

Расщепление ДНК, адсорбированной на поверхности фосфолипидных мембран, рестриктазами типа II

Будкер В. Г., Дегтярев С. Х.*, Соколов А. В.

* - автор для переписки

Изучен гидролиз ДНК фага λ рестриктазами типа II в присутствии модельных мембран из яичного фосфатидилхолина. Показано, что степень гидролиза ДНК ферментами *Bsp* I, *Pst* I и *Bam* HI в этих условиях резко снижена. Это не связано с необратимой инактивацией ферментов или их взаимодействием с мембраной. Наиболее вероятное объяснение ингибирования гидролиза ДНК в присутствии фосфолипидных везикул - изменение субстратных свойств ДНК в результате ее адсорбции на поверхности фосфолипидной мембраны при участии ионов Mg^{2+} .

В присутствии двухвалентных катионов (Ca^{2+} или Mg^{2+}) ДНК образует прочные комплексы с модельными фосфолипидными мембранами или липидными участками природных мембран [1]. Комплекс формируется в результате взаимодействия катиона с фосфатными группами полинуклеотида и липида. Адсорбция на мембране существенно влияет на характер взаимодействия ДНК с рядом ферментов. В частности, это приводит к ингибированию гидролиза ассоциированной ДНК ДНКазой [2].

В данной работе изучен гидролиз ДНК, адсорбированной на фосфолипидных везикулах рестриктазами типа II.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рестриктазы *Bsp* I, *Pst* I и *Bam* HI - отечественного производства. Фаговая ДНК C1857 получена из научно-производственного объединения "Фермент" (Вильнюс). Фосфатидилхолин из куриных яиц получали, как описано в работе [3]. Липосомы диаметром ~ 3000 Å получали, используя модифицированный вариант метода [4], инъекцией раствора липида в диэтиловом эфире в буфере 6 мМ трис-HCl, pH 7,5, 6 мМ NaCl, 6 мМ β -меркаптоэтанол, как описано в работе [2]. Гидролиз ДНК рестриктазами проводили при 37° в реакционной смеси объемом 10 мкл, содержащей 0,5 мкг ДНК, 5е. фермента в 6 мМ трис-HCl, pH 7,5, в присутствии 6 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$ и 6 мМ- β -меркаптоэтанол. В большинстве экспериментов с липосомами реакционная смесь содержала 20 мкг фосфатидилхолина. По окончании реакции к смеси добавляли DS-Na, до концентрации 1%, ЭДТА до 20 мМ. Смесь прогревали 10 мин при 60°, добавляли 5 мкл 50% глицерина и наносили на 1 %-ный агарозный гель. Электрофорез проводили в 50 мМ трис-ацетатном буфере, содержащем 20 мМ ацетат Na, 2 мМ ЭДТА, 10^{-3} мМ бромистый этидий, pH 8,3, при напряжении 5 В/см. Гель фотографировали при освещении ультрафиолетовым светом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Инкубация ДНК фага λ с липосомами из фосфатидилхолина в присутствии 5 мМ $MgCl_2$ приводит, как показано в работе [1], к количественной адсорбции полинуклеотида на поверхности мембраны. В этих условиях, как видно на рис. 1, наблюдается существенное ингибирование

гидролиза ДНК рестриктазами *Bsp* I, *Pst* I и *Bam* HI. В реакционной смеси сохраняется исходная ДНК и накапливаются промежуточные продукты гидролиза. Степень ингибирования несколько отличается для изученных ферментов, но качественно эффект для этих трех рестриктаз аналогичен. Необходимо отметить, что степень гидролиза не зависит от того, добавляется ли в реакционную смесь к липосомам сначала ДНК (при этом немедленно формируется комплекс ДНК - мембрана), а затем фермент или наоборот.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 1. Электрофоретическое разделение продуктов гидролиза ДНК бактериофага λ различными рестриктазами; 1 - исходная ДНК, 2, 3, 4, 5 ДНК после инкубации с *Pst* I; 6, 7, 8, 9 - с *Bam* HI; 10, 11, 12, 13 - с *Bsp* I; 3, 7, 11 - в отсутствие липосом, инкубация 60 мин; 2, 6, 10 - в присутствии липосом (2 мг/мл), инкубация 60 мин; 4, 8, 12 - в присутствии липосом, инкубация 75 мин; 5, 9, 13 - в присутствии липосом, инкубация 60 мин, затем добавление тритона X-100 до 0.5% и инкубация 15 мин

На рис. 2 показана зависимость степени гидролиза ДНК рестриктазой *Pst* I от времени инкубации. В присутствии липосом часть ДНК быстро гидролизует, а затем реакция либо полностью прекращается, либо сильно замедляется. Устойчивыми к расщеплению оказываются не только целые молекулы, но и промежуточные продукты (фрагменты) ее гидролиза.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 2. Электрофоретическое разделение продуктов гидролиза ДНК λ в присутствии (2 мг/мл) липосом - (1 - 6) и в отсутствие липосом (7 - 12). Реакцию останавливали после 1 мин (1, 7), 5 мин (3, 9), 30 мин (4, 10), 45 мин (5, 11), 60 мин (6, 12) инкубации

Увеличение концентрации липосом в реакционной смеси повышает устойчивость ДНК к гидролизу *Pst* I (рис. 3).

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 3. Электрофоретическое разделение продуктов гидролиза ДНК λ *Pst* I при разных концентрациях липида: 2 мг/мл (3), 5 мг/мл (4), 8 мг/мл (5), 12 мг/мл (6) и 15 мг/мл (7); 1 - исходная ДНК, 2 - в отсутствие липида

Можно рассмотреть следующие возможные причины защиты липосомами ДНК от гидролиза рестриктазами: а) в присутствии липосом происходит необратимая инактивация ферментов; б) ферменты адсорбируются на мембране, что приводит к подавлению их активности; в) взаимодействие ДНК с мембраной снижает ее субстратные свойства.

Чтобы проверить, сохраняют ли рестриктазы свою активность после инкубации в присутствии липосом, полную реакционную смесь выдерживали в течение 1 ч., затем разрушали мембраны тритоном X-100 и смесь инкубировали 15 мин. Это приводило к практически полному гидролизу ДНК (рис. 1). Таким образом, ясно, что ферменты сохраняют функциональную активность в течение всего эксперимента. Способность рестриктаз образовывать прочные комплексы с фосфолипидными мембранами была проанализирована на примере *Pst* I. Фермент инкубировали 15 мин при 37° с мультиламеллярными липосомами из фосфатидилхолина. Смесь центрифугировали 15 мин при 10 000 g. В этих условиях липосомы количественно осаждаются. К супернатанту добавляли ДНК λ и скорость ее гидролиза сравнивали с контролем, в котором фермент не инкубировали с липосомами. Оказалось, что отличий между опытом и контролем нет. Таким образом, по крайней мере, *Pst* I, не формирует стабильных комплексов с мембраной. Приведенные данные указывают на то, что ингибирующее действие липосом на гидролиз ДНК рестриктазами, не обусловлено взаимодействием ферментов с мембранами. Более вероятно предположение, что торможение гидролиза связано с адсорбцией ДНК на поверхности мембраны и снижением в результате этого ее доступности действию фермента. Комплекс ДНК с фосфолипидной мембраной формируется, по-видимому, в результате взаимодействия катиона (Mg^{2+} или Ca^{2+}) с фосфатами полинуклеотида и липида и может быть диссоциирован одновалентными катионами [1]. На рис. 4 показано, что добавление NaCl в реакционную смесь, содержащую ДНК, *Pst* I, липосомы и 5 mM $MgCl_2$ приводит к заметному увеличению степени гидролиза ДНК. Однако полного расщепления ДНК не происходит. Как показано [5], адсорбция ДНК на поверхности фосфолипидной мембраны приводит к транслокации части молекул ДНК (5-10%) во внутренний объем везикул по механизму, подобному эндоцитозу. Эта ДНК не освобождается из липосом при добавлении NaCl и, возможно, составляет не гидролизуемую фракцию (рис. 4, дорожки 3 и 4). Основная же часть ДНК, устойчивая к гидролизу в составе комплекса с липосомами, расщепляется ферментом при диссоциации комплекса.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 4. Электрофоретическое разделение продуктов гидролиза ДНК λ *Pst* I (при концентрации $MgCl_2$ 0,005 M) в присутствии липосом - (2-4) и в отсутствие липосом (5, 6) при концентрации NaCl: 0,01 M (2), 0,04 M (3, 5) и 0,08 M (4, 6)-1 - исходная ДНК

Таким образом, наиболее вероятное объяснение ингибирующего действия липосом - снижение доступности ДНК, адсорбированной на поверхности фосфолипидных мембран для рестриктаз типа II, возможно, в результате стерических затруднений взаимодействия фермента с полинуклеотидом или изменения конформации ДНК [7].

Из анализа кинетики гидролиза адсорбированной ДНК *Pst* I (рис. 2) видно, что существуют два состояния для сайтов рестрикции: доступные и практически полностью недоступные для фермента. Доля доступных сайтов снижается при увеличении концентрации липида. Следует отметить, что уже при концентрации липида 2 мг/мл ДНК полностью связана с липосомами, и формальный расчет показывает, что поверхность липосом превосходит поверхность ДНК. Кажется вероятным, что фрагменты ДНК, непосредственно взаимодействующие с мембраной, недоступны гидролизу, но, возможно, сохраняются петли полимера, по которым происходит ферментативная атака.

В заключение необходимо отметить, что диапазон концентраций двух- и одновалентных катионов, при которых наблюдается формирование и диссоциация комплексов ДНК с мембраной, близок к физиологическим [6]. Следовательно, можно думать, что в тех случаях, когда внутриклеточная

концентрация ионов Mg^{2+} будет повышена, ДНК бактериофага, проникшая в бактериальную клетку, может адсорбироваться на фосфолипидных участках мембраны клетки-хозяина, что, по-видимому, приводит к защите ДНК от действия клеточных рестриктаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Budker V. G., Godevnikov A. A., Naumova I. A., Slepneva I. A. Nucleic Acids Res., 1980, v. 8, p. 2499-2515.
2. Беляев Н. Д., Будкер В. Г., Максимова Т. Г., Наумова Л. П., Соколов А. В. Молекуляр. биология, 1982, № 16, с. 612-618.
3. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Молотковский Ю. Г. Препаративная биохимия липидов. М.: Наука, 1981, с. 25-66.
4. Deamer D., Bangham A. D. Biochem. et biophys. acta, 1976, v. 443, p. 629-634.
5. Будкер В. Г., Горохова О. В., Соколов А. В. Докл. АН СССР, 1984, т. 278, с. 479-482.
6. Damadian R. Biophys. J., 1971, v. 11, p. 739-760.
7. Drew H. R., Travers A. A. Nucleic Acids Res., 1985, v. 2, p. 4445-4467.

pages : 1