



УДК 575.224.46.044:577.113.4:577.152.31*21/22'14

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ УДАЛЕНИЕ ИЗ ДНК
ЦИТИДИНОВЫХ ЗВЕНЬЕВ,
МОДИФИЦИРОВАННЫХ О-МЕТИЛГИДРОКСИЛАМИНОМ

Перумов Д. А., Мачковский В. В., Будовский Э. И.*

Ленинградский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
Академии наук СССР, Ленинград;

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Изучено действие экстракта компетентных клеток *Bacillus subtilis* на ДНК, модифицированную действием О-метилгидроксиламина (степень модификации цитозиновых звеньев ~23%, соотношение содержания N⁴-метоксицитидиновых и N⁴-метоксип-6-метоксаминно-5,6-дигидроцитидиновых звеньев ~2,1). При действии экстракта в отсутствие Mg²⁺ в кислоторастворимую фракцию переходит в виде коротких олигонуклеотидов до 25% пиримидиновых звеньев, включающих практически все модифицированные цитидиновые звенья, ~40% тимидиновых и ~20% немодифицированных цитидиновых звеньев. Таким образом, экстракт компетентных клеток *B. subtilis* содержит магнийнезависимую эндонуклеазу, специфичную к модифицированным звеньям, аналогичную по характеру действия репарационному комплексу *uvrABC E. coli*.

При действии О-метилгидроксиламина (метоксамин) на ДНК модифицируется преимущественно цитозин (I) с образованием двух стабильных продуктов: N⁴-метоксицитозина (II) и N⁴-метокси-5,6-дигидро-6-метоксаминцитозина (III) [1]. Ранее было показано, что звенья (II) имитируют при матричном синтезе полинуклеотидов как С, так и U(T) [2-4], т. е. их образование в матричном полинуклеотиде приводит к транзиции С→U(T) [5-8]. Они не репарируются корректирующей системой нормальных ДНК-полимераз, не индуцируют *din* (SOS)-репарацию и не репарируются этой системой [9, 10], но могут репарироваться системой *mismatch* (*mut*) [10]. Практически ничего неизвестно о функциональных свойствах соединений (III). Так как превращение (I)→(III) приводит к утрате ароматичности и планарности основания, было предположено, что такое превращение приводит к утрате функциональной активности, т. е. блокирует репликацию [4]. Данные, полученные на РНК-содержащих фагах, для которых неизвестны системы репарации повреждений, подтверждают это предположение [11].

При действии метоксамина на трансформирующую ДНК *Bacillus subtilis* образуются оба продукта модификации цитозина (соотношение (II)/(III) ~2/1, и 1/1, соответственно при рН 4,5 и 6,0 (50°С)) [12]. Частота мутаций в этих условиях достигает максимума (~10%) при обоих значениях рН и примерно одинаковой суммарной степени модификации цитозина (10%). При этом метоксамин практически не вызывает инактивации трансформирующей способности ДНК [13]. Переход от *uvr*⁺ к *uvr*⁻-реципиенту практически не влияет на трансформирующую способность модифицированной ДНК, но увеличивает примерно в 2 раза частоту мутаций. Задержка репликации ДНК при использовании *ts dnaC*-реципиента приводит к понижению частоты мутаций [13]. Эти данные позволяют предположить, что соединение (III) либо не блокирует репликацию модифицированной ДНК, либо эффективно репарируется в клетке.

Внеклеточная ДНК способна проникать в клетки и встраиваться в их геном только при так называемом компетентном состоянии клеток. При переходе клеток в такое состояние изменяется активность и/или количест-

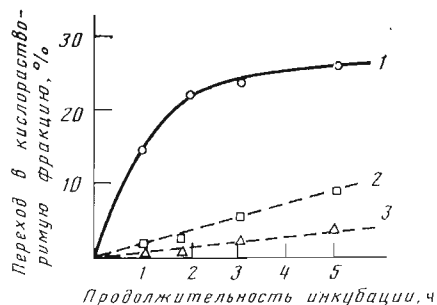


Рис. 1

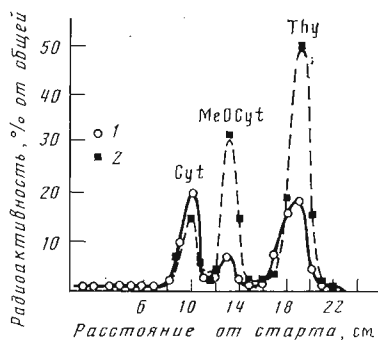


Рис. 2

Рис. 1. Степень расщепления под действием экстракта компетентных клеток *B. subtilis* (рН 5,8; 37° С) ДНК, модифицированной 1 М метоксинамином (рН 4,5; 50° С, 300 ч) (1); ДНК, преинкубированной в этих условиях без метоксинамина (2); нативной ДНК (3). Приведена радиоактивность кислорастворимой фракции (см. «Экспер. часть») в процентах от исходной радиоактивности ДНК, содержащей [2-¹⁴С]пириимидины

Рис. 2. Распределение радиоактивности при хроматографии на бумаге в системе А гидролизата модифицированной [¹⁴С] ДНК (1) и кислорастворимой фракции (2) после инкубации модифицированной ДНК с экстрактом компетентных клеток (рН 6,2; 3 ч при 37° С)

во ферментов, осуществляющих включение в геном клетки трансформирующей ДНК и репарацию ее повреждений. Так как репарация повреждений трансформирующей ДНК происходит только в компетентных клетках, для проверки эффективности и специфичности репарации цитидиновых звеньев, модифицированных метоксинамином, мы исследовали их выщепление из трансформирующей ДНК при действии экстракта компетентных клеток.

В качестве объекта была использована ДНК *B. subtilis*, содержащая [2-¹⁴С]пириимидины. После 60 мин инкубации как нативной, так и модифицированной ДНК с экстрактом компетентных клеток *B. subtilis* в присутствии 10 мМ Mg²⁺ практически все радиоактивные продукты переходят в кислорастворимую фракцию (см. «Экспериментальную часть»). Но при действии экстракта на нативную ДНК в отсутствие Mg²⁺ ее расщепление происходит очень медленно (рис. 1, 3). Несколько быстрее этот процесс идет с контрольной ДНК — преинкубированной в течение 300 ч при рН 4,5 и 50° С без метоксинамина (рис. 1, 2). В случае модифицированной ДНК (1 М метоксинамина (рН 4,5), 300 ч при 50° С, степень модификации цитозина ~23%, ср. [12, 13]) процент радиоактивности в надосадочной фракции быстро растет и через 2–3 ч практически выходит на плато (рис. 1, 1). Скорости расщепления как контрольной, так и модифицированной ДНК зависят от рН. Соотношение скоростей расщепления модифицированной и контрольной ДНК (специфичность действия) имеет максимум при рН 6,2 (табл. 1). Эффективность расщепления ДНК в первом приближении пропорциональна доле компетентных клеток в популяции, из которой получен экстракт (будет опубликовано отдельно). Таким образом, компетентные клетки *B. subtilis* содержат фермент, который в отсутствие Mg²⁺ преимущественно расщепляет модифицированную ДНК.

При хроматографировании на бумаге в системах Б и В практически все радиоактивные продукты, переходящие в кислорастворимую фракцию при действии клеточного экстракта на модифицированную ДНК, остаются на старте (см. «Экспериментальную часть»). В этих системах основания, нуклеозиды и мононуклеотиды обладают значительной подвижностью ($R_f \geq 0,2$). Отсутствие таких соединений среди радиоактивных продуктов в кислорастворимой фракции свидетельствует о том, что в расщеплении модифицированной ДНК при действии клеточного экстракта практически не участвуют ни гликозидазы, элиминирующие модифицированные основания, ни экзонуклеазы обычного типа, действие которых приводит к образованию мононуклеотидов.

Влияние pH на накопление низкомолекулярных (растворимых в 5% трихлоруксусной кислоте) продуктов расщепления ДНК, содержащей [2-¹⁴C]пиримидины, при действии на нее (3 ч при 20°C) экстракта компетентных клеток *B. subtilis*
Приведены усредненные данные не менее трех независимых экспериментов

pH	Радиоактивность кислоторастворимой фракции, % от общей		
	Модифицированная ДНК * (А)	Контрольная ДНК * (В)	А/В
4,8	5,0±1	4,2±0,8	1,2
5,8	31±4,7	7,4±2,6	4,2
6,2	41±6,0	7,6±2,5	5,4
6,8	43±4,2	12,1±2,8	3,6
7,0	48±5,0	16,4±3,5	2,8
7,5	49±6,8	20,0±3,6	2,4
8,0	37±5,4	18,5±4,3	2,0

* Модифицированная и контрольная ДНК получены при инкубации в присутствии и в отсутствие метоксиамин (300 ч, 50° С, pH 4,5).

Таблица 2

Относительное содержание (в %) [2-¹⁴C]пиримидинов в исходном препарате и низкомолекулярных продуктах *, образующихся при действии экстракта компетентных клеток *B. subtilis* (3 ч при 20° С) на контрольную и модифицированную ДНК (инкубированные 30 ч при pH 4,5, 50° С в отсутствие и в присутствии метоксиамин) **

Препарат	Исходная ДНК			Низкомолекулярные продукты		
	Thy	Cyt	MeOCyt	Thy	Cyt	MeOCyt
Контрольная ДНК	49,7 (100)	50,3 (100)	—	50,6 (7,6)	49,4 (7,3)	—
Модифицированная ДНК	48 (100)	40 (100)	12 (100)	51 (42)	16 (17)	33 (100)

* Растворимых в 5% трихлоруксусной кислоте.

** В скобках — процент от содержания соответствующего пиримидина в исходном препарате. Приведены усредненные данные трех и более независимых экспериментов. Дисперсия не превышает 20%.

Так как в 5% трихлоруксусной кислоте, использованной при получении кислоторастворимой фракции, кроме мономерных компонентов нуклеиновых кислот растворимы также короткие олигонуклеотиды (до 5—7 звеньев), то их образованием и обусловлен, скорее всего, переход радиоактивности в кислоторастворимую фракцию при действии клеточного экстракта на модифицированную ДНК. Очевидно, что для образования коротких олигонуклеотидов необходимо расщепление по меньшей мере двух фосфоэфирных связей, разделенных несколькими нуклеотидными звеньями.

Таким образом, при действии клеточного экстракта *B. subtilis* в отсутствие Mg²⁺ расщепление модифицированной ДНК вызвано эндонуклеазами, а расширение бреши в результате последующего экзонуклеазного гидролиза если и идет, то в незначительной степени.

В условиях кислотного гидролиза ДНК до оснований оба типа модифицированных цитозинов переходят в N⁴-метоксицитозин [14], который при хроматографии в системе А хорошо отделяется как от цитозина, так и от тимина (рис. 2). Соотношение радиоактивности тимина, цитозина и модифицированного цитозина в исходном модифицированном препарате — 48 : 40 : 12 (табл. 2). Но в кислоторастворимой фракции это соотношение составляет 51 : 16 : 33, т. е. образующиеся при действии клеточного экстракта олигонуклеотиды обогащены модифицированным цитозином. Следовательно, по крайней мере один из двух разрывов полинуклеотидной цепи, приводящих к образованию кислоторастворимого олигонуклеотида, происходит вблизи от модифицированного звена.

Исходя из степени перехода радиоактивности в кислоторастворимую фракцию и распределения радиоактивности по основаниям в исходном препарате и кислоторастворимой фракции, можно рассчитать степень выщепления из ДНК тимина, цитозина и модифицированного цитозина при действии клеточного экстракта. В том случае, когда ~40% радиоактивности исходного препарата обнаруживается в кислоторастворимой фракции, в ДНК практически не остается модифицированного цитозина, но сохраняется ~60% тимина и ~80% немодифицированного цитозина (табл. 2). Соотношение двух типов модифицированных цитидиновых звеньев (II/III) в исходной ДНК составляет ~2:1 [12]. Поэтому практически полное выщепление модифицированного цитидина из ДНК при действии клеточного экстракта свидетельствует о том, что работающая в экстракте эндонуклеаза специфична к обоим типам цитидиновых звеньев, модифицированных О-метилгидроксиламином.

Таким образом, при действии экстракта компетентных клеток *B. subtilis* в отсутствие Mg^{2+} на ДНК, модифицированную О-метилгидроксиламином, происходит эффективное выщепление обоих типов модифицированных звеньев. Этим, по-видимому, объясняется отсутствие влияния модификации вплоть до 20% цитидиновых звеньев на трансформирующую способность ДНК [12, 13]. Удаление модифицированных звеньев из ДНК осуществляется с помощью эндонуклеазы или соответствующего репарационного комплекса, аналогичного комплексу *uvrABC E. coli*, удаляющему фотохимические повреждения из ДНК [15].

Экспериментальная часть

Радиоактивную ДНК получали из клеток *B. subtilis* BDH (*his*⁻, *arg*⁻, *ura*⁻) [16], выращенных в присутствии гистидина, аргинина и [2-¹⁴C]урацила (будет опубликовано позже). Радиоактивность полученного препарата — $6 \cdot 10^6$ Бк/мкг (без учета эффективности счета). Соотношение радиоактивностей цитозина и тимина в ДНК — $1 \pm 0,01$ (определено после хроматографического разделения оснований, полученных при гидролизе ДНК $HClO_4$) [17]. Так как ДНК *B. subtilis* содержит 21,4% цитозина и 28,7% тимина [18], удельная радиоактивность оснований в полученном препарате составляет 45,5 и 34 Бк/пмоль цитозина и тимина соответственно. Исходя из этого рассчитывали степень модификации цитозина и выщепления оснований из ДНК при действии клеточного экстракта (табл. 2).

Экстракт получали из клеток *B. subtilis* T3, находящихся в стадии компетентности [19], после разрушения клеток на френч-прессе в 0,1 М фосфатном буфере (рН 6,2), содержащем 0,5 мМ EDTA и 5 мМ меркаптоэтанол [20]. ДНК модифицировали действием 1 М метоксиамины при рН 4,5 (50°С) [12, 13].

К 0,05 мл [¹⁴C]ДНК (1 мкг/мл) в 0,15 М NaCl добавляли 0,35 мл экстракта (из ~ 10^9 клеток) и инкубировали при 37°С. Через определенные промежутки времени к аликватам реакционной смеси добавляли равный объем 10% трихлоруксусной кислоты, инкубировали 20 мин при 0°С и центрифугировали. Радиоактивность надосадочной жидкости измеряли в сцинтилляционном счетчике. Из параллельной пробы надосадочной жидкости трихлоруксусную кислоту экстрагировали эфиром и водный слой упаривали досуха. К остатку добавляли 2 мкг немеченой ДНК и 50 мкг метоксицитозина и гидролизовали $HClO_4$ [17]. Гидролизат разделяли хроматографией на бумаге в системе изопропанол — 2 н. HCl, 65:35 (А). Кроме того, надосадочную жидкость после упаривания (без гидролиза) хроматографировали на бумаге в системах *n*-бутанол, насыщенный водой (Б), и *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4:1:1 (В). Хроматограммы разрезали на полосы длиной 1 см и просчитывали их радиоактивность в толуольном сцинтилляторе.

1. Budowsky E. I. In: Progr. in Nucl. Acid. Res. and Mol. Biol. V. 16/Ed. Cohn W. E. N. Y.—L.: Acad. Press, 1976, p. 125–188.
2. Budowsky E. I., Sverdlov E. D., Spasokukotskaya T. N. Biochim. et biophys. acta, 1972, v. 287, № 2, p. 195–210.
3. Banks G. R., Brown D. M., Streeter D. G., Grossman L. J. Mol. Biol., 1971, v. 60, № 3, p. 425–439.
4. Flavel R. A., Sabo D. L., Bandle E. F., Weissmann C. J. Mol. Biol., 1974, v. 89, № 1, p. 255–272.
5. Freese E., Bautz E., Bautz-Freese E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1961, v. 47, № 6, p. 845–855.
6. Tessman I., Poddar R. U., Kumar S. J. Mol. Biol., 1964, v. 9, № 2, p. 352–363.
7. Janion C., Kajatanian E. Mutat. Res., 1979, v. 62, № 2, p. 191–195.
8. Janion C., Glickman B. W. Mutat. Res., 1980, v. 72, № 1, p. 43–47.
9. Janion C. Acta biochim. pol., 1984, v. 31, № 1, p. 183–192.
10. Sledziewska-Gojska E., Janion C. Mol. Gen. Genet., 1982, v. 186, № 2, p. 411–418.
11. Будовский Э. И., Кривиский А. С., Сverdlov E. Д., Щербань Т. П. Генетика, 1971, т. 7, № 1, с. 120–129.
12. Перумов Д. А., Мачковский В. В., Яковлев Д. Ю., Будовский Э. И. Биорган. химия, 1984, т. 10, № 12, с. 1695–1697.
13. Бреслер С. Е., Мачковский В. В., Перумов Д. А., Будовский Э. И. Генетика, 1983, т. 19, № 9, с. 1397–1403.
14. Tikchonenko T. I., Budowsky E. I., Sklyadneva V. B., Khromov I. S. J. Mol. Biol., 1971, v. 55, № 3, p. 535–547.
15. Haseltine W. A. Cell, 1983, v. 33, № 1, p. 13–17.
16. Dubnau D., Goldwithe C., Smith I., Marmur I. J. Mol. Biol., 1967, v. 27, № 1, p. 163–185.
17. Спиринов А. С., Белозерский А. Н. Биохимия, 1956, т. 21, № 6, с. 768–775.
18. Handbook of Biochemistry/Ed. Sober H. A. Cleveland: The Chemical Rubber Co., 1970, p. H-85.
19. Freese E., Strack H. B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1962, v. 48, № 10, p. 1796–1803.
20. Бреслер С. Е., Глазунов Е. А., Перумов Д. А. Генетика, 1972, т. 8, № 2, с. 109–118.

Поступила в редакцию
2.VIII.1985

ENZYMATIC REMOVAL FROM DNA OF CYTIDINE RESIDUES MODIFIED BY O-METHYLHYDROXYLAMINE

PERUMOV D. A., MACHKOVSKY V. V., BUDOWSKY E. I.*

B. P. Konstantinov Institute of Nuclear Physics, Academy of Sciences
of the USSR, Leningrad; * M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic
Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The action of the extract of competent *Bacillus subtilis* cells on the O-methylhydroxylamine — modified DNA (the extent of cytidine modification ~23%, the N⁴-methoxycytidine/N⁴-methoxy-6-methoxyamino-5,6-dihydrocytidine ratio ~2,1) has been studied. In the absence of Mg²⁺, up to 25% pyrimidine units including virtually all modified cytidine, ~40% thymidine and ~20% unmodified cytidine units have been found as short oligonucleotides in the acid-soluble fraction. Hence, the extract of competent cells contains a Mg²⁺-independent endonuclease specific for modified units and similar in its mode of action to the reparative *uvr ABC* complex of *E. coli*.