

Д. Ю. Блохин, В. А. Стручков

**БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ ЯДЕРНОГО МАТРИКСА ИЗМЕНЯЕТСЯ
ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛИПАЗЫ**

*Методом электрофореза в полиакриламидном геле исследован белковый состав препаратов остаточных ядер и ядерного матрикса, выделенных из клеток лейкоза P388 мышей, спермиев и эритроцитов пресноводного вьюна *Misgurnus fossilis* L. Показано, что дополнительная обработка образцов на стадии нуклеазного переваривания липазой вызывает значительные изменения белкового спектра как препаратов остаточных ядер, так и выделенных из них ядерных матриксов. При замене липазы на фосфолипазу C изменений белкового состава препаратов не наблюдается.*

Введение. Липиды и/или липопротенды являются наименее изученными компонентами ядерного матрикса эукариотических клеток [1—3]. Данные об их участии в организации пространственной структуры фибриллярно-гранулярной сети интерфазного ядра немногочисленны и противоречивы [1—5]. Лишь недавно было показано, что липидный состав препаратов ядерного матрикса отличается от состава мембран и суммарных липидов ядра, в связи с чем пересматривается прежняя точка зрения о контаминации мембранными липидами препаратов ядерного матрикса в процессе их выделения [2—4].

В настоящей работе исследованы изменения белкового состава препаратов ядерного матрикса, происходящие при дополнении стандартной процедуры их выделения стадией липолитической обработки. Оказалось, что независимо от объекта исследования инкубация остаточных ядер с липазой вызывает достоверные изменения белкового состава препаратов ядерного матрикса, в то время как фосфолипаза C подобного эффекта не производит.

Материалы и методы. Препараты ядерного матрикса выделяли из клеток перевариваемого лейкоза P388 мышей (пассирован на линии (DBA/2), спермиев и эритроцитов пресноводного вьюна *M. fossilis* L.

Опухолевые клетки, полученные через 6—7 сут после внутрибрюшинной перевивки животным 10^6 клеток, отмывали от асцитной жидкости и суспендировали в холодном (4 °C) растворе Хенкса. Кровь вьюна, вытекающую самотеком после декапитации, смешивали с равным объемом холодного 0,5 %-ного раствора NaCl с 2 ммоль/л цитрата Na. В таком же растворе гомогенизировали семенники вьюна. Клеточные суспензии и гомогенаты фильтровали через титановое сито (40 мкм).

Выделение ядер. 1,0 мл клеточной суспензии (из расчета 1 мг/мл содержания ДНК) смешивали с 1,0 мл буфера для вскрытия клеток (25 mM трис-HCl, pH 7,6, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 %-ный тритон X-100, 1 mM 2-меркаптоэтанол, 0,5 M сахараза, 1 mM фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ, ингибитор сериновых протеиназ)) и пипетировали 3 мин при 0 °C. Грубый осадок ядер после низкоскоростного центрифугирования (2000 об/мин, 5 мин, 4 °C, центрифуга К-23) промывали в 5,0 мл буфера для вскрытия клеток и дважды в 5,0 мл буфера ТКМ (25 mM трис-HCl, pH 7,6, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂), последовательно пипетируя суспензию в течение 3 мин на ледяной бане и осаждая ядра низкоскоростным центрифугированием.

Выделение ядерного матрикса. Промытый осадок ядер суспендировали в буфере для переваривания ДНК (буфер ТКМ с добавлением 5 ед. Куинтия в 1 мл ДНКазы I, 20 ед./мл бактериальной эндонуклеазы и 1 ммоль/л ФМСФ) из расчета 100 мкг ДНК в 1 мл и инкубировали 60 мин при 20 °C.

На этой стадии проводили дополнительную липолитическую обработку опытных серий образцов, вводя в состав буфера для переваривания ДНК 5 ед./мл липазы или фосфолипазы C, предварительно инкубированных с ФМСФ* (полнота подавления про-

* В коммерческих партиях липазы и фосфолипазы C присутствует остаточная протеолитическая активность, обнаруживаемая в тесте гидролиза азоказена. Однако после инкубации ферментных препаратов с иммобилизованным на агарозе бацитрацином или в среде с 1 mM ФМСФ их протеолитическая активность в этом же тесте не обнаруживается.

теолитической активности контролировалась). Одну из контрольных серий дополнительно инкубировали с РНКазой А (200 мкг/мл), примесь протеиназ в которой предварительно инактивировали прогревом (75 °С, 15 мин).

Остаточные ядра осаждали центрифугированием (2500 об/мин, 5 мин, 20 °С) и дважды экстрагировали лабильно связанные белки, суспендируя и энергично пипетируя осадок в 5,0 мл раствора, содержащего 2 М NaCl в буфере ТКМ, в течение 10 мин при 20 °С. Осадок дважды промывали в 10 мМ трис-HCl (pH 7,6) с добавлением 1 % глицерина.

Анализ белкового состава препаратов. Белковый состав анализировали методом одномерного электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии DS-Na по Леммли [6]. Однородный разделяющий ($T=12,5\%$, $C=2,6\%$) и концентрирующий ($T=4\%$, $C=2,6\%$) гели заливали в вертикально расположенные пластины аппарата АВГЭ-1 («Хийу Калур», Таллин). Электрофорез вели при силе тока 25 мА и 20 °С в течение 4 ч. Гели фиксировали в смеси изопропанол — метанол : ледяная уксусная кислота : вода (15 : 5 : 10 : 70) с добавлением до 3,5 % формальдегида и окрашивали кумасси G-250 [7].

Введение в препараты радиоактивной метки. Мышам с привитым штаммом лейкоза P388 за 1 ч до забоя вводили внутривенно 2 МБк метил- H^3 -тимидина (удельная активность 500 ГБк/ммоль) и 1 МБк C^{14} -ацетата натрия (удельная активность 2 ГБк/ммоль) в 0,5 мл 0,9 %-ного раствора NaCl. Аликвоты суспензии целых или остаточных ядер, или ядерного матрикса наносили на бумажные фильтры MN-1 («Filtrak», ГДР) диаметром 25 мм, фиксировали 2 %-ным глутаровым альдегидом, промывали в 10 %-ной уксусной кислоте и высушивали на воздухе. Радиоактивность сорбированных на фильтрах образцов измеряли в режиме двойной метки на спектрометре «Mark-III» («Tracor Analytic», США) в толуоловом сцинтиллаторе [8].

В работе использованы реактивы: трис-(гидроксиметил)-аминометан, 2-меркаптоэтанол, тритон X-100, ФМСФ, акриламид, TEMED, персульфат аммония, глицин, глутаровый альдегид («Serva», ФРГ), квалификация «Apal. grade» и «Research grade», кумасси G-250 («Fegak», Зап. Берлин), N, N-метилен-бисакриламид («Reanal», ВНР). Остальные реактивы отечественного производства квалификации «х.ч.» и «ос.ч.»

Применяли ферменты: ДНКазу I (удельная активность 4800 ед. Кунитца/мг), РНКазу А (удельная активность 80 ед. Кунитца/мг), панкреатическую липазу (удельная активность 14 ед/мг), липазу из *Rhizopus sp.* (удельная активность 50 ед/мг) производства фирмы «Serva», ФРГ; фосфолипазу C из *Vac. cereus* (удельная активность 50 ед/мг) фирмы «Calbiochem», США.

Результаты и обсуждение. В процессе выделения из интактных интерфазных клеток остаточных ядер и ядерного матрикса последовательно происходят сольubilизация мембран, фрагментация и удаление

Относительное содержание метки метил- H^3 -тимидина и C^{14} -ацетата Na в препаратах остаточных ядер и ядерного матрикса клеток лейкоза P388 мышей

Relative contents of methyl- H^3 -thymidine and C^{14} -acetate Na labels in the residual nuclei and nuclear matrix preparations of the murine leukemia P388 cells

Стадия выделения препаратов	Образец	Относительное содержание метки	
		H^3 , %	C^{14} , %
Сольubilизация мембран тритоном X-100	Ядра	100	100
Нуклеазное переваривание ядер	Остаточные ядра (I)	10,5±1,7	9,4±2,1
Дополнительная инкубация ядер с липазой	Остаточные ядра (II)	9,6±1,4	7,6±0,8
Дополнительная инкубация ядер с РНКазой А	Остаточные ядра (III)	9,1±1,0	8,2±1,1
Экстракция белков в 2 М NaCl из остаточных ядер (I)	Ядерный матрикс (I)	0,5±0,1	1,8±0,2
То же из остаточных ядер (II)	Ядерный матрикс (II)	0,2±0,1	1,4±0,2
То же из остаточных ядер (III)	Ядерный матрикс (III)	0,3±0,1	1,8±0,2

основной части ДНК (таблица), а также экстракция большей части белков, в том числе практически всех гистонов (рис. 1, дорожки 1 и 4). При использовании описанной выше методики мы получали из клеток лейкоза *P388* препараты ядерного матрикса, содержащие около 0,5 % метки H^3 -тимидина и около 2 % метки C^{14} -ацетата (за 100 % принято содержание соответствующих меченых соединений в ядрах, изолированных с использованием тритона X-100). Дополнение стандартизированной

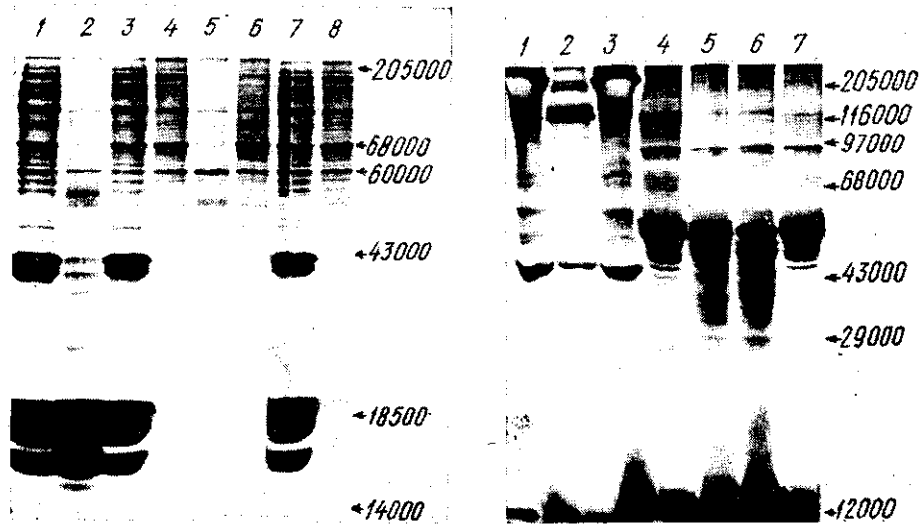


Рис. 1. Электрофореграммы ядерных белков клеток лейкоза *P388* в 12,5 %-ном ПААГ, содержащем DS-Na: 1 — остаточные ядра (I); 2 — остаточные ядра (II), полученные при инкубации (I) с липазой; 3 — остаточные ядра (III), полученные при инкубации (I) с РНКазой А; 4 — ядерный матрикс (I), выделенный из остаточных ядер (I); 5 — ядерный матрикс (II), выделенный из остаточных ядер (II); 6 — ядерный матрикс (III), выделенный из остаточных ядер (III); 7 — остаточные ядра (IV), полученные при инкубации остаточных ядер (I) с фосфолипазой С; 8 — ядерный матрикс (IV), выделенный из остаточных ядер (IV). Окраска кумасси G-250. Справа — стандарты молекулярных масс

Fig. 1. Electrophoregrams of nuclear proteins of leucemia *P388* cells in 12,5 % polyacrylamide gel containing DS-Na. Staining — Coomassie G-250. In the right — standard molecular weights (kDa). 1 — residual nuclei (I); 2 — residual nuclei obtained at incubation with lipase (II); 3 — residual nuclei obtained at incubation with RNase A (III); 4 — nuclear matrix isolated from residual nuclei (I); 5 — Ibid from residual nuclei II and III, respectively; 7 — residual nuclei obtained at incubation of residual nuclei (I) with phospholipase C (IV); 8 — nuclear matrix isolated from residual nuclei (IV)

Рис. 2. Электрофореграммы белков ядерного матрикса из эритроцитов (1-3) и спермиев (4-7) вьюна *M. fossilis* L., выделенных по стандартизированной методике (1, 4) и с дополнительной обработкой образцов панкреатической липазой (2, 5), липазой из *Rhizopus* sp. (6) или фосфолипазой С (3, 7). Справа — стандарты молекулярных масс

Fig. 2. Electrophoregrams of the proteins of nuclear matrix from erythrocytes (1-3) and spermia (4-7) of *Misgurnus fossilis* L. isolated by the standard method (1, 4) or with the additional treatment of samples by pancreatic lipase (2, 5), lipase from *Rhizopus* sp. (6) or phospholipase C (3, 7). Staining — Coomassie G-250. In the right — standard molecular weights (kDa)

процедуры выделения препаратов ядерного матрикса стадией инкубации остаточных ядер с РНКазой А или с липазой приводит к более полному удалению ДНК, а в последнем случае — к небольшому, но достоверному снижению содержания липидов (таблица).

Значительно более выраженные эффекты липазы обнаруживаются при исследовании белкового состава препаратов остаточных ядер и ядерного матрикса.

После инкубации остаточных ядер клеток лейкоза *P388* с липазой отмечается: 1) снижение интенсивности окраски отдельных (преиму-

шественно высокомолекулярных) белковых полос вплоть до их полного исчезновения; 2) появление «дополнительных» полипептидов, отсутствующих в контрольных образцах. Оба эффекта наблюдаются как в препаратах остаточных ядер (рис. 1, дорожки 1, 2), так и в выделенных из них препаратах ядерного матрикса (рис. 1, дорожки 4, 5). Контролируемое подавление протеолитической активности коммерческих партий ферментов и отсутствие подобных эффектов при контрольной обработке образцов РНКазой А (рис. 1, дорожки 3, 6) позволяют отнести обнаруженный феномен за счет собственно липолитического действия на структуру остаточных клеточных ядер и их фибриллярно-гранулярной внутренней сети.

Наблюдаемые изменения белковых спектров могут являться результатом двух различных процессов: усиления экстракции отдельных полипептидов, что ведет к частичной потере некоторых компонентов комплексов, и снижения молекулярной массы липопротеидов при гидролизе их липидных простетических группировок, чем вызывается перераспределение белков на электрофореграмме.

Аналогичные изменения белкового состава препаратов ядерного матрикса наблюдаются при инкубации с липазой остаточных ядер эритроцитов и спермиев вьюна *M. fossilis* L. (рис. 2), причем не отмечено качественных отличий в эффектах панкреатической липазы (рис. 2, дорожка 5) и липазы из *Rhizopus* sp. (рис. 2, дорожка 6).

В отличие от действия липазы инкубация остаточных ядер из всех исследованных клеток с фосфолипазой С не приводит к изменению белкового состава ни самих остаточных ядер (рис. 1, дорожка 7), ни выделенных из них препаратов ядерного матрикса (рис. 1, дорожка 8; рис. 2, дорожки 3, 7). Сходные результаты описаны другими авторами, также не обнаружившими изменений белкового спектра ядерного матрикса печени крыс при инкубации их с фосфолипазой С и сфингомиелипазой [4, 5]. Видимо, фосфолипиды, входящие в состав клеточных ядер, в отличие от нейтральных липидов не принимают непосредственного участия в пространственной организации фибриллярно-гранулярной сети.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что под действием липазы солюбилизируется часть прочно связанной с ядерным матриксом ДНК, а белковый состав самого ядерного матрикса претерпевает значительные изменения. Мы полагаем, что в организации ядерного матрикса, а также участков контакта матрикса с ДНК непосредственное участие принимают нейтральные липиды и/или липопротеиды клеточного ядра.

CHANGE IN THE PROTEIN COMPOSITION OF NUCLEAR MATRIX INDUCED BY LIPASE TREATMENT

D. Yu. Blokhin, V. A. Struchkov

All-Union Cancer Research Center,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Summary

The protein composition of residual nuclei and nuclear matrix preparations isolated from murine leukemia P388 cells, spermia and erythrocytes of *Misgurnus fossilis* L., has been studied by SDS-PAGE. Additional treatment of samples at the stage of nuclease digestion by lipase is shown to cause considerable changes in the protein spectrum of both residual nuclei preparations and nuclear matrices isolated from them. No changes are observed in the protein composition of the preparations when lipase is substituted for phospholipase C.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Збарский И. Б. Белковый состав и организация ядерного матрикса // Биополимеры и клетка.—1985.—1, № 1.—С. 26—32.
2. Чернохвостов В. В. Ядерный матрикс эукариотической клетки: некоторые вопросы выделения, структуры и функционирования // Успехи соврем. биологии.—1985.—99, № 3.—С. 371—384.
3. Глазков М. В. Структурно-функциональная организация ДНК в интерфазном ядре. Структурный аспект // Молекуляр. биология.—1988.—22, № 1.—С. 16—30.
4. Алесенко А. В. Роль фосфолипидов в образовании комплекса ДНК—ядерный матрикс в процессе репликации // Структурно-функциональные аспекты репликации и репарации ДНК: Материалы Всесоюз. симпоз.—Пушино, 1983.—С. 21—27.
5. Алесенко А. В., Пангаз Э. А. Различия в составе фосфолипидов ядра и хроматина в ходе пролиферации клеток печени крысы после частичной гепатэктомии // Биохимия.—1983.—48, № 2.—С. 275—281.
6. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227, N 5259.—P. 680—685.
7. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование.—М.: Наука, 1981.—288 с.
8. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радионуклеидными методами.—М.: Наука, 1983.—304 с.

Всесоюз. онкол. науч. центр АМН СССР,
Москва

Получено 24.05.88