

A simple procedure for the purification of poly(ADP-ribose)polymerase from rat brain was developed. Polymerase was purified using affinity chromatography on DNA-agarose and Blue Sepharose CL-6B. The degree of purification was 123 with respect to the initial nuclear extract and the enzyme yield 11,2%. The optimal activity of poly(ADP-ribose)polymerase was observed at 25° and pH 8,0—8,5. Mg<sup>2+</sup> and total histone fraction did not necessarily accompany polymerase activity, though their addition intensified enzymatic

activity to a certain extent. The rat poly(ADP-ribose)polymerase had absolute requirement for DNA. DNA with single-strand breaks stimulated poly(ADP-ribose)polymerase effectively, whereas denatured, methylated and apurinic DNA inhibited enzymatic activity.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Mandel P., Okazaki H., Niedergang C. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, v. 27, p. 1—51, 1982.
2. Gaal J.C., Peerson C.K. *Biochem. J.*, v. 230, p. 1—18, 1985.
3. Заалишвили Т.М., Маргуани Д.О., Тамазян А.С. *Сообщения АН ГССР*, т. 106, N 2, с.397—400, 1982.
4. Ito S., Shizuta Y., Hayaishi O. *J. Biol. Chem.*, v. 254, p. 3647—3651, 1979.
5. Markwell M. K., Haas S. M., Bieber L. L., Tolbert N. E. *Anal. Biochem.*, v. 87, p. 206—210, 1978.
6. Bradford M.M. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248—254, 1976.
7. Георгиев Г.П. — В кн.: *Химия и биохимия нуклеиновых кислот* (под ред. И. Б. Збарского, С. С. Дебова), с. 74—120, Л., Медицина, 1968.
8. Bendich A.J., Bolton E.T. *Methods in Enzimology*, v. 12 B, p. 635—640, 1968.
9. Chauveau J., Moule Y., Rouiller Ch. *Exp. Cell Res.*, v. 11, p. 317—321, 1956.
10. Holtlund J., Kristensen T., Ostvold A., Laland S.G. *Eur. J. Biochem.*, v. 119, p. 23—29, 1981.

Поступила 21.02.1989.