

DIMERIZATION OF ECODAM-METHYLASE INDUCED BY THE OLIGONUCLEOTIDE SUBSTRATE

N. I. Rechkunova, V. V. Zinoviev, E. G. Malygin, Yu. A. Gorbunov, S. G. Popov, V. F. Nesterenko, Ya. I. Buriyanov

All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo, Novosibirsk Region
Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region

Summary

The Ecodam-methylase has been investigated for its interaction with the 20-base oligonucleotide duplex containing the enzyme recognition site. An increase of the enzyme molecular weight was detected by the gel-filtration and sucrose density gradient centrifugation methods. The maximal value of the molecular complex weight was observed when concentrations of the enzyme and the substrate were equal. The results obtained prove the formation of the dimeric enzyme form in the substrate presence.

1. Действие ДНК-метилазы Ecodam на одностранные последовательности и синтетические олигонуклеотиды / В. В. Зинovieв, Ю. А. Горбунов, С. Г. Попов и др. // Молекуляр. биология.— 1985.—19, № 4.— С. 947—953.
2. Herman G. E., Modrich P. Escherichia coli dam methylase. Physical and catalytic properties of the homogeneous enzyme // J. Biol. Chem.— 1982.—257, N 5.— P. 2605—2612.
3. Brooks J. E., Blumenthal E. M., Gingeras T. R. The isolation and characterization of the Escherichia coli DNA adenine methylase (dam) gene // Nucl. Acids Res.— 1983.—11, N 3.— P. 837—851.
4. Исследование стехиометрии комплексов при взаимодействии Ecodam-метилазы с субстратами методом малоуглового рентгеновского рассеяния / В. В. Зинovieв, Ф. В. Тузиков, Э. Г. Малыгин и др. // Конформационные изменения биополимеров в растворах: Материалы VI симпозиума. (Тбилиси, 20—22 ноября 1985 г.)— Тбилиси, 1985.— С. 56.
5. Бурьянов Я. И., Захарченко В. Н., Баев А. А. Выделение, очистка и некоторые свойства адениновой ДНК-метилазы Ecodam // Докл. АН СССР.— 1981.—259, № 6.— С. 1492—1495.
6. Hirose T., Grea R., Itakura K. Rapid synthesis of triphosphorylated nucleotide blocks // Tetrahedron Lett.— 1978.— N 28.— P. 2449—2452.
7. Martin R. G., Ames B. N. A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures // J. Biol. Chem.— 1961.—236, N 5.— P. 1372—1379.
8. Siegel L. M., Monty K. G. Determination of molecular weights and fractional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation // Biochim. et biophys. acta.— 1966.—112, N 2.— P. 346—362.

ВНИИ молекуляр. биологии, Кольцово Новосибир. обл.
Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР,
Пушино Москов. обл.

Получено 10.09.86

УДК 576.315.42+577.175.642

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ АДФ-РИБОЗИЛИРОВАНИЯ В ХРОМАТИНЕ МОЗГА КРОЛИКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭСТРАДИОЛА

Г. А. Паносян, Э. Г. Саркисян, Э. С. Геворкян, Л. В. Карабашян

Известно, что ряд внутриядерных процессов зависит от степени АДФ-рибозилирования ядерных белков [1—3]. Несмотря на возрастающий интерес исследователей к этой посттрансляционной модификации белков, ее роль в осуществлении основных функций ядра остается неясной. Идентификация АДФ-рибозилированных белков, определение уровня их модификации при различных функциональных состояниях клетки является необходимым для понимания физиологического значения этого процесса. Изменение степени АДФ-рибозилирования ядерных белков может сказаться на суперструктуре хроматина и привести к изменению уровня его транскрибируемости. В этом аспекте возможная взаимосвязь между уровнем АДФ-рибозилирования белков хроматина и процессом гормональной активации генома представляется весьма вероятной.

Хорошо известно, что стероидные гормоны, в частности эстрогены, способны индуцировать биосинтетические процессы в тканях-мишенях, в том числе в клетках головного мозга [4, 5].

В настоящем сообщении приводятся данные о стимулированном эстрадиолом изменении активности (АДФ-рибоза)полимеразы (КФ 2.4.2.30) хроматина клеток головного мозга кролика.

В эксперименте использовали 1,5-месячных самок кроликов. Контрольным животным вводили пропиленгликоль, опытным кроликам инъецировали эстрадиол-17 В («Sigma», США) в пропиленгликоле в концентрации 10 мкг на 100 г массы животного. Актиномицин Д вводили в концентрации 100 мкг на 1 кг массы животного за 1 ч до введения гормона. Хроматин из цельного мозга кроликов выделяли по методу, описанному в [6]. УФ-спектр хроматина снимали в 3 М растворе NaCl на спектрофотометре Spexord UVVIS (ГДР). Концентрации белка и ДНК определяли по [7]. Уровень АДФ-рибозилирования белков хроматина определяли в его тотальной фракции по [8]. Реакционная смесь объемом 0,25 мл содержала 100 мМ трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреитол, хроматин мозга (200 мкг по белку) и 0,02 мМ ¹⁴С-НАД с удельной радиоактивностью 9,6 ГБк/нмоль («Amersham», Англия). Реакцию проводили в течение 5 мин при 25 °С и останавливали добавлением 1 мл холодной 20 %-ной ТХУ, одновременно перенося пробы в лед. Белки осаждали на нитроцеллюлозных фильтрах («Suprog», ЧССР). Фильтры промывали 3 мл 10 мМ НАД, затем 20 %- и 5 %-ной ТХУ соответственно. Фильтры высушивали, измеряли радиоактивность в толуоловом сцинтиллаторе на счетчике SL-4221 (Франция). За активность фермента — (АДФ-рибоза)полимеразы было принято количество НАД, включенного в кислотонерастворимую фракцию, в пересчете на 1 мг белка в 1 мин.

О наличии активности (АДФ-рибоза)полимеразы в клетках головного мозга в литературе имеются единичные данные [9, 10]. Мы проводили изучение изменения уровня АДФ-рибозилирования тотального хроматина в отличие от исследований в работах [10, 12—15], где посттрансляционную модификацию изучали или в ядерных экстрактах, или в выделенных белках хроматина.

Как видно из приведенных в таблице данных, введение эстрадиола животным приводит к изменению уровня АДФ-рибозилирования белков уже на начальных этапах действия гормона. Так, через 1 ч наблюдается повышение уровня АДФ-рибозилирования почти на 25 %. В дальнейшем, к 4-му часу действия гормона, когда уровень стероидной активации биосинтетических процессов доходит почти до максимума [11], наблюдается 3-кратное повышение уровня АДФ-рибозилирования белков. Эти результаты свидетельствуют о корреляции процессов гормональной активации генома и данной посттрансляционной модификации белков хроматина. Ко времени же понижения скорости биосинтетических процессов (к 24-му часу после введения гормона) уровень АДФ-рибозилирования белков хроматина снижается на 45 % ниже уровня контроля. Полученные результаты согласуются с литературными данными, указывающими на снижение уровня (АДФ-рибоза)полимеразы, вызванного разными гормонами в ядрах различных тканей через 24 ч после введения гормона [12—15]. Интересно, что глюкокортикоиды также уменьшают уровень АДФ-рибозилирования, причем тех негистоновых белков хроматина, которые ответственны за регуляцию генетической активности [15]. Для подтверждения корреляции между активацией генома через 4 ч после введения гормона и АДФ-рибозилированием белков нами были поставлены эксперименты с актиномицином Д, которые показали, что увеличение уровня АДФ-рибозилирования белков полностью снимается введением этого ингибитора. Это позволяет рассматривать эффект, вызванный эстрадиолом, наряду с другими возможностями как индукцию фермента (АДФ-рибоза)полимеразы. В доступной нам литературе не оказалось

Уровень АДФ-рибозилирования в хроматине мозга неполовозрелых крольчих через разное время после введения эстрадиола

The level of ADP-ribosylation in the chromatin of immature female rabbit brain during the various periods of estradiol action

Обработка животных, ч	Уровень АДФ-рибозилирования в хроматине мозга.	
	нмоль АДФ-рибозы·мг белка ⁻¹ × ×мин ⁻¹	%
Контроль	0,2204±0,02	100
Эстрадиол, 1	0,2714±0,02*	123
Эстрадиол, 4	0,6624±0,05	300
Актиномицин Д, 1+		
+эстрадиол, 4	0,1224±0,01	56
Эстрадиол, 24	0,1280±0,02	58
Актиномицин Д, 1	0,1236±0,01	56

* $P < 0,1$; остальные — $P > 0,05$.

данных по исследованию гормональной чувствительности процесса АДФ-рибозилирования белков хроматина в тканях головного мозга. Нам впервые удалось показать, что эта посттрансляционная модификация белков хроматина мозговой ткани стимулируется эстрадиолом. Четких данных о механизме влияния гормона на этот процесс нет. Полученные нами результаты наряду с литературными [1] свидетельствуют о возможной регуляторной роли процесса АДФ-рибозилирования белков хроматина в гормональной активации генетического аппарата у эукариот, в частности в тканях головного мозга.

CHANGES OF ADP-RIBOSYLATION LEVEL IN RABBIT BRAIN CHROMATIN UNDER THE ESTRADIOL ACTION

G. A. Panosyan, E. G. Sarkisyan, E. S. Gevorkyan, L. V. Karabashyan

Institute of Experimental Biology,
Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan;
State University, Yerevan

Summary

The action of estradiol on ADP-ribosylation level in the brain chromatin of preadolescent rabbits in various periods after hormone injection has been studied. The level of ADP-ribosylation is shown to increase during the activation of biosynthetic processes and to decrease with the lowering of the rate of these processes. The results obtained point to the possible regulatory role of ADP-ribosylation process in the hormonal activation of genetic apparatus in eucaryotes, in particular in the brain tissue.

1. Барансов Г. Д. Участие поли(АДФ-рибозы) в генетических процессах // Успехи совр. генетики.— 1985.— № 13.— С. 136—172.
2. Gaal J. C., Pearson C. K. Eucaryotic nuclear ADP-ribosylation reactions // Biochem. J.— 1985.— 230, N 1.— P. 1—18.
3. Ueda K., Hayaishi O. ADP-ribosylation // Ann. Rev. Biochem.— 1985.— 54.— P. 73—100.
4. Паносян Г. А., Геворкян Э. С., Саркисян Э. Г. Индукция холинэстеразы эстрадиолом // Физиология и биохимия медиаторных процессов: Тез. III Всесоюз. конф.— Москва, 1980.— С. 152.
5. Moudgil V. K., Kanungo M. S. Induction of acetylcholinesterase by 17- β estradiol in the brain of rats of various ages // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1973.— 52, N 3.— P. 725—730.
6. Graziano S. Z., Huang R. Ch. C. Chromatographic separation of chick brain chromatin proteins using a SP-sephadex column // Biochemistry.— 1971.— 10, N 25.— P. 4770—4777.
7. Layne E. Spectrophotometric and turbidimetric methods // Meth. Enzymol.— 1957.— 3.— P. 450—455.
8. Ito S., Shizuta Yu., Hayaishi O. Purification and characterization of poly(ADP-ribose)synthetase from calf thymus // J. Biol. Chem.— 1979.— 254, N 9.— P. 3647—3651.
9. Das B. R., Kanunco M. S. ADP-ribosylation induced changes in the conformation of the brain of developing rats // Biochem. Int.— 1986.— 12, N 2.— P. 303—311.
10. Gill D. M. Poly(adenosine diphosphate ribose) synthesis in soluble extracts of animal organs // J. Biol. Chem.— 1972.— 247, N 18.— P. 5964—5971.
11. Estrogen and antiestrogen action in reproductive tissues and tumors / B. S. Katzenellenbogen, H. S. Bhakoo, E. R. Ferguson et al. // Rec. Progr. Horm. Res.— 1979.— 35.— P. 259—300.
12. Jackowcki G., Kun E. The influence of triiodothyronine on polyadenosine-diphosphoribose polymerase and RNA synthesis in cardiocyte nuclei // Mol. and Cell. Cardiol.— 1982.— Suppl. 14, N 3.— P. 65—70.
13. Glucocorticoid-induced reduction of poly(ADP-ribose) synthetase in nuclei from chick embryo liver / A. Kitamura, Yo. Tanigawa, T. Yamamoto et al. // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1979.— 87, N 3.— P. 725—733.
14. The effects of thyroid hormone on *in vitro* phosphorylation, acetylation, and ADP-ribosylation of rat liver nuclear proteins / V. M. Nikodem, D. R. Huang, B. L. Trus, J. E. Rall // Hormone and Metab. Res.— 1983.— 15, N 11.— P. 550—554.
15. Tanuma S.-I., Johnson L. D., Johnson G. S. ADP-ribosylation of chromosomal proteins and mouse mammary tumor virus gene expression // J. Biol. Chem.— 1983.— 258, N 24.— P. 15371—15375.

Ин-т эксперим. биологии АН АрмССР, Ереван
Ереван. гос. ун-т

Получено 08.10.86