

**СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ГИДРОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИПОПРОТЕИНОВ****Галина Андреевна КОВАЛЕНКО, Елена Николаевна АНТИПОВА, Роман Александрович КНЯЗЕВ***НИИ биохимии СО РАМН**630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

Было показано, что под действием липопротеинов происходит изменение суперскрученной структуры ДНК плазмиды pBluescript и переход ее в кольцевую за счет разрыва водородных связей между парами азотистых оснований комплементарных нитей ДНК. Переход суперскрученной формы плазмиды в кольцевую в результате присутствия эндоДНКазной активности в молекуле липопротеинов не обнаружен. Белки липопротеинов не содержат эндоДНКазной активности.

**Ключевые слова:** плазида суперскрученная и кольцевая, денатурированная лососевая ДНК, липопротеины высокой, низкой и очень низкой плотности, гидролитическая активность, эндоДНКазная активность.

В настоящее время обнаружено, что функции липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), низкой плотности (ЛПНП) и высокой плотности (ЛПВП) достаточно многочисленны. Транспортная функция липопротеинов (ЛП) не вызывает сомнения [1, 2]. Было показано, что ЛП принимают участие в регуляции стероидогенеза в надпочечниках крыс. ЛПОНП и их белковый компонент оказывали ингибирующее действие на синтез стероидов. Менее выраженным ингибирующим действием обладали ЛПНП [3]. На островках Лангерганса поджелудочной железы крыс было показано, что ЛПВП вдвое увеличивают продукцию инсулина, тогда как ЛПОНП оказывают ингибирующий эффект. Однако механизм описанных явлений пока неизвестен [4].

Отмечено участие ЛПОНП и ЛПНП в биохимических процессах сердечно-сосудистой системы. ЛПНП индуцировали экспрессию гена *egr-1*, усиливающего пролиферацию эндотелия в пулчарной артерии человека. ЛПНП стимулировали дозозависимое включение  $H^3$ -тимидина в ДНК и повышали концентрацию ионов  $Ca^{++}$  в эндотелиальных клетках. Кроме того, достаточно подробно описаны иммуномодулирующие свойства липопротеинов [3].

Анализ исследований прошедшего десятилетия дает возможность предполагать, что ЛП или их компоненты играют важную роль в структурной и функциональной организации хроматина эукариот [5]. Паниным и его сотрудниками [6] было показано, что ЛПВП в присутствии кортизола и адреналина или кортизола повышали экспрессию генов в переживающих срезах печени крыс. Этот

эффект был назван кооперативным, из чего следовало, что ЛПВП и перечисленные гормоны принимают непосредственное участие в поддержании хроматина в транскрипционно активном состоянии. Были получены экспериментальные данные, подтверждающие кооперативный эффект ЛПВП и глюкокортикоидов в регуляции экспрессии генов гепатоцитов.

При участии резидентных макрофагов печени процессы регуляции осуществляются специфическим биохимическим путем. В результате взаимодействия ДНК с комплексом «апо А-I — тетрагидрокортизол» (апо А-I является составной частью ЛПВП) происходит разрыв водородных связей между парами азотистых оснований и появление однонитевых участков ДНК в сайтах связывания с последующей инициацией транскрипции генов [7, 8].

Методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) получены результаты по изменению вторичной структуры ДНК эукариот при взаимодействии ДНК с комплексом «апо А-I — тетрагидрокортизол» [9]. Образование однонитевых участков, четко показанная картина изменения структуры эукариотической ДНК под действием комплексов стероидных гормонов с аполипопротеином А-I послужили предпосылкой для поиска специфической гидролитической, а возможно, и нуклеазной активности липопротеинов в связи с ее возможной ролью в механизме функционирования апо А-I как основного белка ЛПВП. Предметом исследования данной работы является природа специфической гидролитической активности липопротеинов, причины изменения структуры ДНК и запуска механизма экспрессии генов.

**Коваленко Г.А.** — к.б.н., старш.н.с. лаборатории молекулярных механизмов межклеточных взаимодействий, e-mail: [ibch@soramn.ru](mailto:ibch@soramn.ru)

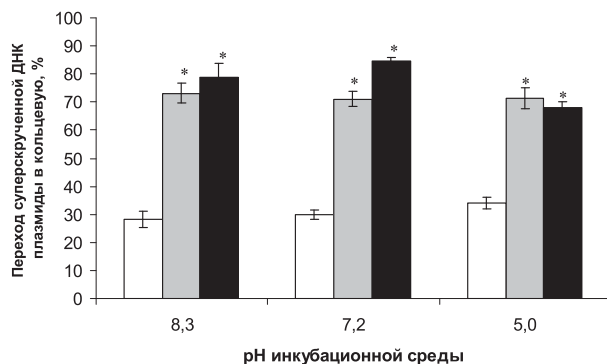
**Антипова Е.Н.** — лаборант-исследователь лаборатории молекулярных механизмов межклеточных взаимодействий, e-mail: [ibch@soramn.ru](mailto:ibch@soramn.ru)

**Князев Р.А.** — к.б.н., старш.н.с. лаборатории молекулярных механизмов межклеточных взаимодействий, e-mail: [ibch@soramn.ru](mailto:ibch@soramn.ru)

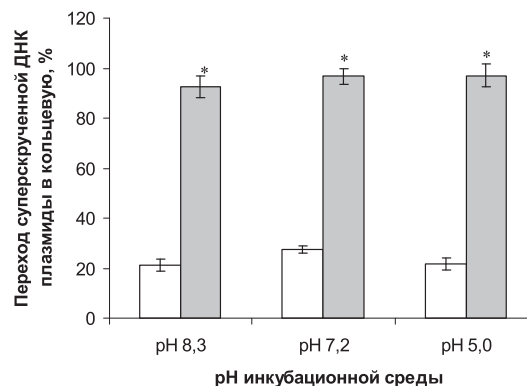
## Материал и методы

Аполипопротеин А-I выделяли из плазмы крови крыс и идентифицировали, как описано в работе [10].

В качестве субстрата для определения гидролитической или предполагаемой эндоДНКазной активности использовали ДНК плазмиды pBluescript. Выращивание бактерий и амплификацию плазмидной ДНК проводили согласно Маниатису и др. Выделение плазмидной ДНК из бактерий, очистку хлористым литием (LiCl), затем очистку на силикагеле проводили по методу Бирнбойма. Выделенную плазмиду инкубировали с рестриктазой Xba I до полного превращения суперскрученной ДНК в линейную. Линейную форму плазмидной ДНК в дальнейшем использовали в качестве контроля при электрофорезе в 0,8%-ном агарозном геле. Плазмидную ДНК хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  и использовали в качестве субстрата для определения гидролитической или эндоДНКазной активности. Последнюю определяли по методу Лебедевой [11]. Буферная смесь включала 0,05 М Трис-НСI (рН 8,3; рН 7,2; рН 5,0), 0,005 М В-меркаптоэтанол, 0,005 М  $\text{MgSO}_4$ . Реакционная смесь состояла из 40 мкл буферной смеси, 10 мкл пробы, содержащей фермент, и 2 мкл взвеси, содержащей 2–3 мкг ДНК плазмиды. Контроль на ДНК плазмиды проводили в тех же условиях, что и опытные пробы, но вместо пробы, содержащей фермент, добавляли 10 мкл  $\text{H}_2\text{O}$ . Реакцию вели при  $37^{\circ}\text{C}$  в термостате 1 час, затем останавливали добавлением 10 мкл смеси, состоящей из 10 мкл 10 % додецилсульфата натрия и 90 мкл 0,5 М ЭДТА. Пробы после остановки реакции замораживали при  $-15\ldots-20^{\circ}\text{C}$  и оставляли в морозильной камере на ночь. Реакционную смесь, полученную после гидролиза ДНК плазмиды, содержащую суперскрученную и кольцевую ДНК, разделяли в 0,8%-ном агарозном геле, сканировали и проводили компьютерный анализ



**Рис. 1.** Гидролитическая/эндоДНКазная активность липопротеинов низкой (■) и очень низкой плотности (■) при рН инкубационной среды 8,3, 7,2 и 5,0. Здесь и на рис. 2: контроль (□) – термостатированная ДНК плазмиды pBluescript; \* – достоверное отличие от контроля ( $p < 0,001$ ).



**Рис. 2.** Гидролитическая/эндоДНКазная активность липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) при рН инкубационной среды 8,3, 7,2 и 5,0.

результатов по программе «Scion Image». Показателем эндоДНКазной или другой гидролитической активности проб служила степень перехода суперскрученной формы плазмидной ДНК в кольцевую, выраженная в процентах [11].

ДНКазную активность в препаратах липопротеинов оценивали по увеличению поглощения при 260 нм кислоторастворимой фракцией, полученной после инкубации при  $37^{\circ}\text{C}$  денатурированной лососевой ДНК с препаратами липопротеинов. Для приготовления субстрата один объем 0,1 М трис-НСI буфера (рН 7,2), содержащего 0,06 М  $\text{MgSO}_4$ , соединяли с равным объемом 0,2%-ного водного раствора ДНК. Опытная инкубационная смесь содержала 0,5 мл субстрата, 0,3 мл пробы (ЛПВП или ЛПНП или ЛПОНП) и 0,2 мл воды. Контрольные инкубационные смеси содержали: 0,5 мл субстрата и 0,5 мл воды (контроль на субстрат); 0,3 мл пробы (липопротеинов) и 0,7 мл воды (контроль на фермент). После 60 мин инкубации при  $37^{\circ}\text{C}$  реакцию останавливали добавлением 1 мл 1 н хлорной кислоты в реакционную смесь на холоду. Пробы охлаждали 30–40 мин в ледяной бане, смесь центрифугировали при 7000–10 000 g 15–20 мин. Супернатант доводили водой до 2,5 мл. Оптическую плотность измеряли при 260 нм против воды. Величину экстинкции в контролях на ДНК и на фермент вычитали из величины экстинкции опытных проб [12].

## Результаты и обсуждение

Панин и его сотрудники в своих исследованиях выявили стимулирование макрофаг-зависимого белкового синтеза при кооперативном взаимодействии ЛПВП и кортизола в печени и других органах и тканях крыс линии Wistar [13]. Было также показано влияние комплекса «тетрагидрокортизол – аполипопротеин А-I» на вторичную структуру ДНК эукариот [8, 9]: появление односторонних последовательностей в сайтах связывания и стимуляцию синтеза копий ДНК, т. е. репликационного синтеза ДНК эукариот [14].

Учитывая непосредственное участие нуклеаз и, в частности, флeпeндонуклеазы-1 в процессах метаболизма ДНК в клетках эукариот [15], в настоящей работе была поставлена задача исследовать специфическую гидролитическую или, возможно, эндоДНКазную активность липопротеинов высокой, низкой и очень низкой плотности по степени перехода суперскрученной формы плазмиды в кольцевую.

На рис. 1, 2 показана гидролитическая/эндоДНКазная активность всех трех типов липопротеинов. Поскольку гидролитическую активность оценивали по превращению суперскрученной формы плазмиды pBluescript в кольцевую, можно предположить присутствие эндоДНКазной активности, т. е. nickирование суперскрученного кольца плазмиды и переход ее в кольцевую. Однако методом малоуглового рентгеновского рассеяния было показано, что при взаимодействии ДНК эукариот с комплексом «тетрагидрокортизол – аполиппротеин А-1» происходит частичное нарушение вторичной структуры нативной ДНК и ее локальное плавление. По предположению авторов, это характеризует картину ферментативного механизма взаимодействия тетрагидрокортизола с ДНК, приводящего к разрыву водородных связей между парами азотистых оснований комплементарных нитей ДНК эукариот [9, 16]. Можно предположить, что переход суперскрученной ДНК плазмиды в кольцевую происходит по тому же механизму, тогда липопротеины не должны обладать ферментативной эндоДНКазной активностью. В подтверждение этого предположения была проверена ДНКазная активность липопротеинов по увеличению поглощения при 260 нм кислоторастворимой фракцией, полученной после инкубации при 37 °С липопротеинов с денатурированной лососевой ДНК. Если изменения вторичной структуры происходят за счет разрыва водородных связей между парами азотистых оснований в ДНК, то тогда сохраняется целостность самой нити денатурированной лососевой ДНК. Даже при глубоком гидролизе при осаждении реакционной смеси (целостной одонитевой ДНК) 1 н хлорной кислотой не образуется кислоторастворимой фракции и не наблюдается увеличения поглощения при 260 нм. При исследовании ДНКазной активности (рН 7,2) липопротеинов оказалось, что липопротеины не обладают ДНКазной активностью. В подтверждение полученных результатов при гидролизе плазмидной ДНК мы получили 100%-ный переход суперскрученной ДНК в кольцевую, но не наблюдали гидролиза кольцевой ДНК до олигонуклеотидов и мононуклеотидов. Из этого следует, что при взаимодействии липопротеинов с ДНК плазмиды, а также с ДНК эукариот, не происходит нуклеазного гидролиза, а происходит, в подтверждение результатов исследований Панина с сотр. [9, 14, 16], расплетание комплементарных нитей ДНК и образование одонитевых участков в структуре ДНК, что и является инициацией процессов транскрипции.

## Список литературы

1. Панин Л.Е., Поляков Л.М., Розуменко А.А., Биушкина Н.Г. Транспорт стероидных гормонов липопротеинами крови // Вопр. мед. химии. 1988. (5). 56–58.
2. Панин Л.Е., Поляков Л.М., Часовских М.И. Липопротеины – уникальная транспортная система для ксенобиотиков и биологически активных веществ // Успехи соврем. биол. 1992. 112. (4). 601–608.
3. Панин Л.Е., Поляков Л.М., Часовских М.И. Lipoproteins is unique transport system for xenobiotics and biologically active substances // Uspekhi sovrem. biol. 1992. 112. (4). 601–606.
4. Поляков Л.М., Панин Л.Е. Липопротеиновая регуляция метаболических процессов // Успехи соврем. биол. 2000. 120. (3). 1–16.
5. Поляков Л.М., Панин Л.Е. Lipoprotein regulation of metabolic processes // Uspekhi sovrem. biol. 2000. 120. (3). 1–16.
6. Панин Л.Е., Останина Л.С., Атучина Н.В. Иммунохимический анализ общих антигенных детерминант в молекуле инсулина и аполиппротеина В // Бюл. экспер. биол. и мед. 1994. 68. (9). 258–261.
7. Панин Л.Е., Останина Л.С., Атучина Н.В. Immunochemical analysis of common antigenic determinants in insulin and apoprotein B // Bul. eksper. biol. and med. 1994. 118. (9). 258–261.
8. Панин Л.Е., Максимов В.Ф., Коростышевская И.М. Влияние глюкокортикоидов и липопротеинов высокой плотности на активность ядерного аппарата гепатоцитов // Бюл. экспер. биол. и мед. 1999. 128. (12). 650–653.
9. Панин Л.Е., Максимов В.Ф., Коростышевская И.М. Effect of glucocorticoids and high density lipoproteins in the activity of hepatocyte nuclear apparatus // Bul. eksper. biol. and med. 1999. 128. (12). 650–653.
10. Панин Л.Е., Свечникова И.Г., Маянская Н.Н. Кооперативный эффект липопротеинов высокой плотности и адаптивных гормонов в активации хроматина печени крыс // Укр. биохим. журн. 1995. 67. (2). 64–70.
11. Панин Л.Е., Свечникова И.Г., Маянская Н.Н. Cooperative effect of high density lipoproteins and adaptive hormones in chromatin activation in rat liver // Ukr. biokhim. zhurn. 1995. 67. (2). 64–70.
12. Панин Л.Е., Гимаутдинова О.И., Поляков Л.М., Наякшина Т.Н. Особенности взаимодействия кортизола, тетрагидрокортизола и их комплексов с аполиппротеином А-1 с эукариотической ДНК // Мол. биол. 1998. 32. (3). 447–451.
13. Панин Л.Е., Гимаутдинова О.И., Поляков Л.М., Наякшина Т.Н. Characteristics of interaction of cortisol, tetrahydrocortisol, and their complexes with apolipoprotein A-I with eukaryotic DNA // Mol. biol. 1998. 32. (3). 447–451.



8. Панин Л.Е., Гимаутдинова О.И., Кузнецов П.А. и др. Структура сайтов взаимодействия ДНК эукариот с комплексами «стероидный гормон – аполипопротеин А-I» // Мол. биол. 2007. 41. (4). 647–653.
- Panin L.E., Gimautdinova O.I., Kuznetsov P.A. et al. Structure of the interaction sites of eukaryotic DNA with steroid hormone-apolipoprotein A-I complexes // Mol. biol. 2007. 41. (4). 647–653.
9. Панин Л.Е., Тузигов Ф.В., Тузикова Н.А., Поляков Л.М. Особенности взаимодействия комплексов «кортизол – аполипопротеин А-I» и «тетрагидрокортизол – аполипопротеин А-I» с эукариотической ДНК // Мол. биол. 2006. 40. (2). 1–10.
- Panin L.E., Tuzikov F.V., Tuzikova N.A., Poliakov L.M. Features of interaction of complexes «cortisol – apolipoprotein A-I» and «tetrahydrocortisol – apolipoprotein A-I» with eukaryotic DNA // Mol. biol. 2006. 40. (2). 300–309.
10. Hatch F.T., Less R.S. Practical method for plasma lipoprotein analysis // Adv. Lipid. Res. 1968. 6. 2–68.
11. Лебедева Л.Г., Александрова С.С., Баснакьян А.Г., Вотрин И.И. Характеристика ядерных эндоДНКаз печени крыс по молекулярной массе и катионной зависимости // Биохимия. 1995. 60. (5). 798–804.
- Lebedeva L.G., Alexandrova S.S., Basnakian A.G., Votrin I.I. In vitro proteolysis of endonucleases in rat liver nuclei extracts // Biokhimiya. 1995. 35. (2). 433–440.
12. Kovalenko G.A., Popova N.A., Tsvetsevidze D.K., Salganik R.I. Correlation between deoxyribonuclease activity in mink serum and resistance to Aleutian disease // Scientifur. 1994. 18. (2). 131–134.
13. Панин Л.Е. Явление стимуляции резидентными макрофагами биосинтеза белка в паренхимных клетках органов и тканей в процессе регенерации // Бюл. СО РАМН. 1998. (3). 11–23.
- Panin L.E. The phenomenon of stimulation by resident macrophages biosynthesis of proteins in parenchymal cells of organs and tissues in the processing of regeneration // Bul. SO RAMN. 1998. (3). 11–23.
14. Гимаутдинова О.И., Панин Л.Е., Кузнецов П.А., Еттиянова-Акимжанова М.В. Специфические изменения вторичной структуры ДНК эукариот под влиянием комплекса «тетрагидрокортизол – аполипопротеин А-I» // Мол. биол. 2002. 36. (1). 103–105.
- Gimautdinova O.I., Panin L.E., Kuznetsov P.A., Ettianova-Akimzhanova M.V. Specific alterations in the secondary structure of eukaryotic DNA effected by «a tetrahydrocortisol – apolipoprotein A-I» complex // Mol. biol. 2002. 36. (1). 103–105.
15. Назаркина Ж.К., Лаврик О.И., Ходырева С.Н. Флепэндонуклеаза-1 и ее роль в процессах метаболизма ДНК в клетках эукариот // Мол. биол. 2008. 42. (3). 405–421.
- Nazarkina Zh.K., Lavrik O.I., Khodyreva S.N. Flap endonuclease-1 and its role in the processes of DNA metabolism in eukaryotic cells // Mol. biol. 2008. 42. (3). 405–421.
16. Панин Л.Е., Тузигов Ф.В., Тузикова Н.А. и др. Влияние комплекса «тетрагидрокортизол – аполипопротеин А-I» на взаимодействие РНК-полимеразы с эукариотической ДНК и на скорость биосинтеза белка в гепатоцитах // Биоорган. хим. 2001. 27. (2). 114–119.
- Panin L.E., Tuzikov F.V., Tuzikova N.A. et al. Effect of «tetrahydrocortisol – apolipoprotein A-I» complex on RNA polymerase interaction with eukaryotic DNA and the rate of protein biosynthesis in hepatocytes // Bioorgan. khim. 2001. 27.(2). 114–119.

## SPECIFIC HYDROLYTIC ACTIVITY OF LIPOPROTEINS

Galina Andreevna KOVALENKO, Elena Nikolaevna ANTIPOVA, Roman Aleksandrovich KNYZEV

Scientific Research Institute of Biochemistry SB RAMS  
630117, Novosibirsk, Timakov st., 2

It has been shown that under action of lipoproteins there is a change of the super braided structure of pBluescript plasmid DNA and its conversion to the ring by rupture of hydrogen bonds between the nitrogenous base pairs of DNA complementary threads. The plasmid super braided form conversion to ring as a result of presence of endo-DNA activity in a lipoprotein molecule is not found out. Proteins of lipoproteins do not contain endo-DNA activity.

**Key words:** super braided and ring plasmid, denatured salmon DNA, high, low and very low density lipoproteins, hydrolytic activity, endo-DNA activity.

**Kovalenko G.A.** – candidate of biological sciences, the senior scientific researcher of laboratory of molecular mechanisms of intercellular interactions, e-mail: [ibch@soramn.ru](mailto:ibch@soramn.ru)

**Antipova E.N.** – the research assistant of laboratory of molecular mechanisms of intercellular interactions, e-mail: [ibch@soramn.ru](mailto:ibch@soramn.ru)

**Knyazev R.A.** – candidate of biological sciences, the senior scientific researcher of laboratory of molecular mechanisms of intercellular interactions, e-mail: [ibch@soramn.ru](mailto:ibch@soramn.ru)