

ЯДЕРНАЯ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗА ЗАРОДЫШЕЙ КУКУРУЗЫ

К. Г. Карпенчук, Г. Н. Руденко

Введение. Важнейшие молекулярно-генетические процессы в клетках про- и эукариот — транскрипция, репликация, рекомбинация и, по-видимому, транспозиция — включают переходы отдельных типов топологических состояний ДНК (суперспиральное, релаксированное, катенированное, заузленное, частично денатурированное) и их сочетаний. Различные клетки содержат специальный аппарат для регуляции топологических переходов ДНК, представленный ферментами — ДНК-топоизомеразами и некоторыми другими, и структурными белками — индукторами топологических переходов [1—4].

Ядерные геномы эукариот (животных и дрожжей) обслуживаются ДНК-топоизомеразами I и II [1, 2, 9]. В клетках высших растений идентифицированы эукариотическая ДНК-топоизомераза I из ткани семян пшеницы [10] и прокариотическая ДНК-топоизомераза I из хлоропластов шпината [11], а также две ДНК-топоизомеразы из ткани соцветий цветной капусты [12].

Растительная клетка содержит три различные генетические системы — ядро, хлоропласты и митохондрии. Необходимо для каждой из этих систем в отдельности идентифицировать аппарат регуляции топологических состояний ДНК. В данной работе описаны выделение и частичная характеристика АТФ-независимой ДНК-топоизомеразы из ядер высшего растения — кукурузы. Показано существенное стимулирование релаксации супервитков ДНК ферментом в присутствии полиаминов и ингибирование активности препаратом ауринтрикарбоновой кислоты.

Материалы и методы. Выделение и очистка ДНК-топоизомеразы из ядер зародышей кукурузы. Семена кукурузы *Zea mays* (сорт Добруджанка) замачивали в дистиллированной воде в течение 12 ч и извлекали из них зародыши. Дальнейшие операции проводили на холоду. Зародыши гомогенизировали в 50 мМ трис-НСl, рН 7,8, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ 2-меркаптоэтанол и 0,1 мМ фешилметилсульфонилфториде — буфере А, который использовали при всех дальнейших манипуляциях с ядрами, ядерным экстрактом и при очистке фермента. Гомогенат зародышей осветляли центрифугированием при 4000 g в течение 10 мин, повторяли промывку ядер в том же режиме и дважды — в присутствии 0,1 % тритона X-100 для разрушения плазмид и митохондрий. Затем отмывали осадок от ионного детергента и наслаивали на 0,75 М сахарозу с последующим центрифугированием при 4000 g в течение 15 мин. Осадок отмывали от сахарозы, лизировали 30 мин 2 М NaCl при помешивании. Дальнейшую очистку активности ДНК-топоизомеразы из экстракта ядер кукурузы проводили, как описано для экстракта ткани соцветий цветной капусты [12]. Нуклеиновые кислоты удаляли из ядерного экстракта добавлением полиэтиленгликоля 6000 («Merck», ФРГ) до 10 % и центрифугированием при 53000 g в течение 20 мин. Осадок повторно экстрагировали 2 М NaCl. Полученные надосадочные жидкости смешивали с сухим сульфатом аммония до 55 % насыщения, собирали осадки белков на границе раздела фаз полиэтиленгликоля и солевого раствора после центрифугирования при 20000 g в течение 20 мин и анализировали против буфера А. Растворимые белки отделяли центрифугированием при 20000 g в течение 20 мин и наносили на колонку карбоксиметил-сефадекса С-25 (2,5×2,5 см), уравновешенного буфером А. Элюцию белков проводили линейным градиентом (0—1 М) концентрации KCl с буфером А в объеме 120 мл и собирали фракции 3 мл.

Определение релаксирующей активности фермента. Активность ДНК-топоизомеразы определяли в объеме 25 мкл стандартной инкубационной смеси, содержащей 10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 50 мМ KCl, 0,14 мМ ЭДТА, 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина («Koch Light», Англия) и 0,2 мкг суперспиральной ДНК плазмиды *pBR322* (НПО «Биохимреактив», г. Олайне), с добавлением 5 мкл полученных хроматографических фракций и инкубацией при 37 °С в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением DS-Na до 2 % и прогреванием при 65 °С. ДНК из смеси пересаживали этанолом и анализировали электрофорезом в 1 %-ной агарозе с 40 мМ

трис-ацетатом, рН 8,3, 2 мМ ЭДТА при 40 В в течение 18 ч. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолете.

Приготовление ингибиторов и возможных кофакторов ДНК-топоизомеразы. Исходные растворы 10 мМ АТР («Reanal», ВНР), 10 мМ спермидина-3HCl и 10 мМ кадаверина-2HCl («Serva», ФРГ), 50 мМ йодацетамида («Sigma», США), 5 мМ ауриINTRикарбоновой кислоты («Fluka», Швейцария), новобиоцина (500 мкг/мл) («Boehringer Mannheim», ФРГ), 100 мМ MgCl₂ (осч, СССР) и бромистого этидия (1 мг/мл) («Serva», ФРГ) готовили на деионизованной воде. Налидиксовую кислоту и п-оксимеркурибензоат натрия («Serva», ФРГ) растворяли в минимальном объеме 1 М NaOH, нейтрализовали разбавленной HCl и разбавляли до конечной концентрации 500 мкг/мл и 10 мМ соответственно.

Спектры поглощения разбавленных водных растворов ауриINTRикарбоновой кислоты в диапазоне 280—560 нм регистрировали на спектрофотометре Gilford-250 (Англия).

Результаты и обсуждение. В первой серии экспериментов были определены фракции элюата ядерного экстракта кукурузы с СМ-сефадекса, содержащие ДНК-топоизомеразную активность. В исходном ядерном экстракте эта активность не обнаружена. Элюция ДНК-топоизомеразы кукурузы с катионита происходит в диапазоне концентраций 0,25—0,5 М KCl, что свидетельствует о наличии небольшого положительного заряда молекул фермента. Представленная на рис. 1 (см. вклейку) картина получена при использовании стандартной инкубационной смеси с добавлением ионов магния. Проведение аналогичного анализа с теми же фракциями в присутствии АТР не обнаружило ни дополнительных фракций с АТР-зависимой релаксирующей активностью, ни заметных изменений активности локализованных фракций АТР-независимой ДНК-топоизомеразы (результат не приведен).

Активные фракции были использованы для изучения свойств содержащейся в них частично очищенной ДНК-топоизомеразы. На рис. 2 (см. вклейку) показана кинетика релаксации суперспиральной ДНК выделенным ферментом в зависимости от длительности инкубации. Известно [15], что реакция релаксации супервитков ДНК ДНК-топоизомеразой I из ядер клеток млекопитающих в зависимости от ионной силы может протекать либо по процессивному механизму, при котором молекулы фермента не диссоциируют с ДНК до полной ее релаксации, либо по дистрибутивному механизму, когда молекулы ДНК-топоизомеразы после единичного акта реакции перераспределяются на другие молекулы ДНК. При молярном недостатке ДНК-топоизомеразы в инкубационной среде по отношению к субстрату — суперспиральной ДНК, протекание реакции по одному из этих механизмов дает различные картины кинетики релаксации ДНК. При дистрибутивном действии происходит постепенная релаксация всех молекул суперспиральной ДНК, что и наблюдается на рис. 2. Иная картина релаксации ДНК ядерной ДНК-топоизомеразой кукурузы в случае процессивного действия фермента (рис. 3, см. вклейку): часть молекул ДНК полностью релаксируется при сохранении значительной доли исходной суперспиральной ДНК.

Активность фермента полностью ингибируется модификацией цистеиновых остатков п-оксимеркурибензоатом (рис. 3), а также йодацетамидом (результат не приведен), что свидетельствует о существенном значении SH-группы или групп для активности фермента.

Ингибиторы бактериальной ДНК-гиразы и эукариотических ДНК-топоизомераз II типа (налидиксовая кислота и новобиоцин) в высоких концентрациях не предотвращали релаксацию супервитков ДНК изучаемым ферментом, однако степень релаксации в их присутствии была несколько ниже, чем в контрольной пробе (рис. 3). При этом новобиоцин оказывал более сильное влияние на распределение топоизомеров релаксированной ДНК по сравнению с налидиксовой кислотой. При добавлении ионов магния наблюдается существенное стимулирование активности ДНК-топоизомеразы кукурузы (рис. 4, см. вклейку), кото-

рое сохраняется в присутствии налидиксовой кислоты и новобицина (рис. 3).

Еще более значительное по сравнению с ионами магния стимулирование активности ДНК-топоизомеразы наблюдается при добавлении в стандартную инкубационную смесь полиаминов— кадаверина и спермидина (рис. 4). Кадаверин (2,5-диаминопентан) оказывает наиболее выраженное стимулирующее влияние на скорость релаксации суперспиральной ДНК.

Было изучено влияние на активность ДНК-топоизомеразы кукурузы препаратов ауринтрикарбоновой кислоты (рис. 5), которая является

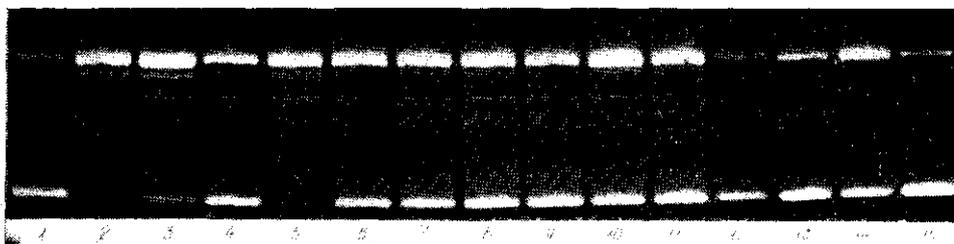


Рис. 5. Ингибирование ядерной ДНК-топоизомеразы кукурузы препаратом ауринтрикарбоновой кислоты: контрольная ДНК (1, 15) и ДНК после инкубации с ферментом в присутствии 10 мМ $MgCl_2$ и 4 (2), 5 (3) и 10 мкМ (4) ауринтрикарбоновой кислоты; 10 мМ $MgCl_2$ (5); 0,5 (6); 1 (7); 2,5 (8); 3 (9); 4 (10); 5 (11), 10 (12) и 25 мкМ (13) ауринтрикарбоновой кислоты; в стандартной инкубационной смеси (14)

Fig. 5. Inhibition of the *Zea mays* nuclear DNA topoisomerase by the preparation of aurointricarboxylic acid: control DNA (1, 15), and DNA after incubation with the enzyme in the presence of 10 mM $MgCl_2$ and 4 (2), 5 (3) and 10 μM of aurointricarboxylic acid (4); 10 mM $MgCl_2$ alone (5); in the presence of 0.5 (6); 1 (7); 2.5 (8); 3 (9); 4 (10); 5 (11); 10 (12) and 25 μM of aurointricarboxylic acid (13) and in standard assay mixture without inhibitor (14)

ингибитором полинуклеотидсвязывающих белков и ферментов [16—18]. Внесение этого соединения в стандартную инкубационную смесь с ДНК-топоизомеразой кукурузы вызывает полное подавление активности фермента при пороговой концентрации ингибитора около 10 мкМ. При более низких концентрациях ингибитора картина релаксации супервитков ДНК практически не отличается от контрольной, без красителя. Внесение в реакцию ионов магния оказывает влияние на характер ингибирования ДНК-топоизомеразы кукурузы ауринтрикарбоновой кислотой. В частности, в присутствии ионов магния и 10 мкМ ингибитора наблюдается частичная релаксация супервитков ДНК, однако при снижении концентрации ауринтрикарбоновой кислоты до 5 и 4 мкМ ее ингибирующее воздействие все еще сказывается.

Ранее было показано, что и коммерческие, и полученные лабораторным синтезом препараты красителя представляют собой смесь мономера ауринтрикарбоновой кислоты и продуктов его олигомеризации, причем именно полимерными продуктами определяется ингибирующая активность препаратов трифенилметанового красителя [16, 17]. В табл. 1 суммированы спектральные характеристики свежеприготовленного раствора ауринтрикарбоновой кислоты в сопоставлении с аналогичными свойствами фракционированного препарата [17]. Наличие пиков поглощения ауринтрикарбоновой кислоты при 305 нм свидетельствует о наличии в растворе мономера-красителя, а плеча при 450 нм и максимума при 520 нм — продуктов его полимеризации с различным числом звеньев мономера [17]. При хранении водных растворов ингибитора наблюдается сдвиг первого максимума в длинноволновую область (312 нм), что указывает на постепенную полимеризацию молекул красителя, в согласии с наличием свободнорадикальных свойств у ауринтрикарбоновой кислоты [17].

Равновесное распределение топоизомеров релаксированной ДНК может быть получено комбинированным действием эндонуклеазы и

ДНК-лигазы (см. обзор [3]). Образование топоизомеров кольцевой ДНК в наших экспериментах под действием именно ДНК-топоизомеразы подтверждается образованием полного спектра топоизомеров ДНК—от суперспиральной до релаксированной (при дистрибутивном действии фермента), и появлением топоизомеров релаксированной ДНК в отсутствие ионов магния и АТР, необходимых для активности лигаз.

Таблица 1

Спектральные характеристики препаратов ауриINTRИКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ
Spectral characteristics of the preparations of aurintricarboxylic acid

Препарат	Средняя молекулярная масса, M_n	λ_{max} , нм	$E_{1\%}^{1\text{см}}$	Ссылка
Алюминон (ауриINTRИКАРБОНОВАЯ КИСЛОТА, аммонийная соль) («Fisher Scientific», США)	396±40	305	223	[17]
		1800±200	308	
	6000±600	450	12	
		535	15	
		312	192	
		460	46	
520	64			
АуриINTRИКАРБОНОВАЯ КИСЛОТА, аммонийная соль («Fluka», Швейцария)	Н. о.	305	204	Данная работа
		450	12	
		520	16	

Изученные ДНК-топоизомеразы подразделяются, во-первых, на два типа по механизму промежуточного расщепления ДНК и, во-вторых, на про- и эукариотические, что отражается в их кофакторных потребностях и чувствительности к ингибиторам [1]. Для классификации ядерной ДНК-топоизомеразы из зародышей кукурузы мы сопоставили ее свойства с уже идентифицированными ДНК-топоизомеразами эукариот (табл. 2). Возможные примеси пластид, которые содержат прокариотические ДНК-топоизомеразы [11], сведены к минимуму выделением ядер из бесцветной ткани зрелых зародышей кукурузы, а также промывками ядер в присутствии неионного детергента. Выделенная из ядерного экстракта зародышей кукурузы ДНК-топоизомераза обладает активностью в отсутствие ионов магния. Этим свойством среди изученных ферментов данной группы обладают лишь эукариотические ДНК-топоизомеразы I типа из ядер млекопитающих и дрожжей [1, 9, 15], а также эукариотическая ДНК-топоизомераза I, экстрагированная из ткани семян пшеницы [10]. Подобно ДНК-топоизомеразам I из ядер животных и дрожжей ядерная ДНК-топоизомераза кукурузы стимулируется ионами магния, ингибируется блокированием цистеиновых остатков и осуществляет релаксацию супервитков по дистрибутивному или процессивному механизму в зависимости от ионной силы. Активность ДНК-топоизомеразы кукурузы, в отличие от эукариотических ядерных ДНК-топоизомераз II типа, не требует доноров энергии, не подавляется высокими концентрациями налидиксовой кислоты и новобиоцина, а также ЭДТА. Эти свойства позволяют предварительно классифицировать выделенный фермент как эукариотическую ДНК-топоизомеразу I типа.

Отсутствие фракции АТР-зависимой ДНК-топоизомеразы в ядерном экстракте кукурузы, подобной ферменту из цветной капусты [12], может быть связано с различиями в процедуре выделения и/или низкой активностью этого фермента в покоящейся ткани зрелого зародыша кукурузы по сравнению с быстроделющейся тканью соцветий цветной капусты.

Влияние высоких концентраций налидиксовой кислоты на распределение топоизомеров релаксированной ДНК в присутствии ядерной ДНК-топоизомеразы кукурузы, описанное ранее для ДНК-топоизомеразы I из ооцитов вьюна [2], возможно, обусловлено связыванием

этого ингибитора с расплетенными участками суперспиральной ДНК [19].

Полиамины — кадаверин и спермидин — оказывают стимулирующее влияние на активность ДНК-топоизомеразы кукурузы в концентрациях, вызывающих конденсацию отдельных молекул ДНК и, не исключено, их агрегацию (см. обзор [20]). Эти биогенные амины присутствуют и в растительных клетках [20].

Ввиду возрастающего внимания к аспектам регуляции топологии ДНК про- и эукариот представляет интерес поиск ингибиторов ДНК-

Таблица 2

Влияние ингибиторов и кофакторов на активность ДНК-топоизомераз эукариот
Effect of inhibitors and cofactors on the activity of eukaryotic DNA topoisomerases

Тип и источник ДНК-топоизомеразы	Релаксация суперспиральной ДНК ферментами в присутствии различных веществ в инкубационной смеси									Ссылка
	АТР	Без АТР	ЭДТА	Mg ⁺²	Спермидин	SH-реагенты	Новобиоцин	Налидиксовая кислота	Бромистый этидий	
Из ядер зародышей кукурузы	+	+	+	++	+++	-	±	±	±	Данная работа
I, из цветной капусты	+	+	-	+	++	-	+			[12]
I, из семян пшеницы	+	+	+	+						[10]
I, из ядер дрожжей	+	+	+	++		-	+		±	[9]
I, из ядер клеток человека	+	+	+						±	[23]
II, из ядер дрожжей	+	-	-	+			±	+	-	[9]
I, из хлоропластов шпината	+	+	-	+		-			-	[11]

Примечание. «+» — наличие и «-» — отсутствие реакции; «±» — частичное ингибирование.

топоизомераз I типа. Было обнаружено неспецифическое ингибирование ДНК-топоизомераз I химической модификацией цистеиновых (табл. 2) и тирозиновых остатков [21], а также сорбцией на гепарин [22]. Нами впервые показано подавление активности эукариотической ДНК-топоизомеразы препаратами ауринтрикарбоневой кислоты. Известно [16, 18], что ауринтрикарбоневая кислота является мощным ингибитором панкреатической РНКазы А, РНК-полимеразы, Q β -репликазы и λ -с-репрессора *E. coli*. Причем для полимераз ауринтрикарбоневая кислота была ингибитором лишь на стадии инициации, не оказывая существенного влияния на элонгацию цепей [16]. Механизм действия ингибитора, по-видимому, заключается в блокировании полинуклеотидсвязывающих участков белков. Методами ЯМР-спектроскопии показано, что олигомеры ауринтрикарбоневой кислоты связывают лизиновые и гистидиновые остатки, в основном, в активном центре РНКазы А [18].

Наши данные позволяют предполагать, что ауринтрикарбоневая кислота может оказаться полезной для ингибирования ДНК-топоизомераз и других ДНК-модифицирующих ферментов при изучении топологических форм ДНК.

Авторы выражают признательность И. М. Ундрицову и Р. П. Вашихидзе за полезные советы.

NUCLEAR DNA TOPOISOMERASE FROM THE *ZEA MAYS* EMBRYOS

K. G. Karpenchuk, G. N. Rudenko

N. G. Kholodny Institute of Botany, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

ATP-independent presumably type I DNA topoisomerase was partially purified from the nuclear extract of *Zea mays* mature embryos by separation in the polyethylene glycol-ammonium sulphate system with 2 M NaCl and by salt gradient elution from CM-Sephadex. The ability of enzyme to relax negative supercoils of plasmid *pBR322* DNA was detected in the presence of EDTA, being however markedly stimulated by the magnesium ions and polyamines (spermidine and cadaverine). The reaction proceeded via either processive or distributive mechanism depending on the ionic strength of the enzyme assay mixture. Novobiocin and nalidixic acid (both at 100 µg/ml) did not inhibit the enzyme activity. Modification with *p*-hydroxymercuribenzoate or iodoacetamide completely abolished the DNA topoisomerase activity, thus indicating the presence of essential cysteine residues in the enzyme molecules. The DNA topoisomerase activity was found to be completely depressed by the preparation of potent inhibitor of polynucleotide-binding proteins—aurintricarboxylic acid in partially polymerized form. Magnesium ions partially restored the DNA topoisomerase activity in the presence of aurintricarboxylic acid.

1. Gellert M. DNA topoisomerases // *Ann. Rev. Biochem.*—1981.—50.—P. 879—910.
2. ДНК-топоизомеразы животных клеток / К. А. Кафрани, И. Б. Бронштейн, И. И. Громова и др. // *Молекуляр. биология.*—1985.—19, № 2.—С. 438—449.
3. Bauer W. R. Structure and reactions of closed duplex DNA // *Ann. Rev. Biophys. and Bioengin.*—1978.—7.—P. 287—313.
4. Wang J. C., Peck L. J., Becherer K. DNA supercoiling and its effect on DNA structure and function // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*—1982.—47.—P. 85—91.
5. Wang J. C. Unwinding of the promoter and the modulation of transcription by DNA supercoiling // *Promoters. Structure and Function* / Eds R. L. Rodriguez, M. J. Chamberlin.—New York: Praeger Publ., 1982.—P. 229—241.
6. Stirdivant S. M., Grossland L. D., Bogorad L. DNA supercoiling effects on *in vitro* transcription of two maize chloroplast genes differently // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1985.—82, N 15.—P. 4886—4890.
7. Richardson S. M. H., Higgins C. F., Lilley D. M. J. The genetic control of DNA supercoiling in *Salmonella typhimurium* // *EMBO J.*—1984.—3, N 8.—P. 1745—1752.
8. Native supercoiling of DNA: The effects of DNA gyrase and omega protein in *E. coli* / S. M. Mirkin, E. N. Zajtsev, I. G. Panyutin, V. I. Lyamichev // *Mol. and Gen. Genet.*—1984.—196, N 3.—P. 508—512.
9. Goto T., Laipis P. The purification and characterization of DNA topoisomerases I and II of the yeast *S. cerevisiae* // *J. Biol. Chem.*—1984.—259, N 16.—P. 10422—10429.
10. Purification and characterization of wheat germ DNA topoisomerase I (nicking-closing enzyme) / W. S. Dynan, J. J. Jendrisak, D. A. Hager, R. R. Burgess // *Ibid.*—1981.—256, N 11.—P. 5860—5865.
11. Siedlecki J., Zimmerman W., Weissbach A. Characterization of a prokaryotic topoisomerase I activity in chloroplast extracts from spinach // *Nucl. Acids Res.*—1983.—11, N 5.—P. 1523—1536.
12. Fukata H., Fukasawa H. Isolation and partial characterization of two distinct DNA topoisomerases from cauliflower inflorescence // *J. Biochem.*—1982.—91, N 4.—P. 1337—1342.
13. Reeves R. Transcriptionally active chromatin // *BBA.*—1984.—782, N 4.—P. 343—393.
14. *Drosophila* DNA topoisomerase I is associated with transcriptionally active regions of the genome / G. Fleischmann et al. // *PNAS.*—1984.—81, N 22.—P. 6958—6962.
15. McConaughy B. L., Young L. S., Champoux J. J. The effect of salt on the binding of the eukaryotic DNA nicking-closing enzyme to DNA and chromatin // *Biochim. et biophys. acta.*—1981.—655, N 1.—P. 1—8.
16. Blumenthal T., Landers T. A. The inhibition of nucleic acid-binding proteins by aurintricarboxylic acid // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1973.—55, N 3.—P. 680—688.
17. Gonzalez R. G., Blackburn B. J., Schleich T. Fractionation and structural elucidation of the active components of aurintricarboxylic acid, a potent inhibitor of protein nucleic acid interactions // *Biochim. et biophys. acta.*—1979.—562, N 3.—P. 534.
18. Gonzalez R. G., Haxo R. S. // *Biochemistry.*—1980.—19, N 18.—P. 4299—4303.
19. Chen L. L., Pernet A. G. // *PNAS.*—1985.—82, N 2.—P. 307—311.
20. Tabor C. W., Tabor H. // *Annu. Rev. Biochem.*—1976.—45.—P. 285—306.
21. Klevan L., Tse Y.-C. // *Biochim. et biophys. acta.*—1983.—745, N 1.—P. 175—180.
22. Inhibition of topoisomerase I by heparin / K. Ishii, A. Katase, T. Andoh et al. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1982.—104, N 2.—P. 541—547.
23. Liu L. F., Miller K. G. // *PNAS.*—1981.—78, N 6.—P. 3487—3491.

Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР, Киев

Получено 26.11.85