

Ispitivanje inhibicije dezoksiribonukleaze I (DNaze I) dietil etrom

Ispitivan je uticaj dietil etra, jedinjenja koje poseduje osobine inhalacionih anestetika, na enzim dezoksiribonukleazu I (DNazu I). DNaza I, izolovana iz goveđe jetre, tretirana je različitim zapreminama iste koncentracije dietil etra. Korišćene su zapremine od 500 µL, 750 µL, 1 mL i 1.5 mL. Nakon tretiranja etrom, određena je aktivnost DNaze I. Enzimska aktivnost određena je poređenjem apsorbanca DNK merene na 260 nm pre i nakon tretiranja uzorcima enzima. Stepem inhibicije enzima određen je poređenjem uzoraka tretiranih i nertiranih etrom. Rezultati pokazuju da stepen inhibicije enzimске aktivnosti DNaze I raste sa povećanjem količine etra kojom se enzim tretira.

Uvod

Dietil etar (etar, etiletar, etoksietan, $(C_2H_5)_2O$) je organsko jedinjenje bez boje, karakterističnog mirisa, tečnog agregatnog stanja, veoma isparljivo. U kombinaciji sa opijumom ovo jedinjenje pokazuje osobine inhalacionih anestetika (Hill i Kolb 2004). Dietil etar je po svojoj nameni i osobinama sličan halotanu, komercijalno korišćenom anestetiku. Do sada su vršena mnoga istraživanja u kojima su ispitivani uticaji halotana na metaboličke procese ćelije. Rezultati tih istraživanja pokazuju da halotan izaziva anomalije u nukleusu fibroblasta (Sturrock i Nunn 1976), anomalije na hromozomima sisara (Kusyk i Hsu 1976) i smanjenu sintezu DNK (Cullen *et al.* 1972). Studije takođe pokazuju da se halotan ponaša kao inhibitor nekih enzima, od kojih je jedan dezoksiribonukleaza I (Reitz *et al.* 1982).

Dezoksiribonukleaza I (DNaza I) je endonukleaza koja hidrolizuje DNK raskidajući fosfodiesterne veze među nukleotidima koji na svom 3' kraju imaju slobodnu hidroksilnu grupu. DNaza I se smatra enzimom odgovornim za fragmentaciju lanca DNK u apoptozi. Mehanizam inhibicije DNaze I halotanom nije u potpunosti ispitan. Pretpostavlja se da dolazi do interferencije hidrofobnih grupa halotana sa hidrofobnim grupama DNaze I. Ugrađujući se između hidrofobnih grupa DNaze I, halotan joj menja strukturu, čime sprečava njenu enzimsku aktivnost. Inhibirajući DNazu I, halotan onemogućava hidrolizu DNK, što sprečava odvijanje osnovnih metaboličkih procesa u ćeliji. Poremećaj osnovnih metaboličkih procesa u ćeliji prouzrokuje promene na nivou celog organizma.

U do sada vršenim istraživanjima stepen inhibicije DNaze I halotanom određivan je poređenjem apsorbanca DNK koja je bila ponuđena kao supstrat DNazi I. Osobina DNK primenjena pri određivanju stepena inhibicije enzima naziva se hiperhromni efekat. Po hiperhromnom efektu, apsorbanca native, dvolančane DNK je 30-40% manja od apsorbanca denaturisane DNK. Ovaj efekat je posledica interakcije među azotnim bazama, koje su u dvolančanoj DNK vezane tako da prilikom apsorbovanja kvanta svetlosti i pomeranja elektrona jedne baze dolazi do izmena u električnom polju oko susedne baze. U slobodnim nukleotidima veze među azotnim bazama nisu tako jake, te zbog toga dolazi do veće apsorpcije svetlosti talasne dužine 260 nm.

Budući da je dietil etar hidrofobno jedinjenje slične namene, strukture i osobina kao halotan, može se pretpostaviti da će interferirati sa hidrofobnim grupama DNaze I na isti način. Stoga je u ovom radu ispitivan inhibični uticaj dietil etra na aktivnost DNaze I.

Vanja Radišić (1995), Arilje, Dragojla Stojića 2, učenica 2. razreda Srednje škole „Sveti Ahilije” u Arilju

*MENTORI:
Luka Mihajlović, diplomirani biohemičar, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu*

Aleksej Drino, student molekularne biologije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu

Materijal i metode

Supstrat za DNazu I, DNK, izolovan je iz crnog luka. DNaza I je za potrebe istraživanja izolovana iz homogenata goveđe jetre amonijum-sulfatnom precipitacijom. Taloženja su vršena sa zasićenjima od 20%, 60% i 80%, a zatim je određena enzimaska aktivnost svakog od precipitata, kao i samog homogenata. U daljem eksperimentu je korišćen uzorak sa najvećom enzimskom aktivnošću. Uzorak je prečišćen ekskluzivnom hromatografijom, nakon čega je dobijeno 5 prečišćenih frakcija u kojima je izmerena aktivnost enzima. Frakcija u kojoj je enzimaska aktivnost bila najveća tretirana je etrom.

Izolovanje DNK iz crnog luka

DNK je izolovana iz crnog luka (*Alium cepa*) po standardnom protokolu opisanom u radu Wang i saradnika (1994), modifikovanom tako što je umesto NaI korišćen KI. Da bi se procenila čistoća uzorka merena je apsorbance na 260 i 280 nm (CECIL 2021, model 2000, Cambridge, UK). Uzorak je tretiran natrijum-hidroksidom, a zatim je izmerena promena apsorbance na 260 nm, kako bi bilo provereno da li se u njemu nalazi dvolančana DNK, a ne samo slobodni nukleotidi.

Izolovanje DNaze I iz goveđe jetre

Uzorak iz kog je izolovana DNaza I pripremljen je homogenizacijom 100 g goveđe jetre prelivene sa 200 mL TRIS-EDTA pufera (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 0.02% Na₃N, pH = 7). Homogenat je centrifugiran 20 minuta na 3800 G. Iz dobijenog supernatanta istaloženi su proteini, amonijum-sulfatnom precipitacijom po standardnom protokolu (Vujčić 2002). Taloženje proteina je vršeno pri zasićenjima supernatanta od 20%, 60% i 100%. Svako od zasićenja je centrifugirano na 3800 G i dobijeni talog je rastvoren u 7 mL pufera (0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.02% NaNO₃, 25 mM fosfat, pH = 1.6). U daljoj analizi korišćeni su rastvoreni precipitati (20%, 60%, 100%) i homogenat.

Prisustvo DNaze I u amonijum-sulfatnim precipitatima i homogenatu određeno je merenjem promene apsorbance DNK na 260 nm nakon njenog tretiranja ovim uzorcima. Reakciona smeša sa uzorkom enzima (10 μL DNK, 200 μL uzorka i 2 mL destilovane vode) inkubirana je 30 minuta na 37°C. Nakon inkubacije meri se apsorbance smeše na 260 nm i

poredi sa apsorbancom kontrole (10 μL DNK i 2.2 mL destilovane vode). Apsorbance reakcione smeše u kojoj se nalazi uzorak sa DNazom I pokazuje najveće odstupanje od apsorbance kontrolnog uzorka. Merenja su ponovljena tri puta.

Uzorak koji sadrži DNazu I je prečišćen ekskluzivnom hromatografijom. Za hromatografiju je korišćen sephadex gel G-100. Hvatane su frakcije od 5 mL. Prisustvo DNaze I u frakcijama je određeno po već opisanom protokolu.

Tretiranje DNaze I dietil etrom

Frakcija u kojoj je aktivnost DNaze I bila najveća podeljena je u četiri dela koja su tretirana različitim zapreminama iste koncentracije etra: 500 μL, 750 μL, 1 mL, i 1.5 mL etra. Peti deo (bez etra) korišćen je kao kontrola.

Stepen inhibicije DNaze I određen je merenjem njene enzimске aktivnosti nakon tretiranja dietil etrom. Reakciona smeša za određivanje aktivnosti enzima sadrži 25 μL rastvora DNK, 200 μL uzorka (delovi frakcije tretirani različitim zapreminama etra) i 2 mL destilovane vode. Nakon tridesetominutne inkubacije na 37°C izmerena je apsorbance smeše na 260 nm. Kontrolna proba je sadržala 200 μL uzorka i 2 mL destilovane vode. Apsorbance DNK nakon tretiranja DNazom I određena je po formuli:

$$A_{DNK} = A_{260}(DNK + uzorak) - A_{260}(kontrolna proba)$$

Stepen inhibicije DNaze I u procentima određen je po formuli:

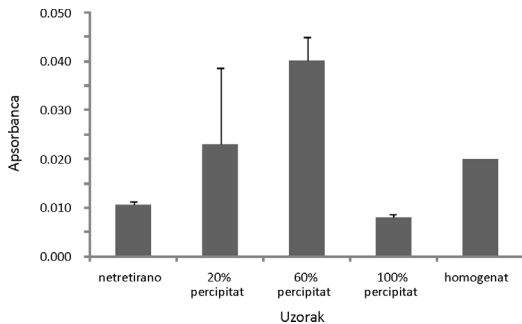
$$X = \left(1 - \frac{A_T}{A_{NT}}\right) \cdot 100$$

gde je A_T apsorbance uzorka sa tretmanom etra, a A_{NT} apsorbance uzorka bez ovog tretmana.

Rezultati

Apsorbance DNK tretirane amonijum-sulfatnim precipitatima i homogenatom povećala se u odnosu na apsorbance netretirane DNK (slika 1). Rezultat ukazuje da je došlo do degradacije DNK pri njenom tretiranju ovim uzorcima. Najveći stepen denaturacije DNK prouzrokovao je 60% amonijum-sulfatni precipitat.

Pri tretiranju uzorka DNK frakcijama dobijenim tokom ekskluzivne hromatografije 60% amonijum-sulfatnog precipitata, primećeno je povećanje njene

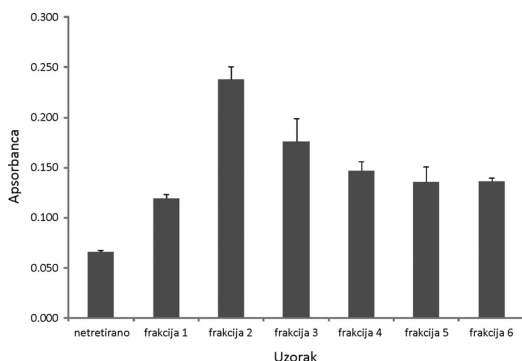


Slika 1. Apsorbance nativne DNK i DNK tretirane uzorcima (amonijum-sulfatni precipitati i homogenat); error barovima je označena standardna greška srednje vrednosti.

Figure 1. Absorbance of native DNA and DNA treated by samples (ammonium-sulfate precipitates and homogenate); error bars indicate the standard error of the average value.

apsorbance u odnosu na apsorbancu netretirane DNK (slika 2). Najveća vrednost apsorbance, odnosno najveći stepen denaturacije DNK, primećen je pri tretmanu frakcijom 2, pa je pretpostavljeno da se DNaza I nalazi u ovoj frakciji.

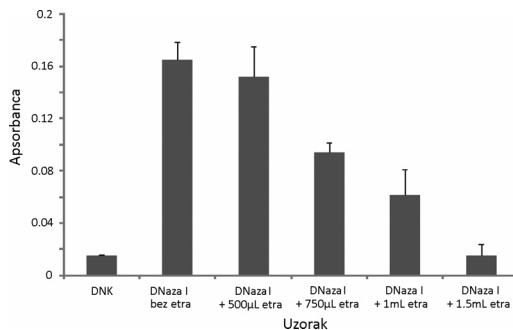
Razlika u apsorbanci između tretirane i netretirane DNK se smanjuje sa povećanjem količine etra kojom je enzim tretiran (slika 3). Opadanje promene apsorbance ukazuje na smanjen stepen denaturacije



Slika 2. Apsorbance nativne DNK i DNK tretirane frakcijama 60% amonijum-sulfatnog precipitata dobijenih hromatografijom

Figure 2. Absorbance of native DNA and DNA treated with chromatography fractions of 60% ammonium-sulphate precipitate

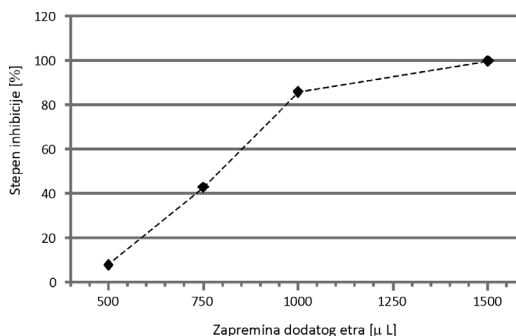
DNK, te samim tim i na smanjenu aktivnost DNaze I. Poređenjem apsorbanci DNK koja je bila ponuđena kao supstrat netretiranoj DNazi I i DNK koja je korišćen kao supstrat za DNazu I tretiranu etrom, zaključeno je da dietil etra inhibira DNazu I.



Slika 3. Apsorbance nativne DNK i DNK tretirane uzorcima DNaze I

Figure 3. Absorbance of native DNA and DNA treated with DNase I samples

Apsorbance uzorka DNK ponuđenog kao supstrat DNazi I tretiranom sa 1.5 mL etra bila je ista kao apsorbance netretiranog uzorka DNK, što znači da je zapremina od 1.5 mL etra dovela do 100% inhibicije DNaze I. Zapremina od 1 mL etra inhibirala je DNazu I 86%, 750 µL dietil etra dovelo je do 43% inhibicije, najmanji stepen inhibicije izazvala je zapremina od 500 µL etra (7.9%).



Slika 4. Stepen inhibicije DNaze I izazvane različitim zapreminama dietil etra (%)

Figure 4. Level of inhibition of DNase I caused by its treatment with various volumes of diethyl ether (%)

Diskusija i zaključak

Mehanizam inhibicije DNaze I dietil etrom nije poznat, ali se na osnovu ranijih istraživanja koja ispituju inhibitornu aktivnost ovog anestetika isključuje mogućnost da do inhibicije dietil etrom dolazi usled denaturacije enzima, jer se u nekim protokolima dietil etar koristi kao jedan od rastvarača prilikom prečišćavanja proteina. Mi smo pretpostavili da je mehanizam inhibicije DNaze I dietil etrom sličan kao kod halotana.

Dobijeni rezultati ukazuju da je usled interferencije hidrofobnih grupa DNaze I sa dietil etrom, došlo do promene u strukturi DNaze I i da je reakcija sa supstratom, DNK, bila sprečena. Sprečavanjem reakcije između DNaze I i DNK, dietil etar bi mogao izazvati različite poremećaje na celularnom nivou, kao što su promene u samom metabolizmu DNK, promene u nukleusu i anomalije na hromozomina. Promene na celularnom nivou dalje bi se mogle preneti na nivo čitavog organizma. Kako bi se moguće posledice sprečile potrebno je smanjiti stepen inhibicije DNaze I dietil etrom. Ovim istraživanjem je potvrđeno da je stepen inhibicije direktno zavisao od količine molekula dietil etra kojom se DNaze I tretira, ali nije ispitano da li stepen inhibicije DNaze I zavisi od trajanja izlaganja ovog enzima dietil etru. Može se pretpostaviti da će za kraće trajanje tretmana DNaze I dietil etrom manja količina molekula ova dva jedinjenja međusobno interferirati, te će zbog toga i stepen inhibicije enzima biti manji. Zavisnost stepena inhibicije od vremena izlaganja enzima dietil etru trebalo bi proveriti u sličaju da se etar koristi kao inhalacioni anestetik. Tada bi bilo moguće ograničiti vreme udisanja anestetika na minimum kako bi stepen inhibicije DNaze I bio najmanji moguć. Takođe, bilo bi potrebno ispitati tačan mehanizam delovanja dietil etra na DNazu I kako bi se uticao na inhibiciju izbegao, a samim tim i sprečile moguće posledice.

Literatura

Allfrey V. G., Mirsky A. E. 1952. Some aspects of deoxyribonuclease activities of animal tissues. *Physiology*, **36**: 227.

Blikstad I., Markey F., Carlson L., Persson T., Lindberg U. 1978. Selective assay of monomeric and filamentous actin in cell extracts, using inhibition of DNase I. *Cell*, **15**: 935.

Calderone F. A. 1935. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*, **55** (1): 24.

Cullen B. F., Sample W. F., Chretien P. B. 1972. The effect of halothane on phytohemagglutinin-induced transformation of human lymphocytes *in vitro*. *Anesthesiology*, **36**: 206.

Hill J. W., Kolb D. K. 2004. *Chemistry for changing times*. Upper Saddle River: Prentice Hall.

Kusyk J., Hsu T. C. 1976. Mitotic anomalies induced by three inhalation halogenated anesthetics. *Environmental Research*, **12**: 366.

Radović S., Kevkarević D. 2005. *Molekularna biologija – praktikum*. Beograd: Univerzitet u Beogradu

Reitz M., Knitza R., Lanz E., Zahn R. K. 1982. The effects of halothane on the DNase I activity in an isolated enzyme preparation and in the DNase I-G actin complex. *Chemistry-Biology, Interactions*, **42**: 291-300

Ishak S., Capon D. J., Hellmiss R. 1991. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proceeding of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **87** (23): 9188.

Ryan S. M., Nielsen C. J. 2010. Global Warming Potential of Inhaled Anesthetics: Application to Clinical Use. *Anesthesia & Analgesia*, **111** (1): 92.

Sturrock J. E., Nunn J. F. 1976. Synergism between halothane and nitrous oxide in the production of nuclear abnormalities in the dividing fibroblasts. *Anesthesiology*, **44**: 461.

Yasutomo K., Horiuchi T., Kagami S. 2001. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *National Genetics*, **28** (4): 313.

Wang L., Hirayasu K., Ishizawa M., Kobazashi Y. 1994. Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated Nal and SDS. *Nucleic acids research*, **22**: 1774.

Vujčić Z. 2002. *Eksperimentalna biohemija – praktikum*. Beograd: Univerzitet u Beogradu

Vanja Radišić

Inhibitory Influence of Diethyl-Ether on Deoxyribonuclease I

In this work the influence of diethyl ether on DNase I was investigated. Diethyl ether is an organic compound commonly used as an inhalation anesthetic. DNase I for the experiment was isolated from beef liver. This enzyme was treated with various volumes of ether which were all in the same concentration. Volumes of 500 μL , 750 μL , 1 mL and 1.5 mL were used. After the treatment of DNase I with ether, its enzymatic activity was investigated. Enzymatic activity of DNase I was detected by comparing the absorbance of DNA measured on 260 nm before and after its treatment with samples of this enzyme. The level of inhibition was detected by comparing the absorbance of DNA treated with inhibited and uninhibited DNase I. The results suggest that the level of inhibition of enzymatic activity is linearly dependent on the volume of ether with which DNase I was treated.

