

УДК 576.312.2.31

БИОХИМИЯ

К. М. ДЖАНДИЕРИ, Г. Д. ТУМАНИШВИЛИ, Д. В. ДЗИДЗИГУРИ,
Н. Г. АВАЛИШВИЛИ, Н. Д. МГВДЕЛАДЗЕ

О ЯДЕРНОМ ФАКТОРЕ, СПОСОБСТВУЮЩЕМ РАЗРУШЕНИЮ ДНК ХРОМАТИНА ДНКазами

(Представлено академиком А. А. Баевым 27 XII 1972)

Недавно в опытах на куриных зародышах *in vivo* и на гомогенатах печени и почки крысы были получены данные, указывающие на существование ядерного фактора, ускоряющего разрушение ДНК в ядрах соответствующих клеток (¹⁻³). Действие обнаруженного фактора оказалось тканеспецифичным. Вещество, ускоряющее разрушение ДНК, экстрагируется из ядер 0,14 М NaCl (³).

Целью настоящей работы является изучение свойств, действия, степени специфичности и химической природы фактора, ускоряющего разрушение ДНК с использованием относительно простой системы, а именно хроматина печени и почки крысы.

Опыты проводились на белых крысах линии «Вистар» весом 200—250 г, из органов которых готовили как хроматин, так и ядерный экстракт. Хроматин получали по методу Дингмана и Спорна (⁴). Полученный хроматин разбавляли в 0,2 мМ ЭДТА из расчета 1 г ткани на 1 мл ЭДТА. С целью получения ядерного экстракта ядра выделяли по методу Берте и Де Дюва (⁵). Надосадочная фракция, полученная после первого осаждения ядер, представляет собой цитоплазматическую фракцию. Ядерную фракцию инкубировали в течение 1 часа в 0,14 М NaCl при 4°, после чего смесь центрифугировали при 600 g в течение 10 мин. Надосадочная фракция представляла собой ядерный экстракт.

Для исследования влияния ядерного экстракта на скорость разрушения ДНК хроматина последний инкубировали в различных растворах в течение 1 часа при температуре 37° (табл. 1).

О степени разрушения ДНК хроматина судили по повышению концентрации кислоторастворимых нуклеотидов (⁶) или понижению концентрации ДНК (^{7, 8}). Результаты определений в достаточной мере совпадали. Поэтому мы большей частью пользовались лишь первым из упомянутых способов. Определения проводили до и после инкубации. Падение содержания ДНК выражали в процентах от ее исходной концентрации. Прирост концентрации свободных нуклеотидов выражали в условных единицах, представляющих собой отношение разности экстинкций, соответствующих концентрации нуклеотидов в конце и начале опыта, к экстинкции, соответствующей концентрации ДНК в растворе.

Для изучения химической природы ядерного фактора на ядерный экстракт действовали теплом (45, 50 и 55°), кристаллическим трипсином фирмы «СПОФА» (Чехославакия) (2 мг на 1 мл экстракта, инкубация 1 час. при 37°) и панкреатической РНКазой фирмы «Реанал», с активностью 40 ед. по Кунитцу (10 мкг на 1 мл экстракта, инкубация 15 мин. при 37°). Действие трипсина прекращали соевым ингибитором трипсина (фирма «Реанал»), а РНКазу из раствора удаляли с помощью аскангеля — разновидности бентотина, полученного из Института физической и

органической химии АН ГрузССР и обработанного в Институте биохимии растений АН ГрузССР (9).

В хроматине и ядерном экстракте определяли содержание ДНК (8), РНК (10) и белка (11). В 1 мл раствора хроматина в среднем содержится 147 ± 21 μ г ДНК, 23 ± 4 μ г РНК и 105 ± 12 μ г белка. В 1 мл ядерного экстракта в среднем содержится 7,6 мг белка, 213 μ г РНК. ДНК в экстракте нами не обнаружена. Содержание белка и РНК в ядерном экстракте печени и почки приблизительно одинаково.

Таблица 1

Сводные результаты исследования ядерного экстракта на скорость разрушения ДНК ДНКазой

Инкубационная смесь *	Прирост содержания свободных нуклеотидов в усл. ед.	Убыль ДНК, %
Хр. печ. 0,5 мл + Ц. печ. 0,5 мл + 0,14 М NaCl 0,5 мл	0,08+0,05	3,0
Хр. печ. 0,5 мл + ДНКазы 25 μ г (0,5 мл) + 0,14 М NaCl 0,5 мл	0,03+0,01	2,8
Хр. печ. 0,5 мл + Ц. печ. 0,5 мл + Яд. печ. 0,5 мл	0,46+0,07	26,5
Хр. печ. 0,5 мл + ДНКазы 25 μ г (0,5 мл) + Яд. печ. 0,5 мл	0,42+0,06	22,5
Хр. печ. 0,5 мл + 0,14 М NaCl 0,5 мл + Яд. печ. 0,5 мл	0,06+0,04	
Хр. печ. 0,5 мл + Ц. поч. 0,5 мл + Яд. печ. 0,5 мл	0,43+0,10	
Хр. печ. 0,5 мл + ДНКазы 25 μ г (0,5 мл) + Яд. печ., об. теп., 1,0 мл	0,09+0,03	
Хр. печ. 0,5 мл + ДНКазы 25 μ г (0,5 мл) + Яд. печ., об. тр., 1,0 мл	0,11+0,07	
Хр. печ. 0,5 мл + ДНКазы 25 μ г (0,5 мл) + Яд. печ., об. РНКазой, 1,0 мл	0,08+0,02	
Хр. печ. 0,5 мл + ДНКазы 25 μ г (0,5 мл) + Яд. печ., об. аск., 1,0 мл	0,53+0,13	
Хр. печ. 0,5 мл + ДНКазы 25 μ г (0,5 мл) + Яд. печ., об. теп., 0,5 мл + Яд. печ., об. РНКазой, 0,5 мл	0,45+0,05	
Хр. печ. 0,5 мл + ДНКазы 25 μ г (0,5 мл) + Яд. печ., об. тр., 0,5 мл + Яд. печ., об. РНКазой, 0,5 мл	0,50+0,07	
Хр. поч. 0,5 мл + ДНКазы 25 μ г (0,5 мл) + Яд. поч.	0,80+0,22	
Хр. поч. 0,5 мл + ДНКазы 25 μ г (0,5 мл) + Яд. печ.	0,03+0,01	

* Принятые сокращения: Хр. печ. — хроматин печени, Хр. поч. — хроматин почки, Яд. печ. — ядерный экстракт печени, Яд. поч. — ядерный экстракт почки, Ц. печ. — цитоплазматическая фракция печени, Ц. поч. — цитоплазматическая фракция почки, об. теп. — обработанный теплом, об. тр. — обработанный трипсином, об. аск. — обработанный аскарином.

Каждый вариант опыта проводился не менее 5 раз. При этом в качестве контроля всегда ставился опыт — хроматин + ДНКазы (или цитоплазматическая фракция) + ядерный экстракт, а также контроль, в котором ядерный экстракт заменяли 0,14 М NaCl.

Из табл. 1 видно, что ни в одном из использованных инкубационных растворов в отсутствие ядерного экстракта не происходит сколько-нибудь ощутимого распада ДНК хроматина до кислоторастворимых продуктов. С другой стороны, ядерный экстракт сам по себе не вызывает ускорения разрушения ДНК хроматина. Разрушение ДНК хроматина заметно ускоряется, если в инкубационной среде одновременно находятся гомологичный по отношению к хроматину ядерный экстракт и ДНКазы или цитоплазматическая фракция гомогената. При этом безразлично, будет ли цитоплазматическая фракция гомологична по отношению к хроматину или нет. В то же время негомологичный ядерный экстракт не ускоряет разрушения ДНК хроматина, что свидетельствует о хорошо выраженной тканеспецифичности ядерного экстракта. Все сказанное в одинаковой мере относится к хроматину и ядерному экстракту как печени, так и почки.

Следует отметить, что применяемая нами панкреатическая ДНКазы фирмы «Сигма», с активностью 2 000 ед. Кунитца, в течение 1 часа при 37° вызывала значительное расщепление эритроцитарной ДНК фирмы

«Реанал», в то время как ядерный экстракт не обладал ДНКазной активностью.

Поскольку цитоплазматическая фракция и ДНКазы действуют на хроматин одинаково, разрушая ДНК хроматина в присутствии ядерного экстракта, а действие цитоплазматической фракции лишено тканеспецифичности, мы заключили, что действие цитоплазмы следует приписать нуклеазам. Нам удалось установить, что ДНК, входящая в хроматин, недоступна для ДНКаз, а ядра клеток содержат фактор, делающий ДНК хроматина доступной для их действия.

Разрушение ДНК хроматина при воздействии ядерного экстракта не зависит от pH среды в пределах pH 6,8—7,15.

Как видно из табл. 1, ядерный экстракт инактивируется, если поддержать его при 55° даже в течение 5 мин. Добавление такого экстракта к раствору ДНКазы уже не ускоряет разрушения ДНК хроматина. Между тем выдерживание ядерного экстракта при 45 и 50° в течение 15 мин. не лишает его активности. Ядерный экстракт, в котором белки были разрушены трипсином, также не ускорял разрушения ДНК хроматина. Его активность исчезает также и вследствие обработки РНКазой. Аскангель, при помощи которого РНКазы удалялись из экстракта, сам по себе не вызывает уменьшения активности ядерного экстракта. Если экстракт, инактивированный теплом или трипсином, соединить с ядерным экстрактом, обработанным РНКазой, его активность восстанавливается.

Из полученных нами результатов следует, что роль ядерного экстракта — способствовать разрушению ДНК хроматина ДНКазой — связана, с одной стороны, с белками, а с другой стороны, с РНК. Этот факт, а также тканеспецифичность действия ядерного экстракта и отсутствие в нем ДНКазной активности указывают на то, что активное начало не представляет собой какой-либо из известных ДНКаз.

Институт экспериментальной морфологии
Академии наук ГрузССР
Тбилиси

Поступило
18 XII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. Д. Туманишвили, Н. В. Саламатина, В сборн. Вопр. биофизики и теоретической биологии, в. 2, Тбилиси, 1969, стр. 89. ² G. D. Tumanishvili, L. K. Verkvadze, N. V. Salamatina, Ann. Embryol. Morphogen. Suppl. 1, 275 (1969). ³ К. М. Джаидиери, Г. Д. Туманишвили, В сборн. Вопр. биофизики и теоретической биологии, в. 3, Тбилиси, стр. 45. ⁴ M. B. Dingman, M. B. Sporn, J. Biol. Chem., 239, 10, 3483 (1964). ⁵ J. Berthet, C. D. de Duve, Biochem. J., 50, 1, 174 (1951). ⁶ А. С. Спирин, Биохимия, 23, 5, 656 (1958). ⁷ Р. Г. Цанев, Г. Г. Марков, Биохимия, 25, 1, 151 (1960). ⁸ Ц. Дише, Нуклеиновые кислоты, 1957, стр. 426. ⁹ Д. И. Джохадзе, Сообщ. АН ГрузССР, 42, № 3, 621 (1966). ¹⁰ D. H. Lowry, N. J. Rosebough, R. J. Randal, J. Biol. Chem., 193, 265 (1953).