

Транспозоноподобная структура генома вируса саркомы Рауса — наличие фланкирующих *LTR*, гена *sarc*, находящегося под сильным промотором, обуславливают перспективность использования плазмиды *pATV-8* в исследованиях стадии- и тканеспецифичности экспрессии генов, стабильности структуры трансгеномов, взаимодействия трансгеномов и генома клеток организма, несущего трансгеном.

THE TRANSGENIC MICE CONTAINING *pATV-8* AND *pBR322* PLASMIDS

A. P. Solomko, A. V. Ryndich, T. G. Titok, L. M. Morozova, I. N. Vagina,
L. I. Chashchina, S. V. Evsykov, I. V. Kirichenko, N. A. Sarapina

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The transgenic mice containing recombinant *pATV-8* plasmid, produced by insertion of the provirus DNA of RSV into *pBR322* were obtained. The type of the transgene DNA inheritance cannot be explained by the insertion of its copies into one chromosomal site. In certain transgenic mice lines the phenotypic disorders were observed.

1. Хесин Р. Б. Непостоянство генома.— М.: Наука, 1984.—472 с.
2. Restriction endonuclease and nucleotide sequence analysis of molecularly cloned unintegrated avian tumor virus DNA: structure of large terminal repeats in circle junctions / R. A. Katz, C. A. Omer, G. H. Weis et al. // J. Gen. Virol.—1982.—42, N 1.—P. 346—351.
3. Rescue of a *tk*-plasmid from transgenic mice reveals its episomal transmission / U. Klessling, K. Becker, M. Strause et al. // Mol. and Gen. Genet.—1986.—204, N 2.—P. 328—333.
4. Germ line transmission of autonomous genetic elements in transgenic mouse strains / M. Rassoulzadegan, P. Leopold, J. Vailly, F. Cuzin // Cell.—1986.—46, N 4.—P. 513—519.
5. Gordon J. W. A foreign dihydrofolate reductase gene in transgenic mice acts as a dominant mutation // Mol. and Cell. Biol.—1986.—6, N 6.—P. 2158—2167.
6. An inherited limb deformity created by insertional mutagenesis in transgenic mouse / R. P. Woychik, T. A. Stewart, L. Y. Davis et al. // Nature.—1985.—318, N 6041.—P. 36—40.
7. Prenatal lethality in mice homozygous for human growth hormone sequences integrated in the germ line / E. F. Wagner, L. Covarrubias, T. A. Stewart, B. Mintz // Cell.—1983.—35, N 3.—P. 647—655.
8. Insertion of retrovirus into first intron of I/I-collagen gene leads to embryonic lethal mutation in mice / K. Harbers, M. Kuehn, H. Delius, R. Jaenisch // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1984.—81, N 5.—P. 1504—1508.
9. Covarrubias L., Nishido Y., Mintz B. Early postimplantation embryo lethality due to DNA rearrangements in a transgenic mouse strain // Ibid.—1986.—83, N 16.—P. 6020—6024.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 17.06.87

УДК 577.152:577.151

ИНДУЦИРУЕМАЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫМ СУБСТРАТОМ ДИМЕРИЗАЦИЯ ЭНДОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗЫ MvaI

Л. Г. Овечкина, С. Р. Попова, В. В. Зиновьев, Д. П. Вайтквявичюс,
А. А. Янулайтис, Ю. А. Горбунов, Э. Г. Малыгин

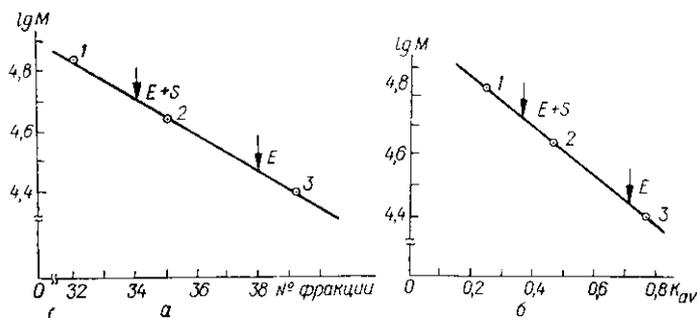
Эндонуклеазы типа II, как правило, узнают симметричную нуклеотидную последовательность и имеют димерную структуру типа α_2 [1]. Имеются, однако, исключения — например, для эндодезоксирибонуклеаз *BglI* и *BspI* показано, что они являются мономерными белками [1].

Исследование таких эндонуклеаз представляет специальный интерес, так как структура фермента, взаимодействующего с симметричным субстратом, должна иметь элементы симметрии. Один из возможных способов образования симметричной струк-

туры — димеризация субъединиц, что было показано, например, для метилазы *Ecodam*, имеющей симметричный сайт узнавания [2].

Целью данной работы являлось определение молекулярной массы эндонуклеазы *MvaI* в денатурирующих и нативных условиях, а также в присутствии синтетических олигонуклеотидов.

Олигодезоксирибонуклеотиды 5'-dAACCTGGAA (I), 5'-dTCCAGGTT (II) и 5'-dCGGATCCG (III) были синтезированы фосфотриэфирным методом [3] и содержали на 5'-конце свободную гидроксильную группу. Эквимольная смесь олигонуклеотидов



Определение молекулярной массы эндонуклеазы *MvaI* (*E*) и комплекса этого фермента с субстратом (*E* + *S*) при температуре 5–7 °С: *a* — ультрацентрифугирование в градиенте концентрации сахарозы; *b* — гель-фильтрация на сефакриле S-200. В качестве субстрата (*S*) использовали двухцепочечный олигонуклеотид, содержащий участок узнавания для эндонуклеазы *MvaI* в концентрации 1,5 мкМ. 1–3 — положение маркерных белков: БСА (68000), овальбумин (45000) и химотрипсиноген (25000) соответственно. Molecular weight determination endonuclease *MvaI* (*E*) and its complex with the substrate (*E* + *S*) at the temperature of 5–7 °С: *a* — sucrose density gradient centrifugation; *b* — gel filtration on sephacryl S-200 column. Oligonucleotide complex (1.5 μM) containing recognition site of endonuclease *MvaI* was used as a substrate (*S*). 1–3 — the marker proteins: bovine serum albumin (68000), ovalbumin (45000) and chymotrypsinogen (25000), respectively

I и II приводит к образованию дуплекса, содержащего в центре последовательность узнавания 5'...C—C—T—G—G... для эндонуклеазы *MvaI*. Самокомплементарный ок-

тануклеотид III образует двухцепочечную структуру, в которой отсутствует участок узнавания для этого фермента.

Эндонуклеазу *MvaI* выделяли по методу [4, 9]. Для определения молекулярной массы фермента использовали методы электрофореза в денатурирующих условиях [5], гель-фильтрации [6] и центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы от 10 до 30 % [7, 8].

Растворы сахарозы готовили в буфере А (20 мМ К-фосфат, рН 7,5, 10 мМ ЭДТА, 7 нМ 2-меркаптоэтанол, 0,6 М NaCl). На градиент сахарозы объемом 5 мл наслаивали 100 мкл препарата эндонуклеазы *MvaI* с концентрацией белка около 10 мкг/мл. Центрифугирование проводили на ультрацентрифуге «Beckman» L5-75 (США) со скоростью 45000 об/мин при температуре 5 °С в течение 20 ч. После центрифугирования градиент раскапывали на фракции по 80 мкл. Активность фермента определяли по методу, приведенному в работе [9]. По калибровочному графику определяли молекулярную массу фермента.

Для гель-фильтрации использовали колонку ($h=10$ см, $d=0,25$ см) с сефакрилом S-200, уравновешенную буфером А с добавлением 100 мкг/мл БСА, и наносили 2 мкл препарата эндонуклеазы с концентрацией белка 50 мкг/мл. Собирали фракции по 25–30 мкл и определяли в каждой ферментативную активность [9]. Все необходимые измерения оптической плотности при 280 нм проводили на спектрофотометре «Обь» (СССР).

По данным электрофореза, в денатурирующих условиях полученный препарат эндонуклеазы *MvaI* представляет собой гомогенный белок, состоящий из одной субъединицы с молекулярной массой 31300 ± 400 ($n=3$). Близкие значения получены при центрифугировании фермента в градиенте концентрации сахарозы 27700 ± 2300 ($n=3$) (рисунок, *a*) и методом гель-фильтрации 27400 ± 1900 ($n=4$) (рисунок, *b*).

Следует отметить, что при понижении концентрации NaCl до 0,1 М в буфере А наблюдается значительное увеличение молекулярной массы фермента в несколько раз

и одновременно падение его активности. Это, по-видимому, связано с агрегацией белка. Уменьшение активности фермента в связи с его агрегацией ранее было показано для эндонуклеазы *EcoRI* [10]. Влияние концентрации NaCl на изменение субъединичной структуры фермента и его активность требует дальнейших исследований.

При центрифугировании фермента в градиенте концентрации сахарозы, содержащем равномерно распределенный по всему объему девятичленный олигонуклеотидный дуплекс, наблюдается увеличение молекулярной массы фермента до 53100 ± 3000 ($n=7$) (рисунок, а). При добавлении 1,5 мкМ олигонуклеотида III, не содержащего участка узнавания рестриктазы *MvaI*, молекулярная масса фермента также увеличивается до 51000. Ранее мы наблюдали димеризацию метилазы *EcodaM* в присутствии олигонуклеотидного дуплекса, не содержащего участка узнавания [2]. Таким образом, димеризация эндонуклеазы *MvaI* и метилазы *EcodaM* происходит, по-видимому, при взаимодействии с любым участком двухцепочечной ДНК.

При гель-фильтрации рестриктазы *MvaI* на колонке с сефакилом S-200, предварительно промытым буфером А и содержащим девятичленный олигонуклеотидный дуплекс, получено значение молекулярной массы фермента 52500 (рисунок, б), что полностью совпадает с данными, которые дает метод ультрацентрифугирования.

Это значение несколько меньше теоретически возможной молекулярной массы, равной 62000, для фермент-субстратного комплекса, содержащего две субъединицы фермента. Такое различие может быть связано с существованием равновесия между комплексом и свободным ферментом [2]. Возможно также, что это несоответствие является следствием использования белковых калибровочных кривых для определения молекулярной массы белок-нуклеинового комплекса. Однако, поскольку в настоящей работе использовали девятичленный олигонуклеотидный субстрат с небольшой молекулярной массой по сравнению с ферментом, трудно предположить значительные изменения глобулярности белково-нуклеиновых частиц. Использование белковых маркеров при определении константы диссоциации фермент-субстратных комплексов методом гель-фильтрации в литературе известно [11].

Таким образом, наблюдаемое увеличение (практически в два раза) молекулярной массы рестриктазы *MvaI* в присутствии двухцепочечного дуплекса по сравнению со свободным ферментом связано с образованием димерной формы фермента. По-видимому, димеризация эндонуклеазы *MvaI* при взаимодействии с ДНК является необходимой стадией образования каталитически активной формы фермент-субстратного комплекса. Возможно, это утверждение справедливо и для рестриктаз *BglI* и *BspI*, выделенных в виде мономерных белков [1].

ENDONUCLEASE *MvaI* DIMERIZATION INDUCED BY THE OLIGONUCLEOTIDE SUBSTRATE

L. G. Ovechkina, S. R. Popova, V. V. Zinoviev, D. P. Vaitkevicius*,
A. A. Janulaitis*, Yu. A. Gorbunov, E. G. Malygin

All-Union Research Institute of Molecular Biology,
Koltsovo, Novosibirsk Region

* Research and Production Amalgamation «Ferment», Vilnius

Summary

Molecular weight of the endonuclease *MvaI* was determined by the method of gel electrophoresis under denaturing conditions. The enzyme consists of a single polypeptide chain with molecular weight of 31300 ± 400 dalton. Similar data are obtained by gel filtration and sucrose density gradient centrifugation. In the presence of substrate the oligonucleotide molecular weight of endonuclease *MvaI* increases up to 53000 ± 3000 dalton, that is related to protein dimerization during the formation of the enzyme-substrate complex.

1. Modrich P. Studies on sequence recognition by type II restriction and modification enzymes // Crit. Revs Biochem.—1982.—13, N 3.—P. 287—323.
2. Изучение индуцированных субстратом изменений в состоянии метилазы *EcodaM* методом малоуглового рентгеновского рассеяния / Ф. В. Тузиков, Л. Н. Яшина, В. В. Зиновьев и др. // Молекуляр. биология.—1986.—20, № 4.—С. 1002—1007.
3. Hirose T., Crea R., Itakura K. Rapid synthesis of trioxynucleotide blocks // Tetrahedron Lett.—1978.—28.—P. 2449—2452.

4. Investigation of restriction-modification enzymes from *M. varians* RFL19 with a new type of specificity toward modification of substrate/V. Butkus, S. Klimasauskas, D. Kersulyte et al. // Nucl. Acids Res.—1985.—13, N 16.— P. 5727—5746.
5. Laemmli U. K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227, N 5259.— P. 680—685.
6. Siegel L. M., Monty K. G. Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel-filtration and density gradient centrifugation // Biochim. et biophys. acta.—1966.—112, N 2.— P. 346—362.
7. Herman G. E., Modrich P. *Escherichia coli* dam methylase. Physical and catalytic properties of the homogeneous enzyme // J. Biol. Chem.—1982.—257, N 5.— P. 2605—2612.
8. Martin R. G., Ames B. N. A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures // Ibid.—1961.—236, N 5.— P. 1372—1379.
9. Януляйтис А. А., Вайткявичюс Д. П. Новый методический подход к разработке получения рестриционных эндонуклеаз. Разработка схемы выделения гомогенного препарата рестриктазы *MvaI* // Биотехнология.—1985.— № 1.— С. 39—51.
10. Alves J. Mechanistische Untersuchungen zur Spaltung von Oligodesoxynucleotiden durch die Restriktionsendonuklease *EcoRI*.—Hannover: Universitat Hannover, 1984.— S. 16—24.
11. Frankel A. D., Ackers G. K., Smith H. O. Measurement of DNA-protein equilibria using gel chromatography: application to the *HinfI* restriction endonuclease // Biochemistry.—1985.—24, N 12.— P. 3049—3054.

ВНИИ молекуляр. биологии,
пос. Кольцово Новосиб. обл.
НПО «Фермент», Вильнюс

Получено 14.07.87

УДК 577.112.855

ПОДОБИЕ ДНК-УЗНАЮЩИХ СТРУКТУР АКТИВАТОРА КООРДИНИРОВАННОЙ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТЫ БИОСИНТЕЗА АМИНОКИСЛОТ У ДРОЖЖЕЙ, РЕГУЛЯТОРОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ И РЕГУЛЯТОРОВ РАЗВИТИЯ И МОРФОГЕНЕЗА

Б. В. Шестопалов

Введение. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* существует координация транскрипции генов, кодирующих ферменты биосинтеза аминокислот [1]. Непосредственным активатором координированной транскрипции является белок *GCN4* [2], причем активация связана с узнаванием белком TGAATC последовательности в регуляторных участках активируемых генов [3]. Авторы работы [4] предприняли попытку определить, к какому из двух известных видов ДНК-узнающей структуры, «пальцевидной» или спираль—изгиб—спираль, относится ДНК-узнающая структура белка *GCN4* и где она локализована. В результате выяснено следующее: ДНК-узнающая структура заключена в С-концевом домене белка — сегменте 222—281; «пальцевидная» структура в ДНК-узнающем домене невозможна, так как в его аминокислотной последовательности нет ключевых для нее остатков; присутствие структуры спираль—изгиб—спираль, локализованной по данным предсказания вторичной структуры ДНК-узнающего домена (спираль 244—261, изгиб 262—265, спираль 266—278), сомнительно: спирали длиннее обычных, аминокислотная последовательность не гомологична аминокислотным последовательностям структур спираль—изгиб—спираль. В итоге авторы пришли к выводу, что вопрос о виде ДНК-узнающей структуры белка *GCN4* и ее локализации остается открытым.

В настоящей работе представлены данные, на основании которых сделано заключение, что белок *GCN4*, возможно, узнает ДНК с помощью ДНК-узнающей структуры спираль—изгиб—спираль, локализованной в сегменте аминокислотной последовательности 256—278, и ДНК-узнающая структура белка *GCN4* подобна ДНК-узнающим структурам белков *MATa1* и *MATa2* — регуляторов дифференцировки клеток дрожжей, и гомеодоменсодержащих белков — регуляторов развития и морфогенеза.

Методы. Использовали необходимые стереохимические условия существования ДНК-узнающей структуры спираль—изгиб—спираль, описанные в нашей статье [5]