

УДК 577.152.24

БИОХИМИЯ

Д. Л. Арутюнян, А. А. Погосян, А. Г. Мхитарян

Выделение (АДФ-рибоза) полимеразы из мозга крупного рогатого скота. Основные физико-химические свойства

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР К. Г. Карагезяном 28/XII 1987)

(АДФ-рибоза) полимеразы (КФ 2.4.99), фермент, локализованный в ядрах эукариотических клеток, катализирует полимеризацию АДФ, рибозильного остатка НАД, с образованием акцепторсвязанного гомополимера поли(АДФ-рибозы). Акцепторами поли(АДФ-рибозы) могут служить различные ядерные белки, в том числе гистон H1 и сама (АДФ-рибоза) полимеразы (1).

Гомогенные препараты фермента выделены из различных источников: тимуса теленка и свиньи, печени крыс, плаценты человека (1,2), тимуса и семенников быка (3).

Настоящая работа посвящена получению высокоочищенных препаратов (АДФ-рибоза) полимеразы из мозга крупного рогатого скота и сравнению ее основных физико-химических свойств со свойствами хорошо изученных ферментов из тимуса и семенников (3).

Ферментативную активность определяли в 100 мМ трис-НСI буфере рН 8,0, содержавшем 10 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреит, 10 мкг высокомолекулярной тимусной ДНК, 5 мкг гистона H1 и 0,2 мМ НАД (300000 имп/мин) в конечном объеме 125 мкл. После 5 мин инкубации при 25°C реакцию останавливали 20%-ной охлажденной трихлоруксусной кислотой. Кислотонерастворимый материал собирали на стекловолокнистом фильтре GF/C «Whatman». За единицу активности (АДФ-рибоза) полимеразы принимали количество фермента, катализирующее включение в кислотонерастворимый осадок 1 нмоль НАД за 1 мин. Концентрацию белка определяли по методу Лоури (4). Степень гомогенности и молекулярную массу полученного препарата фермента определяли методом электрофореза в 7,5%-ном полиакриламидном геле в присутствии Ds—Na.

Для выделения (АДФ-рибоза) полимеразы 120 г ткани гомогенизировали в буфере А (50 мМ трис-НСI рН 7,4, 50 мМ NaHSO₃, 1 мМ ЭДТА, 0,5 мМ дитиотреит), содержавшем 0,3 М NaCl. Основные стадии очистки приведены в табл. 1. После центрифугирования при 20000g надосадочную фракцию подвергали дробному фракционированию 40—80%-ным сульфатом аммония. После обессоливания на колонке G-25 (3X45 см) препарат наносили на колонку с ДНК-целлюлозой объемом 30 мл. ДНК-целлюлозу получали по методу Альбертса (5). После нанесения колонку промывали 40 мл буфера А с 0,2 М

Очистка (АДФ-рибоза) полимеразы из мозга крупного рогатого скота Таблица 1

Стадия	Общий белок, мг	Общая активность, ед.	Специфическая активность, ед./мг	Выход, %	$\frac{A - \text{ДНК}}{A - \text{ДНК}}$, %
Грубый экстракт	1552	274	0,18	100	82
Осаждение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	320	165	0,52	61	60
ДНК-целлюлоза	0,78	140	179	51	47
"Red-sepharose"	0,3	116	386	43	44
Гидроксиапатит	0,06	53	950	19	13

NaCl. Фермент элюировали с колонки буфером А, содержащим 1,0 М NaCl. На этой стадии фермент был очищен в 340 раз, по сравнению с предыдущей стадией, с выходом активности, составлявшей 47% от исходной. Полученный препарат фермента после трехкратного разбавления буфером А наносили на колонку, содержащую «Red-Sephagose» (Pharmacia)—3 мл. Элюцию проводили ступенчатым градиентом KCl, (по 3 мл 0,3, 0,5, 0,8 и 1,0 М KCl в буфере А). Фракции с ферментативной активностью, элюировавшие с сефарозы при 0,8 М KCl, наносили на колонку с гидроксиапатитом (1 мл). После промывки 5 мл 10 мМ калий-фосфатного буфера pH 7,4, содержащего 2 М KCl, фермент элюировали с колонки 50 мМ калий-фосфатным буфером с той же концентрацией KCl. В результате проведенной процедуры было получено 60 мкг белка с удельной активностью 950 ед/мг и выходом активности, составлявшей 19% от исходной. При выделении фермента из тимуса и семенников на гидроксиапатите он отделяется от ДНК. ДНК элюируется с носителя при помощи 250 мМ калий-фосфатного буфера. При выделении фермента из мозга фракция ДНК не обнаруживается. При отсутствии в реакционной среде экзогенной ДНК очищенная (АДФ-рибоза) полимеразы из тимуса и семенников не проявляет активности, а фермент из мозга сохраняет ее в пределах 13%.

По результатам электрофореза более 90% белка обнаруживается в зоне локализации (АДФ-рибоза) полимеразной активности, соответствующей молекулярной массе 116 кДа. Полученные величины молекулярной массы (АДФ-рибоза) полимеразы из мозга согласуются со значениями молекулярной массы для фермента из тимуса и семенников (3). Величина K_m НАД в реакции полиАДФ-рибозилирования гистона H1, определенная в координатах Лайнуивера-Берка, равна 44 мкМ и существенно не отличается от аналогичного параметра для очищенного фермента из семенников и тимуса. Нами отмечены незначительные расхождения между значениями $V_{\text{макс}}$ реакций полиАДФ-рибозилирования гистона H1, катализируемых (АДФ-рибоза) полимеразой, выделенной как из мозга, так и тимуса и семенников (табл. 2). Установлено ингибирование полиАДФ-рибозилирования гистона H1 под действием никотиамида и тимидина в концентрациях $4 \cdot 10^{-4}$ М на 90 и 100% соответственно, в то время как аналоги субстрата—НАДФ, деамино-НАД и этено-НАД в концентрациях $5 \cdot 10^{-4}$ М ингибируют реакцию лишь на 30—50%.

Таблица 2

Свойства (АДФ-рибоза) полимераз из мозга, тимуса и семенников (3)

Параметры	Мозг	Тимус	Семенники
M_r , кДа	116	116	116
$V_{\text{макс}}$, ед./мг	1200	1600	1470
K_m НАД, мкМ	44	55	50
pH-оптимум	8.0—9.0	8.0—9.0	8.0—9.0

Таким образом, проведенные исследования показали, что высокоочищенный препарат (АДФ-рибоза) полимеразы из мозга по ряду физико-химических характеристик (молекулярной массе, pH-зависимости, удельной активности, K_m НАД, по ингибированию аналогами субстрата) идентичен (АДФ-рибоза) полимеразам, выделенным из тимуса и семенников. Полученные результаты позволяют заключить, что низкий уровень синтеза полиАДФ-рибозы в мозговой ткани, по всей видимости, является результатом низкой концентрации фермента в ткани мозга, а не особенностей его каталитических характеристик.

Институт экспериментальной
биологии Академии наук
Армянской ССР

Գ. Լ. ՉԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Ա. Ա. ՊՈՂՈՍՅԱՆ, Ա. Գ. ՄԻԻԹԱՐՅԱՆ

Խոշոր եղջերավոր անասունների ուղեղի (ԱԴՖ-ոիրոզա) պոլիմերազայի
անջատումը: Հիմնական ֆիզիկա-քիմիական հատկությունները

Դեթ-ցելյուլոզայի, «Red-sepharose»-ի հիդրոֆոբիապատիտի սյունների վրա մաքրման եղանակով ստացված են (ԱԴՖ-ոիրոզա) պոլիմերազայի հոմոգեն պրեպարատներ: Ցույց է տրված, որ ուղեղից մաքրված ֆերմենտը մոլեկուլյար դանգվածով K_m -ի արժեքով, տեսակարար ակտիվությամբ, ինչպես նաև pH-կախվածությամբ էականորեն չի տարբերվում ուրցադեղ-ձից և ամորձներից անջատված ֆերմենտից (3): Հենվելով ստացված տվյալների վրա, կարելի է ենթադրել, որ ուղեղի հյուսվածքին բնորոշ (ԱԴՖ-ոիրոզա) պոլիմերազայի ակտիվության ցածր մակարդակը հետևանք է ոչ թե ֆերմենտի կատալիտիկ հատկությունների, այլ նրա ցածր պարունակությանը ուղեղի հյուսվածքում:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ ՈՒ Ն

- ¹ K. Ueda, Ann. Rev. Biochem., v. 54, p. 73—100 (1985). ² H. Ushiro, Y. Yokoyama, Y. Shizuta, J. Biol. Chem., v. 262, p. 2352—2357 (1987). ³ Л. В. Карабашян, Д. Л. Арутюнян, А. А. Погосян и др., Биохимия, т. 53, в. 4 (1988). ⁴ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr e. a., J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275 (1951). ⁵ B. Alberts, G. Herrick, Methods in Enzymology, v. 21, p. 198—217 (1971).