Доклады Академии наук СССР
1971. Том 201, № 4

УДК 575-24 *БИОХИМИЯ*

А. И. ГАЗИЕВ, С. Р. УМАНСКИЙ, член-корреспондент АН СССР А. М. КУЗИН

ВЛИЯНИЕ ГИСТОНОВ НА РЕПАРАЦИЮ ОДНОНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК ПОЛИНУКЛЕОТИДЛИГАЗОЙ

Было показано, что АТФ- и ДПН-зависимые полинуклеотидлигазы (ПН-лигазы) способны репарировать индуцируемые γ-радиацией однонитевые разрывы в ДНК ([1]). Около 80% фосфоэфирных разрывов, индуцируемых ионизирующей радиацией, репарируется ПН-лигазой ([2]).

ПН-лигаза локализована в хроматине клеток костного мозга в виде активированного аденилатного комплекса ([3]), что свидетельствует об участии этого фермента в быстрой ликвидации возникающих in vivo однонитевых поломок ДНК. Вместе с тем известно, что гистоны, составляющие основной белковый компонент хромосом высших организмов, подавляют активность целого ряда ферментов. Так, гистоны ингибируют матричную активность ДНК в РНК- и ДНК-полимеразных системах ([4–5]). В связи с этим представлялось интересным сравнить репарацию ПН-лигазой ДНК в свободном состоянии и в составе нуклеогистона. Следует отметить, что интерпретация данных, получаемых на искусственных комплексах гистон — ДНК, обычно оказывается затруднительной. Это связано с тем, что при добавлении гистонов к ДНК образующийся нуклеогистон агрегирует и выпадает в осадок. Поэтому часто остается неясным, объясняется ли ингибирующее действие гистонов комплексированием с ДНК или является результатом того, что ДНК в составе нуклеогистона переходит в нерастворимое состояние. Поэтому мы изучали влияние гистонов на репарацию ДНК ПН-лигазой в двух системах. В первом варианте гистоны и ДНК смешивали в растворе и ПН-лигазную реакцию проводили без удаления выпавшего осадка. Во-втором варианте гистоны добавляли к ДНК, фиксированной на целлюлозе. Таким образом предотвращалась агрегация образующегося нуклеогистона. ПН-лигазоспецифичный субстрат получали путем обработки P^{32}-ДНК из Bac. subtilis SHGU панкреатической ДНКазой I как описано ранее ([2]). P^{32}-ДНК с лигазоспецифичными разрывами фиксировали на микрокристаллической целлюлозе ЛТ фирмы «Chemapol» по методу ([6]) с незначительными модификациями. К раствору ДНК (250 μг/мл в 0,01 трис-HCl-буфере pH 7,8, содержащем $1 \cdot 10^{-3}$ *M* ЭДТА) добавляли сухую целлюлозу (1 г / 3 мл), смесь сушили 18 час. при 25° и 24 часа при 4° под вакуумом на КОН. Сухой порошок суспендировали в 0,01 *M* трис-HCl-буфере pH 8 и трижды отмывали этим же буфером. P^{32}-ДНК-целлюлозу ресуспендировали в том же буфере из расчета, чтобы 0,3 мл суспензии соответствовало 50 μг ДНК. ПН-лигазу выделяли из Bac. subtilis SHGU по методу Оливера и Леман ([7]). Гистоны выделяли из тимуса крыс по методу ([8]). P^{32}-ДНК с разрывами в растворе или фиксированную на целлюлозе смешивали с гистонами таким образом, чтобы конечный объем смеси составлял 0,4 мл. Репарационная смесь содержала следующие компоненты в концентрации: 20 μ*M* ДПН, 0,01 *M* $MgCl_2$, 0,2 *M* NaCl, 0,01 *M* β-меркаптоэтанола, 0,01 *M* трис-HCl-буфер pH 8,0 и 0,5 единиц VI фракции ПН-лигазы; инкубировали 60 мин. при 25°.

О репарации P^{32}-ДНК с разрывами судили по разности отщепляемого щелочной фосфатазой радиоактивного фосфора из 100 μг P^{32}-ДНК до и после обработки ПН-лигазой ([2, 9]). ПН-лигазную активность в отсутствие гистонов принимали за 100%.

Прежде всего необходимо было выяснить, насколько ДНК, фиксированная на целлюлозе, может служить субстратом для используемых в работе ферментов. Для этого предварительно испытывали P^{32}-ДНК-целлюлозу на ПН-лигазную, фосфатазную и ДНКазную реакцию. ДНКазу инкубировали с 50 μг ДНК на 1 мл в 0,01 *М* трис-HCl-буфере (pH 7,5), содержащем 0,005 *М* $MgCl_2$, в течение 1 часа при 37°. Полученные данные представлены в табл. 1. Видно, что при фиксации на целлюлозе ДНК сохраняет свою субстратную специфичность во всех этих реакциях. В табл. 1 приведены также данные о действии щелочной фосфатазы на ДНК и нуклеогистон. Активность фосфатазы в обоих случаях одинакова. Это и следовало ожидать, так как фосфатазная реакция для отщепления внутреннего фосфора ДНК проводится при 65° ([9]). Можно полагать, что в этих условиях большая часть гистонов отделялась от ДНК или, во всяком случае, их связь с ДНК лабилизировалась. Взаимодействие свободных гистонов с щелочной фосфатазой в этих же условиях также маловероятно.

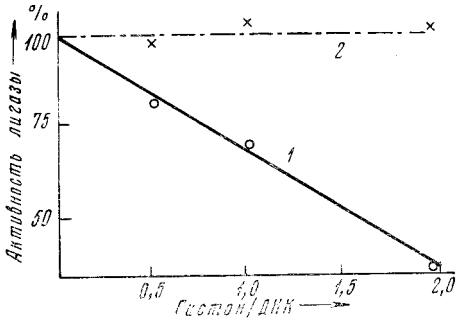

Рис. 1. Влияние гистонов на репарацию ДНК ПН-лигазой. Гистоны добавляли к 50 μг ДНК в растворе (*2*)

На рис. 1 представлены данные о влиянии различных концентраций гистонов на способность ПН-лигазы репарировать разрывы в ДНК. Видно, что когда ДНК-5′$P^{32}O_4$ находится в растворе в виде нуклеогистона, ПН-лигазная активность остается неизменной даже при отношении гистон/ДНК, равном двум. Падение же ПН-лигазной активности при взаимодействии гистонов с ДНК, фиксированной на целлюлозе, связано, по-видимому, с какими-то побочными эффектами.

Наиболее вероятным представляется предположение, что часть гистонов, не связываясь с ДНК-целлюлозой, при добавлении ПН-лигазы комплексируется с ней. О способности гистонов связываться с белками кислой природы хорошо известно ([10], [11]). Для выяснения этого вопроса были поставлены следующие опыты. В одном случае 30 μг P^{32}-ДНК-целлюлозы после смешивания с гистонами в отношении 2 : 1 тщательно отмывали 0,01 *М* трис-HCl-буфером pH 8,0 для удаления несвязавшихся гистонов. В другом — ПН-лигазу до добавления к ДНК-целлюлозе инкубировали 15 мин. при 25° с 15 μг гистонов, после чего проводили репарационные реакции. Результаты анализов показали, что репарация ДНК-целлюлозного субстрата в присутствии гистонов осуществляется на 70—75% относитель-

Таблица 1

Проверка активности ферментов на ДНК-целлюлозе

Фермент	Характеристика активности	Активность
ДНКаза I	Количество ДНК, перешедшее в кислоторастворимое состояние, %	97
Щелочная фосфатаза	Количество отщепляемого фосфора, имп/100 сек. на 200 μг ДНК	16 630
Щелочная * фосфатаза	То же	16 302
ПН-лигаза	Количество фосфора, связанного лигазой в фосфатазоустойчивую связь, имп/100 сек. на 200 μг ДНК	8 735

* В присутствии гистонов. Гистон/ДНК = 2.

но контроля. Удаление несвязавшихся с ДНК гистонов полностью восстанавливает способность нуклеогистона репарироваться ПН-лигазой.

Предынкубация ПН-лигазы с гистонами резко подавляет ее активность на 40—45%.

Таким образом, полученные данные при проведении ПН-лигазной реакции в растворе и на ДНК-целлюлозе свидетельствуют о том, что гистоны, связавшиеся с ДНК, не препятствуют репарации однотяжевых разрывов в ДНК, даже при изменении агрегатного состояния последней. Свободные же гистоны, связываясь с ПН-лигазой, ингибируют ее ферментативную активность. Результаты этих экспериментов свидетельствуют также о том, что гистоны не «прикрывают» 5′PO_4- и 3′OH-концы фосфодиэфирного разрыва ДНК, тем самым сохраняя специфичность ДНК-субстрата к ПН-лигазам и экзонуклеазам. Известно также, что полиамины, связавшиеся с ДНК, не влияют на активность фосфодиэстеразы, действующей с 5′PO_4-конца одиночного разрыва ДНК ([12]).

Можно полагать, что одиночные разрывы, возникающие в ДНК сразу после облучения, репарируются ПН-лигазой. Вместе с тем репарация однонитевых разрывов, возникающих спустя некоторое время после действия радиации под влиянием нуклеаз или радиотоксинов, будет, по-видимому, ингибироваться «свободными» гистонами, появляющимися в ядре через 6—24 часа после облучения в результате частичной диссоциации дезоксинуклеопротеида ([13]).

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пущино-на-Оке

Поступило
6 VII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. И. Газиев, Л. А. Фоменко и др., ДАН, **195**, № 2, 479 (1970). [2] А. И. Газиев, Л. А. Фоменко и др., ДАН, **199**, № 1, 171 (1971). [3] А. И. Газиев, Д. Т. Закржевская и др., ДАН, **199**, № 2, 426 (1971). [4] E. W. Johns, T. A. Hoare, Nature, **226**, № 5246, 650 (1970). [5] S. Schwimmer, J. Bonner, Biochim. et biophys. acta, **108**, № 1, 67 (1965). [6] B. M. Alberts et al., Cold Spring Harbor Symp. on Quantit. Biol., **33**, 289, (1968). [7] B. Olivera, J. Lehman, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **57**, № 5, 1426 (1967). [8] J. Bonner et al., In: Methods in Enzymology, **12**, Part B, 3 (1968). [9] B. Weiss et al., J. Biol. Chem., **243**, 17, 4530 (1968). [10] T. Y. Wang, J. Biol. Chem., **242**, 4, 1220 (1967). [11] С. Р. Уманский и др., Молекулярная биология, **5**, № 2, 270 (1971). [12] U. Bachrach, G. Eilon, Biochem. et biophys. acta, **179**, № 2, 494 (1969). [13] Б. А. Король, А. М. Кузин и др., Радиобиология, **2**, № 2, 180 (1971).