НЕЙРОХИМИЯ

т. 6, № 3, 1987

УДК 577.152.277+577.152.314·611.8

ОЧИСТКА СВЯЗАННОЙ ЩЕЛОЧНОЙ РНКазы ЦИТОЗОЛЯ И ЕЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО БЕЛКОВОГО ИНГИБИТОРА ИЗ РАСТВОРИМОЙ ФРАКЦИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

НЕЧАЕВА Г. А.

Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

Из растворимой фракции больших полушарий головного мозга крыс фракционированием сульфатом аммония и гель-фильтрацией через сефадекс G-100 выделены специфический белковый ингибитор щелочной РНКазы цитозоля и связанная щелочная РНКаза (эндогенный комплекс ингибитора с РНКазой цитозоля), степень очистки которых составляла около 600 и 900 раз соответственно. Ингибитор РНКазы — кислый белок с M_r около 50 кД. Величина M_r эндогенного комплекса ингибитора с РНКазой цитозоля составляет около 62 кД, что соответствует молярному отношению ингибитора и РНКазы в комплексе 1:1. Свободная щелочная РНКаза в растворимой фракции головного мозга крыс не обнаруживалась. Связанная щелочная РНКаза в присутствии парахлормеркурибензоата (*п*-ХМБ) интенсивно гидролизовала поли (С), а также полимерную РНК, рРНК и тРНК из мозга и дрожжей, но не расщепляла поли (U), поли (А), поли (G) и ДНК.

РНКазы головного мозга, как и других органов, отличаются локализацией в различных субклеточных фракциях [1, 3, 6]; по оптимуму активности их делят на кислые и щелочные [1—7]. Щелочные РНКазы содержатся в ядерной, микросомной и растворимой клеточных фракциях головного мозга [3, 7]. Щелочная рибонуклеаза растворимой фракции цитозоля головного мозга с оптимумом при pH 7,8 находится в неактивном, латентном состоянии в виде комплексов, образованных с высоколабильным специфическим белковым ингибитором при помощи дисульфидных связей [3—8]. Активность РНКазы цитозоля обнаруживается в присутствии сульфгидрильных реагентов, таких как *п*-ХМБ, которые инактивируют ингибитор и переводят латентную щелочную РНКазу в активное состояние [1—9]. В растворимой фракции головного мозга большая часть ингибитора находится в свободном, не связанном с РНКазой состоянии [3—5]. Свободный ингибитор из ткани мозга способен тормозить активность РНКазы А из поджелудочной железы быка [3—7, 10]. Ингибитор, активный по отношению к РНКазам типа панкреатической РНКазы А, обнаружен во всех тканях млекопи-

тающих [1, 2], в то время как ингибитор щелочной РНКазы цитозоля печени цыплят с РНКазой А не взаимодействует [2]. Высокая активность свободного ингибитора обнаруживается в тканях, характеризующихся интенсивным синтезом РНК и белков,—в ткани печени [1], плаценты [1, 3], симпатического ганглия [10], головного мозга [1, 3—5]. В коре и подкорковых образованиях больших полушарий головного мозга крыс активность ингибитора примерно одинакова, в мозжечке и стволовой части головного мозга—в 2,5 и 2 раза больше, чем в больших полушариях [11]. Выработка условного оборонительного рефлекса у крыс сопровождается увеличением активности белкового ингибитора щелочной РНКазы цитозоля в гиппокампе и коре больших полушарий головного мозга [9]. По-видимому, лабильная система—щелочная РНКаза цитозоля и ее специфический белковый ингибитор, в отличие от панкреатической РНКазы, участвуют не только в деградации, но и в процессах перестройки цитоплазматических РНК и регуляции биосинтеза белков [1, 2]. Показано, что ингибитор защищает информационную РНК от расщепления РНКазой при выделении полисом [12], а также в процессе синтеза белка *in vitro*, вызывая увеличение выхода синтезируемого белка [13]. Белковый ингибитор щелочной РНКазы цитозоля выделен из головного мозга свиньи [8] и быка [5], величина M_r очищенных препаратов была равна 60 и 51 кД соответственно. Методов, позволяющих осуществить выделение свободного ингибитора и его эндогенных комплексов с щелочной РНКазой цитозоля из одной растворимой фракции в литературе мы не встретили.

В настоящей работе разработаны условия выделения очищенных препаратов белкового ингибитора и его эндогенных комплексов с щелочной РНКазой цитозоля из растворимой фракции больших полушарий головного мозга крыс. Изучение свойств и условий взаимодействия ингибитора с различными РНКазами может способствовать выяснению механизмов регуляции метаболизма РНК и белков в ткани мозга при различных функциональных состояниях ЦНС.

Материалы и методы

В работе были использованы крысы-самцы линии *Wistar* массой 180—200 г. Животных декапитировали в холодной комнате, и все последующие операции проводили на холоду. Большие полушария головного мозга (20—40 животных) гомогенизировали в 0,32 М растворе сахарозы (1:10) с 0,001 М ЭДТА, 0,01 М трис-HCl буфером pH 7,3. Гомогенат подвергали дифференциальному центрифугированию, выделяя ядерную фракцию (1100 g, 10 мин), затем лизосомно-митохондриальную фракцию и микросомы (12000 g, 1 ч или 100000 g, 30 мин). Полученную после этого растворимую фракцию использовали для выделения ингибитора и его комплексов с РНКазой цитозоля.

Гель-фильтрацию сульфатно-аммониевых препаратов белков растворимой фракции проводили на колонке (2,2×86 см) сефадекса G-100.

определение величины M_r (повторную гель-фильтрацию) ингибитора и его комплексов—на колонке сефадекса G-100 (1,8×84 см). Обе колонки уравновешивали и элюировали 0,02 М трис-HCl буфером pH 7,5 с 0,001 М ЭДТА, 0,005 М дитиотреитолом (ДТТ), 0,15 М NaCl и 15%-ным глицерином (буфер А). В работе использовали сефадекс G-100 («Pharmacia» Швеция).

Активность связанной щелочной РНКазы определяли модифицированным спектрофотометрическим методом [4], добавляя к 0,2 мл растворимой фракции или элюата 0,2 мл раствора *п*-ХМБ ($1 \cdot 10^{-4}$ М), который инактивирует ингибитор и переводит связанную РНКазу в активное состояние. Опытные и контрольные (определение без фермента) пробы инкубировали в 0,08 М трис-HCl буфере pH 7,8 с 0,1%-ной дрожжевой РНК при 37° в течение 30 мин. Затем пробы охлаждали и осаждали 0,5%-ным уксуснокислым лантаном в 76%-ном этаноле с 1 н. HCl (1 мл) и через 30 мин центрифугировали 15 мин при 1200 g. В надосадочной жидкости определяли поглощение при 260 нм кислоторастворимых продуктов гидролиза РНК. Активность РНКазы выражали в ΔA_{260} на 1 мг белка, определяемого по методу Lowry и соавт. [14]. Величина активности связанной РНКазы позволяет судить о содержании неактивных эндогенных комплексов белкового ингибитора с РНКазой цитозоля.

Для определения активности свободного ингибитора к 0,1 мл надосадочной жидкости, а в контрольных пробах к 0,1 мл 0,32 М сахарозы, pH 7,3 добавляли 0,1 мл раствора панкреатической РНКазы А (002 мкг) в 0,1%-ном желатине, а через 15 мин—раствор РНК (0,3%) в 0,08 М трис-HCl буфере, pH 7,8. Контрольные и опытные пробы инкубировали при 37° в течение 15 мин. Дальнейшее определение активности РНКазы проводили по ранее описанному методу [4]. По степени торможения активности РНКазы А (определение с ингибитором и без него) судили об активности ингибитора, которую выражали в % торможения активности 0,02 мкг РНКазы А и в усл. ед. За усл. ед. активности белкового ингибитора принимали такое его количество, которое вызывало торможение на 50% активности 0,01 мкг РНКазы А из поджелудочной железы быка в принятых нами стандартных условиях определения. В работе использована рРНК и тРНК дрожжей (Новосибирский ИОХ) и синтетические полинуклеотиды («Serva», ФРГ и «Reanal», Венгрия). Коммерческие препараты дрожжевой РНК депротеинизировали с помощью фенола и выделяли из них полимерную РНК [15]. Из мозга рРНК и тРНК выделяли фенольным методом [15, 16].

Результаты и обсуждение

Белки растворимой фракции осаждали сульфатом аммония. Полученный осадок между 30 и 80% насыщения $(NH_4)_2SO_4$ (в предварительных опытах было установлено, что при таком осаждении ингибитор и латентная РНКаза почти полностью переходили в осадок) раст-

воряли в минимальном объеме буфера А, подвергали диализу (2 ч) против этого буфера и наносили на колонку с сефадексом G-100. Собирали и подвергали анализу 55 фракций по 4 мл. На рис. 1 представлены типичные профили элюции белков, свободного ингибитора и латентной РНКазы при гель-фильтрации сульфатно-аммониевых препаратов белков растворимой фракции больших полушарий головного мозга крыс.

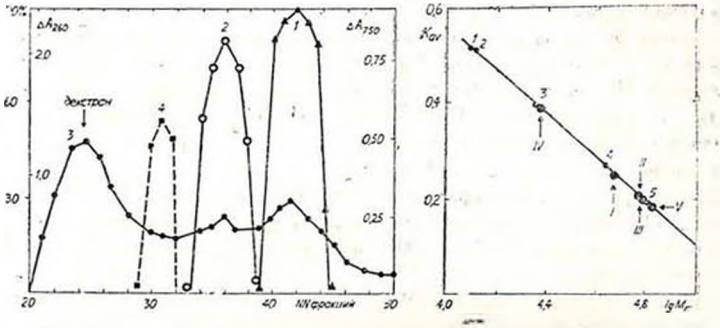

Рис. 1. Гель-фильтрация на колонке с сефадексом G-100 (2,2×86 см) сульфатно-аммониевых препаратов белков растворимой фракции больших полушарий головного мозга крыс. Скорость элюции 16 мл/ч. Объем проб 4 мл. *1*—активность ингибитора в % торможения 0,02 мкг панкреатической РНКазы А; *2*—эндогенные комплексы ингибитора со щелочной РНКазой цитозоля (связанная щелочная РНКаза)—ΔA_{260}; *3*—белок ΔA_{750}; *4*—кислая РНКаза—ΔA_{260}

Рис. 2. Определение величин M_r свободного белкового ингибитора щелочной РНКазы (I) и эндогенных комплексов ингибитора с РНКазой цитозоля (II), комплекса ингибитора с панкреатической РНКазой А (III), свободной щелочной РНКазы цитозоля (IV) и кислой РНКазы (V) гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-100 (1,8×84 см). Скорость элюции 16 мл/ч. Маркерные белки: *1*—цитохром С, *2*—РНКаза А из поджелудочной железы быка, *3*—химотрипсиноген, *4*—яичный альбумин, *5*—альбумин сыворотки быка. По оси абсцисс—логарифм M_r. По оси ординат — $K_{av} = \frac{Ve - Vo}{Vt - Vo}$, где Vo—объем выхода декстрана голубого, Ve—объем выхода каждого белка, Vt—общий объем колонки.

Из представленных данных видно, что объем выхода с колонки пика основной массы белков (фракция 25, объем 100 мл) совпадал с объемом выхода декстрана голубого (M_r 300 кД). Связанная РНКаза (эндогенные комплексы ингибитора с РНКазой цитозоля) элюировалась во фракциях 34—38 с максимальной активностью во фракции 36 (объем 144 мл), свободный ингибитор во фракциях 40—44. Объем элюата с максимальной активностью ингибитора составлял 168 мл (фракция 42). Во фракциях 30—32 элюировалась кислая РНКаза с оптимумом активности при pH 5,8—6,0 и M_r 68 кД (рис. 2). Кислая РНКаза локализуется в лизосомах [3], некоторое количество этого фермента переходит в растворимую фракцию. Фракции, обладающие

максимальной активностью ингибитора, и фракции, содержащие связанную РНКазу, объединяли и осаждали сульфатом аммония до 90% насыщения. После центрифугирования (12000 g, 40 мин) каждый осадок растворяли в минимальном объеме буфера А и после диализа против буфера А наносили поочередно на колонку с сефадексом G-100 (1,8×84 см). Для определения величины M_r ингибитора и связанной РНКазы гель-фильтрацией [17] колонку калибровали с помощью стандартных белков (рис. 2). Величина M_r свободного ингибитора по результатам 5 опытов составила 50±0,5 кД, а эндогенного комплекса ингибитора с РНКазой цитозоля—62±0,6 кД, оказавшаяся близкой к величине M_r комплекса ингибитора из растворимой фракции головного мозга с панкреатической РНКазой А (63±0,55 кД). Комплекс получали добавлением РНКазы А (3 мг) к элюату (стадия 3), содержащему свободный ингибитор. Необходимо отметить, что при повторной гель-фильтрации через сефадекс G-100 эндогенный комплекс ингибитора с РНКазой частично диссоциировал. В элюате обнаруживалась как связанная щелочная РНКаза (90% активности) с величиной M_r 62 кД, так и свободная щелочная РНКаза (10% активности) с M_r 26 кД (рис. 2). Оптимум ферментативной активности связанной и свободной фракций щелочной РНКазы цитозоля головного мозга крыс, как и щелочных (нейтральных) РНКаз цитозоля из других тканей [10], при определении в трис-HCl буфере соответствовал pH 7,5—7,8.

Таблица 1

Влияние связанной щелочной РНКазы на РНК (1 мг/мл) из мозга и дрожжей и на синтетические полинуклеотиды (0,5 мг/мл). Активность РНКазы в ΔA_{260} на 1 мкг белка (n=5)

Субстрат	Длительность инкубации в мин	
	30	40
Поли (C)	20,82±2,15	26,9±2,01
Поли (U)	0	0
Поли (A)	0	0
Поли (G)	0	0
ДНК	0	0
РНК из мозга		
рРНК	0,79±0,07	1,05±0,12
тРНК	0,68±0,04	0,98±0,08
РНК из дрожжей		
Полимерная РНК	1,45±0,12	2,11±0,16
рРНК	0,82±0,08	1,02±0,08
тРНК	0,75±0,06	0,95±0,06

Результаты определения субстратной специфичности очищенных препаратов связанной щелочной РНКазы представлены в табл. 1. Очищенные препараты латентной РНКазы цитозоля в присутствии $1 \cdot 10^{-4}$ М *п*-ХМБ интенсивно гидролизовали полимерную РНК из дрожжей и поли (C), но не проявляли активности по отношению к поли (U),

поли (A), поли (G) и ДНК. Наибольшую активность связанной РНКазы наблюдали при действии на поли (C) и полимерную дрожжевую РНК: рРНК и тРНК из мозга и дрожжей расщеплялись РНКазой примерно с одинаковой скоростью.

К настоящему времени получены в очищенном состоянии щелочные РНКазы из гомогенатов мозга [18, 19] и других органов [20]. В отдельных работах щелочную РНКазу выделяли из растворимой фракции головного мозга [6, 15, 21]. Щелочную РНКазу из животных тканей обычно экстрагируют 0,25—0,1 н. H_2SO_4 или HCl [20, 21]. После экстракции 0,1 н. HCl из растворимой фракции головного мозга крыс выделена щелочная РНКаза с оптимумом pH 7,8 и M_r 13 кД [21], близкой к M_r панкреатической РНКазы А (13,5 кД). При выделении щелочной РНКазы из растворимой фракции головного мозга быка без экстракции кислотой получена щелочная РНКаза с M_r 25 кД [6].

Таблица 2

Выделение белкового ингибитора щелочной (I) и связанной (II) РНКазы цитозоля из растворимой фракции головного мозга крыс

Стадия выделения	Общий белок в мг	Общая активность		Удельная активность		Степень очистки		Выход в %	
		I (усл. ед.)	II (ΔA_{260})	I (усл. ед./мг белка)	II (A_{260} / мг белка)	I	II	I	II
Растворимая фракция	580	5600	754	9,7	1,3			100	100
Высаливание от 30 до 80 % насыщения $(NH_4)_2SO_4$	92	4800	690	52,1	7,5	5,2	5,8	85	91
После гель-фильтрации через сефадекс G-100	I II 2,2 1,8	3600	500	1636	277	158	213	64	66
После повторной гель-фильтрации через сефадекс G-100	0,24 0,15	1620	180	6750	1200	675	923	29	23

Свойства этого фермента отличались от свойств панкреатической РНКазы А. По-видимому, величина M_r щелочной РНКазы цитозоля мозга, как и щелочных РНКаз других тканей [22], в 2 раза превышает величину M_r РНКазы А. Так, РНКаза спермы быка представляет собой димер субъединиц, гомологичных РНКазе А, способный частично диссоциировать на мономеры [22]. В наших опытах при повторной гель-фильтрации эндогенного комплекса ингибитора с РНКазой обнаруживали свободную щелочную РНКазу с $M_r \sim 26$ кД, что соответствует димерной форме РНКазы. Однако эндогенные комплексы ингибитора с РНКазой цитозоля, как и комплексы ингибитора, полученные с РНКазой А, имели M_r 62 кД. Это соответствует отношению ингибитора и мономерной формы РНКазы цитозоля 1:1, так

как молекулярная масса ингибитора из мозга крысы, как и из мозга быка [5] около 50 кД, а из мозга свиньи [8] 60 кД.

В пяти опытах препарат свободного ингибитора после гель-фильтрации через сефадекс G-100 (стадия 3) в 0,02 М трис-HCl буфере pH 7,4 с 0,001 М ЭДТА, 0,005 М ДТТ (буфер Б) наносили на колонку (1,2×10 см) ДЭАЭ-сефадекса А-50. Колонку промывали затем 50 мл буфера Б. Свободный ингибитор сорбировался на ионообменнике. Ингибитор элюировали 30 мл 0,1 М ацетатного буфера pH 5,5 с 1 М NaCl, 0,001 М ЭДТА, 0,005 М ДТТ и 15%-ным глицерином. Объем элюата с максимальной активностью ингибитора составлял 15 мл. Результаты этих опытов позволяют заключить, что ингибитор из мозга крысы, как и ингибитор из мозга быка [5], свиньи [8] и других органов [13] является кислым белком.

Описанный метод, последовательные стадии которого суммированы в табл. 2, позволяет получить из растворимой фракции головного мозга крыс препарат связанной щелочной РНКазы цитозоля и препарат свободного белкового ингибитора этой РНКазы с выходом около 25% и степенью очистки 900 и 600 раз соответственно. Предложенный метод полностью отличается от описанных в литературе методов очистки свободного белкового ингибитора из головного мозга свиньи [8] и быка [5] и позволяет выделить из одной и той же надосадочной жидкости не только свободный ингибитор, но и его комплексы с РНКазой цитозоля, ранее не исследованные.

ISOLATION OF LATENT ALKALINE CYTOSOLIC RNAase AND ITS SPECIFIC PROTEIN INHIBITOR FROM RAT BRAIN SOLUBLE FRACTION

NECHAEVA G. A.

I. P. Pavlov Institute of Physiology, Leningrad

Using ammonium sulfate fractionation and gel-filtration on Sephadex G—100 a specific protein inhibitor of alkaline cytosolic RNase and complex of this inhibitor with alkaline RNAase have been purified from rat brain big hemispheres soluble fraction with the yield of 600 and 900 respectively. RNAase inhibitor is acid protein with M_r of 50 kD the M_r of its complex with cytosolic RNAase is approx 62 kD that makes the molar ratio of components equal to 1 : 1. Free alkaline RNAase is not detected in brain soluble fraction; in the presence of pCMB the bound alkaline RNAase rapidly hydolyses poly (C), polimeric RNA, sRNA, tRNA from brain and yeast, but does not cleave poly (U), poly (A), poly (G) and DNA.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Roth J. S.* Biochim. et biophys. acta, v. 61, № 6, p. 903—915, 1962.
2. *Kraft N., Shortman K.* Austr. J. Biol. Sciences, v. 23, № 1, p. 175—184, 1970.
3. *Исчасова Г. А.* Труды IV Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы, Тарту, с. 323—332, 1966.
4. *Исчасова Г. А.* Укр. біохім. журн., т. 44, № 2, с. 178—181, 1972.
5. *Burton L. E., Blackburn P., Moore S.* Int. J. Peptide Proteine Res., v. 16, p. 359—364, 1980.
6. *Okazaki H., Ittel M. E., Niedergang C., Mandel P.* Biochim. et biophys. acta., v. 391, № 1, p. 84—95, 1975.
7. *Okazaki H., Mandel P.* J. Neurochem., v. 25, № 2, p. 171—176, 1975.
8. *Takahashi Y., Mase K., Suzuki J.* Experimentia, v. 23, № 7, p. 525—526, 1967.
9. *Исчасова Г. А., Лопатина Н. Г.* Тезисы докл. Всесоюзн. симп. «Нейрохимические механизмы регуляции памяти». Пущино, с. 10, 1984.
10. *Bates D. J., Good R. T., Austin L.* Neurochem. Res., v. 10, № 5, p. 713—727, 1985.
11. *Исчасова Г. А.* Всесоюзн. биохим. съезд, тезисы научн. сообщ., 7 секция, Ташкент, с. 18—19, 1969.
12. *Takahashi Y., Mase K., Sugano H.* Biochim. et biophys. acta, v. 119, № 3, p. 627—629, 1966.
13. *Scheele G., Blackburn P.* Proc Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 76, p. 4898—4902, 1979.
14. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 435—445, 1951.
15. *Аксенова Л. Н., Исчасова Г. А.* Биохимия, т. 36, № 3, с. 507—512, 1971.
16. *Георгиев Г. П.* Биохимия, т. 24, № 3, с. 472—480, 1959.
17. *Laurent T. C., Killander J.* J. Chromatogr., v. 14, p. 317—330, 1964.
18. *Elson M. S., Glitz D. G.* Biochemistry, v. 14, № 7, p. 1471—1476, 1975.
19. *Иванов В. А., Третьяк Т. М., Смирнова Г. И.* Биохимия, т. 43, № 2, с. 287—292, 1977.
20. *Gordon J.* Arch. Biochem. and Biophys., v. 112, № 3, p. 421—430, 1965.
21. *Шелепина Е. П.* Биохимия, т. 41, № 7, с. 1313—1318, 1975.
22. *D'Alessio G., Malorni M. C., Parente A.* Biochemistry, v. 14, p. 1116—1122 1975.

Поступила 1. III 1987