

А. И. ГАЗПЕВ, Л. А. ФОМЕНКО, Л. В. СУХОРУЧКИНА,
член-корреспондент АН СССР А. М. КУЗИН

АНАЛИЗ РЕПАРИРУЕМЫХ ПОЛИНУКЛЕОТИДЛИГАЗОЙ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫХ РАЗРЫВОВ В ДНК, ОБЛУЧЕННОЙ γ -ЛУЧАМИ

Исследование химической природы концевых групп межнуклеотидных разрывов в молекуле ДНК, индуцированных ионизирующей радиацией, имеет важное значение в понимании ферментативных механизмов репарации ДНК. В работах (1-2) методом специфического фосфорилирования полинуклеотидфосфокиназной реакцией было показано, что большая часть одиночных разрывов ДНК, индуцированных ионизирующей радиацией,

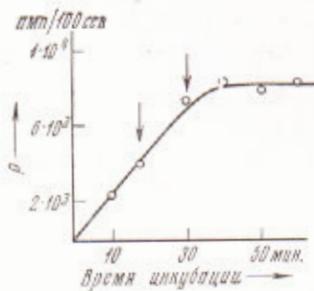


Рис. 1. Выбор оптимальных условий для полного отщепления внешних и внутренних фосфорных групп 25 μ г ДНК $5' P^{32}O_4$ щелочной фосфатазой. Стрелками указаны моменты добавления фосфатазы

имеет $5'PO_4$ -группу. Вместе с тем целостность данных разрывов с $3'OH$ -конца и их специфичность к полинуклеотид-(ПН)-лигазным или ДНК-полимеразным реакциям количественно не охарактеризована. Как известно, при облучении ДНК образуется множество дефектов (3), которые влияют на состояние ПН-лигазной, ДНК-полимеразной специфичности $5'PO_4 \sim 3'OH$ -разрывов. Причем при разрыве $4'$ и $3'$ межуглеродной связи дезоксирибозы также образуются $5'PO_4 \sim 3'OH$ -концы (4), но они не будут зашиваться ПН-лигазой. В недавних наших исследованиях было выявлено значительное восстановление трансформирующей активности γ -облученной ДНК при ее обработке АТФ-, ДПН-зависимыми ПН-лигазами, что свидетельствовало также об образовании $5'PO_4 \sim 3'OH$ -разрывов (5).

В настоящей работе исследовано количественное соотношение образовавшихся ПН-лигазорепазируемых и нерепазируемых фосфоэфирных разрывов в ДНК в зависимости от дозы облучения. Анализы проводили путем количественного соединения разрывов в фосфоэфирную связь ПН-лигазой и отщеплением несвязавшегося фосфора щелочной фосфатазой.

ДНК с радиоактивной меткой получали из культуры *Bacillus subtilis* SHGW, выращенной на среде, содержащей P^{32} . Очищенный препарат ДНК P^{32} (6) с молекулярным весом $3 \cdot 10^7$, с концентрацией 166 μ г/мл, имел удельную активность $2,3 \cdot 10^8$ имп/100 сек. на 1 мг по счетчику Т-25-БФЛ. Параллельно был получен нерадиоактивный препарат ДНК из *Bacillus subtilis* SHGW с молекулярным весом $1,8 \cdot 10^7$ с концентрацией 120 μ г/мл.

ДПН-зависимую ПН-лигазу получали из той же культуры по методу Оливера и Леман (7). За единицу ПН-лигазы принимали количество фермента, необходимое для перевода в фосфатазостойчивую форму 1 микроля фосфора ДНК-субстрата за 30 мин. при 25° . Субстрат для ПН-лигазы — ДНК $5' P^{32}O_4 \sim 3'OH$ получали путем обработки 166 μ г ДНК P^{32} 0,1 μ г панкреатической ДНКазы в присутствии 0,01 М трис-НСl, 5мМ $MgCl_2$, рН 8. Смесь объемом 1,2 мл инкубировали при 25° 30 мин., далее

добавляли 0,1 мл 0,25 М ЭДТА и нагревали 10 мин. при 68°, после чего диализовали против 0,15 М NaCl. Облучение раствора ДНК P^{32} проводили в концентрации 166 мкг/мл в 0,15 М NaCl при 2° на установке Cs^{137} при мощности дозы 450 рад/мин. Молекулярный вес ДНК и количество двойных разрывов (F) определяли вискозиметрическим методом. Анализ ПН-лигазоспецифичных и неспецифичных разрывов проводили следующим об-

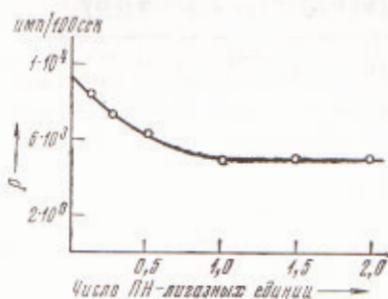


Рис. 2. Выбор количества ПН-лигазы для полного связывания $5'PO_4 \sim 3'OH$ -разрывов в 25 мкг ДНК $5' P^{32}O_4$.

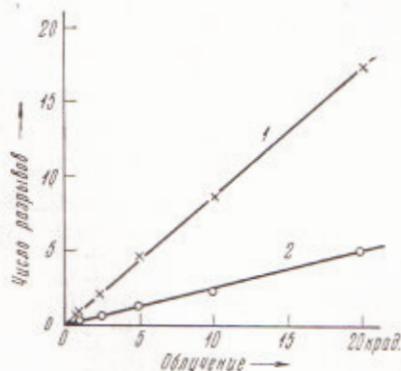


Рис. 3. Зависимость образования фосфорных разрывов от дозы облучения. 1 — ПН-лигазорепарируемые, 2 — не репарируемые ПН-лигазой

разом. К 50 мкг облученной ДНК добавляли 2 единицы ПН-лигазы с удельной активностью 2,5 ед/мг белка, 20 мМ ДПН, 10 мМ β-меркаптоэтанола, 5 мМ $MgCl_2$, 0,3 М NH_4Cl , 10 мМ трис-НСl, рН 8, в общем объеме 0,6 мл, инкубировали 2 часа при 25°. Параллельно в каждом случае ставили образцы с денатурированной ПН-лигазой. Денатурацию ПН-лигазы проводили нагреванием в течение 10 мин. при 80°. Дальнейшие процедуры были стандартны во всех пробах (*). После 2-часовой инкубации к смеси добавляли по 100 мкг немеченой ДНК и 2 мл холодной 0,6 М трихлоруксусной кислоты (ТХУК), центрифугировали при 12 000 г 15 мин., осадок промывали два раза 0,01 N HCl и растворяли в 0,5 мл 0,1 N NaOH, сразу добавляли 0,05 мл 1N HCl, 0,2 М трис и 0,05 мл 0,25 М ЭДТА, рН 8,6. Далее смесь инкубировали с щелочной фосфатазой (0,9 единицы, 40—45 мин. при 65°) (*), добавляя через каждые 15 мин. по 0,3 единицы фермента. Через 45 мин. реакционную смесь охлаждали и после добавления холодной 0,6 М ТХУК центрифугировали при 12 000 г 15 мин. Для подсчета радиоактивности брали супернатант.

При вышеуказанных условиях анализов происходило количественное связывание всех $5'PO_4 \sim 3'OH$ -разрывов ДНК ПН-лигазой и полное отщепление внутреннего и внешнего фосфора щелочной фосфатазой (рис. 1, 2). Статистически обработанные результаты анализов с облученной ДНК P^{32} представлены в табл. 1, из которой видно, что количество радиоактивного фосфора соответствует суммарному фосфору от $5'PO_4$ и $3'PO_4$ -концов межнуклеотидных разрывов и внешнему фосфору (а), 2 молекулы которого приходится на 1 молекулу нативной ДНК. Как известно, при действии радиации образование одиночных и двойных разрывов может сопровождаться частичным отщеплением фосфатной группы ($^{3-4}$). В данном анализе этот фосфат не регистрируется. Из табл. 1 (е) следует, что после обработки ДНК P^{32} ПН-лигазой получаем суммарный фосфор $3'PO_4$ -концов и внешний фосфор. Разность а — е представляет количество фосфора от $5'PO_4$ -концов разрывов, который с помощью лигазной реакции связывается с $3'OH$ -концами. Из табл. 1 видно также, что исходная необлученная ДНК имеет определенное количество разрывов как ПН-лигазоспецифичных, так и неспецифичных.

Зная удельную активность 1 мкмоль фосфора ДНК P^{32} , которая составляет $7,13 \cdot 10^4$ имп/100 сек., можно рассчитать количество мкмол. фосфора на 1 мкмоль ДНК P^{32} с молекулярным весом $3 \cdot 10^7$. Выражая результаты в эквимольных отношениях, можно вычислить количество межнук-

Таблица 1

Количество радиоактивного фосфора, освобожденного щелочной фосфатазой из 10 мкг ДНК после облучения (активность, имп/100 сек)

Доза в крдах	После обработки деаурированной ПН-лигазой (a)	После обработки активной ПН-лигазой (a)
0	2750 ± 110	1550 ± 50
0,5	3080 ± 200	1590 ± 45
1,0	3510 ± 240	1810 ± 70
2,5	4690 ± 360	2410 ± 108
5,0	7070 ± 230	2570 ± 80
10,0	10605 ± 390	3350 ± 150
20,0	19100 ± 410	5480 ± 170

Таблица 2*

Количество ПН-лигазорепазируемых и нерепарируемых фосфоэфирных разрывов ДНК, облученной в растворе 0,15 M NaCl (мкмоль фосфора на 1 мкмоль ДНК с средневесовым молекулярным весом $1 \cdot 10^6$)

Доза в крдах	ПН-лигазоспецифичные	Не репарируемые ПН-лигазой
0	(1,66) 0,00	(2,10) 0,00
0,5	(2,10) 0,44	(2,17) 0,07
1,0	(2,50) 0,84	(2,30) 0,20
2,5	(3,62) 2,06	(2,75) 0,63
5,0	(6,33) 4,67	(3,32) 1,22
10,0	(10,09) 8,43	(4,28) 2,18
20,0	(19,05) 17,39	(7,14) 5,01

* В скобках данные с учетом количества разрывов в исходной ДНК.

леотидных разрывов ПН-лигазорепазируемых (f_1) и нерепарируемых (f_2) на участок молекулы ДНК с среднемoleкулярным весом $1 \cdot 10^6$:

$$f_1 = 4,2 \cdot 10^{-2}(a - b) / 30.$$

Для расчета не репарируемых ПН-лигазой фосфоэфирных разрывов (f_2) необходимо учесть внешний фосфат. Одна молекула нативной ДНК в среднем имеет 2 PO_4 -группы на концах, а при облучении образующийся двойной разрыв (F) вызывает увеличение внешнего фосфора в $2F$ раза. Поэтому

$$f_2 = (4,2 \cdot 10^{-2}b - (2 + 2F)) / 30.$$

Вычисленные таким образом данные представлены в табл. 2 и на рис. 3. Выход связываемых ПН-лигазой разрывов и нерепарируемых разрывов имеет линейную зависимость от дозы, причем количество лигазорепазируемых разрывов составляет 77—85%. Специфичное образование большого количества $5'PO_4 \sim 3'OH$ межнуклеотидных разрывов, по-видимому, является результатом окисления $3'C$ -дезоксирибозы и лабильзации $3'-O-P$ -связи (^{2,3}). Из этих данных становится понятным также и полное восстановление трансформирующей активности облученной дозой 0,5 крэд ДНК при обработке АТФ- и ДПН-зависимыми ПН-лигазами (³). При данной дозе образуется 0,05—0,07 не репарируемых лигазами разрывов на участок ДНК с молекулярным весом $1 \cdot 10^6$.

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пушчино-на-Оке

Поступило
13 I 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ G. Dalrymple, J. Sanders et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, № 3, 538 (1970). ² A. Borр, U. Hagen, *Biochim. et biophys. acta*, **209**, № 2, 320 (1970). ³ М. И. Шальнов, Радиолит пуклеиновых кислот и молекулярная природа радиационного мутагеза. Докторская диссертация, М., 1969. ⁴ D. Karr, K. Smith, *Radiation Res.*, **42**, № 1, 34 (1970). ⁵ А. И. Газиев, Л. А. Фоменко и др., *ДАН*, **195**, № 2, 479 (1970). ⁶ С. Е. Бреслер, В. П. Кашин, Д. А. Перумов, *Молекулярная биология*, **4**, № 3, 414 (1970). ⁷ В. Olivera, J. Lehman, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**, № 5, 1426 (1967). ⁸ В. Weiss, T. Live, Ch. Richardson, *J. Biol. Chem.*, **243**, № 17, 4530 (1968).