

УДК 547.963:612.398.145

© Коллектив авторов

ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ НУКЛЕОПРОТЕИНОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ

И.Ю. РЯДНОВА, Л.К. ШАТАЕВА, В.Х. ХАВИНСОН*

Институт высокомолекулярных соединений РАН, 199004, Санкт-Петербург,
Большой проспект ВО, д. 31 факс: 230-00-49, e-mail: riadnova@imc.macro.ru

* Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии 197110, Санкт-Петербург, проспект Динамо, д. 3., тел/факс: 230-00-49

Разработан лабораторный метод выделения нативных нуклеопротеиновых комплексов (НПК) из коры головного мозга, тимуса и печени крупного рогатого скота и проведена оценка их компонентного состава. Методами гель-хроматографии охарактеризованы молекулярные массы полученных комплексов. Ионообменная хроматография использована для выделения групп белков и пептидов, различающихся электрохимическими свойствами. На примере препаратов из коры головного мозга и печени показано, что природные НПК обладают тканеспецифическим стимулирующим действием.

Ключевые слова: нуклеопротеиновые комплексы, компонентный состав, тканеспецифическая активность

ВВЕДЕНИЕ. В последние годы все большее внимание исследователей привлекает поиск новых веществ, которые позволяют направленно корректировать функциональную активность клеток. В медицинском аспекте этой проблемы целью является восстановление органов и тканей организма на клеточном уровне при их радиационном поражении или геронтологической дисфункции. В настоящее время в качестве таких препаратов, корректирующих клеточный цикл, используют различного рода экстракты из тканей животных, содержащие биорегуляторы белковой природы [1,2].

Известно, что в постоянно функционирующих органах высших организмов в состоянии митотического равновесия оптимальное соотношение между делящимися, функционирующими и отмирающими клетками поддерживается группой белков-регуляторов, связанных с ДНК [3]. Из некоторых тканевых экстрактов путем многоступенчатой очистки были выделены белковые компоненты хромосом - гистоны и кейлоны [4]. Они являются специфическими эндогенными регуляторами как деления клеток, так и их последующей

дифференциации. Гистоны - основные белки, содержащие большое количество аргинина и лизина. Они обладают тканеспецифической, но не видоспецифической активностью и образуют прочные комплексы друг с другом и с ДНК. Кейлоны - кислые белки кислой природы, в структуре которых содержится много глутаминовых и аспарагиновых остатков. Эти белки ингибируют неограниченное деление клеток [4]. Однако, использование таких регуляторных веществ для коррекции цикла клеточного развития при решении медицинских и геронто-логических задач не было успешным из-за короткого времени жизни этих белков в плазме крови и цитоплазме, когда их вводили туда в очищенном виде [5].

Существует способ пролонгирования действия белка и его целенаправленного транспорта в организме путем включения его в интерполимерный комплекс, при этом наиболее надежными носителями являются линейные полиэлектролиты [6]. Нуклеиновые кислоты (НК) - ДНК и РНК - относятся к группе сильных линейных полиэлектролитов, которые несут постоянный отрицательный заряд на фосфатных группах и образуют прочные комплексы с белковыми макромолекулами. Связь между компонентами в этих комплексах определяется системой электростатических взаимодействий между заряженными боковыми группами белков и нуклеиновых кислот. Участие ДНК в структуре интерполимерного комплекса защищает ее от расщепления клеточными нуклеазами, а белок, в свою очередь, защищен от действия протеиназ [7]. Это определяет перспективы использования подобных нуклеопротеиновых комплексов (НПК) в качестве тканеспецифических эндогенных регуляторов.

В данной работе мы выделяли и исследовали препараты НПК из коры головного мозга, из тимуса и из печени крупного рогатого скота, с целью определения основных компонентов, входящих в состав и определения наличия биологической активности.

МЕТОДИКА. Выделение НПК из коры головного мозга, из тимуса и из печени проводили по аналогии с методом, используемым экспериментальным производством Медико-биологического центра Института биорегуляции и геронтологии [8]. Замороженную ткань измельчали и проводили экстракцию 0,1 н раствором тринатрийфосфата при рН 11,6 в течение 3 часов на холоду при перемешивании. Соотношение «ткань : экстрагент» равнялось 1 : 8 по весу. Затем экстракт отделяли центрифугированием, подкисляли уксусной кислотой до рН 4,4 и оставляли на холоду на сутки. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, промывали ацетоном и высушивали. Заготовка сырья для получения НПК включает в себя этап быстрого и глубокого замораживания ткани, что приводит к частичному разрушению клеточных мембран. При размораживании гликолипидные компоненты мембран присоединяются к белковым комплексам и в дальнейшем снижают растворимость препаратов НПК. Так как хлороформ является универсальным растворителем для всех классов липидов (лецитинов, цефалинов и сфингомиелинов), то для делипидизации препаратов использовали трехкратную исчерпывающую экстракцию хлороформом [9].

После делипидизации определяли растворимость исходного и делипидизированного препаратов при различных рН внешнего раствора. Для этого к суспензии препарата в 0,1 н растворе хлористого натрия добавляли

определенное количество натриевой щелочи и после перемешивания в течение суток измеряли рН раствора, концентрацию белка в растворе (по методу Лоури) и оптическую плотность раствора при длинах волн 260 и 280 нм. Содержание нуклеиновых кислот определяли по спектральным характеристикам. На всех последующих этапах работы для получения растворов НПК использовали только делипидизированные препараты; их растворение проводили 0,1 н щелочью с последующим подкислением.

Для оценки молекулярных масс комплексов, входящих в состав препаратов использовали гель-хроматографию на Сефадексах G-50 (колонка 1,8 x 40 см) и G-150 (колонка 1,8 x 60 см) в 0,1 М фосфатном буфере рН 8,2 с добавлением хлористого натрия до ионной силы раствора 0,3 М. Для калибровки гель-хроматографических колонок использовали сывороточный альбумин, трипсиноген, натриевую соль цитидин 2'-3'-цикло фосфата, производства фирмы Reanal (Венгрия) и натриевую соль ДНК из селезенки крупного рогатого скота производства НПО «Химреактив» Олайнского завода химреактивов.

Энзиматический гидролиз препаратов НПК проводили ДНКазой при соотношении фермент : субстрат 1:10 по сухому весу при температуре 37°C в течение 4 часов в буферном растворе при рН 8,2. Смесь после гидролиза фракционировали на той же колонке с Сефадексом G-150, что и исходные препараты для оценки глубины гидролиза. Определяли содержание белка в НПК и его фракциях методом Лоури.

Для отделения белковых компонентов, входящих в состав комплексов, использовали ионообменную хроматографию на карбоксильном катионите КМТ. Колонку с сорбентом переводили в водородную форму слабым раствором соляной кислоты, затем отмывали водой до нейтральных значений рН. Раствор НПК при рН 6,0 пропускали через ионообменную колонку со скоростью 60 мл/ч. При этом свободные нуклеиновые кислоты проходят не задерживаясь, так как имеют одинаковый отрицательный заряд с матрицей сорбента. После окончания сорбции и промывки проводили элюцию фосфатными буферами в градиенте 0,2 М NaH_2PO_4 - Na_3PO_4 . На выходе из колонки собирали фракции, в которых измеряли рН, оптическую плотность и содержание белка.

В качестве тест-объекта для оценки биологической активности и тканеспецифичности препаратов НПК из коры головного мозга и печени использовали культуру спинномозговых ганглиев цыплят [10]. Интенсивность роста оценивали по индексу площади (ИП) зоны роста при культивировании нейронов в течении 3 и 7 суток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Основные биохимические компоненты нуклеопротеиновых комплексов из коры головного мозга, из тимуса и из печени приведены в таблице 1. Видно, что в зависимости от типа ткани, из которой выделен НПК, в препаратах содержится разное количество белков и липидов. Содержание нуклеиновых кислот практически одинаково во всех препаратах в связи с тем, что клетки всех тканей содержат практически одинаковый набор нуклеиновых кислот. В то же время значительно большее содержание сиаловых кислот в препаратах коры головного мозга объясняется, по-видимому, их биологической ролью в передаче нервного импульса [11].

Изучение растворимости препаратов НПК коры головного мозга, тимуса и печени в 0,1 н растворе хлористого натрия обнаружило, что исходные и делипидизированные препараты обладают минимальной растворимостью в

области рН 5,5 – 6,0. Как видно из рисунка 1, добавление щелочи постепенно повышает растворимость НПК и при достижении рН 10,8 – 11,0 происходит максимальное растворение препаратов, т.е. для этого на 1 г НПК требуется добавить 2 мг-экв ионов натрия.

Таблица 1. Основные биохимические компоненты нуклеопротеиновых комплексов, выделенных из коры головного мозга, тимуса и печени крупного рогатого скота (величины выражены в весовых процентах).

Ткань	Липиды (до делипидизации)	Белок (после делипидизации)	Нуклеиновые кислоты, (после д/л)	Сиаловые кислоты (после д/л) Свободные / Связанные
Кора головного мозга	23,0	50	20	4,8 / 6,0
Тимус	12,3	75,2	19	0,46 / 0,52
Печень	9	54,3	18	0,16 / 0,41

Примечание. Использование стандартных белков и ДНК для калибровок приводит к существенной погрешности при анализе нестандартных смесей и комплексов, содержащих пептиды с пониженным содержанием ароматических аминокислот

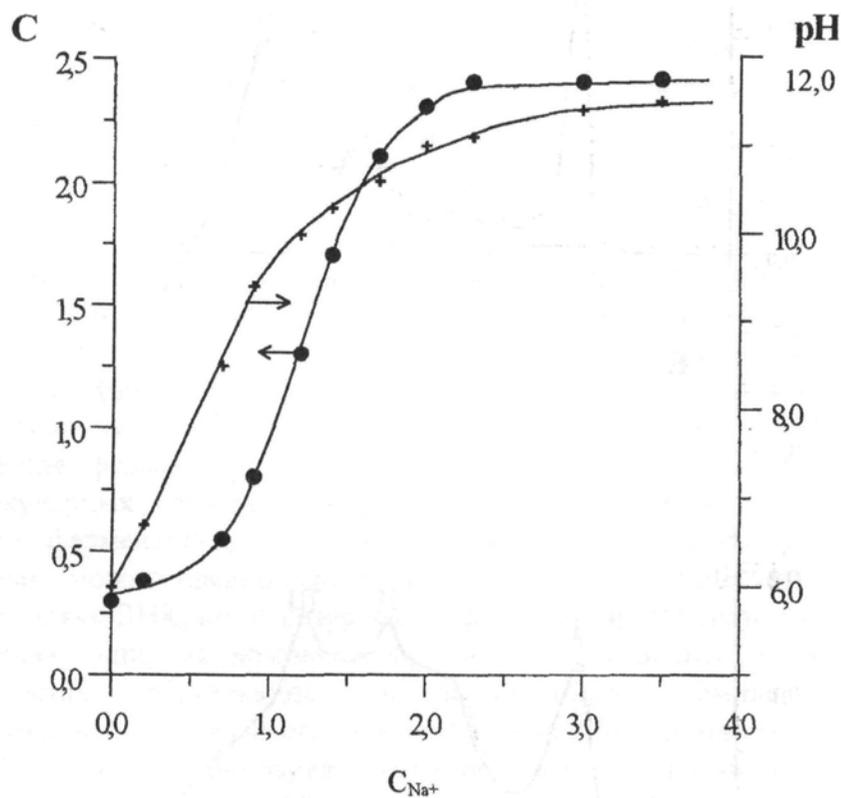


Рисунок 1.

Растворимость нуклеопротеинового комплекса коры головного мозга при добавлении натриевой щелочи. С - концентрация белка (мг·мл⁻¹); C_{Na+} - количество добавленной щелочи (мг-экв/г); pH - pH раствора.

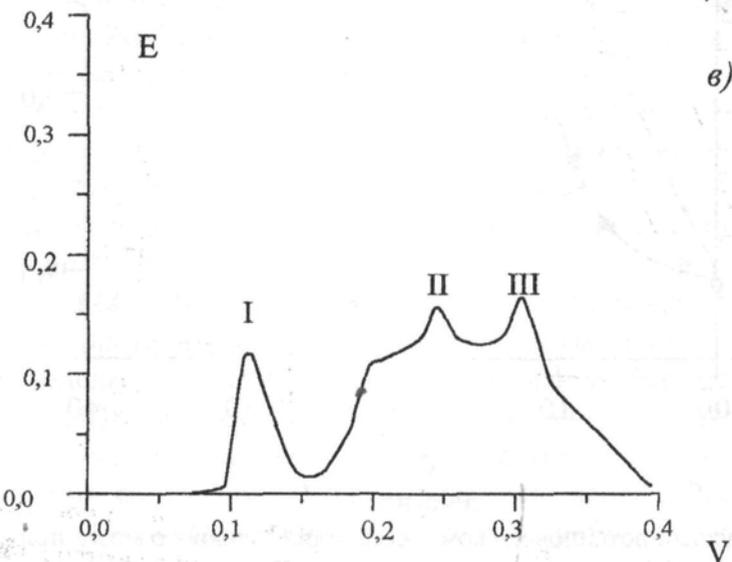
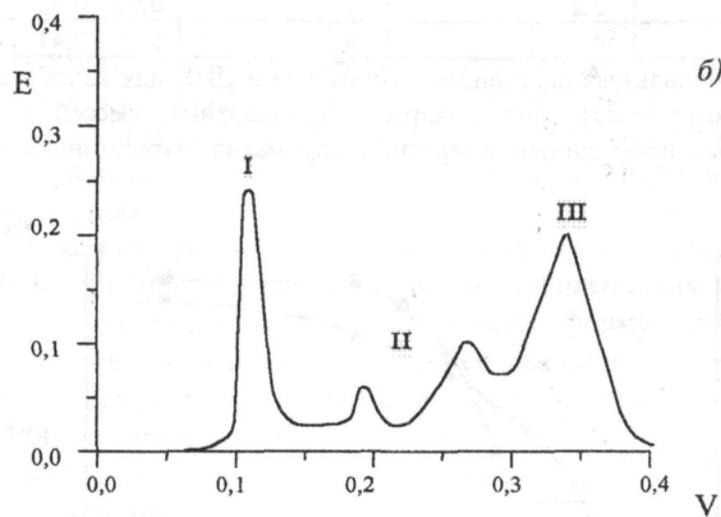
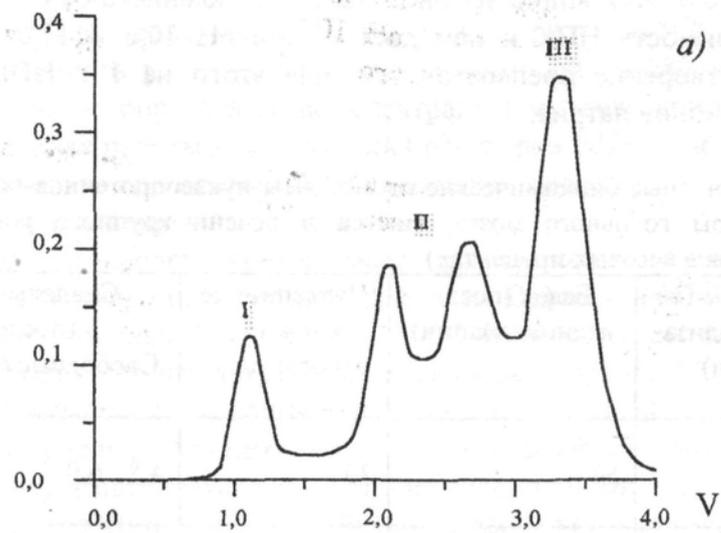


Рисунок 2.

Гель-хроматография растворов препаратов, выделенных из: а) - коры головного мозга, б) - тимуса, в) - печени крупного рогатого скота. V - относительный объем выхода (отношение объема выхода пробы к объему задержки); E - оптическая плотность растворов при длине волны 260 нм (ЕОП).

Присутствие гликолипидных компонентов в препаратах комплексов затрудняет их растворимость. Делипидизация увеличивает вдвое растворимость НПК и улучшает качество гель-хроматографического разделения их фракций. На рисунке 2 представлены гель-хроматографические выходные кривые препаратов. Все растворы НПК, как и фракции полученные после гель-хроматографии, имеют более высокую оптическую плотность при длине волны 260 нм, чем при длине волны 280 нм, что свидетельствует о присутствии нуклеиновых кислот и их фрагментов во всех фракциях. Анализ гель-хроматографических кривых показывает, что все препараты содержат высоко-, средне- и низкомолекулярные фракции. В таблице 2 приведены данные, полученные для молекулярно-массового распределения компонентов препаратов. Видно, что все НПК имеют примерно одинаковый порядок молекулярных масс компонентов в пиках выходных кривых. Величина молекулярной массы зависит от типа ткани. Высокое соотношение белок/нуклеиновая кислота в высокомолекулярной фракции препарата коры головного мозга, вероятно, обусловлено образованием интерполимерного комплекса нуклеиновой кислоты со специфическими мозговыми белками, обладающими высокой селективностью связывания с ДНК.

Таблица 2. Молекулярно-массовое и количественное содержание компонентов фракций препаратов коры головного мозга, тимуса и печени крупного рогатого скота.

Ткань	I Мм, кДа	II Мм, кДа	III Мм, кДа	Соотношение белок/НК в ВМФ
Кора головного мозга	>150	40	8,0	25,6
Тимус	>150	40	15,8	6,0
Печень	>150	15	5,0	13,7

На рисунке 3 представлены выходные гель-хроматографические кривые для препарата коры головного мозга до и после энзиматического гидролиза. Делипидизированный препарат имеет сложное распределение по молекулярным массам с основными пиками в области 150 и более, 40 и 5 кДа. Обработка ДНКазой приводит к более четкому разделению компонентов по молекулярным массам. После ферментной обработки не появляется дополнительного пика низкомолекулярных компонентов. Оценка содержания белка показывает, что даже после ферментативной обработки в первом пике содержится белок, следовательно можно предположить, что панкреатическая ДНКаза гидролизует линейные участки ДНК, но не разрушает межмолекулярные связи между белками и ДНК, отвечающие за комплексообразование. Из общих представлений о закономерностях образования интерполимерных комплексов можно предположить, что эти связи основаны на ион-ионном притяжении фосфатных групп ДНК с положительно заряженными боковыми группами белка. Тот факт, что элементарные структуры НПК сохраняются при воздействии панкреатических ферментов, является определенным аргументом в пользу перспективы использования НПК для пероральных форм кишечнорастворимых диетических дополнений при коррекции возрастных изменений функций отдельных органов и тканей.

Хроматографию белковых компонентов на КМТ проводили в градиенте рН от 6,0 до 11,0 растворами фосфатных буферов. На рисунке 4 представлена

выходная кривая десорбции препарата коры головного мозга. Первый пик десорбируется при 6,5, что позволяет предполагать присутствие в нем кислых

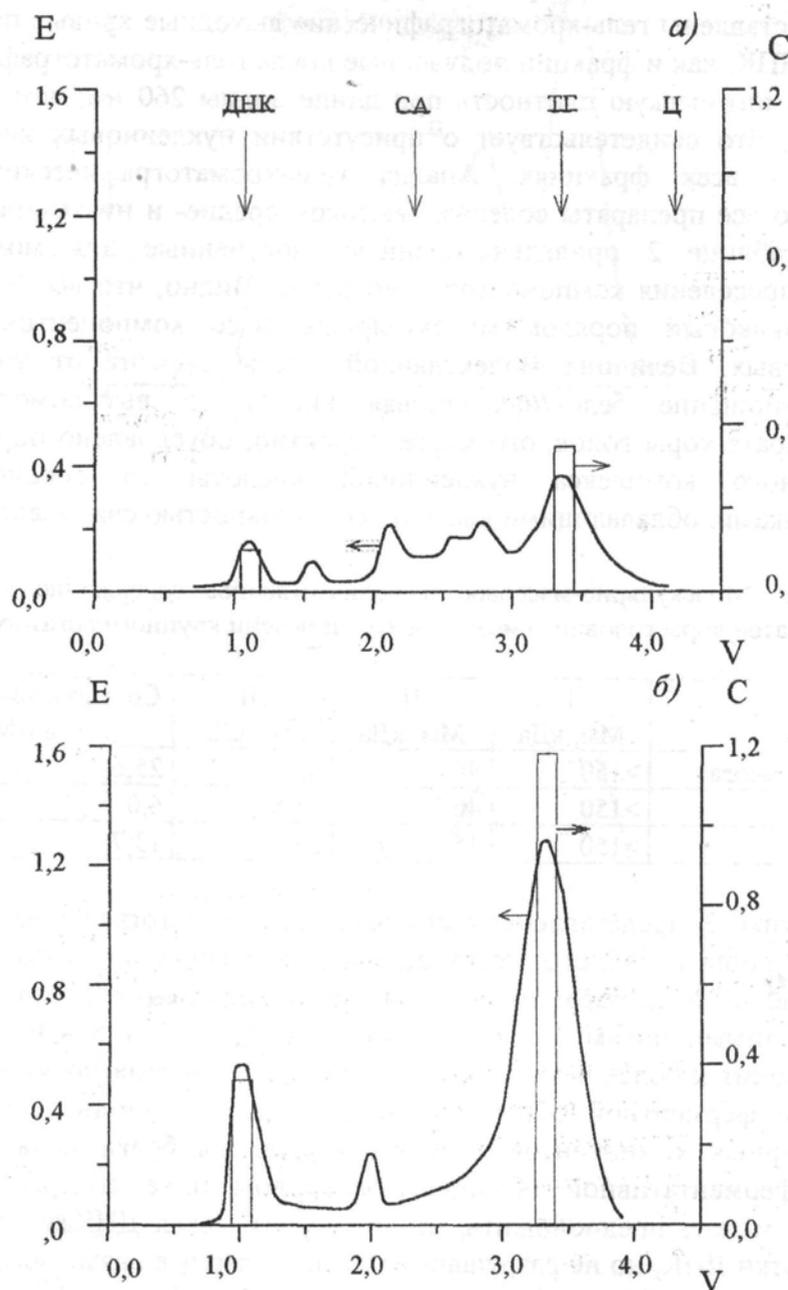


Рисунок 3.

Гель-хроматография растворов препаратов, выделенных из коры головного мозга:
 а) - делипидизированного, б) - после обработки ДНКазой. Стрелками обозначены относительные объемы выхода калибровочных веществ: ДНК тимуса телят (ДНК), сывороточный альбумин (СА), трипсиноген (ТГ) и цитидин 2'-3' циклофосфат (Ц).

V – относительный объем выхода (отношение объема выхода пробы к объему задержки);

E – оптическая плотность растворов при длине волны 260 нм (ЕОП).

C - концентрация белка ($\text{мг}\cdot\text{мл}^{-1}$);

ядерных белков, относящихся к классу кейлонов и нейростимулинов [12]. Второй пик, выходящий в щелочной области, содержит щелочные белки и пептиды, к

которым относятся не только ядерные гистоны, но и компоненты класса цитомединов [13]. Таким образом, можно предположить, что условия разрушения клетки и клеточного ядра на стадии получения препаратов позволяют сохранить устойчивые элементы внутриядерных структур, в частности элементы нуклеосом [14].

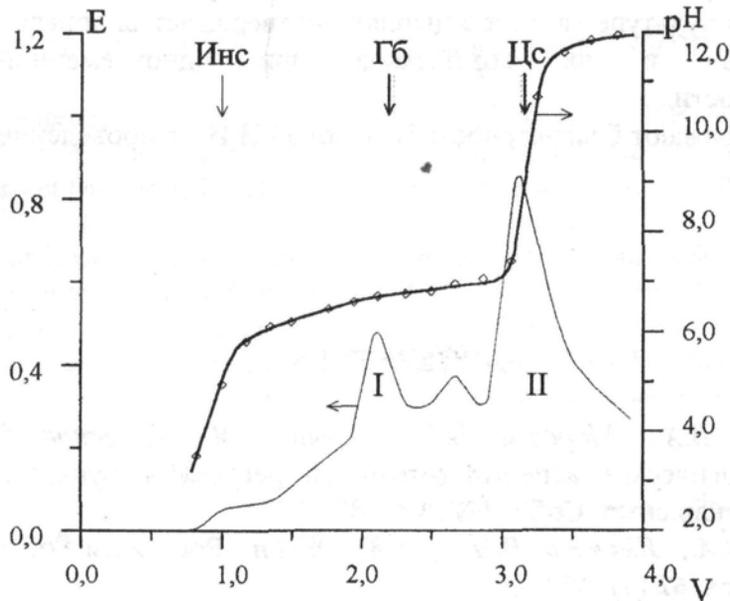


Рисунок 4.

Ионообменная хроматография НПК мозга на карбоксильном катионите КМТ в градиенте 0,2 М буферной системы $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_3\text{PO}_4$. Стрелками обозначены объемы десорбции калибровочных белков: инсулин (Инс), гемоглобин (Гб), цитохром С (Цс) в тех же условиях. V - относительный объем выхода (отношение объема выхода пробы к свободному объему колонки); E - оптическая плотность растворов при длине волны 280 нм (ЕОП). pH - pH раствора.

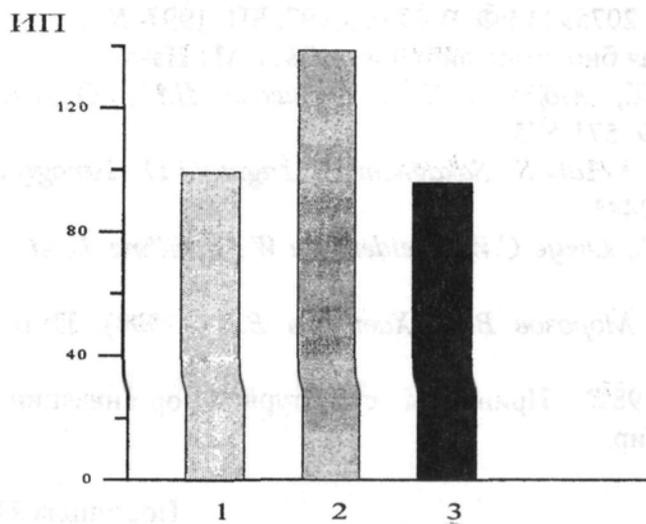


Рисунок 5.

Влияние нуклеопротеиновых комплексов (НПК) на рост нейритов в культуре ткани спинномозговых ганглиев цыплят: 1 - контроль; 2 - НПК коры головного мозга; 3 - НПК печени крупного рогатого скота. ИП - индекс площади (%).

На рисунке 5 представлены результаты биотестирования НПК мозга и печени в культуре спинномозговых ганглиев цыплят. Известно [10], что чувствительные нейроны этих ганглиев отвечают усилением роста нейритов на введение в культуру наномолярных концентраций нейротрофических факторов. На рисунке видно, что при добавлении НПК печени в культуру не происходило увеличения зоны роста нейритов. Стимулирующий эффект НПК мозга крупного рогатого скота в культуре ганглиев цыплят подтверждает видонеспецифичность ядерных белков и их комплексов при одновременной высокой тканеспецифичности.

Авторы выражают благодарность Чалисовой Н.И. за проведение биотеста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г., Серый С.В., Кузнецов С.В. (1996). Геронтологические аспекты пептидной регуляции функций организма. Тез. междунар. симп. Спб.: Наука. 86-87.
2. Ямсков И.А., Ямскова В.П. (1998). Журн. Рос. Хим. об-ва им. Д.И. Менделеева, **62**(3), 85-90.
3. Bullough W.S. (1975). Biol. Revue., **50**, 99-127.
4. Chalons. (1976). Ed. J.C.Houck. Amsterdam: North-Holland Publ.Co.
5. Балаж А., Блажек И. (1982). Эндогенные ингибиторы клеточной пролиферации. М.: Мир.
6. Кабанов В.А. (1994). Высокомолекуляр. соединения, **36**, (2), 183.
7. Кабанов А.В., Кабанов В.А. (1994). Высокомолекуляр. соединения. **36**, (2), 198-211.
8. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Способ получения белковой пищевой добавки. Пат. 2075944 РФ от 27.03.1997. БИ. 1997. № 9.
9. Препаративная биохимия липидов. (1981). М.: Наука.
10. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г., Чалисова Н.И., Окулов В.Б. (1997). Цитология. **39**, 571-575.
11. Nishimura M., Kozaki S., Sakaguchi G., Yagasaki O., Yanagiya I. (1984). Life Sci, **35**, 2435-2441.
12. Andreasen T.Y., Luetje C.W., Heidemann W., Schilling J., et. al. (1987). Cell, **48**, 785-791.
13. Кузник Б.И., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. (1998). Цитомедины. Спб.: Наука.
14. Зенгер В. (1987). Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир.

Поступила 21.09.00.

TISSUE-SPECIFIC NUCLEOPROTEIN COMPLEXES

I.Y. RIADNOVA, L.K. SHATAEVA, V.KH. KHAVINSON*

Institute of Macromolecular Compounds Russ. Acad. Sci. Bolshoi pr. 31, 199004 St.-Petersburg, Russia, fax: 230-00-49; Institute of Bioregulation and Gerontology Russ. Acad. Med. Sci.

Prospect Dinamo 3, 197110 St.-Petersburg, Russia, fax: 230-00-49

A method of isolation of native nucleoprotein complexes from cattle cerebral cortex, thymus, and liver was developed. Compositions of these complexes were studied by means of gel-chromatography and ion-exchange chromatography. These preparations were shown to consist of several fractions of proteins and their complexes differ by molecular mass and electro-chemical properties. Native nucleoprotein complexes revealed high tissue specific activity, which was not species-specific.

Key words: nucleoprotein complexes, component composition, gel-chromatography, ganglio - specific activity