

Э. А. ВАЛЬДШТЕИН, Н. В. ТОМИЛИН

**О СПЕЦИФИЧНОСТИ У.-Ф.-ЭНДОНУКЛЕАЗЫ ИЗ *M. LYSODEIKTICUS* ·
ДЕЙСТВИЕ НА ДНК, ОБРАБОТАННУЮ ГИДРОКСИЛАМИНОМ**

(Представлено академиком Е. М. Крепом 4 I 1971)

Широко распространено представление о том, что ферменты, участвующие в начальных этапах репарации поврежденной ДНК, мало специфичны. Предполагается, что ферменты, удаляющие структурные дефекты ДНК, узнают не определенные изменения оснований, а локальное нарушение их спаривания и вторичной структуры, сопровождающее различные типы модификаций (¹⁻³). Согласно данным, полученным *in vivo* (⁴) и *in vitro* (^{5, 6}), выщепление димеров из у.-ф.-облученной ДНК — процесс, в котором участвуют два фермента, действующие последовательно и координированно. Первый из них — фермент инцизии — разрывает ДНК рядом с димером, второй — фермент эксцизии — вызывает разрыв с другой стороны от димера, выщепляя его в составе олигонуклеотидного фрагмента. Фермент эксцизии, по-видимому, не отличается высокой специфичностью действия (^{6, 7}). Узнавание дефекта и степень специфичности процесса выщепления, таким образом, контролируется ферментом инцизии.

Ранее были получены данные, свидетельствующие об определенной специфичности у.-ф.-эндоуклеазы, вызывающей первый разрыв в ДНК, содержащей димеры (^{8, 9}). В гибридной ДНК, состоящей из у.-ф.-облученной и необлученной нитей, у.-ф.-эндоуклеаза из *M. lysodeikticus* вызывает разрывы лишь в нити, содержащей димеры пиримидиновых оснований. Этот результат привел к предположению, что у.-ф.-эндоуклеаза распознает не локальную денатурацию биспирали ДНК, а определенную химическую модификацию в одной из нитей ДНК.

В настоящей работе активность у.-ф.-эндоуклеазы исследована по отношению к ДНК, обработанной гидроксиламином (ГА). Известно, что в нейтральной и кислой среде ГА преимущественно взаимодействует с остатками цитозина (¹⁰), изменяя их матричные свойства (^{11, 12}). Можно ожидать, что модификация цитозина, индуцированная ГА, сопровождается нарушением водородного спаривания оснований и вторичной структуры биспирали ДНК. Если у.-ф.-эндоуклеаза мало специфична и узнает лишь нарушение вторичной структуры ДНК, то она может оказаться активной и по отношению к ДНК, обработанной ГА. В данной работе показано, что это не так.

ДНК, использованную в опытах, выделяли по методу Мармура (¹³) из клеток *Escherichia coli* 15 T⁻, выращенных в среде М9, обогащенной 2-C¹⁴-тимидином (1—2 мкг/мл; уд. активность 26 мС/г) и казиновыми кислотами (0,25 мг/мл). Уд. активность ДНК составляла 2—5·10³ имп/100 сек. на 1 мкг. Обработку ДНК ГА проводили в условиях, способствующих интенсивному мутагенезу трансформирующей ДНК (¹⁴). Солянокислый ГА растворяли в воде, нейтрализовали сухой NaOH до требуемого pH и доводили до 2M концентрации водой. Смесь, состоящую из 0,1 мл C¹⁴-ДНК (10 мкг), 0,5 мл 2 M ГА и 0,4 мл 2 M NaCl — 0,01 M ЭДТА (с тем же pH, что и ГА), инкубировали в течение часа при 70°, затем медленно охлаждали и фильтровали на колонке сефадекса (G-50, сверхмелкий, 0,6 × 18 см). ДНК в элюате не содержала ГА и NaCl (присутствие ГА контролировали по реак-

ции обесцвечивания $KMnO_4$). В некоторых опытах ГА удаляли путем диализа при 4° против $0,05 M$ калий-фосфатного буфера — $0,001 M$ ЭДТА (рН 7,4) в течение 12—14 час.

Ферментные препараты получали по модифицированному методу Накаяма и др. (15). Клетки *M. lysodeikticus*, отмытые в $0,01 M$ калий-фосфатном буфере — $0,001 M$ ЭДТА (рН 7,4) (ФЭ), разрушали лизоцимом ($50 \mu\text{г}/\text{мл}$) при 37° . Лизат после охлаждения озвучивали (10 мин. при 15 кгц), центрифугировали (30 мин. при $25\,000$ об/мин.) и прозрачный желтый супернатант далее использовали как грубый экстракт. Для извлечения и очистки у.-ф.-эндонуклеазы к грубому экстракту добавляли сульфат стрептомицина (до конечной концентрации 1%), после центрифугирования надосадочную жидкость насыщали до 65% $(NH_4)_2SO_4$ и выпавший осадок растворяли в ФЭ, содержащем $0,001 M$ β -меркаптоэтанола (ФЭМ) до конечной концентрации $16 \text{ мг}/\text{мл}$ белка. Препарат обессоливали на колонке молселекта (Г-25, элюция ФЭМ), сорбировали на колонке ТЕАЕ-целлюлозы, промывали ФЭМ и элюировали $0,0$ — $0,5 M$ градиентом $NaCl$ в ФЭМ. Грубый экстракт и активные фракции ампулировали, замораживали и хранили при -20° .

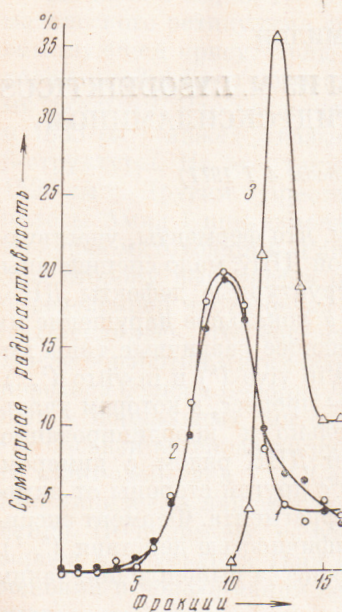


Рис. 1. Действие у.-ф.-эндонуклеазы на нативную и у.-ф.-облученную ДНК. Инкубационная смесь: $0,1 \text{ мл } C^{14}$ -ДНК ($10 \mu\text{г}$) нативной или облученной ультрафиолетом в дозе $2,5 \cdot 10^4$ эрг/ мм^2 ; $0,2 \text{ мл}$ у.-ф.-эндонуклеазы ($100 \mu\text{г}$ белка) или H_2O ; $0,1 \text{ мл } 0,2 M$ трис — $0,16 M$ ЭДТА рН 7,4. После 60-минутной инкубации при 37° $0,2 \text{ мл}$ смеси насаивали на щелочной градиент и центрифугировали при 20° , $48\,000$ об/мин., 2 часа в SW 50L роторе Spinco L2-65K. 1 — нативная ДНК с водой, 2 — нативная ДНК с ферментом, 3 — у.-ф.-облученная ДНК с ферментом

Эндонуклеотическую активность определяли методом ультрацентрифугирования в щелочном градиенте сахарозы. Способ приготовления градиентов, разделения на фракции и счет радиоактивности проб описан ранее (8).

В контрольных опытах была проверена активность препарата у.-ф.-эндонуклеазы по отношению к нативной и у.-ф.-облученной ДНК. На рис. 1 показаны профили седиментации, из которых видно, что у.-ф.-эндонуклеаза фрагментирует у.-ф.-облученную ДНК и неактивна по отношению к необлученной нативной ДНК. В опытах с ДНК, обработанной ГА, результат был иным (рис. 2). Инкубация с у.-ф.-эндонуклеазой не влияла на скорость седиментации ДНК, обработанной ГА в нейтральной среде (рН 7,2), и лишь небольшой, но воспроизводимый сдвиг профиля седиментации был обнаружен при инкубации ДНК, обработанной ГА при рН 5,2. Важно, что подобный эффект не выявлялся в аналогичных опытах с ДНК, обработанной в тех же условиях температуры и рН, но без ГА.

Небольшая активность ферментного препарата по отношению к ДНК, модифицированной ГА в кислой среде, можно было объяснить либо низкой эффективностью узнавания у.-ф.-эндонуклеазой повреждений ДНК, индуцированных ГА, либо присутствием в нашем препарате нуклеазной активности, действующей на ДНК, обработанную ГА. Для проверки этой альтернативы были поставлены опыты, в которых исследовалась конкуренция ГА — ДНК и у.-ф.-облученной ДНК за фермент. Для этого ДНК, обработанную ГА, инкубировали с у.-ф.-эндонуклеазой в присутствии 5-кратного количества немеченой ДНК, облученной высокой дозой у.-ф. К контрольным образцам у.-ф.-облученную ДНК, инкубированную в тех же условиях

с ферментом, добавляли после конца инкубации. Действительно, у.-ф.-облученная ДНК не конкурирует за нуклеотическую активность, действующую на ДНК, модифицированную ГА. Этот результат был получен не только в опытах с ДНК, обработанной ГА при 5,2, но и при рН 6,2. Таким об-

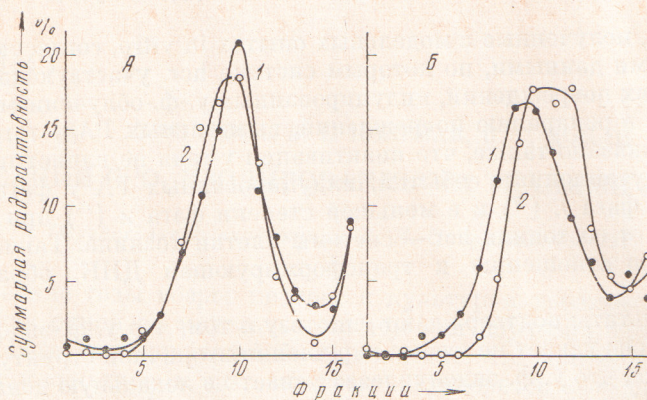
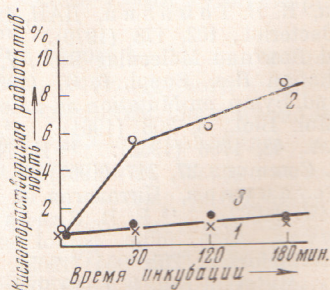


Рис. 2. Действие у.-ф.-эндонуклеазы на ДНК, обработанную гидроксиламином при рН 7,2 (А) и 5,2 (Б). Инкубационная смесь: 0,1 мл C^{14} -ДНК, обработанная ГА (5—10 μ г); 0,2 мл 0,1 М трис — 0,08 М ЭДТА рН 7,4; 0,1 мл у.-ф.-эндонуклеазы или H_2O . Для А: рН 7,2; инкубация 120 мин. при 37°, центрифугирование 2 часа при 48 000 об/мин. Для Б: инкубация 60 мин. при 37°, центрифугирование 3 часа при 48 000 об/мин. 1 — без фермента, 2 — с ферментом

разом, по-видимому, верна вторая альтернатива, т. е. у.-ф.-эндонуклеаза неактивна по отношению к ДНК, модифицированной ГА.

Далее проверялось, действует ли на ДНК, обработанную ГА, эндо- или экзонуклеолитическая активность. Для этого модифицированную ДНК инкубировали с ферментом в тех же условиях, что и ранее (в присутствии

Рис. 3. Действие грубого экстракта на ДНК, обработанную гидроксиламином и на у.-ф.-облученную ДНК. Инкубационная смесь: 0,5 мл C^{14} -ДНК (5 μ г) — нативной, обработанной ГА при рН 6,2, или у.-ф.-облученной в дозе $1,7 \cdot 10^4$ эрг/мм²; 0,3 мл 0,36 М трис-НСI — 0,01 MgCl₂; 0,1 мл грубого экстракта. Пробы по 0,15 мл отбирали по ходу инкубации при 37°, осаждали 0,1 мл HClO₄ и радиоактивность измеряли в кислоторастворимой фракции. 1 — нативная ДНК, 2 — у.-ф.-облученная ДНК, 3 — ДНК, обработанная ГА



0,04 М ЭДТА, рН 7,4), и денатурированную щелочью ДНК пропускали через колонку сефарозы (⁹). Вся радиоактивность элюировалась в области высокополимерных фракций. В области мононуклеотидов метка не была обнаружена. Следовательно, на ДНК, обработанную ГА, влияет, по-видимому, эндонуклеаза. В ДНК, обработанной ГА при рН 5,2, число эндонуклеолитических разрывов по приблизительным расчетам не превышает в среднем двух на одну молекулу.

Поскольку в опытах использовался очищенный ферментный препарат, то можно было предположить, что в процессе очистки теряется значительная доля активности, действующей на ДНК, обработанную ГА. В таком случае активным мог бы оказаться грубый экстракт, извлеченный из тех же клеток *M. lysodeikticus*. ДНК, обработанную ГА при рН 6,2, выдерживали с грубым экстрактом в присутствии ионов магния и о результате судили по суммарной эндо- и экзонуклеолитической активности препарата.

Как видно из рис. 3, активность грубого экстракта была не большей, чем в опытах с нативной ДНК. В то же время грубый экстракт оказывал заметное действие на у.-ф.-облученную ДНК. Это подтверждает сделанный ранее вывод о том, что на ДНК, модифицированную ГА, действует, по-видимому, эндонуклеаза.

Результаты, полученные в модельных опытах *in vitro*, согласуются с ранее полученными данными, по которым система *hcr*, участвующая в репарации летальных повреждений, индуцированных у.-ф.-облучением у *E. coli*, не вовлекается в репарацию повреждений, вызываемых ГА у того же объекта (¹⁶, ¹⁷). Показано также, что инактивация *v*-гена не влияет на частоту летальных и мутационных событий, индуцированных ГА у фага Т4 (¹⁸). Выживаемость фага λ (¹⁹) и в меньшей степени фага κ (²⁰) при действии ГА не зависит от состояния *hcr* — системы клетки хозяина. Такие же данные имеются по отношению к трансформирующей ДНК, обработанной ГА (²¹).

Наши результаты подтверждают гипотезу о том, что у.-ф.-эндонуклеаза из *M. lysodeikticus* узнает не любые нарушения вторичной структуры ДНК. Весьма вероятно, что у.-ф.-эндонуклеаза узнает не локальную денатурацию биспирали ДНК, а химическую модификацию оснований одной из нитей. Не исключено, что данный фермент отличается значительной специфичностью и его действие ограничено определенным кругом первичных повреждений ДНК.

Институт цитологии
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
23 XII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. B. Setlow, W. L. Carrier, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **51**, 226 (1964).
- ² R. B. Boyce, P. Howard-Flanders, Zs. Vererbungsl., **24**, 345 (1964).
- ³ P. C. Hanawalt, R. H. Haynes, Biochem. Biophys. Res. Commun., **19**, 462 (1965).
- ⁴ В. П. Парибок, Э. А. Вальдштейн, Н. В. Томили, Цитология, **10**, 93 (1969).
- ⁵ L. Grossman, J. C. Kaplan et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **33**, 229 (1968).
- ⁶ Y. Takagi, M. Sekiguchi et al., *ibid.*, **33**, 219 (1968).
- ⁷ R. B. Kelly, M. R. Atkinson et al., Nature, **224**, 495 (1969).
- ⁸ В. П. Парибок, Н. В. Томили, ДАН, **195**, № 2 (1970).
- ⁹ W. L. Carrier, R. B. Setlow, J. Bacteriol., **102**, 178 (1970).
- ¹⁰ J. H. Phillips, D. M. Brown, Progr. in Nucl. Acid Res. and Molecular Biol., **7**, 349 (1967).
- ¹¹ E. Freese, E. Bautz-Freese, Radiation Res., Suppl. 6, 97 (1966).
- ¹² L. Grossman, D. M. Brown, In: Ciba Found. Symp. on Mutation as a Cellular Process, London, 1969, p. 109.
- ¹³ J. Marmur, J. Mol. Biol., **3**, 208 (1961).
- ¹⁴ E. Freese, H. B. Strac, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **48**, 1796 (1962).
- ¹⁵ H. Nakayama, S. Okubo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., **27**, 247 (1967).
- ¹⁶ М. К. Исабаева, Э. А. Вальдштейн, В. Д. Жестяников, Цитология, **9**, № 481 (1967).
- ¹⁷ М. К. Исабаева, Цитология, **9**, 1490 (1967).
- ¹⁸ E. B. Freese, E. Freese, Genetics, **54**, 1055 (1966).
- ¹⁹ V. N. Soyfer, Arch. roum. pathol. exp. et microbiol., **28**, 941 (1969).
- ²⁰ U. Winkler, Zs. Naturforsch., **20b**, 864 (1965).
- ²¹ E. S. Bresler, V. L. Kalinin, D. A. Perumov, Mutation Res., **9**, 1 (1970).