

УДК 577.152.24:577.156

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

А. Г. Мхитарян, Д. Л. Арутюнян, Л. В. Карабашян

Изучение влияния микрококковой нуклеазы и ДНКазы I на активирующую способность ДНК в реакции поли-АДФ-рибозилирования гистона H1

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР К. Г. Карагезяном 10/V 1989)

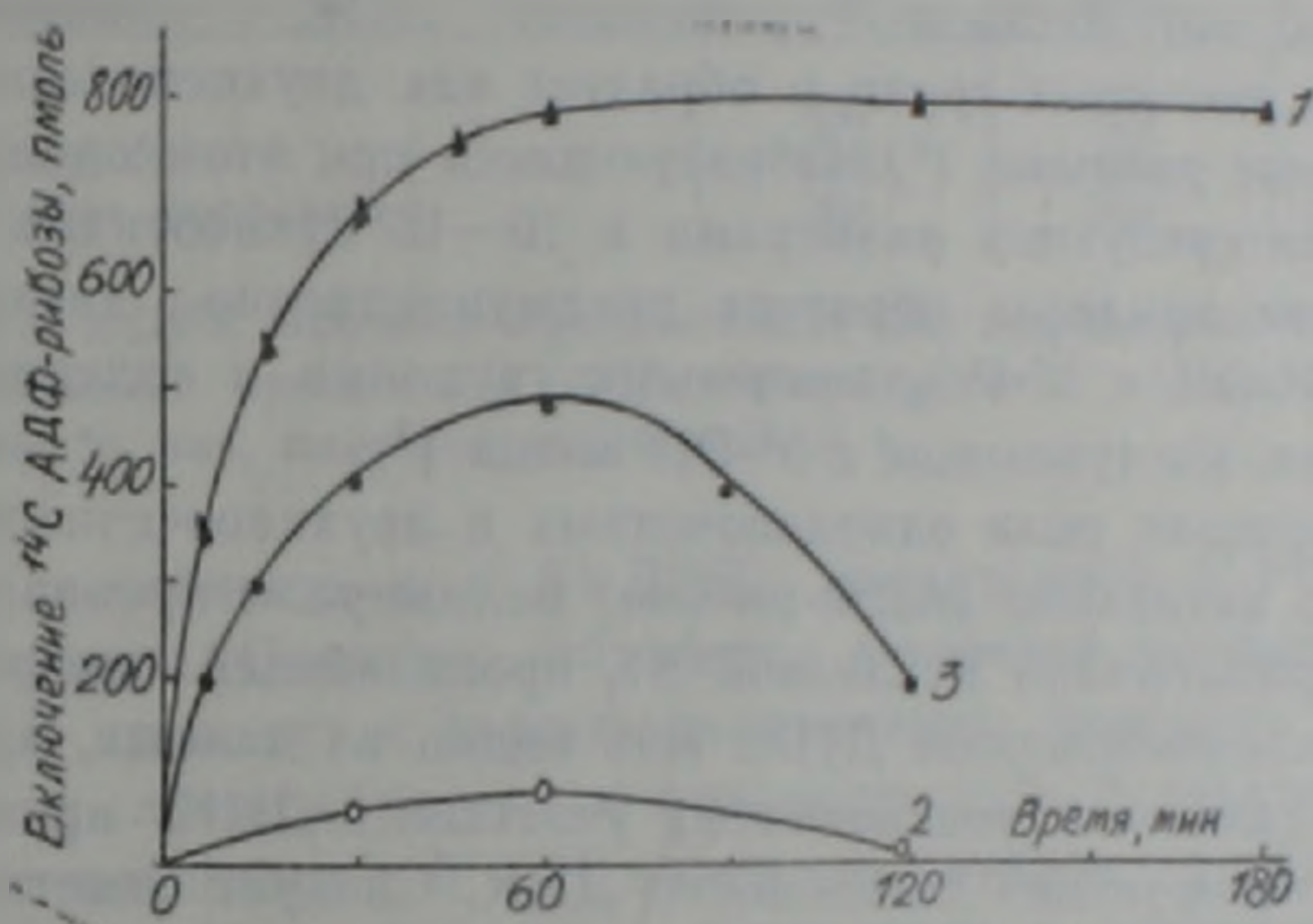
(АДФ-рибоза) полимеразы (К.Ф.2.4.2.30) катализирует реакции поли-АДФ-рибозилирования структурных белков хроматина и ряда ферментов ядра, используя в качестве донора модифицирующей группы НАД. (АДФ-рибоза) полимеразы—ДНК-зависимый фермент, однако активирующая способность ДНК зависит от ее структурных характеристик. Согласно результатам исследований ряда авторов, для активации фермента ДНК должна содержать одно- и двухцепочечные разрывы цепей (^{1,2}), что обычно сопутствует процессам репарации и репликации ДНК. Обработка лизированных детергентом клеток HeLa ДНКазой-I или микрококковой нуклеазой приводит к возрастанию уровня поли-АДФ-рибозилирования внутриклеточных белков. При этом микрококковая нуклеаза, по сравнению с ДНКазой-I, оказывает на этот процесс более эффективное действие (³). По всей видимости, повышение уровня поли-АДФ-рибозилирования связано с повышением активирующей способности эндогенной ДНК при ее гидролизе нуклеазами. Очевидно, что различия в эффективности действия нуклеаз могут быть обусловлены специфичностью их гидролитических активностей.

Настоящая работа посвящена изучению особенностей активации (АДФ-рибоза) полимеразы фрагментами ДНК, полученными в результате обработки микрококковой нуклеазой и ДНКазой-I высокомолекулярной тимусной ДНК.

Выделение (АДФ-рибоза)полимеразы из семенников быка и определение ферментативной активности проводили по методам, описанным ранее (⁴). Гидролиз нуклеазами проводили при температуре 37° С и концентрации ДНК 0,3 мг/мл. Гидролиз высокомолекулярной тимусной ДНК микрококковой нуклеазой проводили из расчета 8 ед. фермента на 1 мг ДНК в 20 мМ трис-НСl буфере рН 8,0, содержащем 20 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂. Реакцию высокомолекулярной ДНК с ДНКазой-I проводили из расчета 3 ед. фермента на 1 мг ДНК в 20 мМ трис-НСl буфере рН 7,7, содержащем 5 мМ MgCl₂, 1 мМ CaCl₂. Обработку ДНК нуклеазой SI (2,5 ед. фермента на 1 мг ДНК) проводили в 0,02 М натрий ацетатном буфере рН 4,5, содержащем 0,2 М NaCl, 1 мМ ZnSO₄. Дефосфорилирование ДНК бактериальной щелочной

фосфатазой (5 ед. фермента на 1 мг ДНК) проводили при температуре 25°C в буфере 50 mM трис-HCl pH 9,0, содержащем 0,1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 . Реакции останавливали добавлением равного объема фенола. Дальнейшую депротенинизацию продолжали смесью хлороформ:изоамиловый спирт (24:1). Далее ДНК осаждали этанолом. Полученные препараты растворяли в 10 mM трис-HCl pH 8,0, содержащем 20 mM NaCl. Размеры фрагментов ДНК оценивали методом электрофореза в 1,5%-ном агарозном и 7,5%-ном полиакриламидном гелях⁽⁵⁾. Концентрацию ДНК определяли по поглощению при 260 нм, пользуясь коэффициентом экстинкции $A_{260}=20$ при концентрации ДНК 1 мг/мл.

На рисунке показана кинетическая зависимость изменения уровня поли-АДФ-рибозилирования гистона H1, активируемого тимусной ДНК после ее обработки микрококковой нуклеазой и ДНКазой-1. Из этих



Кинетическая зависимость изменения активирующей способности высокомолекулярной тимусной ДНК от обработки микрококковой нуклеазой (1) и ДНКазой-1 (2,3). Концентрация ДНК в пробах 1—0,8. 2—0,8 3—4 мкг/мл

данных следует, что высокомолекулярная ДНК в концентрации 4 мг/мл и ниже практически не активирует (АДФ-рибоза) полимеразу. Вместе с тем в результате расщепления нуклеазами активирующая способность ДНК возрастает и достигает максимума примерно через 60 мин инкубации. Однако активирующая способность фрагментов ДНК, полученных в результате ее обработки микрококковой нуклеазой (м-ДНК) и ДНКазой-1 (д-ДНК), резко отличается. Как видно из представленных данных, через 60 мин инкубации активирующая способность м-ДНК в концентрации 0,8 мкг/мл примерно в 10 раз превышает активирующую способность д-ДНК в той же концентрации.

Электрофоретический анализ препаратов м-ДНК и д-ДНК показал, что размер фрагментов ДНК понижается в результате ее инкубации с нуклеазами. Препарат м-ДНК, полученный через 60 мин инкубации, представляет собой гетерогенную смесь фрагментов с размерами от 267 до 26 п.о., а д-ДНК—от 90 до 9 п.о. При дальнейшей инкубации до 3 ч размер фрагментов м-ДНК понижается до пределов от

124 до 9 п.о. и ниже. Однако при этом активирующая способность остается на прежнем уровне. Вместе с тем активирующая способность д-ДНК после достижения максимума через 60 мин понижается при дальнейшей инкубации.

Согласно данным Бенджамина и Джилла (¹) активация (АДФ-рибоза) полимеразы осуществляется при взаимодействии с одноцепочечными и двухцепочечными разрывами полинуклеотидных цепей ДНК. Было показано, что одноцепочечные разрывы, по сравнению с двухцепочечными, менее эффективно активируют (АДФ-рибоза)полимеразу, и существенное значение при этом имеет химическое строение концевых групп ДНК. Исходя из этих данных, мы полагаем, что различия в активирующей способности м-ДНК и д-ДНК могут быть обусловлены либо разным соотношением одно- и двухцепочечных разрывов в структуре этих фрагментов, либо различиями в структуре концевых участков ДНК.

Известно, что ДНКаза-1 расщепляет ДНК с образованием 3'-ОН и 5'-РО₄ концевых групп и образует как двухцепочечные, так и одноцепочечные разрывы (⁶). Образующиеся при этом одноцепочечные участки характеризуются размерами в 10—15 нуклеотидов, тогда как микрококковая нуклеаза образует преимущественно двухцепочечные разрывы с 5'-ОН и 3'-РО₄ концевыми группами и содержит непарные основания, выступающие с 5'-ОН конца (⁷).

Для изучения роли одноцепочечных и двухцепочечных разрывов цепей ДНК в активации (АДФ-рибоза) полимеразы препараты м-ДНК и д-ДНК обрабатывали нуклеазой S1, проявляющей высокую специфичность к одноцепочечной ДНК. Как видно из данных, приведенных в таблице, удаление одноцепочечных участков д-ДНК приводит к повышению активирующей способности ДНК. Следует отметить, что при этом сохраняется химическая структура концевых групп. Эти данные свидетельствуют об ингибирующей роли одноцепочечных участков ДНК и подтверждаются данными Ешихара и др. (⁸) об ингибировании (АДФ-рибоза)полимеразы денатурированной ДНК. Обработка м-ДНК нуклеазой S1 (с образованием производного м S1-ДНК) приводит к понижению ее активирующей способности. Отщепление непарных оснований с 5'-ОН конца, с образованием 5'-РО₄ группы, приводит к «затуплению» концов ДНК. Снижение активирующей способности м-ДНК в результате такой модификации можно объяснить либо изменением концевой 5'-гидроксильной группы на фосфатную, либо «затуплением» концевого участка ДНК. Однако последнее предположение представляется менее вероятным, так как согласно данным Бенджамина и Джилла (¹) отщепление 5'-концевой фосфатной группы сопровождается повышением активирующей способности различных рестриктов ДНК. Кроме того, согласно данным тех же авторов, ДНК с «тупыми» концами активирует (АДФ-рибоза)полимеразу эффективнее, чем ДНК, содержащая концевые непарные основания.

Для выяснения роли концевой 3'-РО₄ группы в активации (АДФ-рибоза) полимеразы полученные образцы м-ДНК и м S1-ДНК подвергали обработке щелочной фосфатазой (таблица). Как видно из

представленных данных, обработка щелочной фосфатазой приводит к заметному понижению активирующей способности м-ДНК (в 2,5 раза). Следует заметить, что при подобной обработке понижается акти-

Влияние нуклеазы S1 и щелочной фосфатазы на активирующую способность м-ДНК и д-ДНК в реакции поли-АДФ-рибозилирования

Образец ДНК*	Включение АДФ-рибозы, пмоль мин		
	Концентрация ДНК в пр-ое, мкг/мл		
	2	4	8
м-ДНК	730	800	800
м-ДНК+нуклеаза S1	600	750	800
м-ДНК+щелочная фосфатаза	130	200	260
м-ДНК+нуклеаза S1+щелочная фосфатаза	120	200	240
д-ДНК	100	160	—
д-ДНК+нуклеаза S1	260	400	—
д-ДНК+щелочная фосфатаза	200	320	—

* м-ДНК и д-ДНК получены в результате 10 мин гидролиза высокомолекулярной ДНК микрококковой нуклеазой и ДНКазой-1. Обработка нуклеазой S1 проводилась в течение 30 мин, щелочной фосфатазой—3 ч.

вирующая способность и м S1-ДНК, содержащей 3'-PO₄ и 5'-PO₄ концевые группы. Очевидно, обработка щелочной фосфатазой м-ДНК и м S1-ДНК приводит к дефосфорилированию фрагментов ДНК. Причем в первом случае образуются фрагменты с 2—3 непарными основаниями, выступающими с 5'-ОН конца, во втором—фрагменты с «ступенными» концами. Несмотря на эти различия в структуре концевых участков, оба фрагмента ДНК активируют фермент с одинаковой эффективностью.

Полученные данные позволяют заключить, что 3'-PO₄ группа ДНК имеет решающее значение для активации (АДФ-рибоза)полимеразы, однако ДНК, не содержащая концевой 3'-PO₄ группы, также способна активировать фермент, хотя при этом наблюдается более низкий уровень максимальной активации.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР

Ա. Գ. ՄԵՐԱՐՅԱՆ, Դ. Լ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Լ. Վ. ԿԱՐԱՍՇՅԱՆ

ԴՆԹ-ի պոլի-ԱԴՖ-ոլիգոմերացման ակտիվացման ունակության վրա միկրոկոկային նուկլեազի և ԴՆԹազ 1-ի ազդեցության հետազոտումը

Ուրցագեղձի բարձրամուկեկուլյար ԴՆԹ հիդրոլիզի է ենթարկվել միկրոկոկային նուկլեազի և ԴՆԹազ 1-ի միջոցով: Ցույց է տրված, որ հիդրոլիզի հետևանքով ստացված ԴՆԹ-ի հատվածները, (ԱԴՖ-ոլիգոմեր) պոլիմերազը ակտիվացնելու իրենց ունակությամբ գերազանցում են բարձրամուկեկուլյար ԴՆԹ-ի ունակությունը: Նուկլեազ S1 և ալկալիական ֆոսֆատազի օգնությամբ

ցույց է տրված, որ (ԱՒՖ-ոիրոզա) պոլիմերազի ակտիվացման համար էական նշանակություն ունի ԴՆԹ-ի 3'-ծայրային ֆոսֆատային խումբը, սակայն այդպիսի խումբ չպարունակող ԴՆԹ նույնպես կարող է ակտիվացնել ֆերմենտին, թեև այդ դեպքում ֆերմենտի ակտիվացման առավելագույն մակարդակը զգալիորեն ցածր է:

ЛИТЕРАТУРА—ԻՐԱՆԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ R. C. Benjamin, D. M. Gill, J. Biol. Chem., v. 255, p. 10502—10508 (1980).
² P. Zahradka, K. Ebisuzaki, Eur. J. Biochem., v. 127, p. 579—585 (1982). ³ R. C. Benjamin, D. M. Gill, J. Biol. Chem., v. 255, p. 10493—10501 (1980). ⁴ Լ. Վ. Կարաբաշյան, Ժ. Լ. Արությունյան, Ա. Ա. Սոգոսյան և իր., Բիոքիմիա, տ. 53, Կ. 4, ժ. 580—585 (1988). ⁵ Դ. Մանուսկ. Յ. Փրիչ, Ժ. Տեմբրուկ, Կ. Կ. Մոլեկուլարնոե կլոնիրովանիե. Մ., Միր, 1984. ⁶ D. E. Riley, Biochemistry, v. 19, p. 2977—2992 (1980). ⁷ B. Jollner-Webl, W. Melchior, G. Felsenfeld, Cell, v. 14, p. 611—627 (1978). ⁸ K. Yoshihara, T. Hashida, Y. Tanaka et al., J. Biol. Chem., v. 253, p. 6459—6466 (1978).