

С. Н. Суханов, Н. В. Нестерова, М. И. Менджул, С. А. Сырчин

МАТРИЧНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЭКЗОНУКЛЕАЗНЫЕ АКТИВНОСТИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ ЦИАНОБАКТЕРИИ *PLECTONEMA BORYANUM*

Исследованы функциональные характеристики ДНК-зависимых ДНК-полимераз цианобактерий *P. boryanum*. Установлено, что ДНК-полимераза II (ДПИ) активно использует матрицы с различной структурой (наиболее активен фермент на ДНК *P. boryanum* и цианофага LPP-3, лизирующего данную цианобактерию). ДНК-полимераза I (ДПИ) менее активна на большинстве испытанных матриц, исключая цианобактериальную ДНК. Оба фермента нуждаются в праймировании синтетических рибонуклеиновых матриц и выявили разную способность включать каждый из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. ДПИ и ДПИИ обладают 3'-5'-экзонуклеазной активностью, причем ДПИИ имеет более мощную ассоциированную экзонуклеазу. Только ДПИ способна к гидролизу фосфодиэфирных связей в направлении 5'-3'. Сделан вывод о возможной функциональной роли цианобактериальных ДНК-полимераз *in vivo*: ДПИ является основным клеточным репликативным ферментом, а ДПИИ ответственна за осуществление репаративных процессов и близка по свойствам ДНК-полимеразе I *Escherichia coli*.

Из клеток цианобактерии *P. boryanum* ранее нами выделены и частично очищены две формы ДНК-зависимой ДНК-полимеразы [3]. Ферменты охарактеризованы по физико-химическим свойствам и чувствительности к ингибиторам [7]. В данной работе приводятся результаты исследования функциональных свойств ДНК-полимераз цианобактерии — специфичности этих ферментов к ряду искусственных и естественных матриц и данные по репарирующей и корректирующей способности, полученные на очищенных препаратах ДНК-полимераз *P. boryanum*.

Материалы и методы. Объектом исследований служила аксеническая культура цианобактерии *P. boryanum* Gom., штамм CALU 465 (США, Индиан. ун-т), полученная из коллекции Биол. ин-та С.-Петербургского ун-та. В работе использовали следующие реактивы: немеченные дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, ДНК тимуса телят, ингибиторы протеаз и имидазол — производство «Sigma» (США), калиевые соли полиадениловой, полиурициловой, полигуаниловой и полицитидиловой кислот, аденозиндифосфат — производства «Serva» (ФРГ), рестриктаза *MspI*, фрагмент Кленова, ДНК-полимераза фага T4 и ДНК-полимераза I *Escherichia coli* — «Fermentas» (Литва), ДНК фагов лямбда, M13 (одноцепочечная форма), T7 и спермы лосося — «Биопол» (Россия), третий-меченные дезоксирибонуклеозидтрифосфаты — Радиевый ин-т (С.-Петербург), фосфор-меченный аденозинтрифосфат — «Радиопрепарат» (Узбекистан).

Составы используемых буферов, методы определения ДНК-полимеразной активности, приготовления активированной ДНК, вычисления активности фермента и выращивания клеток цианобактерий описаны ранее [3, 7].

Получение ДНК-полимераз *P. boryanum*. Все процедуры по выделению и частичной очистке ферментных препаратов проводили при 4 °С. Источником препаратов ДНК-полимераз являлись бесклеточные экстракты цианобактерии. Клетки *P. boryanum* механически разрушали при помощи кварцевого песка на гомогенизаторе Л-17 [1]. К гомогенату разрушенных клеток цианобактерии прибавляли 2 объе-

ма буфера, содержащего 0,6 М КСl и 0,2 %-й тритон X-100. Смесь ресуспендировали на магнитной мешалке в течение 40 мин, после чего вновь центрифугировали при 10 000 g в течение 40 мин. Дальнейшее концентрирование белков, обладающих ДНК-полимеразной активностью, осуществляли преципитацией полиэтиленгликолем (мол. масса 6000). Осадок, полученный после 20-мин центрифугирования при 12 000 g, переносили в рабочий буфер, ресуспендировали его на магнитной мешалке и затем вновь центрифугировали при 12 000 g. Полученную надосадочную жидкость диализовали в течение ночи против 1000-кратного объема рабочего буфера и подвергали электрофорезу. Электрофорез проводили в нативной системе в 4—30 %-м градиентном полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Noller [11] в трис-боратном буфере (рН 8,5). Образцы наносили в двух повторностях. Белки в одной части геля окрашивали 0,05 %-м кумасси бриллиантовым голубым G-250 для визуализации белковых полос. Другую (неокрашенную) часть геля разрезали на участки в соответствии с расположением белковых полос в окрашенной части. При помощи электроэлюатора ПЭ-6 («Биотех», Москва) белки элюировали из геля.

Выделение ДНК *P. boyanum* и цианофага LPP-3. ДНК цианобактерии *P. boyanum* получали по методу [13] с модификациями Менджула и соавт. [5]. ДНК цианофага LPP-3 выделяли фенольно-детергентным методом, описанным в [4]. Качество полученной ДНК контролировали спектрофотометрически и электрофоретически.

Приготовление синтетических матриц-затравок. Синтетические матрицы-затравки готовили, используя калиевые соли рибополимеров (polyA, polyU, polyG и polyC). Растворы полимеров в буфере TE (10 мМ трис-НСl, рН 8, 1 мМ ЭДТА), содержащие комплексные полирибонуклеотиды, соединяли в соотношении 1:1, выдерживали в течение 3 мин на кипящей водяной бане, а затем охлаждали до комнатной температуры. Наличие гипохромного эффекта, равного 7 % для смеси polyA и polyU (polyA-polyU) и 16 % для смеси polyG и polyC (polyG-polyC), свидетельствовало о появлении в структуре матриц двухспиральных участков.

Определение 3'—5'-экзонуклеазной активности. После гидролиза нативной ДНК тимуса теленка рестриктазой *MspI*, дающей выступающие 5'-концы с остатками dGMP и dCMP, доставляли концы фрагментов ДНК при помощи фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* по Маниатису [2]. Для увеличения эффективности мечения использовали два типа меченых предшественников — $[H^3]$ -dGTP и $[H^3]$ -dCTP с удельными активностями 2590 и 2200 ТБк/моль соответственно. ДНК, меченная таким образом по 3'-концу, имела удельную радиоактивность $1,72 \cdot 10^4$ имп/мин на 1 мкг субстрата. Экзонуклеазную активность ферментов тестировали в направлении 3'—5' в 80 мкл реакционной смеси, которая содержала те же компоненты, что и реакционная смесь для определения ДНК-полимеразной активности [3], за исключением дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и активированной ДНК. Вместо этих ингредиентов вносили равное по объему количество дистиллированной воды и $[H^3]$ -3'-ДНК соответственно.

Определение 5'—3'-экзонуклеазной активности. Нативную ДНК фага лямбда метили по 5'-концу с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 в реакции обмена с γ - $[P^{32}]$ АТР (удельная радиоактивность 37 ПБк/моль) и аденозиндифосфатом в имидазол-НСl-буфере (рН 6,6) [6]. Избыток невключившейся метки удаляли гель-фильтрацией на сефадексе G-50 с последующим переосаждением меченой ДНК этанолом. $[P^{32}]$ -5'-ДНК имела удельную радиоактивность $1,6 \cdot 10^5$ имп/мин на 1 мкг субстрата. Экзонуклеазную активность в 5'—3'-направлении определяли аналогично вышеописанному испытанию на 3'—5'-экзонуклеазу за исключением того, что в реакционные смеси вместо $[H^3]$ -3'-ДНК вносили по 0,5 мкг ДНК, меченной по 5'-концу.

При тестировании 5'—3'- и 3'—5'-экзонуклеазных функций полимераз цианобактерии ДНК-полимеразы, используемые в качестве контроля наличия и уровней исследуемых активностей, вносили в реакционные смеси в количествах, равных по ДНК-полимеразной активности таковым испытываемых ДНК-полимераз. Все смеси одновременно инкубировали при 40 °С, пробы отбирали через 10, 20, 50 и 80 мин и далее анализировали на содержание радиоактивно меченной ДНК по [8].

Результаты и обсуждение. Очищенные препараты ДНК-полимераз *P. boryanum* представляли собой препараты, гомогенные по белку и полученные после элюирования соответствующих белковых полос из

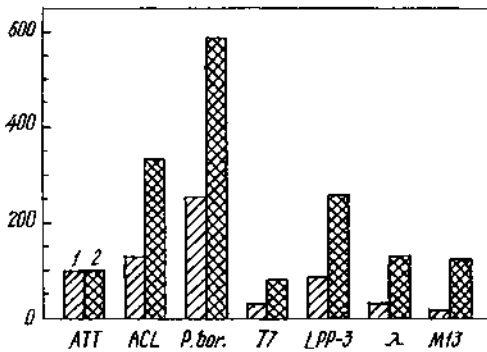


Рис. 1. Специфичность ДНК-полимераз *P. boryanum* к естественным матрицам: 1, 2 — ДНК-полимераза I и II *P. boryanum* соответственно. Матричная специфичность выражена как отношение способности ферментов функционировать на тестируемой матрице (%) к аналогичной способности полимераз использовать активированную ДНК тимуса теленка (АТТ). Обозначения матриц см. в тексте

части геля, не подвергавшейся окрашиванию. Ранее было показано [7], что после электрофореза в ПААГ в нативных условиях с последующей элюцией белков из геля в частично очищенных экстрактах *P. boryanum* достоверно обнаруживаются два белка, обладающих ДНК-полимеразной активностью и имеющих мол. массы 230 000 и 120 000 (обозначенные как ДНК-полимераза II и ДНК-полимераза I соответственно). Расположение белков 230 000 и 120 000 в неокрашенной части геля определяли с помощью стандартов мол. массы окрашенной части (равной геометрии окрашенных и неокрашенных участков достигали вымачиванием участка геля после окраски в растворе с 40 %-м этанолом) и двух внутренних маркеров в неокрашенной части, размещение которых контролировали визуально (внутренними маркерами служили цианобактериальные пигменты — белки 360 000 и 130 000). После предварительного тестирования белковых препаратов на полимеразную активность ДНК-полимеразы *P. boryanum* использовали в последующих экспериментах.

Специфичность ДНК-полимераз *P. boryanum* к матрицам. В экспериментах по изучению матричной специфичности ДНК-полимераз цианобактерии использовали следующие матрицы: активированные двухцепочечные ДНК спермы лосося (АСЛ) и тимуса теленка (АТТ) (специфичность ДНК-полимераз *P. boryanum* к последней матрице принята за 100 %), нативные двухцепочечные ДНК цианобактерии *P. boryanum*, фагов T7, LPP-3 (цианофаг, лизирующий *P. boryanum*) и лямбда (кольцевая форма), одноцепочечная ДНК фага M13 (кольцевая форма), которые вносили в реакционные смеси в равных весовых количествах. ДНК-полимераза II *P. boryanum* эффективно использовала все испытанные матрицы, характеризуясь повышенной специфичностью к цианобактериальной (589 %) и цианофаговой ДНК (257 %), а также к АСЛ (рис. 1). ДНК-полимераза I цианобактерии была менее активной на всех фаговых матрицах (менее 100 %), однако эффективно включала радиоактивную метку в ДНК из эукариотических клеток и цианобактериальную матрицу (252 %).

Данные по специфичности ДНК-полимераз *P. boryanum* к синтетическим матрицам приведены в таблице.

Оба фермента цианобактерии эффективнее включают метку в праймированные синтетические матрицы, чем в активированную ДНК ти-

муса теленка и оказываются не в состоянии связываться с одноцепочечными рибополимерами, не имеющими двухспиральных участков. В этой серии опытов ДНК-полимераза I на 15–80 % эффективнее утилизирует dATP, dTTP и dCTP, чем ДНК-полимераза II, но последний фермент более активно включает dGTP.

Экзонуклеазные активности ДНК-полимераз *P. boyanum* и т. При определении корректирующей активности в качестве контрольных ферментов были выбраны ДНК-полимераза фага T4, обладающая одной из наиболее мощных 3'–5'-эксонуклеаз, и фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, имеющий сравнительно слабую кор-

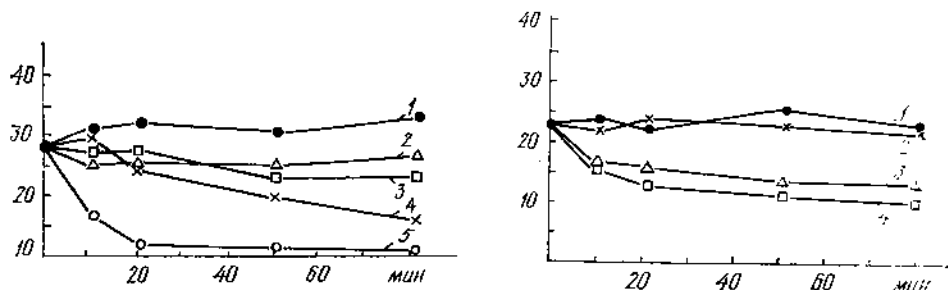


Рис. 2. 3'–5'-Эксонуклеазная активность ДНК-полимераз *P. boyanum*. Определена как радиоактивность [³H]-3'-ДНК после инкубации с ферментами: 1 — контроль матрицы (фермент отсутствует); 2 — ДНК-полимераза I *P. boyanum*; 3 — фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*; 4 — ДНК-полимераза II *P. boyanum*; 5 — ДНК-полимераза фага T4

Рис. 3. 5'–3'-Эксонуклеазная активность ДНК-полимераз *P. boyanum*. Определена как радиоактивность [³²P]-5'-ДНК после инкубации с ферментами: 1 — контроль матрицы (фермент отсутствует); 2 — ДНК-полимераза II *P. boyanum*; 3 — ДНК-полимераза I *P. boyanum*; 4 — ДНК-полимераза I *E. coli*

ректирующую активность. Тестирование на 3'–5'-эксонуклеазную активность ДНК-полимераз цианобактерии и контрольных ферментов выявило, что из всех испытанных ферментов наиболее интенсивно выщепляла метку в 3'–5'-направлении ДНК-полимераза фага T4. Сравнительно меньшей корректирующей активностью обладала ДНК-полимераза II *P. boyanum*. Еще менее активными эксонуклеазами оказались ДНК-полимераза I *P. boyanum* и фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* (рис. 2). Через 80 мин после начала инкубирования в пробах, содержащих ДНК-полимеразу фага T4, осталось около 64 % связанной радиоактивности, а в пробах с ДНК-полимеразой II *P. boyanum*, фрагментом Кленова и ДНК-полимеразой I *P. boyanum* — 74, 90 и 93 % соответственно. При определении репарирующих функций ферментов *P. boyanum* контролем наличия и уровня активности служила ДНК-полимераза I *E. coli*, выполняющая функции основного репарирующего фермента кишечной палочки [12]. Параллельное тестирование 5'–3'-эксонуклеазной активности проб, содержащих цианобактериальные ферменты и контрольный фермент, показало, что способно-

Специфичность ДНК-полимераз *P. boyanum* к синтетическим матрицам (в % к активности полимераз в стандартной реакционной смеси)

Фермент	Синтетические матрицы, тип метки							
	Праймированные				Непраймированные			
	poly A-poly U		poly G-poly G		poly A	poly U	poly G	poly C
	dATP	dTTP	dCTP	dGTP	dTTP	dATP	dCTP	dGTP
ДНК-полимераза I	174	120	182	131	5,3	4,0	0,3	0,1
ДНК-полимераза II	97	103	105	143	6,2	9,1	0,2	0,2

стью выщеплять метку с 5'-конца обладают только ДНК-полимераза I *P. boryanum* и фермент кишечной палочки (рис. 3). После 10-мин инкубирования проб с [32 P]-5'-ДНК и данными полимеразными ферментами в матрице сохранялось 84 % (в пробе с ДНК-полимеразой I *P. boryanum*) и 68 % (в пробе с ДНК-полимеразой I *E. coli*) радиоактивной метки, а после 80-мин инкубирования — 55 и 45 % соответственно. При этом ДНК-полимераза II цианобактерии в течение всего периода инкубации не выявила способности выщеплять радиоактивную метку в направлении 5'—3'.

Исследование матричной специфичности и экзонуклеазных активностей ДНК-зависимых ДНК-полимераз цианобактерии *P. boryanum* дает основание для вывода о различной функциональной роли этих ферментов в клетке цианобактерии. ДНК-полимераза II *P. boryanum* эффективно использует испытанные матрицы с различной структурой, кроме одноцепочечных полирибонуклеотидов, при этом связывание и утилизация цианобактериальной ДНК происходит в 6 раз активнее, чем использование АТТ. Следует отметить, что способность ДНК-полимеразы II включать метку в одноцепочечную непраймированную ДНК (ДНК фага M13) косвенно свидетельствует о наличии в составе этого фермента низкоспецифичной праймазы — явление, широко распространенное среди ДНК-полимераз α -типа [9]. ДНК-полимераза II *P. boryanum* обладает сравнительно высокой корректирующей активностью (всего на 15—20 % меньшей, чем у наиболее мощной из ассоциированных с полимеразой экзонуклеаз — ДНК-полимераза фага T4) и не имеет репарирующей активности. Ранее, по данным ингибиторного анализа, было установлено [7], что этот фермент относится к ДНК-полимеразам α -типа и имеет мол. массу, близкую к мол. массам ферментов этого класса. Принимая во внимание эти данные, а также результаты настоящего исследования, можно сделать вывод о том, что именно ДНК-полимераза II является основным репликативным ферментом цианобактерии, который *in vivo* ответствен, прежде всего, за процесс полимеризации dNTP на хромосомной ДНК *P. boryanum*.

ДНК-полимераза I *P. boryanum* менее активна, чем ДНК-полимераза II на испытанных натуральных матрицах (в том числе и на ДНК *P. boryanum*), и также оказалась не в состоянии использовать непраймированные рибополимеры. Этот фермент, как и ДНК-полимераза I *E. coli* [9], обладает одновременно корректирующей и репарирующей активностями, ассоциированными с ДНК-полимеразной активностью, причем уровни экзонуклеазных активностей полимераз *E. coli* и *P. boryanum* при параллельном тестировании оказались близкими. Как показано ранее [7], ДНК-полимераза I цианобактерии имеет близкое к ферменту *E. coli* значение молекулярной массы ($120\,000 \pm 15\,000$ и $109\,000$ [9] соответственно), и активность обоих ферментов устойчива к действию N-этилмалеимида и присутствию в реакционной смеси дидезоксинуклеозидтрифосфатов [7, 9]. Такое подобие может быть следствием общности выполняемых этими ферментами функций в клетках-хозяевах. ДНК-полимераза I, вероятно, является основным репарирующим ферментом цианобактерии *P. boryanum*, осуществляющим вырезание праймеров, застройку пробелов и брешей и, возможно, принимающим участие в процессах эксцизионной репарации, а также выполняющим другие функции, подобные таковым ДНК-полимеразы I *E. coli* [9].

С. М. Суханов, Н. В. Нестерова, М. I. Менджул, С. О. Сирчин

МАТРИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ І ЕКЗОНУКЛЕАЗНІ АКТИВНОСТІ ДНК-ПОЛІМЕРАЗ ЦІАНОБАКТЕРІЙ *PLESTONEMA BORYANUM*

Резюме

Досліджено функціональні характеристики ДНК-залежних ДНК-полімераз цианобактерії *P. boryanum*. Встановлено, що ДНК-полімераза II (ДПІІ) активно використовує матриці з різною структурою (найбільш активний фермент на ДНК *P. boryanum* та

ціанофага LPP-3, який лізує цю ціанобактерію), ДНК-полімераза I (ДПІ) менш активна на більшості випробуваних матриць, за винятком ціанобактеріальної ДНК. Обидва ферменти потребують праймування синтетичних рибонуклеїнових матриць та проявили різну здатність до включення кожного з дезоксирибонуклеозидтрифосфатів. ДПІ та ДПІІ мають 3'—5'-екзонуклеазну активність, при цьому ДПІІ має потужнішу асоційовану екзонуклеазу. Тільки ДПІ здатна гідролізувати фосфодієфірні зв'язки у 5'—3'-напрямку. Зроблено висновок про можливу функціональну роль ціанобактеріальних ДНК-полімераз *in vivo*: ДПІІ є основним клітинним реплікативним ферментом, а ДПІ відповідає за здійснення репаративних процесів та близька за функціями до ДНК-полімерази I *Escherichia coli*.

S. N. Sukhanov, N. V. Nesterova, M. I. Mendzhul, S. A. Syrchin

TEMPLATE SPECIFICITY AND EXONUCLEASE ACTIVITIES OF DNA-POLYMERASES OF CYANOBACTERIA PLECTONEMA BORYANUM

Summary

Functional characteristics of DNA-dependent DNA-polymerases of cyanobacteria *P. boryanum* have been studied. DNA-polymerase II (DP-II) have been determined to use actively the templates with various structures (the most active was the enzyme on DNA *P. boryanum* and cyanophage LPP-3 which lyse this cyanobacteria); DNA-polymerase I (DP-I) was less active on the most templates tested excluding cyanobacterial DNA. Both enzymes need priming of the synthetic ribonucleic templates and they manifested differ abilities to include each of desoxynucleosidtriphosphates. DP-I and DP-II have 3'—5' exonuclease activity, moreover, DP-II has more potent associated exonuclease. Only DP-I is capable of hydrolysing phosphodiether bonds in directions of 5'—3'. The conclusion has been made of possible functional role of cyanobacterial DNA-polymerases *in vivo*: DP-II is the principal cellular replicative enzyme, and DP-I is responsible for realization of reparative processes and close in properties to DNA-polymerase I from *E. coli*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Лысенко Т. Г., Шаинская О. А., Геращенко И. В. и др. Сравнение двух методов получения бесклеточных экстрактов цианобактерий для изучения активности дегидрогеназ // Микробиол. журн.— 1980.— 51, № 3.— С. 87—91.
2. Маньятис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 479 с.
3. Менджул М. И., Нестерова Н. В., Суханов С. Н. Выделение и частичная очистка ДНК-зависимой ДНК-полимеразы из клеток цианобактерий *Plectonema boryanum* // Микробиол. журн.— 1993.— 55, № 2.— С. 46—51.
4. Менджул М. И., Сырчин С. А., Аверкиев А. А. и др. Сравнение различных методов выделения цианофага LPP-3 и его ДНК // Там же.— 1992.— 54, № 2.— С. 70—74.
5. Менджул М. И., Сырчин С. А., Ребенгиш П. П. и др. Способы защиты ДНК цианофага LPP-3 от систем рестрикции — модификации цианобактерий *Plectonema boryanum* // Биополимеры и клетка.— 1993.— 9, № 5.— С. 54—61.
6. Методы молекулярной генетики и геной инженерии / Под ред. Р. И. Салганика.— Новосибирск: Наука, 1990.— С. 28.
7. Суханов С. Н., Нестерова Н. В., Менджул М. И. Физико-химические свойства и чувствительность к ингибиторам ДНК-полимераз цианобактерии *Plectonema boryanum* // Микробиол. журн.— 1993.— 55, № 5.
8. Bollum F. G. Filter paper disk techniques for assaying radioactive macromolecules // Meth. Enzymol.— 1968.— 12.— P. 169—173.
9. Hubschner U. DNA polymerases in prokaryotes: mode of action and biological implications // Experientia.— 1983.— 39, N 1.— P. 1—126.
10. Klenow H., Henningsen I. Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1970.— 65, N 2.— P. 168—175.
11. Noller E., Fischer H., Simek H. Nondescription of DNA polymerases in nondenaturating polyacrylamide gels // Eur. J. Biochem.— 1985.— 151.— N 2.— P. 311—317.
12. Nossal N., Prokaryotic DNA replications systems // Ann. Rev. Biochem.— 1983.— 53.— P. 581—615.
13. Porter R. DNA transformation // Meth. Enzymol.— 1988.— 167.— P. 703—712.

Ин-т микробиології та вірусології ім. Д. Ж. Заболотного
АН України, Київ

Получено 10.08.93