

В. П. ПАΡΙБОК, Н. В. ТОМЛИШ

ТОЧНОСТЬ РАБОТЫ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ ИЗ *MICROCOCOCCUS*
LYSODEIKTICUS, УЧАСТВУЮЩЕЙ В ВЫЩЕПЛЕНИИ
ДИМЕРОВ ПИРИМИДИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ ИЗ ДНК

(Представлено академиком Е. М. Крепом 27 II 1970)

Большая часть летальных и предмутацционных повреждений ДНК в бактериальной клетке, вызванных ультрафиолетовыми лучами, репарируется путем выщепления — замещения (¹). В последние годы из клеток *Micrococcus lysodeikticus* были выделены и очищены нуклеазы, выщепляющие димеры пиримидиновых оснований из ДНК (²⁻⁶). В частности, был выделен фермент первого этапа выщепления — эндонуклеаза инцизии, разрывающая ДНК при наличии в ней димеров. Однако до сих пор остается неясным, что именно узнает этот фермент — внутрицепочечную димеризацию ДНК или сопровождающую ее локальную денатурацию биспирали. Если справедливо второе предположение, то фермент инцизии может ошибочно разрывать не только ту нить ДНК, в которой содержится димер, но и комплементарную, напротив димера, как предполагал Сетлоу (⁷). В настоящей работе эта гипотеза проверена в опытах с искусственными гибридами ДНК, содержащими радиоактивную метку в одной из нитей и пиримидиновые димеры — в другой.

К обработанному ультразвуком лизоцимному лизату клеток *M. lysodeikticus* добавляли стрептомицин-сульфат для осаждения нуклеиновых кислот (конечная концентрация 1%), отбирали фракцию, осаждающуюся сульфатом аммония в интервале 35—65% насыщения, и димерспецифическую эндонуклеазу очищали анионообменной хроматографией на ТЕАЕ-целлюлозе (⁴). Фракции, содержащие эндонуклеазу, идентифицировали по методу Накаямы и др. (⁴). Активность фракций из пика дополнительно проверяли методом зонального центрифугирования Н³-ДНК *Escherichia coli* в щелочном линейном градиенте сахарозы, облученной у.-ф. радиацией и обработанной ферментом.

ДНК из клеток *B. subtilis* получали по модифицированному методу Мармура (⁸), комплементарные нити денатурированной щелочью ДНК разделяли на колонке с метилированным альбумином на кизельгуре методом прерванной градиентной элюции по Руднер и др. (⁹). Меченую ДНК получали из *B. subtilis* thy⁻, his⁻ (штамм Ф. Ротмана), выросших в среде Спизайзена, содержащей 2-С¹⁴-тимин (2 мкг/мл, 9,5 мС/ммоль), гидролизат казеина (200 мкг/мл) и *l*-гистидин (50 мкг/мл). Как известно, одна из комплементарных нитей ДНК *B. subtilis* является более тяжелой, и мы будем обозначать ее буквой Н, а другую нить, легкую, — буквой L.

Изолированные нити (10 мкг/мл в 0,3 М NaCl — 0,03 М цитрате натрия) облучали лампой БУФ-60 в дозе 8500 эрг/мм². При этой дозе у.-ф. облучения димеризуется около 7,5% тиминовых остатков тяжелой нити и 6,9% легкой. Тиминсодержащие димеры определяли описанным ранее радиохроматографическим методом (¹⁰). Меченую и немеченую комплементарные нити смешивали в отношении 1:2, отжигали 5 час. при 68° и 2 часа при комнатной температуре. Полученные таким образом гибриды инкубировали с эндонуклеазой в присутствии ЭДТА (4·10⁻² М), и 0,2 мл наклаи-

вали на 4,7-миллилитровый изокинетический градиент сахарозы в 0,9 M NaCl и 0,1 M NaOH с начальной концентрацией сахарозы 5%. Изокинетический градиент и приведенный коэффициент седиментации рассчитывали по методу, предложенному Ноллем (¹⁴). Седиментацию проводили в SW50L-роторе Spinco L2-65K ультрацентрифуги 3 часа при 20° при скорости 48000 об/мин. Фракции с градиента осаждали 0,5 M хлорной кислотой в присутствии альбумина, собирали на нитроцеллюлозных фильтрах и измеряли радиоактивность в сцинтилляционном счетчике Tritomatic в PPO-POPOP-толуоле.

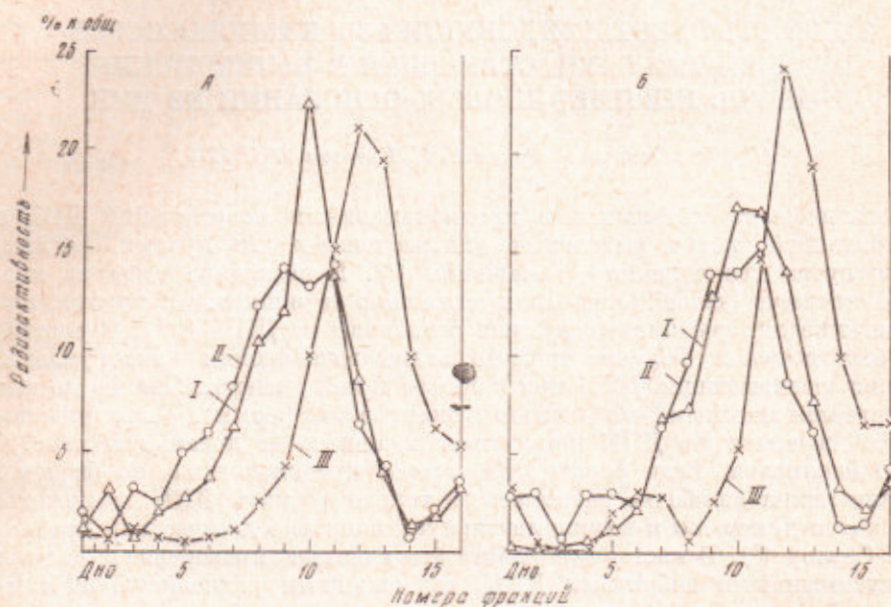


Рис. 1. Действие эндонуклеазы на гибриды, содержащие C^{14} -тяжелую нить (А) и C^{14} -легкую нить (В). I — гибриды, не содержащие димеров; II — гибриды, содержащие димеры в немеченой нити; III — гибриды, содержащие димеры в меченой нити. Все гибриды были выдержаны с ферментом 2 часа при 37°.

На рис. 1 изображены профили в щелочном градиенте сахарозы обработанных эндонуклеазой гибридов трех типов: не содержащих димеров (кривые I), содержащих димеры в немеченой нити (кривые II) и содержащих димеры в меченой нити (кривые III). Отчетливо видно сенсбилизирующее действие (по отношению к ферменту) у.-ф. облучения меченой нити: основная масса ДНК седиментирует значительно медленнее, и это свидетельствует об образовании значительного числа разрывов в этой нити (ср. кривые I и III). При наличии димеров в нити, комплементарной той, которая содержит метку, дополнительных разрывов, по сравнению с таковыми у гибридов, не содержащих димеров, не наблюдается (ср. кривые I и II на рис. 1 А, Б). Как видно на рис. 1, результаты, полученные с тяжелой нитью, не отличаются от результатов, полученных с легкой нитью.

Ясно, что если эндонуклеаза узнает не внутрительную димеризацию ДНК, а лишь локальную денатурацию биспирали, то должна выявляться высокая активность фермента по отношению к денатурированной ДНК, не содержащей димеров. Эта возможность была проверена, и оказалось, что активность фермента по отношению к однонитчатой ДНК значительно ниже, чем по отношению к гибридам, не содержащим димеров (рис. 2). Вместе с тем, как видно на рис. 3, эндонуклеаза узнает димеры в однонитчатой ДНК и разрывает ее, что также противоречит гипотезе (⁷) об узнавании ферментом локально денатурированных участков ДНК, а не димеров.

Эти результаты однозначно свидетельствуют о том, что димерспецифическая эндонуклеаза из *M. lysodeikticus* распознает нарушения укладки азотистых оснований в односпиральной ДНК, вызываемые димеризацией пиримидинов, а не локальную денатурацию биспиральной ДНК. Таким образом, нет оснований предсказывать ошибочность репараторного процесса

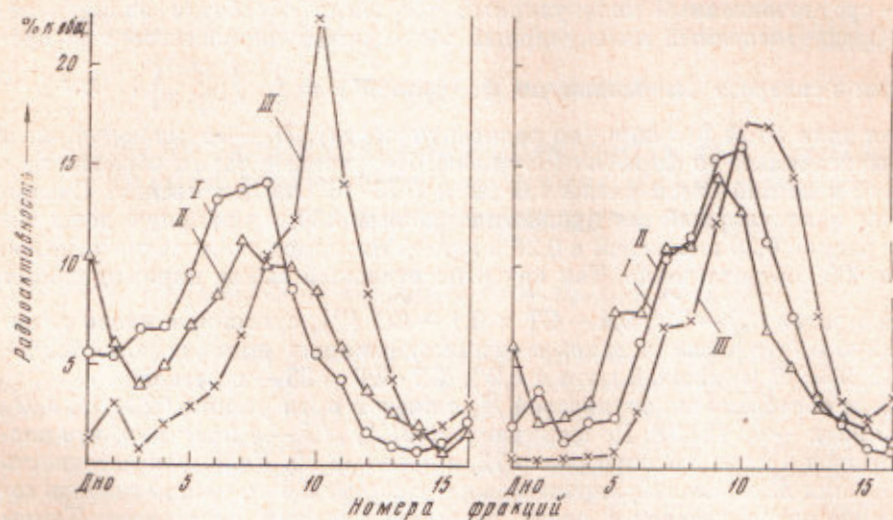


Рис. 2. Действие эндонуклеазы на изолированную C^{14} -тяжелую нить (А) и C^{14} -легкую нить (Б) при отсутствии в них димеров. I — контроль, выдержанный с водой; II — инкубация с эндонуклеазой 2 часа при 37° ; III — та же кривая, что на рис. 1 обозначена как I

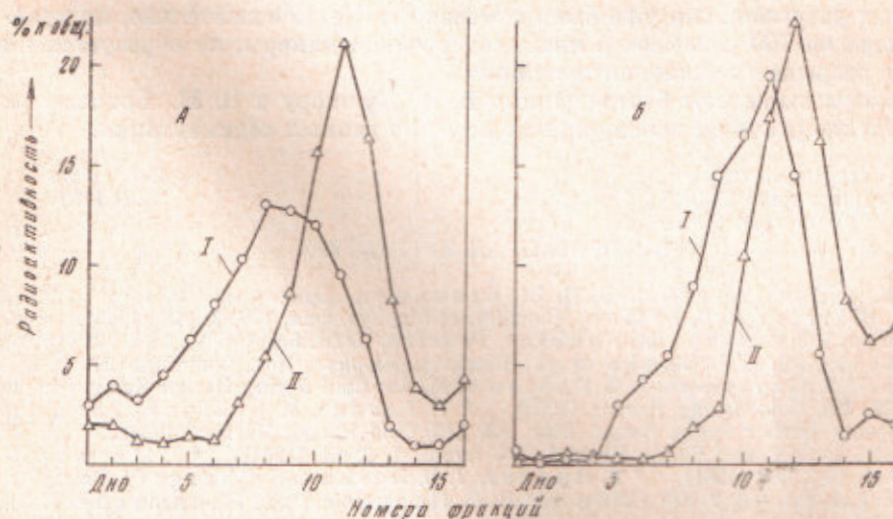


Рис. 3. Действие эндонуклеазы на изолированные C^{14} -тяжелую нить (А) и C^{14} -легкую нить (Б), содержащие димеры. I — контроль, выдержанный с водой; II — инкубация с эндонуклеазой 2 часа при 37°

на этапе выщелчения. К аналогичным выводам приходят на основании генетических экспериментов ⁽¹²⁾, в которых было показано, что на 10^6 выщелченных димеров возникает не более 1 мутации. Эти данные указывают, что следует с осторожностью использовать постулат об ошибочности выщелчения в гипотезе о происхождении хромосомных aberrаций у эукариотических организмов ⁽¹³⁾.

Если для описанных условий седиментации (0,9 M NaCl, 0,1 M NaOH в сахарозе) применима формула Штудера ⁽¹⁴⁾: $s_{20, w} = 0,0528 \cdot M^{0,4}$, то

можно оценить и сравнить между собой: 1) среднее число димеров на одну молекулу (исходя из среднечисленного молекулярного веса M_n и доли тимина в тиминсодержащих димерах) и 2) среднее число эндонуклеолитических разрывов на одну молекулу (исходя из соотношения $n = M_n^1 / M_n^2 - 1$, где M_n^1 — среднечисленный молекулярный вес до обработки ферментом, M_n^2 — среднечисленный молекулярный вес после обработки эндонуклеазой). Среднечисленный молекулярный вес из молекулярновесового распре-

деления в сахарозе вычисляли по формуле $M_n = 1 / \sum_i \frac{f_i}{M_i}$, где f_i — весовая доля i -той фракции (по радиоактивности), M_i — ее молекулярный вес, вычисленный по формуле Штудииера. Полученные таким образом веса тяжелой и легкой нитей равны $1,6 \cdot 10^6$ и $0,73 \cdot 10^6$ соответственно. Считая средний молекулярный вес нуклеотида равным 330, а молярную долю тимина равной 0,30 в тяжелой и 0,26 в легкой нити, получаем число тиминов 1500 и 600 соответственно. Так как относительный выход пиримидиновых димеров равен 0,5 — ТТ, 0,4 — СТ и 0,1 — СС⁽¹⁵⁾, суммарное число димеров равно 0,7 от числа тиминов в тиминсодержащих димерах, т. е. $7,5\% \cdot 0,7 \cdot 1500 = 77$ в тяжелой нити и $6,9\% \cdot 0,7 \cdot 600 = 28$ — в легкой.

После обработки эндонуклеазой M_n тяжелой нити равен $0,022 \cdot 10^6$, а M_n легкой нити — $0,018 \cdot 10^6$. По формуле $n = M_n^1 / M_n^2 - 1$ получаем, что число разрывов в тяжелой нити равно 72, а в легкой 39. Учитывая неточность определения M_n из молекулярновесового распределения, можно считать соответствие числа димеров и числа разрывов удовлетворительным. Таким образом, весьма вероятно, что при использованных нами условиях эндонуклеаза на каждый димер индуцирует один разрыв. При сравнении M_n обработанных ферментом гибридов, не содержащих димеров, и M_n гибридов, содержащих димеры в немеченой нити, в последних не выявляется дополнительных разрывов, как уже было отмечено выше. Следовательно, по крайней мере на 700 разрывов в нити, содержащей димеры, не образуется ни одного разрыва в комплементарной нити.

Авторы выражают благодарность В. П. Кушнеру и В. М. Божкову за обсуждение расчетов молекулярных весов по данным седиментации.

Институт цитологии
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
22 II 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. А. Вальдштейн, В. Д. Жестяников, Цитология, 9, 1, 3 (1967).
- ² W. L. Carrier, R. B. Setlow. Biochim. et biophys. acta, 129, 2, 318 (1966). ³ B. Strauss, T. Searachi, M. Robbins, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 56, 3, 932 (1966).
- ⁴ H. Nakayama, S. Okubo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 27, 2, 217 (1967). ⁵ L. Grossman, J. C. Kaplan et al., In: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 33, 229, Cold Spring Harbor (1968). ⁶ Y. Takagi, M. Sekiguchi et al. In: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 33, 219, Cold Spring Harbor (1968). ⁷ R. B. Setlow, J. Cell. and Comp. Physiol., 64, Suppl. 1, 2, 51 (1964). ⁸ J. Marmur, J. Mol. Biol., 3, 2, 208 (1961). ⁹ R. Rudner, J. D. Karkas, E. Chargaff, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 60, 2, 630 (1968). ¹⁰ В. П. Парибок, Э. А. Валдштейн, Н. В. Томилин, Цитология, 11, 1, 93 (1969). ¹¹ H. Noll, Nature, 215, 5099, 360 (1967).
- ¹² E. Witkin, In: Ann. Rev. of Microbiol., 23, 487 (1969). ¹³ N. P. Dubinin, V. N. Soyfer, Mut. Res., 8, 2, 353 (1969). ¹⁴ E. W. Studier, J. Mol. Biol., 11, 2, 373 (1965). ¹⁵ B. B. Setlow, W. L. Carrier, J. Mol. Biol., 17, 1, 237 (1966).