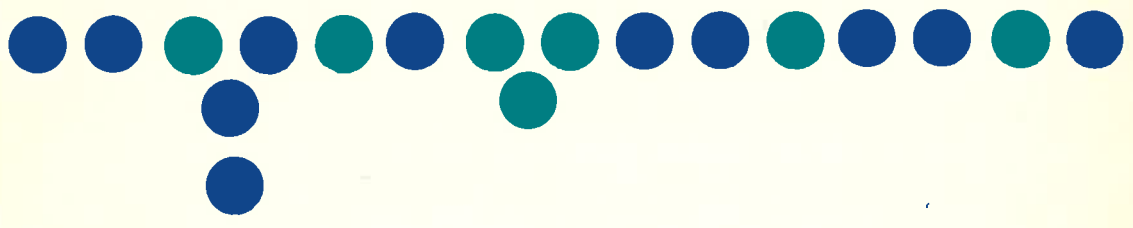




**Eigenschappen van ATP-afhankelijke desoxyribonucleasen  
uit *Micrococcus luteus* en *Escherichia coli***



**EIGENSCHAPPEN VAN  
ATP-AFHANKELIJKE  
DESOXYRIBONUCLEASEN UIT  
*MICROCOCCUS LUTEUS*  
EN  
*ESCHERICHIA COLI***

**PROEFSCHRIFT**

**TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR  
IN DE WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN  
AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN, OP GEZAG  
VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR. A. E. COHEN,  
HOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN,  
VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN  
DEKANEN TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG  
25 SEPTEMBER 1974 TE KLOKKE 16.15 UUR.**

**DOOR**

**BOB VAN DORP  
GEBOREN TE ROTTERDAM IN 1940**

**1974**

**DRUKKERIJ J. H. PASMANS, 'S-GRAVENHAGE**

**Promotor: Prof. Dr. Ir. A. Rörsch**

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd uitgevoerd onder leiding van Dr. P.H. Pouwels op het Medisch Biologisch Laboratorium te Rijswijk.

## STELLINGEN

1. De conclusie van Chu en Mazumder dat IF2 vrijkomt bij verdunnen van natieve ribosomen, wordt niet gestaafd door hun experimenten.

Chu, J. en Mazumder, R. (1974)  
F.E.B.S. Letters 40, 335-338

2. Bij het vergelijken van de mutatiefrekwentie in tetra- en octaploide cellijnen met die in diploide cellijnen van de Chinese hamster, houdt Harris ten onrechte geen rekening met het voorkomen van cellen met een afwijkende ploïdie in eerstgenoemde typen cellijnen.

Harris, M. (1971)  
J.Cell.Physiol. 78, 177-184

3. De conclusie van Springgate en Loeb, dat menselijke leukemie cellen mutageen DNA-polymerase bevatten, is onvoldoende gefundeerd.

Springgate, C.F. en Loeb, L.A. (1973)  
Proc.N.A.S. 70, 245-249

4. De kwantitatieve bepaling van de specifieke en aspecifieke *in vitro* transcriptie van het *E. coli trp* operon door Rose e.a. is aan bedenkingen onderhevig.

Rose, J.K., Squires, C.L., Yanofsky, C., Yang, H.-L.  
en Zubay, G. (1973)  
Nature N.B. 245, 133-137

5. De door thyminedimeren teweeggebrachte ontwindning van de DNA-helix is niet de oorzaak van de door Denhardt en Kato gesignaleerde verhoging van de sedimentatiecoëfficiënt van covalent gesloten DNA cirkels.

Denhardt, D.T. en Kato, A.C. (1973)  
J.Mol.Biol. 77, 479-494

6. De conclusie van Marcus, Modak en Cavalieri dat DNA-polymerasen meerdere actieve plaatsen bevatten die specifiek zijn voor verschillende matrijzen, is voorbarig.

Marcus, S.L., Modak, M.J. en Cavalieri, L.F. (1974)  
Biochem.Biophys.Res.Comm. 56, 516-521

7. Voor het bepalen van de mutagene werking van stoffen met behulp van microorganismen, is een betrouwbaar systeem om voorwaartse mutaties te meten noodzakelijk.

8. De voorstelling van Friedman en Smith betreffende het mechanisme van de afbraak van DNA door het ATP-afhankelijke DNAase, die een coöperatief effect van meerdere enzymmolekulen inhoudt, is waarschijnlijk niet juist.

Friedman, E.A. en Smith, H.O. (1973)  
Nature N.B. 241, 54-58  
Dit Proefschrift

9. Het reproduceren van gravures, etsen en pentekeningen met behulp van halftoon rasters komt de kwaliteit van de afbeelding niet ten goede.

B. van Dorp

Leiden, 25 september 1974

*Aan mijn ouders*

## INHOUD

AFKORTINGEN	6
HOOFDSTUK I : Inleiding	7
HOOFDSTUK II : Materialen en methoden	19
HOOFDSTUK III : Algemene eigenschappen van het ATP-afhankelijke DNAase uit <i>Micrococcus luteus</i>	43
HOOFDSTUK IV : Analyse van de reactieproducten	53
HOOFDSTUK V : De vorming van het DNA-enzym complex	71
HOOFDSTUK VI : De invloed van remmers	84
HOOFDSTUK VII : Vergelijkend onderzoek over exonuclease V	94
HOOFDSTUK VIII : Samenvatting en discussie	109
SUMMARY	116
LITTERATUUR	119
CURRICULUM VITAE	125
NAWOORD	127

## Afkortingen

ADP	adenosine-5-difosfaat
ATP	adenosine-5-trifosfaat
Brij 58	polyoxyethyleen 20 cethylether
BSA	runder serum albumine
cpm	tellen per minuut
DEAE-cellulose	diethylaminoethaan-cellulose
DNA	desoxyribonucleïnezuur
DNAase	desoxyribonuclease
DTT	dithioerythritol
dTTP	desoxythymidine-trifosfaat
E <sub>260</sub> , E <sub>280</sub>	extinctie bij 260 en 280 nm
EDTA	ethyleendiaminotetraazijnzuur
end	endonuclease I
gal	galactose
mCi	milliCuri
RF DNA	"replicative form" DNA
RNAase	ribonuclease
rpm	omwentelingen per minuut
rec	recombinatie
ror	resistentie tegen röntgen straling
sbc	suppressie van RecB en RecC
TEAE-cellulose	triethylaminoethyl-cellulose
T7 <sup>R</sup>	resistentie tegen bacteriofaag T7
tRNA	transfer ribonucleïnezuur
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethaan
UV	ultraviolet



## HOOFDSTUK I. INLEIDING

### 1. Algemeen

In 1964 werd voor het eerst door Tsuda en Strauss (1964) in extracten van *Micrococcus luteus* een DNAase activiteit aangetoond die afhankelijk is van de aanwezigheid van ATP. Soortgelijke DNAasen zijn sindsdien in een vijftal andere microorganismen aangetoond (Buttin en Wright, 1968, Friedman en Smith, 1972a, Chestukhin e.a. 1972, Winder en Coughlan, 1967 en Vovis en Buttin, 1970a). Behalve een aantal verschillen vertonen deze enzymen een grote overeenkomst in eigenschappen. Het meest kenmerkende van deze enzymen is dat ze tijdens de afbraak van DNA grote hoeveelheden ATP hydrolyseren.

Deze groep van enzymen kwam bijzonder in de belangstelling te staan toen bleek dat in sommige mutanten van *Escherichia coli* die gestoord waren in de genetische recombinatie en het herstel van stralingsschade, geen ATP-afhankelijke DNAase activiteit kon worden aangetoond (Barbour en Clark, 1970). Ook bij *Haemophilus influenza* (Greth en Chevallier, 1973), *Bacillus subtilis* (Chestukhin e.a., 1972 en Doly e.a. 1974) en *Diplococcus pneumoniae* (Vovis en Buttin, 1970b) werden recombinatie deficiënte stammen gevonden die het ATP-afhankelijke DNAase niet of in verminderde mate bevatten.

Op grond van deze gegevens werd door deze auteurs de hypothese opgesteld dat het ATP-afhankelijke DNAase een rol speelt bij de genetische recombinatie en het herstel van stralingsschade. Uit hoofde van de belangstelling die op het Medisch Biologisch Laboratorium bestaat voor genetische recombinatie en herstel van stralingsschade werd een onderzoek begonnen naar de rol van het ATP-afhankelijke DNAase in deze processen.

### 2. Doel van het onderzoek

Voor het ophelderen van de functie van de ATP-afhankelijke DNAasen bij de recombinatie en het herstel van schade in het DNA is meer kennis over de werking van de gezuiverde enzymen nodig. Daarom werd het ATP-

afhankelijke DNAase geïsoleerd uit een tweetal organismen, *M. luteus* en *E. coli* en het werkingsmechanisme van beide enzymen bestudeerd. Dat een groot deel van dit onderzoek is verricht aan het ATP-afhankelijke DNAase uit *M. luteus* vindt zijn oorzaak in het feit dat ten tijde dat dit onderzoek werd gestart dit enzym het best hanteerbare enzym uit deze groep was. Het werk aan het ATP-afhankelijke DNAase uit *E. coli* (exonuclease V) is verricht omdat gedurende de laatste jaren een groot aantal biochemische en genetische gegevens beschikbaar is gekomen over dit organisme. Dit in tegenstelling tot *M. luteus* waar vooral het terrein van de genetische experimenten nog vrijwel onontgonnen is. Hierdoor zal een interpretatie van het enzymologische werk *in vitro* voor de situatie *in vivo* eerder mogelijk zijn met het *E. coli* enzym dan met het *M. luteus* enzym.

Het werk aan het ATP-afhankelijke DNAase uit *E. coli* is er in het bijzonder op gericht geweest om de vraag te beantwoorden of de *rora* mutatie in *E. coli*, die heeft geleid tot een grotere gevoeligheid van het organisme voor röntgenstraling en waarvan men op genetische gronden kon vermoeden dat deze mutatie het ATP-afhankelijke DNAase betreft (Glickman e.a., 1971 en persoonlijke mededeling van Glickman), tevens heeft geleid tot een verandering van de enzymatische eigenschappen van het enzym.

### 3. Uitvoering van het onderzoek

De experimenten werden uitgevoerd met de gezuiverde ATP-afhankelijke DNAasen uit *M. luteus* en *E. coli* (wilde-type) en *E. coli rora*. De zuivering van de enzymen is beschreven in hoofdstuk II-7. In de hoofdstukken III, IV, V en VI zijn de experimenten met het enzym uit *M. luteus* beschreven.

De afbraak van verschillende goed gekarakteriseerde DNA substraten werd bestudeerd met behulp van o.a. centrifugatie technieken waardoor een indruk kon worden verkregen van de substraat specificiteit en enkele aspecten van het werkingsmechanisme van het enzym (hoofdstuk III). De produkten die gevormd worden in een vroege fase van de afbraak van T7 DNA werden geanalyseerd met behulp van chromatografie op Sephadex

G-200 kolommen (hoofdstuk IV). Nadere informatie met betrekking tot het mechanisme van de DNA afbraak is gezocht in een studie over de complexvorming tussen het DNA en het enzym en het effect van ATP op de complexvorming (hoofdstuk V). De vorming van dit complex met DNA van verschillende structuur werd onderzocht evenals de kwantitatieve aspecten van de complexvorming. Met behulp van hiermee verkregen gegevens konden ook enkele kinetische aspecten van de afbraak worden bestudeerd (hoofdstuk V). De werking van enkele remmers van het ATP-afhankelijke DNAase wordt in hoofdstuk VI beschreven. In hoofdstuk VII is het werk beschreven met het ATP-afhankelijke DNAase uit *E. coli* (het exonuclease V). Een aantal eigenschappen van het enzym geïsoleerd uit het wilde-type *E. coli* werd vergeleken met die van het enzym uit de *E. coli* RorA stam. In hoofdstuk VIII zijn de resultaten van het onderzoek samengevat en wordt besproken in hoeverre conclusies kunnen worden getrokken over de functie van het enzym in het recombinatieproces op grond van de eigenschappen *in vitro*.

#### 4. Litteratuuroverzicht

##### A. *Micrococcus luteus*

Het ATP-afhankelijke DNAase uit *M. luteus* breekt dubbelstrengig DNA af (Anai e.a., 1970a) maar circulair dubbelstrengig DNA wordt niet afgebroken (Hout e.a. 1970). Het enzym is dus een exonuclease. Enkelstrengig DNA wordt 25-40 maal langzamer afgebroken dan dubbelstrengig DNA (Anai e.a., 1970a en Van Dorp e.a. 1973). Het enzym is afhankelijk van de aanwezigheid van  $Mg^{2+}$  alhoewel het  $Mg^{2+}$  ook vervangen kan worden door  $Mn^{2+}$  (Anai e.a., 1970a). Zowel voor de activiteit op enkelstrengig als die op dubbelstrengig DNA is ATP vereist. Voor deze ATPase activiteit is de aanwezigheid van DNA vereist. Behalve ATP kunnen ook andere trifosfaten dienst doen als cofactor (Anai e.a., 1970b). De hoeveelheid ATP die wordt omgezet is ca. 3 molekulen ATP per breuk in het DNA (Anai e.a. 1970b). In afwezigheid van DNA katalyseert het enzym een uitwisseling van  $PO_4^{3-}$  tussen ADP en ATP (Anai en Takagi, 1971). Deze reactie verloopt sneller in aanwezigheid van  $Mn^{2+}$  dan van  $Mg^{2+}$ . Het enzym breekt DNA af tot 5'P oligonucleotiden met een gemiddelde lengte van 5,5 nu-

cleotiden. De produkten bestaan hoofdzakelijk uit di-,tri-,tetra- en pentanucleotiden (Anai e.a., 1970a). Anai e.a. (1970a) vonden, wanneer de reactieprodukten werden geanalyseerd door centrifugering op een suikergradient, dat behalve onafgebroken molekulen uitsluitend produkten aanwezig zijn met een zeer laag molekuulgewicht. Gedeeltelijk afgebroken DNA molekulen werden niet waargenomen. Op grond van deze proeven stelden Anai e.a. de hypothese op dat de DNA molekulen één voor één worden afgebroken: een DNA molekuul wordt helemaal afgebroken voordat het enzym aan een volgend DNA molekuul begint.

### *B. Escherichia coli*

Het uit *E. coli* geïsoleerde ATP-afhankelijke DNAase, het exonuclease V werd ontdekt door Buttin en Wright (1968). De zuivering en voorlopige karakterisering van het enzym zijn beschreven door Wright, Buttin en Hurwitz (1971), Oishi (1969) en Goldmark en Linn (1970 en 1972). Het is gebleken dat het enzym naast de ATP-afhankelijke exonuclease activiteit op dubbelstrengig DNA nog twee nuclease activiteiten heeft n.l. een ATP-afhankelijke exonuclease activiteit op enkelstrengig DNA en een endonuclease activiteit op enkelstrengig DNA die niet afhankelijk van ATP is maar wel door ATP wordt gestimuleerd (Goldmark en Linn, 1970 en 1972). Het ATP verbruik kan worden ontkoppeld van de DNAase activiteit door het enzym te laten werken op DNA waarvan de twee strengen covalent met elkaar zijn verbonden door de DNA oplossing in aanwezigheid van 4,5!8-trimethylpsoralen te belichten (Karu en Linn, 1972). Ontkoppeling van DNAase en ATPase activiteit werd ook gevonden met een DNA.RNA hybride als substraat. Evenals bij het enzym uit *M. luteus* worden DNA molekulen één voor één afgebroken tot oligonucleotiden. Door de omstandigheden van de reactie te veranderen werden condities gevonden waarbij de afbraakprodukten in een vroege fase van de afbraak bestonden uit zeer grote stukken van het DNA. Deze stukken DNA zijn dubbelstrengig maar hebben lange enkelstrengige uiteinden. Deze enkelstrengige einden kunnen zowel een 3'als een 5'einde hebben (Karu e.a., 1973).

### C. *Haemophilus influenzae*

Het ATP-afhankelijke DNAase uit *H. influenzae* werd gezuiverd en bestudeerd door Friedman en Smith (1972a). Het gezuiverde enzym breekt dubbelstrengig DNA tienmaal zo snel af als enkelstrengig DNA. Het DNA wordt eerst tot grote fragmenten afgebroken, die daarna verder worden afgebroken tot 5'P oligonucleotiden met een gemiddelde lengte van 5,9 nucleotiden.

Bij een lage ionensterkte (5-10 mM Tris-HCl en 10-50 mM NaCl) worden de grote afbraakprodukten opgehoopt. Het blijkt dat deze grote molekulen dubbelstrengig zijn, maar aan de einden zeer lange stukken enkelstrengige ketens hebben. Deze enkelstrengige ketens kunnen door exonuclease I worden afgebroken en hebben dus een vrij 3'OH einde (Friedman en Smith, 1972b en 1973).

Toch breekt ook dit enzym alleen lineair DNA af, zodat we het enzym een exonuclease zullen noemen. Het enzym verbruikt 40 ATP molekulen voor elke breuk die in het DNA wordt aangebracht (Smith en Friedman 1972).

### D. *Bacillus subtilis*

Het gezuiverde ATP-afhankelijke DNAase uit *B. subtilis* is bestudeerd door drie groepen onderzoekers: Chestukhin e.a. (1972) en Shemyakin e.a. (1973), Doly e.a. (1974) en Ohi en Sueoka (1973).

Het enzym breekt dubbelstrengig DNA exonucleolytisch af en wel 6-7 maal sneller dan enkelstrengig DNA. In tegenstelling tot de tot nu toe besproken enzymen en tot het ATP-afhankelijke DNAase uit *Mycobacterium smegmatis* is het enzym uit *B. subtilis* alleen actief in aanwezigheid van ATP of dATP. Andere trifosfaten kunnen deze functie niet overnemen. In dit opzicht lijkt het enzym op het enzym uit *D. pneumoniae*. Door Ohi en Sueoka (1973) werd gevonden, dat de exonuclease activiteit met gedeeltelijk gezuiverde enzympreparaten op enkelstrengig DNA niet afhankelijk is van de aanwezigheid van ATP. In meer gezuiverde enzympreparaten ontbrak de activiteit op enkelstrengig DNA echter volledig. Het gezuiverde enzym vormt een stabiel complex met DNA. Dit complex is veel stabiel in aanwezigheid dan in afwezigheid van ATP. De gebonden DNA molekulen worden eerder afgebroken dan de niet gebonden molekulen.

Dit wijst er op dat de complexvorming een stap is in de afbraakreactie (Shemyakin e.a., 1973). Het enzym wordt gestabiliseerd door DNA maar is in aanwezigheid van ATP minder stabiel (Shemyakin e.a., 1973).

#### E. *Mycobacterium smegmatis*

Het ATP-afhankelijke DNAase uit *M. smegmatis*, dat bestudeerd wordt door een groep onderzoekers in Dublin (Winder en Coughlan, 1967) breekt bij voorkeur dubbelstrengig DNA af (7 maal sneller dan enkelstrengig DNA) en is volledig afhankelijk van de aanwezigheid van een nucleoside trifosfaat en  $Mg^{2+}$ . DNA molekulen worden één voor één afgebroken en het enzym breekt het DNA exonucleolytisch af. De produkten van de reactie zijn oligonucleotiden (Winder en Lavin, 1971).

Door Winder en Sastry (1971) is de vorming van een complex tussen DNA en enzym aangetoond met behulp van nitrocellulose filters. Voor de vorming van dit complex is ATP nodig.

#### F. *Diplococcus pneumoniae*

Het ATP-afhankelijke DNAase uit *D. pneumoniae* is gezuiverd en bestudeerd door Vovis en Buttin (1970a en b).

Evenals bij de hierboven besproken enzymen heeft het enzym uit *D. pneumoniae* ATP of dATP nodig en  $Mg^{2+}$  of  $Mn^{2+}$ . Ook het *D. pneumoniae* enzym breekt de DNA molekulen één voor één af, beginnend aan de uiteinden. Het enzym heeft met enkelstrengig DNA een geringere activiteit dan met dubbelstrengig DNA als substraat.

#### G. Overeenkomsten en verschillen tussen de enzymen

De hier besproken ATP-afhankelijke DNAasen vertonen naast verschillen ook een aantal duidelijke overeenkomsten. De belangrijkste overeenkomsten en verschillen worden nog eens samengevat.

Al deze enzymen breken dubbelstrengige DNA molekulen één voor één af waarbij grote hoeveelheden ATP in ADP en  $PO_4^{3-}$  worden omgezet. De hoeveelheid ATP die per breuk wordt verbruikt is variabel en kan ook voor hetzelfde enzym onder verschillende omstandigheden verschillen.

De afbraak van enkelstrengig DNA is in de meeste gevallen veel lang-

zamer dan de afbraak van dubbelstrengig DNA. Het enzym uit *E. coli* breekt echter enkelstrengig en dubbelstrengig DNA met vergelijkbare snelheid af. De endonuclease activiteit van het enzym uit *E. coli* is bij de andere enzymen niet waargenomen. Ook zijn er verschillen in het vermogen om andere trifosfaten dan ATP en dATP te gebruiken. De enzymen uit *B. subtilus* en *D. pneumoniae* zijn vrijwel niet actief met andere trifosfaten dan deze twee, de andere enzymen kunnen wel andere trifosfaten gebruiken.

## H. Recombinatie

Recombinatie is door Clark (1971) gedefinieerd als een reeks gebeurtenissen waarbij nucleïnezuren met elkaar reageren met als resultaat een verandering in de koppeling van genen. Recombinatie van RNA zal buiten beschouwing worden gelaten. Er zal een beknopte samenvatting worden gegeven van het onderzoek naar het mechanisme van de recombinatie van DNA molekulen. Deze gegevens zijn nodig voor een beschouwing van de functie van het ATP-afhankelijke DNAase in het recombinatie proces. Hierbij zal hoofdzakelijk de recombinatie in *E. coli* besproken worden daar bekend is dat de recombinatie in dit organisme verloopt via een mechanisme waarbij dit enzym betrokken is.

### a. Recombinatie in *E. coli*

Recombinatie in *E. coli* kan worden waargenomen wanneer de cel van een deel van het chromosoom twee kopiën bevat en wanneer merkers aanwezig zijn om het ontstaan van een recombinant molecuul te kunnen detecteren. Een extra copie van het chromosoom of van een deel ervan kan in de cel worden gebracht door conjugatie of door middel van een transducerende faag. Levensvatbare recombiananten worden gevormd na recombinatie van dit DNA met het aanwezige chromosoom.

De integratie van het donor DNA in het DNA van de acceptor stam na conjugatie is bestudeerd door Oppenheim en Riley (1966 en 1967), Cooper e.a. (1971) en Paul en Riley (1974). In deze experimenten werden donor en/of acceptor DNA gemerkt met radioactieve en dichtheids merkers en werd de vorming van hybride molekulen bestudeerd. Vastgesteld is

dat bij conjugatie slechts één streng van het donor DNA wordt overgebracht en dat synthese van DNA zowel in de donor- als in de acceptorcel nodig is (Bresler e.a. 1973).

Het blijkt dat eerst molekulen gevormd worden waarin donor- en acceptor-DNA gebonden zijn door waterstofbruggen. Deze zullen gekoppelde molekulen worden genoemd. Hierna worden de twee delen van het DNA molekuul door covalente bindingen verbonden. Er ontstaan dan gerecombineerde molekulen. De vorming van gekoppelde molekulen is in een aantal gevallen gestoord. Volgens Paul en Riley (1974) worden in recombinatie deficiënte stammen (RecB en RecC) slechts 20% van de normale hoeveelheid gekoppelde molekulen gevormd. In RecA stammen is de vorming van gekoppelde molekulen normaal. De producten van de *recB* en *recC* genen vervullen dus een functie in een beginfase van het recombinatieproces. Deze experimenten zijn naar het schijnt in tegenspraak met die van Birge en Low (1974) die de vorming van een enzym ( $\beta$ -galactosidase) vinden na kruisen van twee stammen met een verschillende mutatie in het gen voor dit enzym, ook als de acceptorstam RecB of RecC is. Er zou dus in de RecB en RecC stammen een gedeeltelijk gerecombineerd molekuul zijn gevormd dat als matrijs voor het RNA-polymerase dienst kan doen, alhoewel geen levensvatbare recombinanten worden gevormd. In een RecA stam is dit niet het geval. De vorming van gekoppelde molekulen is ook gestoord wanneer de acceptorstam een deletie bevat op de plaats overeenkomende met het eerst binnenkomende stuk van het donor DNA (Paul en Riley, 1974). Het blijkt dat in zulke gevallen de recombinatiefrekwentie ook slechts 1% bedraagt van die van het wilde-type bacterie (Curtis e.a., 1968).

Dit wijst er op dat het uiteinde van het DNA molekuul dat de acceptorcel binnenkomt belangrijk is voor het tot stand komen van het gekoppelde molekuul. Opvallend is dat het aantal recombinatiegebeurtenissen in RecB en RecC stammen voor het eerst binnenkomend DNA veel kleiner is dan voor later binnenkomend DNA vergeleken met de situatie in het wilde-type (De Haan e.a., 1972).

Voor een aantal vormen van recombinatie blijkt dat mutaties in de genen *recB* en *recC* slechts een geringe invloed hebben op de recombinatiefrekwentie. Zo vonden Hall en Howard-Flanders (1972 en 1973), die recombinatie tussen chromosoom en episoom bestudeerden, slechts een gering effect



van genoemde mutaties op de recombinatiefrekwentie. Evenzo werd slechts een gering effect van mutaties in *recB* en *recC* genen waargenomen bij chromosoom mobilisaties waarbij slechts één overkruising nodig is (Wilkins, 1969). Het lijkt daarom de vraag of de produkten van *recB* en *recC* genen wel bij dit recombinatieproces betrokken zijn. Het is bekend dat *E. coli* nog een tweede recombinatiemechanisme bevat (Horii en Clark, 1973). Mogelijk is dit mechanisme betrokken bij de recombinatie van episomen en chromosomen..

In *RecB* en *RecC* stammen wordt het vermogen tot recombinatie hersteld door het invoeren van een tweede mutatie. In extracten van deze *SbcB* mutanten (*sbc*=suppressie van B en C) ontbreekt het exonuclease I (Kushner e.a., 1972). Een andere suppressor van de *recB* en *recC* mutaties, die leidt tot een normaal niveau van recombinatie is de *sbcA* mutatie die een ATP-onafhankelijk DNAase produceert (Barbour e.a., 1979). Aangenomen wordt dat de bacterie door de *sbcB* mutatie wordt gedwongen over te schakelen op het tweede recombinatiemechanisme (Horii en Clark 1973).

Over verschillen tussen de twee recombinatiemechanismen is nog niets bekend. Wanneer echter de reeds genoemde recombinatie tussen episoom en chromosoom (Hall en Howard-Flanders, 1972 en 1973 en Wilkins, 1969) plaats vindt via het tweede mechanisme, dan zou een verschil misschien kunnen liggen in het feit dat het hier gaat om recombinatie tussen twee circulaire DNA molekulen en er dus geen einden aanwezig zijn, die, gezien de proeven van De Haan e.a. 1972) en Paul en Riley, 1974) belangrijk zijn voor de via de *RecB* en *RecC* produkten verlopende recombinatie. Een andere mogelijkheid is dat het verschil tussen de recombinatie van chromosomen en de recombinatie van een chromosoom en een episoom ligt dat na integratie van een lineair DNA molekuul (na conjugatie of transductie) een overblijvend stuk DNA moet worden opgeruimd, wat bij integratie van de episomen niet het geval is.

#### b. De rol van het ATP-afhankelijke DNAase in het recombinatie proces

Barbour en Clark (1970) hebben aangetoond dat in *E. coli* *RecB* en *RecC* stammen het ATP-afhankelijke DNAase niet aanwezig is. Ook voor andere organismen is aangetoond dat in sommige recombinatie deficiënte stammen

dit enzym ontbreekt. Dit is voor *D. pneumoniae* aangetoond door Vovis en Buttin (1970b), voor *B. subtilus* door Chestukhin e.a. (1972) en Doly e.a. (1974) en voor *H. influenzae* door Greth en Chevallier (1973). De conclusie uit deze waarnemingen is dat het ATP-afhankelijke DNAase een functie heeft bij de recombinatie. Ook zijn de stammen die het enzym missen gevoeliger voor straling dan het wilde-type bacterie. Opmerkelijk is ook dat de levensvatbaarheid van *E. coli* RecB en RecC stammen ook onder normale omstandigheden verminderd is (Capaldo en Barbour, 1973). In combinatie met de *polA* mutatie zijn *recB* en *recC* mutaties zelfs lethaal (Monk en Kinross, 1972).

### c. Recombinatieherstel

Het is gebleken dat RecB en RecC stammen van *E. coli* gevoeliger zijn voor röntgenstraling en bestraling met ultraviolette straling dan wilde-type stammen. Dit wijst er op dat de *recB* en *recC* genen zijn betrokken bij herstel van de schade. Dit herstel is verschillend van het excisieherstel en vindt plaats na replicatie van het chromosoom (Rupp en Howard-Flanders, 1968). Aangetoond is dat bij replicatie van beschadigd DNA tegenover thymine dimeren, die ontstaan bij bestralen met ultraviolette straling, geen complementaire keten wordt gesynthetiseerd. Er ontstaat dus DNA met enkelstrengige stukken, die ongeveer 500-1000 nucleotiden groot zijn (Iyer en Rupp, 1971).

Verondersteld wordt dat door recombinatie tussen de enkelstrengige stukken in de twee "dochterstrengen", een onbeschadigd chromosoom gevormd kan worden. In overeenstemming hiermee zijn de proeven van Howard-Flanders en Lin (1973), die hebben aangetoond dat de recombinatie sterk gestimuleerd wordt (50x) door bestraling van de cel met ultraviolette straling van 254 nm.

### d. Recombinatiemodellen

Er is een groot aantal modellen voor het mechanisme van de recombinatie opgesteld. De meeste van deze modellen zijn opgesteld om de resultaten van genetische experimenten bij gisten en schimmels te verklaren (Sobel, 1972 en Holliday, 1964). Andere modellen zijn gemaakt aan de hand van

proeven over recombinatie van bacteriofagen (Boon en Zinder, 1969 en 1971; Broker en Lehman, 1971 en Broker, 1973). De oudere modellen geven alleen aan hoe de DNA molekulen met elkaar koppelen zonder in te gaan op de vraag welke enzymen bij deze reacties zijn betrokken. In de meeste modellen missen we een mechanisme voor de vorming van een eerste koppeling tussen de DNA molekulen; hiertoe moet dus in het dubbelstrengige DNA molekuul een complementaire base volgorde worden gevonden. Hiervoor is waarschijnlijk een gedeeltelijke ontwinding van het dubbelstrengige DNA nodig, waarbij ontwindingseiwitten een belangrijke rol zullen spelen (Tomizawa e.a., 1966 en Broker, 1973). Er zijn slechts enkele modellen waarin het ATP-afhankelijke DNAase een functie kan vervullen n.l. het model dat Boon en Zinder opstelden aan de hand van experimenten met de bacteriofaag f1, waarvan het DNA circulair is en het model van Broker en Lehman (1971). De recombinatie van bacteriofaag f1 verloopt

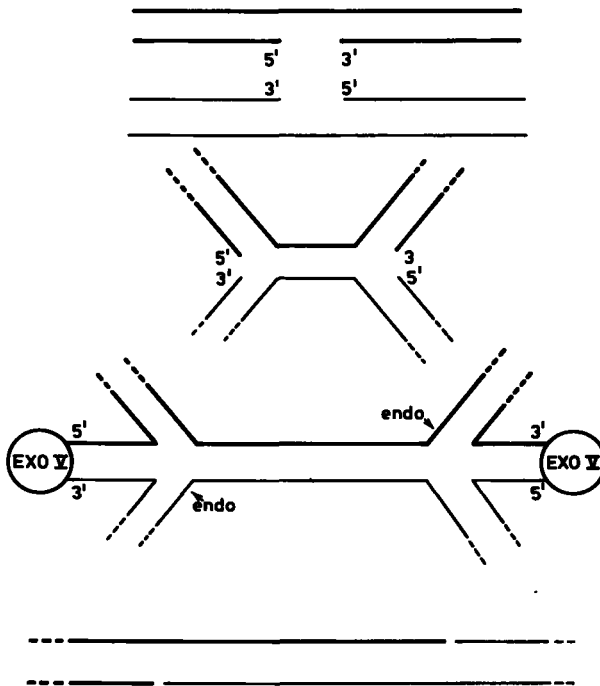


Fig.I-1. Recombinatiemodel volgens Broker en Lehman (1971).

asymmetrisch; infectie van een cel met twee mutant fagen levert een gemengde burst van wilde-type faag en één van de ouders op en in het model van Boon en Zinder wordt aangenomen dat er tijdens de recombinatie DNA synthese plaats vindt en dat ook een lineair stuk dubbelstrengig DNA overblijft. Dit stuk DNA zal moeten worden afgebroken, hetgeen door het ATP-afhankelijke DNAase kan gebeuren. In het model van Broker en Lehman worden in de twee recombinerende DNA molekulen door exonucleases stukken enkelstrengig DNA gevormd. Op deze plaatsen koppelen de twee DNA molekulen. Er ontstaat dan een H-vormige structuur (zie figuur I-1). Het dwarsstreepje van de H is het hybride stuk. Dit hybride stuk kan nu vergroot worden doordat de twee strengen die niet in het hybride stuk zijn gepaard, worden ontwonden en samen paren. Tegelijk kunnen deze twee ketens alsnog worden afgebroken door exonucleasen, die de ene keten vanaf het 3'einde en de andere vanaf het 5'einde afbreken. Broker en Lehman veronderstellen dat deze afbraak door het ATP-afhankelijke DNAase kan gebeuren. Na vorming van een voldoende lang hybride stuk DNA worden twee ketens van de H-structuur door endonucleases afgeknipt, waardoor een lineair molecuul ontstaat dat na opvullen van de eventueel aanwezige stukken enkelstrengig DNA door polymerase en sluiten van de ketens door ligase een gerecombineerd molecuul oplevert.

## HOOFDSTUK II. MATERIALEN EN METHODEN

## 1. Materialen

## A. BACTERIE EN BACTERIOFAAG STAMMEN

De bij dit onderzoek gebruikte bacterie en bacteriofaag stammen zijn met hun eigenschappen in tabel II-1 bijeengebracht.

Tabel II-1. Bacterie en bacteriofaag stammen

stam	eigenschappen	herkomst
<i>Escherichia coli</i> C <sub>0</sub>	wilde-type	Sinsheimer (1960)
" B	wilde-type	Lab.v.Microbiologie, Delft
" KMBL 1749	T7 <sup>R</sup> ,galT,endA	Medisch Biologisch Lab., Rijswijk
" KMBL 1750	T7 <sup>R</sup> ,rorA,gatT,endA	Medisch Biologisch Lab., Rijswijk
<i>Micrococcus luteus</i> ML 1	wilde-type	Lab.v.Microbiologie, Delft
T7		Studier (1972)
ØX 174		Sinsheimer (1960)
λ vir		Glover (Hubacek en Glover 1970)

## B. MEDIA

De samenstelling van de media die werden gebruikt is in de tabel II-2 weergegeven.

## C. CHEMICALIEN

In tabel II-3 is de herkomst van de gebruikte chemicalien vermeld.

## D. APPARATUUR

De voor de zuivering van het exonuclease V benodigde *E. coli* werd gekweekt in een fermentor van 25 l van L.H. Engineering, Engeland.

De cellen werden verzameld door centrifugeren in de Beckman J 21 centrifuge in de JCF-Z zonal rotor.

Tabel II-2. Media

	"Nutrient Broth"	L bouillon	X Medium	3XD
NH <sub>4</sub> Cl	g/l -	-	1	1
NaCl	g/l 5	10	2	-
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	g/l -	-	0,61	0,61
KCl	g/l -	-	0,5	-
Tris	g/l -	-	6	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	g/l -	-	-	2,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	g/l -	-	-	0,9
gelatine	g/l -	-	0,01	0,01
glycerol	g/l -	-	30	30
Casamino acids (Difco)	g/l -	-	-	15
gedefosforileerde Casamino acids (10% opl)	ml/l -	-	150	-
Trypton (Difco)	g/l -	10	-	-
Gist extract (Difco)	g/l 5	5	-	-
Nutrient Broth (Difco)	g/l 8	-	-	-
na steriliseren toevoegen				
CaCl <sub>2</sub> (1M)	ml/l		-	0,3
kaliumfosfaat buffer (0,01 M, pH 7,1)	ml/l		16	-

Voor gradientcentrifugatie werd gebruik gemaakt van Beckman L2 en L3 en International B 60 centrifuges.

Voor het concentreren van het enzym werd gebruik gemaakt van Amicon ultrafiltratie apparatuur met XM 50 of PM 10 filters.

Nitrocellulose filters waren Sartorius SM 11307 filters.

Radioactiviteit werd gemeten met behulp van Nuclear Chicago telapparaat: een Geiger-Mueller teller met automatische monsterwisselaar en Mark I en Mark II scintillatie tellers

Tabel II-3. Chemicaliën

Chemicaliën	leverancier
actinomycine D	14
agarose	2
alkalische fosfatase	3
$\alpha$ -amylase poeder	15
ATP (adenosine-trifosfaat)	3
[ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP	11
bengaals rose	6
Brij 58 (polyoxyethyleen 20 cetyloether)	15
DEAE-cellulose DE 52	18
DEAE-cellulose papier DE81	18
desoxynucleoside-trifosfaten (van adenine, cytosine, guanine en thymine)	13
[ $^3\text{H}$ ]dTTP (desoxythymidine-trifosfaat)	11
natrum-dextransulfaat 2000	9
dextran T 500	9
DNA (uit kalf thymus)	4
DNAase 1 (uit runderpancreas)	16
[ $^{32}\text{P}$ ]fosforzuur	11
heparine	17
katalase	15
lysozym	8
$\beta$ - $\gamma$ methyleen ATP	7
$\beta$ -mercaptoethanol	5
polyethyleenglycol 6000	12
tRNA	3
runder serum albumine	10 en 8
Sephadex G-75 en G-200	9
suiker	2
TEAE-cellulose	14
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethaan)	1

1. Baker Chemicals, Nederland
2. BDH Chemicals, Engeland
3. Boehringer Mannheim, W. Duitsland
4. E.G.A. Chemie, W.Duitsland
5. Fluka A.G. Buchs S.G., Zwitserland
6. Gurr, Engeland
7. Miles, Verenigde Staten
8. Nutritional Biochemical Corporation, Verenigde Staten
9. Pharmacia Fine Chemicals, Zweden
10. Poviet Producten, Nederland
11. Radiochemical Centre Amersham, Engeland
12. Shell, Nederland
13. Schwartz/Mann, Verenigde Staten
14. Serva, W.Duitsland
15. Sigma Chemical Company, Verenigde Staten
16. Schuchardt München, W.Duitsland
17. Vitrum, Zweden
18. Whatman, Biochemicals, Engeland

Andere chemicaliën waren p.a. produkten van Merck, W.Duitsland.

## METHODEN

## 2. Het kweken van bacteriofagen

Radioactief gemerkt DNA van verschillende bacteriofagen werd gebruikt als substraat voor het ATP-afhankelijke DNAase. Deze bacteriofagen werden gekweekt in groeiapparaten (fig. II-1) van verschillende afmetingen volgens Brenner.

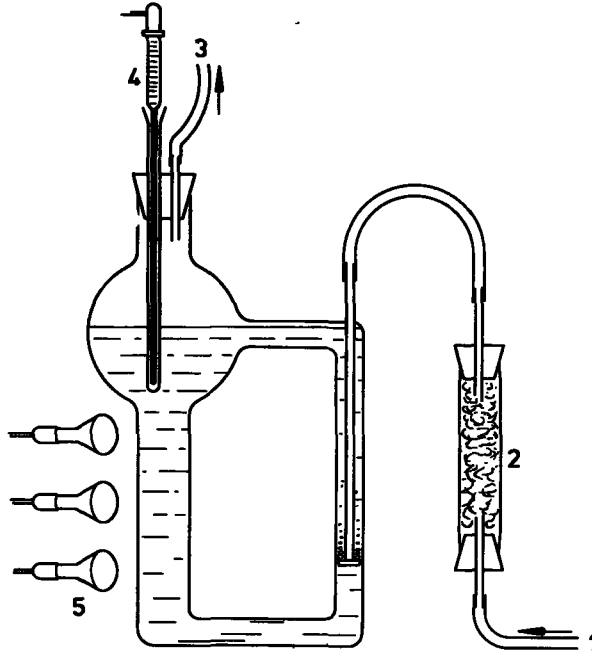


Fig.II-1. Kweekapparaat voor de bereiding van faaglysat. 1. Luchttoevoer. 2. Met watten gevuld luchtfilter. 3. Afvoer van de luchtstroom. 4. Contactthermometer, in een met water gevulde buis, die het in- en uitschakelen regelt van 5. Verwarmingslampen (Infraphil 150 W; Philips). Voor een apparaat met een capaciteit van 5 l zijn vijf lampen voldoende om de temperatuur op 37°C te handhaven.

## A. NIET RADIOACTIEVE BACTERIOFAAG

Bacteriofaag zonder radioactieve label werd steeds in hoeveelheden van 5 liter gekweekt.



### a. T7 bacteriofaag

De gastheer van deze bacteriofaag is *E. coli* B. Deze bacterie werd in L bouillon bij 37°C gekweekt. Bij een bacterieconcentratie van  $5 \cdot 10^8$  cellen per ml werden de bacteriën geïnfecteerd met 0.1 faag per bacterie, waarna nog 1,5 uur onder zo krachtig mogelijk aëren werd geïncubeerd. Na deze periode zijn vrijwel alle bacteriën gelyseerd. Hierna werd NaCl aan het kweekmedium toegevoegd tot een concentratie van 1 M waardoor de faag wordt gestabiliseerd. De celresten werden verwijderd door de suspensie gedurende 30 min bij 3000 rpm te centrifugeren. De opbrengst aan levende T7 faag in de bovenstaande vloeistof werd bepaald door titratie en bedroeg  $2 \cdot 10^{10} - 10^{11}$  per ml.

### b. λvir. bacteriofaag

λvir werd gekweekt met *E. coli* Co als gastheer. Aan het medium (L bouillon) werd 0,01 M  $MgSO_4$  toegevoegd voor adsorptie van de faag aan de bacterie. Na infectie (bij een bacterieconcentratie van  $5 \cdot 10^8$ /ml.) met 0,1 faag per bacterie werd onder krachtig aëren 2,5 uur geïncubeerd. De celresten werden door centrifugeren verwijderd. De opbrengst aan faag was  $2 \cdot 10^{10}$  faag per ml.

### c. ØX174 bacteriofaag

ØX174 werd gekweekt met *E. coli* Co als gastheer in 3XD of TKB medium waaraan 0,2 ml  $CaCl_2$  was toegevoegd voor adsorptie van de faag aan de bacterie. Bij een bacterie concentratie van  $5 \cdot 10^8$  per ml. werden de cellen geïnfecteerd met 0,1 faag per bacterie. Hierna werd nog 1,5 uur geïncubeerd tot dat vrijwel alle bacteriën gelyseerd waren. Onder deze omstandigheden blijven de fagen voor een groot gedeelte geadsorbeerd aan de celresten en kunnen gemakkelijk geconcentreerd worden door de suspensie gedurende 20 min te centrifugeren bij 8000 rpm. Het neerslag werd opgenomen in boraat buffer (pH 9,5) (0,05 M) met EDTA, 15 min geïncubeerd bij 37°C met 0,1 mg/ml lysozym om de fagen los te maken van de celresten en met 2 mg DNAase en 2 mg RNAase om de viscositeit te verlagen. Hierna konden de celresten worden verwijderd terwijl de faag in oplossing bleef. De opbrengst was  $5.8 \cdot 10^{10}$  per ml kweekmedium.

## B. HET KWEKEN VAN RADIOACTIEVE BACTERIOFAAG

Voor de bereiding van [ $^{32}\text{P}$ ] faag werd de gastheer steeds in X medium gekweekt in hoeveelheden van 0,5 l.  $^{32}\text{P}$  werd toegevoegd als anorganisch fosfaat, na een voorincubatie met katalase in X medium om eventuele peroxydes te verwijderen. Voor het overige gedeelte werd dezelfde procedure gevolgd als voor de bereiding van niet-radioactieve faag.

### a. T7 bacteriofaag

Bij een celconcentratie van  $10^8/\text{ml}$  werd 5 mCi  $^{32}\text{P}$  toegevoegd aan de cultuur van *E. coli* B. De infectie geschiedt bij  $5 \cdot 10^8$  cellen per ml met 5 fagen per bacterie. 30 min na infectie waren de cellen gelyseerd en werden de celresten verwijderd (na toevoegen van NaCl). De opbrengst was  $4 \cdot 10^{10} - 10^{11}$  faag/ml kweekmedium.

### b. $\lambda$ vir bacteriofaag

Daar de adsorptie van  $\lambda$  faag aan de bacterie langzaam verloopt werd de adsorptie uitgevoerd in adsorptiebuffer. Hiertoe werden de cellen na gekweekt te zijn tot  $5 \cdot 10^8/\text{ml}$  in 0,5 l X medium verzameld door centrifugeren, en gesuspendeerd in 50 ml 0,01 M  $\text{MgSO}_4$  en vervolgens met 5 fagen per cel geïnfecteerd. Na een uur incuberen bij  $37^\circ\text{C}$  werden 450 ml X medium en 5 mCi  $^{32}\text{P}$  toegevoegd en werden de bacteriën gedurende nog een uur gekweekt bij  $37^\circ\text{C}$ . Na lysis van de bacteriën werden de celresten verwijderd zoals voor de niet-radioactieve faag werd beschreven. De opbrengst was  $2,4 \cdot 10^{10}$  faag per ml kweekmedium.

### c. $\phi$ X174 bacteriofaag

Tegelijk met de infectie van de cellen (bij  $5 \cdot 10^8/\text{ml}$ ) met 5 fagen per bacterie werd 5 mCi  $^{32}\text{P}$  toegevoegd. Na 45 min incuberen werden de celresten met de fagen verzameld door centrifugeren. De opbrengst was  $3,5 \cdot 10^{10}/\text{ml}$ .

### 3. De zuivering van de bacteriofagen

Voor het zuiveren van de verschillende bacteriofagen werden steeds dezelfde technieken toegepast. In tabel II-4 zijn een aantal gegevens samengevat.

Tabel II-4. Gegevens betreffende de zuivering van fagen.

Faag	Buffer	% polyethyleenglycol nodig voor het neerslaan (in 0,5-2,0 M NaCl)	Tijd centrifugeren bij 35000 rpm in uren
ØX174	0,05 M Natriumtetraboraat (pH 9,5)	10	2
λ	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM MgSO <sub>4</sub>	10	1
T7	1 M NaCl	6	1

#### A. NEERSLAAN VAN DE FAAG MET POLYETHYLEENGLYCOL

Deze methode werd gebruikt om de niet-radioactieve faag uit het grote volume van het kweekmedium te concentreren. Bij een NaCl concentratie van 0,5 - 2,0 M werd polyethyleenglycol (tabel II-4) in de faagsuspensie opgelost bij 4°C. Het neerslag dat ontstond kon na enkele uren worden verzameld door 30 min centrifugeren bij 8000 rpm.

#### B. AFWISSELEND BIJ HOOG EN LAAG TOERENTAL CENTRIFUGEREN

De faag werd verder geconcentreerd door centrifugeren van de suspensie bij 35000 rpm (tabel II-4). Het faagsediment werd gesuspendeerd in een voor de faag geschikte buffer (tabel II-4), waarna een verontreiniging van de suspensie met materiaal van groter molekuulgewicht verwijderd werd door centrifugeren bij laag toerental (5 min bij 5000 rpm).

#### C. CENTRIFUGEREN DOOR EEN SUIKEROPLOSSING

Om de hoeveelheid zuuroplosbaar materiaal in een faagpreparaat zo laag mogelijk te maken werd de faagsuspensie op 25 ml van een 15% suikeroplossing gebracht en in de SW 27 rotor tot een sediment gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof werd met een pipet voorzichtig verwijderd en de faag werd weer in buffer gesuspendeerd.

#### 4. Extractie van het DNA uit de bacteriofagen

Het DNA werd uit de faag geïsoleerd door de faagsuspensie tweemaal te schudden met fenol die met buffer (0,01 M Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,05 M NaCl) was verzadigd.

De fenolfases werden gezamenlijk nogmaals met buffer geëxtraheerd, waarna de waterfase waarin zich het DNA bevond minstens 48 uur werd gedialyseerd tegen 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,05 M NaCl, 1 mM EDTA. Daarbij werd de buffer enkele malen verversd.

#### 5. Omstandigheden van de enzymincubaties

##### A. HET ATP-AFHANKELIJKE DNAase UIT *M. LUTEUS* en *E. COLI*

###### a. Bepaling van de nuclease activiteit

Incubaties met deze enzymen werden uitgevoerd in 0,4 ml van een standaard incubatiemengsel dat de volgende componenten bevatte: 20  $\mu$ molen Tris-HCl (pH 9.0), 10  $\mu$ molen  $MgSO_4$ , 0,4  $\mu$ mol ATP, 2  $\mu$ g T7 [ $^{32}P$ ] DNA en enzym (verduningen van het enzym werden gemaakt in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7,5) 0,01 M  $MgSO_4$ , 1 mM  $NaN_3$  en 68  $\mu$ g/ml BSA). Voor een bepaling van de enzymactiviteit werd de hoeveelheid [ $^{32}P$ ] gemeten die zuuroplosbaar werd gemaakt tijdens een incubatie van 30 min bij 30°C met 0,1 tot 1,0 eenheid (zie II-6) van het enzym. De reactie werd gestopt door het toevoegen van 0,2 ml BSA (1,25 mg/ml) en 0,2 ml 6% perchloorzuur. Na 20 minuten koelen in ijs werd het daarbij gevormde neerslag verwijderd door centrifugeren. Van de bovenstaande vloeistof werd een monster van 0,5 ml op een telbakje gebracht en na drogen werd de radioactiviteit op het telbakje bepaald. Afwijkingen van deze procedure worden vermeld bij de experimenten. Indien verdere analyse van het DNA nodig was, werd de reactie gestopt door toevoegen van 0,1 ml 0,5 M EDTA (pH 7,5).

###### b. Bepaling van het ATP verbruik

Het ATP verbruik tijdens de afbraak van DNA met het ATP-afhankelijke DNAase werd gemeten als de hoeveelheid [ $^{32}P$ ] fosfaat die uit [ $\gamma^{32}P$ ]ATP

werd gevormd tijdens de reactie, volgens de methode van Furlong (1967). Per test werden 100000 cpm [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP toegevoegd; de verdere samenstelling van het reactiemengsel is die van het standaard incubatiemengsel. Na incubatie werd de reactie op de normale manier gestopt met BSA en perchloorzuur. Het neerslag werd verwijderd en in 0,5 ml van de bovenstaande vloeistof werd het [ $^{32}\text{P}$ ] fosfaat bepaald na toevoegen van 10  $\mu\text{l}$  1 mM drager  $\text{H}_3\text{PO}_4$  met 0,25 ml 2,5% Ammoniummolybdaat in 1,2 N HCl en 0,2 ml n-heptanol. Dit mengsel werd 1 min geschud. De twee fasen werden gescheiden door kort centrifugeren en de radioactiviteit van 0,1 ml van de heptanol werd na verdunnen in 10 ml alcohol bepaald door Cerenkov telling.

#### B. EXONUCLEASE III UIT *E. COLI*

Het reactiemengsel voor incubaties met exonuclease III bevatte in 0,35 ml 6,6  $\mu\text{mol}$  Tris-HCl (pH 8,0), 0,25  $\mu\text{mol}$   $\text{MgCl}_2$  0,05  $\mu\text{mol}$   $\beta$ -mercaptoethanol, [ $^{32}\text{P}$ ]DNA en enzym (Richardson e.a., 1964b). Dit mengsel werd bij 37°C geïncubeerd. Voor de bepaling van het enzym werd de hoeveelheid DNA, die zuuroplosbaar gemaakt was, bepaald van een incubatie met 2  $\mu\text{g}$  DNA gedurende 30 min.

Afwijkende omstandigheden worden bij de experimenten opgegeven.

#### C. DNA-POLYMERASE EN T4 DNA-POLYMERASE UIT *E. COLI*

Incubaties met deze enzymen werden uitgevoerd volgens het voorschrift van Richardson e.a. (1964a) of Heyneker e.a. (1973). Het incubatiemengsel van 0,3 ml bevatte 21  $\mu\text{mol}$  glycine-KOH buffer (pH 9,2), 1,8  $\mu\text{mol}$   $\text{MgCl}_2$ , 0,3  $\mu\text{mol}$  DTT, 5,1 nmolen van elk van de vier desoxyribonucleoside-trifosfaten (het dTTP was gemerkt met  $^3\text{H}$ ; 500 mCi per mmol) en 40 nmolen DNA.

Voor een bepaling van het enzym werd de hoeveelheid  $^3\text{H}$  gemeten die in zuurprecipiteerbaar DNA werd ingebouwd. Na neerslaan met trichloorazijnzuur in aanwezigheid van drager DNA werd het neerslag op een glasfilter verzameld en na wassen en drogen werd de radioactiviteit geteld in de scintillatieteller.

Eventuele wijzigingen in de omstandigheden worden bij de proeven vermeld.

#### D. EXONUCLEASE I UIT *E. COLI*

Incubaties met dit enzym werden uitgevoerd volgens de methode van Lehman en Nussbaum (1964). Het reactiemengsel van 0,3 ml bevatte: 20  $\mu$ molen glycine-NaOH buffer (pH 9,5), 2  $\mu$ molen  $MgCl_2$ , 0,5  $\mu$ mol  $\beta$ -mercaptoethanol, gedenatureerd DNA of produkten en 0,05 tot 0,3 eenheden van het enzym.

De incubaties werden uitgevoerd bij 37°C gedurende 30 min. Voor de bepaling van het enzym werd 20 nmolen gedenatureerd T7 [ $^{32}P$ ]DNA gebruikt.

#### E. ENDONUCLEASE S1 UIT *ASPERGILLUS ORYZAE*

Voor de incubaties met dit enzym werd de methode van Vogt gebruikt, waarin een kleine wijziging was aangebracht (Vogt, 1973).

Het reactiemengsel bevatte in 0,2 ml: 6  $\mu$ molen Na-acetaat buffer (pH 4,6), 10  $\mu$ molen NaCl, 0,2  $\mu$ mol  $ZnSO_4$ , 5% glycerol en 2  $\mu$ g gedenatureerd T7 DNA en het enzym.

Voor de bepaling van het enzym werd 2  $\mu$ g gedenatureerd T7 [ $^{32}P$ ]DNA gedurende 10 min bij 45°C geïncubeerd met een serie verdunningen van het enzym. De hoeveelheid zuuroplosbaar [ $^{32}P$ ]DNA werd gemeten. De activiteit van het preparaat werd berekend uit een experiment waarbij de afbraak tussen de 25 en 75% was gelegen.

#### F. ALKALISCHE FOSFATASE

Incubaties met alkalische fosfatase werden uitgevoerd volgens Furlong (1967). Het reactiemengsel van 1,0 ml bevatte:

2,5 mmolen NaCl, 0,1 mmol Tris-HCl buffer (pH 8,0) en het substraat.

Bij 65°C werd hieraan 0,3 eenheden van een enzymoplossing in 5  $\mu$ l aan toegevoegd. Na 10 min incuberen bij deze temperatuur werd nogmaals 5  $\mu$ l enzymoplossing toegevoegd en werd de oplossing nogmaals 10 min geïncubeerd. Het bij de reactie vrijgemaakte fosfaat werd vervolgens bepaald zoals in paragraaf 5A is beschreven.

## 6. Enzymen: eenheden

### A. ATP-AFHANKELIJKE DNAasen (UIT *M. LUTEUS* EN *E. COLI*)

Een eenheid van deze enzymen is gedefiniëerd als de hoeveelheid enzym die onder de omstandigheden van de standaard bepaling in 30 min bij 30°C 1 µg T7[<sup>32</sup>P]DNA zuuroplosbaar maakt (zie II-5A).

### B. EXONUCLEASE III UIT *E. COLI*.

Een eenheid exonuclease III is gedefiniëerd als de hoeveelheid enzym die 1 nmol [<sup>32</sup>P]fosfaat zuuroplosbaar maakt in 30 min bij 37°C in de standaard bepaling (zie II-5B).

### C. DNA-POLYMERASE I en T<sub>4</sub>-DNA-POLYMERASE UIT *E. COLI*

Een eenheid van deze enzymen is gedefiniëerd als de hoeveelheid enzym die de inbouw van 10 nmolen nucleotiden in geactiveerd kalf-thymus DNA katalyseert in 30 min bij 37°C in de standaard bepaling (zie II-5C).

### D. EXONUCLEASE I UIT *E. COLI*

Een eenheid exonuclease I is de hoeveelheid enzym die 10 nmol gedenatureerd DNA zuuroplosbaar maakt in 30 min in de standaard bepaling (zie II-5D).

### E. NUCLEASE S1 UIT *ASPERGILLUS ORYZAE*

Een eenheid nuclease S1 uit *Aspergillus oryzae* is de hoeveelheid enzym die 10 µg gedenatureerd DNA zuuroplosbaar maakt in 10 min bij 45°C in de standaard bepaling (zie II-5E).

### F. ALKALISCHE FOSFATASE

Een eenheid alkalische fosfatase is die hoeveelheid enzym die 1 µmol p-nitrofenylfosfaat in een min omzet bij 37°C (Voor de test zie Garen en Levinthal, 1960).

## 7. Zuivering van enzymen

### A. ATP-AFHANKELIJKE DNAase UIT *M. LUTEUS*

Het enzym werd geïsoleerd uit cellen van *M. luteus* die door de Koninklijke Nederlandse Gist en Spiritus Fabriek te Delft werden gekweekt. Deze bacteriën werden bij  $-20^{\circ}\text{C}$  bewaard. De zuivering van het enzym werd uitgevoerd bij  $0-4^{\circ}\text{C}$  tenzij anders vermeld. Na de tweede stap in de zuivering (verwijdering van het nucleïnezuur) bevatten alle buffers 10% ethyleenglycol. De eerste drie stappen van deze zuivering zijn gelijk aan die van de zuivering van het UV-specifieke endonuclease zoals beschreven door Nakayama e.a., (1972). De zuivering wordt beschreven voor een portie van 50 g bacteriën en bestaat uit de volgende stappen:

#### a. Vrijmaken van het enzym

Na ontgooien werden de cellen met lysozym geïncubeerd en met behulp van ultrasonore trillingen geopend.

#### b. Verwijderen van het nucleïnezuur

Het nucleïnezuur werd verwijderd door het te extraheren in de dextranase van een polyethyleenglycol-dextran tweefasen systeem in aanwezigheid van 4 M NaCl.

#### c. Chromatografie op TEAE-cellulose

Na adsorptie aan de ionenwisselaar werd het ATP-afhankelijke DNAase geëluëerd met 0,2 M kaliumfosfaat buffer (pH 7,0), 0,3 M NaCl.

#### d. Gefractioneerde precipitatie met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Het enzym werd gezuiverd en geconcentreerd door gefractioneerde precipitatie met  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Het enzym slaat neer tussen 30 en 50% verzadiging.

#### e. Gelfiltratie over Sephadex G-200

Het eiwit neerslag werd opgelost in  $10^{-2}\text{M}$  Tris-HCl (pH 7,5) en op een



Sephadex G-200 kolom (3x50)cm gebracht. Het enzym werd geëluëerd met dezelfde buffer.

#### f. Chromatografie op DEAE-cellulose

De fracties met het ATP-afhankelijke DNAase werden verzameld en op DEAE-cellulose gechromatografeerd. De DEAE-cellulose kolom (2,3x14 cm) was in evenwicht met 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5). Na het op de kolom brengen van het enzym en wassen met 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5) werd een gradiënt van 0,1 M-0,6 M Tris-HCl (pH 7,5) van 400 ml op de kolom aangesloten. Het enzym werd geëluëerd bij ca. 0,3 M Tris.

#### g. Chromatografie op DNA-agarose

Een verdere zuivering van het enzym kan worden bereikt door chromatografie op een DNA-agarose kolom volgens Schaller e.a., (1972). De fracties van de DEAE-cellulose kolom werden gedialyseerd tegen 0,1 M KCl,  $10^{-2}$ M Tris-HCl (pH 7,5),  $10^{-4}$ M EDTA en daarna op DNA-agarose gebracht (kolom van 2,3x8,5 cm) die met dezelfde buffer was gewassen. De DNA-agarose werd met 30 ml buffer gewassen waarbij meer dan 90% van het

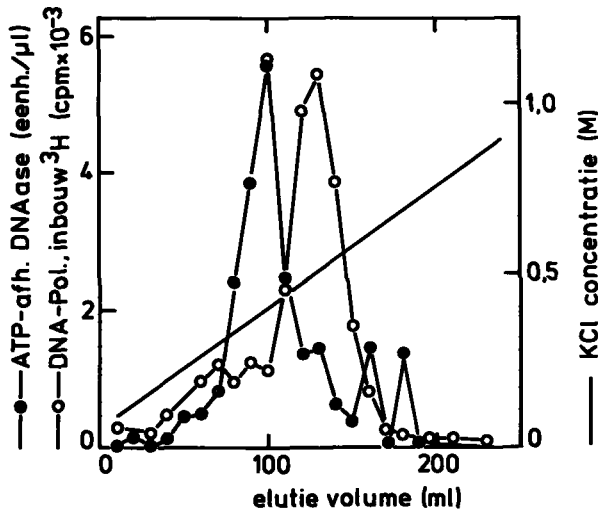


Fig.II-2. Zuivering van het ATP-afhankelijk DNAase op DNA-agarose.

eiwit niet geadsorbeerd werd aan de DNA-agarose. Het gebonden eiwit werd geëluëerd met behulp van een gradient van 0,1 M-1,0 M KCl in buffer van 250 ml. Het enzym werd bij ca. 0,4 M KCl geëluëerd (zie fig.II-2), waarbij het werd gescheiden van een aanzienlijke hoeveelheid DNA-polymerase activiteit. De actieve fracties werden verzameld en geconcentreerd op een Amicon filter (PM 10 of XM 50). Het enzym werd bewaard bij -20°C na het toevoegen van 1 mg/ml albumine en in aanwezigheid van 10 mM MgSO<sub>4</sub>.

#### B. ATP-AFHANKELIJKE DNAase UIT *E. COLI*

Dit enzym werd geïsoleerd uit twee stammen, n.l. *E. coli* KMBL1749 (wilde-type) en *E. coli* KMBL1750 (*rorA*). Beide stammen werden gekweekt in "Nutrient Broth" met 0,4% glucose onder krachtige beluchting bij 37°C tot een concentratie van ongeveer  $4 \cdot 10^9$  cellen per ml. Het enzym werd als volgt uit de cellen geïsoleerd en gezuiverd.

##### a. Openmaken van de cellen met Brij 58

De cellen werden gesuspenderd in 10 ml 25% suiker in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) per 4 gram cellen. Hieraan werd achtereenvolgens toegevoegd 1 ml lysozym oplossing (6,4 mg/ml in 0,25 M Tris-HCl (pH 8,0) en 1 ml EDTA (20 mg/ml (pH 7,5)). Na 10 min staan in ijs werd aan deze suspensie toegevoegd: 1,5 ml 5% Brij 58 in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) en 1,5 ml 0,1 M MgSO<sub>4</sub>. De oplossing werd visceus. Door centrifugeren gedurende 1 uur bij 35000 rpm werd een heldere bovenstaande vloeistof met het enzym verkregen. De bovenstaande vloeistof werd gedialyseerd tegen 20 mM kaliumfosfaat buffer (pH 6,7), 10% glycerol, 1 mM EDTA, 5 mM β-mercaptoethanol (dialyse buffer).

##### b. Chromatografie op DEAE-cellulose

Het gedialyseerde extract werd op een DEAE-cellulose kolom (4x23 cm), die in evenwicht was met de dialyse buffer, gebracht. De kolom werd hierna gewassen met 200 ml van de dialyse buffer en aangesloten op een gradiënt van 0,15 M - 0,45 M KCl in de dialyse buffer van 1,5 l. Het ATP-afhankelijke DNAase werd geëluëerd bij 0,25 M KCl. De fracties met de enzym-

activiteit werden verzameld en direct geprecipiteerd in 60% verzadigde  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; daar de stabiliteit van het enzym in het eluaat van de kolom te wensen over laat. Het neergeslagen eiwit werd opgelost in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10% glycerol, 10 mM  $\text{MgSO}_4$ , 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. Het enzym is dan redelijk stabiel.

#### c. Gelfiltratie over Sephadex G-200

De geconcentreerde oplossing van het eiwit in Tris buffer werd op een Sephadex G-200 kolom van 4,5x50 cm gebracht en vervolgens met dezelfde buffer geëlueerd. Fracties, die wel het ATP-afhankelijke DNAase en niet een DNAase activiteit op enkelstrengig DNA bevatten, werden verzameld.

#### d. Chromatografie op DNA-agarose volgens Schaller e.a., (1972)

Na dialyse tegen 0,1 M KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10% glycerol, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol werd het enzym op een DNA agarose kolom van 2,3x15 cm gebracht. Deze kolom werd met 50 ml van dezelfde buffer gewassen waarna het enzym werd geëlueerd bij 0,5 M KCl in een gradient van 300 ml van 0,1 M - 1,0 M KCl in dezelfde buffer.

### C. EXONUCLEASE I, EXONUCLEASE III, DNA-POLYMERASE I UIT *E. COLI*

Deze drie enzymen werden uit één portie cellen geïsoleerd. De procedure is beschreven door Heyneker e.a., (1973) en bestaat uit de volgende stappen:

#### a. Open maken van de cellen

Een extract werd bereid door 50 g cellen met glasparels te vermalen in een Omnimixer.

#### b. Verwijderen van het DNA

DNA werd verwijderd door het met polyethyleenglycol neer te slaan.

### c. Chromatografie op DNA-agarose

Achtereenvolgens werden de enzymen bij de volgende zoutconcentraties geëluëerd:

exonuclease I	0,1 - 0,15 M KCl
exonuclease III	0,3 - 0,35 M KCl
DNA-polymerase I	0,45 - 0,55 M KCl

De enzymen werden als volgt verder gezuiverd.

### d. Exonuclease I

De fracties van de DNA-agarose kolom die het exonuclease I bevatten werden verder gezuiverd door chromatografie op hydroxyapatiet.

Na dialyse tegen een kaliumfosfaat buffer (pH 6,4) met 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol werd de enzymoplossing op een hydroxyapatietkolom (7,5x1,1 cm) gebracht. Elutie van het enzym vond plaats m.b.v. kaliumfosfaat (gradiënt van 0,05 - 0,25 M). Het enzym werd geëluëerd bij 0,15 M kaliumfosfaat. Het aldus gezuiverde exonuclease I bevat nog een activiteit op dubbelstrengig DNA die ongeveer 3 - 5% is van de activiteit op enkelstrengig DNA.

### e. Exonuclease III

Als exonuclease III preparaat werden gebruikt of wel de fracties die van de DNA-agarose waren geëluëerd of wel de fracties die verkregen werden door het enzym nog verder te zuiveren door middel van chromatografie op DEAE-cellulose. De DEAE-cellulose (een kolom van 20x2,3 cm) werd gewassen met 0,01 M kaliumfosfaat buffer (pH 7,4), in aanwezigheid van 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. Het enzym (gedialyseerd tegen dezelfde buffer) werd op de DEAE-cellulose gebracht en weer geëluëerd met kaliumfosfaat (gradient van 0,01 M - 0,45 M) (pH 7,4). Het exonuclease III werd geëluëerd bij ca. 0,045 M kaliumfosfaat.

### f. DNA-polymerase I

De DNA-polymerase I fractie van de DNA-agarose kolom werd verder gezuiverd door chromatografie op fosfocellulose volgens Jovin, Englund en Bertsch (1969).

#### D. T4 DNA-POLYMERASE

Dit enzym kan uitsluitend polymeriseren als het beschikt over een enkelstrengige DNA matrijs met een "primer"(fig.II-3). Het enzym geeft minder ongewenste polymerisatie ("displacement synthesis") dan het DNA-polymerase I van *E. coli*.

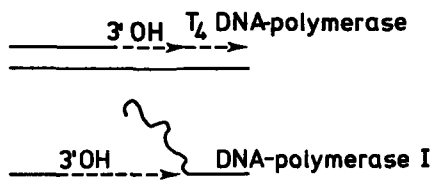


Fig.II-3. Specificiteit van de polymerase activiteit van het T4 DNA-polymerase. Het T4 DNA-polymerase kan uitsluitend een bestaande DNA keten verlengen vanaf een 3'OH eind tegenover een complementaire streng als matrijs.

De isolatie van het enzym omvatte de volgende stappen:

##### a. Infectie van *E. coli* met T4 faag

*E. coli* B werd gekweekt tot  $10^9$  cellen/ml in L bouillon en geïnfecteerd met 4 T4 fagen per bacterie. Na een voortgezette beluchting gedurende 10 min werden de bacteriën in ijs uitgegoten.

##### b. Openmaken van de cellen

De bacteriën werden gesuspenseerd in 0,02 M Tris-HCl (pH 8,1), 10 mM  $MgCl_2$ , 2 mM  $CaCl_2$ , 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 mM EDTA en vervolgens opengemaakt door de suspensie in de Omnimixer met glaspereels te malen.

##### c. Verwijderen van het DNA

Het DNA in het extract werd afgebroken met pancreas DNAase (20  $\mu$ g/ml) waarmee overnacht bij 4°C werd geïncubeerd.

##### d. Chromatografie op DNA-agarose

Het preparaat werd gedialyseerd tegen 0,1 M KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)

1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 0,1 mM EDTA en op een DNA-agarose kolom gebracht. Na wassen van de kolom met de dialyse buffer werd een gradiënt van 0,1 - 1,0 M KCl op de kolom aangesloten. Het enzym werd bij 0,5 M KCl geëluëerd.

#### e. Chromatografie op fosfo-cellulose

De actieve fracties van het DNA-agarose eluaat werden gedialyseerd tegen 0,02 M kaliumfosfaat buffer (pH 6,5) met  $\beta$ -mercaptoethanol en 1 mM EDTA en gechromatografeerd over fosfocellulose volgens Jovin e.a., (1969). De kolom werd geëluëerd met een gradiënt van 0,02 - 0,4 M kaliumfosfaat (pH 6,5). Het T4 DNA-polymerase werd bij ongeveer 0,2 M kaliumfosfaat geëluëerd.

#### E. NUCLEASE S1 UIT *ASPERGILLUS ORYZAE*

Dit enzym werd bereid uit  $\alpha$ -amylase poeder volgens de methode van Vogt (1973). Deze procedure behelst een hitte-behandeling, gefractioneerde precipitatie met ammoniumsulfaat en chromatografie op DEAE-cellulose.

### 8. Bijzondere technieken

#### A. FILTRATIE VAN DNA OVER NITROCELLULOSE FILTERS

Met behulp van nitrocellulose filters kunnen dubbelstrengig en enkelstrengig DNA worden onderscheiden: enkelstrengig DNA bindt aan de filters terwijl dubbelstrengig DNA door het filter loopt.

Een monster van [ $^{32}$ P]DNA in 0,5 ml wordt met 4,5 ml 1 M NaCl in 0,01 M Tris-HCl buffer (pH 8,0) verdund en gefiltreerd door een nitrocellulose filter (Sartorius SM 11307) dat vooraf gedurende 1 uur in deze buffer was geweekt. Het filter wordt gewassen met 5 ml buffer. De radioactiviteit die achterblijft op het filter wordt gemeten met een Geiger-Mueller teller.

#### B. DICHTHEIDSCENTRIFUGATIE IN CsCl GRADIËNTEN

Dubbelstrengig en enkelstrengig DNA kunnen van elkaar gescheiden worden op grond van een verschil in zweefdichtheid in CsCl. Aan 2,0 ml van het

te analyseren [ $^{32}\text{P}$ ]DNA monster werd 2,5 g. CsCl toegevoegd, waardoor een oplossing ontstaat met een dichtheid van  $1,70 \text{ g/cm}^3$ . Deze oplossing werd in een buisje van de SW 50 rotor gebracht en aangevuld met paraffine olie tot 5 ml. De oplossing werd gedurende 65 uur bij 37 000 rpm gecentrifugeerd. De gradiënten werden gefractioneerd volgens methode ii) van de volgende paragraaf. De radioactiviteit van de fracties werd gemeten met behulp van een Geiger-Mueller teller.

### C. ZONE CENTRIFUGATIE OP SUIKER- EN GLYCEROLGRADIËNTEN

#### a. Het maken van de gradiënten

Gradiënten werden gemaakt met behulp van het apparaat afgebeeld in fig.II-4. In vat A werd een hoeveelheid buffer met 5% suiker of 5% glycerol afgewogen (tabel II-5). Uit vat B werd een oplossing met 30% suiker of 25% glycerol aangezogen.

De suikergradiënten werden gemaakt in  $1 \text{ M NaCl}$ ,  $10^{-2} \text{ M Tris-HCl}$  (pH 7,5),  $1 \text{ mM EDTA}$  en de glycerolgradiënten in  $10^{-2} \text{ M Tris-HCl}$  (pH 8,0) met  $10^{-2} \text{ M MgSO}_4$ .

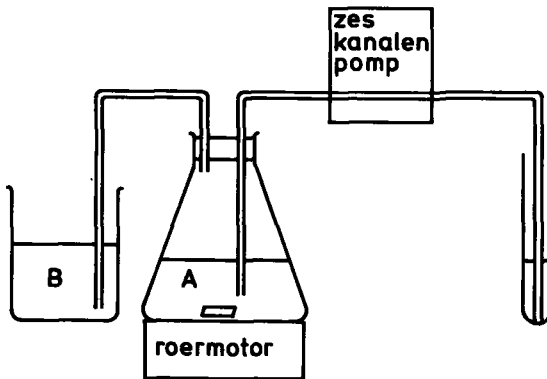


Fig.II-4. Apparaat voor het maken van suiker- en glycerolgradiënten.

In vat A wordt de oplossing met de lage dichtheid geplaatst, in vat B de oplossing met de hoge dichtheid. Uit vat A wordt vloeistof gezogen door zes slangetjes, waarmee dan zes gradienten tegelijk worden gevuld.

Tabel II-5. Gegevens voor het maken van suiker- en glycerolgradiënten

Rotor		gewichts- hoeveelheid oplossing in vat A (in gram)
Beckman	SW 27	160
International	SB 110	
Beckman	SW 41	48
International	SB 283	
Beckman	SW 50, SW 56	16
International	SB 405	

b. Centrifugeren

Snelheid en tijd van centrifugeren zijn bij de experimenten vermeld.

c. Fractioneren van de gradiënten

De gradiënten werden op een van de volgende manieren gefractioneerd:

- i. Op de buis werd een conische kap geplaatst en de suiker- of glyceroloplossing werd door een opening in de kap gedrukt met behulp van tetrachloorkoolstof dat onder in de buis werd geperst.
- ii. In de gradiënt werd een dunne buis geplaatst waardoor de gradiënt vanaf de bodem werd leeggezogen.

De inhoud van de gradiënten werd in buisjes of op telbakjes opgevangen. In enkele experimenten werd de extinctie bij 260 nm van de vloeistof gemeten in een doorstroom cuvet tijdens het fractioneren.

D. CHROMATOGRAPHIE VAN OLIGONUCLEOTIDEN EN DNA OP DEAE-CELLULOSE PAPIER

Chromatografie op DEAE-cellulose papier werd uitgevoerd volgens de methode van Davilla, Charles en Ledoux, (1965a en 1965b) waarin een kleine wijziging werd aangebracht.

0,1 ml van het te analyseren monster werd op een strookje DEAE-cellulose papier gebracht (fig.II-5). Het materiaal werd achtereenvolgens van het papier geëluëerd met 5 ml van de volgende oplossingen.



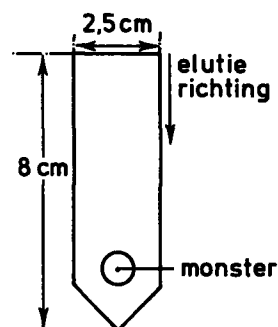


Fig.II-5. Strook DEAE-cellulose papier waarop de scheiding van de produkten wordt uitgevoerd.

1. 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5)
2. idem + 0,14 M NaCl
3. idem + 0,5 M NaCl
4. idem + 1,0 M NaCl
5. 1 M NaOH

De vloeistof werd opgevangen in flesjes van de scintillatie teller en de radioactiviteit werd door Cerenkov telling bepaald. De hoeveelheid radioactiviteit die per fractie werd geëluëerd werd opgegeven als percentage van de totale hoeveelheid opgebrachte radioactiviteit. De op het strookje gebrachte radioactiviteit werd volledig teruggevonden in de gezamenlijke eluaten.

#### E. GELFILTRATIE OP SEPHADEX G-200

De afbraakprodukten, gevormd bij incubatie van radioactief DNA met het ATP-afhankelijke DNAase werden geanalyseerd op Sephadex G-200 kolommen van 1x45 cm). Het te analyseren monster werd gemengd met ATP en tRNA. Deze twee stoffen dienden als merkers in het eluaat. 1 ml van het mengsel werd op de kolom gebracht en het materiaal werd geëluëerd met 0,01 M Tris (pH 7,5), 0,05 M NaCl. Fracties van 15 druppels (1 ml) werden opgevangen. Radioactiviteit, de extinctie bij 260 nm en in sommige gevallen het percentage zuuroplosbaar materiaal werden bepaald.

#### F. SCHEIDING VAN EIWIT EN DNA IN EEN WATERIG MENGSEL VAN POLYETHYLEEN-GLYCOL EN DEXTRAN

Aan 0,4 ml van de oplossing van DNA en het ATP-afhankelijke DNAase werd 1,5 g van een gekoeld mengsel van 8% (g/g) polyethyleenglycol 6000 en 8% (g/g) dextran T 500 in 0,05 M Tris-HCl (pH 9,0), 0,025 M MgSO<sub>4</sub> toegevoegd. Dit mengsel werd gedurende 1 min goed geschud, waarna de twee fasen werden gescheiden door gedurende een korte tijd te centrifugeren. In de bovenfase werd de enzymactiviteit en de hoeveelheid DNA bepaald.

#### G. BEREIDING VAN DNA-AGAROSE

DNA-agarose werd bereid volgens de methode van Schaller e.a., (1972). Hiertoe werden met elkaar gemengd:

- a. 100 ml van een 4% oplossing van agarose van 100°C.
- b. 100 ml van een oplossing met 15 mg kalf-thymus DNA per ml in 0,02 M NaOH van 50°C.

Het mengsel werd snel gekoeld door het uit te gieten op een koud oppervlak, waarna het overnacht bij 4°C werd bewaard. De volgende dag werd de DNA-agarose door een zeef van 90 mesh geperst. De gezeefde DNA-agarose werd vervolgens gewassen met 1 M KCl, 10<sup>-2</sup> M Tris-HCl (pH 7,6), 10<sup>-4</sup> M EDTA, 1 mM NaN<sub>3</sub> en bewaard bij 4°C.

#### H. EIWIT BEPALINGEN

Eiwit concentraties werden gemeten:

- a. Volgens Lowry e.a., (1951) waarbij met albumine een ijklijn werd gemaakt.
  - b. Door de extinctie bij 280 nm te meten.
- Hierbij werd aangenomen dat een extinctie = 1,0 overeenkomt met een concentratie aan eiwit van 1 mg per ml.

#### I. ELECTROFORESE OP POLYACRYLAMIDE GELS

De zuiverheid van het enzympreparaat werd gecontroleerd door electroforese op polyacrylamide gels. Deze electroforese werd uitgevoerd volgens Maurer (1968), op gels (zonder verzamel gel) van 7% acrylamide in 0,375 M Tris-HCl buffer (pH 8,9).

Op een gel van 8x55 mm werd 50  $\mu$ l enzymoplossing gebracht. De electroforese buffer bevatte  $5 \cdot 10^{-3}$  M Tris en  $3,42 \cdot 10^{-2}$  M glycine (pH 8.0). Electroforese werd uitgevoerd bij een stroomsterkte van 5 mA per gel en bij een spanning van 250 Volt gedurende ongeveer 3 uur.

De eiwitbanden werden gekleurd met amido zwart. De gels werden ontkleurd in 7% azijnzuur, 5% methanol bij een stroomsterkte van 100 mA.

## J. BESTRALING VAN DNA

### a. $\gamma$ -straling

De bestraling werd uitgevoerd in een Gammacell-100  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -bron. Het DNA werd bestraald in glazen buisjes in een  $\text{O}_2$  atmosfeer.

### b. Ultraviolette straling

Het DNA met een concentratie van 20  $\mu\text{g}$  per ml werd in een dunne laag bestraald met een Philips TUV 57413 P40 lamp, die was uitgerust met een reflector. Minstens 90% van de energie wordt bij 254 nm uitgestraald.

HOOFDSTUK III. ALGEMENE EIGENSCHAPPEN VAN HET ATP-AFHANKELIJKE  
DNAase UIT *MICROCOCCUS LUTEUS*

1. De zuiverheid van de enzympreparaten van het ATP-afhankelijke  
DNAase uit *M. luteus*

De proeven, die in dit hoofdstuk worden beschreven, werden uitgevoerd met een enzympreparaat dat is gezuiverd tot en met de DEAE-cellulose stap evenals de proeven van paragraaf V-2 t/m 5. De proeven van hoofdstuk IV, V-6 en VI zijn met het meest gezuiverde enzympreparaat uitgevoerd, de DNA-agarose fractie. De resultaten van de laatste twee stappen van de zuivering zijn samengevat in tabel III-1.

Tabel III-1. Laatste stappen van de zuivering van het ATP-afhankelijk DNAase uit *M. luteus*

	volume (ml)	totaal eiwit (mg)	totale activiteit (eenheden)	specifieke activiteit (eenheden per mg eiwit)
eluaat van DEAE-cellulose	5,0	6,30	$3,78 \cdot 10^4$	$6,0 \cdot 10^3$
eluaat van DNA-agarose	6,3	0,11	$2,34 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^5$

Over de zuiverheid van deze enzympreparaten zijn de volgende gegevens beschikbaar. Bij electroforese van de DEAE-cellulose fractie op polyacrylamide gels worden 16 eiwit banden waargenomen. Na de DNA-agarose kolom zijn dit nog twee ongeveer even dikke banden. De enzymactiviteit bevindt zich op de plaats van een van deze banden. Uit deze gegevens kan worden opgemaakt dat het enzym ongeveer 50% zuiver is op eiwitbasis. Belangrijker dan het aantal eiwitten in het preparaat zijn de nuclease activiteiten er van. Er kunnen geen verschillen worden gevonden in de nuclease activiteit van de DEAE-cellulose fractie en de DNA-agarose fractie. Beide enzympreparaten bezitten naast ATP-afhankelijke DNAase activiteit op dubbelstrengig DNA, een activiteit op enkelstrengig DNA die ongeveer 4% bedraagt van de afbraak van het dubbelstrengig DNA. De afbraak van dubbelstrengig DNA in afwezigheid van ATP is 0,3% van die

welke met ATP wordt gevonden;dit geldt voor beide enzympreparaten. Zonder ATP wordt ook geen endonuclease activiteit waargenomen (zie fig. III-1) zoals blijkt uit het profiel van het T7 DNA dat na incubatie met het enzym en denaturatie onderworpen werd aan centrifugatie in een suikergradiënt. Er werd geen verschil waargenomen tussen het profiel van het DNA dat wel en van het DNA dat niet met het enzym was geïncubeerd. Hieruit blijkt dat er geen enkelstreng breuken in het DNA ontstaan door incubatie met het enzym in afwezigheid van ATP.

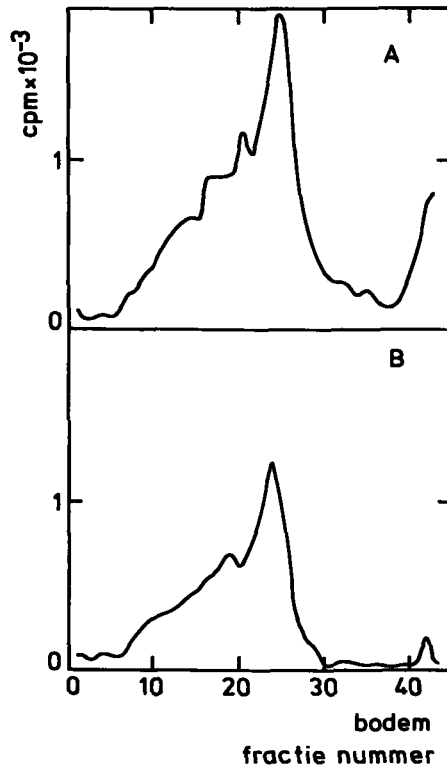


Fig.III-1. Controle van het ATP-afhankelijke DNAase preparaat op endonuclease activiteit.

A. Controle van gedenatureerd T7 DNA.

B. 2  $\mu\text{g}$  T7[ $^{32}\text{P}$ ]DNA werd gedurende 30 min geïncubeerd met 2 eenheden van het ATP-afhankelijke DNAase (zonder ATP) en na denatureren (door alkali) gecentrifugeerd gedurende 15 uur bij 15000 rpm in een neutrale suikergradiënt. Als controle werd gedenatureerd T7 DNA gecentrifugeerd.

De enzympreparaten bevatten dus drie nuclease activiteiten in een vaste verhouding. Het is niet helemaal uit te sluiten dat de twee lage ATP onafhankelijke activiteiten door andere nucleasen worden veroorzaakt. Het is echter ook mogelijk dat het ATP-afhankelijke DNAase deze drie activiteiten bezit.

## 2. Stabiliteit van het enzym

Gedurende de eerste stappen van de zuivering is het enzym stabiel; er treedt geen verlies van activiteit op wanneer de preparaten bewaard worden bij 4°C of -20°C. Na de chromatografie op DEAE-cellulose wordt echter een langzame achteruitgang van de activiteit gevonden, indien geen maatregelen worden genomen. Deze maatregelen bestaan uit het toevoegen van 1 mg albumine per ml en 0,01 M MgSO<sub>4</sub>. Het enzym blijft dan stabiel indien het bewaard wordt bij -20°C. De stabiliserende invloed van Mg<sup>2+</sup>-ionen blijkt uit tabel III-2.

Tabel III-2. De stabilisering van het ATP-afhankelijke DNAase door Mg<sup>2+</sup>ionen

dagen bij 4°C	relatieve enzymactiviteit na bewaren bij 4°C			
	0	3	10	13
10 mM MgSO <sub>4</sub>	100	109	93	98
zonder MgSO <sub>4</sub>	100	40	9	8

Na de chromatografie over DNA-agarose is de stabiliteit verder verminderd. In aanwezigheid van albumine en Mg<sup>2+</sup> is het enzym bij -20°C echter goed houdbaar. Na een jaar bewaren kon geen verlies van activiteit worden vastgesteld. Wel gaat de enzymactiviteit achteruit na herhaald ontdooien en weer bevriezen van het preparaat.

## 3. Karakterisering van het afbraakproces

Hout e.a., (1970) hadden aangetoond dat het enzym wel lineair, maar geen circulair dubbelstrengig DNA afbreekt. Het enzym is dus een exonuclease. Anai e.a., (1970) concludeerden uit een analyse van de afbraakprodukten van *E. coli* DNA op alkalische suikergradiënten dat het

DNA molekuul voor molekuul wordt afgebroken. De hoeveelheid materiaal in de piek van het *E. coli* DNA werd wel minder maar de plaats van deze piek in de gradiënt veranderde niet. De afbraakprodukten werden aan de top van de gradiënt gevonden. We hebben deze proeven herhaald en uitgebreid met het beter gekarakteriseerde DNA van de faag T7 als substraat. Na de incubatie werd het DNA met behulp van alkali gedenateerd en na neutraliseren gecentrifugeerd. Het resultaat van de experimenten is in fig. III-2 te zien. De piek van het DNA wordt inderdaad lager maar de positie van deze piek verandert niet. Dit wil zeggen dat bij de incubatie sommige DNA molekulen geheel tot niet sedimenterende produkten worden afgebroken, terwijl andere geheel intact zijn gebleven. Daar hier wordt gekeken naar gedenateerd, dus enkelstrengig DNA, blijft er nog de mogelijkheid open dat van een DNA molekuul eerst één streng geheel wordt afgebroken. Gezien de geringe activiteit van het enzym op enkelstrengig DNA is dit niet waarschijnlijk. Analyse van de produkten op suikergradiënten zonder denaturatie leert dat het hele DNA molekuul, beide strengen tegelijk, wordt afgebroken (fig. III-3). De afwezigheid van gedeeltelijk afgebroken DNA molekulen, de intermediairen, wijst er verder op dat het enzym in ondermaat aanwezig was en dat een DNA molekuul in korte tijd wordt afgebroken. Het aantal molekulen DNA dat op een bepaald tijdstip wordt afgebroken is dus klein. Als deze conclusie juist is moet het mogelijk zijn intermediairen te isoleren door de enzymconcentratie te verhogen en de afbraaksnelheid te verlagen. In het experiment van fig. III-4 werden 2  $\mu\text{g}$  DNA geïncubeerd met 50 eenheden enzym bij 0°C. De hoeveelheid enzym is hier voldoende om alle DNA molekulen tegelijk in de afbraak te betrekken. Door de lage temperatuur duurt de afbraak van een T7 DNA molekuul zolang dat intermediairen van verschillende lengte geïsoleerd kunnen worden door korter of langer te incuberen: het hoogmoleculaire DNA verschuift in de richting van de top van de gradiënt.

De resultaten bevestigen dat het enzym exonucleolytisch werkt. Een tweede manier om de reactie in de hand te houden en intermediairen te isoleren is beschreven door Takagi, Matsubara en Anai (1972). De incubatie wordt door hen eveneens met een overmaat enzym uitgevoerd, maar met een beperkende hoeveelheid ATP.

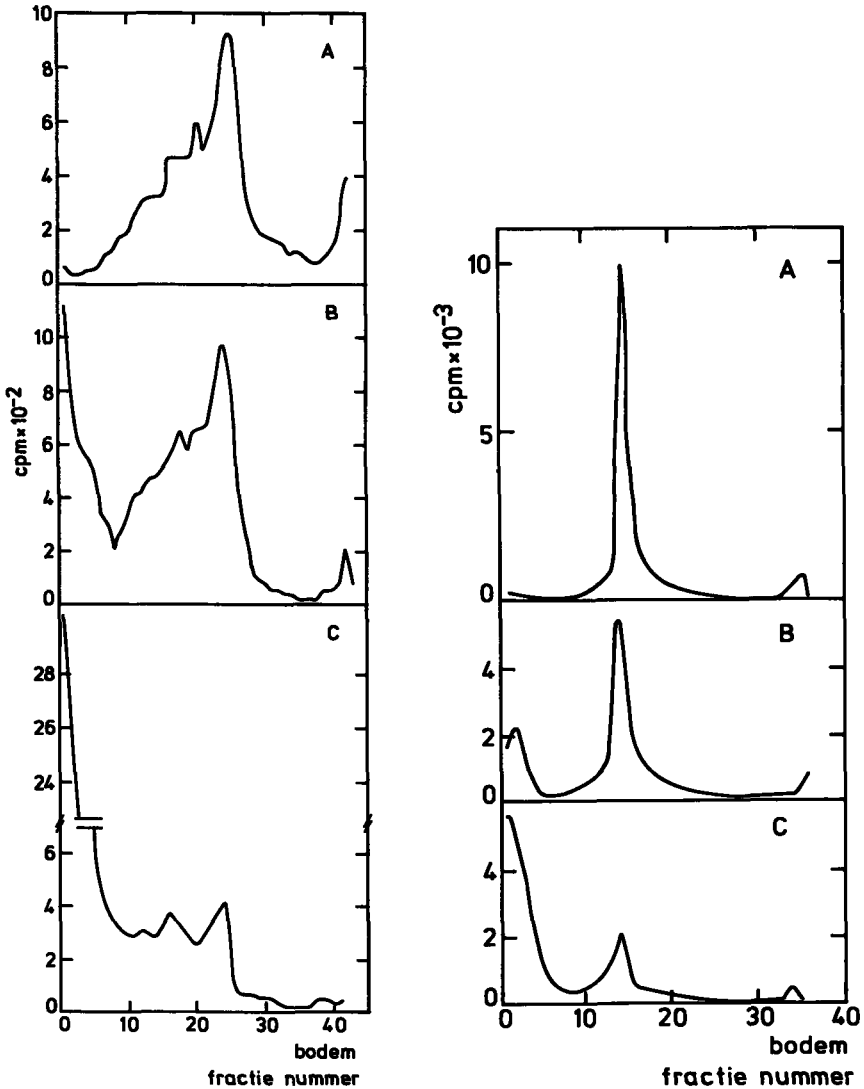


Fig.III-2. Sedimentatie van T7[<sup>32</sup>P]DNA in een suikergradiënt na afbraak met het ATP-afhankelijke DNAase en denaturatie.

- A. T7[<sup>32</sup>P]DNA als controle.
- B. T7[<sup>32</sup>P]DNA, gedurende 5 min gefincubeerd met 0,5 eenheid enzym.
- C. T7[<sup>32</sup>P]DNA, gedurende 15 min gefincubeerd met 2 eenheden enzym.

De gradiënten werden 14 uur bij 15000 rpm gecentrifugeerd in een SW 41 rotor.

Fig.III-3. Sedimentatie van T7[<sup>32</sup>P]DNA in een suikergradiënt na afbraak met het ATP-afhankelijke DNAase zonder denaturatie.

A,B en C zijn als in figuur 2.

De gradiënten werden 15 uur bij 25000 rpm gecentrifugeerd in een SW 27 rotor.



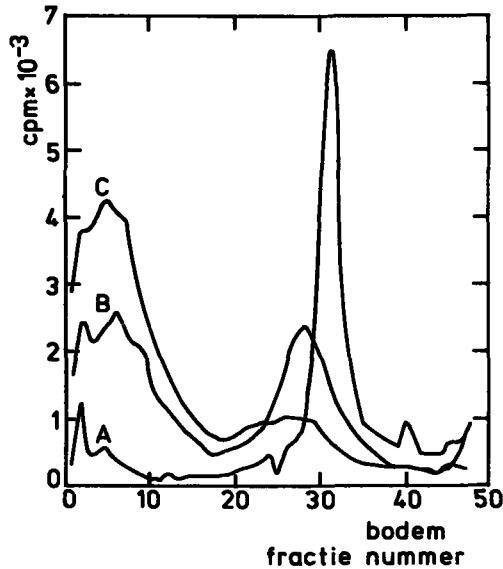


Fig.III-4. Intermediären bij de afbraak van T7[<sup>32</sup>P]DNA.

A. Controle T7[<sup>32</sup>P]DNA.

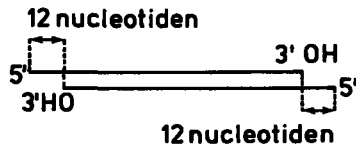
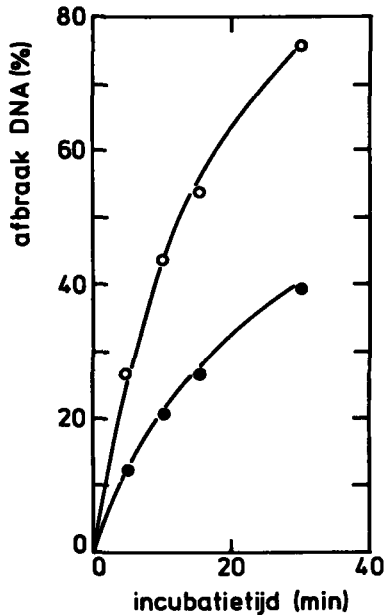
B. Incubatie van het T7[<sup>32</sup>P]DNA met 50 eenheden enzym gedurende 5 min bij 0°C.

C. Incubatie van het T7[<sup>32</sup>P]DNA met 50 eenheden enzym gedurende 10 min bij 0°C.

Het DNA werd gedurende 15,5 uur bij 25000 rpm gecentrifugeerd in suikergradiënten in een SW 27 rotor.

#### 4. Specificiteit van het ATP-afhankelijke DNAase

Het enzym is een exonuclease, d.w.z. de afbraak van het DNA molecuul kan alleen bij de uiteinden van het molecuul beginnen. Het was echter niet bekend of de structuur van deze einden nog van invloed is op de gevoeligheid van het DNA voor het enzym. We hebben daarom enkele experimenten uitgevoerd met DNA waarvan de einden een andere structuur hebben dan die van T7 DNA. Zo heeft  $\lambda$  DNA aan beide einden van het molecuul stukjes enkelstreng keten van slechts 12 nucleotiden lengte (Hershey e.a., 1963) in tegenstelling tot T7 DNA dat geheel dubbelstrengig is (Ritchie e.a., 1967).  $\lambda$  DNA heeft een structuur als afgebeeld in fig.III-5. De afbraak van dit  $\lambda$  DNA werd vergeleken met de afbraak van T7 DNA. In fig.III-6 is te zien dat  $\lambda$  DNA ongeveer half zo snel wordt afgebroken als het T7 DNA. Waarschijnlijk

Fig.III-5. De structuur van  $\lambda$  DNA.Fig.III-6. De afbraak van  $\lambda$  en T7 DNA met het ATP-afhankelijke DNAase.

Gelijke hoeveelheden ( $2\mu\text{g}$ )  $\lambda$ [ $^{32}\text{p}$ ]DNA en T7[ $^{32}\text{p}$ ]DNA (Molekulgewichten resp.  $30 \cdot 10^6$  en  $25 \cdot 10^6$ ) werden met twee eenheden van het enzym geïncubeerd. Het  $\lambda$ [ $^{32}\text{p}$ ]DNA was voor de incubatie 5 min op  $65^\circ\text{C}$  verhit en daarna snel gekoeld in ijs om eventueel aanwezige waterstofbruggen gesloten cirkels in lineaire molekulen om te zetten. De afbraak werd bepaald door het meten van de hoeveelheid materiaal die oplosbaar was in zuur.

—○— T7 DNA,      —●—  $\lambda$  vir DNA.

wordt deze vertraging van de afbraak veroorzaakt door de aanwezigheid van de enkelstrengige einden van het  $\lambda$  DNA. Indien namelijk DNA met nog langere enkelstrengige einden met het enzym geïncubeerd wordt, dan blijkt dat dit DNA vrijwel niet meer wordt afgebroken. In het experiment van fig.III-7 werd de afbraak van T7 DNA vergeleken met de afbraak

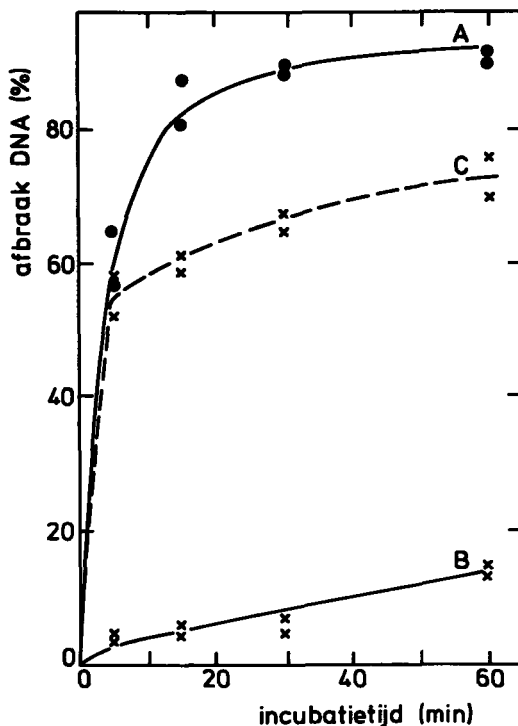


Fig.III-7. De invloed van enkelstrengige einden aan het T7 DNA op de afbraak-snelheid.

- A. Controle afbraak tot zuuroplosbaar materiaal van 2  $\mu\text{g}$  T7[ $^{32}\text{P}$ ]DNA met 5 eenheden van het ATP-afhankelijke DNAase.
- B. De afbraak van 2  $\mu\text{g}$  T7[ $^{32}\text{P}$ ]DNA dat voor 22% is afgebroken met exonuclease III.
- C. T7[ $^{32}\text{P}$ ]DNA werd na behandeling met exonuclease III (als onder B) gefincubeerd met een overmaat DNA-polymerase bij 0°C in aanwezigheid van de benodigde trifosfaten.  
De afbraak van het aldus behandelde DNA met 5 eenheden van het ATP-afhankelijke DNAase is hier uitgezet. Hier werd per experiment 0,35  $\mu\text{g}$  DNA gebruikt.

van T7 DNA dat gedeeltelijk is afgebroken met exonuclease III. Dit enzym breekt een streng van het dubbelstrengige DNA af en wel van het 3'einde, zodat eenzelfde type molecuul ontstaat als het  $\lambda$  DNA. De enkelstrengige stukken zijn echter langer (gemiddeld 8000 nucleotiden in onze proef). In fig.III-7 is te zien dat dit DNA nog maar heel langzaam wordt afgebroken.

Het gedeeltelijk enkelstrengige DNA kan weer dubbelstreng gemaakt worden door met behulp van DNA-polymerase een complementaire streng er op te synthetiseren. Het DNA blijkt dan weer gevoeliger te zijn geworden voor het ATP-afhankelijke DNAase. De conclusie van deze proeven is dat het enzym specifiek is voor de einden van dubbelstrengig DNA. De precieze structuur van deze einden is iets minder belangrijk; ook indien

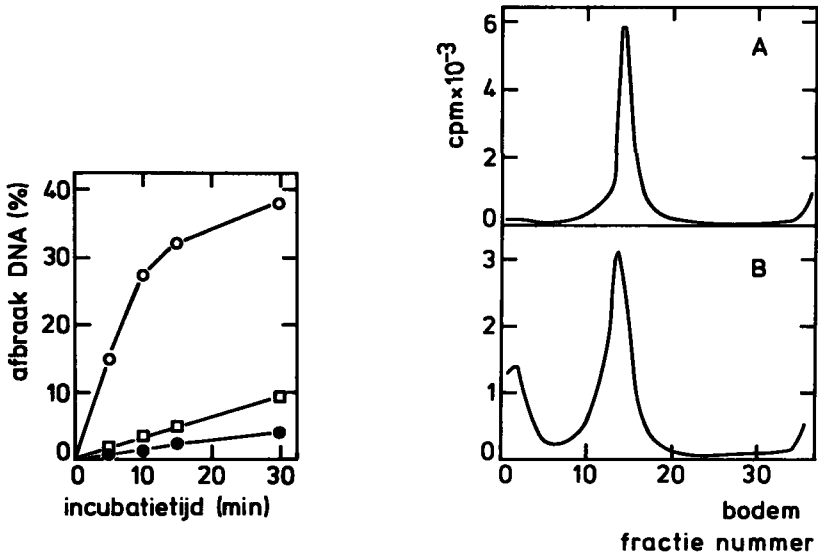


Fig.III-8. De afbraak van met ultraviolet licht bestraald T7[<sup>32</sup>P]DNA.

- De afbraak van 2 µg onbestraald T7[<sup>32</sup>P]DNA met een eenheid van het ATP-afhankelijke DNAase.
- De afbraak van het T7[<sup>32</sup>P]DNA na bestraling met 7200 erg per mm<sup>2</sup>.
- Idem na bestraling met 14400 erg per mm<sup>2</sup>.

Fig.III-9. Analyse van de afbraakprodukten verkregen bij incubatie van bestraald T7[<sup>32</sup>P]DNA (14400 erg per mm<sup>2</sup>) met 2 eenheden van het ATP-afhankelijke DNAase gedurende 30 min bij 30°C.

A. Controle van onbestraald T7[<sup>32</sup>P]DNA.

B. Bestraald DNA.

De gradiënten werden gedurende 15 uur gecentrifugeerd bij 25000 rpm in een SW 27 rotor.

een kort stukje enkelstreng aanwezig is, kan het DNA worden afgebroken, zij het met lagere snelheid.

Een andere vraag die de specificiteit betreft is of bestraald DNA wordt afgebroken. Met andere woorden, kan het enzym thymine-dimeren en andere schade in DNA passeren. De afbraak van DNA, dat met ultraviolette straling is bestraald, is vergeleken met de afbraak van onbestraald DNA. Uit fig.III-8 blijkt dat het bestraalde DNA langzamer wordt afgebroken. Uit gradiënt centrifugatie van de producten (fig.III-9) blijkt dat het DNA nog wel molekuul voor molekuul wordt afgebroken, dus dat de afbraak niet ergens geblokkeerd wordt. De stralingsschade vertraagt de afbraak dus wel, maar het enzym kan de schade passeren.

## HOOFDSTUK IV. ANALYSE VAN DE REACTIEPRODUKTEN

### 1. Inleiding

Uit het werk van Hout e.a., (1970) en het werk van Anai e.a., (1970a) als ook op grond van de experimenten die in hoofdstuk III zijn beschreven, is gebleken, dat het ATP-afhankelijke DNAase een exonuclease is. Door Anai e.a., (1970a) werd tevens vastgesteld dat de eindprodukten van de reactie bestaan uit oligonucleotiden met een gemiddelde lengte van 5,5 nucleotiden. Onze eigen experimenten deden echter vermoeden dat tijdens de beginfase van de afbraak een gedeelte van de produkten onoplosbaar was in zuur en daarom groter moest zijn dan penta-nucleotiden (Cleaver en Boyer, 1972).

Uit het vorige hoofdstuk is gebleken dat bij de afbraak twee typen produkten worden gevormd:

- a) Produkten met een laag molekuulgewicht, die door het enzym van de DNA-keten worden gebroken en die bij centrifugeren op de top van de gradiënt worden gevonden (kleine produkten genoemd).
- b) Gedeeltelijk afgebroken DNA molekulen (intermediären) met een hoog molekuulgewicht. Deze intermediären kunnen worden gevonden in een redelijke concentratie, wanneer de afbraak wordt uitgevoerd met een overmaat enzym en bij 0°C of met een beperkende hoeveelheid ATP.

Voor een beter begrip van het mechanisme van de afbraak is kennis van de structuur van de afbraakprodukten noodzakelijk. Daarom hebben we de structuur onderzocht van de produkten die in een vroeg stadium van de afbraak worden gevonden. De resultaten van dit onderzoek worden in dit hoofdstuk beschreven.

### 2. Oplosbaarheid in zuur als maat voor de DNA afbraak

Bij het vergelijken van de afbraak van DNA, gemeten als zuuroplosbaar materiaal en als niet sedimentierend materiaal in suikergradiënten, bleek er een verschil te bestaan tussen deze twee methoden. Met behulp van gradiëntanalyse werd in het algemeen een hoger percentage afbraak gevonden (tabel IV-1). De oorzaak hiervan is dat een deel van de produkten zo groot is dat deze in zuur neerslaan. We zien dit ook in

Tabel IV-1. Bepaling van de ATP-afhankelijke DNAase activiteit

Experi- ment	Tempe- ratuur	Afbraak van het DNA (%) bepaald als		
		zuuroplos- baar	topfracties v/d gradiënt	laag molec. materiaal op Sephadex G-200
1	30°C	29	52 (1,8) <sup>x</sup>	
2	"	59	84 (1,4)	
3	"	25	50 (2,0)	65 (2,6) <sup>x</sup>
4	"	47	76 (1,6)	63 (1,3)
5	0°C	22	47 (2,1)	
6	"	29	49 (1,7)	
7	"	23		17 (0,7)
8	"	31		32 (1,0)

x tussen haakjes is de verhouding ten opzichte van de zuuroplosbare fractie gegeven.

fig. IV-1 waar van het materiaal aan de top van de gradiënten bepaald werd of dit materiaal volledig zuuroplosbaar was. Een deel van de produkten slaat neer met zuur. Wanneer deze waarnemingen met de gegevens van Cleaver en Boyer (1972) worden vergeleken, over de afmetingen van oligonucleotiden die nog zuuroplosbaar zijn, dan kan geconcludeerd worden dat de kleine produkten voor een deel bestaan uit oligonucleotiden die langer zijn dan 17 nucleotiden. Zoals uit het voorgaande blijkt, is de bepaling van het percentage zuuroplosbaar materiaal een onjuiste maat voor de werkelijke afbraak. Daarom is geprobeerd deze bepalingmethode te vervangen door een gelfiltratie van het reactiemengsel over Sephadex G-200 kolommen. Zeer grote produkten, zowel als onafgebroken molekulen worden hierbij teruggevonden in het exclusievolume, terwijl kleinere afbraakprodukten worden achtergehouden op een Sephadex G-200 kolom. Voor incubaties bij 30°C geeft deze methode waarden die vrij goed overeenkomen met de analyse met behulp van de suikergradiënten. Afbraken bij 0°C blijven echter afwijkende waarden opleveren (tabel IV-1). Een deel van de produkten na incubatie bij 0°C is zichtbaar zo groot dat ze in het exclusievolume van de kolom terecht komen.

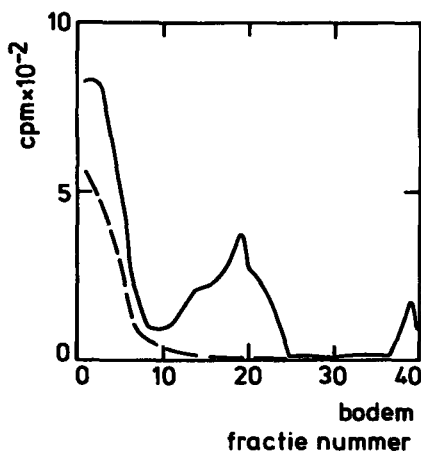


Fig.IV-1. Het zuuroplosbare deel van de afbraakprodukten, gemeten na centrifugatie in suikergradiënten.

T7 [<sup>32</sup>P]DNA werd gedeeltelijk afgebroken met 1 eenheid van het ATP-afhankelijke DNAase (incubatie 10 min bij 30°C). Het reactiemengsel werd gecentrifugeerd in een suikergradiënt. Van de fracties van de gradiënt werd de totale hoeveelheid radioactiviteit ——— en het zuuroplosbare deel van de radioactiviteit ----- bepaald. Totale activiteit aan de top van de gradiënt (fractie 1 t/m 9) is 55%; het zuuroplosbare gedeelte aan de top is 41% van de totale radioactiviteit. De zuuroplosbaarheid gemeten direct na de incubatie bedroeg 36%.

De gemiddelde ketenlengte van de produkten werd bepaald zonder verdere fractionering en na isolatie van de afbraakprodukten door centrifugatie gevolgd door dialyse. In tabel IV-2 zien we dat in beide gevallen de gemiddelde ketenlengte van de produkten die bij 0°C zijn gevormd, groter is dan de gemiddelde ketenlengte van de produkten die bij 30°C werden verkregen.

Tabel IV-2. Gemiddelde ketenlengte van de produkten in nucleotiden

	0°C	30°C
Totale produkten	5,2	3,6
Topfracties van de gradiënt	14,3	10,8



### 3. Aanwijzingen voor de aanwezigheid van enkelstrengig DNA in de produkten

Enkelstrengig DNA en complexen van dubbelstrengig DNA met eiwitten worden sterk aan nitrocellulose filters gebonden. Met behulp van deze filters hebben Winder en Sastry (1971) aangetoond dat het ATP-afhankelijke DNAase uit *M. smegmatis* in aanwezigheid van ATP met DNA een complex vormt. Bij pogingen om op dezelfde manier een complex van het ATP-afhankelijke DNAase uit *M. luteus* met DNA aan te tonen, bleek dat een aanzienlijk deel van het DNA aan het filter werd gebonden. Daar echter ook na het verwijderen van het eiwit met fenol of met natriumlaurylsulfaat en pronase, het DNA nog aan het filter bleef plakken, moest worden aangenomen dat niet complexvorming, maar een gedeeltelijke afbraak tot enkelstrengige produkten de oorzaak van deze binding was. Afhankelijk van de incubatie omstandigheden werd 30-80% van het radioactieve DNA aan de filters gebonden. Om een indruk te krijgen welke soort produkten aan de filters binden, en dus enkelstrengig DNA kunnen bevatten, werd het incubatiemengsel na de afbraak en onteiwitten op een suikergradiënt gebracht en gecentrifugeerd om de laag-moleculaire afbraakprodukten te scheiden van de intermediairen. De fracties van de gradiënt werden door een nitrocellulose filter gefiltreerd (fig. IV-2). Zowel de kleine afbraakprodukten als de intermediairen binden aan het filter. De wat lagere binding van materiaal in de topfracties wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat deze produkten te klein zijn om te kunnen binden, zelfs als ze enkelstrengig zijn. Deze experimenten wijzen op de aanwezigheid van enkelstrengig DNA in beide soorten produkten. Omtrent de hoeveelheid enkelstrengig DNA kan niets gezegd worden daar DNA dat voor een klein deel enkelstrengig is reeds aan het filter bindt. Zo werd in een controle experiment T7 DNA voor 4,7% met exonuclease III afgebroken, hetgeen een DNA molekuul oplevert dat 4,7% enkelstrengig is. Dit DNA bindt reeds volledig aan nitrocellulose filters. De hoeveelheid enkelstrengig materiaal in DNA kan worden bepaald met behulp van dichtheidscentrifugatie in een CsCl gradiënt (Schildkraut e.a., 1961). Bij centrifugeren in CsCl van de intermediairen werd de piek precies op de plaats van dubbelstrengig DNA gevonden (fig. IV-3). Dit wijst er op dat de enkelstrengige stukken in deze

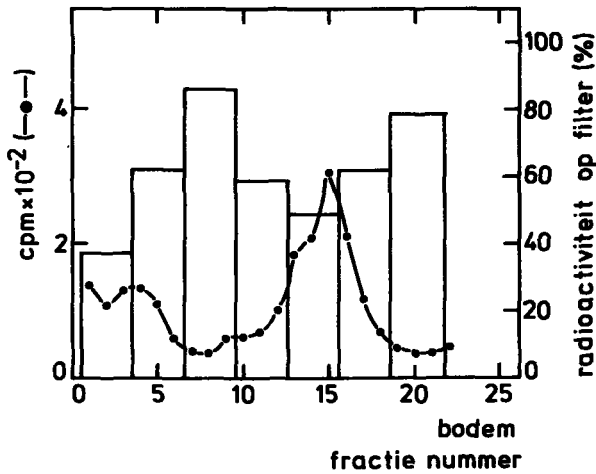


Fig. IV-2. Binding van de reactieproducten aan nitrocellulose filters na scheiding op een suikergradiënt.

Na gedeeltelijke afbraak van T7[<sup>32</sup>P]DNA met een overmaat ATP-afhankelijke DNAase (incubatie 5 min bij 0°C) werden de reactieproducten onteiwit met fenol, gedialyseerd en gecentrifugeerd in een suikergradiënt gedurende 15 uur bij 25000 rpm in een SW 41 rotor. De verdeling van de radioactiviteit werd bepaald —●—●— waarna steeds drie fracties werden gecombineerd. Na verdunnen in 5 ml 1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) werden deze gecombineerde fracties door een nitrocellulose filter gefiltreerd (zie hoofdstuk II,8). Het histogram toont het percentage van de radioactiviteit dat op het filter achterblijft.

intermediären relatief kort zijn. Voor een analyse van de kleine producten is deze methode niet geschikt, daar de kleine molekulen in CsCl geen band geven.

#### 4. Isolering van kleine afbraakproducten en intermediären

Alvorens over te gaan tot een nadere analyse van de produkten moeten de kleine produkten van de intermediären worden gescheiden. Per experiment werd 400 µg T7[<sup>32</sup>P]DNA (25 µg/ml) afgebroken. Om een voldoende opbrengst aan intermediären te verkrijgen werden 15 eenheden enzym per µg DNA gebruikt (overmaat enzym) en werd de afbraak beperkt door gedurende 8 min bij 0°C te incuberen, of door de ATP concentratie in het reactiemengsel te verlagen tot 42 µM. Er werd in dit laatste geval

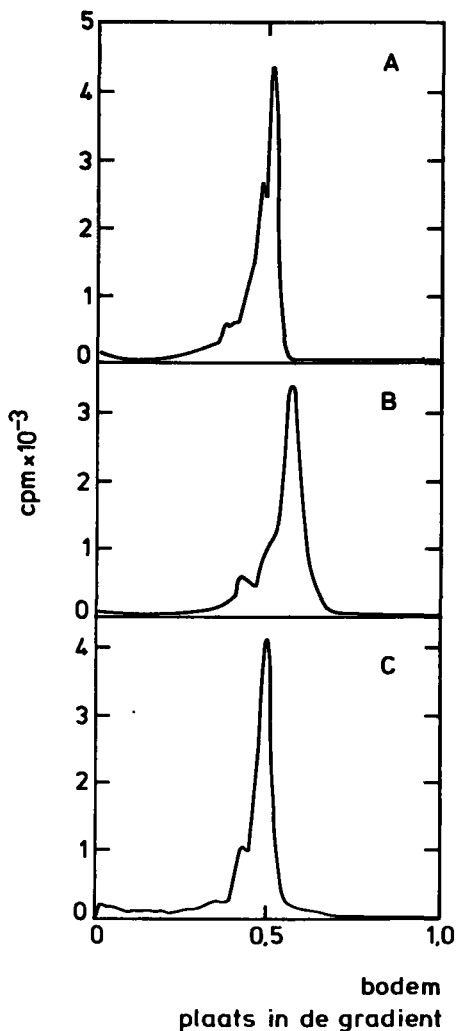


Fig.IV.3. Evenwichtscentrifugatie in een CsCl gradiënt.

T7 [<sup>32</sup>P]DNA werd gedurende 3 min met een overmaat enzym gefincubeerd bij 0°C. Het reactiemengsel werd met CsCl gemengd (hoofdstuk II,8) en gedurende 65 uur bij 37000 rpm in een SB 405 rotor gecentrifugeerd. Fracties van twee druppels werden opgevangen en de radioactiviteit ervan werd gemeten.

A. Controle van dubbelstrengig T7 DNA.

B. Controle van gedensureerd T7 DNA.

C. Gedeeltelijk afgebroken T7 DNA.

15 min bij 30°C geïncubeerd. De afbraak is in beide gevallen ongeveer 50%. De reactie werd gestopt door te schudden met fenol. De oplossing werd gedialyseerd tegen 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,05 M NaCl, 1 mM EDTA en de kleine producten werden gescheiden van de intermediairen door centrifugatie op een suikergradiënt (fig.IV-4). De kleine producten en de intermediairen werden afzonderlijk verzameld zoals in deze figuur is aangegeven. Hierna werden de verzamelde fracties gedialyseerd tegen 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,05 M NaCl, 1 mM EDTA en geconcentreerd door vriesdrogen. Na het vriesdrogen werd de oplossing nogmaals gedialyseerd tegen dezelfde buffer.

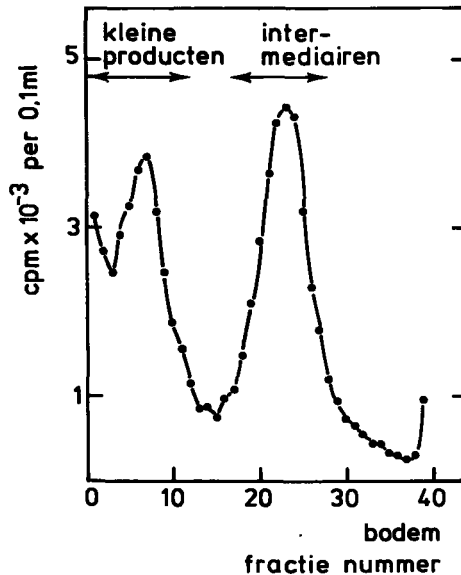


Fig.IV.4. Scheiding van kleine producten en intermediairen.

Voor de condities van de afbraak zie tekst. Per gradiënt werd 3 ml van het reactiemengsel gescheiden door gedurende 15 uur bij 24000 rpm te centrifugeren in een SW 27 rotor.

Uit de topfracties van de gradiënt, die dus de kleine producten bevatten, zijn door het dialyseren de kleinere molekulen verdwenen. Deze dialyseverliezen lopen op tot 70% van de kleine producten. Volgens de gegevens van Cleaver en Boyer (1972) zijn dit molekulen kleiner dan 5 nucleotiden in lengte.

## 5. Analyse van de kleine afbraakprodukten

Filtratie van de kleine produkten door nitrocellulose filters had reeds aanwijzingen opgeleverd dat deze produkten tenminste voor een deel enkelstrengig zijn. Voor de karakterisering van de kleine produkten na dialyse zijn twee aspecten bestudeerd.

- a) Welk deel van de kleine produkten enkelstrengig en welk deel dubbelstrengig is.
- b) De afmetingen en de grootte verdeling van de kleine produkten.

Deze experimenten werden uitgevoerd met produkten gevormd bij 0°C en bij 30°C, daar er aanwijzingen waren dat deze produkten niet gelijk zijn (tabel IV-2).

### a. De hoeveelheid dubbelstreng DNA in de kleine produkten.

Er zijn een aantal methoden beschreven om enkel- en dubbelstrengig DNA van elkaar te onderscheiden, zoals chromatografie op gebenzoïleerde, genaphtoïleerde DEAE-cellulose (Sedat e.a., 1967) of hydroxyapatiet (Bernardi, 1969), filtratie door nitrocellulose filters (Nygaard en Hall, 1964) en meting van de fluorescentie van complexen van ethidiumbromide en DNA (LePecq en Paoletti, 1967).

Geen van de hierboven genoemde methoden heeft echter bevredigende antwoorden opgeleverd. De reden hiervan is waarschijnlijk, dat de kleine produkten een te laag molekulgewicht hebben, terwijl de molekulen, zoals zal blijken bovendien gedeeltelijk dubbelstrengig en gedeeltelijk enkelstrengig zijn. Een methode die wel tot goede resultaten leidde, is het afbreken van enkelstrengige gedeelten met een specifiek nuclease, gecombineerd met een analyse op Sephadex G-200 kolommen. Op deze manier werd niet alleen informatie verkregen over de conformatie van de produkten maar ook over de grootte verdeling.

Voor de specifieke afbraak van enkelstrengig DNA in de kleine produkten werd gebruik gemaakt van een endonuclease (S1) uit *Aspergillus orizae* (Vogt, 1973). Hierdoor is de afbraak onafhankelijk van een speciale eindgroep aan het DNA, zoals bijvoorbeeld bij exonuclease I van *E. coli* dat de DNA keten alleen vanaf een 3'OH einde afbreekt (Lehman en Nussbaum, 1964). De kleine produkten van een incubatie bij 0°C werden na isolatie

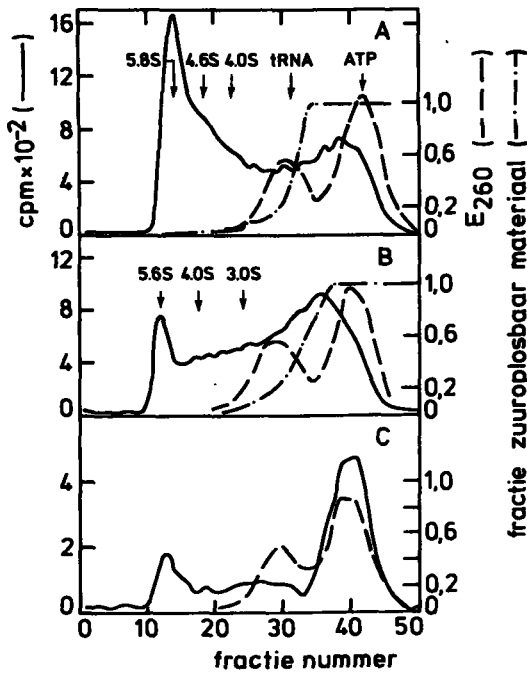


Fig.IV-5. Analyse van de kleine produkten (gemerkt met  $^{32}\text{P}$ ) gevormd bij  $0^\circ\text{C}$ , op een Sephadex G-200 kolom.

Een monster van een ml van de kleine produkten werd met tRNA en ATP gemengd en op een Sephadex G-200 kolom gechromatografeerd. De positie van de kleine produkten werd bepaald door het meten van de radioactiviteit die van de het tRNA en het ATP door het meten van de extinctie bij 260 nm.

———— de radioactiviteit in het eluaat.  
 - - - - de extinctie bij 260 nm.  
 - · - · de fractie zuuroplosbaar in het eluaat.

A kleine produkten

B gedenatureerde kleine produkten

C kleine produkten na incubatie met het nuclease S1 uit *Aspergillus* gedurende 15 min bij  $45^\circ\text{C}$ .

en dialyse eerst naar grootte gescheiden op een Sephadex G-200 kolom (zie fig.IV-5A). Daarbij werden tRNA en ATP als referenties toegevoegd en na elutie werd in de afzonderlijke fracties het percentage zuuroplosbaar materiaal bepaald. Het is bekend dat oligonucleotiden van 17 basen voor ongeveer 50% zuuroplosbaar zijn (Cleave en Boyer, 1972),

zodat de plaats waar molekulen van deze lengte de kolom verlaten op deze manier bepaald kan worden.

Opmerkelijk is vooral de grote hoeveelheid materiaal in het exclusie volume. Daar geen precieze gegevens bekend waren over de relatie tussen het molekuulgewicht van het DNA en de positie in het elutie patroon hebben we van het materiaal in enkele fracties de sedimentatiecoëfficiënt bepaald.

De gemeten sedimentatiecoëfficiënten geven slechts een benadering van de afmetingen van de molekulen, daar niet bekend is of de produkten bestaan uit dubbelstrengige molekulen, enkelstrengige molekulen of uit molekulen van gemengd karakter. In tabel IV-3 zijn de molekuulgewichten uit de sedimentatie berekend, aannemende dat het DNA of wel volledig dubbel- of wel volledig enkelstrengig is. De lengte van de langste molekulen wordt op grond van deze berekening op ongeveer 300 nucleotiden geschat. Fig. IV-5B geeft het elutieprofiel van kleine produkten die zijn gedenatureerd alvorens op de kolom te zijn gebracht. Vergeleken met fig. IV-5A is er een aanzienlijke verschuiving van materiaal naar fracties met een lager molekuulgewicht. De conclusie hieruit is dat in ieder geval een deel van de kleine produkten geheel of gedeeltelijk dubbelstrengig is. Een ander gedeelte van het gedenatureerde DNA wordt terug-

Tabel IV-3. Sedimentatie analyse van de kleine produkten. Berekening van het molecuulgewicht en de ketenlengte uit de sedimentatiecoëfficiënt. De molecuulgewichten werden berekend aan de hand van de relaties van  $S = 0,0882.M^{0,346}$  voor natief dubbelstrengig DNA en  $S = 0,0105.M^{0,549}$  voor gedenatureerd DNA in een neutrale gradiënt volgens Studier (1965).

	S	$M_w$ dubbelstrengig DNA. $10^{-3}$	$M_w$ enkelstrengig DNA. $10^{-3}$	ketenlengte
kleine produkten onbehandeld	5,8 4,6 4,0	180 91 60	100 65 51	~300 150-200 100-170
kleine produkten na denaturatie	5,6 4,0 3,0		90 65 20	300 220 60

gevonden in het exclusievolume. Dit zijn dus zeer lange molekulen. Uit de sedimentatiecoëfficiënt (zie fig. IV-5B) kan een molekulgewicht berekend worden (zie tabel IV-3). Er zijn dus enkelstrengige ketens van ~300 basen aanwezig.

Wanneer met het nuclease S1 uit *Aspergillus* het enkelstrengige materiaal in de kleine produkten wordt afgebroken, waarbij dus de dubbelstrengige stukken overblijven, dan wordt bij gelfiltratie op Sephadex G-200 een profiel gevonden zoals weergegeven in fig. IV-5C. Een grote hoeveelheid van de radioactiviteit is op de plaats van het ATP terecht gekomen; een gedeelte van het materiaal wordt echter teruggevonden in het exclusie volume. Blijkbaar komen er in de kleine produkten dubbelstrengige DNA molekulen voor van zeer grote lengte.

Samenvattend kan gezegd worden dat de kleine produkten bestaan uit oligonucleotiden van zeer verschillende lengte: gedeeltelijk enkelstrengig en gedeeltelijk dubbelstrengig.

Worden de produkten van een incubatie bij 30°C op dezelfde wijze onderzocht, dan worden de resultaten van fig. IV-6A, B en C verkregen. Wanneer deze resultaten worden vergeleken met die van fig. IV-5A, B, en C dan blijkt dat de bij 30°C gevormde produkten in het algemeen korter zijn en voor een kleiner deel dubbelstrengig zijn dan de bij 0°C ontstane produkten.

## 6. De vorming van dubbelstrengige produkten bij de afbraak

De aanwezigheid van dubbelstrengig DNA in de kleine produkten doet de vraag rijzen of dit dubbelstrengig DNA tijdens de afbraak is gevormd of wel ontstaan is door renaturatie tijdens de isolatieprocedure. Om een indruk te krijgen van de mogelijke renaturatie tijdens de isolatie, zijn de kleine produkten gedenuatureerd en weer geïsoleerd. De hoeveelheden dubbelstrengig DNA voor denatureren en na opnieuw isoleren werden vergeleken door de gevoeligheid van het materiaal te bepalen voor exonuclease I.

De hoeveelheid zuuroplosbaar materiaal kan niet gebruikt worden als maat voor de afbraak door een enzym van het enkelstrengig gedeelte van de produkten en wel om de volgende reden.



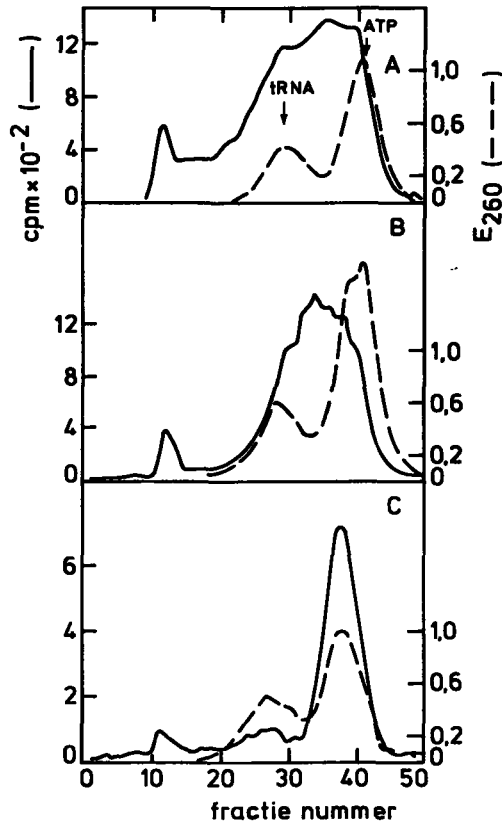


Fig.IV-6. Analyse van de kleine produkten die bij 30°C zijn gevormd, op een Sephadex G-200 kolom.

Voor gegevens zie fig. 5.

Twee gegevens zijn hier van belang:

- a) Oligonucleotiden kleiner dan 17 nucleotiden zijn oplosbaar in zuur (Cleaver en Boyer, 1972).
- b) Een dubbele helix van meer dan 10-15 baseparen is stabiel (Wang en Davidson, 1966).

Na afbraak van de kleine produkten met een enzym dat specifiek is voor enkelstrengig DNA zal niet alleen al het enkelstrengig DNA zuuroplosbaar zijn geworden, maar tevens dat gedeelte van het dubbelstrengig DNA dat kleiner is dan 17 nucleotiden (zie fig.IV-7). Daarbij komt dat ook zonder enzymbehandeling reeds een deel van de kleine produkten zuuroplosbaar

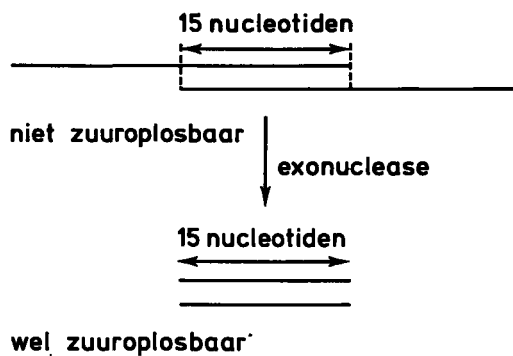


Fig.IV-7. Afbraak van het enkelstrengige deel van de kleine produkten met exonuclease I uit *E. coli*.

is. Daarom is deze methode onbruikbaar voor het bepalen van het enkelstrengig gedeelte van het DNA. Om deze reden is voor de bepaling van het enkelstrengig gehalte van de kleine produkten een wat minder voor de hand liggende methode gekozen, namelijk chromatografie op DEAE-cellulose papier, zoals beschreven door Davilla, Charles en Ledoux, (1965 a en b). Door het papier te behandelen met buffers van verschillende ionensterkte kunnen afzonderlijk mononucleotiden (fractie 1), oligonucleotiden (fracties 2 en 3) en hoogmolekulaair DNA (fracties 4 en 5) van het papier worden geëluëerd.

Met deze methode kan de hoeveelheid mononucleotiden bepaald worden, die wordt gevormd door incubatie met exonuclease I. In fig.IV-8 is het elutiepatroon te zien van natief T7 DNA (A), gedenatureerd T7 DNA dat voor 48% afgebroken is met exonuclease I (B) en van kleine produkten voor en na afbraak met exonuclease I (C en D).

Wanneer de kleine produkten worden gedenatureerd en vervolgens worden onderworpen aan een nieuwe isolatieprocedure en hierna het percentage DNA dat gevoelig is voor exonuclease I wordt bepaald met behulp van de hierboven beschreven methode dan blijkt dat 87% van het DNA enkelstrengig is (tabel IV-4). Voor onbehandelde kleine produkten is deze waarde 70% en voor kleine produkten die gedenatureerd zijn maar niet aan een hernieuwde isolatieprocedure zijn onderworpen is deze waarde 94%. Er treedt dus wel renaturatie op tijdens de isolatieprocedure maar niet voldoende om de hoeveelheid dubbelstrengig DNA in de kleine produkten

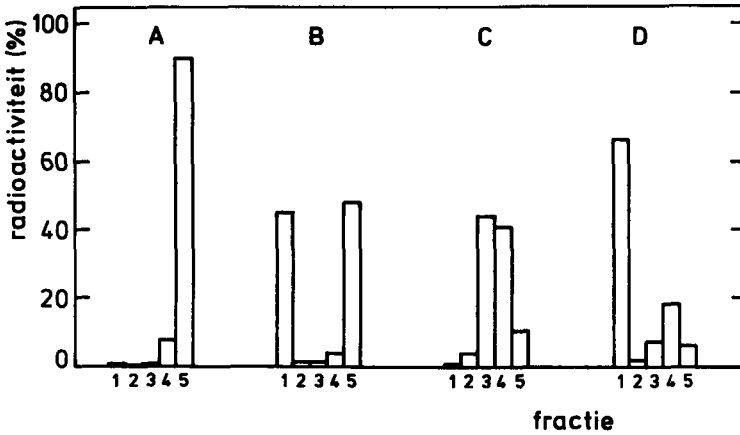


Fig. IV-8. Elutie van de kleine produkten van DEAE-cellulose papier.

Voor de techniek zie hoofdstuk II,8.

Het opgebrachte materiaal wordt geëluëerd met achtereenvolgens:

- 1) 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5), 2) idem + 0,14 M NaCl, 3) idem + 0,5 M NaCl,
- 4) idem + 1,0 M NaCl en 5) 1 M NaOH.

A Natief T7 DNA

B Gedenatureerd T7 DNA na incubatie met exonuclease I, waarbij 48% van het materiaal zuuroplosbaar is gemaakt.

C Kleine produkten

D Kleine produkten na incubatie met een overmaat exonuclease I (2 eenheden per  $\mu\text{g}$  DNA, gedurende 30 min bij  $37^\circ\text{C}$ ).

Tabel IV-4. Renaturatie van de kleine produkten tijdens de isolatie. De afbraak van de kleine produkten door exonuclease I werd met behulp van DEAE-cellulose papier gemeten en weergegeven als het percentage  $^{32}\text{P}$  dat met buffer 1 werd geëluëerd. Gedenatureerde kleine produkten werden verkregen door de kleine produkten 5 min op  $100^\circ\text{C}$  te verhitten en daarna in ijs te koelen.

behandeling	radioactiviteit (%) die met buffer 1 van DEAE-cellulose papier wordt geëluëerd		
	kleine produkten	gedenatureerde kleine produkten	gedenatureerde kleine produkten (opnieuw geïsoleerd)
geen	0,3	0,2	2,6
exonuclease I	70	94	87

te verklaren. De conclusie moet dus zijn dat bij afbraak van DNA met het ATP-afhankelijke DNAase produkten ontstaan die gedeeltelijk dubbelstrengig zijn.

## 7. Karakterisering van de intermediairen

De intermediairen zijn de gedeeltelijk afgebroken DNA molekulen die verkregen worden door DNA gedurende een korte tijd met een overmaat enzym te incuberen. Uit proeven met nitrocellulose filters zijn aanwijzingen verkregen dat deze intermediairen gedeeltelijk enkelstrengig zijn. Uit de CsCl dichtheidsgradiënten (paragraaf IV-3) is gebleken dat het enkelstreng deel klein moet zijn. Aangezien het ATP-afhankelijke DNAase een exonucleolytische werking heeft, is te verwachten dat deze kleine stukjes enkelstreng aan het eind van de molekulen zitten. Een andere aanwijzing dat de einden van de intermediairen veranderd zijn, is de vertraagde afbraak met het ATP-afhankelijke DNAase. Dit is te zien in fig.IV-9, de intermediairen worden duidelijk

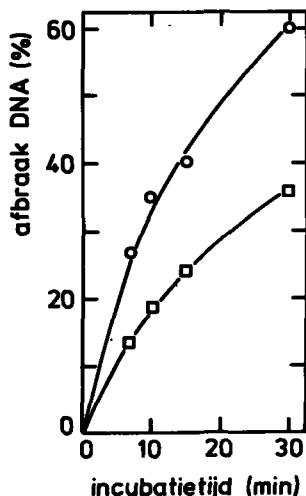


Fig.IV-9. Vergelijking van de afbraak van intermediairen en van T7 DNA met het ATP-afhankelijke DNAase.

De afbraak van 0,5  $\mu$ g van de intermediairen met 0,5 eenheid van het enzym werd vergeleken met de afbraak van 0,5  $\mu$ g T7 DNA onder gelijke omstandigheden. De incubaties werden uitgevoerd bij 30°C.

—○— T7 DNA, —□— intermediairen

langzamer afgebroken dan T7 DNA zoals dat ook het geval was bij  $\lambda$  DNA. Uit het werk van Anai e.a., (1970a) is bovendien gebleken dat het enzym breuken maakt van het 5'P-3'OH type. De intermediären zullen dus één van de structuren van fig.IV-10 hebben of uit een mengsel van beide bestaan. Geprobeerd werd de aan- of afwezigheid van deze twee

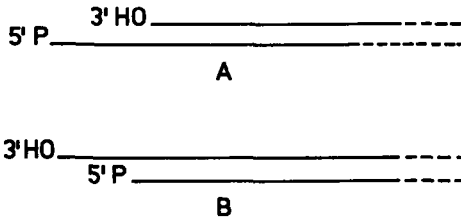


Fig.IV.10. Mogelijke structuren van de intermediären.

structuren aan te tonen en tevens de lengte van de enkelstreng stukken te bepalen. Een DNA molekuul van het type A met uitstekende 5' keten kan dienst doen als matrijs voor het T4 DNA-polymerase. Om deze reden werd de inbouw van radioactieve desoxyribonucleotiden, gekatalyseerd door gezuiverd T4 DNA-polymerase, gemeten ter bepaling van de hoeveelheid enkelstrengige ketens met 5' einde. In tabel IV-5 zijn deze proeven samengevat. De inbouw in de intermediären werd vergeleken met de inbouw in natief T7 DNA, dat als controle DNA fungeerde. De polymerase-activiteit werd gecontroleerd door de inbouw te meten met geactiveerd kalf-thymus DNA als matrijs (Kalf-thymus DNA wordt geactiveerd door een behandeling met pancreas DNAase en exonuclease III). De inbouw van radioactief dTTP in de intermediären blijkt duidelijk boven de controle waarde uit te komen en bedraagt 0,4% van de totale hoeveelheid intermediären, hetgeen neerkomt op gemiddeld 80 basen per eind.

Een bepaling van het voorkomen van DNA molekulen met uitstekende 3'einden (fig.IV-10, type B) bleek niet goed mogelijk. In principe moet een afbraak met exonuclease I het gevraagde antwoord geven. Binnen de fout van de bepaling kon echter geen verschil gevonden worden tussen afbraak met het enzym en de achtergrond bij incubatie zonder het enzym. Vermoedelijk is de afbraak kleiner dan 0,2% en zijn de 3'enkelstrengig einden korter dan die met een 5'eind.

Tabel IV-5. De inbouw van [ $^3\text{H}$ ]dTTP in de intermediairen door T4 DNA-polymerase.  
De inbouw in DNA van [ $^3\text{H}$ ]dTTP gekatalyseerd door T4 DNA-polymerase is weergegeven als de hoeveelheid zuuroplosbaar [ $^3\text{H}$ ]dTTP. Kalf thymus DNA werd voor 25% afgebroken met exonuclease III om als matrijs voor het polymerase dienst te doen.

	tijd (min)	$\mu\text{g DNA per test}$	
		0,86	1,0
		cpm ingebouwd	
intermediairen	0	35	36
	10	388	557
	20	448	508
T7 DNA	0	0	81
	10	0	166
	20	103	45
kalf thymus DNA na behandeling met exonuclease III	0	33	0
	10	3512	3459
	20	4150	3572

### Discussie

In dit hoofdstuk zijn proeven beschreven die tot doel hadden op te helderen hoe het enzym de breuken in het DNA maakt. Hiertoe zijn de reactieproducten geanalyseerd. Van de afbraak producten is het grootste deel dialyseerbaar en bestaat dus uit molekulen die kleiner zijn dan pentanucleotiden (Cleaver en Boyer, 1972).

Een deel is echter veel groter, met ketenlengten tot 300 basen. Van het niet dialyseerbare deel is 20-30% dubbelstrengig. Ook de dubbelstrengige DNA producten bereiken een lengte tot 150 of meer basen. De gedeeltelijk afgebroken DNA molekulen, de intermediairen, zijn dubbelstrengig met enkelstrengige uiteinden van gemiddeld 80 basen lengte. De enkelstrengige uiteinden hebben een 5'einde.

Worden deze resultaten met die van Friedman en Smith (1973) vergeleken, die de afbraak van T7 DNA met het ATP-afhankelijke DNAase uit *H. influenzae* hebben bestudeerd en ook met die van Karu e.a., (1973), die de afbraak van T7 DNA met het ATP-afhankelijke DNAase uit *E. coli* hebben

bestudeerd, dan zijn er enkele duidelijke verschillen. Onder bepaalde omstandigheden breken de enzymen uit *E. coli* en *H. influenzae* het DNA af tot zeer grote stukken met lange enkelstrengige uiteinden, (enkele duizenden nucleotiden lang). In het geval van het *H. influenzae* enzym wordt vrijwel geen zuuroplosbaar produkt gevormd, terwijl onder deze omstandigheden door het *E. coli* enzym wel zuuroplosbaar produkt wordt gevormd.

Friedman en Smith veronderstellen dat het DNA door het enzym wordt gedenatureerd. Zij veronderstellen een coöperatief effect van een aantal enzym molekulen, zoals bijvoorbeeld het T4 gen32 dat de denaturatie van dubbelstrengig DNA bevordert door de grote affiniteit van dit eiwit voor enkelstrengig DNA.

Wright, Buttin en Hurwitz (1971) stelden een model voor waarbij het enzym eerst één keten van het DNA afbreekt en daarna pas de tweede keten. De afbraak van DNA door het ATP-afhankelijke DNAase uit *M. luteus* verloopt duidelijk anders. Voor het verklaren van onze resultaten is het niet nodig te veronderstellen dat het enzym het DNA kan denatureren. Het ontstaan van enkelstrengige produkten in onze proeven kan eenvoudig verklaard worden uit de instabiliteit van dubbelstrengige stukken DNA tussen de breuken die op een afstand die kleiner is dan 10 nucleotiden van elkaar worden gevormd. Is de afstand tussen twee breuken groter, dan is het produkt dubbelstrengig.

Omdat gebleken is dat zowel voor het *H. influenzae* enzym als voor het *E. coli* enzym de vorming van afbraakprodukten met lange enkelstrengige uiteinden sterk afhankelijk is van de reactie omstandigheden en daar de condities voor onze experimenten duidelijk verschillen van de door Friedman en Smith (1973) en Karu e.a., (1973) gebruikte omstandigheden is een directe vergelijking van de enzymen niet mogelijk.

## HOOFDSTUK V. DE VORMING VAN HET DNA-ENZYM COMPLEX

### 1. Inleiding

De in hoofdstuk III beschreven afbraak van een volledige DNA keten door één enzym molecuul wijst er op dat tijdens de afbraak een sterke binding tussen DNA en enzym bestaat. Het werk van Winder en Sastry (1971) met het ATP-afhankelijke DNAase uit *Mycobacterium smegmatis* wijst ook op het bestaan van een DNA-enzym complex in aanwezigheid van ATP, dus tijdens de afbraak (hoewel een andere verklaring voor deze experimenten mogelijk is). Voor de verdere studie werd uitgegaan van de werkhypothese dat de enzymatische afbraak van het DNA uit twee stappen bestaat:

1. Binding van het enzym aan het DNA.
2. De eigenlijke afbraak van het DNA.

Er werd daarom gezocht naar omstandigheden, waarbij wel de binding maar niet de afbraak plaats vindt. Hiertoe werden DNA en enzym geïncubeerd, waarbij één van de componenten, nodig voor de afbraak, was weggelaten.

### 2. Omstandigheden van de complexvorming

Het enzym werd met DNA geïncubeerd, zowel zonder  $Mg^{2+}$  als zonder ATP. De afwezigheid van  $Mg^{2+}$  bleek echter tot een snelle inactivering van het enzym te leiden, zodat deze methode onbruikbaar was. In afwezigheid van ATP kon echter wel de vorming van een DNA-enzym complex worden aangetoond. De vorming van een DNA-enzym complex werd onderzocht met behulp van zone centrifugatie op glycerolgradiënten en extractie in een polyethyleen-glycol-dextran twee fasen systeem.

### 3. Centrifugeren van het complex op glycerolgradiënten

Daar de sedimentatiecoëfficiënten van T7 DNA en het enzym aanzienlijk verschillen (resp. 32 s en 12 s) is het in principe mogelijk een complex tussen DNA en enzym aan te tonen. Voorwaarde is wel dat dit complex voldoende stabiel is. Als het enzym aan het DNA is gebonden, zal het op de plaats van het DNA in de gradiënt terecht komen. In het experiment



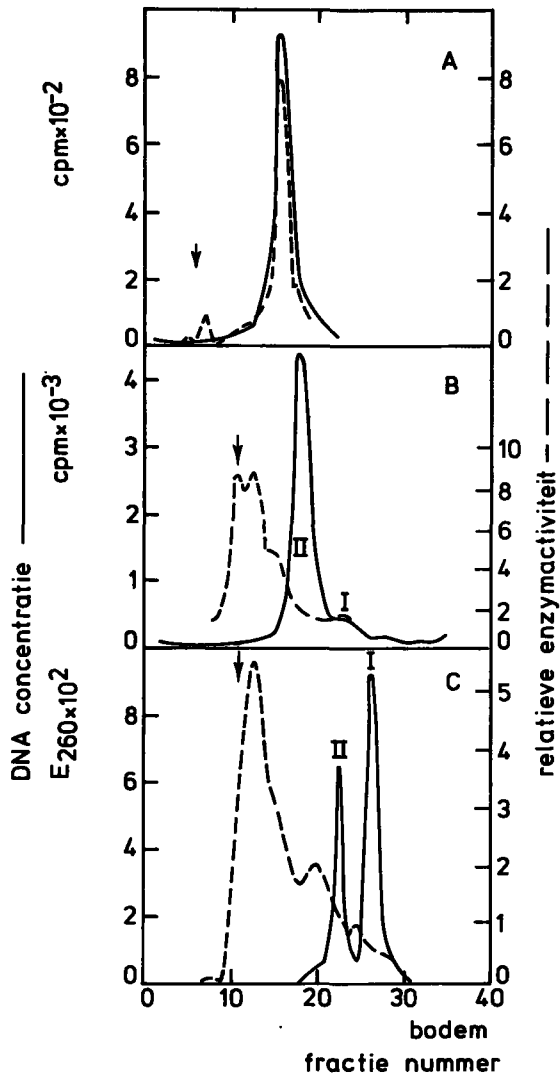


Fig.V-1. Analyse van de complexvorming tussen DNA en het ATP-afhankelijke DNAase in glycerolgradiënten.

Het DNA werd gedurende 15 min bij 30°C met een eenheid enzym in afwezigheid van ATP gefincubeerd en daarna in een glycerolgradiënt gesedimenteerd. De plaats van het DNA werd bepaald door de radioactiviteit in 0,1 ml van elke fractie te meten (in experiment A en B; in experiment C werd de E<sub>260</sub> in een doorstroomcuveet gemeten).

De plaats van het vrije enzym (zie pijl) werd in een afzonderlijke gradiënt bepaald. Sedimentatieprofielen in aanwezigheid van:

- A 2 µg T7[<sup>32</sup>P]DNA
- B 0,6 µg ØX174 RF [<sup>32</sup>P]DNA
- C 2 µg PM2 DNA.

werden 2  $\mu\text{g}$  [ $^{32}\text{P}$ ] T7 DNA gedurende 15 min bij  $30^\circ\text{C}$  met 1 eenheid enzym geïncubeerd en daarna gecentrifugeerd in een glycerolgradiënt. De gradiënt bevatte 0,01 M  $\text{MgSO}_4$  om het enzym te stabiliseren. Na fractioneren van de gradiënt werd de plaats van het DNA ( $^{32}\text{P}$  radioactiviteit) en van het enzym bepaald. Voor de enzymbepaling werd aan 0,1 ml van elke fractie 2  $\mu\text{g}$  [ $^{32}\text{P}$ ] T7 DNA en incubatie buffer toegevoegd en werd de enzym activiteit gemeten. De resultaten worden getoond in fig. V-1A. In deze figuur is te zien dat het enzym inderdaad samen met het DNA sedimenteert. Er is dus een DNA-enzym complex ontstaan en ATP is voor de vorming van dit complex niet nodig.

Met behulp van deze methode is ook de specificiteit van de complexvorming onderzocht. Achtereenvolgens werd gekeken naar binding van het enzym aan circulair DNA, enkelstrengig DNA en DNA met enkelstrengige einden.

In fig. 1B en C is het resultaat te zien van gradiënten met circulair dubbelstrengig DNA. Er werden experimenten gedaan met  $\phi\text{X}$  RF DNA (Pouwels en Jansz, 1964) en het DNA van de faag  $\text{PM2}^{\text{X}}$  (Espejo e.a., 1969). In deze DNA preparaten was zowel de gesloten vorm (component I) als de vorm met enkelstreng breuken (component II) aanwezig, zodat ook een eventuele binding aan DNA met enkelstreng breuken geconstateerd kon worden. Het enzym blijkt aan geen van beide vormen van circulair DNA te binden. Alleen op de plaats in de gradiënt waar een geringe hoeveelheid lineair DNA sedimenteert (Opschoor e.a., 1968), werd een kleine hoeveelheid enzym gevonden (fractie 19 in fig. 1C), de rest sedimenteert als vrij enzym.

Uit deze proeven volgt dat het enzym bindt aan de einden van het lineaire DNA, hetgeen ook te verwachten was, gezien het exonucleolytische karakter van het enzym.

Op dezelfde manier werden experimenten uitgevoerd met enkelstrengig DNA,  $\lambda$  DNA en T7 DNA dat met exonuclease III was behandeld. In tabel V-1 zijn de resultaten van deze bindingsproeven vergeleken met die van de afbraak-proeven uit hoofdstuk III.

Alleen in die gevallen waarin het enzym aan het DNA wordt gebonden wordt ook een afbraak van het DNA waargenomen.

<sup>x</sup>Wij zijn Dr.G.P. van der Schans zeer erkentelijk voor het beschikbaar stellen van het  $\text{PM2}$  DNA.

Tabel V-1. Invloed van de structuur van het DNA op binding en afbraak.

DNA	type	binding afbraak	
T7	dubbelstrengig, lineair	+	+
$\lambda$	" " ,enkelstr.einden	+	+
T7 (na exo III)	" " " "	-	-
$\emptyset$ X174 RF	" circulair	-	-
PM2	" "	-	-
$\emptyset$ X174	enkelstrengig, "	-	-

Naast de specificiteit van de binding hebben we bepaald hoeveel enzym aan een DNA molekuul kan binden. Door het T7 DNA te incuberen met toenemende hoeveelheden van het enzym en dan te meten hoeveel enzym aan het DNA wordt gebonden, kon de maximale hoeveelheid enzym, die een DNA molekuul kan binden, worden bepaald. Bij een hoeveelheid van 7,0 eenheden enzym per  $\mu\text{g}$  T7 DNA was het DNA verzadigd met het enzym (voor berekening van het aantal molekulen enzym per molekuul DNA, zie tabel V-4). Bij toevoeging van grotere hoeveelheden enzym werd ook enzym terug gevonden op de plaats van ongebonden enzym.

#### 4. Extractie van het DNA-enzym complex

Een tweede methode om een complex tussen het enzym en het DNA in aanwezigheid van  $\text{Mg}^{2+}$  aan te tonen, is de extractie in een twee fasen systeem. Een waterige oplossing van polyethyleenglycol en dextran scheidt zich in twee fasen, waarin, afhankelijk van zoutconcentraties en pH, eiwitten en DNA verschillende verdelingscoëfficiënten hebben. (Alberts, 1967). Wanneer de polyethyleenglycol en de dextran opgelost worden in de incubatie buffer voor het ATP-afhankelijke DNAase (0,05 M Tris-HCl (pH 9,0), 0,025 M  $\text{MgSO}_4$ ) blijkt dat dubbelstrengig DNA voor meer dan 95% in de onder (=dextran) fase komt (zie fig.V-2). In afwezigheid van DNA is het enzym vrijwel gelijk over beide fasen verdeeld en in fig.V-2 is de enzymactiviteit in de bovenfase op 100% gesteld. Eiwit (het enzym) is in de twee fasen in gelijke concentratie

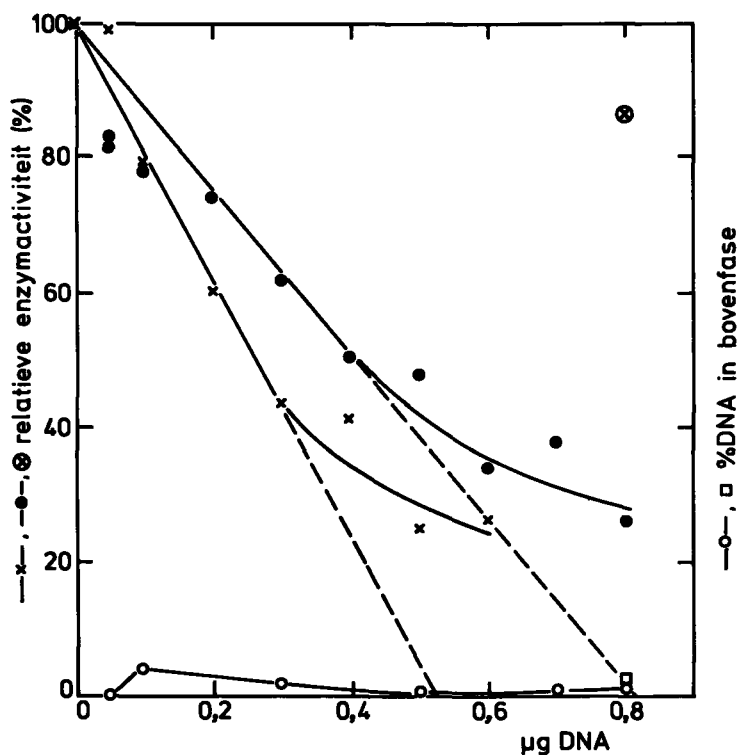


Fig.V-2. Fasescheiding in een waterige oplossing van polyethyleenglycol en dextran. Het ATP-afhankelijke DNAase werd in afwezigheid van ATP met verschillende hoeveelheden T7[<sup>32</sup>P]DNA gefincubeerd (15 min bij 30°C). In een experiment werd ØX174 RF [<sup>32</sup>P]DNA gebruikt. Na extractie van het DNA-enzym complex met een mengsel van polyethyleenglycol en dextran werden de DNA concentratie (—○— T7 DNA en □ ØX DNA) en de hoeveelheid enzym in de bovenfase bepaald. De radioactiviteit is weergegeven als het percentage van de totale radioactiviteit. De enzymactiviteit is weergegeven als het percentage van de activiteit die wordt gevonden in afwezigheid van DNA. In de figuur zijn de resultaten van twee onafhankelijke experimenten uitgezet.

9,0 eenheden enzym per proef —●—  
 8,0 eenheden enzym per proef —x—

Voor de proef met ØX RF DNA ■ werden 9,0 eenheden gebruikt.  
 Elk punt is het gemiddelde van twee extracties.

aanwezig. Bij vorming van een complex tussen DNA en enzym wordt het enzym, gebonden aan het DNA, ook naar de onderlaag geëxtraheerd. Deze binding kan op eenvoudige wijze worden aangetoond door de afname van de enzymactiviteit in de bovenfase te meten. Met toenemende hoeveelheden DNA in het incubatiemengsel daalt de enzymatische activiteit in de bovenfase, hetgeen wijst op complexvorming. Bij lage DNA concentraties is de afname van de enzymactiviteit evenredig met de hoeveelheid toegevoegd DNA. Bij hogere DNA concentraties wordt een dergelijke evenredigheid niet gevonden. Voor dit laatste verschijnsel is geen bevredigende verklaring te geven. Wanneer de afname van enzymactiviteit wordt uitgezet tegen de DNA concentratie, wordt voor de lagere DNA concentraties een rechte lijn gevonden. Uit de helling bij deze lage DNA concentraties hebben we berekend dat 11 - 15 eenheden door 1  $\mu\text{g}$  T7 DNA worden gebonden (zie ook tabel V-4).

In een controle experiment werd dubbelstrengig circulair DNA aan het enzym toegevoegd voor de extractie. Dit DNA geeft geen vermindering van de enzymactiviteit in de bovenfase, hoewel het DNA wel goed wordt geëxtraheerd. De conclusie is dus weer dat dubbelstrengig circulair DNA geen enzym bindt en dat het enzym dus uitsluitend aan de einden van een DNA keten bindt.

## 5. Competitie experimenten

Nu vastgesteld is dat DNA en enzym in aanwezigheid van  $\text{Mg}^{2+}$  een stabiel en specifiek complex kunnen vormen is het van belang om te bepalen of deze complexvorming de eerste stap is in het afbraakproces. Om dit vast te stellen werden competitie proeven uitgevoerd.

In het experiment werd eerst een DNA-enzym complex gevormd door T7 [ $^{32}\text{P}$ ]DNA te incuberen met het enzym. Vervolgens werd een grote overmaat niet-radioactief DNA toegevoegd, waarna de afbraakreactie werd gestart door toevoegen van ATP. Wanneer de vorming van het complex inderdaad de eerste stap van de reactie is, is te verwachten dat het gebonden DNA het eerst afgebroken zal worden. Om deze reden werd de afbraak van het [ $^{32}\text{P}$ ]DNA onder deze omstandigheden vergeleken met de afbraak in een controle experiment waarin wel dezelfde hoeveelheden

[<sup>32</sup>P] en niet-radioactief DNA met het enzym worden geïncubeerd, maar waarin het enzym met beide soorten DNA tegelijk is gemengd in plaats van alleen met het [<sup>32</sup>P]DNA. In tabel V-2 zijn de resultaten van enkele van deze competitie experimenten samengevat. De hoeveelheid enzym is zo gekozen dat het [<sup>32</sup>P]DNA juist met enzym verzadigd is. De afbraak werd bij lagere temperatuur uitgevoerd om de afbraaksnelheid te verlagen. Hierdoor blijft een enzym molecuul tijdens het experiment aan hetzelfde DNA molecuul gebonden, zodat de uitkomst niet wordt beïnvloed doordat het enzym opnieuw bindt aan een ander DNA molecuul. Het gebonden radioactieve DNA wordt sneller afgebroken dan de rest van het DNA, waaruit volgt dat het eerder wordt afgebroken. Hieruit volgt dat de binding van het enzym aan het DNA de eerste stap is in de enzymatische afbraak van het DNA door het ATP-afhankelijke DNAase.

Tabel V-2. Preferentiële afbraak van gebonden DNA.

Incubatie omstandigheden		afbraak van het T7[ <sup>32</sup> P]DNA (%)	
temperatuur (°C)	tijd (min)	voorincubatie alleen met [ <sup>32</sup> P]DNA	voorincubatie [ <sup>32</sup> P]DNA +koud DNA
0	5	11,2	0,85
	10	15,1	1,70
15	1	15,1	1,35
	2	21,6	2,6
	3	27,4	5,5

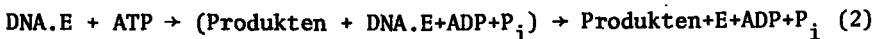
## 6. Kinetische experimenten

Uit de vorige paragrafen volgt dat de afbraakreactie van DNA met het ATP-afhankelijke DNAase uit (minstens) twee stappen bestaat.

1. De vorming van een DNA-enzym complex, voorgesteld door



2. De afbraak, waarbij het enzym aan het DNA gebonden blijft tot het DNA volledig is afgebroken.



Deze twee reacties kunnen afzonderlijk worden bestudeerd daar (1)

verloopt in afwezigheid van ATP.

### A. De binding

Er werden enkele proeven gedaan om een indruk te krijgen van de snelheid waarmee het complex wordt gevormd. Gemeten werd de afbraak van DNA dat wel en van DNA dat niet in een complex met het enzym was gebonden. Wanneer voor vorming van het complex een meetbaar lange tijd nodig is moet DNA dat al gebonden is aan het enzym in aanwezigheid van  $Mg^{2+}$  verder worden afgebroken dan het niet gebonden DNA.

De proef wordt als volgt uitgevoerd: het enzym wordt 10 min bij  $30^{\circ}C$  geïncubeerd, in een proef met, en in een tweede proef zonder DNA. Na koelen wordt de afbraak gestart door het toevoegen van de ontbrekende componenten: ATP in het eerste experiment, ATP en DNA in het tweede. De afbraak wordt weer bij lage temperatuur uitgevoerd om te voorkomen dat een enzym molecuul een DNA molecuul volledig afbreekt en dus een tweede maal zal binden. In de tabel V-3 zijn de resultaten van een representatief experiment vermeld. Daaruit blijkt dat het gebonden DNA iets verder wordt afgebroken, het verschil is echter groter bij lagere DNA en enzym concentraties. Uit deze experimenten kan overigens slechts een kwalitatieve indruk van de snelheid van de bindingsreactie worden verkregen.

Tabel V-3. Invloed van voorincubatie op de afbraak.

conc. DNA ( $\mu g$ per proef)	conc. enzym (eenheden per proef)	Afbraak (% zuuroplosbaar)	
		voorincubatie van het enzym met DNA	zonder DNA
2,0	20	10,8	9,2
1,5	15	10,2	8,4
1,0	10	10,1	8,3
0,5	5	8,7	7,3
0,2	2	7,2	5,0
0,1	1	5,9	3,3

### B. Kinetiek van de afbraak

De kinetiek van de afbraak kan worden bepaald wanneer van te voren het complex tussen DNA en enzym gevormd is in aanwezigheid van  $Mg^{2+}$ . Hiertoe werden DNA en enzym steeds 15 min bij  $30^{\circ}C$  met elkaar geïncu-

cubeerd. De afbraakreactie werd na koelen tot 0°C gestart door ATP aan het mengsel toe te voegen. De reactie werd bij 0°C uitgevoerd omdat bij hogere temperatuur (30°C bijv.) de afbraak zo snel verloopt dat nauwkeurige metingen niet mogelijk zijn.

De afbraak van het DNA werd gemeten door bepaling van de vorming van zuuroplosbaar materiaal. Het zuuroplosbaar materiaal vertegenwoordigt echter slechts een deel van de afbraakprodukten. Aangezien de verhouding tussen het zuuroplosbare deel van de afbraakprodukten en de totale hoeveelheid afbraakprodukten (gemeten op suikergradiënten) redelijk constant is (fig.V-3) onder de door ons gekozen reactieomstandigheden, is het verantwoord deze bepalingsmethode te gebruiken.

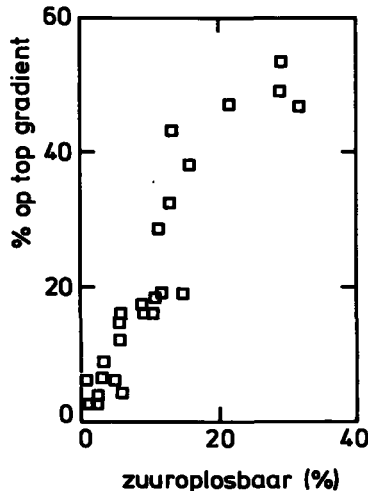


Fig.V-3. Afbraak van DNA, gemeten als zuuroplosbaar materiaal en als materiaal op de top van gradiënten.

In dit experiment werd de afbraaksnelheid bepaald als de hoeveelheid DNA die in drie minuten zuuroplosbaar werd gemaakt bij 0°C. De incubatietijd werd kort gehouden om de beginsnelheid zo goed mogelijk te benaderen. Maximaal 10% van het DNA werd zuuroplosbaar gemaakt in deze experimenten. De resultaten zijn samengevat in fig.V-4, waarin elk punt in de grafiek het gemiddelde is van vier experimenten. Voor drie DNA concentraties (2,0 µg, 1,0 µg en 0,5 µg per proef) werd



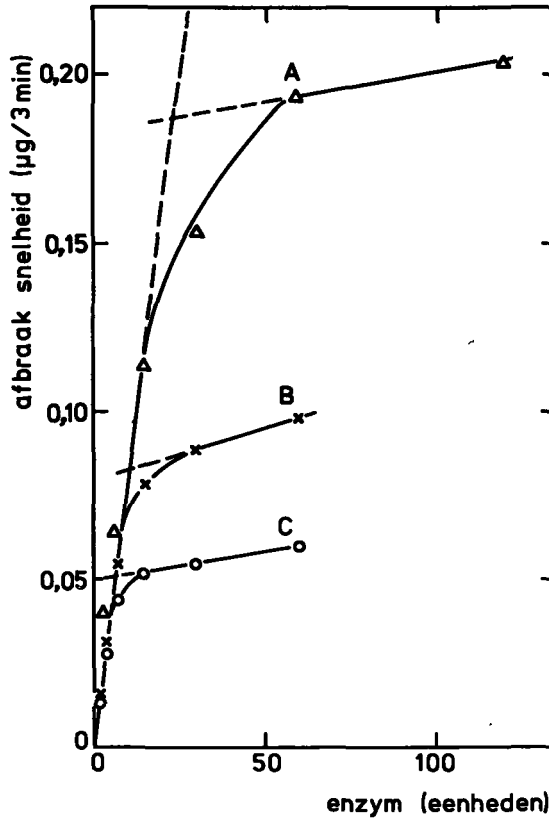


Fig.V-4. Snelheid van de afbraak van T7 DNA als functie van de enzymconcentratie. Na een voorincubatie van het enzym met het DNA bij 30°C (A:2,0 µg; B:1,0 µg en C:0,5 µg DNA) zonder ATP werd het reactiemengsel gekoeld tot 0°C. Hierna werd ATP toegevoegd en nog 3 min geïncubeerd bij 0°C. De afbraaksnelheid is weergegeven als de hoeveelheid DNA (in µg) die in 3 min zuuroplosbaar wordt gemaakt.

de afbraaksnelheid als functie van de enzymconcentratie gemeten. Bij lage enzymconcentraties vallen de curves samen. Bij hoge enzymconcentraties bereikt de afbraaksnelheid een plateau, waarvan de hoogte evenredig is met de DNAconcentratie. Hieruit volgt, dat bij het buigpunt van de kromme het DNA juist met enzym is verzadigd. Bij een ondermaat enzym is de afbraaksnelheid alleen afhankelijk van en evenredig met de enzymconcentratie. Bij een overmaat enzym is de afbraaksnelheid evenredig met de DNAconcentratie. In deze gevallen

van overmaat enzym of overmaat DNA is er dus een eerste orde kinetiek. Een mechanisme zoals in fig. V-5 is afgebeeld, waarbij steeds twee molekulen DNA door één molekuul enzym worden afgebroken, kan nu worden uitgesloten. Tijdens de vorming van het DNA-enzym complex worden namelijk geen DNA molekulen gekoppeld, het complex sedimenteert op de plaats van T7 DNA (fig.V-1). Een structuur zoals in fig. V-5 afgebeeld, zou dus moeten ontstaan tijdens de afbraak, dus na toevoegen van het ATP. De concentratie enzym in het buigpunt van de krommes, gevonden door extrapolatie van de lineaire gedeelten geeft ons hoeveel enzym aan het DNA bindt. Als gemiddelde voor de drie DNA-concentraties wordt 12 eenheden enzym per  $\mu\text{g}$  T7 DNA berekend (zie ook tabel V-4).

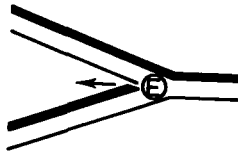


Fig.V-5. Denkbeeldige afbraak van twee DNA molekulen door een molekuul van het ATP-afhankelijke DNAase.

In dit afbraakmechanisme breekt een enzymmolekuul tegelijk ketens van het 3'eind en het 5'eind van twee DNA molekulen af. Tegelijk worden de twee overblijvende ketens samengevoegd.

## 7. Discussie en samenvatting

In dit hoofdstuk zijn experimenten behandeld die aantonen dat de afbraak van DNA met het ATP-afhankelijke DNAase in twee stappen verloopt:

### 1. Binding van het enzym aan het DNA.

Voor deze reactie is geen ATP nodig.

### 2. De afbraak van het DNA.

De bindingsproeven zijn in verband met de stabiliteit van het enzym steeds uitgevoerd in aanwezigheid van  $\text{Mg}^{2+}$ . We hebben geen aanwijzingen of  $\text{Mg}^{2+}$  ionen voor de binding nodig zijn.

Het enzym breekt slechts DNA af dat dubbelstrengig is. Korte stukken enkelstrengig DNA aan de einden van het DNA molekuul ( $\lambda$  DNA) vertragen

de afbraak, langere enkelstreng stukken (T7 DNA na exonuclease III) reduceren de afbraaksnelheid tot vrijwel nul (zie hoofdstuk III).

Uit bindingsstudies op glycerolgradiënten bleek dat het enzym aan de einden van het lineaire DNA bindt. In die gevallen waar geen afbraak plaats vindt blijkt ook de binding van het enzym aan het DNA gestoord te zijn.

Uit drie verschillende types experimenten werd bepaald hoeveel enzym aan een bepaalde hoeveelheid DNA bindt. In tabel V-4 zijn deze resultaten bijeengebracht.

Tabel V-4. Molekuulverhouding in het DNA-enzym complex.

experiment	eenheden enzym per $\mu\text{g}$ DNA	molekullen enzym per molekuul DNA
centrifugeren op glycerolgradiënten	7,0	1,4
extractie in polyethyleen- glycol - dextran	11,0 - 15,1	2,2 - 3,1
kinetische experimenten	12,0	2,4

Dat de waarde, gevonden met de glycerolgradiënten wat lager is dan die welke berekend worden uit de andere twee experimenten, wordt verklaard door:

1. een gedeeltelijke dissociatie van het complex gedurende centrifugeren.
2. gedeeltelijke inactivering van het enzym tijdens het centrifugeren.
3. de aanwezigheid van een zeer kleine verontreiniging van het T7 DNA met bijvoorbeeld gebroken T7 DNA molekulen.

Het aantal einden zou hierdoor groter zijn dan berekend. Tengevolge van een dergelijke verontreiniging zouden de uitkomsten van de extractie en kinetische experimenten te hoog uitkomen, terwijl in de glycerolgradiënten de verhouding DNA/enzym slechts wordt bepaald voor het ongebroken DNA.

Uit de gemeten binding van het enzym aan het DNA is te berekenen hoe groot het aantal molekulen enzym is dat per DNA molekuul wordt gebonden.

Hiervoor moeten wel de specifieke activiteit van het zuivere enzym en het molekulgewicht van het enzym bekend zijn. Uit de sedimentatie-coëfficiënt kan een ruwe schatting van het molekulgewicht gemaakt worden met behulp van de relatie van Hallsall (1967). Er wordt dan een molekulgewicht van 300000 dalton gevonden. Uit de electroforese op polyacrylamide gels kan een schatting van de zuiverheid van het enzym-preparaat gemaakt kan worden; deze zuiverheid bedraagt ongeveer 50%. Met deze gegevens kan het aantal molekulen enzym per molekuul DNA worden berekend. Deze waarden zijn in tabel V-4 gegeven. Uit deze waarden volgt dat per DNA molekuul 2 enzym molekuul worden gebonden, dat is één per eind. Uit de kinetische experimenten kan bovendien de afbraaksnelheid berekend worden bij 0°C. Wanneer hierbij rekening wordt gehouden met de verhouding echte afbraak/zuuroplosbaar, dan wordt gevonden dat het T7 DNA molekuul met een molekulgewicht van  $26,4 \cdot 10^6$  dalton ( $4,4 \cdot 10^4$  baseparen) in 3 min voor 20% wordt afgebroken en wel door twee enzym molekulen. Bij 0°C breekt een enzym molekuul per minuut dus  $\sim 1500$  baseparen van het DNA molekuul af.

## HOOFDSTUK VI. DE INVLOED VAN REMMERS

### 1. Inleiding

Het gebruik van verbindingen die een enzym remmen kan nuttige gegevens opleveren over het werkingsmechanisme van dat enzym, in het bijzonder wanneer zo'n remmer selectief één van een uit meer stappen bestaande reactie blokkeert. Zoals in het vorige hoofdstuk is uiteengezet kan de afbraak van DNA door het ATP-afhankelijke DNAase in tenminste 2 reacties worden ontleed, te weten de bindingsreactie en de eigenlijke afbraak.

Van een aantal verbindingen werd daarom nagegaan of ze het ATP-afhankelijke DNAase remmen. Een aantal van deze verbindingen werd gekozen op grond van hun vermogen om één of meer stappen in de DNA afhankelijke RNA synthese door RNA-polymerase te remmen, namelijk rifampicine (Hartmann e.a., 1967), heparine (Zillig e.a., 1970), streptolygidine (Siddhikol e.a., 1969), bengaal rose (Wu en Wu, 1973) en actinomycine D (Hurwitz e.a., 1962).

Het RNA-polymerase immers lijkt in zoverre op het ATP-afhankelijke DNAase dat het eveneens een enzym is dat aan DNA bindt en langs het DNA beweegt tijdens de polymerisatie van nucleoside-trifosfaten. Van dextransulfaat was bij toeval gebleken dat het in zeer lage concentraties het enzym remt.

Tenslotte werd ook het effect van  $\beta$ - $\gamma$  methyleen ATP (met in plaats van een O-atoom een  $\text{CH}_2$ -groep tussen het  $\beta$  en  $\gamma$  P-atoom van het ATP) bestudeerd (zie ook Ohi en Sueoka, 1973).

### 2. Oriënterend onderzoek naar de remmende werking van zeven verbindingen.

In tabel VI-1 is het globale effect weergegeven van zeven verbindingen op de DNAase activiteit van het ATP-afhankelijke DNAase. Voor rifampicine, heparine en streptolygidine werd geen enkel effect op de DNAase activiteit gevonden bij een concentratie die voldoende was om de activiteit van RNA-polymerase te remmen. Het  $\beta$ - $\gamma$  methyleen ATP werd getest in aanwezigheid van verschillende concentraties ATP. De ATP-afhankelijke

Tabel VI-1. Remming van de DNAase activiteit.

	concentratie µg/ml	remming
rifampicine	25	-
heparine	25	-
streptolygidine	250	-
bengaals rose	25	+
actinomycine D	25	+
dextransulfaat	0,25	+
β-γ methyleen ATP	(zie tekst)	-

DNAase activiteit werd echter zelfs in aanwezigheid van een tien maal zo grote hoeveelheid β-γ methyleen ATP als ATP in het geheel niet geremd. Actinomycine D, bengaa's rose en dextransulfaat remmen het enzym wel en werden daarom verder bestudeerd.

### 3. Remming van de DNAase en ATPase activiteit

Onderzocht werd of dextransulfaat, actinomycine D en bengaa's rose behalve de DNAase activiteit ook de ATPase activiteit van het enzym remmen. In tabel VI-2 zijn de resultaten van deze experimenten weergegeven. Daaruit blijkt dat de drie bovengenoemde verbindingen beide activiteiten van het enzym remmen. Uit de verhouding tussen de ATPase

Tabel VI-2. Het effect van remmers op de ATPase en DNAase activiteit.

exp.	enzym concentratie (eenheden)	remmer	concentratie (µg/ml)	DNAase <sup>x</sup> (nmolen)	ATPase <sup>x</sup> (nmolen)	ATPase/ DNAase
1	2,4	-	-	1,9	0,8	0,4
	2,4	dextransulfaat	2,5	0	0	-
	2,4	bengaa's rose	25,0	0	0	-
	2,4	actinomycine D	2,5	0,2	0,4	2,0
2	4,8	-	-	3,5	2,0	0,6
	4,8	actinomycine D	2,5	0,4	1,2	3,0

<sup>x</sup>De DNAase activiteit is weergegeven als de hoeveelheid DNA (in nmolen) die is afgebroken na een incubatie gedurende 30 min bij 30°C bij een ATP concentratie van 0,033 mM. De ATPase activiteit is weergegeven als de hoeveelheid ATP (in nmolen) die gedurende dezelfde periode is gehydrolyseerd.

en DNAase activiteit is te zien dat actinomycine D ATPase en DNAase activiteiten ontkoppelt: de DNAase activiteit wordt sterker geremd dan de ATPase werking. Deze situatie lijkt op de ont koppeling van ATPase en DNAase activiteit die door Karu en Linn (1972) voor het ATP-afhankelijke DNAase uit *E. coli* werd gevonden wanneer DNA met "crosslinks" als substraat werd gebruikt. Geen conclusies kunnen getrokken worden over een eventuele ont koppeling door dextransulfaat of door bengals rose.

#### 4. Nadere analyse van de remming door dextransulfaat

Dextransulfaat remt het ATP-afhankelijke DNAase al bij een zeer lage concentratie. In fig.VI-1 is de enzymactiviteit als functie van de concentratie aan dextransulfaat weergegeven voor twee enzymconcentraties. Uit deze proef blijkt dat bij een tienmaal zo grote enzymconcentratie, ook de concentratie aan dextransulfaat nodig om een vergelijkbare remming van de enzymactiviteit te krijgen, tien maal hoger is. Op grond van deze uitkomst en rekening houdend met bekende gegevens

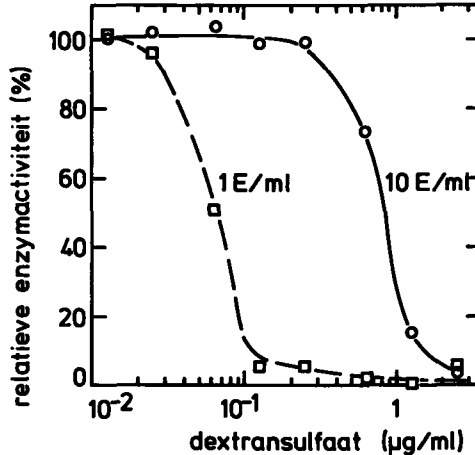


Fig.VI-1. Remming van het ATP-afhankelijke DNAase door dextransulfaat.

De enzymactiviteit in afwezigheid van de remmer is op 100% gesteld. Incubaties werden bij 30°C uitgevoerd, met 1 eenheid van het enzym gedurende 30 min (—□—) en met 10 eenheden gedurende 5 min (—○—).

voor de specifieke activiteit van het enzym (1 eenheid =  $4,8 \cdot 10^9$  molekulen), voor het molekulgewicht van het enzym (300000, zie hoofdstuk V-2) en van het dextranulfaat ( $2 \cdot 10^6$ ) kunnen we berekenen dat 1 molekuul dextranulfaat voldoende is om 1 enzym molekuul te inactiveren. Aannemende dat de remmende werking van het dextranulfaat veroorzaakt wordt door de aanwezigheid van de sterk negatief geladen sulfaatgroepen die het dextranulfaat tot een analoog van DNA maken, is getracht de remmende werking van dextranulfaat op te heffen door gebruik te maken van stoffen die de lading van het dextranulfaat neutraliseren. Het bleek dat het positief geladen polyamine spermidine in staat was om de remmende werking van dextranulfaat geheel te neutraliseren. In tabel VI-3 is te zien dat 250  $\mu\text{g}$  spermidine per ml het enzym geheel reactiveert, terwijl deze concentratie spermidine de ongeremde reactie vrijwel niet beïnvloedt.

Tabel VI-3. Reactivering door spermidine van het geremde enzym.

		Afbraak tot zuuroplosbaar materiaal (%)	
		zonder dextranulfaat	met dextranulfaat
controle		59,3	2,6
+spermidine	0,25 $\mu\text{g/ml}$	65,9	3,1
"	2,5 "	64,5	2,1
"	25,0 "	62,5	4,7
"	250 "	59,3	60,5

Uit het experiment van fig.VI-2 blijkt dat het enzym door de remmer wordt gebonden. Een mengsel van het ATP-afhankelijke DNAase en dextranulfaat werd op een Sephadex G-200 kolom gebracht en geëluëerd. In het eluaat werd de plaats van het enzym bepaald door de enzymactiviteit te meten na het toevoegen van spermidine aan de incubatiemengsels. De plaats van het dextranulfaat werd gevonden door de remmende werking van 0,1 ml van elke fractie op een enzymincubatie te meten. In een apart experiment werd het vrije ATP-afhankelijke DNAase op dezelfde kolom gechromatografeerd. We zien dat door de aanwezigheid van het dextranulfaat het enzym verschuift in de richting van het uitsluitvolume waar ook het veel grotere dextranulfaat gevonden wordt. Dit



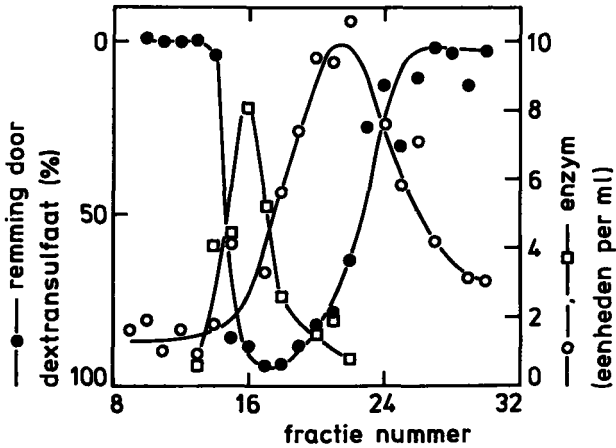


Fig.VI-2. Detectie van een enzym-dextransulfaat complex door gelfiltratie op een Sephadex G-200 kolom.

De resultaten van twee experimenten zijn in een grafiek uitgezet. In het ene experiment werd alleen enzym (100 eenheden) gechromatografeerd op een Sephadex G-200 kolom (—○—). In het andere experiment werd een mengsel van enzym (100 eenheden) en 100 µg dextransulfaat gechromatografeerd over dezelfde Sephadex kolom. In het eluaat van deze kolom werden de enzymactiviteit en de aanwezigheid van remmer getest. De enzymactiviteit werd gemeten van 0,1 ml van elke fractie in aanwezigheid van spermidine (—□—). De plaats van het dextransulfaat werd bepaald door 0,1 ml van elke fractie toe te voegen aan een incubatie met 2 eenheden enzym en 2 µg T7[<sup>32</sup>P]DNA (—●—) en de remming van de afbraak te bepalen. De uitkomst van de niet geremde fractie werd op 0% gesteld.

wijst er op dat het enzym een stabiel complex vormt met het dextransulfaat.

Behalve het vrije enzym wordt ook het aan DNA gebonden enzym geremd door dextransulfaat. Deze remming is echter veel langzamer en minder volledig dan die van het vrije enzym. In deze experimenten werden complexen van DNA met enzym bij 0°C of 30°C geïncubeerd met dextransulfaat. Hierna werd de afbraakreactie gestart door toevoeging van ATP en werd de afbraaksnelheid bepaald in een incubatie van 10 min bij 0°C. Uit de fig.VI-3 blijkt dat bij toenemende tijd van incubatie met het dextransulfaat de snelheid van de DNA afbraak vermindert. De inactiveringingsnelheid van het gebonden enzym is echter veel geringer dan die van het vrije enzym. Deze resultaten doen vermoeden

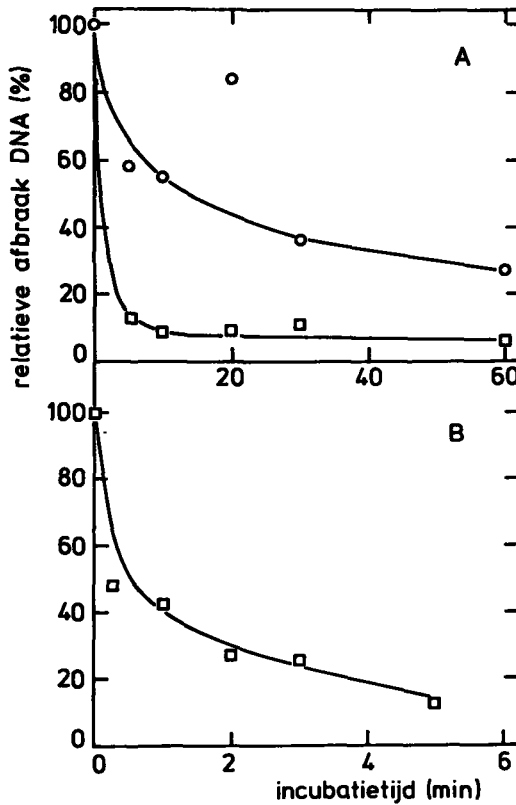


Fig.VI-3. Remming van het enzym-DNA complex met dextransulfaat.

Enzym-DNA complex werd gevormd door 2 µg T7[<sup>32</sup>P]DNA gedurende 15 min bij 30°C te incuberen met 25 eenheden enzym. Een deel van deze oplossing werd bij 30°C geïncubeerd met 1,0 µg dextransulfaat gedurende de aangegeven tijden (B). Een ander deel werd gekoeld tot 0°C en eveneens met dextransulfaat (zie A, 0,1 µg, —○—; 1,0 µg, —□—) geïncubeerd. Hierna werd ATP toegevoegd en werd de afbraak gemeten na een incubatie bij 0°C gedurende 10 min. De afbraak die gevonden wordt in afwezigheid van dextransulfaat is op 100% gesteld.

dat de remmende werking van dextransulfaat berust op de interactie van het dextransulfaat met die plaats van het enzym waar anders het DNA wordt gebonden. Wanneer het enzym-DNA complex wordt geïncubeerd met dextransulfaat bij 0°C, is er een kleine fractie van de enzymactiviteit (~10%) die resistent is tegen de remmer bij de gekozen concentratie.

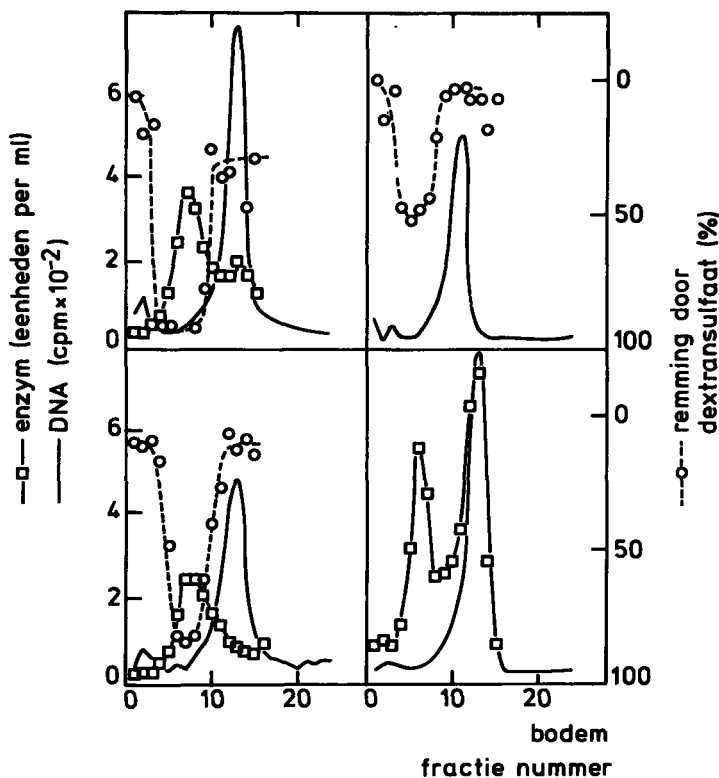


Fig.VI-4. Het effect van dextransulfaat op de vorming van een DNA-enzym complex, gemeten met behulp van glycerolgradiënten.

- A. Complex van 2  $\mu\text{g}$  T7[<sup>32</sup>P]DNA en 25 eenheden enzym werd gevormd door 15 min incuberen van deze twee componenten bij 30°C. Hierna werd 2  $\mu\text{g}$  dextransulfaat toegevoegd en nog 5 min bij 30°C gefincubeerd.
- B. 25 eenheden enzym werden gedurende 5 min met dextransulfaat en daarna gedurende 15 min met 2  $\mu\text{g}$  T7[<sup>32</sup>P]DNA gefincubeerd.
- C. 2  $\mu\text{g}$  T7[<sup>32</sup>P]DNA werd gedurende 5 min gefincubeerd met 2  $\mu\text{g}$  dextransulfaat.
- D. 2  $\mu\text{g}$  T7[<sup>32</sup>P]DNA werd gedurende 15 min met 25 eenheden enzym gefincubeerd bij 30°C.

Na incubatie werden de monsters gekoeld tot 0°C en gecentrifugeerd gedurende 3,5 uur bij 40000 rpm in een glycerolgradiënt (5-22% glycerol in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgSO<sub>4</sub>). Na afloop van de centrifugatie werden de gradiënten gefractioneerd en werd in de fracties de enzymactiviteit, de DNA concentratie en de aanwezigheid van dextransulfaat bepaald, zoals aangegeven is in het onderschrift van fig.VI-2.

—□— enzymactiviteit      — DNA      —○— bepaling van de plaats van het dextransulfaat.

De conclusie dat het dextransulfaat het enzym van het DNA verdringt onder vorming van een inactief complex van enzym en dextransulfaat, werd bevestigd door experimenten waarin het effect van dextransulfaat op de stabiliteit van DNA-enzym complexen werd onderzocht met behulp van glycerolgradiënten. Wanneer het DNA-enzym complex gedurende 5 min werd geïncubeerd met dextransulfaat en daarna gecentrifugeerd op een glycerolgradient werd het overgrote deel van de enzymactiviteit teruggevonden op de plaats van het vrije enzym (fig.VI-4A). Slechts een geringe fractie van de enzymactiviteit werd teruggevonden op de plaats van het DNA-enzym complex. Wanneer het enzym eerst geïncubeerd werd met dextransulfaat en dit enzym-dextransulfaat complex vervolgens geïncubeerd werd met DNA, werd alle enzymactiviteit teruggevonden op de plaats van het vrije enzym (fig. 4B). Blijkbaar remt het dextransulfaat de vorming van een DNA-enzym complex volledig. Uit een analyse van de glycerolgradiënten blijkt tevens dat dextransulfaat niet aan DNA bindt (fig.4C). In fig.4D is een mengsel van enzym en DNA gecentrifugeerd.

#### 5. Remming door bengaals rose

Bengaals rose is een bekende remmer voor RNA polymerase. Deze remming wordt veroorzaakt door vorming van een inactief complex van de kleurstof met het enzym (Wu en Wu 1973). Zoals uit tabel VI-2 blijkt wordt ook het ATP-afhankelijke DNAase geremd door bengaals rose. Bij een concentratie van  $1,5 \cdot 10^{-3}$  mM remt bengaals rose de DNAase activiteit voor 50%. Eenzelfde concentratie is nodig om een vergelijkbare remming van het RNA-polymerase te krijgen (Wu en Wu 1973). Evenals bij het RNA-polymerase vindt de inactivering van het ATP-afhankelijke DNAase waarschijnlijk plaats door een interactie van de kleurstof met het enzym: bij pogingen om de kleurstof te verwijderen uit een enzym-kleurstof mengsel door dialyse, gelfiltratie op Sephadex G-200 of centrifugeren op een glycerolgradiënt vond geen reactivering van de enzymactiviteit plaats. Pogingen om op grond van de fluorescerende eigenschappen van de kleurstof een binding aan het enzym vast te stellen hadden geen succes. De lage enzymconcentraties die in deze proeven gebruikt worden, is hier mogelijk de oorzaak van.

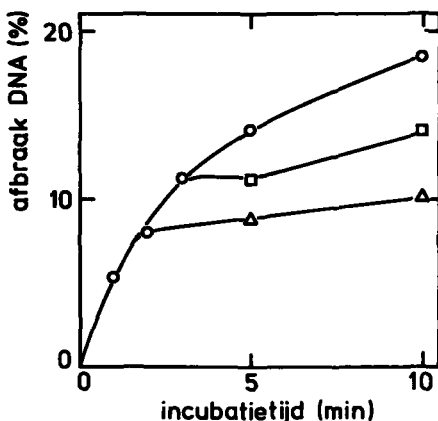


Fig.VI-5. Remming van het ATP-afhankelijke DNAase door bengaals rose.

2  $\mu\text{g}$  T7[ $^{32}\text{P}$ ]DNA werd bij  $0^\circ\text{C}$  met 25 eenheden enzym gefincubeerd. De afbraak tot zuuroplosbaar materiaal werd gemeten als functie van de tijd. Twee of drie minuten na de start van de reactie werd 10  $\mu\text{g}$  bengaals rose aan het reactiemengsel toegevoegd, waarna de incubatie werd voortgezet en de afbraak bepaald. —○—: afbraak in afwezigheid van bengaals rose; —△— bengaals rose toegevoegd na 2 min; —□— : bengaals rose toegevoegd na 3 min.

Wanneer bengaals rose tijdens de afbraak van het DNA (bij  $0^\circ\text{C}$ ) werd toegevoegd, werd de DNAase activiteit onmiddellijk geremd (fig.VI-5). Hierdoor blijkt dat ook enzym dat aan DNA gebonden is wordt geremd.

## 6. Discussie

In dit hoofdstuk zijn experimenten met enkele remmers van het ATP-afhankelijke DNAase beschreven.

Het dextranulfaat kan met het enzym een inactief complex vormen en blokkeert daardoor de vorming van een enzym-DNA complex. Waarschijnlijk bindt het dextranulfaat op de plaats waar ook het DNA aan het enzym wordt gebonden. Dit betekent dat deze plaats op het enzym sterk positief geladen is.

Actinomycine D remt de DNAase activiteit van het enzym sterker dan de ATPase activiteit. Kennelijk vormt het complex van actinomycine D met DNA een barriere voor het enzym waarop het enzym "slipt" op een

manier die vergelijkbaar is met de situatie die door Karu en Linn (1972) is gevonden bij het enzym uit *E. coli* met "gecroslinked" DNA als substraat. Verdere bestudering van dit verschijnsel kan misschien aanwijzingen over de functie van het ATP leveren.

Bengaals rose remt het enzym irreversibel en vrijwel direct. Over het mechanisme van deze remming zijn geen verdere gegevens beschikbaar.

Mogelijk dat hier met fluorescentie technieken iets bereikt kan worden (zie ook Wu en Wu, 1973).

## HOOFDSTUK VII. VERGELIJKEND ONDERZOEK OVER EXONUCLEASE V

## 1. Inleiding

Door Zwenk (1969) en Glickman e.a. (1971) werd een mutant van *E. coli* beschreven, de *E. coli rorA*, die röntgegevoelig, maar UV resistent is. Hoewel het gemuteerde gen in het gebied van de *recB* en *recC* genen gelegen is, is de stam wel  $\text{Rec}^+$  en bevat de ATP-afhankelijke DNAase activiteit (exonuclease V). Na bestraling met röntgenstraling treedt een aanzienlijk grotere afbraak van het DNA op in deze stam in vergelijking met de wilde-type bacterie. Uit verdere genetische studies is gebleken dat de *rorA* mutatie in of zeer dichtbij het *recB* gen is gelegen (persoonlijke mededeling van Glickman). Het was echter niet mogelijk om door een complementatieproef ondubbelzinnig de ligging van dit gen vast te stellen omdat het *ror*<sup>-</sup> allel dominant is over het *ror*<sup>+</sup> allel.

Om te verklaren waarom de RorA mutant zich onderscheidt van de RecB mutant, zouden we kunnen veronderstellen dat de mutatie in het *recB* gen gelegen is en een verandering van het enzym tot gevolg heeft, dan wel dat de mutatie in een zeer dicht naast het *recB* gelegen gen, dat een regelende functie heeft, ligt. We hebben daarom het exonuclease V uit wilde-type cellen en uit RorA mutant cellen geïsoleerd en gezuiverd en een aantal eigenschappen van de enzymen vergeleken. Hierbij is gebleken dat het enzym uit de RorA mutant inderdaad veranderde eigenschappen bezit en dat de mutatie dus gelegen is in één van de structurele genen voor het ATP-afhankelijke DNAase.

## 2. De enzympreparaten

Het exonuclease V uit *E. coli* (wilde-type) en *E. coli* RorA werd gezuiverd zoals beschreven in hoofdstuk II. De twee stammen bevatten ongeveer evenveel enzymactiviteit per mg eiwit en de opbrengst (tabel VII-1) van de procedure was ongeveer gelijk, namelijk 10%. Daar de eiwitconcentratie laag was (<100 µg/ml), was het niet mogelijk de specifieke activiteit van het gezuiverde enzym op nauwkeurige wijze te bepalen. Er waren wat dat betreft echter geen grote verschil-

Tabel VII-1. Opbrengst van de isolering van het exonuclease V (wilde-type en RorA)

	ml	opbrengst	
		eenheden	eenheden per gram cellen
RorA enzym (234 g cellen)	20	3780	16,2
wilde-type enzym (182 g cellen)	20	3180	17,5

De reactiecondities zijn beschreven in hoofdstuk II. De incubatietijd was 40 min.

len tussen de twee enzympreparaten waar te nemen. Voor de zuiverheid van de enzympreparaten is evenwel vooral de aan- of afwezigheid van andere nucleases en ATPases belangrijk. Dit soort verontreinigingen is gemeten als ATP-onafhankelijke DNAase en DNA-onafhankelijke ATPase activiteiten en de analyses daarvan zijn weergegeven in tabel VII-2. Deze activiteiten zijn zo laag dat ze niet zullen storen bij het vergelijken van de twee enzympreparaten.

Tabel VII-2. Aspecifieke DNAase en ATPase activiteiten in de enzym preparaten.

	DNAase activiteit (in nmolen)			ATPase activiteit (in nmolen)		
	+ATP	-ATP	%	+DNA	-DNA	%
wilde-type enzym	2,74	0,04	1,5	36,8	0,1	0,3
RorA enzym	3,27	0,05	1,5	82,5	2,0	2,5

### 3. Het vergelijken van de twee enzympreparaten

Met de twee in de vorige paragraaf beschreven enzympreparaten werden een aantal experimenten uitgevoerd om eventuele verschillen op te sporen. Als maat voor de hoeveelheid enzym hebben we het aantal eenheden genomen, zoals bepaald met dubbelstrengig DNA volgens de in hoofdstuk II genoemde definitie. Dit geeft echter geen garantie dat per experiment ook evenveel enzym molekulen gebruikt worden.

In het geval dat één van de twee enzymen een grotere specifieke ac-



tiviteit heeft of het DNA afbreekt tot grotere producten, die voor een kleiner deel zuuroplosbaar zijn, is het aantal eenheden geen goede maat. De resultaten van de volgende twee experimenten wijzen er echter op dat in dit opzicht de enzymen geen grote verschillen vertonen.

#### A. Analyse van de afbraakprodukten

De afbraak gemeten als zuuroplosbaar materiaal en als niet sedimenteerend materiaal op suikergradiënten, is vrijwel gelijk voor beide enzymen. (fig.VII-1). Dit wil dus zeggen dat de afbraakprodukten voor beide enzymen geen belangrijke verschillen vertonen.

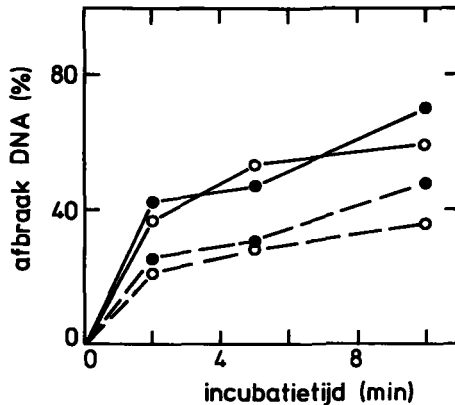


Fig.VII-1. De ATP-afhankelijke DNAase activiteit voor dubbelstrengig DNA van wilde-type en RorA enzym.

2  $\mu$ g T7[ $^{32}$ P]DNA werd met 0,6 eenheid van het wilde-type enzym of met 0,6 eenheid van het RorA enzym gefincubeerd in aanwezigheid van ATP.

De afbraak van het DNA werd bepaald door de afbraak tot zuuroplosbaar materiaal te meten en door de hoeveelheid materiaal die niet sedimenteerde op een suikergradiënt te bepalen.

- RorA enzym
- wilde-type enzym
- afbraak gemeten als zuuroplosbaar materiaal
- afbraak gemeten als niet sedimenteerend materiaal op suikergradiënten.

### B. Verzadiging van het DNA met enzym

Wanneer de afbraaksnelheid bepaald wordt met steeds grotere hoeveelheden enzym, dan zal bij een bepaalde enzymconcentratie het maximum van de afbraaksnelheid gevonden worden. Het DNA is dan met het enzym verzadigd (zie ook hoofdstuk V). In het experiment van fig.VII-2 wordt gevonden dat voor beide enzymen de maximale afbraaksnelheid gelijk is. Er wordt dan 0,15 - 2,0  $\mu\text{g}$  DNA in 2 min afgebroken tijdens een incubatie bij 30°C. Dit wil zeggen dat voor beide enzymen geldt dat 6-9 eenheden zoveel enzym molekulen bevatten dat de einden van 1  $\mu\text{g}$  T7 DNA met enzym verzadigd zijn.

### C. Activiteit op enkelstrengig DNA

Allereerst werd de endonuclease activiteit van beide enzymen op enkelstrengig DNA vergeleken. Deze activiteit vereist niet de aanwezigheid van ATP maar wordt wel door ATP gestimuleerd. Wanneer circulair  $\phi\text{X174}$  DNA geïncubeerd werd met gelijke hoeveelheden van beide enzymen in afwezigheid van ATP, werd geen duidelijk verschil in afbraak waargenomen (fig. 3A en B). In aanwezigheid van ATP, waarbij behalve een verhoogde endonuclease activiteit, ook de exonuclease activiteit gemeten wordt op de gevormde lineaire molekulen, werd evenmin een duidelijk verschil in activiteit waargenomen tussen de twee enzymen (fig.VII-3 C en D).

### D. ATP-afhankelijkheid

In fig. VII-4 is de afbraak van dubbel- en enkelstrengig T7 DNA tot zuuroplosbaar materiaal uitgezet als functie van de concentratie ATP. De kleine verschillen tussen de twee curves bleken goed reproduceerbaar te zijn. In fig.VII-4B is de omzetting van ATP, bij dezelfde ATP concentratie, per nmol afgebroken DNA weergegeven. In fig. 4C tenslotte is de verhouding voor de twee stammen van dit ATP verbruik per hoeveelheid DNA uitgezet. Voor dubbelstrengig DNA verbruikt het RorA enzym 2,0 - 2,4 x zoveel ATP als het wilde-type enzym. Voor enkelstrengig DNA is dit verschil nog groter namelijk 2,4 - 4,0 x. Dit experiment geeft ons een sterke aanwijzing dat de enzymen verschillend zijn aangaande het ATP verbruik tijdens de DNA afbraak.

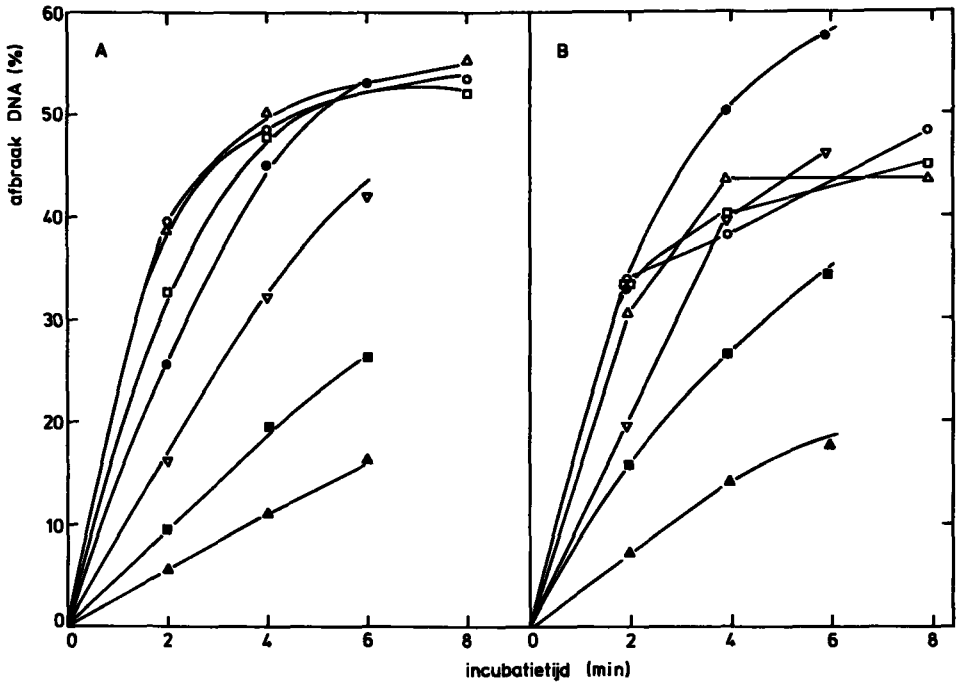


Fig.VII-2. Verzadiging van het DNA met enzym 0,5  $\mu$ g T7[ $^{32}$ P]DNA werd met toenemende hoeveelheden van het wilde-type enzym (A) of het RorA enzym (B) gefincubeerd bij 30°C gedurende de aangegeven tijden. De afbraak werd gemeten als zuuroplosbaar materiaal.

- ▲— 0,4 eenheden enzym
- 0,8 eenheden enzym
- ▽— 1,5 eenheden enzym
- 3,0 eenheden enzym
- 6,0 eenheden enzym
- △— 9,0 eenheden enzym
- 12,0 eenheden enzym

#### E. De invloed van de NaCl concentratie

Omdat vele enzymreacties sterk afhankelijk zijn van de zoutconcentraties in het reactiemengsel werd de invloed van de NaCl concentratie op de enzymactiviteit nagegaan. In fig.VII-5 is de invloed van de NaCl concentratie op de afbraak van DNA (fig.VII-5A) en de ATP omzetting (5B) gegeven. De DNAase activiteit neemt af bij toenemende zoutconcentratie, maar in vrijwel gelijke mate voor de twee enzymen. Het

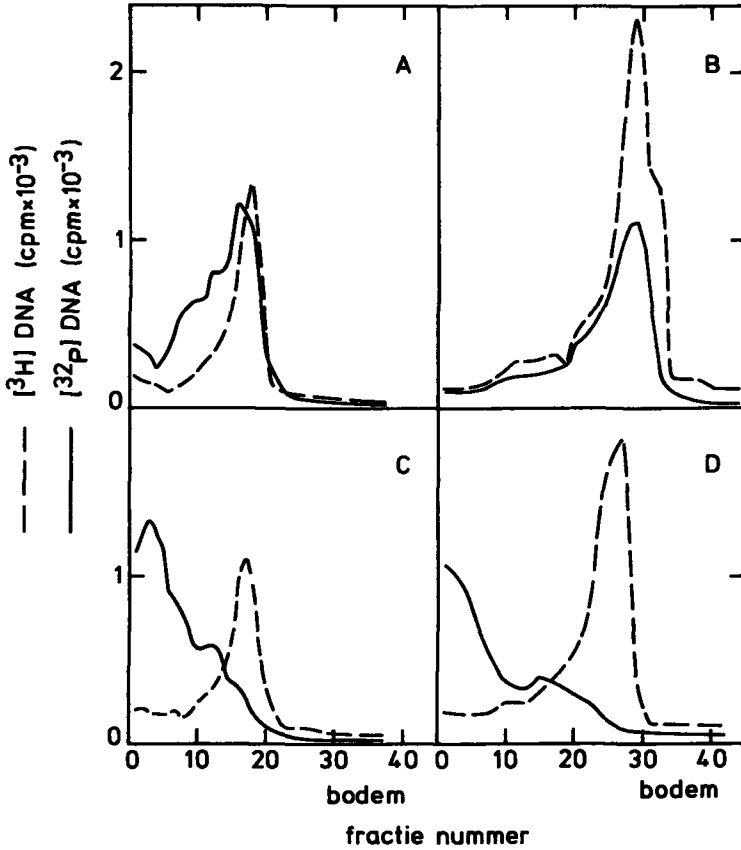
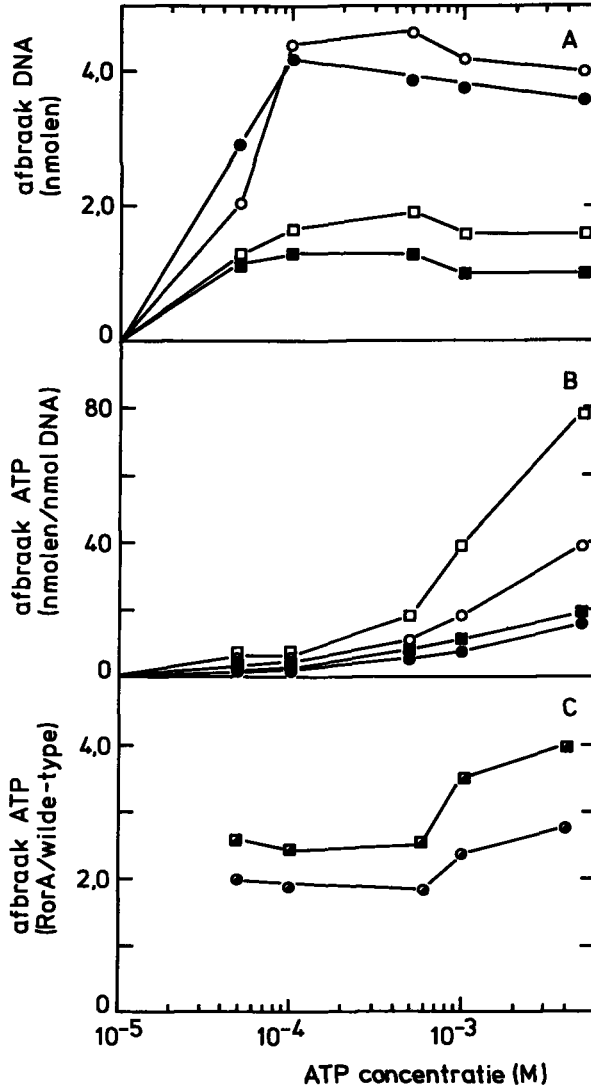


Fig.VII-3. De ATP-afhankelijke exonuclease en ATP-onafhankelijke endonuclease-activiteit voor enkelstrengig DNA van wilde-type en RorA enzym. 2  $\mu\text{g}$   $\phi\text{X174}$  [ $^{32}\text{P}$ ]DNA werd 30 min bij 30°C gefincubeerd met 14,3 eenheden van het wilde-type enzym (A en C) en 11,4 eenheden van het RorA enzym (B en D). In de experimenten van A en B werd zonder ATP gefincubeerd; aan de incubaties van C en D werd 0,33 mM ATP toegevoegd. Na het stoppen van de reactie met EDTA werd  $\phi\text{X174}$  [ $^3\text{H}$ ]DNA als referentie toegevoegd, en werden de monsters in een suikergradiënt bij 40000 rpm in een SW 50.1 rotor gecentrifugeerd.

ATP verbruik (per nmol afgebroken DNA) neemt ook af, maar voor het RorA enzym echter meer dan voor het wilde-type enzym, zodat het verschil tussen de twee enzymen verdwijnt bij hoge concentraties (fig. 5C). Dit experiment wijst er dus op dat de ATPase activiteit van de twee enzymen op verschillende wijze wordt beïnvloed door de ionensterkte.

### F. Enzymactiviteit met bestraald DNA als substraat

Het voornaamste verschil van de *E. coli* RorA stam met *E. coli* wilde-type is de veel grotere gevoeligheid van de RorA stam voor röntgenstraling en  $\gamma$  straling. Een opvallend kenmerk van deze mutant is bovendien dat de gevoeligheid voor ultraviolette straling gelijk is aan die van het wilde-type. Daarom leek het zinvol de activiteiten



van beide exonucleases V te bepalen op UV-bestraald en  $\gamma$ -bestraald DNA. In fig.VII-6 is het resultaat met  $\gamma$ -bestraald DNA te zien en in fig. 7 zijn experimenten met DNA dat met UV is bestraald weergegeven. Zowel  $\gamma$ -als UV-bestraald DNA worden langzamer afgebroken dan het onbestraalde DNA. Zowel voor  $\gamma$ -als voor UV-bestraald DNA geldt dat het RorA enzym het bestraalde DNA iets sneller afbreekt dan het wilde-type enzym (fig.VII-6A en 7A). Wanneer we echter letten op de ATP afbraak door de enzymen tijdens de afbraak van bestraald DNA dan vinden we grotere verschillen. Het ATP verbruik neemt bij toenemende stralingsdosis aan  $\gamma$ -straling toe zowel voor het wilde-type enzym als voor het RorA enzym maar de toename is belangrijk sterker voor het wilde-type enzym. Het resultaat is dat bij gebruik van DNA dat is bestraald met een hoge dosis  $\gamma$ -straling de twee enzymen een gelijke hoeveelheid ATP hydrolyseren per hoeveelheid afgebroken DNA (fig. 6C). Bij gebruik van UV-bestraald DNA neemt het ATP verbruik voor beide enzymen slechts weinig toe. Het verschil tussen RorA enzym en wilde-type enzym met betrekking tot het ATP verbruik blijft daarom ook gehandhaafd bij gebruik van UV-bestraald DNA.

Fig. VII-4. De DNAase en ATPase activiteit als functie van de concentratie ATP.

A. De DNAase activiteit.

De afbraak van 2,0  $\mu\text{g}$  T7[ $^{32}\text{P}$ ]DNA tot zuuroplosbaar materiaal werd bepaald na incubatie met 2,0 eenheden van een van beide enzymen gedurende 30 min. bij 30°C. in aanwezigheid van verschillende ATP concentraties. Het resultaat is weergegeven als nmolen DNA die per proef zuuroplosbaar werden gemaakt.

B. De ATPase activiteit.

De condities zijn dezelfde als onder A. Het ATP verbruik is uitgezet als nmolen omgezet ATP per nmol afgebroken DNA.

- wilde-type enzym + 2,0  $\mu\text{g}$  T7[ $^{32}\text{P}$ ]DNA
- RorA enzym + 2,0  $\mu\text{g}$  T7[ $^{32}\text{P}$ ]DNA
- wilde-type enzym + 2,0  $\mu\text{g}$  gedenatureerd T7[ $^{32}\text{P}$ ]DNA
- RorA enzym + 2,0  $\mu\text{g}$  gedenatureerd T7[ $^{32}\text{P}$ ]DNA.

T7[ $^{32}\text{P}$ ]DNA werd gedenatureerd door het DNA 5 min te verhitten op 100°C en daarna snel in ijs te koelen.

- C. Verhouding van het ATP verbruik voor het wilde-type enzym en het RorA enzym als functie van de ATP concentraties
- dubbelstrengig DNA
  - gedenatureerd DNA

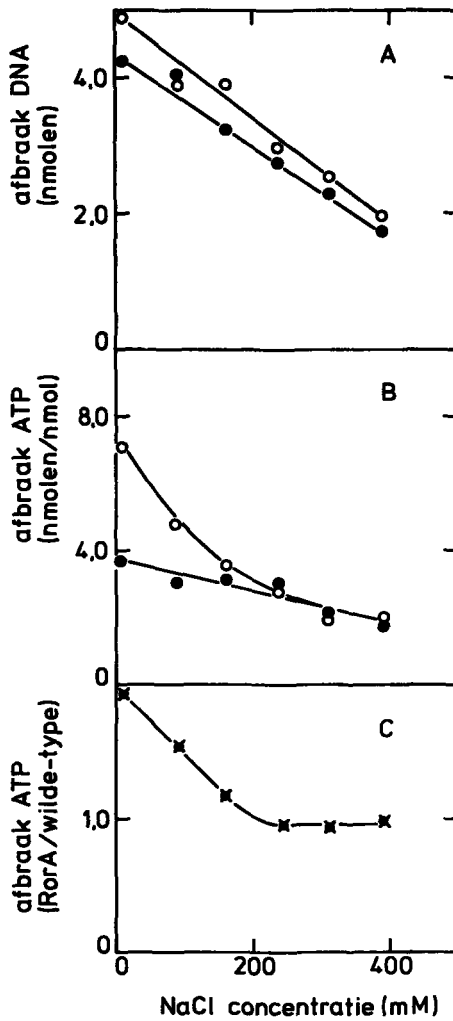


Fig.VII-5. Invloed van de NaCl concentratie.

Aan het normale reactiemengsel werd NaCl toegevoegd tot de concentraties die in de figuur zijn vermeld. De DNAase en ATPase activiteit werd bepaald na 30 min incuberen bij 30°C. De DNA afbraak is weergegeven in nmolen zuuroplosbaar materiaal (A). De ATP omzetting is weergegeven in nmolen omgezet ATP per nmol afgebroken DNA (B). In blok C is de verhouding van de ATPase activiteiten van RorA en wilde-type enzymen uitgezet.

—●— wilde-type enzym  
—○— RorA enzym.

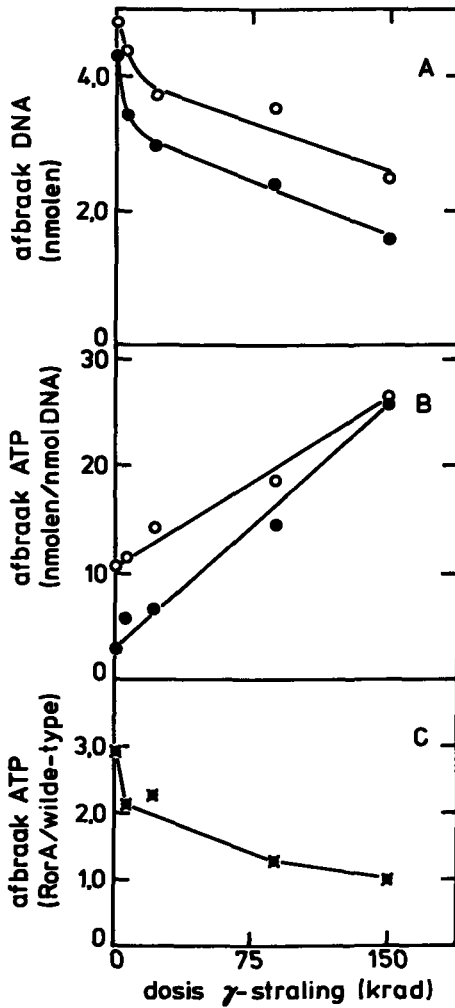


Fig.VII-6. Effect van bestraling van het DNA met  $\gamma$ -stralen op de enzymactiviteit. T7[ $^{32}\text{P}$ ]DNA werd met verschillende doses  $\gamma$ -straling behandeld in een  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -bron (zie hoofdstuk II-8). De afbraak (30 min. bij  $30^\circ\text{C}$ ) tot zuuroplosbaar materiaal door het wilde-type en het RorA enzym (2 eenheden) werd bepaald en uitgezet in nmolen afgebroken DNA (A) evenals de ATPase activiteit (B) die per hoeveelheid afgebroken DNA is weergegeven in nmolen omgezet ATP. In blok C is de verhouding van de ATPase activiteiten voor het RorA en het wilde-type enzym uitgezet.

—●— wilde-type enzym.

—○— RorA enzym



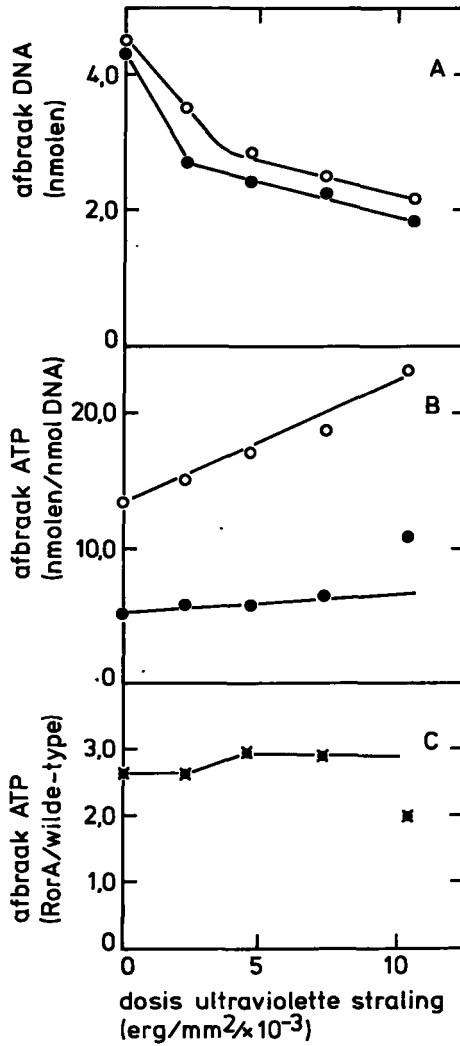


Fig.VII-7. Effect van bestraling van het DNA met ultraviolette straling op de enzym-activiteit.

DNA dat met ultraviolette straling was behandeld (zie hoofdst.II-8) werd met de RorA enzym (2 eenheden) afgebroken gedurende 30 min bij 30°C.

A. De afbraak van het DNA in nmolen.

B. De omzetting van ATP in nmolen per nmol afgebroken DNA.

C. De verhouding van de ATPase activiteiten voor het RorA enzym en het wilde-type enzym.

● wilde-type enzym.  
○ RorA enzym

### G. Hitte-stabiliteit van de enzymen

Het effect van de incubatie van het enzym bij 42°C op de ATP-afhankelijke DNAase activiteit op dubbelstrengig DNA en de DNA-afhankelijke ATPase activiteit werd vergeleken voor beide enzymen. Tijdens de incubaties bij 42°C werd noch voor de DNAase activiteit noch voor de ATPase activiteit significante verschillen gevonden tussen het RorA enzym en het wilde-type enzym. Dit werd getest onder drie verschillende omstandigheden:

a) zonder toevoeging; b) in aanwezigheid van ATP; c) in aanwezigheid van DNA.

Zowel in aanwezigheid van ATP als in afwezigheid van ATP was de inactiveringssnelheid van de DNAase activiteit voor beide enzymen gelijk (fig.VII-8A en B). Opvallend is dat beide enzymen sneller geïnactiveerd worden in aanwezigheid van ATP. Toevoeging van DNA tijdens de incubatie bij 42°C had op beide enzymen een gelijk effect: de enzymen werden volledig gestabiliseerd door het DNA (fig.VII-8A en B).

Ook de inactiveringssnelheid van de ATPase activiteit was voor beide enzymen gelijk in afwezigheid van ATP (fig. 8 C en D) en hield gelijke tred met de inactivering van de DNAase activiteit (vergelijk fig. VII-8A en C en fig. VII-8B en C). In aanwezigheid van ATP was ook de inactiveringssnelheid voor beide enzymen gelijk en groter dan in afwezigheid van ATP. In aanwezigheid van DNA was de ATPase activiteit van beide enzymen nagenoeg stabiel onder deze omstandigheden (fig. VII-8C en D). Deze beïnvloeding van de stabiliteit van het enzym door DNA en ATP wijst op een interactie van het enzym met zowel het DNA als het ATP.

### Discussie

Uit de experimenten die in dit hoofdstuk zijn beschreven, blijkt dat de hoeveelheid ATP die gehydrolyseerd wordt per hoeveelheid afgebroken dubbelstrengig DNA, twee maal groter is voor het RorA enzym en per hoeveelheid enkelstrengig DNA zelfs viermaal groter is dan voor het wilde-type enzym. Eveneens is gebleken dat de verhouding verbruikt

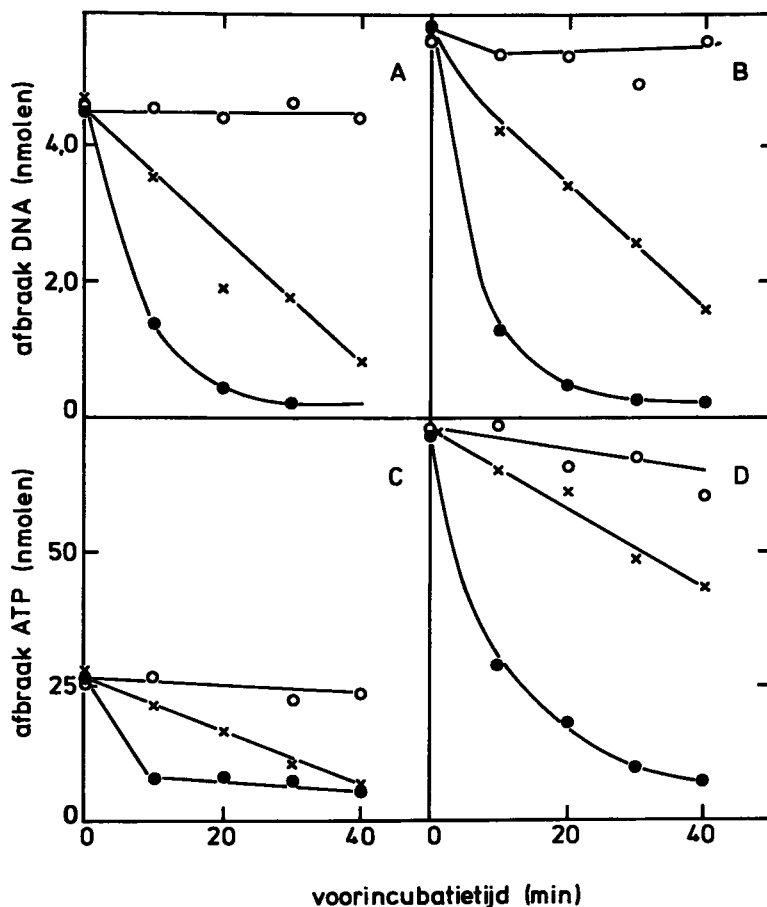


Fig.VII-8. Inactivering van het ATP-afhankelijke DNAase bij 42°C.

Het ATP-afhankelijke DNAase (2 eenheden) werd gedurende de aangegeven tijden gefincubeerd bij 42°C in 0,2 ml van de volgende samenstelling: 15 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM MgSO<sub>4</sub> en 68 µg albumine. In afzonderlijke experimenten werd aan dit mengsel 2,0 µg T7[<sup>32</sup>P]DNA of 1 mM ATP toegevoegd. Na afkoelen tot 30°C werden de DNAase activiteit en de ATPase activiteit bepaald. De incubatietijd was 30 min.

A. wilde-type enzym, DNAase activiteit.

B. RorA enzym, DNAase activiteit.

C. wilde-type enzym, ATPase activiteit.

D. RorA enzym, ATPase activiteit.

—x— incubatie bij 42°C van het enzym

—o— incubatie bij 42°C van het enzym met DNA

—•— incubatie bij 42°C van het enzym met ATP.

ATP per hoeveelheid afgebroken DNA verandert bij veranderende reactieomstandigheden. Veranderingen in de reactieomstandigheden hebben een verschillend effect op deze verhouding bij het RorA enzym en bij het wilde-type enzym. Zo verdwijnt het verschil in de ATPase/DNAase verhouding van beide enzymen bij toenemende dosis  $\gamma$ -straling op het DNA, terwijl het verschil gelijk blijft bij bestraling van het DNA met ultraviolette straling. Ook bij toenemende zoutconcentratie in het incubatiemengsel verdwijnt het verschil in de verhouding ATPase activiteit ten opzichte van de DNAase activiteit voor beide enzymen. Uit deze waarnemingen volgt dat de *rora* mutatie heeft geleid tot een verandering van de structuur van het exonuclease V. Het is daarom aantrekkelijk om te veronderstellen dat de mutatie gelegen is in één van de structurele genen van het eiwit.

Opmerkelijk is dat de eigenschappen van beide enzymen, te beïnvloeden zijn, zij het op verschillende wijze, door verandering van de ionensterkte. Dit zou er op kunnen wijzen dat deze veranderingen in eigenschappen het gevolg zijn van conformatie veranderingen van het enzym, veroorzaakt door veranderde ionensterkte. In dit verband is het interessant te vermelden dat een hoge concentratie NaCl leidt tot suppressie van het Rec<sup>-</sup> phenotype in RecB<sup>ts</sup> en RecC<sup>ts</sup> mutanten (Kushner en Linn, persoonlijke mededeling).

Het verschil in de ATPase/DNAase verhouding voor beide enzymen is niet alleen te beïnvloeden door veranderingen in de ionensterkte maar ook door verandering van het substraat. Zo wordt bij vervanging van dubbelstrengig DNA door enkelstrengig DNA de verhouding groter terwijl deze verhouding kleiner wordt bij bestraling van het DNA met  $\gamma$  stralen. Deze waarnemingen bevestigen de conclusie dat de *rora* mutatie heeft geleid tot een verandering in de structuur van het exonuclease V. Het door ons gevonden verschil in gevoeligheid van  $\gamma$ -bestraald DNA voor het wilde-type enzym en het RorA enzym is interessant in verband met het verschil in stralingsgevoeligheid van de desbetreffende bacteriestam. Het is echter moeilijk een verband te leggen tussen het gegeven dat bestraald DNA *in vitro* relatief sneller wordt afgebroken door het RorA enzym dan door het wilde-type enzym en het gegeven dat *in vivo*

het DNA in bestraalde cellen in de RorA stam sneller wordt afgebroken vergeleken met het wilde-type en wel omdat bestraald DNA *in vitro* langzamer wordt afgebroken dan onbestraald DNA terwijl *in vivo* bestraald DNA sneller wordt afgebroken dan onbestraald DNA.

Door gebruik te maken van de door Lieberman en Oishi (1973) ontwikkelde techniek om complementatie *in vitro* uit te voeren tussen extracten van RecB en RecC mutanten zal het in principe mogelijk zijn met gebruikmaking van het RorA enzym vast te stellen in welk van beide subunits van het enzym de ATPase activiteit gelegen is.

## HOOFDSTUK VIII. SAMENVATTING EN DISCUSSIE

In dit proefschrift zijn experimenten beschreven met het ATP-afhankelijke DNAase uit *Micrococcus luteus* en *Escherichia coli*. De experimenten met het enzym uit *M. luteus* waren gericht op het ophelderen van het mechanisme van de afbraakreactie *in vitro*. De proeven met het enzym uit *E. coli* hadden tot doel het defect van de *E. coli* RorA stam te identificeren. De resultaten van deze proeven kunnen als volgt worden samengevat:

a. De afbraak van DNA door het ATP-afhankelijke DNAase uit *M. luteus* verloopt in twee stappen: binding van het enzym aan het DNA molecuul en de eigenlijke afbraak van het DNA. De rol van  $Mg^{2+}$  ionen daarbij is onbekend. Het enzym kan zich aan lineair DNA binden in afwezigheid van ATP; binding met circulair DNA vindt niet plaats, zodat aangenomen moet worden dat het enzym aan de einden van het lineaire DNA molecuul bindt. Binding van het enzym vindt alleen plaats aan einden die dubbelstrengig zijn of aan einden die voor een klein stukje enkelstrengig zijn, zoals in het geval van  $\lambda$  DNA. DNA met langere enkelstrengige einden wordt niet aan het enzym gebonden. Per DNA molecuul worden twee enzymmolekulen gebonden, dus aan ieder uiteinde een. Dat de binding inderdaad de eerste stap in het afbraakmechanisme is, blijkt uit een competitie experiment waarbij gevonden werd, dat aan enzym gebonden DNA eerder wordt afgebroken dan niet gebonden DNA.

Het is mogelijk gebleken om de binding van het DNA aan het enzym te blokkeren met behulp van dextransulfaat. Deze stof bezet waarschijnlijk de plaats op het enzym waar het DNA wordt gebonden. Als gevolg van de binding van dextransulfaat aan het enzym, verliest het enzym het vermogen om DNA af te breken. In al deze experimenten blijkt steeds dat geen afbraak van het DNA plaats kan vinden, wanneer het enzym niet kan binden aan het DNA. Het ATP-afhankelijke DNAase uit *E. coli* bindt zich waarschijnlijk ook aan het DNA. Dit enzym-DNA complex is echter niet stabiel genoeg om direct met behulp van gradiëntcentrifugatie of een competitie-experiment aan te tonen. Het blijkt echter dat dit enzym in aanwezigheid van DNA veel stabiel is tegen verhitting, hetgeen op een complexvorming van DNA en enzym wijst.

b. Wanneer na binding van het enzym aan het DNA ook ATP aanwezig is, wordt het DNA afgebroken. Beide strengen van het dubbelstrengige DNA worden vrijwel tegelijk afgebroken te beginnen aan de uiteinden. Een opvallend kenmerk van deze enzymatische afbraak is dat de DNA molekulen één voor één worden afgebroken: een DNA molekuul wordt door een enzymmolekuul helemaal afgebroken voor dat een nieuw DNA molekuul aan de beurt komt.

Het DNA wordt met hoge snelheid afgebroken, een molekuul van het *M. luteus* enzym breekt bij 0°C 1500 baseparen per minuut van een dubbelstrengige DNA keten af. Bij 30°C is dit ongeveer 8800 baseparen per minuut. Het *E. coli* enzym breekt bij 30°C ongeveer 3000 baseparen per minuut van dubbelstrengig DNA af.

c. Het DNA wordt door het ATP-afhankelijke DNAase uit *M. luteus* afgebroken tot oligonucleotiden die sterk in afmetingen verschillen. Naast een grote hoeveelheid dialyseerbaar materiaal zijn ook molekulen aanwezig met een lengte van 300 nucleotiden. Deze molekulen zijn gedeeltelijk enkel- en gedeeltelijk dubbelstrengig. Ook de dubbelstrengige stukken bereiken een lengte van enkele honderden nucleotiden. De bij 0°C gevormde produkten zijn gemiddeld groter dan de produkten die bij 30°C zijn gevormd. De gedeeltelijk afgebroken DNA molekulen (intermediären) hebben enkelstrengige einden met een vrij 5'P einde. Deze einden zijn gemiddeld 80 nucleotiden lang.

d. Het ATP-afhankelijke DNAase uit *M. luteus* kan worden geremd door dextranulfaat, bengaals rose en actinomycine D. De eerste twee stoffen remmen zowel de DNAase als de ATPase activiteit van het enzym. Het actinomycine D ontkoppelt DNAase en ATPase activiteiten: de DNAase activiteit wordt sterker geremd dan de ATPase activiteit.

Het dextranulfaat remt het enzym door binding van één molekuul dextranulfaat per enzym molekuul. De binding komt waarschijnlijk tot stand op dezelfde plaats waar ook het DNA wordt gebonden. De remming van het DNA-enzym complex door deze stof verloopt veel langzamer dan de remming van het vrije enzym. Het geremde enzym kan weer gereactiveerd worden door incubatie met spermidine.

- e. Uit een vergelijking van het ATP-afhankelijke DNAase uit *E. coli* wilde-type en *E. coli* RorA is gebleken dat deze enzymen verschillend zijn. De mutatie van de *rorA* stam is dus gelegen in een structureel gen voor het enzym. Het verschil tussen de twee enzymen komt vooral tot uitdrukking in de verhouding tussen DNAase en ATPase activiteit en de veranderingen in deze verhouding onder verschillende omstandigheden. De verschillen in ATP afbraak voor de twee enzymen verdwijnen wanneer met  $\gamma$ -straling behandeld DNA als substraat wordt gebruikt; met DNA dat met ultraviolette straling is bestraald blijft het verschil gelijk.
- f. Het ATP verbruik per hoeveelheid afgebroken DNA is bij het ATP-afhankelijke DNAase uit *E. coli* sterk afhankelijk van de omstandigheden en varieert van 2 tot 80 nmolen ATP per nmol DNA.
- g. Het ATP-afhankelijke DNAase uit *E. coli* wordt gestabiliseerd tegen verhitting door DNA en verliest aan stabiliteit in aanwezigheid van ATP.

Het beeld dat uit deze experimenten van de afbraak van DNA door het ATP-afhankelijke DNAase uit *M. luteus* kan worden gevormd is als volgt: Het enzym bindt het DNA aan een plaats op het enzymoppervlak die waarschijnlijk sterk positief geladen is. In aanwezigheid van ATP beweegt het enzym molekuul zich langs het DNA molekuul. Hierbij worden in beide strengen breuken gemaakt en wel op onregelmatige afstanden. Het gevolg is dat sommige stukken DNA geheel worden afgebroken tot zeer kleine oligonucleotiden (bijv. 2-15) die enkelstrengig zijn. Op andere plaatsen wordt slechts één streng tot zulk klein materiaal afgebroken, terwijl in de complementaire streng weinig of geen breuken worden aangebracht, waardoor een lang enkelstrengig produkt ontstaat. Wanneer het enzym langs het DNA loopt zonder te knippen, ontstaan de lange dubbelstrengige produkten die werden gevonden. Voor een verklaring van het verbruik van ATP tijdens de afbraak zijn twee hypothesen opgesteld. Volgens de ene hypothese wordt de door ATP geleverde energie gebruikt voor het ontwinden van het DNA (Friedman en Smith, 1973) terwijl de andere hypothese veronderstelt dat de ATP nodig is om het enzym langs het DNA molekuul te laten voortbewegen (Winder, 1972). De waarneming dat dubbelstrengige afbraakprodukten gevormd worden is moeilijk in



overeenstemming te brengen met de eerste hypothese maar is in overeenstemming met het door Winder voorgestelde model.

De functie van het ATP-afhankelijke DNAase in de cel.

De uiteindelijke bedoeling van het onderzoek aan de ATP-afhankelijke DNA-assen *in vitro* is het verklaren van de functie van deze enzymen in het recombinatiemechanisme. Het is de vraag of met de verkregen resultaten en gegevens uit de literatuur een hypothese of model over de *in vitro* functie van het enzym is op te stellen. Aangezien voor *E. coli* de meeste gegevens beschikbaar zijn, zal deze beschouwing voor *E. coli* worden gehouden.

Het is bekend dat in *E. coli* tenminste twee enzymsystemen aanwezig zijn, die recombinatie van DNA kunnen bewerkstelligen. Deze mechanismen zijn genoemd naar één van de genen er van: het RecBC mechanisme en het RecF mechanisme (Horii en Clark, 1973). In het RecBC mechanisme heeft het ATP-afhankelijke DNAase een belangrijke functie. In cellen die dit enzym missen is slechts een laag niveau van recombinatie mogelijk en dit lage niveau wordt toegeschreven aan het RecF mechanisme. Door de *sbcB* mutatie kan volgens Horii en Clark (1973) in RecB en RecC mutanten efficiënt op het RecF mechanisme worden overgeschakeld, de recombinatie is dan weer normaal.

Recombinatie van twee DNA molekulen moet via de volgende stappen verlopen:

- a. Nadat de homologe (complementaire) delen van de twee DNA molekulen bij elkaar zijn gebracht, wordt een koppeling tussen enkelstrengige ketens tot stand gebracht.
- b. Dit hybride stuk DNA wordt vergroot tot een stabiele gekoppelde structuur.
- c. Door de werking van endo- en exonucleases wordt een lineair gekoppeld molecuul gevormd.
- d. Door DNA synthese op enkelstrengige plaatsen en sluiten van de ketens door ligase wordt het gerecombineerde DNA molecuul gevormd.
- e. Overbodige stukken DNA moeten worden afgebroken (het is mogelijk dat door die overtollige stukken vitale processen van de cel, bijv. DNA replicatie, worden geblokkeerd).

Overwogen wordt wat de functie van het ATP-afhankelijke DNAase in dit schema kan zijn, de eigenschappen van het enzym *in vitro* in aanmerking genomen.

De volgende twee mogelijkheden worden besproken:

1e Het ATP-afhankelijke DNAase vervult een functie bij het opruimen van overbodig DNA, dus als laatste stap van het recombinatiemechanisme. Het is duidelijk dat het enzym deze functie goed kan vervullen, daar het enzym *in vitro* dubbelstrengig DNA afbreekt. Verdere argumenten voor deze functie ontleen we aan de experimenten van Birge en Low, (1974), Wilkins (1969), Hall en Howard-Flanders (1972 en 1973) en Benbow e.a. (1974).

In de experimenten van de laatste drie groepen van onderzoekers is de recombinatie tussen circulaire DNA molekulen bestudeerd n.l. tussen episomen en chromosomen (Wilkins, 1969 en Hall en Howard-Flanders, 1972 en 1973) en tussen  $\phi$ X174 RF DNA molekulen (Benbow e.a., 1974). In geen van deze gevallen wordt er na recombinatie overbodig DNA gevonden, waardoor er geen functie is voor het ATP-afhankelijke DNAase. Het blijkt dan ook dat in deze gevallen de recombinatie in RecB en RecC mutanten slechts heel weinig is gestoord, terwijl de recombinatie tussen lineaire molekulen sterk gestoord is in RecB en RecC mutanten. De proeven van Birge en Low (1974) tonen aan dat in RecB en RecC mutanten wel degelijk gerecombineerd DNA wordt gevormd, wat aantoont dat er in ieder geval wel een aantal stappen in het recombinatieproces verlopen. Hoewel daarbij geen levensvatbare recombinanten worden gevormd, blijkt het gerecombineerde DNA wel te kunnen dienen als matrijs voor RNA-polymerase. Deze auteurs suggereren dan ook dat het ATP-afhankelijke DNAase een late functie heeft bij het afbreken van overbodig DNA.

2e Het ATP-afhankelijke DNAase heeft een functie bij de vorming van gekoppelde molekulen, dus een vroege functie. Ook hiervoor zijn een aantal argumenten aan te voeren. Paul en Riley (1974) vonden dat in een stam waarin recombinatie gebeurt via het RecBC mechanisme geen gekoppelde molekulen worden gevormd wanneer in het DNA van deze stam een deletie aanwezig is op de plaats van het DNA dat bij conjugatie het eerste de cel binnenkomt. Proeven van Curtis e.a. (1968) laten

zien dat in zo'n geval slechts 1% van de normale hoeveelheid recombinanten wordt gevormd. Uit deze experimenten concluderen we dat de vorming van gekoppelde molekulen in het RecBC mechanisme begint aan het eind van een lineair DNA molekuul.

Tot een hierbij aansluitende conclusie leiden de experimenten van De Haan e.a. (1972), die vonden dat in RecB en RecC stammen het aantal recombinatie gebeurtenissen voor het eerst binnenkomende DNA veel kleiner is dan voor later binnenkomend DNA, vergeleken met de situatie in het wilde-type (De Haan e.a., 1972). Dit is een aanwijzing dat eerstgenoemd recombinatieproces verzorgd wordt door het RecF mechanisme.

Hiermee in overeenstemming zijn tevens de uitkomsten van de experimenten van Wilkins (1969), Hall en Howard-Flanders (1972 en 1973) en Benbow e.a. (1974) die gevonden hebben dat bij recombinatie tussen circulaire molekulen, mutaties in *recB* en *recC* weinig invloed hebben. Aangezien hier geen eindpunten aanwezig zijn zal ook deze recombinatie niet via het RecBC mechanisme verlopen maar waarschijnlijk eveneens via het RecF mechanisme.

Een aanwijzing betreffende de plaats van het ATP-afhankelijke DNAase in het RecBC mechanisme geven de proeven van Paul en Riley (1974). Zij vinden dat in RecB en RecC mutanten slechts 20% gekoppelde molekulen worden gevormd in tegenstelling tot de situatie in RecA mutanten, waar de normale hoeveelheid gekoppelde molekulen wordt gevormd. Dit suggereert dat het RecBC produkt vóór het RecA produkt werkt. Van het RecA produkt weten we dat het in beide recombinatiemechanismen onmisbaar is (Horii en Clark, 1973). Daar de *recB* en *recC* genen tesamen met het *recA* gen de enige bekende genen in het RecBC mechanisme zijn, leveren bovenstaande gegevens het fundament voor de hypothese dat het ATP-afhankelijke DNAase een functie vervult in het begin van dit mechanisme, bijv. bij de vorming van de gekoppelde molekulen.

Over de taak van het ATP-afhankelijke DNAase in de vorming van de gekoppelde molekulen kunnen we slechts gissen. Deze taak zou kunnen bestaan uit het veranderen van het einde van het recombinerende DNA molekuul (bijv. het enkelstrengig maken) waardoor de vorming van de koppeling met het DNA van de acceptorcel beter kan gebeuren.

Direct na de eerste koppeling kan het enzym een deel afbreken van het DNA van de acceptorcel waardoor structuren ontstaan die lijken op de intermediaire afbraakprodukten, zoals waargenomen door Karu e.a., (1973) waar dan een langer hybride stuk DNA gevormd kan worden.

Voor opheldering van dit mechanisme zijn echter verdere experimenten nodig.

## Summary

It is generally assumed that ATP-dependent DNAases are involved in genetic recombination. In this thesis an investigation into the ATP-dependent DNAases from *Micrococcus luteus* and *Escherichia coli* is described. Detailed studies to clarify the mechanism of DNA degradation by the ATP-dependent DNAase were carried out with the *M. luteus* enzyme.

The results of this investigation are summarized as follows:

a) In the degradation process of DNA by the ATP-dependent DNAase from *M. luteus*, two steps can be distinguished:

Binding of the enzyme to the DNA.

Degradation of the DNA.

The enzyme binds to linear double-stranded DNA; this reaction can occur in the absence of ATP. No binding takes place with circular DNA, indicating that the enzyme binds to the ends of the linear DNA molecule. Furthermore it was found that in order for the binding to occur, the DNA ends have to be double stranded, or single stranded to a small extent, like the DNA of phage  $\lambda$ . Longer single-stranded ends on double-stranded DNA prevent the binding of the enzyme.

To each linear DNA molecule two molecules of enzyme can be bound, one to each end. Results from competition experiments show that this binding is a first necessary step in the degradation reaction, no degradation is found without previous binding.

The binding of the enzyme to the DNA and consequently the DNA degradation, can be blocked by means of dextransulfate, which probably binds to the enzyme in the same place as the DNA.

b) Degradation of the DNA, bound in the DNA-enzyme complex, begins only when ATP is present. The DNA molecules are degraded exonucleolytically and one by one, i.e. a whole DNA molecule is degraded completely before another one is attacked. The rate of degradation is high: at 0°C one molecule of the *M. luteus* enzyme degrades in one minute a stretch of double-stranded DNA of 1500 basepairs; at 30°C the rate is about 9000 basepairs per min.

c) DNA is degraded to oligonucleotides. The size distribution and structure of the products were studied: besides dialysible material, larger oligonucleotides with a length of up to 300 nucleotides were found. These molecules are for a considerable part single stranded but a fraction, or perhaps all of them, contain double-stranded regions which may be as long as 150-300 nucleotides. When the incubations with the enzyme are carried out at 0°C the average length of the products is greater than after incubation at 30°C.

A second class of products consists of partially degraded DNA molecules, the intermediates, which are double-stranded and have single-stranded ends with an average length of 80 nucleotides.

d) The ATP-dependent DNAase can be inhibited by dextransulfate, rose bengale and actinomycin D. Both DNAase and ATPase activities are inhibited, although actinomycin D inhibits the ATPase activity less than the DNAase activity. Dextransulfate binds to the enzyme, probably on the active site where also the DNA is bound and thus blocks both binding and degradation. The inhibition by dextransulfate can be reversed by spermidine.

Rose bengale too is probably bound to the enzyme, as the inhibition is not reversed by removing the rose bengale.

These results have lead to the following model for the degradation of DNA by the ATP-dependent DNAase from *M. luteus*. The enzyme binds to the ends of a DNA molecule on a site which is probably strongly positively charged. In the presence of ATP the enzyme moves from this position along the DNA chain, making breaks in both strands. These breaks are made in an irregular way, perhaps at random; resulting in the digestion of the DNA into acid-soluble products and longer single- and double-stranded products, depending on whether the breaks are made close together in both strands, in one strand or are absent in a considerable stretch of DNA.

The function of the ATP is not known, but from the results presented in this thesis it would seem more likely that the energy of the ATP is used to move the enzyme along the DNA molecule, as suggested by Winder (1972), than to denature the DNA as proposed by Friedman and Smith (1973).

In the second part of this thesis, studies were performed with the ATP-dependent DNAase from *E. coli*. The *E. coli* enzyme was isolated from a mutant strain (RorA), suspected to carry a mutation in a structural gene for the ATP-dependent DNAase, and was then compared with the wild-type enzyme.

a. The ATP-dependent DNAase from the *E. coli* RorA strain was compared with the enzyme from the wild-type strain and was found different. The difference lies mainly in the ATP consumption and in the way this consumption is influenced by the conditions of the reaction (ATP concentration and ionic strength) and the substrate (single-stranded DNA, is irradiated DNA).

When the DNA is  $\gamma$ -irradiated, the ATP consumption of the mutant and wild-type enzymes becomes the same, while with DNA exposed to ultraviolet irradiation the existing difference remains.

b. Depending on the reaction conditions and the substrate, the amount of ATP consumed per amount of DNA degraded varies from 2 to 80 nmoles ATP per nmole DNA.

c. The ATP-dependent DNAase from *E. coli* probably forms a DNA-enzyme complex, as the *M. luteus* enzyme however this complex is not stable enough to be detected by means of centrifugation in glycerolgradients or by competition experiments. An indication that this enzyme forms a complex with DNA is provided by the observed considerable stabilization of the enzyme against heat inactivation in the presence of DNA.

From these results it is concluded that the RorA strain is affected in the structural gene for the ATP-dependent DNAase.

The function of the exonuclease V from *E. coli* in the recombination process is discussed. Two possibilities are considered:

1. The enzyme is involved in removing DNA left over after the recombination has taken place.

2. The enzyme has a function early in the recombination process.

For both possibilities arguments can be found; it is however not possible to identify the function of this enzyme.

## LITTERATUUR

- Alberts, B.M. (1967) *Biochem.*, 6, 2527-2532.
- Anai, M., Hirahashi, T. en Takagi, Y. (1970a)  
*J.Biol.Chem.*245, 767-774.
- Anai, M., Hirahashi, T. en Takagi, Y. (1970b)  
*J.Biol.Chem.*245, 775-780.
- Anai, M. en Takagi, Y. (1971)  
*J.Biol.Chem.*246, 6389-6392.
- Barbour, S.D., Nagaishi, H., Templin, A. en Clark, A.J., (1970)  
*Proc.N.A.S.*67, 128-135.
- Barbour, S.D. en Clark, A.J. (1970)  
*Proc.N.A.S.*65, 955-961.
- Benbow, R.M., Zuccarelli, A.J., Davis, G.C. en Sinsheimer, R.L. (1974)  
*J.Virology* 13, 898-907.
- Bernardi, G. (1969) *Biochim.Biophys.Acta* 174, 423-434.
- Birge, E.A. en Low, K.B. (1974)  
*J.Mol.Biol.*83, 447-457.
- Boon, T. en Zinder, N.D. (1969)  
*Proc.N.A.S.*64, 573-577.
- Boon, T. en Zinder, N.D. (1971)  
*J.Mol.Biol.*58, 133-151.
- Bresler, S.E., Lanzov, V.A. en Likhachev, V.T. (1973)  
*Molec.Gen.Genet.*120, 125-131.
- Broker, T.R. en Lehman, I.R. (1971)  
*J.Mol.Biol.*60, 131-149.
- Broker, T.R. (1973) *J.Mol.Biol.* 81, 1-16.
- Buttin, G. en Wright, M. (1968)  
*Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.*33, 259-269.
- Capaldo, F.N. en Barbour, S.D. (1973)  
*J.Bact.*115, 928-936.
- Chestukhin, A.V., Shemyakin, M.F., Kalinina, N.A. en Prozorov, A.A.  
(1972)  
*F.E.B.S.Letters* 24, 121-125.
- Clark, A.J. (1971) *Ann.Rev.Microbiol.*25, 437-464.
- Cleaver, J.E. en Boyer, H. (1972)  
*Biochim.Biophys.Acta* 262, 116-124.
- Cooper, A.D., Burgan, M.W., White, C. en Hermann, R.L. (1971)  
*J.Bact.*107, 433-441.
- Curtis, R., Chamarella, L.J. en Stallions, D.R. (1968)  
*Bact.Rev.*32, 320-348.



- Davila, C., Charles, P. en Ledoux, L. (1965a)  
*J.Chromatog.19*, 382-395.
- Davila, C., Charles, P. en Ledoux, L. (1965b)  
*J.Chromatog.19*, 396-403.
- Doly, J., Sasarman, E. en Anagnostopoulos, C. (1974)  
*Mutation Res.22*, 15-23.
- Van Dorp, B., Ceulen, M.Th.E., Heyneker, H.L. en Pouwels, P.H. (1973)  
*Biochim.Biophys.Acta 299*, 65-81.
- Van Dorp, B., Ceulen, M.Th.E. en Pouwels, P.H. (1974)  
*Biochim.Biophys.Acta 340*, 166-176.
- Espejo, R.T., Canelo, E.S. and Sinsheimer, R.L. (1969)  
*Proc.N.A.S.63*, 1164-1168.
- Friedman, E.A. en Smith, H.O. (1972a)  
*J.Biol.Chem.247*, 2846-2853.
- Friedman, E.A. en Smith, H.O. (1972b)  
*J.Biol.Chem.247*, 2859-2865.
- Friedman, E.A. en Smith, H.O. (1973)  
*Nature N.B.241*, 54-58.
- Furlong, N.B. (1967) in *Methods in Enzymology* (Moldave, K. en Grossman, L. eds.)  
Vol. XII A pp 320-321, Academic Press, New York, Londen.
- Garen, A. en Levinthal, C. (1960)  
*Biochim.Biophys.Acta 38*, 470-483.
- Glickman, B.W., Zwenk, H., Van Sluis, C.A. en Rörsch, A. (1971)  
*Biochim.Biophys.Acta 254*, 144-154.
- Goldmark, P.J. en Linn, S. (1970)  
*Proc.N.A.S.67*, 434-441.
- Goldmark, P.J. en Linn, S. (1972)  
*J.Biol.Chem.247*, 1849-1860.
- Greth, M.L. en Chevallier, M.R. (1973)  
*Biochem.Biophys.Res.Com.54*, 1-8.
- De Haan, P.G., Hoekstra, W.P.M. en Verhoef, C. (1972)  
*Mutation Res.14*, 375-380.
- Hall, J.D. en Howard-Flanders, P. (1972)  
*J.Bact.110*, 578-584.  
*J.Bact.113*, 1089.
- Hallsall, H.B. (1967)*Nature*, 215, 880-881.
- Hartmann, G., Honikel, K.O., Knüsel, F. en Nüesch, J. (1967)  
*Biochim.Biophys.Acta 145*, 843-844.

- Heijneker, H.L., Ellens, D.J., Tjeerde, R.H., Glickman, B.W.,  
Van Dorp, B. en Pouwels, P.H. (1973)  
*Molec.Gen.Genet.*124, 83-96.
- Hershey, A.D., Burgi, E. en Ingraham, L. (1963)  
*Proc.N.A.S.*49, 748-755.
- Holliday, R. (1964) *Genet.Res.Camb.*5, 282-304.
- Howard-Flanders, P. en Lin, P.F. (1973)  
*Genetics Suppl.*73, 85-90.
- Horii, Z-I. en Clark, A.J. (1973)  
*J.Mol.Biol.*80, 327-344.
- Hout, A., Oosterbaan, R.A., Pouwels, P.H. en De Jonge, A.R.J. (1970)  
*Biochim.Biophys.Acta* 204, 632-635.
- Hubacek, J. en Glover, S.W. (1970)  
*J.Mol.Biol.*50, 111-127.
- Hurwitz, J., Furth, J.J., Malamy, M. en Alexander, M. (1962)  
*Proc.N.A.S.*48, 1222-1230.
- Iyer, V.N. en Rupp, W.D. (1971)  
*Biochim.Biophys.Acta* 228, 117-126.
- Jovin, T.M., Englund, P.T. en Bertsch, L.L. (1969)  
*J.Biol.Chem.*244, 2996-3008.
- Karu, A.E. en Linn, S. (1972)  
*Proc.N.A.S.*69, 2855-2859.
- Karu, A.E., MacKay, V., Goldmark, P.J. en Linn, S. (1973)  
*J.Biol.Chem.*248, 4874-4884.
- Kushner, S.R., Nagaishi, H. en Clark, A.J. (1972)  
*Proc.N.A.S.*69, 1366-1370.
- Lehman, I.R. en Nussbaum, A.L. (1964)  
*J.Biol.Chem.*239, 2628-2636.
- Lieberman, R.P. en Oishi, M. (1973)  
*Nature N.B.* 243, 75-77.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. en Randall, R.J. (1951)  
*J.Biol.Chem.*193, 265-275.
- Maurer, H.R. (1968) *Disk.Electrophorese*, 1st ed., Walter de Gruyter  
en Co., Berlin, blz. 42.
- Monk, I.M., Kinross, J. (1972)  
*J.Bact.*109, 971-978.
- Nakayama, H., Okuba, S. en Takagi, Y. (1971)  
*Biochim.Biophys.Acta* 228, 671-682.
- Nygaard, A.P. en Hall, B.D. (1964)  
*J.Mol.Biol.*9, 125-142.
- Ohi, S. en Sueoka, N. (1973)  
*J.Biol.Chem.*248, 7336-7344.

- Oishi, M. (1969) *Proc.N.A.S.*64, 1292-1299.
- Oppenheim, A.B., Riley, M. (1966)  
*J.Mol.Biol.*20, 331-357.
- Oppenheim, A.B. en Riley, M. (1967)  
*J.Mol.Biol.*28, 503-511.
- Opschoor, A., Pouwels, P.H., Knijnenburg, C.M. en Aten, J.B.T. (1968)  
*J.Mol.Biol.*37, 13-20.
- Paul, A. en Riley, M. (1974)  
*J.Mol.Biol.*82, 35-56.
- LePecq, J.B., Paoletti, C. (1967)  
*J.Mol.Biol.*27, 87-106.
- Pouwels, P.H. en Jansz, H.S. (1964)  
*Biochim.Biophys.Acta* 91, 177-179.
- Richardson, C.C., Schildkraut, C.L., Aphoshian, H.V. en Kornberg, A.  
(1964a)  
*J.Biol.Chem.*239, 222-232.
- Richardson, C.C., Lehman, I.R. en Kornberg, A. (1964b)  
*J.Biol.Chem.*239, 251-258.
- Ritchie, D.A., Thomas, Jr., C.A., MacHattie, L.A. en Wensink, P.C. (1967)  
*J.Mol.Biol.*23, 365-376.
- Rupp, W.D., Howard-Flanders, P. (1968)  
*J.Mol.Biol.*31, 291-304.
- Schaller, H., Nüsslein, C., Bonhoeffer, F.J., Kurz, F.J. en  
Nietzmann, I. (1972)  
*Eur.J.Biochem.*26, 474-481.
- Schildkraut, C.L., Marmur, J. en Doty, P. (1961)  
*J.Mol.Biol.*3, 595-617.
- Sedat, J.W., Kelly, R.B. en Sinsheimer, R.L. (1967)  
*J.Mol.Biol.*26, 537-540.
- Shemyakin, M.F., Chestukhin, A.V., Kalinina, N.A.,  
Prozorov, A.A. (1973)  
*F.E.B.S.Letters* 31, 31-34.
- Siddhikol, C., Erbstoesz, J.W. en Weisblum, B. (1969)  
*J.Bact.*99, 151-155.
- Sinsheimer, R.L. (1960)  
*J.Mol.Biol.*1, 37-42.
- Smith, H.O., Friedman, E.A. (1972)  
*J.Biol.Chem.*247, 2854-2858.
- Sobel, H.M. (1972) *Proc.N.A.S.*69, 2483-2487.
- Sobel, H.M. en Jain, S.C. (1972)  
*J.Mol.Biol.*68, 21-34.

- Studier, F.W., (1965)  
J.Mol.Biol.11, 373-390.
- Studier, F.W. (1972) Science,176, 367-376.
- Takagi, Y., Matsubara, K. en Anai, M. (1972)  
Biochim.Biophys.Acta 269, 347-353.
- Tomizawa, J-I., Anraku, N., Iwama, Y. (1966)  
J.Mol.Biol.21, 247-253.
- Tsuda, Y. en Strauss, B.S. (1964)  
Biochemistry 3, 1678-1684.
- Vogt, V.M. (1973) Eur.J.Biochem.33, 192-200.
- Vovis, G.F., Buttin, G. (1970a)  
Biochim.Biophys.Acta 224, 29-41.
- Vovis, G.F., Buttin, G. (1970b)  
Biochim.Biophys.Acta 224, 42-54.
- Wang, J.C., Davidson, N.J. (1966)  
J.Mol.Biol.15, 111-123.
- Wilkins, B.W. (1969) J.Bact.98, 599-604.
- Winder, F.G. (1972) Nature N.B.236, 75-76.
- Winder, F.G. en Coughlan, M.P. (1967)  
Biochim.Biophys.Acta 134, 215-217.
- Winder, F.G. en Lavin, M.F. (1971)  
Biochim.Biophys.Acta 247, 542-561.
- Winder, F.G. en Sastry, P.A. (1971)  
F.E.B.S.Letters 17, 27-30.
- Wright, M., Buttin, G. en Hurwitz, J. (1971)  
J.Biol.Chem.246, 6543-6555.
- Wu, F.Y.-H. en Wu, C.-W. (1973)  
Biochem.12, 4343-4348.
- Zwenk, H. (1969) Proefschrift, Leiden.
- Zillig, W., Zechel, K., Rabussay, D., Schachner, M., Sethi, V.S.,  
Palm, P., Heil, A. en Seifer, W. (1970)  
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.35, 47-58(1970).

## Curriculum vitae

De auteur van dit proefschrift werd in 1940 in Rotterdam geboren, waar hij ook de lagere en middelbare school bezocht. Nadat hij in 1957 het eindexamen HBS-B aan het Libanon Lyceum had afgelegd, begon hij aan de studie voor scheikundig ingenieur aan de Technische Hogeschool te Delft.

De studie voor het ingenieurs examen, dat in 1965 werd afgelegd, stond onder leiding van Prof. W. Berends. Tijdens de hierna volgende militaire diensttijd was hij gedetacheerd op het Medisch Biologisch Laboratorium, waar hij ook nadien bleef werken, zij het in dienst van de Rijksuniversiteit te Leiden.

In 1970 werd aan het hier beschreven onderzoek begonnen.

## Nawoord

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd uitgevoerd op het Medisch Biologisch Laboratorium te Rijswijk en is het resultaat van de samenwerking van velen. Ik dank de directeur en de medewerkers van dit laboratorium voor de gastvrijheid die ik er sinds 1965 heb ondervonden.

Van degenen die direct hebben bijgedragen aan het proefschrift wil ik in het bijzonder danken:

Dr. P.H. Pouwels, voor zijn stimulerende leiding en waardevolle adviezen bij het onderzoek en de grote steun die hij bij het schrijven van het proefschrift is geweest.

Dr. R.A. Oosterbaan, voor zijn opmerkingen over de tekst van het manuscript.

Mevrouw M.Th.E. Heering Ceulen voor de deskundige wijze waarop zij vele experimenten heeft uitgevoerd.

Drs. H.L. Heijneker voor de vele stimulerende discussies en in het bijzonder voor het beschikbaar stellen van een aantal enzymen.

Dr. R. Benne en F. Palitti voor het aandeel dat zij hebben gehad in het tot stand komen van hoofdstuk VII.

Het personeel van de keuken, de werkplaats en de glasblazerij, die elk op hun manier hun bijdrage aan het onderzoek hebben geleverd.

De heren M.J.M. Boermans, H.E. Groot Bramel en B. Meines voor de uitstekende wijze waarop zij de figuren hebben verzorgd.

Tenslotte dank ik het bestuur van de Rijksverdedigingsorganisatie TNO voor de toestemming om het onderzoek als proefschrift te publiceren.

Dit werk werd gedeeltelijk gesteund door Euratom, contract 052-65-2 BIAN.