

БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ ЯДЕРНОГО МАТРИКСА В КЛЕТКАХ РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЕЙ ЖИВОТНЫХ

Д. Ю. Блохин, В. А. Стручков

Введение. Ядерный матрикс представляет собой остаточную структуру интерфазного ядра клеток эукариот, устойчивую к последовательным обработкам нуклеазами, неионными детергентами и растворами с высокой ионной силой [1]. Ядерный матрикс состоит в основном из негистоновых белков ядра и включает небольшие количества ДНК, РНК, липидов и углеводов [1, 2]. Известно несоответствие понятия «ядерный матрикс» строго ограниченному морфо-функциональному образованию клеточного ядра, в связи с чем морфология и состав препаратов ядерного матрикса в значительной мере зависят от процедуры их выделения [2].

В то же время считают, что состав и структура ядерного матрикса подвержены динамическим изменениям в процессе функционирования клетки [1, 3]. В настоящее время отсутствует единый методический подход к выделению препаратов ядерного матрикса, что затрудняет сопоставление результатов разных авторов даже при исследовании одного объекта [2].

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение белкового ядерного матрикса, выделенного из широкого круга различных клеток животных в строго одинаковых условиях получения препаратов.

Материалы и методы. Объектами исследования служили тимоциты и нормальные гепатоциты мышей линии *DBA/2*, клетки нормальной и регенерирующей (через 24 ч после частичной гепатэктомии) печени крыс *Wistar*, спермии и эритроциты пресноводного вьюна *Misgurnus fossilis L.*, первичная трипсинизированная культура эпителия почек зеленых мартышек производства Ин-та полиомиелита и вирус энцефалитов АМН СССР (любезно предоставлена Т. А. Блохиной, Моск. НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского МЗ РСФСР), клетки перевиваемых опухолей: асцитная гепатома Зайделя, асцитный вариант саркомы-37 (*C-37*), лейкозы *L1210*, *P388* мышей и подштамм *P388/ад.*, адаптированный для культивирования *in vitro*, а также подштамм *P388/АМД* с индуцированной резистентностью к актиномицину Д.

В качестве основного метода получения препаратов ядерного матрикса использовали метод [4], модифицировав его в ходе предварительных исследований. Все используемые растворы готовили на основе низкосолевого магнийсодержащего буфера ТКМ (25 мМ трис-НСI, рН 7,6, 25 мМ КСI, 5 мМ MgCl₂) с добавлением до 1,0 мМ фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ). К 1,0 мл профильтрованной (40 мкм) клеточной суспензии в растворе Хенкса (спермии и эритроциты вьюна суспендировали в 0,5 %-ном растворе NaCl) при 0 °С прибавляли 1,0 мл холодного буфера для вскрытия клеток (буфер ТКМ с добавлением 0,5 %-ного тритона X-100, 0,5 М сахарозы, 1 мМ 2-меркаптоэтанола, ФМСФ), дегазированного перед использованием. Суспензию пипетировали 3 мин при 0 °С и инкубировали 10 мин на ледяной бане. Ядра осаждали центрифугированием (2000 об/мин, 5 мин, 4 °С, центрифуга К-23), промывали в буфере для вскрытия клеток и дважды — в буфере ТКМ. Осадок ресуспендировали в буфере для переваривания ДНК (5 ед. Куинтца в 1 мл ДНКазы I, 20 ед/мл бактериальной эндонуклеазы в буфере ТКМ), инкубировали 60 мин (20 °С), осаждали центрифугированием (2500 об/мин, 5 мин, 20 °С) и дважды экстрагировали 2,0 М NaCl (в ТКМ) по 10 мин при 20 °С. Осадок дважды промывали в 10 мМ трис-НСI, рН 7,6, с 1 % глицерина и сохраняли в 10 %-ном водном глицерине при —20 °С.

Анализ белков вели методом одномерного гелевого электрофореза в присутствии DS-Na в однородном ПААГ (Т=12,5 %, С=2,6 %) по Леммли [5], используя отечественный аппарат АВГЭ-1 с вертикально расположенными пластинами геля (СССР). Гели фиксировали в растворе уксусная кислота—изопропанол—вода (10 : 15 : 75) с добавлением до 3,5 % формальдегида [6] и окрашивали кумасси ярким синим R-250 в смеси уксусная кислота—метанол—вода (10 : 20 : 70).

Количественное определение белка в препаратах ядерного матрикса проводили по методу [7] после растворения образцов в буфере для нанесения пробы [5]. Радиоактивность ДНК, меченной ^3H - и ^{14}C -тимидином, определяли сцинтилляционным методом на спектрометре «Mark-III» («Tracor Analytic», США).

Результаты и обсуждение. Предварительно в поисках оптимальной методики выделения препаратов исследовали влияние на белковый спектр ядерного матрикса некоторых модификаций состава растворов. Так, введение в буфер для вскрытия клеток ионов меди ($1-10\text{ мМ CuCl}_2$), стабилизирующих участки прикрепления ДНК к матриксу [8, 9], приводило к значительному (до 500 %) увеличению выхода суммарного белка во фракции ядерного матрикса, а на электрофореграммах наблюдалось существенное обогащение образцов белками во всем исследуемом диапазоне молекулярных масс (от 10000 до 200000) и ухудшение разрешения белковых полос (рис. 1). Способ экстракции лабильно связанных белков не влияет на белковый состав ядерного матрикса: при поэтапной экстракции растворами 0,35; 0,5; 1,0 и 2,0 М NaCl в препаратах сохранялись те же белки, что

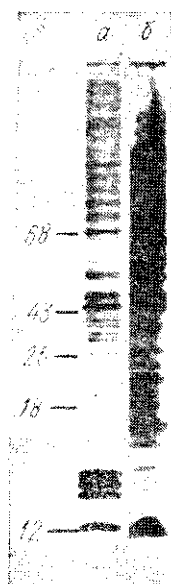


Рис. 1. Электрофореграмма белков ядерного матрикса, выделенных по стандартной методике (а) и с применением ионов меди на этапе выделения ядер (б) из клеток лейкоза P388 мышей. Слева — стандарты молекулярных масс ($\cdot 10^3$)

Fig. 1. Electrophoregrams of nuclear matrix proteins from P388 mice leucemic cells obtained by standard techniques (a) and during nuclei isolation in the presence of cupric ions (b). Left side — the molecular weight of markers (kDa)

и при одномоментной обработке 2,0 М NaCl. Поэтому в дальнейшей работе мы отказались от использования солей меди, дающих, по нашему мнению, артефактное сшивание растворимых белков хроматина и, возможно, цитозоля с фибриллярно-гранулярной сетью ядерного матрикса, а также от поэтапных обработок препаратов растворами с повышающимися ионными силами.

Применив стандартизованную процедуру, получили препараты ядерного матрикса из различных клеток животных: нормальных и опухолевых, половых и соматических, покоящихся и пролиферирующих, млекопитающих и рыб. Ниже приведено общее содержание белков во фракциях ядерного матрикса, полученного из различных объектов (мкг/млн клеток):

Тимоциты мыши	$1,1 \pm 0,4$	Нормальная печень мыши	$0,8 \pm 0,2$
Лейкоз L1210	$4,8 \pm 1,7$	Нормальная печень крысы	$0,9 \pm 0,2$
Лейкоз P388	$5,3 \pm 2,1$	Регенерирующая печень крысы	$1,9 \pm 0,5$
Эритроциты выюна	$0,15 \pm 0,05$	Асцитная гепатома Зайделя	$7,5 \pm 1,5$
Спермии выюна	$0,4 \pm 0,2$		
C-37	$8,2 \pm 2,4$		

Оказалось, что выход суммарного белка в препаратах ядерного матрикса колеблется в пределах двух порядков и составляет для разных клеток от 0,1 до 10 мкг/млн клеток, что в пересчете на содержание ДНК в клетках соответствует 0,1—0,3 (белок/ДНК) для нормальных и 0,6—0,7 (белок/ДНК) для опухолевых тканей. Белковый спектр достаточно стабильно воспроизводится в образцах разных серий, выделенных из одних и тех же видов клеток, однако состав белков оказался видо- и тканеспецифичным (рис. 2).

На одномерной электрофореграмме препаратов ядерного матрикса, выделенных из разных клеток, удаётся различить от 20 до 50 индивидуальных белковых полос, количество которых может быть еще боль-

шим при высокочувствительной окраске гелей серебром. Спектры состоят из нескольких мажорных белков (неодинаковых в препаратах из разных клеток) и большого количества минорных полипептидов. Диапазон молекулярных масс белков ядерного матрикса достаточно широк: от 10 000 до 200 000 и выше (рис. 2). Возможно, часть обнаруженных полипептидов не имеет прямого отношения к фибриллярно-гранулярной сети ядра, а попадает во фракцию ядерного матрикса в

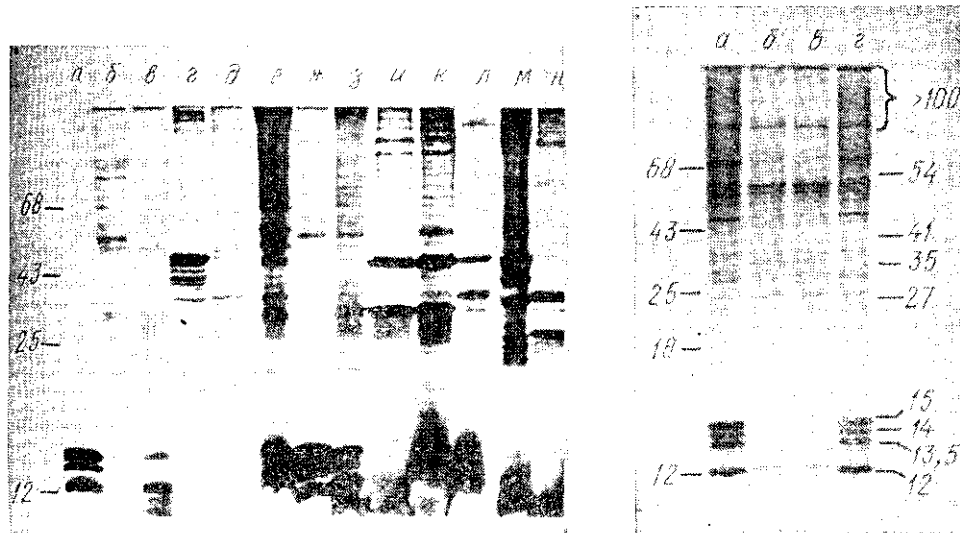


Рис. 2. Электрофореграмма белков ядерного матрикса из клеток различных тканей: тимоциты мыши (а); лейкоз *L1210* (б); лейкоз *P388* (в); подштамм лейкоза *P388/ад.* (г); суммарные клетки костного мозга мыши (д); *S-37* (е); спермии выюна (ж); эритроциты выюна (з); нормальная печень крысы (и); регенерирующая печень крысы (к); асцитная гепатома Зайделя (л); нормальная печень мыши (м); эпителий почек зеленой мартышки (н). Слева — стандарты молекулярных масс ($\cdot 10^3$)

Fig. 2. Electrophoretograms of nuclear matrix proteins from different objects: mice thymocytes (a); *L1210* leukemic cells (b); *P388* leukemic cells (v); cells of *P388/ad* substrain (g); mice bone marrow (d); sarcoma *S-37* (e); loach sperm (zh); loach erythrocytes (z); normal (u) and regenerating (k) rat liver; the Zajdela ascitic hepatoma (l); normal mice liver (m); African green monkey kidney (n). Left side — the molecular weight of markers (kDa)

Рис. 3. Электрофореграмма белков ядерного матрикса клеток лейкоза *P388*, выделенных по стандартной методике (а), и с последующей обработкой 2-меркаптоэтанолом (б) или дитиотреитолом (в). Слева — стандарты молекулярных масс ($\cdot 10^3$), справа — молекулярные массы диссоциировавших белков ($\cdot 10^3$)

Fig. 3. Electrophoretograms of nuclear matrix proteins from *P388* leukemic cells obtained by standard technique (a) and with following treatment by 2-mercaptoethanol (b) or dithiotreitol (v). Left side — the molecular weight of markers (kDa); right side — the molecular weight of dissociating proteins

процессе выделения препаратов. В частности, промежуточные филаменты цитоскелета не удается удалить с поверхности ядра, не разрушая полностью ядерной оболочки [2].

«Триплет» белковых полос в области молекулярных масс 60 000—70 000, считающийся характерным признаком ядерного матрикса («ламини» А, В и С), отчетливо выражен в препаратах, выделенных из нормальной и регенерирующей печени, и клеток лейкозов мышей, в то время как в образцах матрикса из других клеток «ламини» представлены минорными белками. Принимая во внимание высокую чувствительность «ламини» к протеиназам [1, 2], нельзя исключить различной степени протеолиза в процессе выделения препаратов из разных объектов.

Наиболее общими для всех исследованных клеток оказались белки ядерного матрикса с молекулярными массами около 18 000, 30 000, 45 000 и 52 000. Поскольку в этой области молекулярных масс обычно

идентифицируются белки цитоскелета (тубулин, актин, виметин), не обладающие видовой и тканевой специфичностью, мы не исключаем возможности контаминации последними препаратов ядерного матрикса, выделенных по использованной нами методике. Идентификация отдельных белков не входила в задачу настоящего исследования, однако белок с молекулярной массой 45 000, вероятно, является актином, который наряду с миозином и тропомиозином обнаружен в составе хроматина [10] и ядерного матрикса [11], с чем связывают способность последнего к обратимому сокращению при изменении концентрации бивалентных катионов [12].

Изолированный в примененных нами условиях ядерный матрикс является достаточно стабильным в отношении белкового состава при дополнительной обработке диссоциирующими агентами. Так, инкубация препаратов с ЭДТА (20 мМ, рН 7,6, 30 мин, 20 °С) не изменяет их белкового спектра, а экстракция в растворах 3,5 М NaCl и 3,5 М NaCl+6 М мочевины (в буфере ТКМ) лишь незначительно обедняет образцы низкомолекулярными белками. Видимо, эти препараты представляют собой устойчивую скелетную структуру, с которой ассоциировано около 1 % общей ядерной или около 5 % вновь синтезированной (по длительной ³H- и импульсной ¹⁴C-тимидиновой меткам) ДНК. Однако при инкубации образцов ядерного матрикса с 2-меркаптоэтанолом или дитиотреитолом наблюдается потеря некоторых белков: удаляются белки с молекулярными массами около 35 000, 41 000 и 54 000, частично белки «триплета», а также низкомолекулярные полипептиды (12 000—15 000) и высокомолекулярные фракции с молекулярной массой более 150 000 (рис. 3). Очевидно, эти белки связаны с остаточным скелетом дисульфидными связями.

Известно, что роль ядерного матрикса в осуществлении и регуляции процессов транскрипции и репликации чрезвычайно велика [1, 2]. Возможно, обнаруженные видовой и тканевой специфичности белкового состава ядерного матрикса свидетельствуют о его участии в процессах клеточной дифференцировки.

THE PROTEIN COMPOSITION OF NUCLEAR MATRIX IN CELLS OF DIFFERENT ANIMAL TISSUES

D. Yu. Blokhin, V. A. Struchkov

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

Summary

The protein composition of nuclear matrix preparations, isolated from different animal tissues under the same conditions, possesses species and tissue specificity. The preparations of nuclear matrix are resistant to additional treatments with dissociating agents (EDTA, NaCl, urea), but their incubation in the presence of thiols results in dissociation of some proteins, that confirms the assumption on participation of disulfide intersubunit bonds in organization of skeletal structures of interphase nucleus.

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. Berezney R. Dynamic properties of the nuclear matrix // The cell nucleus / Ed. H. Busch.— New York: Acad. press, 1979.— Vol. 7.— P. 413—456.
4. Berezney R., Buchholtz L. A. Isolation and characterization of rat liver nuclear matrices containing rat liver high molecular weight DNA // Biochemistry.— 1981. 20, N 17.— P. 4995—5002.
5. Jaemmlt U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.— 1970. 227, N 5259.— P. 680—685.
6. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование.— М.: Наука, 1981.— 288 с.

7. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein—dye binding // *Analyt. Biochem.*— 1976.—72, N 2.— P. 248—254.
8. Яровая О. В., Разин С. В. Два типа участков прикрепления ДНК к ядерному скелету в клетках асцитной карциномы Эрлиха // *Молекуляр. биология.*— 1983.—17, № 2.— С. 303—313.
9. Чернохвостов В. В. Белки, прочно связанные с ДНК, и их роль в организации участков прикрепления ДНК к скелетным структурам хромосомы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— М., 1985.—23 с.
10. Douvas A. S., Harrington C. A., Bonner J. Major nonhistone proteins of rat chromatin: preliminary identification of myosin, actin and tropomyosin // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1975.—72, N 10.— P. 3902—3906.
11. Nakayasu H., Ueda K. Association of actin with the nuclear matrix from bovine lymphocytes // *Exp. Cell Res.*— 1983.—143, N 1.— P. 55—62.
12. Wunderlich F., Herlan G. A reversibly contractile nuclear matrix: its isolation, structure and composition // *J. Cell Biol.*— 1977.—73, N 2.— P. 271—278.

Всесоюз. онкол. науч. центр АМН СССР, Москва

Получено 11.03.87

УДК 577.112.5

ТРИПТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ КАТАЛАЗЫ ГРИБА *PENICILLIUM VITALE*.

3. СТРОЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ПЕПТИДОВ

Н. М. Гусак, Т. Л. Левитина, С. А. Атепалихина,
М. Т. Кириленко, Л. В. Гудкова, Э. А. Козлов

Введение. Первичная структура каталазы гриба *P. vitale* изучалась методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 0,2 нм. Так называемая «рентгеноструктурная» последовательность опубликована в 1986 г. [1]. Настоящее сообщение является продолжением серии работ по выяснению первичной структуры каталазы *P. vitale* химическими методами. Предполагалось [2], что при наличии опубликованной «рентгеноструктурной» аминокислотной последовательности каталазы для определения ее полной первичной структуры химическими методами достаточно будет установить строение триптических пептидов. В первых двух сообщениях [2, 3] нами описано разделение указанных соединений; в частности, было выделено 60 пептидов и определен их аминокислотный состав. В этой работе представлены данные, касающиеся частичной или полной аминокислотной последовательности 55 пептидов, насчитывающих в сумме 384 аминокислотных остатка.

Материалы и методы. Триптические пептиды расщепляли химотрипсином (Ch) и термолизином (Th) в 0,2 н. NH_4HCO_3 в течение 6 ч при 37 °С. Смеси полученных пептидов разделяли высоковольтным электрофорезом в электролитах ЭФ1 и ЭФ2 и хроматографией в системе БХ [4] на бумаге FN 17 («Filtrak», ГДР). N-концевую аминокислоту и N-концевую последовательность определяли методом Эдмана в сочетании с дансильрованием [5]. DNS-аминокислоты идентифицировали на пластинках с тонким слоем полиамида по методу [6] в модификации Решетова и др. [7]. Аминокислотный состав определяли на анализаторе ААА-331 (ЧССР), как описано ранее [4]. Триптофан идентифицировали по реакции Эрлиха [8], амиды — по подвижности пептида при электрофорезе в электролите ЭФ1 [4]. Пептидное картирование триптического гидролизата проводили по описанному методу [9].

Результаты и обсуждение. Дополнительно к опубликованным ранее данным [2, 3] в настоящем сообщении приводится строение еще пяти пептидов Т55—Т59, полученных методом пептидного картирования триптического гидролизата каталазы. Ниже выписана частичная