ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱՅԻ ԶԵԿՈՒՅՑՆԵՐ
ДОКЛАДЫ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК АРМЕНИИ

Том 95 1995 № 3

БИОЛОГИЯ

УДК 577.152.24

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

Активация (АДФ-рибоза) полимеразы олигодезоксинуклеотидными комплексами

(Представлено чл.-корр. НАН Армении К. Г. Карагезяном 8/IV 1994)

(АДФ-рибоза) полимераза (КФ 2.4.99) — ядерный фермент, катализирующий посттрансляционную модификацию ядерных белков, используя НАД в качестве донора модифицирующей группы [1]. Данный фермент вовлечен в ряд биологических процессов, сопровождающихся разрывом и восстановлением цепей ДНК, таких как структурные перестройки хроматина, репарация и репликация ДНК, клеточная пролиферация и дифференциация [2].

(АДФ-рибоза) полимераза проявляет каталитическую активность при взаимодействии с ДНК, содержащей разрывы одной или обеих цепей [3]. Несмотря на ряд исследований, посвященных изучению взаимодействия (АДФ-рибоза) полимеразы с различными типами ДНК [3,4], механизм активации этого фермента остается невыясненным. Отчасти это связано со сложностями при интерпретации и обобщении результатов исследований, ввиду того, что в этих работах использовалась ДНК различного происхождения, состава, структуры и химического строения концевых участков. Для удобства интерпретации полученных данных представляется целесообразным использование в качестве активаторов (АДФ-рибоза) полимеразы синтетических ДНК известного состава и строения.

В настоящем сообщении приведены результаты исследования особенностей активации (АДФ-рибоза) полимеразы синтетическими дуплексами, сформированными из гомологичных олигомеров дезоксиаденозинфосфата и дезокситимидинфосфата — $d(pA)_{530}$, $d(pA)_{16}$, $d(pT)_{16}$.

В работе использовали НАД, гистон Н1, ДНК тимуса теленка производства «Sigma», [аденин-U-^{14}C] НАД — «Amersham», нуклеазу S 1 — «Serva», олигодезоксинуклеотиды $d(pA)_{16}$, $d(pT)_{16}$, а также $d(pA)_{530}$ длиной 530 ± 50 нуклеотидных остатков, которые были предоставлены Е. А. Невинским (Новосибирский институт биоорганической химии).

(АДФ-рибоза) полимеразу из семенников быка получали по методу, описанному в работе [5]. Активность фермента определяли по реакции автоАДФ-рибозилирования [5]. Олигодезоксинуклеотидные дуплексы получали смешиванием соответствующих компонентов в 5 мМ

трис-HCl буфере (pH 8,0), содержащем 5 мМ $MgCl_2$, 0,05 М NaCl, и 0,5 мМ дитиотрейтол. Смесь прогревали на водяной бане до 50°С, инкубировали в течение 3—5 мин, затем выдерживали в течение 1 ч. при 25°С. При получении дуплексов типа $d(pA)_{530}:[d(pT)_{16}]_n$ концентрация $d(pA)_{530}$ составляла 10^{-5} М, концентрация $d(pT)_{16}$ — $n \times 10^{-5}$М, где $0 < n < 30$. При получении остальных дуплексов компоненты смешивали в эквимолярной пропорции в концентрациях 10^{-6}—10^{-5} М. Гидролиз дуплексов нуклеазой S1 проводили в 50 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 4,5), содержащем 0,2 М NaCl, 1 мМ $ZnCl_2$, 0,5% глицерин при 25°С. Концентрация $d(pA)_{530}:[d(pT)_{16}]_{10}$ в реакционной смеси составляла 10^{-5} М. Содержание нуклеазы S1 составляло 3—5 ед. на 1 мкг олигодезоксинуклеотида. Уровень гидролиза дуплексов контролировался методом электрофореза в ПААГ.

Исследования показали, что ни один из испытанных олигодезоксинуклеидов $d(pA)_{530}$, $d(pA)_{16}$, $d(pT)_{16}$ в концентрациях до 10^{-5} М вне комплекса не активирует (АДФ-рибоза) полимеразу. Указанные нуклеотиды в тех же концентрациях не оказывают влияния на реакции, катализируемые ферментом в присутствии высокомолекулярной тимусной ДНК. Эти данные свидетельствуют о том, что однонитевые олигодезоксинуклеотиды не взаимодействуют с (АДФ-рибоза) полимеразой и не конкурируют с ДНК за место связывания. Вместе с тем эквимолярные смеси комплементарных олигодезоксинуклеотидов $[d(pA)_{530}:d(pA)_{16}]$; $[d(pA)_{16}:d(pT)_{16}]$ при концентрациях в интервале 10^{-8}—10^{-6}М, обработанные описанным выше методом, являются эффективными активаторами (АДФ-рибоза) полимеразы в реакции автоАДФ-рибозилирования. Эти данные свидетельствуют об образовании из комплементарных олигодезоксинуклеотидов дуплексов, являющихся активаторами фермента.

Анализ зависимостей скоростей ферментативной реакции от концентрации дуплексов $d(pA)_{530}:[d(pA)_{16}]_n$ в координатах Лайнуивера—Берка при различных n показал, что повышение n до 30 не отражается на V_{max} реакции, составляющей 1200 нмоль/мин на 1 мг белка. В то же время увеличение n сопровождается понижением K_m дуплекса. На рис. 1а представлена зависимость K_m дуплексов $d(pA)_{530}:[d(pA)_{16}]_n$ от n, из которой следует, что при повышении n до 15 понижение происходит по обратнопропорциональной зависимости. Дальнейшее увеличение n не отражается на значении K_m. Поскольку дуплексы указанного типа моделируют ДНК с однонитевыми разрывами, а параметр n представляет собой количество $d(pT)_{16}$, связанных с комплементарными $d(pA)_{530}$, и соответствует числу этих разрывов, следует предположить, что наблюдаемое понижение K_m дуплексов обусловлено фактическим увеличением количества активирующих участков дуплексов.

На рис. 1,б показана зависимость K_m активирующих участков дуплекса от n, представленная в виде K_m $d(pT)_{16}$. Видно, что K_m активирующих участков не зависит от n при $n < 15$. Дальнейшее повышение n до 30 сопровождается линейным ростом K_m $d(pT)_{16}$. Неизменность V_{max} и K_m от n (для K_m в интервале $0 < n < 15$) позволяет заключить, что разрывосодержащие участки дуплексов $d(pA)_{530}:[d(pT)_{16}]_n$ обладают как одинаковой активирующей эффективностью, так и одинаковым сродством к (АДФ-рибоза) полимеразе. При этом активирующая эффективность не зависит от размера однонитевого фрагмента дуплекса во всем исследованном интервале n, а сродство к ферменту—только в

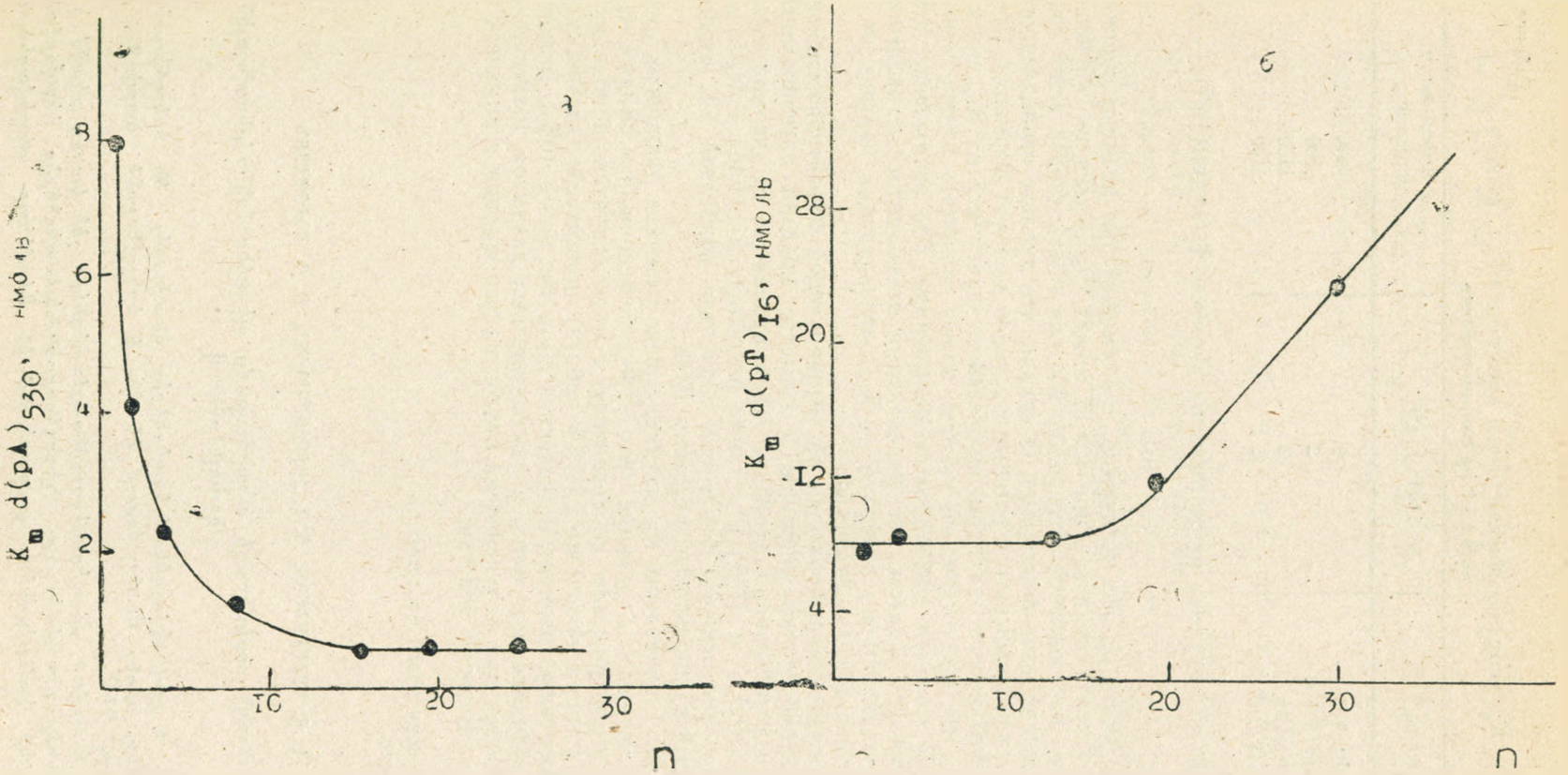

Рис. 1. Зависимость K_m дуплексов $d(pA)_{530}$:$[d(pT)_{16}]_n$ от значения n. **а**—K_m, рассчитанная по концентрации $d(pA)_{530}$; **б**—K_m, рассчитанная по концентрации $d(pT)_{16}$.

Таблица 1

K_m олигодезоксинуклеотидных дуплексов и V_{max} реакции автоАДФ-рибозилирования

Дуплексы	K_m d(pT)$_{16}$, nM	V_{max}, нмоль·мин$^{-1}$ на 1 мг белка
d(pA)$_{530}$:d(pT)$_{16}$	8	1200
d(pA)$_{530}$:[d(pT)$_{16}$]$_{10}$	8	1200
d(pA)$_{16}$:d(pT)$_{16}$	12	1100
d(pA)$_{16}$:d(pT)$_{16}$*	16	1100

* Дуплексы, полученные путем гидролиза дуплексов [d(pA)$_{530}$]:[d(pT)$_{16}$]$_{10}$ нуклеазой S1.

интервале $0<n<15$. Не исключено, что уменьшение размера однонитевого фрагмента дуплекса при $n>15$ может отразиться на значении K_m. Однако наблюдаемое повышение K_m при $n>15$ скорее всего связано со стерическими факторами. Очевидно, что дуплекс ограниченного размера может связывать ограниченное число молекул фермента. Пренебрегая возможным влиянием однонитевого фрагмента на K_m, можно заключить, что исследованный дуплекс может связывать одновременно не более 15 молекул (АДФ-рибоза) полимеразы. Это заключение подтверждается тем фактом, что аналогичные закономерности наблюдались при исследовании зависимости K_m активирующих центров от n для дуплексов d(pA)$_{530}$:[d(pT)$_{10}$]$_n$.

Для получения информации об активирующей эффективности концевых двухцепочечных разрывов в качестве моделей активирующей ДНК были использованы дуплексы, сформированные из эквимолярных количеств d(pA)$_{16}$ и d(pT)$_{16}$, а также гидролизаты дуплекса d(pA)$_{530}$:[d(pT)$_{16}$]$_{10}$, полученного путем его обработки нуклеазой S1, строго специфичной к однонитевым участкам ДНК.

В табл. 1 приведены K_m активирующих участков различных дуплексов, а также V_{max} реакции автоАДФ-рибозилирования. Видно, что двухцепочечные разрывы по сравнению с одноцепочечными обладают несколько худшим сродством к (АДФ-рибоза) полимеразе. Однако, судя по незначительной разнице в значениях V_{max} (не более 10%), активирующая эффективность одно- и двухцепочечных разрывов практически не различается при неизменности нуклеотидного состава и химической структуры концевого участка.

Институт молекулярной биологии
НАН Армении

Լ. Վ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Դ. Լ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Ա. Գ. ՄԽԻԹԱՐՅԱՆ

(АԴՖ-ի ռիբոզ) պոլիմերազի ակտիվացումը օլիգոդեզօքսինուկլեոտիդային կոմպլեքսներով

Օլիգո- և պոլիդեզօքսինուկլեոտիդներից ձևավորվել են երկշղթայանի կոմպլեքսներ, որոնք մոդելավորում են մի- և երկշղթայանի վնասվածքներ պարունակող ԴՆԹ։

Յուցց է տրված, որ օլիգոդեզօքսինուկլեոտիդները չեն կարող ակտիվացնել (АԴՖ-ռիբոզ)պոլիմերազը։ Օլիգոդեզօքսինուկլեոտիդներից ձևավորված երկշղթայանի կոմպլեքսները ցուցաբերում են ֆերմենտը ակտիվացնելու

բարձր ունակություն ավտո ԱԴՖ-ռիբոզիլացման ռեակցիայում։ $d(pA)_{530}$:$[d(pT)_{10}]^n$ տիպի կոմպլեքսների կտրվածք պարունակող հատվածները օժտված են ֆերմենտի ակտիվացման նույն էֆեկտիվությամբ և ֆերմենտի նկատմամբ նույն խնամակցությամբ։ Ֆերմենտն ակտիվացնելու էֆեկտիվությամբ էականորեն չեն տարբերվում նաև մի- և երկշղթայանի կտրվածքները, նուկլեոտիդային վազմի և ծայրային հատվածի քիմիական կառուցվածքի անփոփոխության դեպքում։

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

[1] **K. Ueda, O. Hayaishi,** Ann. Rev. Biochem., v. 54, p. 73—100 (1985). [2] **G. de Murcia, A. Huletzky, G. G. Poirier,** Biochem. Cell Biol., v. 66, № 6, p. 626—635 (1988). [3] **U. Ohgushi, K Yoshihara, T. Kamiya,** J. Biol Chem., v. 255, № 13, p. 6205—6211 (1980). [4] **R. C. Benjamin, D. M. Gill,** J. Biol. Chem., v. 255, № 21, p. 10502—10508 (1980). [5] **Л. В. Карабашян, Д. Л. Арутюнян, А. А. Погосян и др.,** Биохимия,, т. 53, № 4, с. 580—585 (1988).