

На правах рукопису

СИРЧІН СЕРГІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ

СТРУКТУРНИЙ АНАЛІЗ ДНК ЦІАНОФАГА LPP-3 ТА
ЦІАНОБАКТЕРІЇ *PLECTONEMA BORYANUM*

03.00.06 - вірусологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1996 р.

Дв. 35. 893

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі вірусів водоростей Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
МЕНДЖУЛ МИХАЙЛО ІВАНОВИЧ

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
академік АН України
КІШКО ЯРОСЛАВ ГРИГОРОВИЧ

доктор біологічних наук
МАЛЮГА СТАНІСЛАВ СТАНІСЛАВОВИЧ

Провідна установа: Національний університет ім. Тараса Шевченка

Захист дисертації відбудеться "20" листопада 1996 р. о " 10 " год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д. 01. 81. 01 по захисту докторських дисертацій Інституту мікробіології і вірусології НАН України за адресою: м. Київ, вул. Заболотного, 154.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці інституту.

Автореферат розіслано "20" жовтня 1996 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради
кандидат біол. наук

Л. М. Пуріш

ЛНБ України ім. В. Стефаника



00739851 (X)

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми обумовлена як науково-теоретичним, так і практичним значенням вивчення системи ціанофаг-ціанобактерія (Proctor et al., 1990, Waterbury et al., 1994).

В той же час сукупність і послідовність молекулярних процесів, які супроводжують інфекцію ціанофагів в клітинах ціанобактерій, залишаються ще мало відомими. Тому початковий період інфекції є найбільш цікавим та зручним для вивчення функціонування системи ціанофаг-ціанобактерія, оскільки йому притамані швидкі кількісні і якісні зміни фізіолого-біохімічних та молекулярно-біологічних процесів.

При цьому найбільш важливий інтерес полягає в дослідженні механізмів збереження структурно-функціональної цілостності вірусного геному на протязі тривалого часу ранніх етапів інфекції. Відомо, що всі досліджені ціанобактерії мають системи рестрикції-модифікації II типу, але відомості щодо цих систем у *Plectonema boryanum* досить обмежені.

Рестрикційні бар'єри ціанобактерій, у багатьох випадках, перешкоджають ефективному процесу клонування генів як при дослідженні механізмів регуляції ціанофагової інфекції шляхом трансформації ціанобактерій, так і при конструюванні рекомбінантних штамів-продуцентів (Mozer et al., 1993). З іншого боку, практична відсутність молекулярно-біологічних досліджень ДНК ціанофагів не дає можливості підійти до вивчення механізмів подолання рестрикційних бар'єрів господаря.

Приймаючи до уваги теоретичну і практичну значимість вищезгаданих проблем, доцільним було дослідити деякі аспекти взаємодії вірулентного ціанофага LPP-3 з клітинами нитчастої ціанобактерії *Plectonema boryanum*. При вивченні даної проблеми ми виходили з таких положень: по-перше, ціанобактерії *P. boryanum* притаманна висока компетентність; по-друге, ціанофаг LPP-3 має невеликі розміри геному, відносно просту структурну організацію віріонів і порівняно короткий, відносно інших ціанофагів, літичний цикл розвитку; по-третє, репродукція даного ціанофага не лімітується віком культури

ціанобактерії, що відкриває широкі можливості використання цієї системи ціанофаг-ціанобактерія для дослідження механізмів регуляції процесів ціанофогової інфекції і для розробки принципово нових екологічно безпечних фотобіотехнологій.

Мета та завдання роботи. Робота присвячена вивченню систем рестрикції-модифікації ціанобактерії *P. boryanum* і способів захисту від них ДНК ціанофага LPP-3 шляхом дослідження структурно-функціональних особливостей будови їх ДНК. Для досягнення цієї мети були поставлені такі задачі:

- провести рестрикційний аналіз ДНК ціанофага LPP-3 та ціанобактерії *P. boryanum*;
- ідентифікувати та визначити вміст модифікованих основ в досліджуваних ДНК;
- виявити і визначити специфічність систем рестрикції-модифікації клітин *P. boryanum*;
- визначити шляхи захисту ціанофага LPP-3 від систем рестрикції-модифікації господаря;
- побудувати фізичну карту ДНК ціанофага LPP-3;
- ідентифікувати область раних генів ДНК ціанофага LPP-3, здійснити тонке картування і клонування її фрагментів.

Наукова новизна та практична цінність роботи. У процесі виконання роботи одержані нові результати, які дозволяють розширити уявлення про ранні етапи ціанофогової інфекції і створюють передумови для використання елементів геному ціанофагів для розробки новітніх фотобіотехнологій. Вперше побудована фізична карта ДНК ціанофага, виявлена специфічність модифікації і доведено існування контрелекція геному ціанофага LPP-3. Встановлені механізми захисту ДНК LPP-3 від рестрикції в клітинах *P. boryanum*. В результаті проведених досліджень розроблена методика мічення лінійних РНК *in vitro* за допомогою термінальної трансферази, яка вперше використана для одержання вірусспецифічних мРНК-зондів. Використання цього методу дозволило ідентифікувати область раних генів на ДНК ціанофага LPP-3.

Основні положення, що виносяться на захист.

1. Геном ціанофага LPP-3 являє собою дволанцюгову молекулу ДНК розміром $42,5 \pm 1,5$ т.п.о., яка не містить ніків та має відкриті некомплементарні кінці.

2. ДНК ціанобактерії *P. boguianii* крім канонічних містить дві модифіковані основи: N-6-метиладенін - 4,5% і 5-метилцитозин - 1,2%.

3. ДНК ціанофага LPP-3 крім канонічних основ містить тільки 5-метилцитозин в кількості 0,8 % в CnC(A/T)GG послідовностях.

4. Клітини ціанобактерії *P. boguianii* мають системи рестрикції-модифікації dam- і dcm- подібного типу.

5. Захист геному ціанофага LPP-3 від рестрикції в клітинах *P. boguianii* здійснюється двома шляхами: метилуванням цитозину в другому положенні CC(A/T)GG послідовностей та контрелекцією за GG(C/G)CC послідовностями.

Апробація роботи. Результати дисертаційної роботи доповідались на VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992), на I установчому (VIII) з'їзді Українського мікробіологічного товариства (Одеса, 1993), на міжнародній конференції з проблем фітовірусології (Ялта, 1994), на засіданнях Вченої ради та щорічних конкурсах експериментальних робіт Інституту мікробіології і вірусології НАН України.

Особистий внесок автора. Робота виконана автором особисто.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 9 робіт.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, результатів та їх обговорення, висновків та списку літератури (158 джерел, з них 123 на іноземних мовах). Роботу викладено на 137 сторінках машинописного тексту, ілюстровано 20 рисунками та 5 таблицями.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктом досліджень була чиста лінія ціанофагу LPP-3, а також аксенична культура ціанобактерії *Plectonema boryanum* Gom, штам CALU 465. Ціанобактерію *P. boryanum* вирощували на середовищі Фітцджеральда в 3 л колбах Ерленмейєра при $t = 26-28^{\circ} \text{C}$, освітленні 3000 лк та безперервній аерації повітрям з 5% CO_2 . Для одержання ДНК ціанобактерії *P. boryanum* використовували модифіковані методи (Adams, 1988 та Golden, 1987). Довжини рестрикційних фрагментів ДНК вираховували за допомогою комп'ютерної програми, складеної на базі лінійного алгоритму (Southern, 1975). Теоретично очікувана кількість сайтів в ДНК LPP-3 визначалася за Upholt et al. (1977). Для гідролізу ДНК фтористоводневою кислотою використовували модифікований метод Catania et al. (1987). Гідроліз ДНК проводили 35 % HF на протязі 2 годин при 80°C . Розподіл продуктів хімічного гідролізу ДНК і стандартних основ проводили на хроматографічній установці HPLC "System GOLD" Beckman (США), колонка C18 RPC у зворотній фазі: водна - 25мм KH_2PO_4 , органічна - ізопропанол з лінійним градієнтом 95-5%. Виділення РНК з інфікованих клітин ціанобактерій проводили за методом Smith & Carr, 1977. Радіоактивне мічення ДНК по 3'-кінцям здійснювали за допомогою фрагмента Кленова ДНК-полімерази I *E. coli*, ДНК полімерази T4 та термінальної дезоксинуклеотидтрансферази, міченими [α ^{32}P] дНТФ з питомою активністю 3000 Ки/ммоль. 5'-кінцеве мічення ДНК проводили за допомогою полінуклеотидкінази T4 в реакції обміну з [γ ^{32}P] АТФ (питома акт. 4000 Ки/ммоль) в присутності АДФ (Sambrook et al., 1989, Ausubel et al., 1990). РНК-зонди для гібридизації отримували міченням тотальних препаратів ціанобактеріальної РНК полінуклеотидкіназою T4 та термінальною трансферазою в буфері: 200 мМ какодилату калію, 1 мМ CoCl_2 , 1 мМ ДТТ, рН 7,2.

Метилазну активність екстрактів та частково очищених ферментних препаратів *P. boryanum* визначали за методом (Smith, 1992) використовуючи S-аденозил-L-[метил ^3H метионін (пит. акт. 15 Ки/ммоль). Для ДНК-ДНК та ДНК-РНК гібридизації вико-

ристовували метод блот-гібридизації за Саузерном. Предгібридизацію і гібридизацію з пробкою проводили у розчині без формаміду при 68°C на протязі 16-20 год. Фільтри експонували на рентгенівський плівці РМ-1 чи β -max "Amersham" при -70°C. Статистичну обробку даних проводили методом дисперсійного аналізу в пакеті Statgrafics (STSC, Канада)

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Рестрикційний аналіз ДНК ціанофага LPP-3 і ціанобактерії *P. boryanum*

В ході рестрикційного аналізу використано більш ніж 60 ендонуклеаз рестрикції, які впізнають тетра-, пента- і гексапаліндромні нуклеотидні послідовності, а також рестриктази, що гідролізують ДНК за непаліндромними і декількома сайтами. Встановлено, що велика кількість рестриктаз, які впізнають гексапаліндромні нуклеотидні послідовності, не гідролізують ДНК ціанофага LPP-3, а деякі рестриктази мають кількість сайтів, що значно відхиляється від теоретично очікуваної (табл. 1).

Особливо привертає увагу значне відхилення теоретично очікуваної кількості сайтів рестрикції від їх експериментально одержаної кількості для деяких рестриктаз. Так, рестриктаза *BsuRI*, що впізнає на ДНК тетра-нуклеотидну паліндромну послідовність GGCC, гідролізує ДНК LPP-3 лише за одним сайтом, в той час як при повній рандомізації та враховуючи GC-склад вірусної ДНК можна було б очікувати наявність приблизно 200 сайтів. Рестриктази *Cfr13I* і *Eco47I* з сайтами впізнавання GGNCC та GG(A/T)CC мають по 7 сайтів замість 192 і 94 теоретично очікуваних, відповідно.

Для пошуку модифікованих основ в складі ДНК ціанофага LPP-3 і ціанобактерії *P. boryanum* використовували найбільш чутливий метод - HPLC продуктів хімічного гідролізу ДНК. ДНК LPP-3 і *P. boryanum* гідролізували хлорною та фтористоводневою кислотами. HF використовували для запобігання дезамінування метильованого цитозину.

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

ГІДРОЛІЗ ДНК ЦІАНОФАГА LPP-3 РЕСТРИКТАЗАМИ:

1) з гексапаліндромними сайтами впізнавання

	Назва рестрик-тази	Сайт впізна-вання	Кіль-кість сайтів	Назва рестрик-тази	Сайт впізна-вання	Кіль-кість сайтів
6 GC	Eco52I	CGGCCG	0	Sma I	CCCGGG	0
	Ehe I	GGCGCC	3	Bsp120I	GGGCCC	0
4 GC	Alw44I	GTGCAC	3	Mlu I	ACGCGT	15
	BamHI	GGATCC	0	Nco I	CCATGG	2
	Bsp68I	TCGCGA	3	Pae I	GCATGC	4
	Eco47III	AGCGCT	14	Pst I	CTGCAG	0
	Eco72I	CACGTG	15	Pvu	CGATCG	1
	Eco147I	AGGCCT	1	PvuII	CAGCTG	0
	Ecl136I	GAGCTC	0	Sal I	GTCGAC	0
	Kpn I	GGTACC	11	Xho I	CTCGAG	0
	Kpn2I	TCCGGA	2			
		Bcl I	TGATCA	8	Eco255I	TAGCTA
2 GC	Bgl II	AGATCT	10	HindIII	AAGCTT	20
	Bsp119I	TTCGAA	1	Mph1103I	ATGCAT	0
	Bsu15I	ATCGAT	10	Nde I	CATATG	0
	EcoRI	GAATTC	0	Xba I	TCTAGA	12
	Eco32I	GATATC	16	Eco105I	AGTACT	20
0 GC	Dra I	TTTAAA	0	Ssp I	AATATT	0

2) з тетра-, пентапаліндромними та іншими сайтами

Alu I	AGCT	>30	Cfr13I	GGNCC	7
BsuRI	GGCC	1	Eco47I	GG(A/T)CC	7
Bsp50I	CGCG	>30	Bcn I	CC(C/G)GG	>30
Csp6I	GATC	>60	Mva I	CC(A/T)GG	>60
Hin6I	GCGC	>30	Bbv I	GCAGC(N)8/12	>60
Msp I	CCGG	>20	Alw26I	GTCTC(N)1/5	>20
Sau3A	GATC	>20			
Taq I	TCGA	>50	Not I	GCGGCCGC	0
Cfr I	PuGGCCPu	0	Eco88I	CPuCGPyG	10
Cfr10I	PuCCGGPy	>20	Eco91I	GGTNACC	0
Eco24I	GPuGCPyC	14	Eco130I	CCPuPuGG	>20
Eco31I	GGTCTC(N)1/5	0	Hinc II	GTPyPuAC	>30
Sdu I	GDGCHC	>20	Xho II	PuGATCPy	>20

Pu = A,G Py = T,C D = A,G або T H = T,C або A

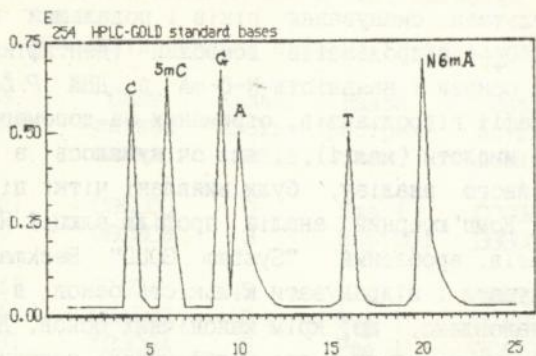
Результати сканування піків і подальший комп'ютерний аналіз HClO_4 - гідролізатів дозволив ідентифікувати тільки канонічні основи і наявність N-6-мА в ДНК *P. boyoulim*. При хроматографії гідролізатів, отриманих за допомогою фтористоводневої кислоти (мал.1), як очікувалось з результатів рестрикційного аналізу, були виявлені чіткі піки 5-метилцитозину. Комп'ютерний аналіз профілю елюції HF - і HClO_4 - гідролізатів, зроблений "System GOLD" Beckman, дозволив ідентифікувати і підрахувати кількість основ в досліджених ДНК. Встановлено, що, крім канонічних основ, ДНК ціанобактерії *P. boyoulim* містить дві модифіковані основи: 5-метилцитозин в концентрації 1,23 % та 4,5 % N-6-метиладеніну. ДНК LPP-3 містить лише 0,8 % 5-метилцитозину і не містить в своєму складі N-6-метиладеніну.

Вивчення наявності сайтспецифічного метилювання

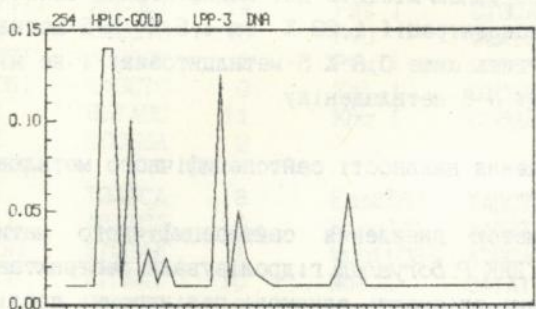
З метою виявлення сайтспецифічного метилювання ДНК LPP-3 та ДНК *P. boyoulim* гідролізували рестриктазами-ізошизомерами, які впізнають однакові паліндромні послідовності, але по-різному реагують на метилювання залишків цитозину та аденіну в цих послідовностях. Для виявлення метильованого цитозину в сайті CCGG використовували рестриктази *MspI* і *HpaII*.

Порівнюючи електрофоретичні профілі продуктів рестрикційного гідролізу ДНК кожною рестриктазою можна встановити наявність метилювання цитозину у другому положенні послідовності CCGG. Співпадання рестриктів говорить про відсутність метилювання, а менша їх кількість або повна відсутність при гідролізі *HpaII* свідчить про часткове або повне метилювання *StCCGG* сайту. Електрофоретичний розподіл продуктів гідролізу ДНК LPP-3 та *P. boyoulim* цими рестриктазами має ідентичний характер, що вказує на відсутність метилювання по внутрішньому цитозину в CCGG- послідовностях. В той же час слід зазначити, що обидві ДНК мають велику кількість CCGG- послідовностей.

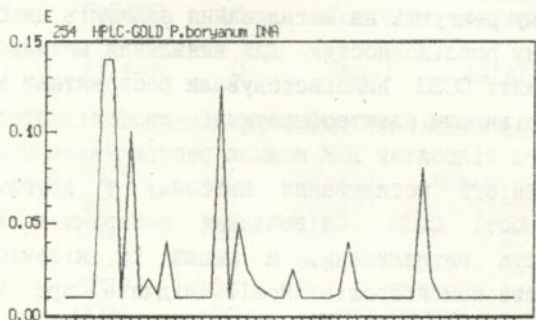
Інша пара рестриктаз *MvaI* та *AruI* впізнають один і той же сайт *CC(A/T)GG*. *MvaI* гідролізує ДНК незалежно від наяв-



1



2



3

Час елюції, хв

Мал. 1 Хроматографія стандартних основ (1) і продуктів хімічного гідролізу фтористоводневою кислотою ДНК ціанофага LPP-3 (2) та ціанобактерій *P. boryanum* (3) на установці HPLC "System GOLD" Beckman.

ності в сайті рестрикції 5-метилцитозину, а ApyI- тільки у випадку метилювання цитозину в другому положенні і при відсутності метилювання в першому. Майже в усіх CC(A/T)GG- послідовностях досліджуваних ДНК цитовин в другому положенні метильований. Таким чином, більшість CCAGG- і CCTGG- послідовностей в ДНК цих об'єктів існують у вигляді CmC(A/T)GG. Для визначення наявності метильованого аденіну використовували рестриктази Sau3A, MboI та DpnI, які впізнають послідовність GATC. Рестриктаза Sau3A може гідролізувати ДНК по GmATC, але не за GATmC- послідовностями. Рестриктаза MboI, навпаки, здатна впізнавати GATmC, але не GmATC сайти. Ендонуклеаза DpnI гідролізує ДНК тільки по метильованих послідовностях (GmATC сайти). Встановлено, що практично всі GATC сайти ДНК *P. boryanum* метильовані по аденіну, а в ДНК LPP-3 ці послідовності неметилювані.

При вивченні систем рестрикції-модифікації *P. boryanum* досліджено метилтрансферазну активність її клітин. Гідролізати клітин *P. boryanum* очищали хроматографічно на колонках з ДЕАЕ-сефадексом, а також методом ізоелектрофокусування в борат-поліольній системі. В одержаних фракціях досліджували наявність і специфічність дії метилтрансфераз. З цією метою використовували субстрати з різною специфічністю метилювання. Активність проб з метилазною активністю дорівнювала: 3850 ± 800 імп/хв/мкг при використанні ДНК фага лямбда, виділеного з dam+, dom+ господаря в той час як на ДНК фага лямбда з мутантного по системам метилювання господаря активність дорівнювала 15200 ± 1200 імп/хв/мкг, а на ДНК еритроцитів курчат вона сягала 29950 ± 2050 імп/хв/мкг.

Визначення типу метилтрансферазної активності показало, що як і для більшості метилаз II типу, прояв активності залежить тільки від наявності молекул SAM і практично не залежить від присутності в реакційній суміші йонів Mg^{++} і молекул АТФ. Це свідчить про те, що *P. boryanum* містить сайтспецифічні метилази II типу. Як вже зазначалося раніше, аналіз даних, одержаних за допомогою хроматографії гідролізатів ДНК *P. boryanum* та рестрикції ендонуклеазами, чутливими до метилювання, дозволив встановити, що метильований цитовин

міститься в ДНК в CmC(A/T)GG послідовностях, а метильований аденін в GmATC послідовностях. Враховуючи наявність у *P. boyanum* метилазної активності з подібною специфічністю можна зробити висновок про те, що цей ціанобактерієфіта притаманні системи рестрикції-модифікації з специфічністю, подібною до dam і dcm систем *E. coli*.

Шляхи захисту ДНК LPP-3 від рестрикції в *P. boyanum*

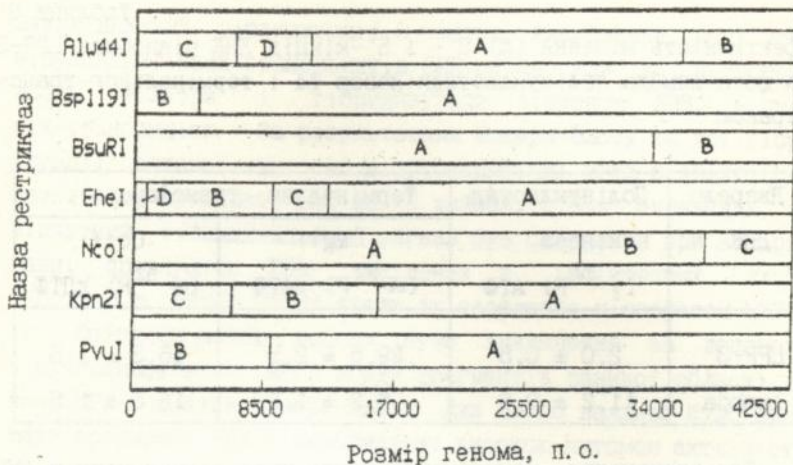
Порівняння кількості метильованих CmC(A/T)GG послідовностей з загальною кількістю 5-метилцитозину в досліджуваних ДНК свідчить про те, що практично весь метильований цитозин зосереджений в цих сайтах. Ідентичність рестриктів, одержаних в результаті гідролізу ДНК LPP-3 рестриктазами Cfr13I (GGNCC) і AvaII (GG(A/T)CC) свідчить (з загальноприйнятими методами визначення специфічності рестриктаз) про те, що Cfr13I гідролізує ДНК LPP-3 по сайтах AvaII. У цьому випадку послідовності GG(C/G)CC повинні бути або метильовані по останньому цитозину, або еліміновані з ДНК.

У випадку метилювання ці послідовності мали б виглядати як GG(C/G)CmC(A/T)GG, тобто, перекриватися ApyI сайтом. Але ця послідовність містить GGCC сайт рестриктази BsuRI, який би інгібувався метилюванням. До того ж, за допомогою методів подвійних переварів вдалось встановити, що унікальний сайт BsuRI є частиною розширеної послідовності AGGCCT, що гідролізується іншою рестриктазою Eco147I. Отже є підстави стверджувати про відсутність в ДНК LPP-3 послідовностей GG(C/G)CC. Оскільки ДНК *P. boyanum* ефективно гідролізується рестриктазою BsuRI, причиною цього явища може бути захист від власних вірусспецифічних нуклеаз, які з'являються на ранніх етапах інфекції.

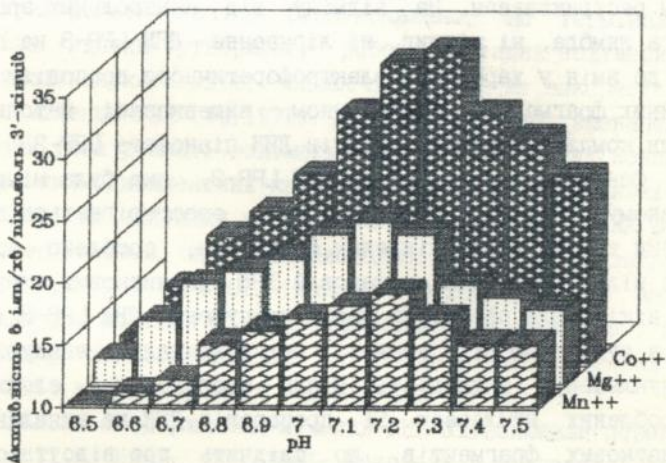
Спроби виділення ендонуклеази рестрикції з клітин *P. boyanum* різними хроматографічними методами (КМ-целюлоза, ДЕАЕ-сефадекс, ізоелектрофокусування) виявилися невдалими з причин неможливості звільнення від домішок неспецифічних нуклеаз. ДНК LPP-3 гідролізували рестриктазами з розширенням GATC-сайту: BamHI -сайт пізнавання GGATCC, BclI - TGATCA,

У більш складних випадках локалізації сайтів рестрикції використовували підхід, який базується на знаходженні кінцевих фрагментів для рестриктаз в більш ніж одним сайтом рестрикції. ДНК LPP-3 мітили по кінцях, гідролізували двома чи трьома рестриктазами і автографували гель. Цей метод дав можливість відразу розподілити на карті кінцеві фрагменти і значно підвищити ефективність рестрикційного картування. Для створення фізичної карти ДНК ціанофага LPP-3 використовували комп'ютерні програми картування сайтів рестрикції. Застосування комп'ютерних програм картування дозволило створити власну базу даних і використовувати вже досліджені фрагменти як автомаркери. Карта ДНК LPP-3 (Мал. 2) являє собою схему відносної локалізації 14 сайтів рестрикції восьми рестриктаз - Alw44I, Bsp119I, BsuRI, Eco147I, EheI, NcoI, Kpn2I та PvuI (сайт рестриктази BsuRI є частиною послідовності Eco147I).

Природа кінців ДНК ціанофагів не вивчалася, тому важливе значення мало визначення типу кінців ДНК LPP-3. Той факт, що ДНК LPP-3 ефективно мітиться по 3'- і 5'-кінцям за допомогою фрагмента Кленова, полінуклеотидкінази T4 та термінальної трансферази, однозначно свідчить про те, що ДНК LPP-3 має відкриті кінці. Для визначення наявності виступаючих нуклеотидів на одному з кінців ДНК ціанофага LPP-3 використовували метод, який базується на порівняльному аналізі ефективності включення мітки полінуклеотидкіназою T4 в 5'-кінці та термінальною трансферазою в 3'-кінці ДНК LPP-3 і фага лямбда. Як видно з табл. 3 полінуклеотидкіназа, яка проявляє найвищу активність при міченні виступаючих 5'-кінців, ефективніше мітить ДНК фага лямбда. Відомо, що термінальна трансфераза проявляє найбільшу специфічність до виступаючих 3'-кінців ДНК при використанні какодилатного буферу з йонами Mg^{++} та ДАТФ і втрачає специфічність до типу кінців в тому ж буфері з йонами Co^{++} та міченим ДЦТФ. При використанні реакційної суміші йонами Co^{++} ефективність мічення ДНК зазначених об'єктів практично не відрізняється. В той же час, при використанні йонів Mg^{++} спостерігається значне зростання ефективності мічення ДНК LPP-3 у порівнянні з ДНК фага лямбда.



Мал. 2 Фізична карта ДНК ціанофага LPP-3 (сайт BsuRI=Eco147I)



Мал. 3 Залежність ефективності мічення РНК термінальною трансферазою від значень рН буферу і типу використаних дивалентних катіонів.

Позначення - какодилатний буфер з: Co⁺⁺ - 1 мМ CoCl₂ (молярне співвідношення кількості 3'-кінців РНК до кількості [³²P] rCTP 1 : 10); Mg⁺⁺ - 10 мМ MgCl₂ ; Mn⁺⁺ - 10 мМ MnCl₂ ([³²P] rATP 1 : 100)

Таблиця 3

Ефективність мічення (%) 3'- і 5'-кінців ДНК ціанофага LPP-3 та фага лямбда полінуклеотидкіназою T4 і термінальною трансферазою

Джерело ДНК	Полінуклеотид-кіназа [γ 32 P] АТФ	Термінальна трансфераза	
		Mg++ [α 32 P] дАТФ	Co++ [α 32 P] дЦТФ
LPP-3	2,0 ± 0,5	29,5 ± 2,5	16,3 ± 1,5
lambda	11,2 ± 0,8	6,2 ± 1,2	15,5 ± 1,5

Для визначення комплементарності протилежних кінців ДНК LPP-3 проведені досліди по віджигу та по лігуванню за допомогою лігази T4 нативних молекул генома з наступним гідролізом рестриктазами. На відміну від контрольних зразків ДНК фага лямбда, ні віджиг, ні лігування ДНК LPP-3 не призводить до змін у характері електрофоретичного розподілу рестрикційних фрагментів. Таким чином, вищевказані методи не виявили комплементарності кінців ДНК ціанофага LPP-3.

Оскільки при гідролізі ДНК LPP-3, яка була мічена в нативному стані ДНК-полімеразою I, спостерігається включення мітки тільки в два кінцевих фрагменти, зроблено припущення про відсутність в ціанофазовій ДНК одониткових структур типу ніків. Для перевірки цього припущення ДНК LPP-3 інкубували з нуклеазою S1 в умовах, які максимально знижують її ендонуклеазну активність. Після проведення електрофорезу оброблених нуклеазою S1 препаратів ДНК не виявлено ніяких додаткових фрагментів, що свідчить про відсутність в ДНК LPP-3 ніків.

ТОНКЕ КАРТУВАННЯ РАННЬОЇ ОБЛАСТІ ГЕНОМУ ЦІАНОФАГА LPP-3

Для ідентифікації рестрикційних фрагментів ДНК ціанофага LPP-3, які містять ранню область генів, використовували

метод ДНК-РНК гібридизації. З метою визначення часу появи вірусспецифічних транскриптів РНК переносили на нітроцелюлозні фільтри і гібридували вірусною ДНК, міченою нік-трансляцією. За результатами Нозерн-блоту та дот-гібридизації встановлено, що вірусспецифічні мРНК з'являються в тотальному препараті вже на 15 хвилини після зараження, але відсутній гібридизаційний сигнал був одержаний при використанні препаратів РНК, виділених з інфікованих клітин *P. boryanum* через 30 хв після їх зараження ціанофагом LPP-3.

Основною метою роботи було визначення за допомогою вірусспецифічного мРНК-зонду фрагментів ранньої області геному LPP-3 шляхом Нозерн-блоту. Для цього важливо було одержати препарати РНК з максимально високою питомою активністю. На жаль, всі відомі методи мічення прокаріотичних мРНК мають суттєві недоліки. Тому була досліджена можливість використання для мічення РНК крім полінуклеотидкінази T4, і термінальної трансферази. Раніше було показано, що термінальна трансфераза здатна утворювати рибонуклеотидні полімери на 3'-кінцях олігонуклеотидів, однак цей метод не використовувався для мічення РНК (Wu, 1976). В досліджах по визначенню оптимальних умов реакції полімеризації вивчали вплив концентрацій різних дивалентних катіонів, мічених попередників і рН. Показано, що найвищий рівень включення мітки в РНК фага MS2 спостерігається при використанні 200 мМ какодилатного буферу, рН 7,2 з 1 мМ CoCl_2 (Мал. 3). Відпрацьований метод застосували для мічення вірусспецифічних мРНК *in vitro*, які в подальшому використовували як зонди в експериментах по ідентифікації області ранніх генів в ДНК LPP-3.

Паралельно з одержанням мічених РНК здійснювали перенесення HindIII-, KpnI- та XbaI- фрагментів вірусної ДНК на нітроцелюлозні фільтри для подальшої гібридизації з міченими мРНК. Вибір саме цих рестриктаз зумовлений тим, що серед ендонуклеаз, які гідролізують ДНК LPP-3, тільки HindIII, KpnI та XbaI мають сайти в полілінкері pUC19 - векторі, який передбачався використати для клонування фрагментів ранньої області генів. За допомогою ранніх вірусних мРНК методом блот-гібридизації встановлено, що B-KpnI фрагмент містить

область ранніх генів ДНК ціанофага LPP-3. Розмір виявленого фрагмента складає 10 т.п.о. і займає майже чверть вірусного геному. Ці дані були отримані, на наш погляд, завдяки використанню оригінального методу мічення мРНК за допомогою термінальної трансферази. Незважаючи на те, що сумарні препарати РНК, мічені термінальною трансферазою, мали меншу питому активність в порівнянні з препаратами міченими полінуклеотидкіназою (в середньому $5,5 \times 10^7$ імп/хв/мкг і $1,2 \times 10^8$ імп/хв/мкг відповідно), більш чіткі автографи були отримані при використанні першої із них.

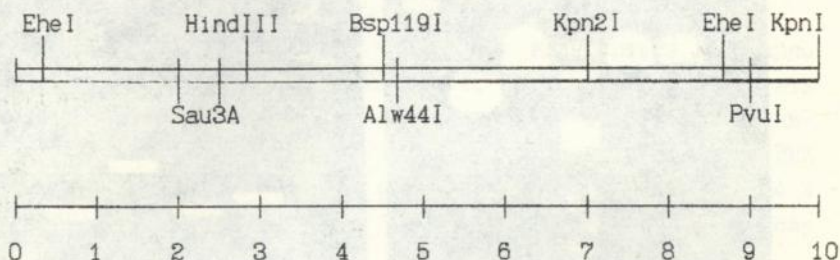
З метою визначення локалізації В-KpnI фрагменту на фізичній карті ДНК LPP-3 проводили спільний гідроліз рестриктазою KpnI з рестриктазами, які мають сайти впізнання на протилежних кінцях геному: NcoI, Bsp119I і Kpn2I. Встановлено, що рестриктази Bsp119I і Kpn2I мають сайти рестрикції на В-KpnI фрагменті ДНК LPP-3, а рестриктаза NcoI його не гідролізує. Таким чином була встановлена реальна орієнтація фізичної карти ДНК ціанофага LPP-3.

Після гідролізу вірусного геному, міченого по кінцях в нативному стані рестриктазою HindIII, чітко ідентифікуються два кінцеві фрагменти розміром 2,8 і 0,77 т.п.о. Їх рестрикційний аналіз та гібридизація з 10 т.п.о. В-KpnI-фрагментом дозволили встановити, що саме 2,8 т.п.о. HindIII-фрагмент належить до ранньої області ДНК LPP-3. Цей фрагмент виділяли з легкоплавкої агарови і гідролізували рестриктазою Sau3A. Дані експерименти разом з результатами клонування дозволили провести тонке картування 2,8 т.п.о. HindIII-фрагмента ДНК LPP-3 по рестриктазі Sau3A (Мал. 4).

Клонування фрагментів ранньої області ДНК LPP-3

Проведено клонування окремих фрагментів області ранніх генів ДНК LPP-3 в вектор pUC19. Для цього використовували 2,8 т.п.о. HindIII-фрагмент ДНК LPP-3 і продукти його Sau3A гідролізу. В результаті експериментів не вдалося заклонувати кінцеві HindIII чи HindIII/Sau3A фрагменти геному, що також свідчить про наявність в ДНК LPP-3 виступаючих кінців. В той

же час були отримані клони, що містять два Sau3A - фрагменти ранньої області ДНК LPP-3 розміром 700 п.о. і 350 п.о. клоновані за BamHI та за BamHI/HindIII сайтами pUC19 (мал. 5).



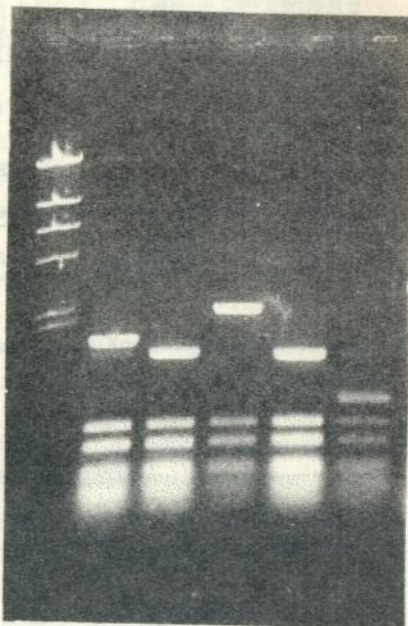
Довжина геному, т. п. о.

Мал. 4 Фізична карта ранньої області ДНК ціанофага LPP-3

Оскільки в експериментах по клонуванню використовували штами *E. coli*, дефіцитні по системам рестрикції-модифікації, або такі, що не мали метилаз GmCC-типу, неабиякий інтерес представляла перевірка припущення щодо елімінації з ціанофагового геному CC(C/G)GG- послідовностей. З метою доказу існування контрелекції плазмиди з фрагментами ДНК LPP-3 гідролізували рестриктазою BsuRI і аналізували електрофоретично. У випадку коли резистентність ДНК LPP-3 до дії рестриктази BsuRI була би обумовлена метилюванням GGCC послідовності повинен спостерігатися гідроліз клонованих фрагментів (близько 200 теоретично очікуваних сайтів на геном LPP-3). У разі існування контрелекції більшість клонованих фрагментів не повинні гідролізуватися крім одного, що містить унікальний сайт BsuRI. Як видно з мал. 6., клоновані фрагменти ДНК LPP-3 не піддаються гідролізу рестриктазою BsuRI, тобто не мають GGCC- послідовностей, що є ще одним важливим доказом наявності контрелекції ціанофагової ДНК за CC(C/G)GG послідовностями.



1 2 3 4 5 6 7
Мал. 5



1 2 3 4 5 6
Мал. 6

Мал. 5 Електрофорез в 1,5 % агарозному гелі продуктів гідролізу плазмід з фрагментами ДНК ціанофага LPP-3

Позначення: 1,4 - ДНК LPP-3/Sau3A; 5 - pUC19/BamHI; 6 - pUC19; рекомбінантні плазміді гідролізовані BamHI: з фрагментами розміром 700 п. о. (2) і 350 п. о. (3); 7- маркер ДНК фага λ /StyI

Мал. 6 Електрофорез в 1,0 % агарозному гелі продуктів гідролізу рекомбінантних плазмід (2-6) з клонованими HindIII-фрагментами ДНК ціанофага LPP-3 рестриктазою HaeIII
1 - маркер - ДНК фага λ / HindIII

В И С Н О В К И

1. ДНК ціанофага LPP-3 являє собою дволанцюгову молекулу ДНК розміром $42,5 \pm 1,5$ т.п.о., яка не містить ніків та має відкриті некомплементарні кінці.

2. ДНК ціанобактерії *P. boyouanum* відноситься до слабо вираженого АТ-типу (48 % ГЦ-пар) і, крім канонічних містить дві модифіковані основи: N-6-метиладенін - 4,5% і 5-метилцитозин -1,2%. ДНК ціанофага LPP-3, на відміну від ДНК *P. boyouanum*, відноситься до слабо вираженого ГЦ-типу (54 % ГЦ-пар) і, крім канонічних основ, містить тільки 5-метилцитозин в кількості 0,8 % .

3. Клітини ціанобактерії *P. boyouanum* мають системи рестрикції-модифікації *dam*- і *dcm*- подібного типу.

4. Захист геному ціанофага LPP-3 від рестрикції в клітинах *P. boyouanum* здійснюється двома шляхами: метилюванням *StmC(A/T)GG* послідовностей та контрелекцією за *GG(C/G)CC* і, можливо, *GGATCC* послідовностями.

5. Вперше для ціанофагів побудована фізична карта ДНК LPP-3, яка являє собою повну схему локалізації 14 сайтів рестрикції для 8 рестриктаз: *Alw44I*, *Bsp119I*, *BsuRI*, *Eco147I*, *EheI*, *Kpn2I*, *NcoI*, *PvuI*.

6. Для отримання радіоактивних мРНК-зондів з високою питомою активністю вперше розроблений і використаний ефективний метод мічення вірусспецифічних мРНК *in vitro* за допомогою термінальної трансферази.

7. Методом блот-гібридизації з вірусними мРНК ідентифікована область ранніх генів ДНК ціанофага LPP-3 розмір якої складає 10 т.п.о. Створена її тонка карта і здійснено клонування фрагментів ранньої області ДНК LPP-3 в вектор *pUC19*. Передбачається, що рання область ДНК ціанофага LPP-3 містить ген, який кодує сайтспецифічну ендонуклеазу з сайтом впізнання *CC(C/G)GG*, яка на ранніх етапах інекції викликає деградацію клітинної ДНК.

Список робіт, опублікованих за матеріалами дисертації

1. Менджул М. И., Сырчин С. А., Аверкиев А. А., Бусахина И. В. Сравнение различных методов выделения цианофага LPP-3 и его ДНК // Микробиол. журн. - 1992. -54, N2. - С. 70-74.
2. Менджул М. И., Сырчин С. А., Ребентис Б. А., Аверкиев А. А., Бусахина И. В. Резистентность ДНК цианофага LPP-3 к действию различных эндонуклеаз рестрикции // Микробиол. журн. -1993. -55, N4. -С. 47-53.
3. Менджул М. И., Сырчин С. А., Аверкиев А. А., Ребентис Б. А. Способы защиты ДНК цианофага LPP-3 от систем рестрикции-модификации цианобактерии *Plectonema boryanum* // Биополимеры и клетка - 1993. -9, N5. -С. 56-61.
4. Нестерова Н. В., Калиниченко Т. С., Мельник А. И., Сырчин С. А. Деградация генома цианобактерий при репродукции цианофагов AS-1L, S-8K, LPP-3 и A-1 // Микробиол. журн. -1991. - 53, N 3. - С. 43-49.
5. Нестерова Н. В., Менджул М. И., Калиниченко Т. С., Сырчин С. А. Роль укороченного пути и блока синтеза *de novo* пуринов и пиримидинов в обеспечении трифосфатами синтеза ДНК цианофагов S-8K, LPP-3 и A-1 //Микробиол. журн. -1991. -53, N 4. - С. 73-80.
6. Сырчин С. А., Калиниченко Т. С. Мечение мРНК *in vitro* с помощью терминальной трансферазы /Материали I устан. (VIII) з'їзду УМТ, Одеса, 1993//Мікробіол. журн. -1994. -56, N 5. -С. 65.
7. Сырчин С. О., Менджул М. И. Сайт-специфічне метилювання ДНК цианофагу LPP-3 та цианобактерії *P. boryanum* //Тез. VI Укр. біохім. з'їзду, Київ: Видавництво УСГА, 1992. - ч. 3. -С. 47.
8. Mendzhul M. I., Syrchin S. A., Melnik A. A., Rebentish B. A. Restriction/modification systems in *Nostoc* and *Plectonema* //Cyanonews. (Ed. Jeff Elhai) Miami Int. Uni. -1991. -7, N2. -P. 3.
9. Mendzhul M. I., Syrchin S. A., Kalinichenko T. S. Investigation of structure-functional characteristics of cyanophage LPP-3 DNA /In: Proc. of Inter. Conf. Fundamental and Applied Problems in Phytovirology, Yalta, -1994. -P. 10.

АННОТАЦІЯ

Сырчин С. А. Структурний аналіз ДНК ціанофага LPP-3 і ціанобактерії *Plectonema boryanum*.

Дисертація на соискание ученої ступені кандидата біологічних наук по спеціальності 03.00.06 - вірусологія, Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ, 1996.

Захищається дисертація, по матеріалам якої опубліковано 9 наукових робіт. При використанні різних методических підходів отримані нові дані, які розширюють представлення про механізми взаємодії ціанофагів з клітками ціанобактерій: вивчені структурно-функціональні особливості їх ДНК, встановлено специфічність систем рестрикції-модифікації *P. boryanum* і способи захисту від них ДНК LPP-3. Вперше побудована фізична карта ДНК ціанофага. Ідентифіковані і клонировані фрагменти області ранніх генів ціанофага LPP-3.

BRIEF INFORMATION

Syrchin S. A. Structural analysis of DNA of cyanophage LPP-3 and cyanobacteria *Plectonema boryanum*.

Thesis for obtaining scientific degree of Candidate of biological sciences in speciality 03.00.06 - virology, Zabolotny Institute of microbiology and virology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1996.

Thesis is defended on the basis of 9 scientific works published on its materials. Different methodical approaches were used to obtain new data which extend knowledge about the mechanisms of interaction of cyanophages with cyanobacterial cells: structural-functional peculiarities of their DNA have been studied. Specificity of *P. boryanum* restriction-modification systems and the ways of defence against its of LPP-3 DNA have been characterised. First physical map of cyanophages DNA has been constructed.

Ключові слова: ціанофаг, ціанобактерія, системи рестрикції-модифікації, модифікація, контрелекція, фізична карта, ранні гени.

1111146

AB 35.893

AB. 35.893