

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного

На правах рукопису

Безуглий С.В.

ДНК-залежні ДНК-полімерази *Acholeplasma laidlawii* PG-8

03.00.07. - мікробіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття вченого ступеня кандидата
біологічних наук

Київ - 1993

АВ 27.02

Робота виконана у відділі мікоплазмології Інституту мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного АН України

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00803312 (H)

Науковий керівник: доктор біол. наук,
член-кор. АН України
І.Г.Скрипаль

Офіційні опоненти: доктор біол. наук,
Заслужений діяч науки
України
професор Захарова І.Я.

кандидат біол. наук
Пилипенко В.Г.

Ведуча організація: Науково-дослідний Інститут урології та нефрології МОЗ України

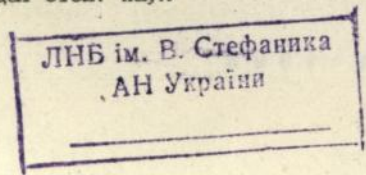
Захист відбудеться 21 квітня 1993 року о 10⁰⁰ на засіданні спеціалізованої ради Д.016.06.01 при Інституті мікробіології та вірусології ім.Д.К.Заболотного АН України за адресою: 252143, Київ-143, вул.Заболотного,154.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту мікробіології та вірусології ім.Д.К.Заболотного.

Автореферат розіслано " ____ " _____ 1993 року.

Вчений секретар
спеціалізованої ради
кандидат біол. наук

Е.О.Коваленко



ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Молікути стали зручним об'єктом для вирішення фундаментальних та прикладних завдань мікробіології. Інтерес до вивчення цих мікроорганізмів пояснюється незвичайною природою цих мікроорганізмів, що займають проміжне положення між бактеріями та вірусами, а також тою роллю, яку вони відіграють у різних сферах діяльності людини. Молікути, будучи паразитами з достатньо широким ареалом хазяїв (рослини, тварини, людина) викликають у них різноманітні захворювання, завдаючи великої шкоди людству.

Ферменти нуклеїнового обміну молікутів одна з найважливіших ланок функціонування їх клітини тому їх детальне вивчення дозволить пізнати механізм обміну нуклеїнових кислот та наблизитися до розуміння біології цих мікроорганізмів, їх місця серед інших мікробів. ДНК-залежні ДНК-полімерази, як основна складова частина реплікативного апарату клітини, є ключовими ферментами цього обміну. Виділення ДНК-полімераза, вивчення їх властивостей, дозволить в'ясувати механізм реплікації ДНК в клітині молікута, а також розробити принципи контролю цього процесу.

В науковій літературі є публікації щодо виділення та вивчення ДНК-залежних ДНК-полімераз у різних представників класу Mollicutes, але всі ці роботи мають характер попередніх повідомлень, які вимагають подальших досліджень.

Саме тому вивчення у молікутів системи синтезу ДНК, її основних складових частин є своєчасним та актуальним завданням.

Те, що ці ферменти у молікутів практично не вивчені, пояснюється, головним чином, складністю одержання біомаси, а якої потрібно виділити достатню їх кількість.

Одержані нами результати щодо властивостей ДНК-полімераз молікутів свідчать про деяку схожість цих ферментів із ДНК-полімеразами інших прокаріотичних організмів. Вони дають можливість прослідкувати їх філогенетичні зв'язки, зрозуміти особливості функціонування як реплікативної системи, так і всього метаболізму ДНК в клітині молікута. Крім того, розроблені підходи селективного впливу на процеси життєдіяльності цих мікроорганізмів.

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було: виділення та розробка економічних засобів очищення ДНК-залежних ДНК-полімераз із обмеженої кількості біомаси *Acholeplasma laidlawii* PG-8, всебічне вивчення їх властивостей. Для досягнення цієї мети потрібно було вирішити такі завдання: 1. Розробити спосіб одержання ДНК-полімераз із мінімальної кількості біомаси. 2. Розробити умови очищення ферментів і одержання їх у гомогенному стані. 3. Провести вивчення властивостей ДНК-полімераз молекулів в порівнянні з подібними ферментами інших організмів.

Наукова новизна. Ферменти вперше виділені та очищені до гомогенного стану; показано існування двох форм ДНК-залежних ДНК-полімераз у реплікативній системі *Acholeplasma laidlawii* PG-8. Створені засоби одержання ДНК-полімераз *Acholeplasma laidlawii* PG-8 із обмеженої кількості біомаси; встановлені величини молекулярних мас ферментів; вивчені фізико-хімічні та молекулярно-біологічні властивості ферментів, кінетичні параметри взаємодії ДНК-полімераз з субстратом, дія різноманітних за властивостями речовин на процес функціонування ДНК-залежних ДНК-полімераз *in vitro*.

Встановлено деяку подібність ДНК-полімераз молекулів із ДНК-полімеразами інших прокаріотичних організмів, що, поперше, свідчить про їх філогенетичну спорідненість і, подруге, вказує на можливість використання загальних принципів контролю над реплікацією. В той же час вивчення ДНК-полімераз молекулів дозволило встановити деяку різницю між цими ферментами та ДНК-полімеразами інших прокаріотичних організмів, що дає змогу розробити оригінальні засоби селективної боротьби з молекулами на рівні реплікації.

Практична цінність роботи. Створена система швидкого відбору *in vitro* речовин, які ефективно блокували процес реплікації ДНК молекулів. Це може бути використане для пошуку високоефективних препаратів для боротьби з молекулами та хворобами, що вони викликають.

Розроблений метод одержання ДНК-залежних ДНК-полімераз може бути використано при одержанні подібних ферментів інших мікроорганізмів.

Апробація роботи. Матеріали дисертації були викладені на конкурсі робіт секції молекулярної біології Інституту мікроби-

ології та вірусології ім.Д.К.Заболотного (Київ,1991) "Міжнародній школі в швидкої діагностики мікоплазм" (Ієрусалим,1992), спільному засіданні відділів мікоплазмодогії, генетики мікроорганізмів, молекулярної біології вірусів, репродукції вірусів та вірусів водоростей (Київ,1992).

Публікації. Основні положення дисертації викладені в 6 друкованих роботах.

Структура та об'єм дисертації. Дисертаційна робота викладена на 119 сторінках друкованого тексту і складається з вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів та їх обговорення, висновків та списку використаної літератури. Дисертація має 4 таблиці та 29 малюнків.

ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. Огляд літератури містить відомості про стан проблеми, новітні досягнення в галузі вивчення ДНК-залежних ДНК-полімераз, методи їх виділення та способи функціонування ферментів в клітині.

Об'єкт та методи дослідження. Об'єктом дослідження був штам *Acholeplasma laidlawii* PG-8, родина *Acholeplasmataceae*, отриманий із колекції Міжнародного центру культур мікоплазм /Орхус, Данія/. Для одержання ДНК-залежних ДНК-полімераз культуру ахолеплазм вирощували протягом 72 годин при температурі 31⁰С на середовищі CM IMB-72.

Лізіс біомаси проводили при 0-4⁰С та постійному перемішуванні додаванням НП-40 та девоксиколату натрію до кінцевої концентрації 5% та 0.08% відповідно.

Всі етапи виділення та очистки ДНК-полімераз проводили при температурі 0-4⁰С. Буфер ТЕДГ, що викрстовувався нами для виділення ферментів складався з 50 мМ Трис-НСl рН 7.9, 0.1 мМ ЕДТА, 25% гліцерину, а також фенілметилсульфонілфториду (ФМСФ) та дитіотреїтолу (ДТТ) в концентраціях 1 мМ та 3 мМ, відповідно.

Активність ДНК-полімераз на різних стадіях виділення, очистки, та вивчення властивостей проводили в 0.1 мл реакційної суміші, що складалася з: 50 мМ трис-НСl рН 7.9, 10 мМ ФМСФ, 2 мМ ДТТ, 10 мкг бичачого сироваточного альбуміну, 5 мкг активованої ДНК селезінки великої рогатої худоби, 10 мМ MgCl₂, 10%

гліцерину, 100 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів (дНТФ), крім міченого, концентрація котрого складала 10мкМ /1 мкКи/ та 15 мкл відповідної фракції.

Суміш інкубували 30 хвилин при 37°C. Реакцію зупиняли внесенням 5% ТХУ. Далі проби фільтрували через фільтри "whatman" GF/C. Інтенсивність включення [H³] дТТФ заміряли в сцинтиляційному лічильнику "Beckman", США, використовуючи сцинтиляційну рідину ЖС-8.

За одиницю активності ферменту приймали кількість ферменту, що каталізує в стандартних умовах включення 1 нмоль [H³] дТТФ.

Чистоту виділених ферментів та їх молекулярну масу визначали за допомогою електрофорезу білків в поліакриламідному гелі з 0.1% додецилсульфату натрію, використовуючи трис-гліцинову буферну систему Леммлі.

Молекулярну масу ДНК-полімераз в нативному стані визначали за допомогою гель-фільтрації на Тойо-перлі HW-60.

Концентрацію білку на різних етапах очищення визначали за допомогою методу Бредфорда.

Для розділення, очищення, та одержання чистого ферменту використовували методи рідинної хроматографії на різноманітних сорбентах: ДЕАЕ-целюлозі, Гепарин-сефарозі, Полі У-сефарозі, Полі А-сефарозі.

Результати та їх обговорення. Вирощені на середовищі SM 1MB-72 клітини абирали в логарифмічній фазі росту за допомогою центрифугування при 17000 g, відмивали від залишків культурального середовища десятикратною кількістю буфера ТЕДГ. Лізис проводили на протязі 20 хвилин. Лізат центрифугували при 17000 g для осадження нелізованих клітин та залишків мембран.

Першим етапом очищення ДНК-полімераз було фракціонування лізату на колонці з ДЕАЕ-целюлозою DE-52. В результаті було досягнуто розділення ДНК-полімеразної активності на два піки: перший - у проскоці, другий - у фракціях з іонною силою, що відповідає 0.3 M NaCl.

Розподіл двох форм ДНК-залежних ДНК-полімераз на ДЕАЕ-целюлозі вказує на різницю в поверхневих зарядах цих двох ферментів. Перша форма, судячи з усього більш електронейтральна, в той час, як друга несе на собі більше електронегативних груп.

Фракцію з ДЕАЕ-целюлози, що містила ДНК-залежну ДНК-полімеразу I, наносили на колонку з Гепарин-сефарозою. Елюцію проводили градієнтом NaCl 0.05-0.5 M.

Виділена білкова фракція містила, крім ферменту, також баластні білки.

Фракції, що мали ДНК - полімеразну активність, об'єднували та наносили на колонку з Полі У-сефарозою. ДНК-полімераза зв'язувалася з колонкою. Елюцію проводили градієнтом NaCl. Фермент елюювався з колонки піком при іонній силі, що дорівнювала 0.3 M NaCl. Препарат було очищено у 103.3 рази і мав питому активність 50450 од/мг білку (Табл.1).

При електрофорезі в ПААГ з ДДС-Na фракція виявилась гомогенною і мала молекулярну масу 72 кД (Мал.1,а)

Другу фракцію ДНК-залежної ДНК-полімерази наносили на колонку із Гепарин-сефарозою. Фермент, що зв'язався з колонкою, елювали градієнтом NaCl від 0.05 до 0.5 M. ДНК-полімераза виходила з колонки при концентрації солі 0.25-0.3 M.

Для останнього етапу очистки другої форми ДНК-полімерази було обрано афінний сорбент Полі А-сефарозу. Цей вибір було зроблено в результаті селективної роботи, що була направлена на максимальне розділення на сорбенті ДНК-полімерази та супутніх ДНК-залежних білків. Таким чином, незважаючи на більшу специфічність ДНК-полімерази до Полі (У) матриці ми, зупинили свій вибір на Полі А-сефарозі.

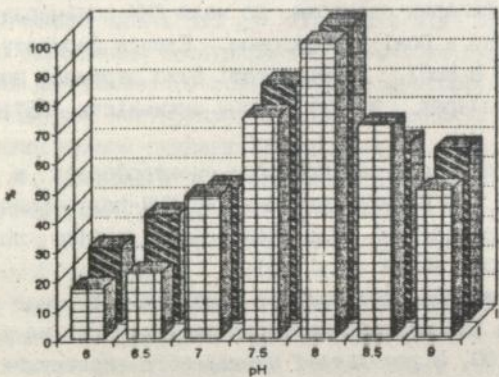
Фракції з Гепарин-сефарози, що мали ДНК-полімеразу II наносили на колонку з Полі-А сефарозою. Елюція ферменту починалась при 0.25 M NaCl. В результаті було отримано очищений у 1328.7 разів препарат, що мав питому активність 96710 од/мг білку (Табл.2).

Зразки аналізували за допомогою електрофорезу в ПААГ з ДДС-Na. Фракція, що виявила максимальну ДНК-полімеразну активність на електрофореграмі була представлена однією полоскою з молекулярною масою 45 кД (Мал.1,б).

Для встановлення молекулярної маси ДНК-полімераз в нативних умовах було використано метод гель-фільтрації на колонці з Тойо-перлом HW-60. В результаті проведеного експерименту, було отримано значення молекулярних мас ДНК-залежних ДНК-полімераз I та II, що становили 137 та 351 кД, відповідно. Рівниця у значенні молекулярних мас, отриманих за допомогою гель-філь-



Мал.1 Электрофореграма двох форм ДНК-полімераза *A. laidlawii* PG-8. а - ДНК-полімераза I; б - маркерні білки : фосфорилаза В 94 кД; альбумін 67 кД; овальбумін 43 кД; карбоангідраза 30 кД; інгібітор трипсину 20 кД; α -лактальбумін 14 кД; в - ДНК-полімераза II.



Мал.2 Залежність активності ДНК-полімераза від рН реакційної суміші. 1 - ДНК-полімераза I; 2 - ДНК-полімераза II.

трації та електрофорезу в денатуруючих умовах вказує на мульт-

Таблиця 1. ПОКАЗНИКИ ОЧИЩЕННЯ ДНК-ПОЛІМЕРАЗИ I
ACHOLEPLASMA LAIDLAWII PG-8

Етапи очищення	Об'єм (мл)	Білок (мг/мл)	Активність (од.)	Пт. акт. (од/мг)	Ступ. очист.	Вихід (%)
1 Лізат	20	175				
2 ДЕАЕ-цел.	20	62	30280.0	488.0	1.0	100.0
3 Гепарин	3	0.16	17999.9	37499.7	76.8	59.4
4 Полі У	2	0.08	8072.7	50450.1	103.3	26.6

Таблиця 2. ПОКАЗНИКИ ОЧИЩЕННЯ ДНК-ПОЛІМЕРАЗИ II
ACHOLEPLASMA LAIDLAWII PG-8

Етапи очищення	Об'єм (мл)	Білок (мг/мл)	Активність (од.)	Пт. акт. (од/мг)	Ступ. очист.	Вихід (%)
1 Лізат	20	175.00				
2 ДЕАЕ-цел.	4	65.00	18730.0	72.0	1.0	100.0
3 Гепарин	3	0.08	16876.5	70318.7	976.2	90.1
4 Полі А	3	0.05	14356.5	95710.0	1328.7	76.6

тисубодиничну структуру ферментів; те, що фракції, проявляючи ДНК-полімеразну активність на електрофореграмі були представлені однією подосою, свідчить що полімеразна активність належала субодиниці саме в такою молекулярною масою; кратність значень молекулярних мас ферментів в нативному та денатурованому стані дає можливість запропонувати модель функціонування *in vivo* ДНК-полімерази I - у вигляді димеру, а ДНК-полімерази II - у вигляді тетрамірної структури.

Таким чином, результатом роботи стала розробка оригінальної схеми одержання ДНК-полімераз в гомогенному стані, високий ступінь чистоти дозволив проводити подальше дослідження їх властивостей.

Встановлено, що оптимум температури дії обох форм ДНК-полімераз становив 37°C.

Вивчення впливу рН на ДНК-полімерази *A.laidlawii* PG-8 проводили в інтервалі рН від 6 до 9. Як було встановлено, оптимуми рН для обох форм ферментів співпадали і знаходилися в межах 7.8-8.0 (Мал.2).

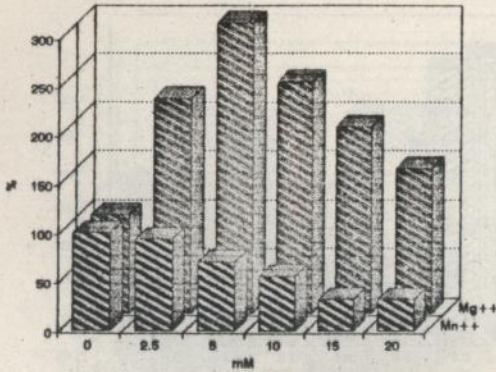
Вплив двувалентних катіонів Mg^{2+} та Mn^{2+} на активність ДНК-полімераза вивчали в інтервалі концентрації 0-20 мМ. Присутність в реагуючій суміші 2.5 мМ Mg^{2+} приводить до десятиразового підвищення активності II форми, (Мал.3) в той час, коли I мала максимум активності при 5 мМ і виявляла лише трикратне підвищення активності. Іони Mn^{2+} також активували II форму в три рази, на I форму ці іони справляли інгибуючу дію (Мал.4).

Вивчення дії ЕДТА на активність ДНК-полімераза виявило оберненопропорційну залежність між присутністю ЕДТА в реакційній суміші та активністю ДНК-полімераза (Мал.5), але графіки впливу ЕДТА на ДНК-полімерази мали різні профілі: активність I форми різко зменшувалась при переході концентрації и від 0.3 до 0.6 мМ. Активність II форми при підвищенні концентрації ЕДТА повільно зменшувалась.

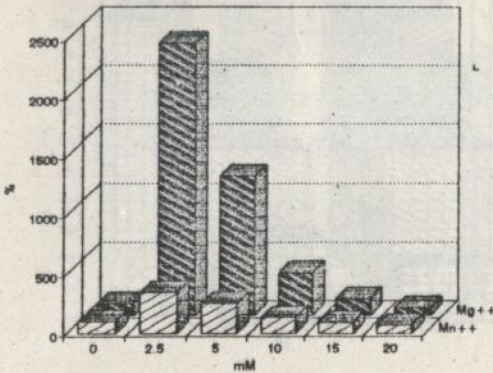
Для вивчення кінетичних характеристик ферментів визначали константи Міхаеліса. Графіки, побудовані в системі зворотніх координат Лайнувера-Берка дозволили графічно визначити K_m для обох форм ДНК-полімераза, що дорівнювали 180 та 250 мкм ДНТФ для I та II форми, відповідно.

Як відомо ДНК-полімерази - ферменти, що потребують для своєї дії два види субстратів: ДНК та ДНТФ. ДНТФ є універсальним субстратом для усіх полімераза, тому ми вивчали взаємодію ДНК-полімераза із нуклеїновими кислотами природного та штучного походження. Показано, що серед штучних матриць максимальну спорідненість ДНК-полімерази виявляли до Полі (У) та Полі (А), причому спорідненість навіть вищу ніж до ДНК селівинки великої рогатої худоби (Мал.6). Природні матриці розташувалися по порядку зменшення споріднености до них ДНК-полімераза: ДНК *A.laidlawii* PG-8, ДНК фагу λ , ДНК селівинки великої рогатої худоби, для I форми, та ДНК *A.laidlawii* PG-8, ДНК селівинки крупної рогатої худоби, ДНК фагу λ - для II (Мал.7).

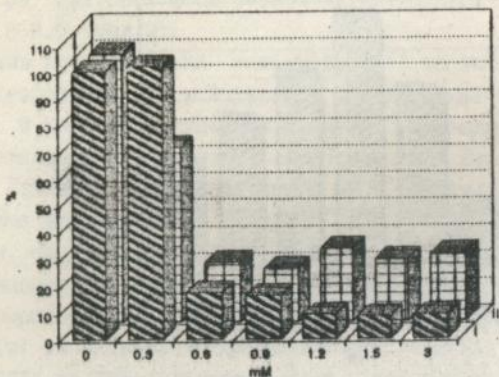
Налідиксова кислота - інгібітор прокаріотичних ДНК-полімераза, не діяла на I форму при концентрації 25 та 50 мкг/мл. II форма піддавалася пригніченню на 30% вже 25 мкг/мл (Мал.8).



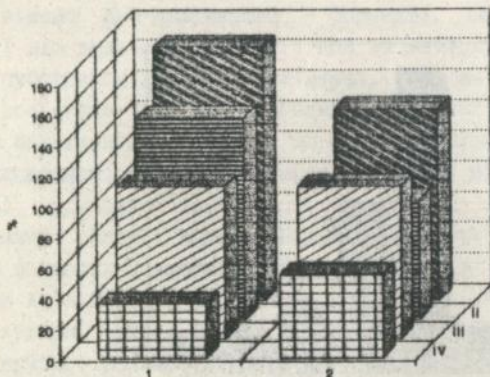
Мал.3 Вплив іонів двувалентних металів на активність ДНК-полімерази I.



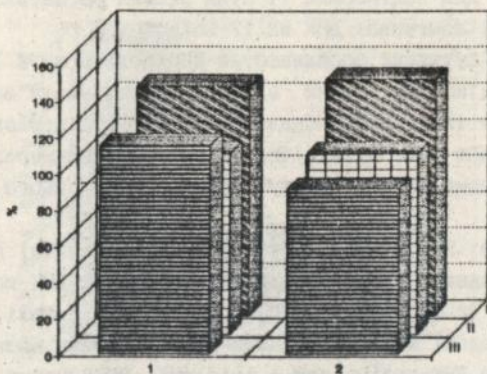
Мал.4 Вплив іонів двувалентних металів на активність ДНК-полімерази II.



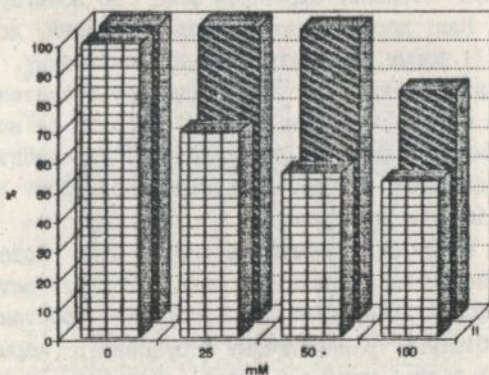
Мал.5 Графік впливу ЕДТА на ДНК-полімерази *A.laidlawii* PG-8. I - ДНК-полімераза I; II - ДНК-полімераза II.



Мал.6 Специфічність ДНК-полімераз *A.laidlawii* PG-8 по відношенню до матриць синтетичного походження. I - Полі (У); II - Полі (А); III - ДНК селєвінки великої рогатої худоби (прийнята за 100%); IV - Полі (С); 1 - ДНК-полімераза I; 2 - ДНК-полімераза II.



Мал.7 Специфічність ДНК-полімераза *A. laidlawii* PG-8 по відношенню до матриць природного походження. I - ДНК *A. laidlawii*; II - ДНК селівинки великої рогатої худоби (прийнята за 100%); III - ДНК фагу λ ; 1 - ДНК-полімераза I; 2 - ДНК-полімераза II.



Мал.8 Вплив налідиксової кислоти на активність ДНК-полімераз *A. laidlawii* PG-8. I - ДНК-полімераза I; II - ДНК-полімераза II.

При вивченні репараційної функції ДНК-полімераз було виявлено, що I форма не мала 3'-5'-екзонуклеазної активності, в той час, як ДНК-полімераза II була здатна зменшувати рівень радіоактивності поміченої ДНК на 17-25%.

Однією із суттєвих особливостей ДНК-полімераз є їх відношення до афідіколіну, який здатний пригнічувати активність ДНК-полімераз α -типу. Було показано, що ДНК-полімераза I згідно з цією ознакою може бути віднесена до ДНК-полімераз α -типу, тоді, як II форма виявляє меншу залежність від цього реагенту (Мал. 9).

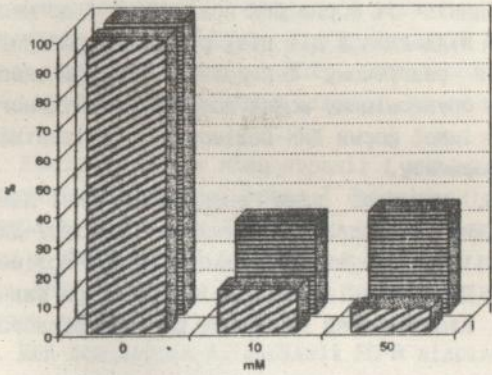
Відомо, що SH-блокуючі речовини і в тому числі n-етилmaleїмід (NEM), здатні пригнічувати прокаріотичні ДНК-полімерази II та III типу та не діють на ДНК-полімеразу I *E. coli*. Результати, що приведені на мал. 10 дають змогу зробити висновок, що за цією ознакою ДНК-полімерази *A. laidlawii* PG-8 мають схожість із ДНК-полімеразою I *E. coli*.

Вивчення дії етанолу, як розчинника багатьох біологічно-активних речовин на ДНК-полімерази, виявило стабільність I форми до цієї речовини. II форма підвищувала свою активність під дією 15% етилового спирту.

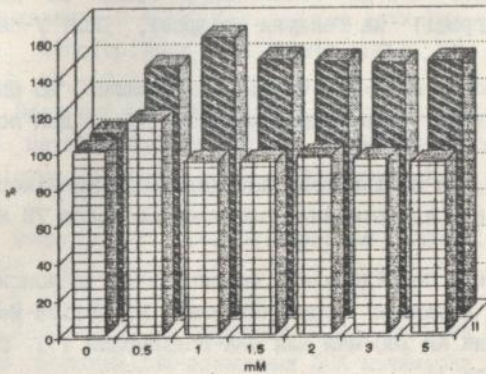
Дія спермідину на ДНК в більшості випадків приводить до активації роботи реплікаційного комплексу, бо спермідин здатний стабілізувати вторинну структуру ДНК, що полегшує роботу ДНК-полімерази. Наші дослідження виявили невеликий, до 8%, для I, та 30% для II форми, активуючий ефект спермідину.

Використання високоспецифічних інгібіторів синтезу нуклеїнових кислот з груп хромоміцинів (натрієва сіль олівоміцину), антрациклінів (карміноміцин та доксорубіцин) та стрептонігріну (брунесміцин) дозволяє детально вивчити властивості ДНК-полімераз, їх функціонування в клітині.

Досліджено вплив цих речовин на синтез ДНК. Встановлено, що олівоміцин, як "Г-Ц" залежна речовина пригнічує активність, як I, так і II форми ДНК-полімераз пропорційно зростанню концентрації антибіотика в реагуючому середовищі; карміноміцин при концентрації біля 1 мкг/мл в пробі повністю пригнічував синтез ДНК обома формами ДНК-полімераз. До доксорубіцину, ДНК-полімерази проявили індивідуальне відношення: активність I форми повністю пригнічувалась при концентрації антибіотика в реагуючому середовищі 1 мкг/мл, а II форма ДНК-полімерази,



Мал.9 Дія актидіколіну на ДНК-полімерази *A.laidlawii* PG-8. I - ДНК-полімераза I; II - ДНК-полімераза II.



Мал.10 Залежність ДНК-полімеразної активності від присутності NEM в реакційній суміші. I - ДНК-полімераза I; II - ДНК-полімераза II.

якій властива 3'-5'-екзонуклеазна функція практично виявлялася нечутливою до дії цієї речовини. Корисним для диференціювання форм ДНК-полімераз і визначення їх функцій виявився стрептоміцин (брунеоміцин): II форма ДНК-полімерази (що несе репараційну функцію) піддавалася дії цієї речовини пропорційно його концентрації в реагуючому середовищі. Поперемінною дією доксорубіцину та брунеоміцину можна досягти селективного пригнічення тієї або іншої форми ДНК-полімераз, чи ідентифікувати виділену форму ферменту.

Таким чином, одержані нами експериментальні дані свідчать, що по основним принципам функціонування в клітині ДНК-полімерази *A. laidlawii* PG-8 не відрізняються від ДНК-полімераз інших організмів. Деякі відмінні спостерігаються при вивченні їх фізико-хімічних властивостей та впливу речовин різного походження.

ВИСНОВКИ

1. У *Acholeplasma laidlawii* PG-8 вперше було показано наявність двох форм ДНК-залежних ДНК-полімераз: ДНК-полімерази I, що не зв'язувалася в ДЕАЕ-целюлозою та ДНК-полімерази II, яка адсорбувалася цією колонкою.

2. Розроблені методи очищення ДНК-залежних ДНК-полімераз I та II *A. laidlawii* PG-8 до гомогенного стану за допомогою афінної хроматографії на Гепарин-сефарозі, Полі У-сефарозі, Полі А-сефарозі.

3. За допомогою гель-фільтрації встановлено, що ДНК-полімераза I мала нативну молекулярну масу 137 кД, а ДНК-полімераза II - 351 кД.

4. Показано, що полімеразна активність ДНК-полімераз I та II асоційована з поліпептидами молекулярною масою 72 кД та 45 кД, відповідно.

5. Встановлена спорідненість ферментів до дезоксирибонуклеотидтрифосфатів, виражена через константу Міхаеліса-Ментен що становила значення K_m 180 мкМ для ДНК-полімерази I і 250 мкМ для ДНК-полімерази II.

6. ДНК-полімерази *A. laidlawii* PG-8 активувалися іонами Mg^{2+} (20- і 3-разово, відповідно для I та II форми); ДНК-полімераза II активувалася іонами Mn^{2+} в концентрації 2.5

мМ (3-разово); в той же час, ДНК-полімераза I при цих умовах втрачала свою активність; обидва ферменти мали оптимуми рН при 7.9 і температури при 37°C.

7. ДНК-полімераза I виявила резистентність до налідиксової кислоти у концентрації 50 мМ, при якій ДНК-полімераза II знижувала свою активність на 50%; обидві полімерази стійкі до високих, до 20%, концентрацій етанолу, пригнічувалися афідіоліном.

8. Доксорубіцин в концентрації 1 мкг/мл повністю пригнічував активність ДНК-полімерази I (реплікази); ДНК-полімераза II (репараза) виявилася нечутливою до цього антибіотика. Брунеоміцин в концентрації 1000 мкг/мл повністю пригнічував активність ДНК-полімерази II, тоді, як ДНК-полімераза I була резистентною до дії цієї речовини.

9. ДНК-полімерази *A. laidlawii* PG-8 відрізнялися за своїми фізико-хімічними властивостями від подібних ферментів як молікутів, так і інших мікроорганізмів, що вказує на високу ступінь дивергенції ахлеплазм з другими прокаріотичними організмами.

СПИСОК РОБІТ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Безуглый С.В., Вабичев В.В., Скрипаль И.Г., Малиновская Л.П. Выделение и частичная очистка двух ДНК-зависимых ДНК-полимераз *Acholeplasma laidlawii* PG-8 // Микробиол. журн. - 1991. - 53, №5. - С.26-30.

2. Безуглый С.В., Токовенко И.П., Скрипаль И.Г. Некоторые аспекты метаболизма пуриновых и пиримидиновых оснований у *Acholeplasma laidlawii* PG-8 // Микробиол. журн. - 1991. - 53, №6. - С.41-46.

3. Bezugly S.V. DNA-polymerases from *A. laidlawii* PG-8 // Proc.FEMS Workshop on: Rapid Diagnosis of Mycoplasmas. Jerusalem, Israel, 1991, august 11-23.

4. Безуглый С.В., Скрипаль И.Г., Вабичев В.В. Хроматографические свойства ДНК-зависимых ДНК-полимераз из *Acholeplasma laidlawii* PG-8 // Микробиол. журн. - 1992. - 54, №1. - С.51-57.

5. Безуглый С.В., Скрипаль И.Г., Вабичев В.В. Малиновская Л.П. Влияние некоторых физико-химических факторов на актив-

ность ДНК-зависимых ДНК-полимераз *Acholeplasma laidlawii* PG-8. // Микробиол. журн. - 1992. - 54, N4. - С. 21-27.

6. Безуглый С.В., Скрипаль И.Г., Бабичев В.В. Изучение кинетических и функциональных характеристик ДНК-зависимых ДНК-полимераз *Acholeplasma laidlawii* PG-8. // Микробиол. журн. - 1993. - 55, N2. - С. 22 - 27.

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

Підп. до друку. 12.03.93 Формат 60×84/16 Папір офс 1/2

Друк. офс. Умови друк. арк. 0,93 Обл.-вид. арк. 0,66 тир. 100

Зам. 3-3377.

Київська книжкова друкарня наукової книги. Київ, Репіна, 4.



Ab 27.025
AB 27.025