

УДК 577.15+547.963.3

БИОФИЗИКА

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

**ПЕРВИЧНОЕ СОСТОЯНИЕ ДНК КАК МАТРИЦЫ
В ДНК-ПОЛИМЕРАЗНОЙ РЕАКЦИИ В γ -ОБЛУЧЕННЫХ КЛЕТКАХ
E. COLI**

В настоящее время установлено участие как ДНК-полимеразы I (¹, ²), так ДНК-полимераз II, III (³) в репаративной репликации ДНК бактерий, облученных ионизирующей радиацией. Появление «незапланированного» нешолукопсервативного синтеза ДНК под действием ионизирующей радиации на клетку свидетельствует о дополнительной активации ДНК-матрицы. Активация ДНК-матрицы, очевидно, обусловлена появлением в ней дополнительных 3'ОН-концевых групп, необходимых для ДНК-полимеразных реакций (⁴). 3'ОН-концевые группы в ДНК могут появиться как под действием специфичной к поврежденной ДНК-эндонуклеазы (¹), так и при непосредственном разрыве фосфодиэфирной связи в результате радиационно-химической реакции (², ⁵).

Однако в настоящее время мы не знаем, в какой мере 3'-концевые группы разрывов, индуцируемых ионизирующей радиацией в ДНК *in vivo*, могут служить субстратными точками в ДНК-полимеразной реакции. Настоящая работа посвящена исследованию способности ДНК-полимеразы I использовать ДНК из γ -облученных клеток *E. coli* как матрицу в полимеразной реакции и анализу состояния 3'-концевых групп разрывов в этой ДНК.

В работе использован штамм *E. coli* K-12 (дикий тип). Культуру выращивали до логарифмической фазы роста (⁶), собирали центрифугированием. Облучение клеток и выделение ДНК из них в высокомолекулярном состоянии проводили в условиях, исключающих действие ферментов метаболизма ДНК (⁵, ⁷). Средние молекулярные веса препаратов ДНК, определенные методом седиментации (⁸), соответствовали 0,9–2,1·10⁸ дальтон. ДНК-полимеразную реакцию проводили как указано в работе (⁹). В реакции использовали ДНК из облученных и необлученных клеток, активированную ДНКазой I, а также предварительно обработанные полинуклеотидкиназой (ПН-киназа), ДНК-лигазой и экзонуклеазой III. Для этого к 0,05 мл и 0,4 нМ ДНК (1,8–4,2 мкг) в 0,01 М трис-НСI-буфере (рН 8,2), содержащем 1 мМ ЭДТА, добавляли 0,1 мл 0,02 М глицинового буфера (рН 8,5), содержащего 10 мМ MgCl₂, 5 мМ β -меркаптоэтанол, по 40 мкМ дГТФ, дТТФ, дЦТФ, ³H-ДАТФ (1 мкС) каждого. К этой смеси добавляли 4,3 единицы ДНК-полимеразы I (фосфат-целлюлозная фракция) в 0,05 мл 0,01 М глицинового буфера, содержащего 1 мг/мл альбумина бычьей сыворотки. Реакционную смесь инкубировали при 37° в течение 30 мин., реакцию останавливали и образцы обрабатывали как описано (¹⁰, ¹¹). Радиоактивность подсчитывали на установке SL-30 («Интертек-енк»). Количество вновь синтезированной ДНК выражали в импульсах в 1 мин. ³H-ДАТФ по 0,1 нмол. ДНК-матрицы в 1 мл. ДНК из облученных клеток была также предварительно обработана экзонуклеазой III и ПН-киназой и лигазой последовательно. Эти реакции позволяли выяснить состояние 3'-концевой группы и ее близость к 5'-концу в разрывах ДНК. Последовательные ПН-киназную и лигазную реакции проводили, как это было описано нами ранее (⁵). Обработку ДНК экзонуклеазой III проводили в реакционной смеси (2 нмол. ДНК в 1 мл), как указано в работе (¹¹). Активированную ДНК для контрольных полимеразных реакций получа-

ли обработкой ДНК из необлученных клеток ДНКазой I⁽⁹⁾. В работе использована ДНКазы I (Е. С. 3.1.4.5), препарат Вашингтонской биохимической корпорации; АТФ-зависимую ДНК-лигазу и ПН-киназу очищали из *E. coli* В, инфицированной фагом Т4⁽¹²⁾. ДНК-полимеразу I (Е. С. 2.7.7.7) и экзонуклеазу III (Е. С. 3.1.4.1) очищали из культуры *E. coli* 1100 endo I^(9, 11). ПН-киназа, ДНК-лигаза, экзонуклеаза III и ДНК-полимераза I не содержали эндонуклеазные примеси. Дезоксинуклеотидтрифосфаты — продукция фирмы «Serva», ³H-дАТФ (специфическая активность 10,5 С/ммоль) — компаний «Amersham».

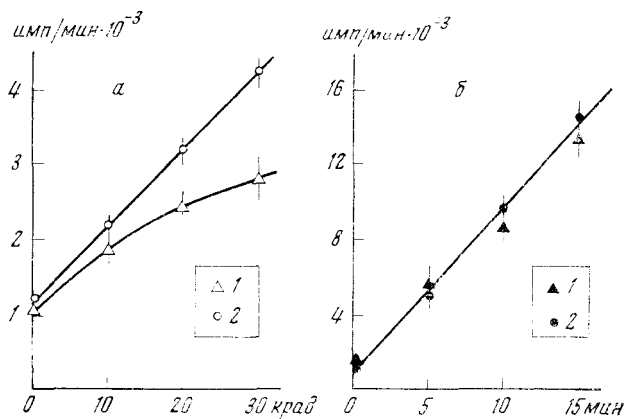


Рис. 1. Матричная активность ДНК *E. coli* в реакции с ДНК-полимеразой I. *a* — ДНК из облученных клеток: 1 — матричная активность до обработки экзонуклеазой III; 2 — после обработки экзонуклеазой III. По оси абсцисс — доза облучения, по оси ординат — количество матричного синтеза (имп/мин ³H-дАТФ) на 0,1 нмол. ДНК с среднемoleкулярным весом 10⁶ дальтон в 1 мл. *б* — изменение матричной активности ДНК из необлученных клеток под действием нуклеаз: 1 — ДНКазы I; 2 — ДНКазы I + экзонуклеаза III (при их совместном присутствии). По оси абсцисс — время инкубации ДНК с нуклеазами; по оси ординат — количество матричного синтеза (имп/мин ³H-дАТФ) на 0,1 нмол. ДНК в 1 мл

Результаты исследования показали, что матричная активность ДНК в реакции с ДНК-полимеразой I под действием γ -радиации (рис. 1*a*) увеличивается. Правда, эта активация незначительна по сравнению с матричной активностью высокополимерной ДНК, обработанной ДНКазой I (рис. 1*б*). Повышение матричной активности ДНК из облученных клеток можно рассматривать как результат появления в ДНК одностранных разрывов с 3'ОН-концевыми группами⁽⁵⁾. Вместе с тем повышение матричной активности не имеет линейной зависимости от дозы (рис. 1*a*), хотя казалось, что с увеличением 3'ОН-концевых групп должна линейно повышаться активность ДНК в полимеразной реакции, как это мы наблюдаем в случае действия ДНКазы I (рис. 1*б*). Последняя, как известно, образует в нативной ДНК одностранные разрывы с 3'ОН- и 5'РО₂-концевыми группами⁽⁴⁾. Недавно было продемонстрировано, что ДНК, облученная понижующей радиацией *in vitro*, не может служить эффективной матрицей в ДНК-полимеразном синтезе. Более того, облученная *in vitro* ДНК способна ингибировать активность ДНК-полимеразы I⁽¹³⁾. Эти свойства облученной *in vitro* ДНК не были обусловлены наличием денатурированных сайтов или повреждением в основаниях. По-видимому, ингибирование ДНК-полимеразной реакции на γ -облученной *in vitro* ДНК-матрице связано с наличием в ней 3'РО₂-концевых групп⁽²⁾. Возможно, отсутствие линейной зависимости матричной активности ДНК, облученной *in vivo*, от дозы радиации связано с накоплением в этой ДНК одностранных разрывов с 3'РО₂-концевыми группами, которые ингибируют ДНК-поли-

меразную активность (⁴). Действительно, при предварительной обработке облученной *in vivo* ДНК экзонуклеазой III, которая отщепляет нуклеотиды с 3'РО₄-конца (¹²), наблюдается повышение ее матричной активности (рис. 1а). Дополнительная активация ДНК из γ -облученных клеток в ДНК-полимеразной реакции после ее обработки экзонуклеазой III обусловлена исключительно отщеплением фосфатной группы с 3'-конца. Это не связано с наличием в препарате экзонуклеазы III эндонуклеазной примеси, способной продуцировать разрывы с 3'ОН-концами, так как матричная активность ДНК из необлученных клеток при обработке ее ДНКазой I в отсутствие экзонуклеазы III одинакова (рис. 1б).

Полученные данные позволяют заключить, что *in vivo* репаративный синтез инициируется ДНК-полимеразными реакциями не со всех 3'-концевых групп разрывов ДНК, поврежденной γ -радиацией. Часть 3'-концевых групп разрывов должна быть предварительно атакована экзонуклеазой III для начала процесса репаративной репликации с участием ДНК-полимераз.

Для понимания механизмов репарации ДНК также важно выяснение количественного соотношения 3'ОН-, 3'РО₄-концевых групп разрывов в ДНК и близость 3'-конца к 5'-концевой группе. Данные о субстратной специфичности 3'-концов разрывов, индуцируемых γ -радиацией (20 крад) *in vivo* в ДНК *E. coli*, приведены ниже:

Ферментативные реакции	Количество ³ H-дАТФ, включаемое в ДНК после полимеразной реакции (имп/мин на 10 мкг ДНК)
1. ДНК-полимераза I	1835 ± 79 (71%)
2. Экзонуклеаза III + ДНК-полимераза I	2570 ± 250 (100%)
3. ПН-киназа + ДНК-лигаза + ДНК-полимераза I	418 ± 64 (16%)
Разность 1—2	735 (09%)

Количество ³H-дАТФ, включающегося ДНК-полимеразой I в ДНК-матрицу после ее обработки экзонуклеазой III, соответствует сумме 3'ОН- и 3'РО₄-концевых групп, тогда как активность матрицы без обработки экзонуклеазой III определяет только 3'ОН-концы. Разность между этими величинами (разность 1—2) соответствует количеству 3'РО₄-концов, которое составляет 27—31% от общего количества 3'-концевых групп. ДНК-полимеразный синтез, наблюдаемый на ДНК-матрице, предварительно обработанной ПН-киназой и лигазой, соответствует количеству 3'ОН-концов, не связываемых лигазой с 5'РО₄-концами, т. е. эти группы отделены друг от друга нуклеотидными брешами и составляют около 16% от общего количества 3'-концевых групп разрывов в ДНК клеток, облученных γ -радиацией в дозе 20 крад.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что 3'-концевые группы однонитевых разрывов в ДНК, индуцируемых непосредственно радиационно-химической реакцией (без участия экзонуклеаз) *in vivo* имеют различные субстратные состояния. Около 70% 3'-концевых групп специфичны к ДНК-полимеразам и из них 50—55% связываются лигазой при фосфорилировании свободных 5'ОН-концов ПН-киназой. Очевидно, в клетке для репарации части однонитевых разрывов (~30%) с участием ДНК-полимераз требуется предварительное действие экзонуклеазы III, так как 3'→5'-экзонуклеазная субъединица ДНК-полимеразы I не способна атаковать 3'РО₄-концы.

Авторы выражают благодарность С. А. Сергеевой, Д. Т. Закржевской за помощь при выполнении этих экспериментов.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. B. Setlow, J. K. Setlow, *Ann. Rev. Biophys. Bioengin.*, v. 1, 293 (1972).
² U. Hagen, *Biophys.*, v. 9, 4, 279 (1973). ³ А. И. Газиев, С. А. Сергеева, Матер. симпозиума: Энзимология генетических процессов, 13—16 июня. Пушкино, 1974. ⁴ C. C. Richardson, *Ann. Rev. Biochem.*, v. 38, 795 (1969). ⁵ A. I. Gaziev, S. A. Sergeeva, D. T. Zakrgevskaya, *Studia biophysica*, v. 42, 2, 203 (1974). ⁶ A. K. Ganesan, K. C. Smith, *J. Bacteriol.*, v. 96, 2, 365 (1968). ⁷ T. Noguti, T. Kada, *J. Mol. Biol.*, v. 67, 3, 507 (1972). ⁸ F. W. Studer, *J. Mol. Biol.*, v. 41, 2, 373 (1965). ⁹ C. C. Richardson, C. L. Schildraut et al., *J. Biol. Chem.*, v. 239, 1, 222 (1964). ¹⁰ F. J. Bollum, In: *Procedures in Nucleic Acid Research*, N. Y., 1966, p. 284. ¹¹ C. C. Richardson, A. Kornberg, *J. Biol. Chem.*, v. 239, 1, 242 (1964). ¹² A. Panet, J. H. Van de Sande et al., *Biochemistry*, v. 12, 25, 5045 (1973). ¹³ L. Landbeck, U. Hagen, *Biochim. et biophys. acta*, v. 331, 2, 318 (1973).