

И. Ф. ПАСКЕВИЧ

ИССЛЕДОВАНИЕ НУКЛЕАЗ, СВЯЗАННЫХ С ГИСТОНАМИ ПЕЧЕНИ И СЕЛЕЗЕНКИ

(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 6 IV 1971)

Появившиеся в последнее время сообщения о нуклеазной активности гистонов⁽¹⁻³⁾ свидетельствует скорее всего о наличии комплекса гистон — фермент, однако природа этого комплекса остается невыясненной. Представляло интерес провести изучение нуклеаз, связанных с гистонами печени и селезенки, для выявления возможной специфики в обоих органах, а также выяснения природы комплекса гистон — фермент, т. е. вопроса о том, является ли этот комплекс биологически активным в клетке или он образуется в процессе выделения гистонов.

Опыты проведены на белых крысах — самцах весом 160 г. Из обоих органов выделяли ядра в 2,2 *M* сахарозе (плотность 1,275). Из очищенных ядер экстрагировали ядерный сок буфером, содержащим 50 ммол. трис-НСI-буфера, 14 ммол. NaCl, 1 ммоль MgCl₂, pH 7,2. Операцию повторяли 9 раз. Дезоксирибонуклеопротеид (ДНП) экстрагировали 1,5 *M* NaCl в течение 12 час. на холоду при постоянном перемешивании. ДНП, в зависимости от условий опыта, очищали на колонках из сефадекса Г-150 (2 × 100 см) или разбавлением до концентрации 10 мМ NaCl. Из ДНП экстрагировали гистоны 0,25 *N* HCl, экстракт диализовали последовательно, сначала против воды, а затем против 10 мМ трис-НСI-буфера, pH 8,2. Гистоны хроматографировали на колонках из карбоксиметилцеллюлозы, как описано ранее⁽⁴⁾. Ингибитор из ядерного сока получали центрифугируя ядерный сок 2 часа при 10 5000 *g* на центрифуге VАС-60. Белки надосадочной жидкости осаждали сернокислым аммонием при 100% насыщении на холоду, pH 6. Осадок диализовали против воды и растворяли в 0,14 *M* NaCl. Восстановление рибонуклеазы проводили меркаптоэтанолом в 8 *M* мочевины pH 8,6⁽⁵⁾. После инкубации мочевины и редуцирующий агент отделяли на колонке сефадекса Г-25 (2 × 50 см).

Нуклеазную активность выявляли после инкубации в течение 2 час. при 37°. Для определения активности рибонуклеазы 3 мл инкубационной смеси содержали: 150 μмол. трис-НСI-буфера, 330 μмол. NaCl, 150 μг белка и 1,5 мг белка. Для определения активности дезоксирибонуклеазы инкубационная смесь содержала: 150 μмол. трис-НСI-буфера, 300 μмол. NaCl, 15 μмол. MgCl₂, 150 μг белка и 1 мг ДНК (pH системы в обоих случаях 7,2). Ингибитор рибонуклеазы из ядерного сока и цитоплазмы добавляли в соотношении к гистону 1 : 3. В качестве субстратов использовали высокополимерные РНК и ДНК, выделенные из печени и селезенки, как описано^(6, 7). Инкубацию останавливали холодной HClO₄ (конечная концентрация 0,5 *N*). Определяя нуклеазную активность, учитывали величину оптического поглощения кислоторастворимой фракции до инкубации, при инкубации без субстрата и при инкубации без фермента. За единицу ферментной активности принимали количество белка, обеспечивающее прирост оптической плотности кислоторастворимой фракции на одну единицу при 260 мμ. Удельная активность выражена в единицах активности на 1 мг белка.

Результаты проведенных исследований представлены в табл. 1.

Видно, что в гистонах обоих органов не обнаруживается дезоксирибонуклеазная активность, хотя вполне возможно, что при других условиях выделения гистонов такая активность может быть обнаружена (3).

В обоих органах в препаратах гистонов обнаружена рибонуклеазная активность, которая практически не изменяется в зависимости от степени очистки ДНП, из которого экстрагированы гистоны.

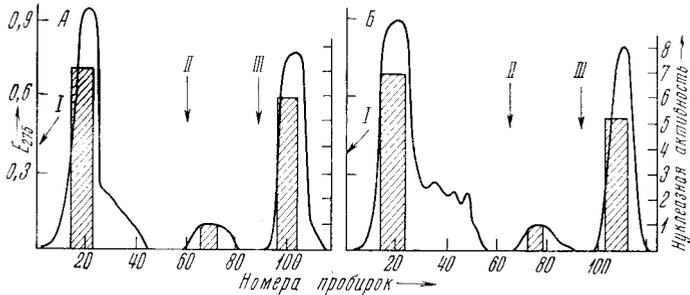


Рис. 1. Хроматография гистонов печени (А) и селезенки (Б) на колонках из КМ-целлюлозы. Ступенчатая элюция растворами: 0,2 М ацетатный буфер, рН 4,2 + 0,42 М NaCl (I), 0,01 N HCl (II), 0,02 N HCl (III)

При давлении в инкубационную среду ингибитора рибонуклеазы из ядерного сока ферментная активность полностью подавляется. Ингибитор рибонуклеазы из цитоплазмы оказался менее специфичным (степень подавления около 80%). Полное подавление рибонуклеазной активности наблюдается также и при восстановлении меркаптоэтанолам. Эти результаты (инкубация с меркаптоэтанолам) свидетельствуют прежде всего о том, что ферментная активность гистонов обусловлена наличием в них рибонуклеазы, и делают маловероятным предположение о нуклеазной активности самих гистонов.

Об этом говорят также данные по изучению ферментной активности гистонов при хроматографии их на колонках из КМ-целлюлозы и сефадекса. На рис. 1 А представлены результаты хроматографического разделения гистонов печени и селезенки на КМ-целлюлозе. Видно, что нуклеазная активность преимущественно сосредоточена в первом и третьем пиках, являющихся, соответственно, лизиновыми и аргининовыми фракциями гистонов (4). Степень выраженности рибонуклеазной активности практи-

Таблица 1

Активность нуклеаз в гистонах из ДНП печени и селезенки белых крыс (ферментные единицы)

Условия опыта	Печень	Селезенка
Система для РНК		
гистоны из неочищенного ДНП	4,6	5,2
гистоны из ДНП, очищенного на Г-150	4,4	5,2
гистоны из ДНП, очищенного переосаждением	4,4	5,0
после инкубации с меркаптоэтанолам	0,0	0,0
Полная система с гистонами из неочищенного ДНП плюс		
ингибитор рибонуклеазы из ядерного сока	0,0	0,2
ингибитор рибонуклеазы из клеточного сока	0,6	0,8
Система для ДНК		
гистоны из неочищенного ДНП	0,0	0,1
гистоны из ДНП, очищенного на Г-150	0,0	0,0

Примечание. Каждая величина — среднее из результатов четырех опытов.

чески одинакова для обоих органов. При инкубации белков обоих органов, содержащихся в зоне нуклеазной активности (заштрихованная часть на рис. 1), с меркаптоэтанолом нуклеазная активность последнего исчезала, как и в тотальных гистонах, что также свидетельствует о наличии в гистонах связанной рибонуклеазы.

Дальнейшая постановка опыта заключалась в следующем. Белки аргининовой фракции гистонов обоих органов, не обладающие нуклеазной активностью (незаштрихованная часть на рис. 1), инкубировали с рибонук-

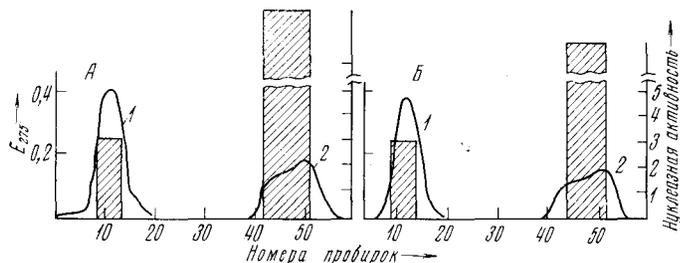


Рис. 2. Гель-фильтрация аргининовых гистонов печени (А) и селезенки (Б), инкубированных с рибонуклеазой, на колонках сефадекса Г-75. 1 — гистон, 2 — рибонуклеаза

леазой, выделенной из цитоплазмы. Выделение проводилось в условиях, аналогичных выделению гистонов. Смесь разгоняли на колонках из сефадекса Г-75 (2 × 50 см), отделяли от рибонуклеазы и в пике, соответствующем гистонам, определяли нуклеазную активность (рис. 2). Видно, что после инкубации рибонуклеазная активность обнаруживается в белках, ранее этой активностью не обладавших, причем для белков обоих органов она практически равнозначна.

Хотя на основании этих данных мы не можем полностью утверждать то, что комплекс гистон — рибонуклеаза образуется в процессе выделения гистонов, можно совершенно определенно считать, что сами гистоны нуклеазной активностью не обладают, и нам кажется, что применение термина «нуклеазная активность гистонов» (1) является неправомерным. Кроме того, данные об инкубации гистонов аргининовой фракции со свободной рибонуклеазой позволяют предполагать, что комплекс гистон — фермент скорее всего образуется при выделении, а не является предсуществующим в клетке.

Научно-исследовательский институт
медицинской радиологии
Харьков

Поступило
6 IV 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. С. Шапот, Г. Д. Кречетова, И. А. Чудинова, В кн. Функциональная биохимия клеточных структур, «Наука», 1970, стр. 286. ² В. А. Юркив, И. П. Пушкина и др., Укр. биохим. журн., 42, 727 (1970). ³ М. И. Беляева, Н. Л. Зоткина, В. Г. Винтер, Биохимия, 35, 409 (1970). ⁴ И. Ф. Паскевич, М. А. Ишханова и др., Радиобиология, 11, 42 (1971). ⁵ F. White, J. Biol. Chem., 235, 1333 (1961). ⁶ Г. П. Георгиев, В. П. Мантьева, Биохимия, 27, 949 (1962). ⁷ И. Ф. Паскевич, В. И. Шантырь, Докл. АН УССР, 10, 923 (1969).