

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 pH 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 pH 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 pH 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 pH 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 pH 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 pH 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 pH. Раствор НПК при pH 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  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  -  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ . На выходе из колонки собирали фракции, в которых измеряли pH, 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 одинаковых 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 pH 5,5 – 6,0. Как видно из рисунка 1, добавление щелочи постепенно повышает растворимость НПК и при достижении pH 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

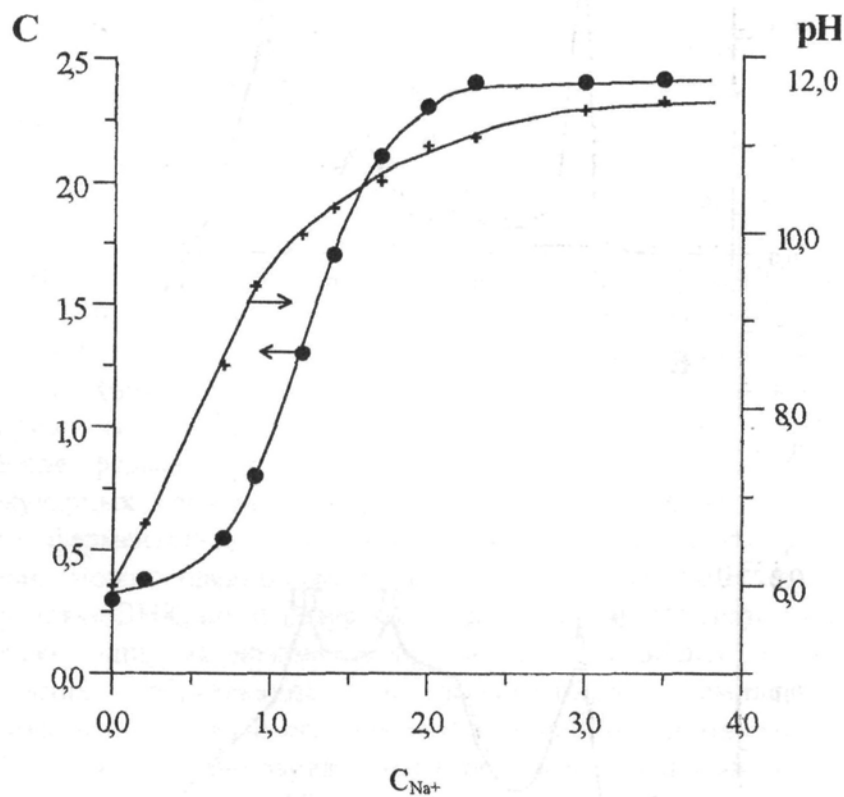


Рисунок 1.

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

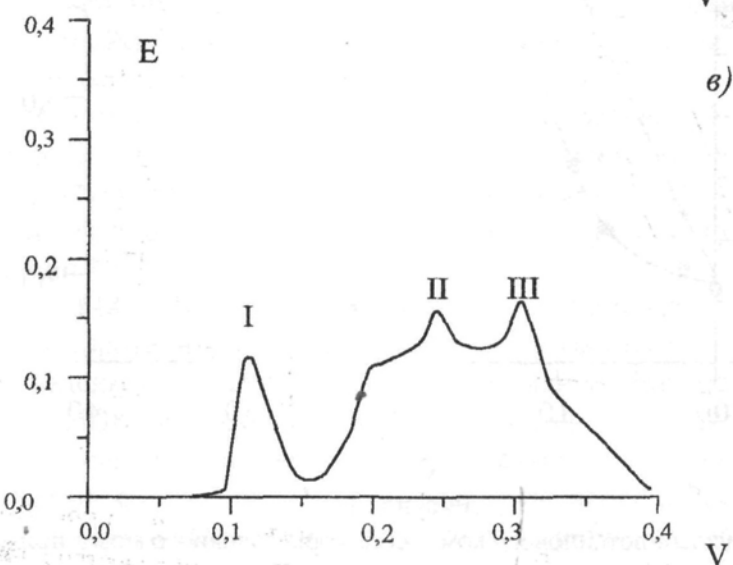
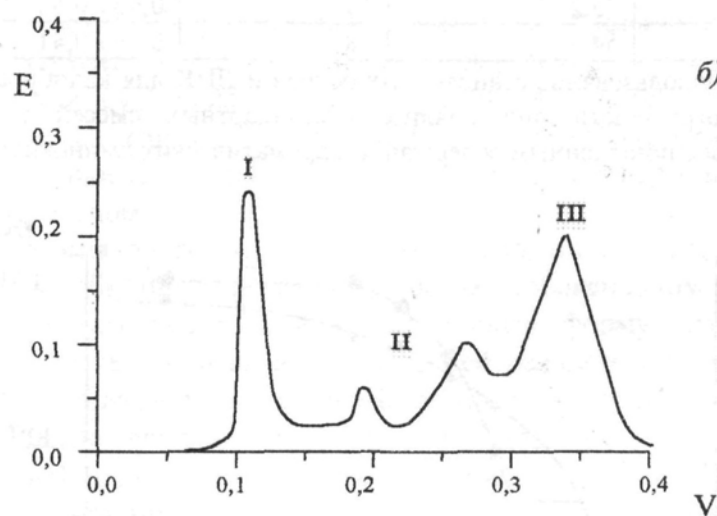
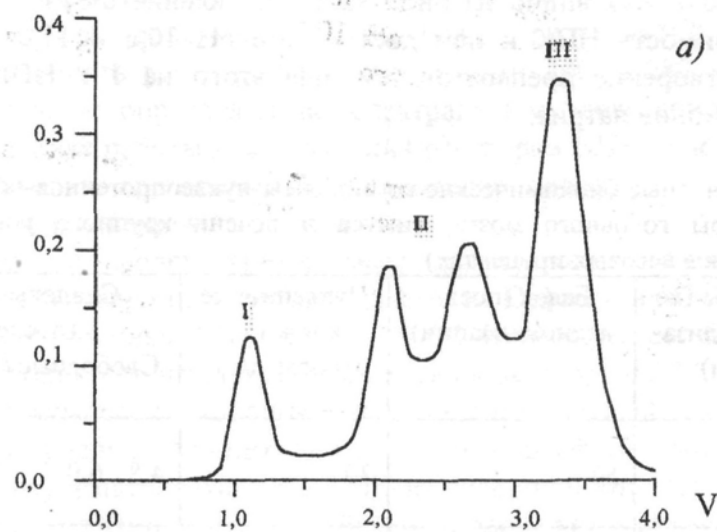


Рисунок 2.

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

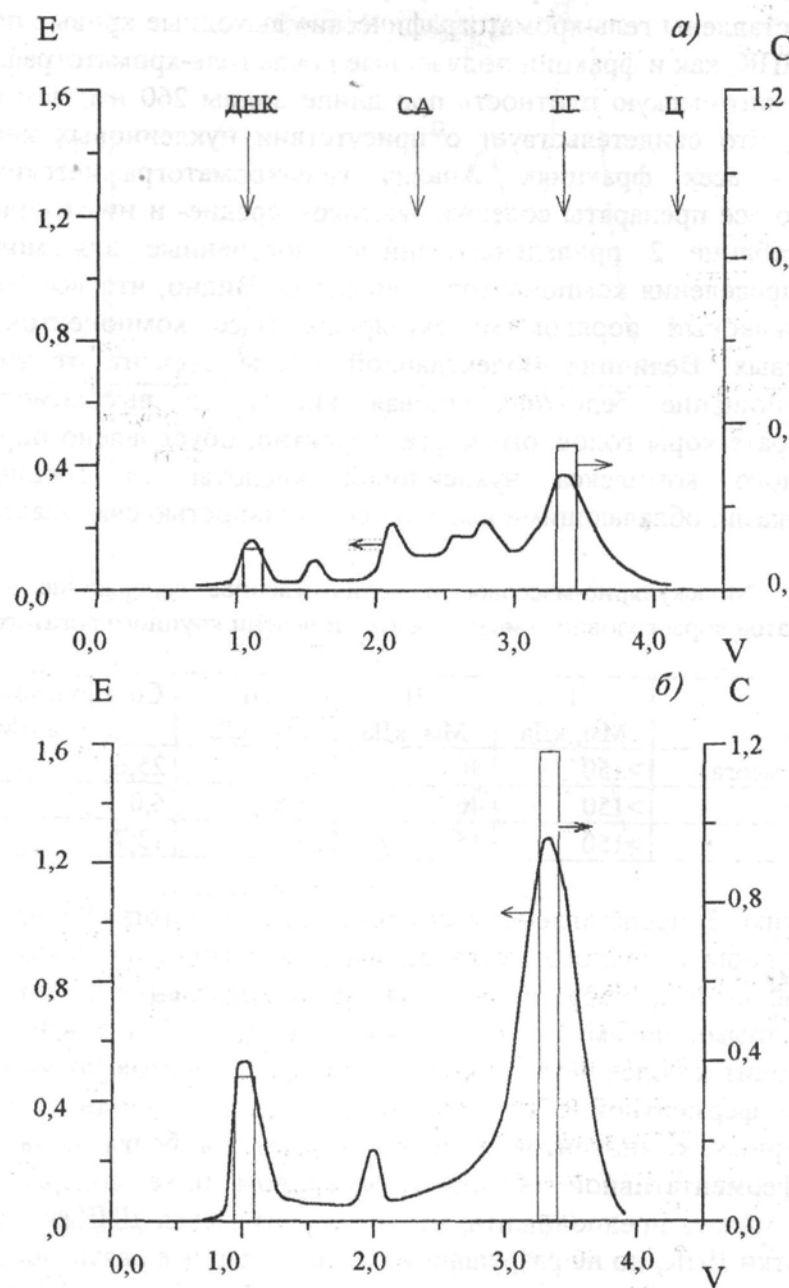


Рисунок 3.

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 (мг·мл<sup>-1</sup>);

ядерных белков, относящихся к классу кейлонов и нейростимулинов [12]. Вторым 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].

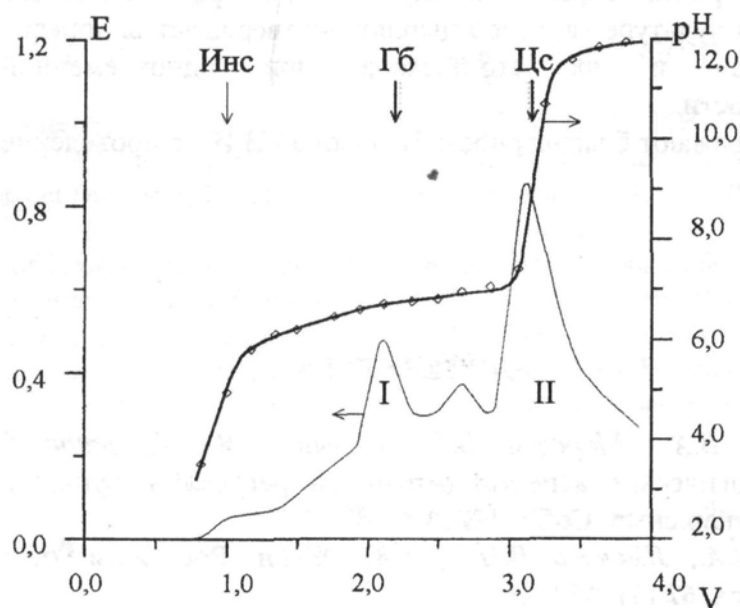


Рисунок 4.

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.

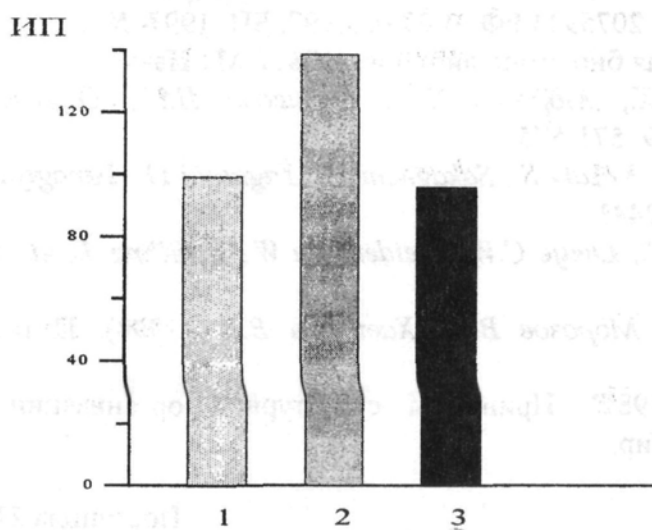


Рисунок 5.

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. Andreassen 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