

Н. Н. ГАФУРОВ, В. А. РАССКАЗОВ

АТФ-ЗАВИСИМАЯ ДНКазА В ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИХСЯ КЛЕТКАХ ЭМБРИОНОВ МОРСКОГО ЕЖА

(Представлено академиком А. А. Баевым 1 X 1974)

АТФ-зависимые дезоксирибонуклеазы — ферменты, гидролизующие ДНК только в присутствии АТФ, — широко распространены среди бактерий (¹⁻⁷, ¹⁰). Отсутствие или значительное снижение активности этих ферментов у *res В*⁻ и *res С*⁻ мутантов *Escherichia coli* (⁷, ⁸), *Bacillus subtilis* (⁹), дефектных по рекомбинации, и мутантов *Diplococcus pneumoniae* со сниженной способностью к трансформации (¹⁰) позволило предположить их важную роль в процессах рекомбинации, трансформации и темповой репарации ДНК в бактериальных клетках. Следует отметить, что до настоящего времени не ясно, функционируют ли в клетках эукариотов ферменты, подобные АТФ-зависимым ДНКазам бактерий. Исследования, проведенные на дрожжеподобном грибе *Ustilago maidis*, показали, что в аллельной рекомбинации у этого организма участвует нуклеаза, в значительной степени отличающаяся по своим свойствам от бактериальных АТФ-зависимых ДНКаз. Фермент ингибировался АТФ (¹¹).

В процессе исследования ферментов метаболизма ДНК в дифференцирующихся клетках эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* мы обнаружили, что добавление АТФ активирует ферментативную деградацию ДНК.

В данной работе приводятся результаты исследования свойств АТФ-зависимой ДНКазы, выделенной из клеток эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. Активность ДНКаз определяли по количеству кислоторастворимых олигонуклеотидов, освобождаемых в процессе ферментативного гидролиза ДНК. Инкубационная смесь содержала 450 мкг нативной или денатурированной нагреванием ДНК, 50 мкмол трис-НСl буфера рН 8,5—9,0, 0,01 мкмол АТФ и 150—200 мкг фермента в общем объеме 1 мл. Пробы инкубировали при 37° в течение 1 часа. Реакцию останавливали добавлением 2 мл 0,5 N HClO₄. В некоторых случаях перед добавленным хлорной кислоты реакцию смесь прогревали при 100° в течение 10 мин. Дальнейшее определение активности ДНКазы проводили, как описано ранее (¹²). Концентрацию белка определяли по поглощению в ультрафиолете при $\lambda=280$ нм и двухволновым спектрофотометрическим методом (¹³). Для приготовления ферментного препарата клетки эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* на стадии средней бластулы (12—14 час. развития) гомогенизировали в растворе 0,01 M трис-НСl буфера, рН 7,2, содержащем 0,005 M ЭДТА и 0,002 M β -меркаптоэтанол. К экстракту добавляли сухой сульфат аммония до 80% насыщения. Собранный центрифугированием активный ферментный препарат обессоливали на колонке с сефадексом G-25 и фракционировали на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой в трис-НСl буфере, рН 7,0, в линейном градиенте (0—0,5 M) NaCl. АТФ-зависимая ДНКазА выходила в первом пике белка при концентрации NaCl 0,08—0,12 мол/л. Дальнейшая очистка фермента проводилась на колонке с сефадексом G-150 (25×90 см) в том же буфере. Активный пик, элюируемый сразу же за свободным объемом колонки (140 мл), наносили на колонку с КМ-сефадексом G-25 (2×20 см) и промывали 0,01 M трис-НСl буфером, рН 7,6. Фермент элюировался трис-НСl буфером, рН 8,9, со-

держащим 0,3 M NaCl. Полученный препарат фермента не содержал примесей рибонуклеазы и фосфатазы, был очень нестабилен и инактивировался при хранении в течение 10 час. при 4°. При аналитическом дисковом электрофорезе в полиакриламидном геле очищенный препарат фермента

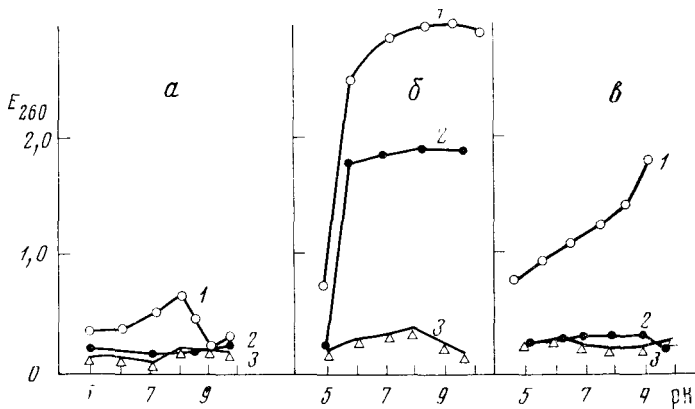


Рис. 1. Влияние pH, ионов Mg^{2+} , Ca^{2+} и АТФ на активность АТФ-зависимой ДНКазы из клеток эмбрионов морского ежа *Str. intermedius*. Гидролиз нативной (а) и денатурированной (б) ДНК в присутствии: 1— 10^{-4} M АТФ, 2—0,005 M Mg^{2+} , 3—0,005 M Ca^{2+} . Реакция останавливалась добавлением 0,5 N HClO₄. Гидролиз нативной ДНК (в) в тех же условиях, но перед добавлением хлорной кислоты инкубационная смесь прогревалась

давал одну белковую полосу, совпадающую с ферментативной активностью.

Оптимум pH АТФ-зависимости ДНКазы из эмбрионов морского ежа при гидролизе нативной ДНК находится в области pH 6,5—9 (рис. 1а). При использовании в качестве субстрата денатурированной ДНК оптимум

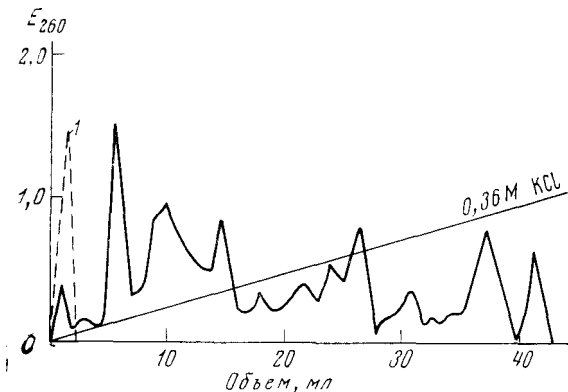


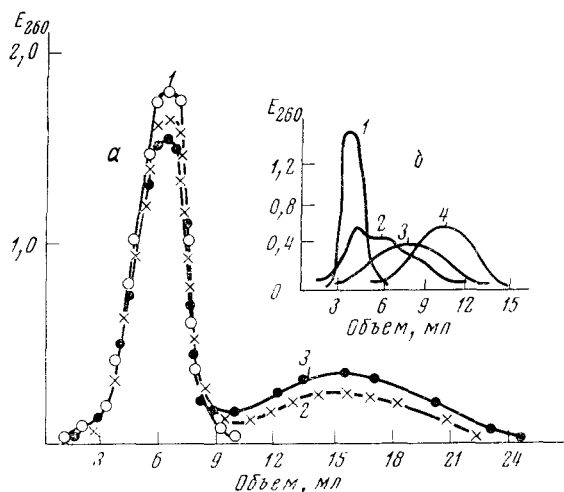
Рис. 2. Хроматография продуктов ферментного гидролиза ДНК на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-25 в 7 M мочевины. На колонку (0,4×15 см) наносили 20 о. е. ферментного гидролизата ДНК в 0,015 M трис-HCl буфере, pH 7,5 с 7 M мочевиной. Элюция линейным градиентом NaCl (0,36 M) в том же буфере. 1—контрольный пик мононуклеотида

pH фермента сдвигается в область pH 9—9,5 (рис. 1в). АТФ и дезокси-АТФ вызывают значительную активацию ферментативной активности по отношению к нативной и денатурированной нагреванием ДНК при оптимальной концентрации 10^{-4} мол/л. Другие рибо- и дезоксирибонуклеотидтрифосфаты не способны замещать АТФ в активации ферментного гидролиза ДНК. АТФ-зависимая ДНКаза из эмбрионов морского ежа активируется добавлением ионов Mg^{2+} в концентрации 0,005 мол/л ионы Ca^{2+} не увеличивают активности ДНКазы (рис. 1б, в).

Интересной особенностью фермента является его способность гидролизовать нативную ДНК с образованием одиночных разрывов без освобождения образующихся олигонуклеотидов из двойной цепи ДНК. Продукты ферментного гидролиза освобождались в реакционную смесь только после разрушения нагреванием водородных связей в молекуле ДНК (рис. 1б). Анализ величины продуктов ферментного гидролиза проводили после их

разделения на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-25 в 7 М мочеvine по методу Томлинсона — Тернера (¹⁴). Как видно из рис. 2, продуктами ферментативного гидролиза нативной и денатурированной ДНК являются короткие олигонуклеотиды преимущественно ди-, три- и тетра-нуклеотиды. Образова-

Рис. 3 Гельфильтрация на сефадексе G-100 продуктов гидролиза денатурированной ДНК, образующихся при действии АТФ-зависимой ДНКазы из эмбрионов морского ежа (а) и кислой ДНКазы из печени камбалы (б) на ДНК в течение 1—0 мин.; 2—30 мин., 3—60 мин., 4—120 мин



ние олигонуклеотидов при ферментном гидролизе ДНК характерно для эндонуклеаз. Но при исследовании кинетики изменения полимерности нативной и денатурированной ДНК в процессе ферментного гидролиза с помощью гельфильтрации на колонке с сефадексом G-100 (¹⁵) было обнаружено, что АТФ-зависимая ДНКаза из эмбрионов морского ежа гидролизует ДНК по экзонуклеазному типу. В частности, увеличение количества низкомолекулярных олигонуклеотидов в процессе ферментного гидролиза происходит на фоне почти полного отсутствия разрывов внутри молекулы ДНК (рис. 3а). При появлении таких разрывов, например, в процессе ферментного гидролиза ДНК типичной эндонуклеазой — кислой ДНКазой из печени камбалы (¹²), происходит быстрое перераспределение полинуклеотидов по всему объему колонки (рис. 3б).

На основании полученных данных можно предположить, что АТФ-зависимая ДНКаза из эмбрионов морского ежа последовательно гидролизует фосфодиэфирные связи с конца одной из цепей молекулы нативной ДНК, в результате чего образующиеся олигонуклеотиды удерживаются водородными связями на шпактной цепи ДНК. Не исключена также возможность того, что фермент предварительно вносит одиночные разрывы в молекулу нативной ДНК на значительном расстоянии от конца молекулы с последующим гидролизом ДНК от места разрыва. Оба этих механизма обнаружены у бактериальных АТФ-зависимых ДНКаз (²⁻⁶).

Тихоокеанский институт биоорганической химии
Дальневосточного научного центра
Академии наук СССР
Владивосток

Поступило
30 IX 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Wright, G. Buttin, H. Hurwitz, J. Biol. Chem., v. 246, 6543 (1971).
- ² P. J. Goldmark, S. Linn, J. Biol. Chem., v. 245, 1849 (1972).
- ³ M. Anai, T. Hazahashi, Y. Takagi, J. Biol. Chem., v. 245, 767 (1970).
- ⁴ G. Viviz, G. Buttin, Biochim. et biophys. acta, v. 224, 42 (1970).
- ⁵ E. A. Friedman, H. O. Smith, J. Biol. Chem., v. 247, 2846 (1972).
- ⁶ F. G. Winder, M. F. Lavin, Biochim. et biophys. acta, v. 247, 542 (1971).
- ⁷ M. Oishi, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 64, 1292 (1969).
- ⁸ S. Barbour, A. J. Clark, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 65, 955 (1970).
- ⁹ A. V. Chestuchin, M. F. Shemyakin et al., FEBS Letters, v. 24, 121 (1972).
- ¹⁰ G. Vovis, G. Buttin, Biochim. et biophys. acta, v. 224, 29 (1970).
- ¹¹ W. K. Holloman, R. Holiday, J. Biol. Chem., v. 248, 8107 (1973).
- ¹² V. A. Rasskazov, M. M. Anisimov, G. D. Berdyshev, Comp. Biochem. Physiol., v. 26, 639 (1968).
- ¹³ W. E. Groves, F. Davis, Anal. Biochem., v. 22, 195 (1968).
- ¹⁴ R. V. Tomlinson, J. M. Turner, J. Am. Chem. Soc., v. 84, 2644 (1962).
- ¹⁵ H. Birnboim, Biochim. et biophys. acta, v. 119, 198 (1966).