

УДК 577.15.012

БИОХИМИЯ

А. И. ГАЗИЕВ, Д. Т. ЗАКРЖЕВСКАЯ, С. Р. УМАНСКИЙ, Н. Б. СТРАЖЕВСКАЯ,  
В. А. СТРУЧКОВ, член-корреспондент АН СССР А. М. КУЗИН

### ПОЛИНУКЛЕОТИДЛИГАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА

В настоящее время ферменты, катализирующие восстановление фосфорных связей между концами 5'PO<sub>4</sub> и 3'ОН одиночных разрывов в двухспиральной ДНК, очищены из интактных и инфицированных фагом бактерий, а также из животных клеток (1-5). Интерес к полинуклеотидлигазам (ПН-лигазы) связан с возможным участием этих ферментов в процессах генетической рекомбинации, репарации повреждений ДНК и репликации. ПН-лигазы, по-видимому, играют существенную роль в репликации хромосом животной клетки (6). Предполагается, что синтезируемые ДНК-полимеразной системой низкомолекулярные фрагменты ДНК соединяются в высокополимерные молекулы с помощью ПН-лигаз (7).

В работе (8) показано, что животные клетки содержат АТФ-зависимую ПН-лигазу, причем 60% активности локализовано в ядерной фракции.

В связи с вышесказанным естественно было предположить, что некоторое количество ПН-лигазы животных клеток тесно связано с ДНК и представляет собой один из компонентов негистоновых белков хроматина. Поэтому настоящее исследование мы посвятили поискам ПН-лигазной активности в хроматине клеток костного мозга.

В качестве ДНК-субстрата для определения ПН-лигазной активности использовали трансформирующую ДНК (тДНК) с 5'PO<sub>4</sub> и 3'ОН одиночными разрывами из *Bacillus subtilis* Shgw. Этот субстрат наиболее доступен, он также является специфичным и довольно чувствительным для стандартных ПН-лигазных реакций, как это было показано в ряде работ (8-11). Получение тДНК с разрывами, без разрывов и постановку реакции трансформации проводили как описано в предыдущем сообщении (10). Реципиентной культурой служил штамм *Bac. subtilis* 168 tr<sup>-</sup>. В работе использованы нуклеозид-5'-трифосфаты, дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты, АДФ, АМФ, ДПН и ТПН производства фирмы «Reanal». Для выделения белковых фракций с ПН-лигазной активностью использовали костный мозг из 10 крольчат весом 1,2-1,5 кг. Все процедуры проводили при 2-4°. 20 г костного мозга суспендировали в 0,01 М трис-НСl-буфере, рН 7,4, содержащем 0,075 М NaCl, 0,025 М ЭДТА, 0,001 М глутатион из расчета 20 мл на 1 г сырой ткани. Суспензию переносили в размельчитель тканей и гомогенизировали 2 мин. при 8000 об/мин. и 4 мин. при 4000 об/мин. Гомогенат фильтровали через 2 и 6 слоев марли и центрифугировали 20 мин. при 2500 g. Центрифугат использовали для выделения не связанной с хроматином (свободной) ПН-лигазной фракции. Из осадка очищали хроматин (13).

Отделение негистоновых белков хроматина от гистонов проводили в двух вариантах. В первом варианте белки хроматина диализовали против 0,01 М трис-НСl-, 0,01 М β-меркаптоэтанол-буфера, рН 7,6, доводя концентрацию NaCl до 0,02 М. Образующийся при этом осадок в виде комплекса гистонов с негистоновыми белками (13) отделяли центрифугированием. Супернатант (грубая фракция, табл. 1) подвергали ДЭАЭ-целлюлозной хроматографии по Вейсу и Ричардсону (1). Полученную ДЭАЭ-целлюлозную фракцию очищали на фосфатцеллюлозной колонке (4). Во втором ва-



рианте белки хроматина диализовали против 0,05 *M* натрийфосфатного буфера, содержащего 0,5 *M* NaCl, 0,01 *M* β-меркаптоэтанол, pH 7,3, и пропускали через уравнивающую тем же буфером колонку Амберлит CG-50 тип 1. Гистоны полностью задерживаются колонкой, а негистоновые белки элюируются буфером (13). Полученные таким образом негистоновые белки диализовали против 0,01 *M* трис-HCl-, 0,01 *M* β-меркаптоэтанол-буфера, pH 7,6, и хроматографировали на ДЭАЭ-целлюлозной колонке (1).

Таблица 1

ПН-лигазная активность фракции в процессе выделения

Источник	Фракция	Количество белка, $\mu\text{г}$ на 10 $\mu\text{г}$ тДНК-субстрата	Трансформирующая активность тДНК-субстрата
Хроматин	Грубая фракция	0	27,23
	ДЭАЭ-целлюлозная	40	31,30
	Фосфатцеллюлозная	60	74,79
	ДЭАЭ-целлюлозная второго варианта	16 45	83,89 67
Супернатант	1. ДЭАЭ-целлюлозная	400	45,45
	2. ДЭАЭ-целлюлозная	300	76,73
	Фосфатцеллюлозная	30	91,96

Для выделения не связанной с хроматином свободной ПН-лигазной фракции центрифугат от гомогената повторно центрифугировали 20 мин. при 20 000 *g* для осаждения митохондрий. К супернатанту в течение 30—45 мин. добавляли сухой  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  до 42% насыщения, через 30 мин. образовавшийся осадок отделяли центрифугированием и отбрасывали. К надосадочной жидкости добавляли сухой  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  до 80% насыщения и образующийся в течение 30 мин. осадок собирали центрифугированием и растворяли в 25 мл 0,01 *M* трис-HCl-, 0,01 *M* β-меркаптоэтанол-буфера, содержащем 0,1 *M* NaCl, pH 7,6. Отдиализованный препарат подвергали двойной ДЭАЭ-целлюлозной очистке (1), после чего хроматографировали на фосфатцеллюлозной колонке (2). Фосфатцеллюлозные фракции из негистоновых белков хроматина и свободных белков использовали в основных ПН-лигазных анализах. Реакционная смесь для определения ПН-лигазной активности в конечном объеме 0,6 мл содержала 10  $\mu\text{г}$  тДНК-субстрата, 16  $\mu\text{г}$  фосфатцеллюлозной фракции из хроматина (или 30  $\mu\text{г}$  свободной),  $5 \cdot 10^{-4}$  *M* АТФ, 0,01 *M* β-меркаптоэтанола, 0,01 *M*  $\text{MgCl}_2$ , 0,01 *M* трис-HCl, 0,45 *M*  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pH 7,6. Смесь инкубировали 4 часа при 25°. Обе фосфатцеллюлозные фракции имели незначительную нуклеазную активность, которая ингибировалась в присутствии 0,45 *M*  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (14). В табл. 1 представлены результаты анализов, проведенных в предварительно выбранных оптимальных условиях с различными фракциями в процессе выделения фермента. Эти данные свидетельствуют о наличии ПН-лигазной активности как во фракциях негистоновых белков хроматина, полученных разными вариантами, так и в не связанной с хроматином фракции.

Для сравнения свойств свободной и связанной с хроматином ПН-лигаз между собой, а также с описанной АТФ-зависимой лигазой (1, 5) мы исследовали влияние различных веществ на активность наших препаратов (табл. 2). При этом концентрация добавляемых нуклеотидов соответствовала также  $5 \cdot 10^{-4}$  *M*, а ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  0,01 *M*. Эти вещества рассматривались как возможные заменители АТФ в качестве кофактора или как активаторы АТФ-зависимой лигазной реакции. Результаты этой серии опытов показали, что обе фракции содержат строго АТФ-зависимые ПН-лигазы и требуют для активации присутствия тиолов и ионов магния, причем ионы магния могут быть заменены на  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{Mn}^{2+}$ . Оптимум pH также соответствует описанному для АТФ-зависимых лигаз (1, 5). Присут-

Выбор различных условий активации ПН-лигаз

Условия	Выход трансформантов, % к тДНК не обработанной ДНКазой		
	без ПН-лигазы	свободная фракция	хроматиновая фракция
Полная система	31, 28, 29	91, 96	89, 87, 93
Без АТФ	30	30, 34, 35	44, 50, 51
Без SH	—	—	58
Замена АТФ на АМФ	28	36	48, 45
АДФ	—	—	52
ГТФ	—	—	41
УТФ	—	—	47
ЦТФ	—	—	40
dАТФ	24	—	54
dГТФ	—	—	45
ДПН	—	—	41
ТПН	—	—	53
Полная система с dАТФ	—	49, 53	69, 70
с АМФ	—	58, 63	77, 79
Замена Mg <sup>2+</sup> на Ca <sup>2+</sup>	27	—	95, 101
Mn <sup>2+</sup>	—	—	76, 71
Полная система, pH 7,0	—	—	79
pH 8,0	—	—	84

ствие в полной реакционной смеси dАТФ или АМФ значительно подавляет ПН-лигазную активность, что, по-видимому, объясняется способностью этих соединений к конкурентному ингибированию АТФ-зависимой ПН-лигазной реакции (1, 12).

Интересные данные были получены (табл. 2) при определении ПН-лигазной активности во фракциях белков хроматина и во фракциях свободных белков в отсутствие кофактора АТФ. Если свободная ПН-лигаза совершенно не активна в этих условиях, то связанная фракция способна повышать трансформирующую активность ДНК с фосфоэфирными разрывами и без АТФ.

Таблица 3

Репарация  $\gamma$ -облученной тДНК ПН-лигазами из костного мозга

ДНК	ПН-лигазоактивная фракция	Трансформирующая активность, %
Контрольная	—	100
Контрольная	+ Хроматиновая	104, 109
Облученная	—	68, 63
Облученная	+ Хроматиновая	94, 98
Облученная	+ Свободная	93, 96

Это объясняется, очевидно, тем, что часть ПН-лигазы из хроматина извлекается в виде стабильного ковалентносвязанного аденилатного комплекса АМФ-лигазы, образование которого может восстанавливать фосфоэфирные разрывы ДНК в отсутствие АТФ (12).

В настоящее время хорошо установлено, что бактериальные и индуцированные фагом ПН-лигазы восстанавливают одиночные разрывы ДНК, вызванные ионизирующей радиацией (10, 11). Мы исследовали также способность ПН-лигаз из животных клеток (свободной и связанной с хроматином фракции) восстанавливать трансформирующую активность облученной тДНК. тДНК облучали  $\gamma$ -лучами в дозе 500 рад. в условиях, описанных ранее (10). Как видно из табл. 3, обе ПН-лигазные фракции восстанавливают трансформирующую активность — облученной тДНК, что является результатом репарации 5'РО, ~ 3'ОН однонитевых разрывов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии АТФ-зависимой ПН-лигазы в негистоновых хроматиновых белках клеток кост-



ного мозга, способной катализировать репарацию однонитевых фосфоэфирных разрывов, индуцируемых панкреатической ДНКазой и  $\gamma$ -радиацией в ДНК. Специфических отличий между хроматиновой ПН-лигазой и не связанной с хроматином фракцией не обнаружено. Вместе с тем эти исследования позволяют судить о том, что часть хроматиновой ПН-лигазы, в отличие от свободной ПН-лигазы, находится в виде активного аденилатного комплекса.

Институт биологической физики  
Академии наук СССР  
Пуцзино-на-Оке

Поступило  
16 III 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> B. Weiss, A. J. Sablon et al., *J. Biol. Chem.*, **243**, № 17, 4543 (1968). <sup>2</sup> S. B. Zimmerman, C. K. Ochinsky, *J. Biol. Chem.*, **244**, № 17, 4689 (1969). <sup>3</sup> B. Olivera, Z. W. Hall et al., *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, **33**, 27 (1968). <sup>4</sup> M. L. Geffer, A. Becker, J. Hurwitz, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **58**, № 1, 240 (1967). <sup>5</sup> T. Lindahl, G. M. Edelman, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **61**, № 2, 680 (1968). <sup>6</sup> H. Beger, jr., J. L. Irvin, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **65**, № 1, 152 (1970). <sup>7</sup> R. Okazaki, T. Okazaki et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **33**, 129 (1968). <sup>8</sup> P. J. Laipis, B. M. Olivera, A. T. Ganesan, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **62**, № 1, 289 (1969). <sup>9</sup> J. Takagi, T. Ando, J. Ikeda, *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **31**, № 4, 540 (1968). <sup>10</sup> А. И. Газнев, Л. А. Фоменко и др., *ДАН*, **195**, № 2, 479 (1970). <sup>11</sup> Т. И. Постнова, В. М. Глазер, С. В. Шестяков, *ДАН*, **195**, № 4, 976 (1970). <sup>12</sup> Ch. Richardson, J. Masamune et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **33**, 157 (1968). <sup>13</sup> С. Р. Уманский, В. И. Токарская и др., *Молекулярная биология*, **5**, № 2, 430 (1971). <sup>14</sup> T. Ando, J. Takagi et al., *J. Biochem.*, **66**, № 1, 117 (1969).