

THERMODYNAMICS OF THE B-Z TRANSITION OF POLY[d(G-C)]
IN WATER/ETHANOL SOLUTION. THE «TIE» CALORIMETRY

A. T. Karapetyan *, E. E. Minyat, P. O. Vardevanyan *, V. I. Ivanov

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow
* Pedagogical Institute, Armenian SSR, Kirovakan

Summary

Poly[d(G-C)] in 55 % ethanol solution shifts from the Z form to the B form with the temperature rise from 20 to 50 °C. Enthalpy of the B-Z transition, ΔH_{BZ} , has been determined with a «tie», a polyamine, which stabilized the Z conformation: $\Delta H_{BZ} = -1.4$ kcal/mol. This value was shown to be practically independent from the ionic strength in the range of $5 \cdot 10^{-4}$ — $2 \cdot 10^{-3}$ M NaCl.

1. Karapetyan A. T., Minyat E. E., Ivanov V. I. Increase in temperature induces the Z to B transition of poly d(G-C) in water-ethanol solution // FEBS Lett.—1984.—173, N 1.—P. 243—246.
2. Pohl F. M., Jovin T. M. Salt-induced co-operative conformational change of a synthetic DNA: equilibrium and kinetic studies with poly(dG-dC) // J. Mol. Biol.—1972.—67, N 3.—P. 375—396.
3. Ivanov V. I., Minyat E. E. The transitions between left- and right-handed forms of poly(dG—dC) // Nucl. Acids Res.—1981.—9, N 18.—P. 4783—4798.
4. Woisard A., Guschlbauer W., Fazakerley G. V. The low ionic strength form of the sodium salt of poly(dm⁵C-dG) is a B DNA // Ibid.—1986.—14, N 1.—P. 3515—3519.
5. Ethidium bromide as a cooperative effector of a DNA structure / F. M. Pohl, T. M. Jovin, W. Baer, Ch. Holbrook // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1972.—69, N 13.—P. 3805—3809.
6. Lazurkin Yu. S., Frank-Kamenetskii M. D., Trifonov E. N. Melting of DNA: its study and application as a research method // Biopolymers.—1970.—9, N 10.—P. 1253—1306.
7. Франк-Каменецкий М. Д., Карапетян А. Т. Теория плавления ДНК в присутствии низкомолекулярных веществ // Молекуляр. биология.—1972.—6, № 7.—С. 624—635.

Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва
Кировакан. пед. ин-т

Получено 09.03.87

УДК 547.963.32

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ
И БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ОБРАТНОЙ ГИРАЗЫ
ИЗ ЭКСТРЕМАЛЬНО ТЕРМОФИЛЬНЫХ АРХЕБАКТЕРИЙ *

А. И. Слесарев, С. А. Козьявкин

Введение. Существование живых организмов при высоких температурах (вплоть до 110 °C [1]) ставит проблему стабилизации вторичных и третичных структур биологических макромолекул. Обнаружение специального фермента, создающего положительную сверхспирализацию в ДНК,— обратной гиразы — в двух различных экстремально термофильных архебактериях (*Sulfolobus acidocaldarius* с оптимумом роста при 75 °C [2, 3] и *Desulfurococcus amylolyticus* с оптимумом роста при 92 °C [4]), а также обнаружение положительной сверхспирализации в ДНК, выделенной из *S. acidocaldarius* [5], дают основания предположить, что создание положительной сверхспирализации является общим принципом стабилизации двойной спирали ДНК в экстремальных термофилах. Поскольку основная роль при этом принадлежит обратной гиразе, то в настоящее время вызывает интерес изучение специфики и механизма действия фермента, а также его места в ряду других топоизомераз.

Данная работа посвящена исследованию субстратной специфичности обратной гиразы из *D. amylolyticus*.

* Представлена членом редколлегии М. Д. Франк-Каменецким.

Материалы и методы. Полученный ранее препарат обратной гиразы из *D. amylophilicus* [4] (фосфоцеллюлозная фракция) подвергли дальнейшей очистке на гепарин-сефарозе. Для этого фосфоцеллюлозную фракцию диализовали против буферного раствора (50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 0,2 М NaCl, 1 мМ спермидин, 0,1 мМ дитиотреитол) и наносили на колонку с гепарин-сефарозой объемом 3 мл, уравновешенную этим же буфером. Колонку промывали тремя объемами стартового буфера и проводили элюцию 50 мл линейного градиента NaCl: 0,2—1,0 М. Активность во фракциях определяли, как описано ранее [4]. Активные фракции объединяли, диализовали против 50 мМ К-фосфатного буфера, рН 7,4, наносили на колонку с оксипатитом и концентрировали, элюируя 0,8 М К-фосфатным буфером, рН 7,5. Эту фракцию затем диализовали против буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 0,5 М NaCl, 1 мМ спермидин, 1 мМ ФМСФ, 1 мМ 2-меркаптоэтанол, 20 %-ный глицерин. Белковый состав фракции анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии DS-Na по [4]. Полученный препарат топоизомеразы содержал один основной полипептид с молекулярной массой 135000, с которым и связана активность.

ДНК плазмиды *pAO3* любезно предоставлена В. Г. Коштовым, ДНК *pUC19* — В. И. Лямичевым, ДНК *pAT48* — И. Г. Панютиным, ондонитевая ДНК фага *M13* — Н. С. Незнановым (Ин-т молекуляр. генетики (ИМГ) АН СССР). Чтобы получить положительно сверхспирализованные при температуре $>25^{\circ}\text{C}$ препараты, ДНК плазмид *pUC19* или *pAT48* инкубировали при 4°C с топоизомеразой I из асцитной карциномы Krebs II, любезно предоставленной С. М. Миркиным (ИМГ АН СССР).

Одиночный топоизомер получали следующим образом: проводили электрофорез ДНК *pAO3* в 2 %-ной агарозе в присутствии 0,03 мкг/мл бромистого этидия в течение 24 ч при напряженности электрического поля 1 В/см. Затем вырезали полосу, соответствующую топоизомеру с фиксированным значением числа зацеплений. ДНК экстрагировали из геля стандартным образом [6].

Кольцевую замкнутую ДНК (кзДНК) с одонитевой петлей конструировали по методу Киркегаард и Вонга [7] на основе ДНК плазмид *pUC19* и *pAT48*. Последняя отличается от *pUC19* наличием АТ-последовательности длиной 48 пар оснований, встроенной в *SmaI*-сайт *pUC19* [8]. ДНК *pAT48* линейризовали рестрикционной эндонуклеазой *HindIII*, ДНК *pUC19* — *cfr101*. Затем эти ДНК смешивали и отжигали. Гетеродуплексные кольцевые молекулы с одонитевыми разрывами отделяли препаративным электрофорезом в 1,5 %-ной агарозе, а затем экстрагировали из геля. Очищенные гетеродуплексные молекулы лигировали Т4-ДНК-лигазой при 4°C . В результате получились кольцевые замкнутые молекулы, содержащие одну нить от *pUC19* и одну нить от *pAT48*. В таких молекулах содержался некомплементарный участок из 48 оснований.

Реакции обратной гиразы с кзДНК проводили в стандартной реакционной системе [4]. Продукты топоизомеризации анализировали методом двухмерного электрофореза, как описано ранее [4].

Результаты. После хроматографии на гепарин-сефарозе препарат обратной гиразы бы доведен до состояния, близкого к гомогенности. Активность связана с основным полипептидом с молекулярной массой 135000 (данные не приведены).

Для определения субстратной специфичности обратной гиразы мы исследовали влияние одонитевой ДНК на эффективность работы фермента. В стандартную реакционную систему, содержащую отрицательно сверхспирализованную ДНК *pBR322*, добавляли различные количества одонитевой ДНК фага *M13*. Продукты топоизомеризации анализировали методом двухмерного электрофореза (рис. 1). Как видно, добавление одонитевой ДНК ингибирует действие обратной гиразы.

Далее мы исследовали влияние одонитевой петли в составе кзДНК на работу обратной гиразы. Эксперименты проводили на ДНК *pUC19*, *pAT48* и гетеродуплексной кзДНК с одонитевой петлей, конструированной на основе этих двух плазмид. Все ДНК были исходно одинаково положительно сверхспирализованы (рис. 2, Б и 3, Б, Г). Результаты действия фермента на эти ДНК приведены на рис. 2, А и 3, А, В. Из рис. 3 видно, что в условиях эксперимента обратная гираза не действует на *pUC19* и *pAT48*. Однако в тех же условиях фермент сверхспирализует гетеродуплексную кзДНК с одонитевой петлей

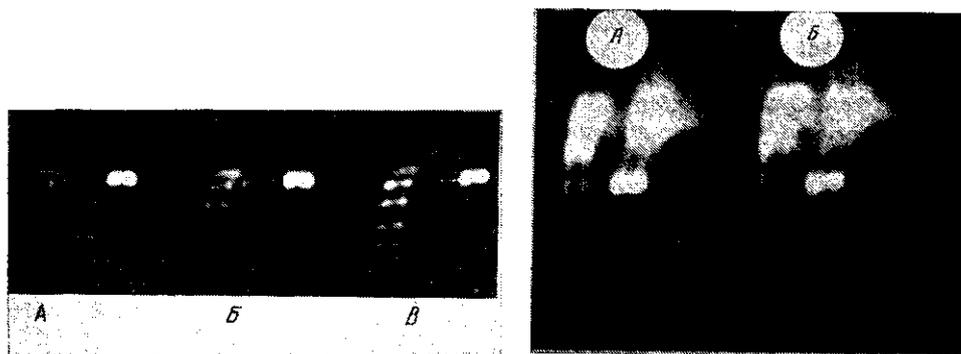


Рис. 1. Ингибирование действия обратной гиразы однонитевой ДНК. Различные количества ДНК *M13* добавляли в стандартную реакционную систему, содержащую ДНК *pBR322*: молярное отношение *M13* и *pBR322* равно: 1 (А); 0,1 (Б); контроль (без ДНК *M13*) (В). Реакцию проводили при 90 °С. Продукты топиомеризации анализировали методом двухмерного электрофореза в 1 %-ной агарозе. Разделение в первом направлении вела сверху вниз, во втором — справа налево в том же буфере, содержащем 2 мкг/мл хлорохина. Количество фермента в смеси 0,05 мкг, количество ДНК *pBR322* — 0,3 мкг

Fig. 1. Inhibition of the reverse gyrase action by a single-stranded DNA. Various amounts of DNA *M13* were added in the standard reaction mixture containing *pBR322*. Reaction was carried out at 90 °C. Analysis of topoisomerization products was carried out by two-dimensional electrophoresis in 1 % agarose gel. Separation in the first dimension was from top to bottom, in the second one — from right to left in the same buffer containing 2 µg/ml chloroquine. The quantity of enzyme in the mixture was 0.05 µg, that of DNA *pBR322* was 0.3 µg. The molar ratios *M13* to *pBR322* were: А) 1; Б) 0.1; В) control (without DNA *M13*)

Рис. 2. Действие обратной гиразы на положительно сверхспирализованную гетеродуплексную кзДНК с однонитевой петлей: А — обратную гиразу (0,1 мкг) инкубировали с 0,5 мкг положительно сверхспирализованной кзДНК с однонитевой петлей в стандартной реакционной системе при 80 °С (справа видны: открытая кольцевая ДНК (верхнее пятно) и линейная ДНК (нижняя полоса); слева — ветвь положительных топиомеров); Б — контроль (в отсутствие фермента). Продукты топиомеризации анализировали двухмерным электрофорезом (см. рис. 1) в 1,5 %-ной агарозе

Fig. 2. Action of reverse gyrase on positively supercoiled heteroduplex closed circular DNA with a single-stranded loop: А — reverse gyrase (0.1 µg) was incubated with 0.5 µg of positively supercoiled DNA containing the single-stranded loop in the standard reaction mixture at 80 °C (the visible bands on the right are: open circular DNA (upper spot) and linear DNA (lower band); on the left — leadders of positive topoisomers); Б — control (without the enzyme). Topoisomerization products were analyzed by two-dimensional electrophoresis in 1.5 % agarose gel (see Fig. 1)

Рис. 3. Инкубирование обратной гиразы с положительно сверхспирализованными ДНК *pUC19* и *pAT48* (по данным двухмерного электрофореза в 1,5 %-ной агарозе, см. рис. 1): обратную гиразу (0,1 мкг) инкубировали в стандартных условиях с 0,2 мкг ДНК *pAT48* (А); ДНК *pUC19* (0,2 мкг) (Б); контроль в отсутствие фермента ДНК *pAT48* (0,4 мкг) (Б); ДНК *pUC19* (0,35 мкг) (Г). В этих условиях обратная гираза не действует на исходно положительно сверхспирализованную ДНК, но действует на гетеродуплексную кзДНК с однонитевой петлей (см. рис. 2)

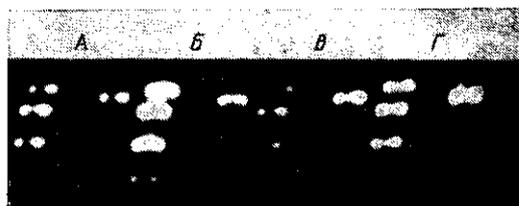


Fig. 3. Incubation of reverse gyrase with positively supercoiled DNA *pUC19* and *pAT48* (on the data of two-dimensional electrophoresis in 1.5 % agarose gel, see Fig. 1): reverse gyrase (0.1 µg) was incubated with 0.2 µg DNA *pAT48* (А); DNA *pUC19* (0.2 µg) (Б); control without the enzyme: DNA *pAT48* (0.4 µg) (Б); DNA *pUC19* (0.35 µg) (Г). Under these conditions reverse gyrase does not act on positively supercoiled DNA, but acts (under the same conditions) on heteroduplex DNA with the single-stranded loop (see Fig. 2).

(рис. 2). Следовательно, наличие однонитевого участка в составе кЗДНК активирует работу обратной гиразы.

Обнаруженное свойство позволяет предположить, что обратная гираза является топоизомеразой I типа. Это мы проверили экспериментально. На рис. 4 показано действие фермента на одиночный отрицательный топоизомер ДНК *pAO3*. Видно, что обратная гираза увеличивает число зацеплений исходного топоизомера на число, кратное 1 (рис. 4, Б). Следовательно, обратная гираза из *D. amylolyticus*, так же

как и обратная гираза из *S. acidocaldarius* [2, 3], принадлежит к топоизомеразам I типа.

Обсуждение. Обнаружен-

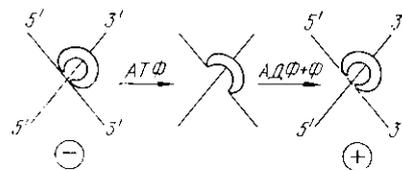
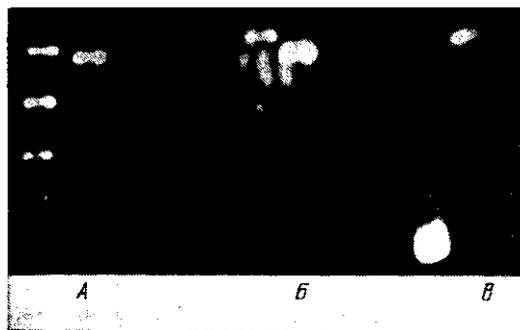


Рис. 4. Изменение числа зацеплений в кЗДНК обратной гиразой. Одиночный отрицательно сверхспирализованный топоизомер *pAO3* инкубировали с обратной гиразой в стандартных условиях: А — ДНК *pAO3* (0,3 мкг), инкубированная с 0,1 мкг обратной гиразы (число зацеплений при переходе от одного топоизомера к другому изменяется на 1); Б — одиночный топоизомер *pAO3* (0,2 мкг), инкубированный с 0,1 мкг обратной гиразы (обратная гираза увеличивает число зацеплений на число, кратное 1); В — отрицательно сверхспирализованный одиночный топоизомер *pAO3* в отсутствие фермента. Полученные топоизомеры анализировали двухмерным электрофорезом (см. рис. 1) в 2 %-ной агарозе

Fig. 4. Change in the linking number of closed circular DNA by reverse gyrase. A negative unique topoisomer *pAO3* was incubated with reverse gyrase under the standard conditions: A — DNA *pAO3* (0.3 μg) incubated with 0.1 μg reverse gyrase. This is a control demonstrating that the linking number changes by +1; B — unique topoisomer *pAO3* incubated with 0.1 μg reverse gyrase (reverse gyrase convert this topoisomer to series of topoisomers increasing their linking number one by one); B — negatively supercoiled unique topoisomer *pAO3* without the enzyme. Topoisomers produced by reverse gyrase were examined by two-dimensional electrophoresis in 2% agarose gel (see Fig. 1)

Рис. 5. Модель создания обратной гиразой положительной сверхспирализации посредством временно создаваемого однонитевого разрыва. Обратная гираза связывается с одной нитью ДНК и производит временный разрыв. Затем происходит «протаскивание» через этот разрыв другой нити и лигирование разрыва. Этот процесс обратная гираза осуществляет только в том случае, если исходно взаимное расположение нитей такое, как указано слева. В такой модели разрываемая и протаскиваемая нити должны быть однонитевыми

Fig. 5. A model for positive supercoiling by reverse gyrase. Reverse gyrase binds one strand of DNA and transiently nicks it. After this the enzyme passes the other strand through the break. Sealing the break results in a change in linking fixed at +1. Reverse gyrase performs this process only in the case if mutual orientation of DNA strands is as indicated on the left of the Figure

ное нами свойство субстратной специфичности обратной гиразы к однонитевой ДНК, а также однонаправленность вращения нитей двойной спирали ДНК позволяют предположить определенный механизм работы этого фермента. По-видимому, обратная гираза осуществляет перенос одной нити через создаваемый ею временный разрыв в другой нити, причем взаимная ориентация нитей должна быть строго определенной, отвечающей созданию одного положительного сверхвитка (рис. 5). Отметим, что механизм действия гираз эубактерий и обратных гираз экстремально термофильных архебактерий различен.

В предыдущей работе было показано, что обратная гираза закручивает отрицательно сверхспирализованную ДНК до высоких степеней положительной сверхспирализации [4]. Вместе с тем, если ДНК

исходно положительно сверхспирализована, то фермент в тех же условиях не способен закручивать ее до более высокой сверхспиральной плотности. Для объяснения этих результатов следует предположить, что фермент, связываясь с одностранными участками в отрицательно сверхспирализованной ДНК, работает процессивно.

В настоящее время известно, что специфичностью к одностранным ДНК обладают только эубактериальные топоизомеразы I типа [9]. Мы показали, что такой же специфичностью обладает обратная гириза из экстремально термофильных археобактерий. По-видимому, это свойство имеет важное биологическое значение. Появление одностранных участков в отрицательно сверхспирализованной ДНК приводит к активации эубактериальных топоизомераз I типа. Эти ферменты релаксируют возникшее напряжение и тем самым стабилизируют двойную спираль. Аналогично при высоких температурах появление одностранных участков активует обратную гиризу. В этих условиях стабилизация ДНК осуществляется за счет положительной сверхспирализации. Таким образом, специфичность рассматриваемых топоизомераз может использоваться в бактериях для поддержания сверхспирализации ДНК на определенном уровне.

Авторы выражают благодарность С. М. Миркину и А. В. Вологодскому за критические замечания.

SUBSTRATE SPECIFICITY AND BIOLOGICAL ROLE OF REVERSE GYRASE FROM EXTREME THERMOPHILIC ARCHAEACTERIA

A. I. Slesarev, S. A. Kozjakov

Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

Reverse gyrase has been isolated from new archaeobacterium *D. amycolithicus*. It was found that single-stranded DNA was effective in inhibiting the action of reverse gyrase. Using heteroduplex molecules formed from a pair of plasmids, one of which contains a small insertion relative to the other, it is shown that enzyme introduces additional positive supercoils into positively supercoiled DNA if a short single-stranded loop is placed in the DNA. These results suggest that reverse gyrase is specific to single-stranded DNA like eubacterial topoisomerase I. Due to such specificity reverse gyrase can support optimal level of positive supercoiling in extreme thermophiles and prevents denaturation of the genomic DNA of these organisms.

1. Stetter K. O., König H., Stakebrandt E. *Pyrodictium gen. nov.*, a new genus of submarine disc-shaped sulphur reducing archaeobacteria growing optimally at 105 °C // Syst. Appl. Microbiol.—1983.—4, N 3.— P. 535—551.
2. Nakasu S., Kikushi A. Reverse gyrase; ATP-dependent type I topoisomerase from *Sulfolobus* // EMBO J.—1985.—4, N 10.— P. 2705—2710.
3. High positive supercoiling *in vitro* catalyzed by an ATP and polyethylene glycol-stimulated topoisomerase from *Sulfolobus acidocaldarius* / P. Forterre, G. Mirambeau, K. Jaxel et al. // Ibid.— N 8.— P. 2123—2128.
4. Слесарев А. И. Положительная топоизомеразная активность, обнаруженная у новой экстремально термофильной анаэробной археобактерии, восстанавливающей серу // Биополимеры и клетка.—1988.—4, № 1.— С. 28—34.
5. Positive supercoiled DNA in a virus-like particle of an archaeobacterium / M. Nadal, G. Mirambeau, P. Forterre et al. // Nature.—1986.—321, N 6067.— P. 256—258.
6. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual.— New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982—390 p.
7. Kirkegaard K., Wang J. C. Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop // J. Mol. Biol.—1985.—185, N 3.— P. 625—637.
8. Panyulin I., Lyanichev V., Mirkin S. A structural transition in $d(AT)_n : d(AT)_n$ inserts within superhelical DNA // J. Biomol. Struct. and Dynam.—1985.—2, N 6.— P. 1221—1233.
9. Wang J. C. DNA topoisomerases // Ann. Rev. Biochem.—1985.—54.— P. 665—697.

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва

Получено 01.04.87