

УДК 577.151.4

МОДУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ НУКЛЕАЗЫ КРОЛИКА S-АДЕНОЗИЛ-*L*-МЕТИОНИНОМ

Д.Е. Соболев¹, Б.Ф. Ванюшин²

(кафедра биохимии; e-mail: morang@list.ru)

В экстракте из митохондрий печени кролика обнаружена эндонуклеазная активность, которая по свойствам сходна с животной эндонуклеазой G. Эта активность выявлена в белковой фракции с молекулярной массой около 30 кДа, она стимулируется ионами Mg^{2+} и ингибируется ионами Zn^{2+} . В отличие от растительных эндонуклеаз WEN1 и WEN2 она не чувствительна к статусу метилирования субстратных ДНК и ингибируется S-аденозил-*L*-метионином.

Ключевые слова: митохондрии, эндонуклеаза G, S-аденозил-*L*-метионин, метилирование.

Эндонуклеаза G, изначально обнаруженная в ядрах незрелых куриных эритроцитов, получила свое название за предпочтительное расщепление последовательностей $(dG)_n \cdot (dC)_n$ при $n \geq 9$ [1]. Позже было показано, что фермент локализован в межмембранном пространстве митохондрий [2, 3]. Эндонуклеаза G кодируется в ядре и содержит на N-конце сигнальную последовательность, обеспечивающую транспорт фермента в митохондрии [4]. Она найдена у животных и грибов, есть также указания на возможное ее наличие у растений [5].

Эндонуклеаза G принадлежит к семейству $\beta\alpha$ -Me-finger ДНК/РНК-неспецифичных нуклеаз. Она присутствует в клетке в форме гомодимера с молекулярной массой субъединиц около 29 кДа [3, 6]. Активность эндонуклеазы G зависима от ионов Mg^{2+} и Mn^{2+} и ингибируется ЭДТА, ионами Zn^{2+} и Fe^{2+} и высокой ионной силой (свыше 50–75 мМ KCl). Фермент активен в широком диапазоне pH (от 5 до 9). Эндонуклеаза G расщепляет РНК, одно- и двухцепочечные ДНК с образованием 3'-ОН и 5'-фосфатной группы [1, 3, 7, 8].

Предполагается, что эндонуклеаза G может участвовать в репликации и репарации мтДНК [9–11]. Она участвует в деградации ядерной ДНК при запрограммированной гибели клеток (ЗГК). Высвобождение эндонуклеазы G из межмембранного пространства митохондрий (совместно с цитохромом c и другими белками) происходит при воздействии продуцированного каспазой-8 белка tBID [12]. Высвобожденная эндонуклеаза G осуществляет межнуклеосомную фрагментацию ядерной ДНК [13]. Роль эндонуклеазы G в ЗГК подтверждается фенотипическими

изменениями у нокаутных по ее гену организмов, в том числе нарушениями фрагментации ДНК при ЗГК [14, 15].

Ранее мы выделили и охарактеризовали эндонуклеазы WEN1 и WEN2 из содержащих митохондрии везикул, образующихся в гибнущих клетках coleoptila пшеницы *Triticum aestivum* L. [16, 17]. Предположительно, они могут принимать участие в запрограммированной гибели клеток coleoptila. Мы показали их чувствительность к статусу метилирования субстратной ДНК и регуляцию их активности S-аденозил-*L*-метионином и его аналогами, что характерно также для бактериальных эндонуклеаз рестрикции [18]. По некоторым своим свойствам (молекулярная масса, зависимость ферментативной активности от ионов двухвалентных металлов, предположительно митохондриальная локализация) эндонуклеаза пшеницы WEN1 сходна с эндонуклеазой G. До сих пор не было убедительно доказано наличие эндонуклеазы G у растений, хотя сходный по свойствам фермент был обнаружен в межмембранном пространстве митохондрий растений *Arabidopsis thaliana* и частично охарактеризован [5].

До сих пор о возможной модуляции действия эндонуклеаз животных S-аденозил-*L*-метионином сведения в литературе отсутствуют.

В настоящей работе мы исследовали влияние S-аденозил-*L*-метионина (SAM) и его лишённого метильной группы аналога S-аденозил-*L*-гомоцистеина (SAH) на эндонуклеолитическую активность, выделенную из митохондрий печени кролика, а также изучили зависимость этой активности от статуса метилирования расщепляемой ДНК.

¹ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, 127550 Москва, ул. Тимирязевская, 42.

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва.

Сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, ДТТ — дитиотреитол, ЗГК — запрограммированная гибель клеток, ТВЕ — Tris-боратный буфер, содержащий ЭДТА, ФМСФ — фенилметилсульфонилфторид, SAH — S-аденозил-*L*-гомоцистеин, SAM — S-аденозил-*L*-метионин.

Материалы и методы

Выделение митохондрий и экстракция белка

Выделение митохондрий производили при 4°C. Ткань свежее извлеченной печени кролика *Oryctolagus cuniculus* L. помещали в буфер для гомогенизации (25 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 150 mM NaCl, 300 mM сахара, 5 mM ЭДТА · Na, 2,5 mM ДТТ, 1 mM ФМСФ), 5 мл буфера/г ткани. Ткань гомогенизировали в ножевом гомогенизаторе и затем в поршневом стеклянном гомогенизаторе. Гомогенат дважды фильтровали через 4 слоя марли.

Отфильтрованный гомогенат дважды центрифугировали 10 мин при 750 g для удаления тяжелых органелл и недоразрушившихся клеток и полученные осадки отбрасывали. Супернатант фильтровали через 2 слоя марли.

Супернатант центрифугировали 15 мин при 17 500 g. Полученный супернатант отбрасывали, предварительно удалив с его поверхности остатки липидов. Верхнюю коричневую часть осадка ресуспендировали в небольшом объеме буфера для гомогенизации, переносили в чистые центрифужные стаканы и дважды промывали буфером для гомогенизации. Промытый осадок ресуспендировали в буфере хранения (50 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM ЭДТА · Na, 2,5 mM ДТТ, 1 mM ФМСФ, 15% глицерин), 0,1 мл буфера/г исходной ткани печени.

Для экстракции белков из полученной суспензии митохондрий к ней добавляли 1 объем буфера лизиса (50 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 mM ЭДТА · Na, 2,5 mM ДТТ, 1 mM ФМСФ, 1%-й Тритон X-100). Смесь гомогенизировали в стеклянном поршневом гомогенизаторе и инкубировали при 4°C в течение 20 мин при помешивании. Полученный лизат центрифугировали 120 мин при 48 400g и отбирали супернатант — суммарный экстракт митохондрий.

Определение эндонуклеазной активности

В качестве субстрата для определения эндонуклеазной активности использовали *dam*, *dcm*-метилированную (+) и неметилированную (–) ДНК фага λ (Fermentas) или их смесь в пропорции 1:1 (в опытах, где статус метилирования субстратной ДНК не указан). Метилированная фаговая ДНК содержит остатки 5-метилцитозина в последовательностях Cm⁵CWGG и N⁶-метиладенина в последовательностях Gm⁶ATC. Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 0,6 мкг ДНК, 10 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 0,5 мкл митохондриального экстракта (контроль), а также, где это указано, S-аденозил-L-метионинхлорид, S-аденозил-L-гомоцистеин, MgCl₂ и ZnSO₄ (опыт). Смеси инкубировали при 37°C в течение 2 ч, добавляли 2 мкл 6× буфера для нанесения на гель (10 mM Трис-HCl pH 7,6, 0,03% бромфеноловый синий, 0,03% ксиленианол, 60% глицерин, 60 mM ЭДТА) (Fermentas) и наносили на 0,75%-й агарозный гель в трис-борт-

ном буфере pH 8,3, содержащем 0,0005%-й бромистый этидий. Электрофорез проводили при напряжении 7,5 В/см до пробега бромфенолового синего 7 см в геле и продукты гидролиза ДНК визуализировали в УФ-свете.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле. Разделение белков производили по методике Laemmli (Laemmli 70) в 4%-м концентрирующем и 12%-м разделяющем гелях. Гели окрашивали нитратом серебра по методике [20].

Определение эндонуклеазной активности в геле. В разделяющий полиакриламидный гель для вертикального электрофореза белков при его приготовлении добавляли ДНК из тимуса телят до конечной концентрации 40 мкг/мл. После электрофореза гель для удаления SDS однократно промывали в 0,5%-м растворе Тритон X-100 в течение 20 мин и четырехкратно в дистиллированной воде в течение 20 мин. Затем гель переносили в буфер, содержащий 25 mM Трис-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, и инкубировали в течение ночи в закрытой чашке Петри при 37°C. Затем в буфер с гелем добавляли бромистый этидий до концентрации 0,0025% и после 15 мин инкубации зоны гидролиза ДНК в визуализировали в УФ-свете.

Определение концентрации белка производили по микроварианту метода Bradford [21] с использованием БСА в качестве стандарта.

Результаты и их обсуждение

Митохондрии печени кролика были выделены при помощи дифференциального центрифугирования на основе описанных в литературе методик [22, 23]. В экстракте из них была обнаружена нуклеазная активность с кажущейся молекулярной массой около 30 кДа (рис. 1), что соответствует массе мономера эндонуклеазы G [3]. Эндонуклеазная активность, присутствующая в митохондриальном экстракте, стимулируется ионами Mg²⁺ и ингибируется ионами Zn²⁺ (рис. 1), что тоже характерно для эндонуклеазы G [7].

Исследована зависимость действия эндонуклеазной активности митохондриального экстракта на субстратные ДНК от статуса их метилирования и от S-аденозил-L-метионина и S-аденозил-L-гомоцистеина. В качестве субстрата использованы неметилированная (*dam*–, *dcm*–) и метилированная по сайтам Gm⁶ATC и Cm⁵CWGG (*dam*+, *dcm*+) ДНК фага λ . Эти ДНК идентичны по длине, нуклеотидной последовательности и концентрации в реакционной смеси. Найденная эндонуклеаза расщепляет оба эти субстрата примерно одинаково (рис. 2), что отличает ее от эндонуклеаз пшеницы WEN1 и WEN2, предпочтительно расщепляющих соответственно метилированную и неметилированную ДНК [16, 17].

S-аденозил-L-метионин заметно подавляет расщепление субстратных ДНК в присутствии ионов Mg²⁺. S-аденозил-L-гомоцистеин, который по сравнению с SAM не имеет метильной группы, не влияет

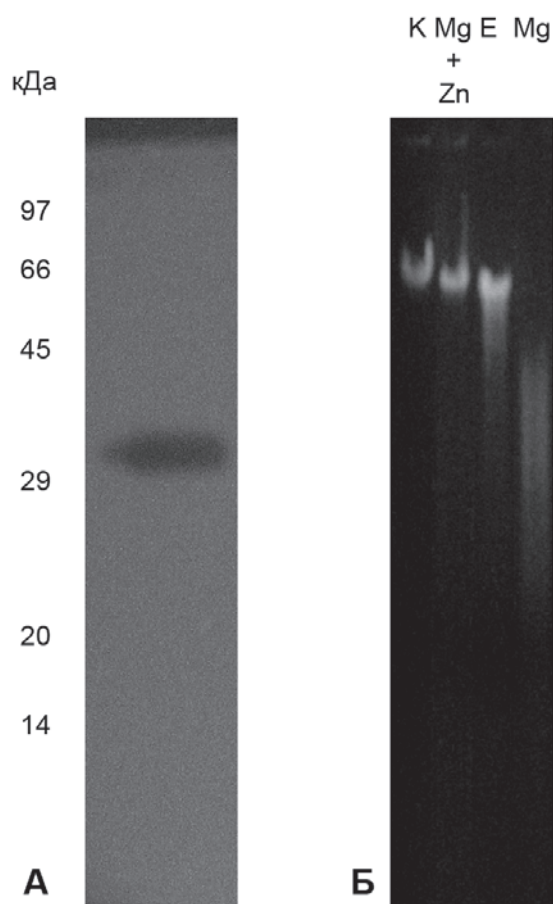


Рис. 1. **А** — эндонуклеазная активность суммарного белкового экстракта митохондрий в 12% ПААГ с вплавленной в гель тимусной ДНК; **Б** — зависимость эндонуклеазной активности суммарного белкового экстракта митохондрий (800 нг белка) от ионов Mg^{2+} и Zn^{2+} (5 мМ). К — контроль, Е — ионы металлов не добавлялись



Рис. 2. Зависимость эндонуклеазной активности суммарного белкового экстракта митохондрий (800 нг белка) от SAM и SAH (2 мМ) и статуса метилирования субстратной ДНК (–, dam, dcm-неметилированная ДНК; +, dam, dcm-метилированная ДНК) в присутствии Mg^{2+} (5 мМ). К — контроль

на эндонуклеазную активность (рис. 2). Это отличается изученную животную митохондриальную эндонуклеазную активность от пшеничной эндонуклеазы WEN1, которая, напротив, активируется SAM, SAH и SiBA [16].

Таким образом, эндонуклеазная активность из экстракта митохондрий кролика, соответствующая по свойствам эндонуклеазе G, не различает субстратные ДНК по статусу их метилирования. Чувствительность к статусу метилирования субстратной ДНК известна для охарактеризованных нами эндонуклеаз проростков пшеницы WEN1 и WEN2 [16, 17]

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ruiz-Carrillo A., Renaud J. Endonuclease G: a $(dG)_n \cdot (dC)_n$ -specific DNase from higher eukaryotes // EMBO Journal. 1987. Vol. 6. N 2. P. 401–407.
2. Ohsato T., Ishihara N., Muta T., Umeda S., Ikeda S., Mihara K., Hamasaki N., Kang D. Mammalian mitochondrial endonuclease G. Digestion of R-loops and localization in intermembrane space // Eur. J. Biochem. 2002. N 269. P. 5765–5770.

и некоторых бактериальных эндонуклеаз рестрикции (в том числе принадлежащих, как и эндонуклеаза G, к $\beta\alpha$ -Me-finger-семейству) [24, 25]. Реакция митохондриального фермента животных на SAM (ингибирование активности) противоположна характерной для SAM-зависимых эндонуклеаз рестрикции и WEN1 активации под действием SAM. Поэтому, в отличие от известных растительных и бактериальных эндонуклеаз, SAM не является позитивным аллостерическим эффектором для животной митохондриальной эндонуклеазы.

3. Davies A.M., Hershman S., Stabley G.J., Hoek J.B., Peterson J., Cahill A. A Ca^{2+} -induced mitochondrial permeability transition causes complete release of rat liver endonuclease G activity from its exclusive location within the mitochondrial intermembrane space. Identification of a novel endo-exonuclease activity residing within the mitochondrial matrix // Nucleic Acids Res. 2003. Vol. 31. N 4. P. 1364–1373.

4. Oda K., Kawasaki N., Fukuyama M., Ikeda S. Ectopic expression of mitochondria endonuclease Pnu1p from *Schizosaccharomyces Pombe* induces cell death of the yeast // J. Biochem. and Mol. Biol. 2007. Vol. 40. N 6. P. 1095–1099.
5. Balk J., Chew S.K., Leaver C.J., McCabe P.F. The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death // Plant J. 2003. N 34. P. 573–583.
6. Loll B., Gebhardt M., Wahle E., Meinhart A. Crystal structure of the EndoG/EndoGI complex: mechanism of EndoG inhibition // Nucleic Acids Res. 2009. Vol. 37. N 21. P. 7312–7320.
7. Widlak P., Li L.Y., Wang X., Garrard W.T. Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. N 51. P. 48404–48409.
8. Widlak P., Garrard W.T. Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G // J. Cell. Biochem. 2005. N 94. P. 1078–1087.
9. Côté J., Ruiz-Carrillo A. Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G // Science. 1993. Vol. 261. N 5122. P. 765–769.
10. Zassenhaus H.P., Denniger G. Analysis of the role of the NUC1 endo/exonuclease in yeast mitochondrial DNA recombination // Current Genetics. 1994. Vol. 25. N 2. P. 142–149.
11. Ikeda S., Ozaki K. Action of mitochondrial endonuclease G on DNA damaged by L-ascorbic acid, peplomycin, and cis-diamminedichloroplatinum (II) // Biochem. and Biophys. Res. Comm. 1997. Vol. 235. N 2. P. 291–294.
12. van Loo G., Schotte P., van Gurp M., Demol H., Hoorelbeke B., Gevaert K., Rodriguez I., Ruiz-Carrillo A., Vandekerckhove J., Declercq W., Beyaert R., Vandenaabeele P. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation // Cell Death and Differentiation. 2001. Vol. 8. N 12. P. 1136–1142.
13. Li L.Y., Luo X., Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria // Nature. 2001. Vol. 412. N 6842. P. 95–99.
14. Parrish J., Li L., Klotz K., Ledwich D., Wang X., Xue D. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans* // Nature. 2001. Vol. 412. N 6842. P. 90–94.
15. Büttner S., Eisenberg T., Carmona-Gutierrez D., Ruli D., Knauer H., Ruckenstuhl C., Sigrist C., Wissing S., Kollroser M., Fröhlich K.U., Sigrist S., Madeo F. Endonuclease G regulates budding yeast life and death // Mol. Cell. 2007. Vol. 25. N 2. P. 233–246.
16. Fedoreyeva L.I., Sobolev D.E., Vanyushin B.F. Wheat endonuclease WEN1 dependent on S-adenosyl-L-methionine and sensitive to DNA methylation status // Epigenetics. 2007. Vol. 2. N 1. P. 50–53.
17. Федорева Л.И., Соболев Д.Е., Ванюшин Б.Ф. S-Аденозил-L-метионинзависимая и чувствительная к статусу метилирования ДНК эндонуклеаза WEN2 из колеоптилей пшеницы // Биохимия. 2008. Т. 73. № 9. С. 1243–1251.
18. Sistla S., Rao D.N. S-Adenosyl-L-methionine-dependent restriction enzymes // Critical reviews in biochemistry and molecular biology. 2004. Vol. 39. N 1. P. 1–19.
19. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227. N 5259. P. 680–685.
20. Merrill C.R., Goldman D., Sedman S.A., Ebert M.H. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins // Science. 1981. Vol. 211. N 4489. P. 1437–1438.
21. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
22. Cummings O.W., King T.C., Holden J.A., Low R.L. Purification and characterization of the potent endonuclease in extracts of bovine heart mitochondria // J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262. N 5. P. 2005–2015.
23. Low R.L., Gerschenson M. Endonuclease G isolation and assays // Methods in Molecular Biology. 2002. Vol. 197. P. 331–349.
24. Yang W. Nucleases: diversity of structure, function and mechanism // Quarterly Rev. of Biophys. 2011. Vol. 44. N 1. P. 1–93.
25. Sir Richard J. Roberts. REBASE — The Restriction Enzyme Database. (URL: <http://rebase.neb.com> 01.12.2011).

Поступила в редакцию
15.05.12

MODULATION OF THE RABBIT MITOCHONDRIAL ENDONUCLEASE ACTION BY S-ADENOSYL-L-METHIONINE

D.E. Sobolev, B.F. Vanyushin

Endonuclease activity found in rabbit liver mitochondrial extract is similar to known endonuclease G: it has an apparent molecular mass value of about 30 kDa, it depends on Mg^{2+} and is inhibited with Zn^{2+} . Unlike WEN1 and WEN2 plant endonucleases it is unsensitive to DNA methylation status and inhibited with S-adenosyl-L-methionine.

Key words: mitochondria, endonuclease G, S-adenosyl-L-methionine, methylation.

Сведения об авторах

Соболев Дмитрий Евгеньевич — специалист, науч. сотр. ГНУ ВНИИСБ Россельхозакадемии. Тел.: 8-495-939-54-12, +7-903-204-48-27; e-mail: morang@list.ru

Ванюшин Борис Федорович — докт. биол. наук, проф., чл.-корр. РАН, зав. отделом молекулярных основ онтогенеза, Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939 54-12, e-mail: vanyush@belozersky.msu.ru