



УДК 577.152.5

## АТР-НЕЗАВИСИМАЯ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗА ИЗ ХЛОРОПЛАСТОВ *NICOTIANA CHINENSIS*

К. Г. Карпенчук

ДНК-топоизомеразы представляют собой особую группу ферментов, которые путем внесения обратимых разрывов в молекулы ДНК осуществляют топологические превращения ДНК, такие, как суперспирализация — релаксация, катенирование — декатенирование, заузливание — разузливание и ренатурацию расплетенных цепей ДНК в важнейших генетических процессах — транскрипции, репликации, рекомбинации и транспозиции в клетках про- и эукариот [1]. ДНК-топоизомеразы изученных про- и эукариотических клеток подразделяются, во-первых, на два типа по механизму расщепления ДНК и, во-вторых, по происхождению из бактериальных клеток или ядер эукариот. Энзимология топоизомеризации ДНК в растительной клетке, которая управляется геномами ядра, хлоропластов и митохондрий, остается малоизученной. Недавно были описаны свойства ДНК-топоизомеразы I из хлоропластов шпината [2], которая оказалась подобной аналогичному ферменту из бактериальных клеток, что рассматривается как дополнительное свидетельство в пользу эндосимбиотического происхождения пластид [3]. Установление наличия в хлоропластах аппарата регуляции топологических переходов ДНК, подобного содержащемуся в бактериальных клетках [1], представляет несомненный интерес для понимания принципов управления генами пластид. Данная работа посвящена выделению и частичной характеристике прокариотической ДНК-топоизомеразы из хлоропластов *Nicotiana chinensis*.

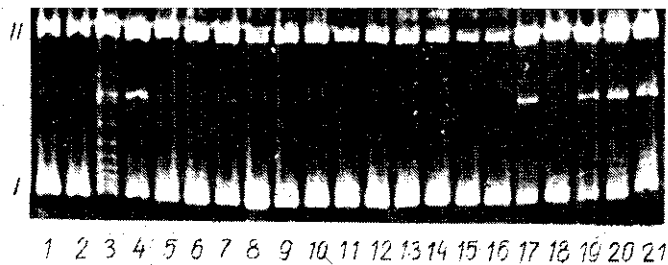
Очистку хлоропластов из листьев *N. chinensis* в градиенте плотности перколлы, получение лизата хлоропластов и его фракционирование на ДЭАЭ-целлюлозе проводили, как описано для хлоропластов шпината [2], с некоторыми модификациями.

Анализ активности ДНК-топоизомеразы проводили в объеме 30 мкл стандартной инкубационной смеси, содержащей 12,5 мМ трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ дитиоэритритол, 75 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,5 мкг ДНК плазмиды *pUR222* [4] и 12—17 мкл хроматографических фракций лизата хлоропластов. Инкубацию проводили при 37 °С в течение 1 ч и останавливали реакцию прогреванием при 65 °С в течение 5 мин с последующим добавлением 5 мкл 50 мМ ЭДТА, рН 8,0, 2 % DS-Na, 10 % фикола и 0,01 % бромфенолового синего. Аликвоты полученной смеси наносили на 1,5 %-ный агарозный гель с 40 мМ трис-ацетатом, рН 8,3, 5 мМ натрий-ацетатом и 2 мМ ЭДТА и разделяли ДНК электрофорезом при 40 В в течение 18 ч.

На рисунке показаны результаты анализа АТР-независимой релаксирующей активности ДНК-топоизомеразы хлоропластов во фракциях, полученных элюцией ДЭАЭ-целлюлозы градиентом концентрации NaCl (20—400 мМ). Видно, что такая активность содержится в начальных фракциях, инкубация которых с субстратом — суперспиральной ДНК (форма I) плазмиды *pUR222* — приводит к появлению характерной «лесенки» топоизомеров кольцевой ДНК с различным количеством супервитков. Данная активность элюируется при более низкой ионной силе (около 0,1 М NaCl) по сравнению с ДНК-топоизомеразой I из хлоропластов шпината [2]. Помимо этой активности при более высокой концентрации соли с ионообменной колонки элюировалась ДНК-топоизомераза, которая релаксировала супервитки ДНК в присутствии АТР (результат не приведен).

Для активности АТР-независимой ДНК-топоизомеразы абсолютно необходимы ионы магния, поскольку добавление хелатного агента полностью предотвращает релаксацию супервитков ДНК. Вместе с тем ДНК-топоизомеразная активность не ингибиру-

валась новобиоцином, спермидином и бромистым этидием (рисунок). Наличие ДНК-топоизомеразной активности в присутствии новов магния, но без АТР позволяет отнести данный фермент к прокариотическому типу ДНК-топоизомераз подобно ДНК-топоизомеразе I из хлоропластов шпината [2]. В настоящее время эндосимбиотическая теория происхождения хлоропластов из фотосинтезирующих бактерий получает дополнительные аргументы [5], тогда как кластерно-клональная модель дивергентной эволюции геномов ядра и пластид [6] требует слишком многих новых допущений для объяснения сходства в организации геномов хлоропластов и бактерий. ДНК-топоизо-



Релаксирующая активность хлоропластной ДНК-топоизомеразы. Показано разделение ДНК плазмиды *pUR222* после инкубации с аликвотами четных хроматографических фракций (1—16), а также после инкубации с активной фракцией в стандартной реакционной смеси (17) и добавлением 10 мМ ЭДТА (18), 1,8 мМ спермидина (19), новобиоцина, 80 мкг/мл (20) и бромистого этидия, 0,8 мкг/мл (21). Указано положение суперспиральной (форма I) и открытой кольцевой (форма II) молекул ДНК *pUR222*.

Relaxing activity of the chloroplast DNA topoisomerase. The resolution of plasmid *pUR222* DNA is shown after incubation with aliquots of the even chromatographic fractions (1-16) and after incubation with the active fraction in standard assay mixture (17) and with addition of 10 mM EDTA (18), 1.8 mM of spermidine (19), novobiocin (80 µg/ml) (20) or ethidium bromide (0.8 µg/ml) (21). Positions of the supercoiled (form I) and open circular (form II) *pUR222* DNA molecules are indicated.

меразы цианобактерий, предполагаемых «предков» хлоропластов растений, остаются совершенно неизученными, поэтому возможно сопоставление хлоропластных ДНК-топоизомераз лишь с ферментами филогенетически более отдаленных прокариот. В клетках *E. coli* идентифицированы четыре ДНК-топоизомеразы — I, II', III и ДНК-гираза [1, 7]. Выделенная нами ДНК-топоизомераза хлоропластов толерантна к присутствию спермидина, что объединяет ее с ДНК-топоизомеразой I типа из *Micrococcus luteus* [8] и археобактерии *Sulfolobus acidocaldarius* [9] и отличает от ДНК-топоизомераз I и III из *E. coli*, которые ингибируются полиаминами. Спермидин стимулирует активность ДНК-топоизомеразы II' *E. coli* [10], которая подобно хлоропластной ДНК-топоизомеразе осуществляет АТР-независимую релаксацию супервитков ДНК и не ингибируется бромистым этидием. Выделенный нами фермент, по-видимому, не является ДНК-гиразой, так как и в присутствии АТР наблюдалась релаксация суперспиральной ДНК. Для точной классификации фермента из хлоропластов необходимо установление механизма промежуточного расщепления ДНК.

Изучение ДНК-топоизомераз хлоропластов представляет интерес в связи с уже известным влиянием бактериальных ДНК-топоизомераз на репликацию ДНК [1], а также на уровень суперспирализации ДНК в период между делениями клеток, что оказывает влияние на экспрессию многих генов. Так, в клетках *Salmonella typhimurium* уровень суперспирализации ДНК контролируется по меньшей мере пятью генами, мутации которых приводят к замедлению деления клеток [11].

Прокариотическая природа выделенной нами ДНК-топоизомеразы, так же как фермента из шпината [2], позволяет предполагать, что хлоропласты высших растений должны содержать целый набор ДНК-топоизомераз подобно изученным бактериям. Следует также ожидать, что по крайней мере некоторые хлоропластные ДНК-топоизомеразы кодируются в собственном геноме пластид, а их активность может оказывать влияние на развитие хлоропластов.

Автор выражает признательность Л. А. Ситайло за очистку плазмидной ДНК.

ATP-INDEPENDENT DNA TOPOISOMERASE  
FROM THE CHLOROPLASTS OF *NICOTIANA CHINENSIS*

K. G. Karpenchuk

N. G. Kholodny Institute of Botany,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

ATP-independent DNA topoisomerase was extracted from the purified leaf chloroplasts of *Nicotiana chinensis* and partially purified by the salt gradient elution from DEAE-cellulose. Relaxation of negatively supercoiled plasmid *pUR222* by the enzyme was found to be absolutely dependent on the presence of magnesium ions, being completely inhibited by EDTA. DNA topoisomerase activity was tolerant to the spermidine (1.8 µg/ml), novobiocin (80 µg/ml) and ethidium bromide (0.8 µg/ml). Strong magnesium requirement of chloroplast DNA topoisomerase in ATP-independent reaction resembles properties of the prokaryotic counterparts.

1. Gellert M. DNA topoisomerases // Ann. Rev. Biochem. — 1981.—50. — P. 879—910.
2. Siedlecki J., Zimmerman W., Weissbach A. Characterization of a prokaryotic DNA topoisomerase I activity in chloroplast extracts from spinach // Nucl. Acids Res. — 1983.—11, N 5. — P. 1523—1536.
3. Марселус Л. Роль симбиоза в эволюции клетки. — М.: Мир, 1983.—352 с.
4. *pUR222*, a vector for cloning and rapid chemical sequencing of DNA / U. Rütther, M. Koenen, K. Otto, B. Müller-Hill // Nucl. Acids Res. — 1981.—9, N 16. — P. 4087—4098.
5. *Endocytobiology* / Eds H. E. A. Schenk, W. Schwemmler. — Berlin; New York: Walter de Gruyter, 1983. — V. 2. — 891 p.
6. Bogorad L. Evolution of organelles and eukaryotic genomes // Science. — 1975.—188, N 4191. — P. 891—898.
7. Srivenogupal K. S., Lockshon D., Morris D. R. *Escherichia coli* DNA topoisomerase III: purification and characterization of a new type I enzyme // Biochemistry. — 1984.—23, N 9. — P. 1899—1906.
8. Kung V. T., Wang J. C. Purification and characterization of an omega protein from *Micrococcus luteus* // J. Biol. Chem. — 1977.—252, N 15. — P. 5398—5402.
9. Kikuchi A., Asai K. Reverse gyrase — a topoisomerase which introduces positive superhelical turns into DNA // Nature. — 1984.—309, N 5970. — P. 677—681.
10. Brown P. O., Peebles C. L., Cozzarelli N. R. A topoisomerase from *Escherichia coli* related to DNA gyrase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1979.—76, N 12. — P. 6110—6114.
11. Richardson S. M. H., Higgins C. F., Lilley D. M. J. The genetic control of DNA supercoiling in *Salmonella typhimurium* // EMBO J. — 1984.—3, N 8. — P. 1745—1752.

Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР, Киев

Получено 26.11.85

УДК 578.81

МИНИ-ФОРМЫ НИТЕВИДНОГО ВЕКТОРНОГО ФАГА M13

Е. Б. Патон, А. Н. Живолуп

Нитевидный фаг *M13* широко используется в качестве вектора для молекулярного клонирования в *E. coli* [1]. Большая векторная емкость [2] и наличие одноцепочечной (ОЦ) формы, необходимой для секвенирования по методу Сэнгера [3] и сайтспецифического мутагенеза [4], делают фаг *M13* исключительно удобным. Тем не менее, к существенным его недостаткам следует отнести возможную нестабильность рекомбинантов [5] и образование дефектных мини-форм [6, 7]. Необходимость использования фага *M13mp8* [1] в качестве вектора для молекулярного клонирования была причиной предпринятой в данной работе попытки изучения образуемых им мини-форм.

Для выделения мини-фагов клетки из 20 фаговых бляшек вносили в жидкую среду LB [8] и культивировали в течение ночи. Репликативные формы (РФ) фаговой ДНК выделяли по методу [9] и анализировали электрофорезом в 0,8 %-ном агарозном геле (рис. 1). Оказалось, что наряду с полными РФ в более чем половине фагосодер-