

УДК 577.155 : 547 : 962.2

БИОХИМИЯ

В. И. ТЮЛЕНЕВ, Г. Д. БЕРДЫШЕВ, Н. А. ПАЛАДИЧ

ТОРМОЖЕНИЕ ГИСТОНАМИ РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА ДНК КИСЛОЙ ДНКазой

(Представлено академиком А. В. Палладиным 14 II 1972)

В последние годы получены данные о том, что ДНКазы участвуют в таких важных процессах, как репликация ДНК, генетическая рекомбинация, репарация поврежденных молекул ДНК^(1,2). Поэтому особый интерес представляет изучение ингибиторов ДНКаз, которые регулируют активность этих ферментов в клетке.

Ингибиторы нейтральной ДНКазы (ДНКазы I) выделены и представляют собой вещества белковой природы⁽³⁾, причем они не подавляют активность кислой ДНКазы (ДНКазы II)⁽⁴⁾. О существовании ингибитора кислой ДНКазы у млекопитающих сообщили Коулессар с сотрудниками⁽⁵⁾, Леска и Паолетти⁽⁶⁾, причем последние получили его в очищенном виде. Однако Ове и соавторы⁽⁷⁾ не смогли подтвердить присутствие ингибитора кислой ДНКазы в различных тканях крыс.

Мощными ингибиторами ряда ферментов, связанных с синтезом нуклеиновых кислот (РНК-полимеразы, ДНК-полимеразы), являются гистоны⁽⁸⁾. Могут ли гистоны ингибировать ДНКазу, неизвестно. Выяснение этого вопроса представляется весьма важным для понимания регуляторных взаимоотношений между гистонами и ДНКазами хроматина.

В настоящей работе приводятся данные о способности гистонов тормозить активность кислой ДНКазы хроматина клетки.

Источником препарата кислой ДНКазы являлся хроматин тимуса телят, полученный по методу Джонса⁽⁹⁾, из которого ДНКазу экстрагировали 0,45 М раствором NaCl после предварительного удаления части белков 0,35 М раствором NaCl. Препарат фермента диализовали против охлажденной дистиллированной воды 18 час. и использовали в дальнейших опытах.

Выделение суммарного гистона из тимуса телят проводили путем экстракции отмытого хроматина 0,2 М HCl, с последующим осаждением ацетоном и высушиванием под вакуумом⁽⁹⁾.

Высокополимерную ДНК лососей выделяли по методу Кэя⁽¹⁰⁾. Инкубационная смесь состояла из 0,1 М ацетатного буфера, pH 4,6, 200 мкг ДНК и 500 мкг фермента. Время инкубации 30 мин. при 37°. Гистоны к реакционной смеси добавляли от 50 до 600 мкг. На рис. 1 показано снижение активности кислой ДНКазы под влиянием возрастающих концентраций гистона. Из рисунка видно, что при предварительной инкубации ДНК с гистонами (кривая 1) в течение 5 мин. при 37° происходит более сильное торможение активности кислой ДНКазы, чем при предварительной инкубации фермента с гистонами (кривая 2). Так, предварительная инкубация 100 мкг гистона с ДНКазой не оказывает какого-либо влияния на ее активность, тогда как инкубация этих же количеств гистона с ДНК приводит к потере активности ДНКазы на 18%. Предварительная инкубация 600 мкг гистона с ДНК приводит почти к полной потере активности ДНКазы, тогда как после предварительной инкубации этого же количества гистона с ДНКазой выявляется около 25% активности фермента.

Особенно четкая зависимость торможения активности фермента от характера предварительной инкубации видна на рис. 2. Так, торможение активности кислой ДНКазы не зависит от характера предварительной инкубации в области концентрации гистона 50—200 $\mu\text{г}$. Начиная с 200 $\mu\text{г}$ торможение активности кислой ДНКазы при предварительной инкубации гистона с ДНК резко усиливается. Максимальное торможение активности кислой ДНКазы происходит при 400 $\mu\text{г}$ гистона. Дальнейшее увеличение концентрации гистона не приводит к возрастанию торможения активности

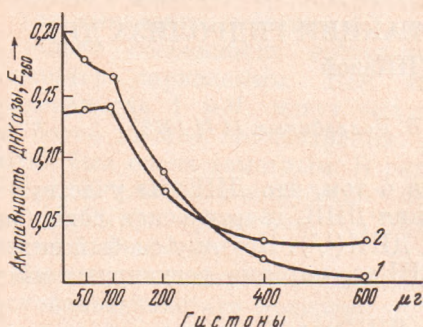


Рис. 1. Влияние различных концентраций гистона на активность кислой ДНКазы. Предынкубация гистона с ДНК (1), с ферментом (2). Объем инкубационной смеси 2 мл

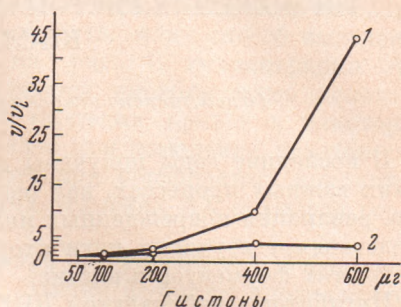


Рис. 2. Зависимость отношения v/v_1 от концентрации гистона (v — активность ДНКазы без ингибитора, v_1 — с ингибитором). 1, 2 — как на рис. 1

фермента, если проведена предварительная инкубация гистона с кислой ДНКазой (кривая 2). Если же провести предварительную инкубацию гистона с ДНК, то концентрации гистона 400—600 $\mu\text{г}$ угнетают активность ДНКазы (кривая 1).

Таким образом, эти данные свидетельствуют о смешанном характере торможения гистонами активности кислой ДНКазы. Механизмы ингибирующего эффекта гистонов на кислую ДНКазу могут заключаться или в прямом взаимодействии гистона с молекулой фермента, или в изменении гистонем ряда свойств ДНК, например ее доступности для ДНКазы. Действительно, имеются данные о том, что гистоны могут действовать на фермент как аллостерические регуляторы. Известно, что действие на РНК-полимеразную активность обогащенного лизином гистона отличается от действия гистона, обогащенного аргинином⁽⁸⁾. Поэтому при использовании суммарной фракции гистонов, как в наших экспериментах, следует учитывать, что действие одних фракций гистонов накладывается на действие других.

Нами показано, что кинетика кислой ДНКазы хроматина тимуса телят (зависимость активности от различных концентраций субстрата) подчиняется классическому уравнению Михаэлиса⁽¹¹⁾. Однако в присутствии ингибитора при pH 4,6 график зависимости скорости реакции от количества ДНК выражается в форме сигмоидальной кривой. Более высокие концентрации ингибитора влияют более сильно. Торможение преодолевается увеличивающимися концентрациями субстрата, т. е. действие ингибиторов становится менее выраженным при увеличении концентрации ДНК. График зависимости скорости реакции от концентрации ингибитора (рис. 1) выражается сигмоидальной кривой только в случае предварительной инкубации кислой ДНКазы с гистонами. В этом отношении тормозящее действие гистона на кислую ДНКазу напоминает взаимодействие ингибитора негистоновой природы с кислой ДНКазой печени мышей⁽⁶⁾.

Обнаруженная нами способность гистонов ингибировать активность кислой ДНКазы хроматина дает основание предполагать, что и другие

ДНКазы (I, III, и IV) также могут ингибироваться гистонами. Нами получены предварительные данные, которые показывают, что активность нейтральной ДНКазы также ингибируется гистонами. Во взаимодействии гистонов с нуклеазами хроматина может заключаться один из механизмов регуляции гистонами многих генетических функций.

Киевский государственный университет
им. Т. Г. Шевченко

Поступило
7 II 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Y. R. Lehman, Ann. Rev. Biochem., 36, 645 (1967). ² P. Howard-Flanders, Ann. Rev. Biochem., 37, 175 (1968). ³ В. С. Шапот, Нуклеазы, М., 1968. ⁴ M. U. Lindberg, L. Skoog, Europ. J. Biochem., 13, 326 (1970). ⁵ O. D. Kowlessar, S. Okada et al. Arch. Biochem. and Biophys., 68, 231, (1957). ⁶ P. Lesca, C. Paoletti, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 64, № 3, 913 (1969). ⁷ P. Ove. O. E. Brown, J. Laszlo, Arch. Biochem. and Biophys., 131, 652 (1969). ⁸ T. C. Spelsberg, S. Tankersley, L. S. Hnilica, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 62, № 4, 1218 (1969). ⁹ E. W. Johns, Biochem. J., 92, 55 (1964). ¹⁰ E. R. Kay, N. S. Sommons, A. L. Dounce, J. Am. Chem. Soc., 74, 1724 (1952). ¹¹ М. Диксон, Э. Уэбб, Ферменты, М., 1966.