

12. Flos R., Ballash J. *Angressologia*, 18, 1, 47—53, 1977.
13. Fridovich J. *Science*, 201, 4359, 875—880, 1978.
14. Gluck G. E., McLean P. *Biochem. J.*, 39, 140, 1960.
15. Kadota I. *J. Lab. Clin. Med.*, 33, 8, 568—591, 1950.
16. Lowry O. H., Rosenbrough N. I., Farr A. L. et al. *J. Biol. Chem.*, 193, 256, 1951.
17. Maske H. *Diabetes*, 6, 335—340, 1957.
18. Morimitsu Nishikimi, Appaji N. Rao, Kunio Yagi *Biochim. Biophys. Commun.*, 40, 2, 849—854, 1972.
19. Pinto R. L., Bartley W. *Biochem. J.*, 112, 109, 1969.
20. Sato Y., Hotta M., Sakamoto N., Matsuoka S., Ohishi-N., Yagi K. *Biochem. Med.*, 21, 104—107, 1979.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 9, 1985

УДК 577.155.2

СРАВНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗЫ I ЭМБРИОНОВ ДИКОГО ВИДА *DROSOPHILA SIMULANS* И МУТАНТНОЙ ЛИНИИ

К. Ж. АКОПЯН

Изучена активность топоизомеразы I из дикого вида дрозофилы *Dr. simulans* и производной от него мутантной линии мух с повышенной нестабильностью (*Dr. simulans vermilion*), выражающейся в высоком уровне рекомбинантных событий. Показано, что активность топоизомеразы I у 4—5-часовых эмбрионов мутантной линии примерно вдвое выше, чем у эмбрионов дикого вида той же стадии развития.

Ключевые слова: ДНК-топоизомераза, дрозофила.

Бурное развитие исследований в области молекулярной биологии, геной инженерии обусловило необходимость активного изучения ферментов, обслуживающих основные генетические процессы в клетке. К числу достаточно полно исследованных ферментов относятся рестриционные эндонуклеазы, ДНК-полимеразы, РНК-полимеразы и др. Однако большая группа ферментов метаболизма нуклеиновых кислот пока изучена явно недостаточно как в отношении структуры, так и функциональной значимости. К числу этих ферментов относятся ДНК-топоизомеразы.

Задачей настоящей работы было сравнительное изучение активности топоизомеразы I из дикого вида дрозофилы (*Dr. simulans*) и производной от него мутантной линии мух с повышенной нестабильностью (*Drosophila simulans vermilion*), выражающейся в высоком уровне рекомбинантных событий.

Материал и методика. В работе использованы эмбрионы диких линий *Dr. simulans*, *Dr. melanogaster* и мутантной линии *Dr. simulans vermilion*, характеризующихся высоким уровнем соматического и мейотического кроссинговера. Обе линии *Dr. simulans* получены от Г. М. Ховановой (ИМГ АН СССР). Выделение суперспирализованной плазмидной ДНК pBR 322 осуществляли кислородофильным методом с последую-

кшей гель-фильтрацией на сефарозе 4 В [9]. Все операции проводили на холоду. Горизонтальный электрофорез в блоке 1% агарозного геля проводили по методу ША-НА и сотр. [8]. Гель окрашивали бромидом этидия в концентрации 1 мкг/мл в течение часа. Фотографировали под ультрафиолетовой лампой на пленку типа «Микрат-300» с орвяжесвым фильтром. Яйца размораживали, веревосили на вакуумную сетку, многократно промывали водой. 1% раствором тритона X-100, приготовленного из 0,7% NaCl, обсушивали и дехорионизировали в 1% растворе гипохлорида натрия, после чего гомогенизировали в буфере (мМ): 20— KH_2PO_4 , 1—ЭДТА, 1—ДТТ, 0,1—ФМСФ, ДМСО—0,4% (рН 6,9). Ингибитор протеаз—фенилметилсульфонилфторид, приготовленный на диметилсульфоксиде, добавляли в буфер перед использованием. К гомогенату добавляли сухой NaCl до конечной концентрации 1 М. Центрифугировали при 16000 об/мин, 60 мин. Надосадок фильтровали через три слоя марли. Так как высокие концентрации поваренной соли ингибируют топоизомеразу I типа, то экстракт обессоливали из колонки (0,7×9) с сефадексом G-50, уравновешенной буфером с ингибитором протеаз. На колонку наносили 0,2 мл экстракта (V—1,5 мл). Для определения активности топоизомеразы I использовали методом, основанным на том, что при электрофорезе в агарозном геле ДНК-топоизомераза различается по числу вытков и движется с разной скоростью [5]. Пробы объемом 25 мкл содержали: ДНК—0,2 мкг, Трис-HCl—25 мМ, ЭДТА—4 мМ, NaCl—180 мМ, белок—различные количества, от 5 до 15 мкг. Реакция начиналась с добавления белка. Пробы инкубировали при 30° от 15 до 60 минут. Реакцию останавливали додицилсульфатом натрия—1%. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза при условиях: 25 в, 18—20 часов. После окрашивания и фотографирования негативы сканировали на микрофотометре ИФО-451. Площадь пиков на денситограммах, соответствующих различным формам ДНК, рассчитывали на микро-ЭВМ 9825 А (США) по программе, любезно предоставленной Е. И. Головановым. Активность топоизомеразы I оценивали по убыли субстрата (по уменьшению площади пиков, соответствующих суперспиральной ДНК). Убыль субстрата выражали в процентах от исходного количества. Количество белка определяли по методу Лоури и сотр. [6].

Результаты и обсуждение. Характеристика препаратов ДНК. В качестве субстрата топоизомеразной реакции использовали суперспиральную ДНК плазмиды рВR 322, выделенной из культуры *E. coli* ксенофобным методом. Качественный анализ полученной ДНК проводили при помощи электрофореза в 1% агарозе. На рис. 1 приведена электрофореграмма одного из препаратов ДНК после завершающего этапа его очистки на колонке с сефарозой 4В. Видно, что после пропуска раствора ДНК фракции (№ 1, 2), содержащие ДНК (а и б), свободны от примеси РНК (в). Сверхспиральная ДНК (рис. 1, а), выделенная обработкой кислым фенолом, обычно содержит наибольшие примеси релаксированной формы (2, 9), доля которой (рис. 1, б) в наших опытах оценивалась количественно по соотношению площадей пиков а и б на денситограмме, полученной при сканировании соответствующего негатива. В препарате ДНК (рис. 1) доля релаксированной формы (б) составляла 12,3%, в других использованных нами в экспериментах препаратах обычно содержалось не более 25% релаксированной ДНК.

Определение активности топоизомеразы I у 4–5-часовых эмбрионов Drosophila melanogaster. Массовый сбор 11-часовых яиц дрозофилы сопряжен с определенными методическими трудностями, хотя делались попытки использования эмбрионов этой стадии развития [1, 8]. Между тем для получения высокоочищенных препаратов фермента, изучения его физико-химических, каталитических свойств обычно требуется значительное количество исходного материала. В связи с этим нами

первые предпринята попытка использования при изучении эмбриональной топоизомеразы I у дрозофилы эмбрионов более поздних стадий развития. С этой целью был проведен массовый сбор яиц *Dr. melanogaster* через 4–5 часов после начала кладки. В экстрактах из дехорионизированных яиц определяли активность фермента. После подбора условий инкубации получены электрофореграммы разделения продуктов реакции, свидетельствующие о наличии достаточно высокой активности топоизомеразы I у 4–5-часовых эмбрионов.

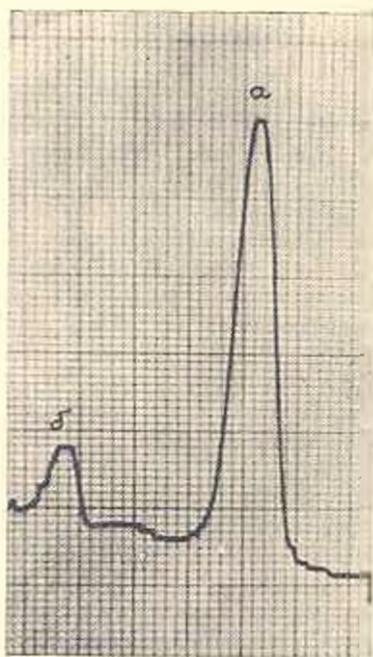


Рис. 1. Денситограмма препарата ДНК рВР 322: а—сверхспирализованная форма ДНК; б—релаксированная форма ДНК.

На рис. 2 приведены денситограммы, полученные с негатива одного из агарозных гелей. Видно, что в течение 40 мин реакции количество суперспирализованной ДНК (пик а) уменьшается, а содержание релаксированной формы (пик б)—увеличивается. Наличие среди продуктов реакции промежуточных форм релаксирования суперскрученной ДНК (с меньшим, чем исходное, количеством сверхвитков, рис. 2, в) является прямым доказательством топоизомеразного характера реакции.

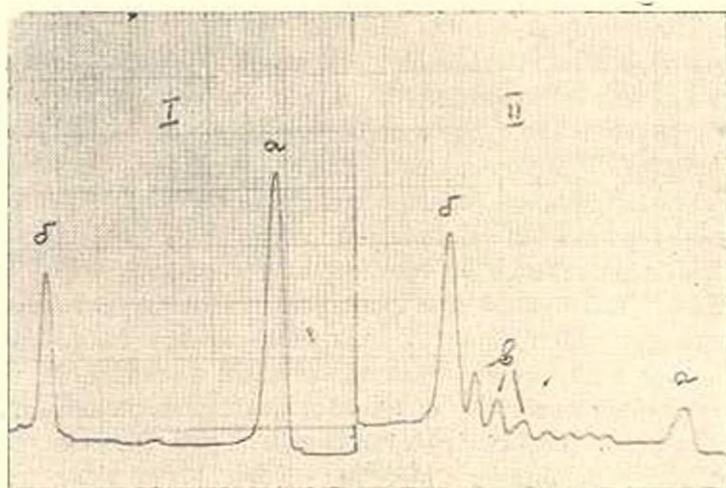


Рис. 2. Активность топоизомеразы I в экстрактах из 4–5-часовых яиц *Dr. melanogaster*. I—контроль; II—после обработки экстрактом.

Определение активности топоизомеразы I у 4–5-часовых эмбрионов *Dr. simulans*. Поскольку свойства фермента из этого дикого вида плодовой мушки ранее не исследовались, то при определении активности

топоизомеразы I у 4–5-часовых эмбрионов использовали условия (t° , время, концентрация NaCl, ДНК (белок), оптимальные для функционирования фермента из эмбрионов *Dg. melanogaster*. На рис. 3 представлены денситограммы разделения в агарозном геле форм ДНК, полученных после 20 (II) и 40 (III) мин обработки сверхспирализованного субстрата экстрактом 4–5-часовых эмбрионов *Dg. simulans*. Убыль в ходе реакции (II и III) пика а (суперспирализованная ДНК) и при-

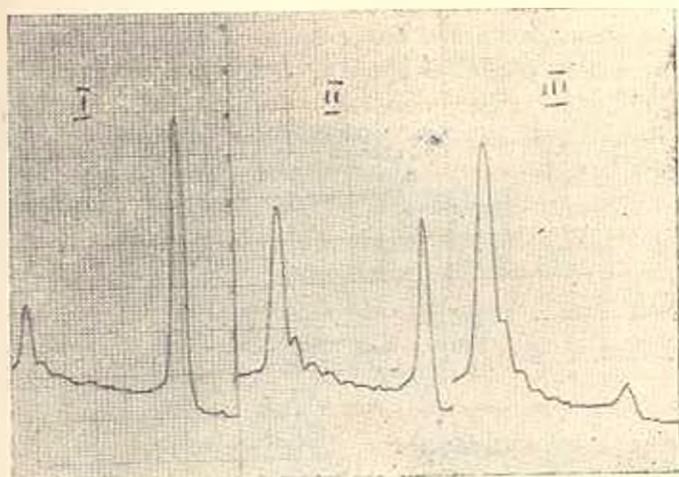


Рис. 3. Активность топоизомеразы I в экстрактах из 4–5-часовых эмбрионов *Dg. simulans*. I—контроль; II—обработка в течение 20 мин; III—обработка в течение 40 мин.

рост пика б (релаксированная ДНК) по сравнению с контролем [1], а также наличие промежуточных продуктов релаксирования (IIв и IIIв) свидетельствуют о наличии в экстрактах активности топоизомеразы I типа. Точная количественная оценка ферментативной активности в данном случае не проводилась, однако использование тех же условий и примерно тех же концентраций белка, что и в опытах с экстрактами из эмбрионов *Dg. melanogaster*, дает основание сделать предварительное заключение о том, что величина активностей топоизомеразы I у эмбрионов двух диких видов дрозофилы примерно одного порядка.

Сравнение активности топоизомеразы I у 4–5-часовых эмбрионов линии Dr. simulans и Dr. simulans vermilion.

Представляло интерес сопоставление активностей топоизомеразы I у двух описанных выше линий дрозофилы (дикой и мутантной, с повышенным уровнем рекомбинационных событий). Поскольку темп эмбрионального развития у *Dr. simulans vermilion* и *Dr. simulans* примерно одинаков, использованные в работе 4–5-часовые эмбрионы должны были находиться на одних и тех же стадиях развития. Экстракты из дехорионизированных яиц обеих линий мух получали в один и тот же день. После обессоливания измеряли в них концентрацию белка и сразу использовали для определения активности топоизомеразы I. Объем наносимых в инкубационную среду экстрактов рассчитывали так, чтобы пробы содержали одно и то же количество белка. На рис. 4 приведены

результаты одного из экспериментов. Пробы 1 и 2—контрольные, содержат исходное количество ДНК без обработки экстрактом. Пробы 3—10—опытные, после 40 минут обработки различными количествами экстрактов обоих видов. В пробах 3 и 4 инкубационная среда содержала экстракт из яиц *Dg. simulans* (10 мкг белка), в пробах 5 и 6—экстракт из яиц *Dg. simulans vermillion* (10 мкг белка). Очевидно, что скорость перехода субстрата (ДНК рВР 322) из сверхспирализованного состояния (а) в релаксированное (б) в пробах 5 и 6 была существенно выше, чем в пробах 3 и 4. Столь же наглядное различие в скорости этой реакции обнаружено при более высоком (15 мкг) содержании белка в инкубационной среде. В пробах, содержащих экстракт из эмбрионов *Dg. simulans* (7 и 8), переход субстрата (а) в релаксированную форму (б) был частичным, а в пробах с экстрактом из эмбрионов *Dg. simulans vermillion* (9 и 10)—полным. При этом во всех опытных пробах была получена типичная для топоизомеразной реакции электрофоретическая картина (с наличием промежуточных продуктов релаксирования).

Избирательные условия реакции обеспечивали функционирование только топоизомеразы I типа. Полученная после сканирования негатива денситограмма (рис. 5) была использована для количественной



Рис. 5. Денситограмма количественной оценки активности топоизомеразы I у двух линий дрозофилы. I—контроль; II—15 мкг белка, *Dg. simulans*. III—15 мкг белка, *Dg. simulans vermillion*.

оценки активности топоизомеразы I у двух линий дрозофилы. Сравнивали скорости реакции в пробах 7 (*Dg. simulans*) и 9 (*Dg. simulans vermillion*). Средняя величина площади пиков, соответствующих сверхспирализованной ДНК, в контроле (I а) составляла 978,6 ед. Через 40 мин после начала реакции в пробе, содержавшей экстракт из эмбрионов *Dg. simulans* (II а), она была равна 400,4 ед., а в пробе с экстрактом из эмбрионов мутантной линии этот пик (III а) практически отсутствовал. Из полученных экспериментальных данных легко было рассчитать, что убыль субстрата реакции после 40 мин обработки экстрактом из эмбрионов *Dg. simulans* составляла 59%, а после обработки экстрактом из эмбрионов *Dg. simulans vermillion*—практически 100%.

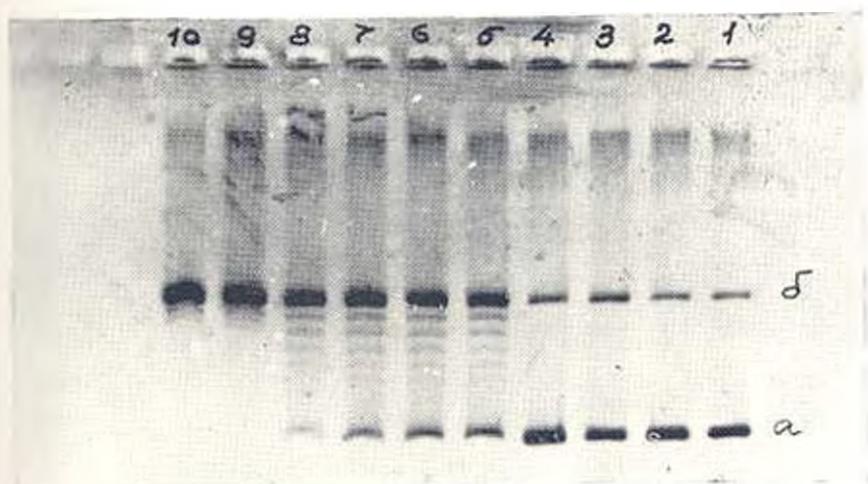


Рис. 4. Сравнение активности топоизомеразы I в экстрактах *Dr. simulans* и *Dr. simulans vermillion*. 1, 2 — контроли; 3, 4 — 10 мкг белка, *Dr. simulans*, 5, 6 — 10 мкг белка, *Dr. simulans vermillion*, 7, 8 — 15 мкг белка, *Dr. simulans*; 9, 10 — 15 мкг белка, *Dr. simulans vermillion*.

Таким образом, активность топоизомеразы I у 4—5-часовых эмбрионов мутантной линии примерно вдвое выше, чем у эмбрионов дикого вида той же стадии развития.

Работа выполнена в Институте молекулярной генетики АН СССР под руководством профессора К. Г. Газаряна.

Институт экспериментальной биологии
АН Армянской ССР

Поступило 26.X 1984 г

DR. SIMULANS ՎԱՅՐԻ ՏԵՍԱԿԻ ԵՎ ՄՈՒՅԱՆՏԱՅԻՆ ԳԵՆՐԻ ՍԱՀՄԻՑ ԴՆԹ-SՈՊՈՒԶՈՒԵՐԱԶԱ 1-Ի ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՀԱՐՄԵՄԱՏՈՒԹՅՈՒՆԸ

Կ. Ժ. ՀԱԿՈԹՅԱՆ

Ուսումնասիրված է տապսիդոմերազա 1-ի ակտիվությունը, որն անշտտված է դրոզոֆիլայի *Dr. simulans* վայրի տեսակից և նրանից ստացված ճանճերի ավելի բարձր անկայունությամբ օժտված մուտանտ գծից (*Dr. simulans vermilion*)՝ արտահայտված ռեկոմբինանտային երևույթների բարձր մակարդակով: Յույց է արված, որ մուտանտ գծի 4—5 ժամանոց սաղմերի տապսիդոմերազա 1-ի ակտիվությունը մոտ երկու անգամ զերազանցում է ֆերմենտի ակտիվությանը վայրի տեսակի նույն իրարում զանվող սաղմերի մոտ:

COMPARISON OF THE DNA-TOPOISOMERASE 1 OF EMBRYOS OF THE WILD TYPE *DR. SIMULANS* AND MUTANT LINE

K. Zh. AKOPIAN

The activity of topoisomerase 1 from wild type *Dr. simulans* and of its derivatives mutant line of flies with increased instability (*Dr. simulans vermilion*), expressed by the high level of recombinant events, has been studied. The topoisomerase 1 activity of 4—5 hour embryos of mutant line is twice higher than the enzyme activity of the wild type embryos of the same stage of development.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Baase W. A., Wang J. C. *Biochemistry*, 13, 4299—4303, 1974.
2. Besi A. N., Allison D. P., Novelli G. D. *Analyt. Biochem.* 114, 235—243, 1981.
3. Champoux J. J., McConaughy B. L. *Biochemistry*, 15, 4638—4642, 1976.
4. Champoux J. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 74, 5328—5332, 1977.
5. Keller W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 2550—2554, 1975.
6. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, 193, 265—275, 1951.
7. Poccia D. L., LeVine D., Wang G. C. *Develop. Biol.*, 64, 273—283, 1978.
8. Sharp P. A., Sugden H., Sambrook J. *Biochemistry*, 12, 3055—3063, 1973.
9. Zaslaff M., Ginder G. D., Fesenfeld G. *Nucl. Acid Res.*, 5, 1139—1152, 1978.