

А. И. ГАЗНЕВ, Л. А. ФОМЕНКО, Д. Т. ЗАКРЖЕВСКАЯ,
член-корреспондент АН СССР А. М. КУЗИН

РЕПАРАЦИЯ ИНДУЦИРОВАННЫХ γ -ЛУЧАМИ ОДИНОЧНЫХ РАЗРЫВОВ ТЯЖЕЙ ДНК ПОЛИНУКЛЕОТИДЛИГАЗАМИ IN VITRO

В настоящее время становится более ясной роль полинуклеотидлигаз — ферментов, катализирующих восстановление одиночных фосфоэфирных разрывов ($3'$ -ОН \sim PO_4 - $5'$) в нативной молекуле ДНК в процессах репликации, рекомбинации и репарации. Вместе с тем, в литературе отсутствует твердый ответ на вопрос, может ли полинуклеотидлигаза (ПН-лигаза) восстанавливать индуцированные радиацией разрывы, или сначала требуется участие нуклеаз и ДНК-полимераз. Правда, в опытах с инкубацией облученной Т7-ДНК в дозе 40 крад с ПН-лигазоактивными экстрактами было обнаружено незначительное увеличение молекулярного веса ДНК (¹). Однако это не нашло подтверждения в работе других авторов (²), в которой после обработки ПН-лигазой ДНК, облученной в дозе 19,5 крад, эффект восстановления отсутствовал. Эти данные послужили основанием для вывода об отсутствии $3'$ -ОН \sim PO_4 - $5'$ -разрывов тяжелой ДНК при облучении ее растворов ионизирующей радиацией. Позже образование $3'$ -ОН \sim PO_4 - $5'$ -разрывов при облучении растворов ДНК было показано в работе (³).

Поэтому представлялось интересным исследовать восстановление индуцированных ионизирующей радиацией одиночных разрывов тяжелой ДНК ПН-лигазами различного происхождения.

В экспериментах мы использовали трансформирующую ДНК из *Vac. subtilis* SHGW и две ПН-лигазы: ДПН-зависимую из этого же штамма и АТФ-зависимую из *Escherichia coli* В, инфицированной Т4-фагом. Образование и восстановление одиночных разрывов наблюдали по трансформирующей активности ДНК, как одному из наиболее чувствительных тестов (⁴). Реципиентной культурой служила *Vac. subtilis* 168 (try⁻). При получении компетентных клеток и при проведении реакции трансформации соблюдали условия, указанные Прозоровым (⁵).

Трансформирующую ДНК получали по методу Мармура в модификации Бреслера (⁶). Молекулярный вес, определенный вискозиметрически, составлял в среднем $45 \cdot 10^6$. Часть препарата ДНК обрабатывали ДНК-азой I, создающей специфичные $3'$ -ОН \sim PO_4 - $5'$ -разрывы (⁴). Для этого 3,5 мг ДНК, 5 ммол. $MgCl_2$, 0,075 мол. NaCl, 0,0075 мол. цитрата натрия (SSC/2), 20 ммол. трис-HCl (pH 8) и 5 μ г ДНКазы I, в общем объеме 35 мл, инкубировали при 25° 30 мин. Реакцию останавливали прибавлением 0,25 мл 0,25 М ЭДТА. После этого диализовали против SSC/4. После такой обработки молекулярный вес ДНК не менялся, но трансформирующая активность снижалась на 45—50%. Это свидетельствовало об отсутствии двойных разрывов и наличии одиночных. Препарат ДНК с ферментативными фосфоэфирными разрывами использовали для выявления ПН-лигазной активности и для контроля в процессе выделения и очистки фермента.

Препарат нативной ДНК в концентрации 100 μ г/мл облучали γ -лучами Cs^{137} при 2° в дозах 0,5—10,0 крад при мощности дозы 450 рад/мин. Облученный препарат разбавляли вдвое холодным SSC/4 и диализовали против

этого же раствора. Изменение молекулярного веса ДНК после облучения разными дозами контролировали вискозиметрическим методом, что представлено на рис. 1.

Для выделения ПН-лигазы из *Bac. subtilis* SHGW использовали 50 г биомассы культуры 7-часового роста. При выделении АТФ-зависимой ПН-лигазы инфицирование *E. coli* В фагом Т4, и получение биомассы проводили по Вейсу и Ричардсону (7). Выделение ПН-лигаз сначала проводили соблюдая процедуры, описываемые в этой работе (7) до V стадии очистки (ДЕАЕ-целлюлозная — 0,3 M NaCl-фракция). Далее очищали на фосфоцеллюлозной колонке по методу Оливера, Леман (8). Полученный препарат концентрировали, прибавляя к 100 мл ферментсодержащей фракции

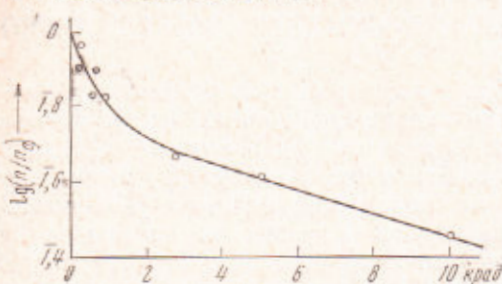


Рис. 1. Изменение молекулярного веса трансформирующей ДНК в зависимости от дозы облучения

18 г сефадекса (грубый Г-25). Через 3 часа снимали верхний прозрачный слой, 5—6 мл, содержащий 70—80 $\mu\text{г}/\text{мл}$ белка, и использовали для опытов. Контроль степени очистки показал, что 400—500 $\mu\text{г}$ белка аммоний-сульфатной фракции и 1 $\mu\text{г}$ конечного препарата давали одинаковое повышение трансформирующей активности ДНК, обработанной ДНКазой I (табл. 1).

Обработку облученной ДНК ПН-лигазами проводили в реакционной смеси (1 мл), содержащей 10 $\mu\text{г}$ ДНК, 1 $\mu\text{г}$ ПН-лигазы, 0,3 моля NH_4Cl , 66 $\mu\text{мол}$. АТФ или 20 $\mu\text{мол}$. ДПН, 20 $\mu\text{мол}$. β -меркаптоэтанол, 20 $\mu\text{мол}$. MgCl_2 , 100 $\mu\text{мол}$. трис-HCl. pH для АТФ-зависимой ПН-лигазы 7,6, для ДПН-зависимой 8,0. Смесь инкубировали 30 мин. при 37°. В качестве контроля использовали денатурированный нагреванием (10 мин. при 95°) фермент.

Для проведения реакции трансформации 0,1 мл смеси доводили 0,15 M NaCl до 1 мл, после чего 0,2 мл (0,2 $\mu\text{г}$ ДНК) смешивали с 0,8 мл компетентных клеток ($3\text{--}5 \cdot 10^8$ кл/мл), инкубировали 1 час при 37°, затем разбавляли холодным 0,15 M NaCl в 7—10 раз и высевали по 0,2 мл на чашки Петри с минимальным агаром. Выход трансформантов подсчитывали через 24 часа. Результаты выражали в процентах к контролю (выход трансформантов от нативной ДНК, обработанной денатурированными лигазами). Полученные данные обрабатывали статистически.

Данные по подбору оптимального количества ПН-лигазы на 10 $\mu\text{г}$ ДНК в объеме 1 мл реакционной смеси представлены в табл. 1. Как видно из результатов, это составляет 1 $\mu\text{г}$ белка. Следует отметить, что трансформирующая активность нативной ДНК после обработки ПН-лигазами также увеличивалась (опыт 1). Это может быть обусловлено двумя причинами: содержанием фактора компетентности в ПН-лигазоактивных экстрактах или наличием одиночных разрывов на молекулах нативной ДНК (9). По-видимому, надо отдать предпочтение второму предположению, так как этот эффект в процессе очистки фермента всегда сопровождал ПН-лигазную активность.

Результаты опытов по репарации облученной ДНК ДПН- и АТФ-зависимыми лигазами приведены в табл. 2. Обе ПН-лигазы восстанавливали трансформирующую активность облученной ДНК в одинаковой степени, что свидетельствует об отсутствии видовой специфичности этих ферментов. Отношение А/В выхода трансформантов от образцов ДНК, обработанных активным (А) и денатурированным (В) ферментами показывает индуцирование γ -радиацией 3'-ОН \sim PO₄-5'-разрывов и их репарацию ПН-лигазами. Это отношение намного выше у облученных образцов ДНК по сравнению с необлученными. ПН-лигазы полностью восстанавливают транс-

формирующую активность ДНК, облученной в дозе 500 рад. Дальнейшее увеличение дозы приводило к падению трансформирующей активности ДНК и эффекта репарации, что, по-видимому, является результатом образования при высоких дозах радиации двойных разрывов и других дефектов, неспецифичных для ПН-лигазной репарации (¹⁰). Как известно, вероятность возникновения двойных разрывов пропорциональна квадрату дозы. При молекулярном весе ДНК $8 \cdot 10^6$ доза 5 крад снижала его на 60% и сопровождалась образованием множества одиночных разрывов, в результате чего средний молекулярный вес тяжа становится около $3 \cdot 10^5$ (¹¹).

Таблица 1

Репарация индуцированных ДНКазой I разрывов полинуклеотидлигазой из *Bac. subtilis* SHGW

| № опыта | Обработка ДНКазой | Колич. ПН-лигазы, μ г белка на пробу | Выход трансформантов после обработки ПН-лигазой, % к контр. | | А/Б |
|---------|-------------------|--|---|----------------------|------|
| | | | активная (А) | денатурированная (Б) | |
| 1 | — | 1,0 | $123,0 \pm 5,7$ | $100,0 \pm 0,0$ | 1,23 |
| 2 | + | 0 | $56,0 \pm 3,3$ | — | — |
| 3 | + | 0,1 | $78,5 \pm 4,1$ | $59,0 \pm 3,8$ | 1,33 |
| 4 | + | 1,0 | $120,0 \pm 4,4$ | $50,7 \pm 4,7$ | 2,40 |
| 5 | + | 5,0 | $121,5 \pm 5,3$ | $61,4 \pm 5,0$ | 1,98 |

Таблица 2

Репарация облученной трансформирующей ДНК ПН-лигазами

| Фермент | Доза облучения, крад | Выход трансформантов после обработки ДНК ПН-лигазами, % к контр. | | А/Б |
|-------------------------|----------------------|--|----------------------|------|
| | | активная (А) | денатурированная (Б) | |
| ДПН-зависимая ПН-лигаза | 0 | $135,0 \pm 5,3$ | $100,0 \pm 0,0$ | 1,35 |
| | 0,5 | $133,6 \pm 5,4$ | $66,0 \pm 2,8$ | 2,03 |
| | 0,75 | $92,5 \pm 5,3$ | $42,6 \pm 2,7$ | 2,17 |
| | 1,0 | $78,2 \pm 5,2$ | $38,0 \pm 2,5$ | 2,06 |
| | 2,5 | $34,6 \pm 2,2$ | $19,4 \pm 1,3$ | 1,79 |
| | 5,0 | $19,3 \pm 1,7$ | $12,5 \pm 0,7$ | 1,53 |
| | 10,0 | $2,2 \pm 0,2$ | $1,9 \pm 0,3$ | 1,15 |
| АТФ-зависимая ПН-лигаза | 0 | $157,0 \pm 4,8$ | $100,0 \pm 0,0$ | 1,57 |
| | 0,5 | $166,2 \pm 5,7$ | $79,1 \pm 3,3$ | 2,10 |
| | 1,0 | $83,3 \pm 3,2$ | $35,9 \pm 1,9$ | 2,31 |
| | 2,5 | $35,7 \pm 2,0$ | $21,0 \pm 1,8$ | 1,70 |
| | 5,0 | $14,1 \pm 2,1$ | $9,6 \pm 1,3$ | 1,44 |

Примечание. Во всех опытах даны средние из 12—16 выборов.

В условиях наших экспериментов изменение молекулярного веса ДНК в зависимости от дозы облучения соответствовало кривой на рис. 1. При использованных дозах γ -радиации молекулярный вес оставался выше критического для феномена трансформации ($0,3—1 \cdot 10^6$) (^{12, 13}). Поэтому резкое понижение трансформирующей активности ДНК, облученной дозами 5—10 крад, и исчезновение эффекта действия ПН-лигаз, по-видимому, также связано с появлением множества одиночных не ПН-лигазоспецифичных разрывов, что объясняет отрицательные результаты, полученные в экспериментах Каппа и Смита (²).

Таким образом, растворы трансформирующей ДНК, облученной γ -радиацией, репарируются в одинаковой степени ДПН- и АТФ-зависимыми ПН-лигазами. При этом ПН-лигазы полностью восстанавливают трансформирующую активность ДНК, облученной дозой 500 рад, что свидетель-

ствуется об образовании при малых дозах ПН-лигазоспецифичных 3'-ОН ~
~ РО₄-5'-разрывов.

Дальнейшее увеличение дозы γ -радиации приводит к понижению эф-
фекта репарации ПН-лигазами.

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пуццино-на-Оке

Поступило
30 VI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. Moroson, A. Anello, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, № 1, 1 (1968).
² D. Kapp, K. Smith, *Intern. J. Rad. Biol.*, **14**, № 6, 567 (1968). ³ G. Dalzypmle,
I. Sanders et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, № 3, 538 (1970). ⁴ P. Lai-
pis, B. Olivera, A. Ganesan, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **62**, № 4, 289 (1969).
⁵ А. А. Прозоров, Генетическая трансформация у микроорганизмов, «Наука»,
1966. ⁶ С. Е. Бреслер, Д. А. Перумов, *Биохимия*, **27**, № 5, 927 (1962).
⁷ B. Weiss, A. J. Sablon et al., *J. Biol. Chem.*, **243**, № 17, 4543 (1968). ⁸ B. Oli-
vera, J. Lehman, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**, № 5, 1426 (1967). ⁹ W. Bod-
mer, *J. Gen. Physiol.*, **49**, № 2, 233 (1966). ¹⁰ М. И. Шальнов, Радиолит нуклеи-
новых кислот и молекулярная природа радиационного мутагенеза, Докторская дис-
сертация, М., 1969. ¹¹ U. Hagen, *Biochim. et biophys. acta*, **134**, № 1, 45 (1967).
¹² W. Guild, F. Defilippes, *Biochim. et biophys. acta*, **26**, № 2, 241 (1957).
¹³ M. Litt, J. Marmur et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **44**, № 1, 144 (1958).