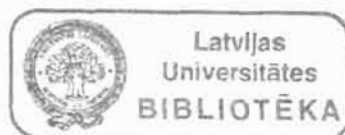


INDRIĶIS MUIŽNIEKS
Dr. biol.

DAŽU IMŪNMODULATORU MIKROBIOLOĢISKĀS
SINTĒZES PROCESU IZPĒTE

Publicētu darbu kopa
habilitēta doktora grāda iegūšanai bioloģijā,
mikrobioloģijas apakšnozarē



LATVIJAS UNIVERSITĀTE

RĪGA, 1997

Darba kopsavilkums	5 - 16
Publicēto darbu kopa	17 - 144
Ревелия ВР, Шафранский АБ, Муйжниекс ИО (1981) Аденилатдезаминаза <i>Penicillium lanoso-viride</i> . Некоторые свойства фермента. В сб.: Использование и трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами (под ред. Х.А.Маурина) с. 92 - 101	18 - 27
Николаева ВР, Муйжниекс ИО (1985) Противоопухоловое и иммуностимулирующее действие аденилатдезаминазы . В сб.: Нуклеазы, биологическая роль и практическое использование (под ред. Г.Д.Бердышева и др.) с. 21 - 24	28 - 31
Матюшкова НА, Муйжниекс ИО (1985) Морфологическое выражение плазмидного маркера тетрациклиностойчивости. <i>Изв. АН Латвийской ССР</i> , № 12, с. 94 -98	32 - 36
Žak M, Novak F, Muiznieks IO, Nikolajeva VR, Kamradze AA, Maurina NA, Ferdats AK (1986) Imunostimulačni a protinadorove vlastnosti plisneoveho glykoproteinu A [Immunopotentiating and anti-tumour activity of the mould glycoprotein A] <i>Sbornik lekarsky</i> 88: 139 - 145	37 - 43
Žak M, Novak F, Muiznieks IO, Nikolajeva VR, Kamradze AA, Maurina NA, Ferdats AK, Jirkovsky J (1986) Vliv plisneoveho glykoproteinu A na rust nadoru a prezivani mysu kmene C3H se syngennim metylcholantrenovym nadorem [Influence of the fungal glycoprotein A on the growth of tumours and survival of mice strain C3H with a syngenic Methylcholantrene tumour] <i>Sbornik lekarsky</i> 90: 252 - 257	44 - 51
Янкевиц ЭК, Макаренкова ГИ, Романчикова НВ, Муйжниекс ИО, Циманис АЮ, Грен ЭЯ (1989) Клонирование и нуклеотидная последовательность 5/-фланкирующей области гена интерлейкина-2 человека. <i>Биоорганическая химия</i> 15: 1362 -1365	52 - 55
Камрадзе АА, Эзе ДИ, Петриня ЗЭ, Николаева ВР, Муйжниекс ИО (1990) Реакция системы крови на введение иммуномодулятора - гликопротеина А. <i>Изв. АН Латвийской ССР</i> , № 2, с. 68 - 71	56 - 59
Aslanidis C, Muiznieks I, Schmitt R (1990) Successive binding of <i>raf</i> repressor to adjacent <i>raf</i> operator sites <i>in vitro</i> . <i>Mol Gen Genet</i> 233: 297-304	60 - 67
Jaenicke R, Muiznieks I, Aslanidis C, Schmitt R (1990) Ultracentrifugal analysis of the quaternary structure of the <i>raf</i> repressor from <i>Escherichia coli</i> . <i>FEBS Lett</i> 260: 233-235	68 - 70
Muiznieks I, Schmitt R (1994) The role of two operators in regulating <i>raf</i> -operon in <i>Escherichia coli</i> . <i>Mol Gen Genet</i> 242: 90-99	71 - 80

Muiznieks I, Doerfler W (1994) The topology of the promoter of RNA polymerase II- and III-transcribed genes is modified by the methylation of 5'-CpG-3' dinucleotides <i>Nucl Acids Res</i> 22: 2568 - 2575	81 - 86
Muiznieks I, Doerfler W (1994) The impact of 5'-CpG-3' methylation on the activity of different eukaryotic promoters: a comparative study <i>FEBS Lett</i> 344, 251-254	87 - 90
Nikolajeva V, Eze D, Kamradze A, Indulena M, Muiznieks I (1996) Protective effect of adenylate deaminase (from <i>Penicillium lanoso-viride</i>) against acute infections in mice <i>Immunopharmacology</i> 978: accepted May 28, 7 pages	91 - 96
Муйжниекс ИО, Ревелиня ВР, Шафранский АБ, Мауриня ХА Способ получения производных гипоксантина. Описание изобретения к А.с. СССР № 764385 un LR Patenta №. 5057 anotācija	97 - 105
Муйжниекс ИО, Ревелиня ВР, Шафранский АБ Штамм <i>Penicillium lanoso-viride</i> 8Д - продуцент аденилатдезаминазы. Описание изобретения к А.с. СССР № 782392 un LR Patenta №. 5056 anotācija	106 - 111
Межиня ГР, Муйжниекс ИО, Ревелиня ВР, Мауриня ХА, Бекер ВФ, Упит АА Способ получения кормовой биомассы. Описание изобретения к А.с. СССР № 1064500 un LR Patenta №. 5055 anotācija	112 - 120
Муйжниекс ИО, Ревелиня ВР, Шафранский АБ Способ получения аденилатдезаминазы. Описание изобретения к А.с. СССР № 1082011 un LR Patenta №. 5059 anotācija	121 - 130
Зилбере АМ, Шафранский АБ, Хартмане ЯЯ, Ансберга СЭ, Муйжниекс ИО, Камрадзе АА Способ получения плазмидной ДНК. Описание изобретения к А.с. СССР № 1124033	131 - 134
Николаева ВР, Муйжниекс ИО Способ получения аденилатдезаминазы. LR Patenta №. 5058 anotācija	135
Шафранский АБ, Муйжниекс ИО, Макаренкова ГИ, Зилбере АМ, Ансберга СЭ Способ получения дезоксирибонуклеиновой кислоты фага Харон 4А. Описание изобретения к А.с. СССР № 1277748	136 - 138
Ивашенко МЕ, Муйжниекс ИО, Николаева ВР, Камрадзе АА Штамм микроскопического гриба <i>Penicillium lanoso-viride</i> - продуцент аденилатдезаминазы. Описание изобретения к А.с. СССР № 1499919	139 - 144

INDRIĶIS MUIŽNIEKS

Dr. biol.

HABILITĀCIJAS DARBA

“Dažu imūnmodulatoru mikrobioloģiskās sintēzes procesu izpēte”,

kas iesniegts zinātnisku publikāciju kopas veidā LU Mikrobioloģijas un
Biotehnoloģijas institūta habilitācijas un promocijas padomei habilitēta zinātņu
doktora grāda iegūšanai bioloģijas zinātnēs, mikrobioloģijas apakšnozarē,

K O P S A V I L K U M S

I. Vispārējs raksturojums

Publikācijās atspoguļotie rezultāti iegūti laikā no 1979. līdz 1996. gadam, strādājot LU Bioloģijas fakultātes Augu fizioloģijas un mikrobioloģijas katedras (vadītāja - profesore Helēna Mauriņa) Augu attīstības fizioloģijas laboratorijā, bet no 1991. gada - uz iepriekšminētās laboratorijas bāzes izveidotajā Augu un mikroorganismu ģenētikas laboratorijā. Daļa pētījumu 1984. - 1987. gados veikti sadarbībā ar Prāgas Kārļa Universitātes zinātniekiem Čehijā, bet kopš 1988. gada - Vācijā, stažējoties Rēgensburgas un Ķelnes universitātēs.

Darbā izmantotas dažādas pieejas imūno atbildi veicinošu savienojumu iegūšanai no mikroorganismu šūnām un klonēto gēnu ekspresiju regulējošo faktoru izpētei.

Selekcionēti *Penicillium* ģints augsnes mikroskopisko sēņu celmi, kuri sintezē dabisku imūnstimulatoru - glikoproteīnu ar adenilātdeamināzes enzimatisko aktivitāti. Raksturota adenilātdeamināzi (ADA) producējošo *Penicillium* celmu fizioloģija, izstrādātas metodes ADA attīrīšanai un dots tās imunoloģiskās iedarbības spektra raksturojums.

Ar gēnu inženierijas metodēm konstruēti cilvēka imūnmodulatoro proteīnu gēnus nesoši *Escherichia coli* celmi. No molekulārās mikrobioloģijas viedokļa raksturoti faktori, kuri regulē plazmīdu gēnu stabilitāti un ekspresijas efektivitāti baktēriju šūnās.

Darbā izmantotas:

mikroorganismu fizioloģijas un bioķīmijas metodes: mikroorganismu kultivēšanas apstākļu optimizācija, mikroorganismu fermentu un DNS preparātu iegūšana un attīrīšana, fermentu īpašību raksturošana, DNS struktūras analīze ar restrikcijas analīzes un sekvenēšanas palīdzību;

mikroorganismu ģenētikas un gēnu inženierijas metodes: mikroorganismu celmu selekcija un konstruēšana, to ģenētiskās stabilitātes raksturošana, gēnu bibliotēku veidošana un DNS klonēšana, virzītā mutaģenēze, proteīnu un DNS mijiedarbības izpēte ar veidoto kompleksu elektroforētiskā kustīguma un proteīnu neaizsargātās DNS degradācijas ("fūtprintinga") palīdzību, plazmīdu gēnu promoteru

efektivitātes raksturošana pēc reportierģēnu ekspresijas aktivitātes un DNS topoloģijas izpēte ar šim nolūkam speciāli pielāgotām elektroforēzes metodēm;

eksperimentālās imunoloģijas metodes: humorālo un šūnu imūno atbildi raksturojošie testi: limfocītu mitotiskās aktivitātes stimulēšana un blasttransformācija, antivielas producējošo šūnu skaita noteikšana liesā (Jernes reakcija), audzēju un imūnās sistēmas šūnu mijiedarbība *in vitro*, asins bioķīmisko rādītāju un šūnu morfoloģijas raksturojums, transplantējamu audzēju un inducētu infekciju attīstības pētījumi laboratorijas dzīvniekos.

Darbu izstrādājot, ir vadītas 4 doktora disertācijas un vairāk nekā 10 diplomdarbi.

Aizstāvēšanai iesniegtajā darbu kopā ir iekļauti 6 zinātniskie raksti angļu valodā, 2 zinātniskie raksti čehu valodā, 4 zinātniskie raksti krievu valodā, 8 PSRS autorapliecības, no kurām piecām izņemts atbilstošs Latvijas Republikas patents. Publikāciju impaktfaktoru summa pēc ISI datiem 1996. gadā ir 19,347.

II. Pētījumu virzienu teorētiskā un praktiskā nozīme, problēmas un uzdevumi.

Imūno atbildi veicinošie savienojumi sekmē organisma pretestības spējas pret dažādu infekciju izraisītājiem, arī pret audzēju šūnu attīstību. Pēdējos gados parādījušās jaunas bīstamas infekcijas, daudzi jau sen zināmo infekciju izraisītāji ir zaudējuši jūtību pret agrāk lietotajām terapijas metodēm. Tādēļ īpaša vērība tiek pievērsta jaunu ārstniecības paņēmienu meklējumiem, arī organisma nespecifiskās imūnās aizsardzības stimulēšanai.

Iespējamās divas pieejas imūno atbildi veicinošo savienojumu iegūšanai no mikroorganismu šūnām. Pirmkārt, izmantot dabas doto mikroorganismu vielmaiņas produktu daudzveidību un meklēt starp to šūnu komponentiem savienojumus, kuri spētu izraisīt dzīvnieku un cilvēka organisma imūnās rezistences spēju palielināšanu, stimulēt noteiktus imūnās atbildes veidošanās posmus. Otrkārt, izmantojot molekulārās klonēšanas metodes, veidot jaunus mikroorganismu-producentu celmus, kas nes hibrīdus gēnus un spēj sintezēt šiem gēniem specifiskos proteīnus, arī imūnmodulatorus.

Tradicionālie mikrobioloģiskās sintēzes potenciāla izmantošanas virzieni ir saistīti ar spirtu, organisko skābju, aminoskābju, antibiotiku un fermentu iegūšanu. Uz šīs daudzveidības fona salīdzinoši retāki ir mēģinājumi izmantot mikroorganismu vielmaiņas produktus imūnās atbildes veicināšanai. No mikroorganismu izcelsmes imūnstimulātoriem plašāko pielietojumu ir atraduši šūnu apvalki vai to komponenti (zimoskābe, propermils, muramilpeptīdu preparāti, LPS). Praksē tiek lietotas arī nefrakcionētas nonāvētu mikroorganismu šūnu suspensijas (BCG, pirogenāls).

Klasiskās mikroorganismu celmu-producentu selekcijas metodes pēdējos 20 gados būtiski papildinājušas iespējas, kuras sniedz gēnu inženierija. Ar tās metodēm konstruēti daudzi jauni celmi, kuri spēj producēt imūnās atbildes veidošanos regulējošas molekulas: limfokīnus, interferonus u.c. Lai efektīvi izmantotu rekombinantus mikroorganismu celmus, neciešams kompleksi izziņāt gēnu aktivitātes regulācijas elementus, kuri ietver kā molekulāri ģenētiskos, tā arī fizioloģiskos faktorus.

Darba mērķis bija noskaidrot dažādu pieeju efektivitāti imūnmodulatorus sintezējošu mikroorganismu celmu iegūšanai, apzināt faktorus, kuri ietekmē produkcijas efektivitāti, un pētīt plazmīdās klonēto gēnu regulācijas mehānismu.

Mērķa sasniegšanai tika analizēti dažādi fizioloģiski aktīvu savienojumu mikrobioloģiskās ieguves aspekti, gan strādājot ar dabiskos imūnstimulatorus ražojošajām kultūrām, gan klonējot cilvēka imūno atbildi regulējošo proteīnu gēnus un pētīt rekombinantu gēnu ekspresijas regulēšanu.

Uzdevumi:

1. Izveidot iespējama dabiskā imūnstimulatora, fermenta adenilātdeamināzes (ADA), sintezējošus mikroorganismu celmus.
2. Izpētīt ADA īpašības, tās imūnstimulējošās iedarbības spektru un mehānismu, iegūtā preparāta pielietošanas perspektīvas.
3. Iegūt baktēriju celmus, kas plazmīdu vai vīrusu sastāvā replicē cilvēka imūnās sistēmas aktivitāti regulējošus gēnus.
4. Izpētīt faktorus, kuri noteic rekombinantās plazmīdas saturošo baktēriju celmu stabilitāti.
5. Noskaidrot DNS topoloģijas īpatnību lomu rekombinanto plazmīdu genoma funkciju regulēšanā.

III Galveno rezultātu kopsavilkums

Adenilātdezamināzi producējošo celmu iegūšana, fermenta un producenta īpašību izpēte.

Adenozīna atvasinājumus dezaminējošos fermentus producējošo mikroorganismu meklējumi tika uzsākti, lai veidotu enzīmoterapijas metodi ar adenozīndezamināzes deficītu saistītajam cilvēka kompleksajam iedzimtā imūndeficīta sindromam. Pārbaudot vairākus simtus dažādu sistemātisko grupu mikroorganismu klonus, kuri tika izolēti no augsnes uz sintētiskām barotnēm, kas kā vienīgo slāpekļa avotu saturēja adenozīnu, tika atrasts *Penicillium lanoso-viride* 8 celms. Šī celma klons 8D, augot uz vienkāršas kliju barotnes, producē 40 - 50 IU (starptautiskās fermenta aktivitātes vienības) nespecifiskās adenozīnaminohidrolāzes jeb adenilātdezamināzes (E.C. 3.5.4.6) uz gramu substrāta, tādējādi 3 - 5 reizes pārsniedzot patentu literatūrā iepriekš aprakstīto celmu aktivitāti. Celma īpašības aprakstītas PSRS autorapliecībā N^o. 782392, tas deponēts Vissavienības Antibiotiku zinātniskās pētniecības institūta Mikroorganismu kultūru kolekcijā. Uz PSRS autorapliecības pamata izsniegts Latvijas Republikas patents N^o. 5056. Ferments uzkrājas sēnes micēlijā noteiktā augšanas fāzē, sākot diferencēties konīdijsporas veidojošajām šūnām. Ar UV-mutaģenēzes palīdzību tika iegūts *Penicillium lanoso-viride* 8D atvasinājums 8B, kurš producē līdz 90 IU fermenta uz gramu substrāta, un kura nepigmentētās konīdijsporas ir praktiski netoksiskas laboratorijas dzīvniekiem. Šis celms aprakstīts PSRS autorapliecībā N^o. 14999919.

Penicillium lanoso-viride adenilātdezamināze (ADA) tika izdalīta no sēnes micēlija, un tika raksturotas tās īpašības (Ревелиня *et al.* 1981). Ferments ir glikoproteīns, kura natīvās formas molekulmasa ir apm. 210 - 230 kd, bet SDS-poliakrilamīda gēlā tas veido zonu, kura atbilst 58 kd masai. 22 - 25 % no fermenta masas veido polisaharīdi. Konīdiju veidojošo sēņu micēlijā tas ir vislielākajā koncentrācijā atrodamais glikoproteīns, tādēļ vairākās publikācijās tas tiek dēvēts par *P.lanoso-viride* glikoproteīnu A (GPA). Reakcijas ātruma samazināšanās kārtībā ferments dezaminē: AMP, ADP, ATP, adenozīnu, NAD, dATP, dezoksiadenozīnu, NADF un 2',3'AMP. $K_{M,AMP} = 7.4 \times 10^{-3}$ M. Optimālais pH ir 6.0 ± 0.3 , $t^o = 37^oC$, sāls koncentrācija - 0.04 - 0.10 M NaCl.

Tika izstrādātas ADA attīrīšanas metodes, izmantojot adsorbciju uz siluhroma, selektīvu precipitāciju ar polianjoniem, kā arī sorbcijas un jonu apmaiņas hromatogrāfijas kombināciju. Par šīm ADA attīrīšanas metodēm tika iegūtas PSRS autorapliecības Nr. 942429, Nr. 999598, Nr.1082011. Pēdējai atbilst LR patents Nr. 5059.

ADA stabilitāte attīrītu preparātu veidā, arī augstā īpatnējā aktivitātē imobilizētā *Penicillium* micēlijā dod iespēju izmantot fermentu inozīna un tā atvasinājumu iegūšanai (autorapliecība Nr. 764385), kuri var būt noderīgi gan farmakoloģijā (piem., riboksīns), gan kā garšas piedevas (piektā veida jeb “gaļas garša”) pārtikas ražošanā. Tika parādītas arī iespējas izmantot ADA fermentu elektroda izveidošanai, lai noteiktu adenoziņa atvasinājumu koncentrāciju bioloģiskajos šķidrumos.

Adenilātdezamināzes imūnstimulējošo īpašību izpēte

Attīrīti ADA preparāti (40 - 50 IU/ mg proteīna) izraisa kā humorālās, tā šūnu imūnās atbildes reakciju aktivēšanu *in vivo* un *in vitro* testos. Konstatēts, ka ferments stimulē ³H-timidīna ieslēgšanos limfocītos un limfocītu blasttransformāciju par 30 - 50 %, antivielas producējošo šūnu skaitu liesā par 20 - 140 %, liesas un audzēja šūnu adhēziju - 2 reizes (Николаева и Муйжниец 1985; Žak *et al.* 1986). Fermenta ievadīšana kavēja arī vairāku eksperimentālo audzēju attīstību. *In vitro* par 25 - 50% tika samazināta ¹⁴C-uracila ieslēgšanās nukleīnskābēs Ērliha ascīta un limfoleikomas L5178y šūnās (Николаева и Муйжниец, 1985), *in vivo* tika 1,5 - 3 reizes paildzināts dzīves laiks pelēm ar transplantētu limfoleikomu L5178y, būtiski samazināta pret ķīmioterapiju rezistentu metilholantrēninducēto fibrosarkomas šūnu līniju augšanas intensitāte (Žak *et al.* 1986, 1988). 1 - 3 IU ADA profilaktiska ievadīšana pelēm izraisa spilgti izteiktu aizsardzību pret salmonellu, pseidomonu un gripas A vīrusa infekcijām (Nikolajeva *et al.*, 1996). Eksperimentos, kur tika pētīta ADA imūnmodulējošā iedarbība *in vivo*, tika atrasts, ka pelēm optimālā fermenta doza ir 1 - 3 mg/kg ievadīšanas reizē.

Pētot ADA iedarbības mehānismu, tika konstatēts, ka imūnstimulējošās īpašības vienādā mērā piemīt kā natīvam fermentam, tā termiski denaturētam, enzimatisko aktivitāti zaudējušam glikoproteīnam. Pēc palielinātas, 25 IU/kg, ADA dozas parenterālas ievadīšanas pelēm novērojama apm. 12 stundas ilga neitrofilā

leikocitoze, kuras laikā stabiņkodolainie neitrofili sasniedz apm. 30 % no kopējā leikocītu skaita (Камрадзе *et al.*, 1989). Līdzīgas asins šūnu sastāva izmaiņas un akūtās fāzes reakcijai raksturīgu proteīnu (ceruloplazmīna, sēruma amiloīda proteīna priekšteča) parādīšanās asins serumā tika novērota arī eksperimentos ar žurkām, trušiem un aitām, pie tam, rēķinot uz dzīvnieka masu, bioloģiski efektīvā ADA doza strauji samazinās. ADA ievadīšana trušiem izraisa izteiktu pirogēno efektu, kas nav saistīts ar baktēriju LPS piesārņojumu, jo netiek samazināts pēc fermenta preparāta attīrīšanas ar "Detoksigela" (polimiksīna) hromatogrāfijas palīdzību. ADA bioloģiskās aktivitātes pētījumi imūnsupresētos dzīvniekos, un ADA spēja izraisīt noturīgu 5'-nukleotidāzes aktivitātes samazināšanos inducētos peritoneālos makrofāgos liecina, ka fermenta preparāta imūnstimulējošās darbības mehānisms vismaz daļēji ir saistīts ar makrofāgu aktivēšanu (Nikolajeva *et al.*, 1996). Imūnstimulējošo īpašību saglabāšanās pēc ADA termiskās apstrādes norāda uz to, ka par glikoproteīna bioloģisko aktivitāti, līdzīgi lektīniem, ir atbildīga tā polisaharīda daļa. Termodenaturēta ADA stabili un ilgstoši saglabā imūnstimulējošās īpašības. Termisko apstrādi var izmantot kā papildus etapu tieši imūnmodulācijai paredzētu preparātu iegūšanai (autorapliecība №. 1218679).

Plašāki ADA producējošo *Penicillium* celmu bioķīmisko īpašību pētījumi parādīja, ka tie sintezē arī daudzveidīgu hidrolītisko fermentu kompleksu - celulāzes, amilāzes, pektināzes, macerāzes. Pateicoties daudzveidīgajai fermentu aktivitātei, šie celmi labi aug uz dažādiem celulozi saturošiem lauksaimniecības atkritumproduktiem, no kuriem tādējādi ar mikrobioloģiskās transformācijas palīdzību var iegūt ar proteīnu un biostimulatoriem bagātinātas lopbarības piedevas (autorapliecība №. 1064500). *Penicillium* celmu celulolītisko un hidrolītisko fermentu kompleksu iespējams izmantot arī augu šūnu protoplastu iegūšanai.

Cilvēka gēnu bibliotēkas iegūšana un limfokīnu gēnu klonēšana

Izmantojot λ -Charon4A fāgu vektorsistēmu un fāgu *in vitro* reasociāciju, iegūta reprezentatīvas cilvēka leikocītu DNS genoma bibliotēkas, kurās ar molekulārās hibridizācijas metožu palīdzību tika atrasti vīrusu kloni, kas satur α -interferonu, interleikīna-2 un imunoglobulīnu smagās ķēdes konstantās daļas gēnus. Interferonu un

interleikīna-2 gēni tālāk pārklonēti plazmīdu vektoros un sekvenēta kā to kodējošā daļa, tā arī 5'-regulatorie rajoni (Янкевиц *et al.*, 1989).

Parādīts, ka, genoma bibliotēku amplificējot, λ -fāgu klonu struktūra un reprezentācija populācijā strauji mainās. Tādēļ, lai nezaudētu klonu pārstāvēniecību bibliotēkā, vēlams to saglabāt attīrītu *in vitro* agregācijas ekstraktu veidā. Strādājot pie liela skaita fāgu klonu DNS raksturošanas, bija nepieciešams izstrādāt ātru un vienkāršu metodi šīs DNS iegūšanai (skat. autorapliecību N^o. 1277748)

Pārklonējot plazmīdās intronus nesaturošos cilvēka α I-interferonu hromosomālos gēnus, tika iegūti *Escherichia coli* celmi, kuri ekspresē rekombinanto G un D interferonu.

Parādīts, ka baktērijās, kas satur cilvēka α I-G interferona gēnu nesošas plazmīdas, tiek sintezēts N-galā saīsināts interferona proteīns. Šajā gadījumā notiek translācijas iniciācija no interferona iekšgēna SD-analogas sekvences. Rekombinantā proteīna efektīvu sintēzi sekmē apm. 300 b.p. gara fragmenta delēcija no vektorplazmīdas struktūrā esošā *tet*-gēna rajona, kas atrodas 3' virzienā aiz INF- α I-G gēna kodējošās daļas. Pētījumi, izmantojot baktēriju *rnc*⁻ celmu mutantus, parādīja, ka šī biosintēzes aktivēšana nav saistīta ar retroregulācijai līdzīgām parādībām. Lai panāktu pilnvērtīga interferona proteīna sintēzi, ar virzītās mutaģenēzes palīdzību iegūti gēna varianti, kur likvidēts baktērijās izmantotais iekšgēna SD saits. Poliakrilamīda gela elektroforēzē parādīts, ka šāda gēna ekspresijas rezultātā baktērijas uzkrāj par saīsināto interferona variantu garāku proteīnu, kura identitāti un fizioloģisko aktivitāti paredzēts noskaidrot.

Rekombinanto plazmīdu replikācijas un struktūras stabilitātes izpēte

Pārklonējot genoma DNS fragmentus plazmīdu vektoros, novērojama ar heterologās DNS fragmentu īpašībām saistīta selektivitāte. Baktēriju šūnās netiek akceptēti DNS apgriezti atkārtējumi, kas samērā bieži atrodami genoma regulatorajos rajonos, stabilitāti strauji zaudē rekombinantos proteīnus aktīvi sintezējošie kloni, notiek klonējamās DNS struktūras izmaiņas, inserciju elementu integrācijas rezultātā.

Replikācijas un struktūras nestabilitāte ir viens no faktoriem, kas kavē vai reizēm pat padara neiespējamu ar gēnu inženierijas metodēm konstruēto plazmīdu un rekombinanto celmu praktisko izmantošanu.

Skaidrojot no plazmīdas replikona un saimniekšūnas genoma atkarīgos faktoros, kuri ir atbildīgi par klonēto gēnu ekspresijas efektivitāti, par modeļsistēmu izmantotas pBR grupas vektorplazmīdas, kas nes ampicilīna un tetraciklīna rezistences gēnus (*bla* un *tet*), kā arī pUC plazmīdās klonēts baktēriju α -galaktozidāzes gēns (*rafA*). Parādīts, ka rekombinanto molekulu replikācijas un struktūras stabilitāti kompleksi regulē no klonēto gēnu ekspresijas un saimniekšūnas rekombinācijas/replikācijas sistēmu darbības atkarīgie faktori. Viens no nozīmīgākajiem faktoriem, kas izraisa rekombinantu nestabilitāti, ir ar producējamā proteīna sintēzi saistītā papildus metaboliskā slodze vai arī šī proteīna īpašības, visbiežāk tendence integrēties membrānu sastāvā, kas var izraisīt saimniekšūnas dalīšanās traucējumus. Tā rezultātā novērojamas integrālas izmaiņas producējošo šūnu un koloniju morfoloģijā (Матюшкова и Муйжниец 1985). Vektorplazmīdu sastāvā šāds metaboliski toksiskais elements ir *tet* gēna proteīns. Bez tam plazmīdu gēni tiek vāji ekspresēti baktēriju kultūras augšanas cikla sākumā un logaritmiskās augšanas fāzes pirmajā pusē, kas populācijā sekmē bezplazmīdu šūnu segregāciju.

Baktēriju šūnas inaktivē nekontrolēti efektīvi ekspresējamus gēnus ar inserciju mutaģenēzes palīdzību. Sekvenētas IS1 elementa *in vivo* integrācijas vietas, kuras izraisa *tet*-gēna inaktivēšanu un plazmīdu replikācijas stabilitātes palielināšanos. 15 neatkarīgi iegūtos pBR322 IS1 atvasinājumos konstatēts, ka IS1 orientācijā I integrējas aiz 199. nukleotīda, bet orientācijā II - aiz 47. nukleotīda plazmīdas sekvencē. pBR327 struktūrā IS1 orientācijā I integrējas aiz 34. nukleotīda (5 neatkarīgi izolāti), bet orientācijā II - aiz 31. nukleotīda (3 neatkarīgi izolāti). pBR313 sastāvā 12 gadījumos atrasta IS1 integrācija tikai orientācijā I aiz 247. nukleotīda. Visiem pBR322 inserciju atvasinājumiem, salīdzinot ar sākotnējo plazmīdu, raksturīgs palielināts kopiju skaits, t.i. - paaugstināta RNAII promotera aktivitāte. *tet* gēna struktūra visās minētajās plazmīdās ir identiska. Tādēļ jāsecina, ka spilgti izteikto inserciju saita specifiskumu šajā gēnā dažādās plazmīdās nosaka nevis DNS sekvences elementi, bet gan citi, visdrīzāk ar replikona topoloģiju saistīti faktori. Gēnu ekspresijas efektivitāti un nelikumīgās rekombinācijas specifiskumu var ietekmēt attālas, replikona telpisko struktūru veidojošas nukleotīdu secības. piemēram, statistiski saliekti DNS segmenti. Konstruētas modeļplazmīdas, kuras dod iespēju pētīt replikona topoloģijas ietekmi uz gēnu ekspresiju un transkripciju.

No saimniekšūnas genotipa faktoriem, kuri nosaka rekombinanto plazmīdu replikācijas efektivitāti, pirmām kārtām ir minama *recA* atkarīgā rekombinācijas sistēma. *recA*⁺ celmos daudz efektīvāk nekā *recA*⁻ šūnās novērojama plazmīdu dimerizācija, kura strauji samazina to replikācijas stabilitāti. Izmantojot novērojumus par celma genotipa ietekmi un baktēriju kultūras augšanas fāzes nozīmi plazmīdu replikācijas efektivitātes nodrošināšanai, izstrādātas vienkāršas un efektīvas metodes plazmīdu DNS attīrīšanai (autorapliecība N^o. 1124033).

Plazmīdu gēnu ekspresijas regulācijas pētījumi

Rekombinanto plazmīdu replikācijas un struktūras stabilitātes pētījumi parādīja, ka klonēto gēnu efektīvai ekspresijai nepieciešams izmantot labi regulējamus baktēriju gēnu regulācijas elementus, promoterus, kuri varētu bloķēt kontrolējamo gēnu transkripciju normālos augšanas apstākļos, tādējādi saglabājot konstruētā klona stabilitāti. Kā šāda regulējama promotera modelis izvēlēts baktēriju *raf*-operona promoters *PrafA*.

Raksturotas DNS un transkripciju regulējošo proteīnu mijiedarbības *PrafA* sastāvā. Izstrādātas metodes RafR (represora) proteīna attīrīšanai un parādīts, ka šis proteīns saista divas operatora sekvenses abpus promotera -35 secības, tādējādi nodrošinot ļoti efektīvu gēna represijas līmeni (Aslanidis *et al.* 1990). Promtera aktīvā darbības forma ir dimērs, taču augstas lokālās koncentrācijas apstākļos, tas spēj veidot arī tetramērus kas norāda uz sarežģītu DNS-proteīnu telpisko kompleksu veidošanas iespējām (Jaenicke *et al.* 1990). Ar virzītās mutaģenēzes palīdzību selektīvi inaktivēti viens vai otrs *rafA* gēna operators, parādīta to loma gēna kontroles procesā, parādītas promotera iespējas citu, modeļģēnu ekspresijas regulēšanai (Muiznieks and Schmitt 1994).

Parādīts, ka gan CAP, gan RafR proteīni, piesaistoties pie savām mērķsekvencēm, saliec DNS apm. 90^o lenķī, taču liekšanas virzieni ir pretēji. RafR proteīns liec DNS "projām no sevis". DNS mutācijas, kas nemaina CAP afinitāti, bet kavē tā spēju saliekt DNS, apm. 3 reizes samazina CAP-atkarīgo promotera aktivācijas efektu. Parādīts, ka *PrafA* promoters satur papildus regulatoro elementu, kas sakrīt ar O₁ rajonu, bet kuram ir pat lielāka nozīme nekā -35 sekvencai promotera bazālās (CAP-nestimulētās) aktivitātes noteikšanai.

Parādīts, ka bez tiešām proteīnu-DNS mijiedarbībām promoteru aktivitāti būtiski ietekmē DNS topoloģijas īpatnības. Nelielas novirzes DNS topoloģijā, kuras izraisa citidīna atlikumu metilēšana promotera sekvencē, nemaina proteīnu saistīšanās efektivitāti, bet modificē kopējo transkripcijas kompleksa telpisko uzbūvi un samazina promotera aktivitāti (Muiznieks and Doerfler 1994, *NAR*). Molekulas telpiskās struktūras un proteīnu saistības spēju izmaiņas DNS modifikācijas rezultātā darbojas kooperatīvi, atkarībā no promotera struktūras un reportierģēna dabas regulējot transkripcijas efektivitāti (Muiznieks and Doerfler 1994 *FEBS*).

Tādējādi parādīts, ka līdztekus tiešām, nukleotīdu sekvences noteiktām, proteīnu un DNS mijiedarbībām gēnu ekspresiju ietekmē arī promotera un replikona telpiskā struktūra.

IV Secinājumi

Darba rezultāti parāda kā klasisko selekcijas metožu, tā arī gēnu inženierijas izmantošanas produktivitāti imūnās sistēmas atbildi veicinošu mikroorganismu celmu iegūšanā.

Ar selekcijas metodēm iegūtie celmi raksturojami ar relatīvi stabilu imūnmodulējošo savienojumu sintēzi, taču nepieciešams liels darbs, lai iegūtu adekvātu priekšstatu par šo savienojumu struktūru, darbības mehānismu un pielietošanas perspektīvām. Mūsu gadījumā no *Penicillium* iegūstamās ADA imūnstimulējošās iedarbības mehānisms izrādījās pavisam citāds nekā sākotnēji paredzētais. Tas ir saistīts ar fermenta glikoproteīna struktūru, nevis ar tā enzimatisko aktivitāti.

Ar gēnu inženierijas metodēm tiek klonēti lielākoties cilvēka imūno atbildi regulējošo proteīnu gēni, kuru produktiem ir relatīvi labi zināms iedarbības fizioloģiskais un molekulārais mehānisms. Šajā gadījumā jāsaskaras ar problēmām, kuras izraisa rekombinanto celmu nestabilitāte un gēnu ekspresijas efektivitātes regulēšana. Mūsu darbā tika parādīta kompleksa rekombinantā genoma un saimniekšūnas mijiedarbība, kā arī DNS topoloģisko īpatnību loma klonēto gēnu saglabāšanas un ekspresijas procesā.

1. No Latvijas augsnes izdalīti, selekcionēti un raksturoti *Penicillium* ģints mikroskopisko sēņu celmi, kuri uzkrāj glikoproteīnu kompleksu ar adenilātdezamināzes enzimatisko aktivitāti (ADA) un plaša spektra imūnstimulātoru īpašībām. Izpētīta producenta fizioloģija, izstrādātas ADA

attīrīšanas metodes, parādītas ADA lietošanas iespējas hipoksantīna atvasinājumu iegūšanai.

2. Parādīts, ka adenilātdeamināze ir plaša iedarbības spektra imūnmodulators, kas veicina imūnās atbildes humorālā un šūnu komponentu aktivitāti. Tās iedarbības mehānisms ir saistīts ar makrofāgu un akūtās fāzes reakciju stimulēšanu. Preparātu var efektīvi lietot baktēriju un vīrusu infekciju profilaksei. Izmantojot ADA producējošo celmu hidrolītisko fermentu kompleksa aktivitāti, izstrādātas metodes ar fizioloģiski aktīvām vielām bagātinātu lopbarības piedevu iegūšanai.
3. Iegūtas cilvēka gēnu bibliotēkas un klonēti imūno atbildi regulējošo proteīnu α -interferonu, interleikīna-2 un imunoglobulīnu konstantās daļas gēni, pētīta to kodējošās un regulējošās daļas struktūra.
4. Noskaidrots, ka rekombinanto plazmīdu replikācijas stabilitāti nosaka klonēto proteīnu izraisītā metaboliskā slodze, plazmīdu molekulu dimerizācija $recA^-$ baktēriju celmos, saimniekšūnu ģenētiskais fons un plazmīdu gēnu ekspresijas nesabalansētība ar baktēriju kultūras augšanas ciklu.
5. Klonēto gēnu struktūras nestabilitāti baktēriju šūnās izraisa inserciju mutaģenēze, kuras specifiskumu ietekmē replikona topoloģiskās īpatnības. Iegūta plaša replikāciju stabilizējošu vektorplazmīdu IS-atvasinājumu kolekcija un raksturots dažādu transpozonu insercijas specifiskums plazmīdu genomā. Parādīts, ka IS elementu struktūrā atrodamo statistiski lieko DNS segmentu novietojums plazmīdu genomā ietekmē plazmīdu replikācijas stabilizēšanas efektu.
6. Izmantojot baktēriju *raf*-operona un adenovīrusa E2A gēna promoterus, noskaidrotas DNS regulatoro elementu un proteīnu mijiedarbības likumsakarības, kā arī topoloģisko īpatnību loma promotera aktivitātes regulēšanā. Raksturotas represijas - aktivācijas mijiedarbības *rafA* promoterā un parādītas šī promotera potenciālās iespējas heterologu gēnu ekspresijas regulēšanai baktēriju šūnās.

P U B L I C Ē T O D A R B U
K O P A

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТРАНСФОРМАЦИЯ ПУРИНОВЫХ И
ПИРИМИДИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Межвузовский сборник научных трудов
Под общей ред. проф. Х.А.Маурини

БКК 28.4

В настоящем межвузовском сборнике научных трудов сообщены экспериментальные данные оригинальных исследований в области биохимии метаболизма нуклеиновых кислот и их гетероциклических компонентов у микроорганизмов. В сборник включены также работы, посвященные проблемам повышения эффективности микробиологического производства при синтезе биологически активных соединений с использованием отходов пищевой промышленности и сельского хозяйства. Несколько работ касаются проблем повышения эффективности научного эксперимента и разработки методов микробиологических и биохимических исследований.

Сборник предназначен для биохимиков, микробиологов и студентов старших курсов факультетов биологического профиля.

Печатается по решению редакционно-издательского совета
ЛГУ им. П. Стучки от 26 июня 1981 года.

21007-1981 35.81.0003000100
MS12(11)-81



Латвийский государственный
университет им. П. Стучки
1981

Ревелиня В.Р., Шафранский А.Б., Мушенико И.С.
ЛГУ им. П. Стучки

Аденилатдезаминаза *Penicillium lanoso-viride*.
Некоторые свойства фермента

Аденилатаминогидролазы (КФ.3.5.4.6), осуществляющие гидролитическое дезаминирование 5'-аденозинмонофосфата (АМФ), широко распространены в специализированных тканях позвоночных (1,2) и беспозвоночных (3,4). Аденилатдезаминазы или неспецифические аденозинаминогидролазы (КФ.3.5.4.4), дезаминирующие также АМФ, известны и у микроорганизмов *Desulfotribrio desulfuricans* (5), *Penicillium natrigens* (6), *Actinomyces antibioticus* (7), *Streptomyces aureofaciens* (8), *Saccharomyces cerevisiae* (9), *Microsporium audouinii* (10) и у ряда видов, принадлежащих к роду *Aspergillus* (11,12). В отличие от дезаминаз высших организмов, свойства которых изучены относительно подробно, из дезаминаз адениловых соединений микроорганизмов основательно охарактеризована только неспецифическая аденозиндезаминаза *A. stipitatus* (12,13,14,15).

В настоящей работе приводятся данные о некоторых физико-химических и кинетических свойствах аденилатдезаминазы *Penicillium lanoso-viride*.

Методика

В работе использовался в 1317 раз очищенный (16) препарат аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* с удельной активностью 790 единиц (17) на 1 мг белка. Определение дезаминазной активности проводилось по описанной методике (17).

Для определения молекулярного веса активной формы фермента проводили хроматографию на колонке (1,5 x 20 см) с СL-сефарозой 4В в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 6,0. Скорость элюирования - 10 мл/час. В качестве свиленелей использовали следующие белки - маркеры: тиреоглобулин - 663 тыс.Д, ферритин - 440 тыс.Д, каталазу - 323 тыс.Д и гемоглобин - 67 тыс.Д.

Для определения субстратной специфичности использовали субстраты производства "Геннал". При изучении кинетических свойств препарат аденилатдезаминазы инкубировали 1 мин, при 37°C в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 6,0, с добавлением различных количеств

АМФ (от 2,5 до 25,0 мкМ). Км определяли графическим методом в координатах обратных величин Лайнуверера-Берка (18). Для изучения механизма ферментативной реакции использовали графическое определение зависимости $1/v/v$ от $1/v$ (18).

Влияние на аденилатдезаминазную активность катионов в виде хлоридов определяли в 0,1 М калий-фосфатном буфере pH 6,0, действие фермента при различных значениях pH - с применением 0,1 М буферных растворов: калий-фосфатного (pH 5,0 - 8,0), цитратного (pH 3,0 - 6,5), трис - HCl (pH 7,0 - 9,0), боратного (pH 7,5-9,2).

Результаты и их обсуждение

Уже в процессе очистки были получены предварительные данные о высоком молекулярном весе фермента, т.к. активность обнаруживалась в самых ранних фракциях элюата с колонки с сефадексом Г-200 (16). Установленный методом колоночной хроматографии с применением СГ - сефарозы 4В молекулярный вес оказался равным 210 тыс.Д (рис.1), что сравнимо с молекулярным весом, определенным для аденозиндезаминазы *Aspergillus oryzae* в недиссоциированном состоянии - 217 тыс.Д (15).

Субстратную специфичность аденилатдезаминазы проверяли по отношению к 14 субстратам (табл.1).

Аденилатдезаминаза *P.lanosoviride* также как и другие известные аденозин - и аденилатдезаминазы грибов (II,14) активно дезаминирует адениловые нуклеотиды и аденозин, менее активно - их дезоксирибозопроизводные, НАД и НАДФ, но также как аденозиндезаминаза *A.oryzae* не дезаминирует аденин и полиадениловую кислоту (14). Дезаминирование аденозина происходит в 3 раза быстрее, чем дезаминирование дезоксиаденозина. Км для дезаминирования АМФ составляет $7,4 \cdot 10^{-3}$ М (рис.2). При концентрациях, превышающих 10 мкМ, наблюдается ингибирование избытком субстрата. Определенная нами Км примерно на порядок выше, чем у аденозиндезаминазы *A.oryzae* (13) и *Streptomyces aureofaciens* (8), и на два порядка выше, чем у *Microsporium audouinii* (II). Зависимость

$[s]/v$ от концентрации субстрата, позволяющая различать механизм, включающий образование тройного комплекса, от механизма с замещением фермента в двухсубстратных - двухпродуктных реакциях, как видно из рис.3, может свидетельствовать в пользу конкурентного характера ингибирования и, следовательно, подчинения реакции

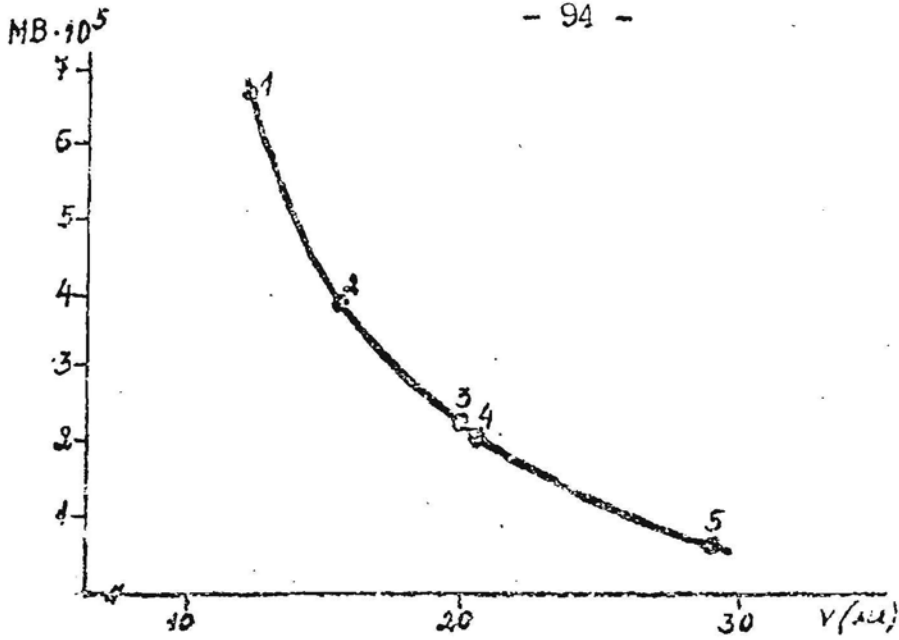


Рис.1. Определение молекулярного веса аденлатдезаминазы хроматографией на колонке с СМ-сефарозой 4В
1-тиреоглобулин; 2-ферритин; 3-каталаза; 4-аденлатдезаминаза; 5-гемоглобин

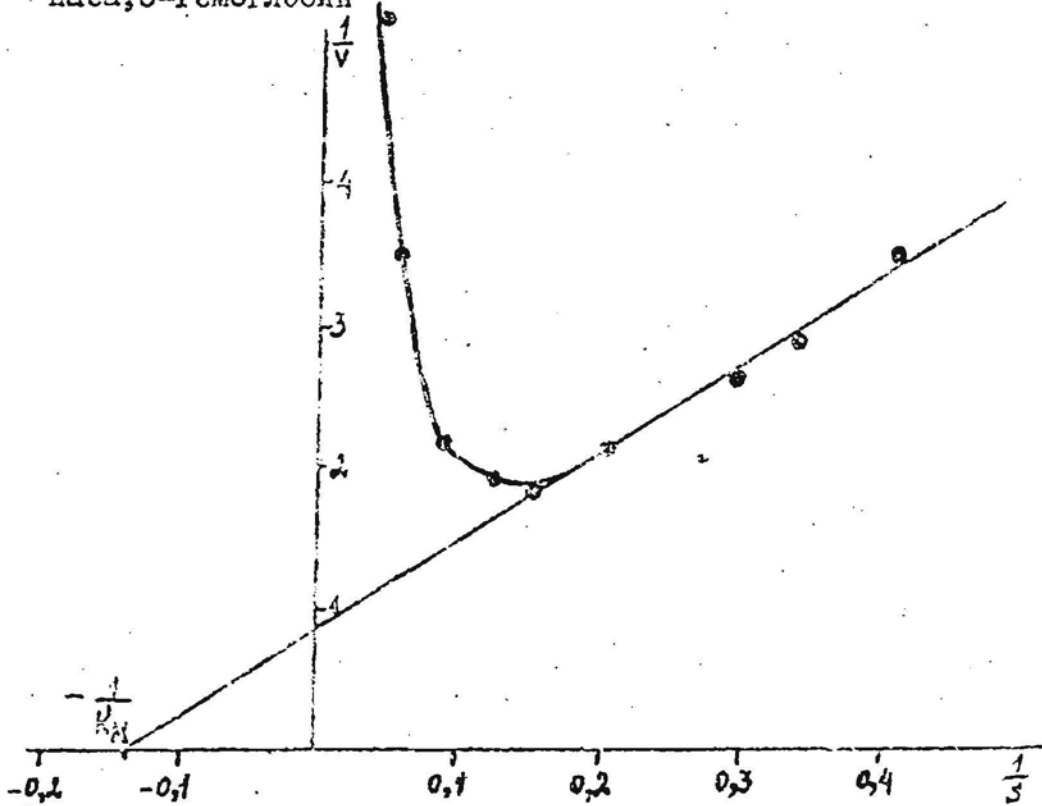


Рис.2. Определение константы Михаэлиса для аденлатдезаминазной реакции

Таблица I

Субстратная специфичность аденилатдезаминазы
P. lances-viride

Субстраты	Деаминазная активность	
	МЕ/мл	% [#]
АМФ	790	100
АДФ	751	95
АТФ	695	88
аденозин	656	83
НАД	395	50
дезоксид АМФ	211	27
дезоксаденозин	205	26
НАДФ	134	17
2',3'-цАМФ	111	14
НАДФ · Н ₂	0	0
Аденин	0	0
полиадениловая кислота	0	0
ГМФ	0	0
ЦМФ	0	0

[#] за 100% принята активность деаминарования АМФ.

деаминарования АМФ механизму с замещением фермента.

Аденилатдезаминаза *P. lances-viride* не требует присутствия анализуемых кофакторов. Это свойство отмечено и у других деаминаз (2). Ионы Li⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, K⁺ в концентрации 4 мМ не влияют на деаминазную активность фермента, однако ряд катионов, особенно Al³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, оказывает ингибирующее действие (табл.2). Ионы-активаторы не были найдены.

На рис.4 изображена зависимость активности аденилатдезаминазы от концентрации NaCl в реакционной смеси, видно, что отклонение молярности от оптимальной - 0,04 - 0,10 М NaCl вызывает снижение активности фермента.

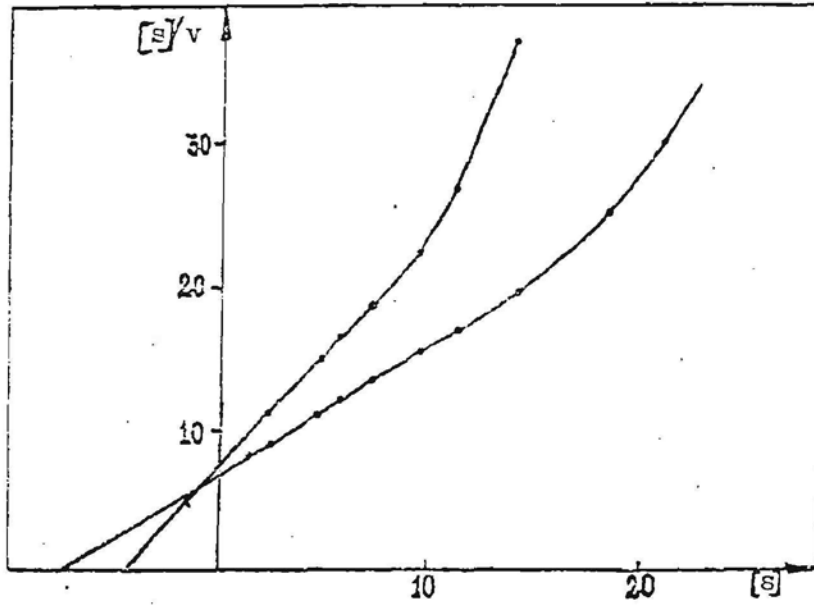


Рис.3. Первичные зависимости $[s]/v$ от концентрации АМФ

АМФ-дезаминазная
активность
(МЕ/МЛ)

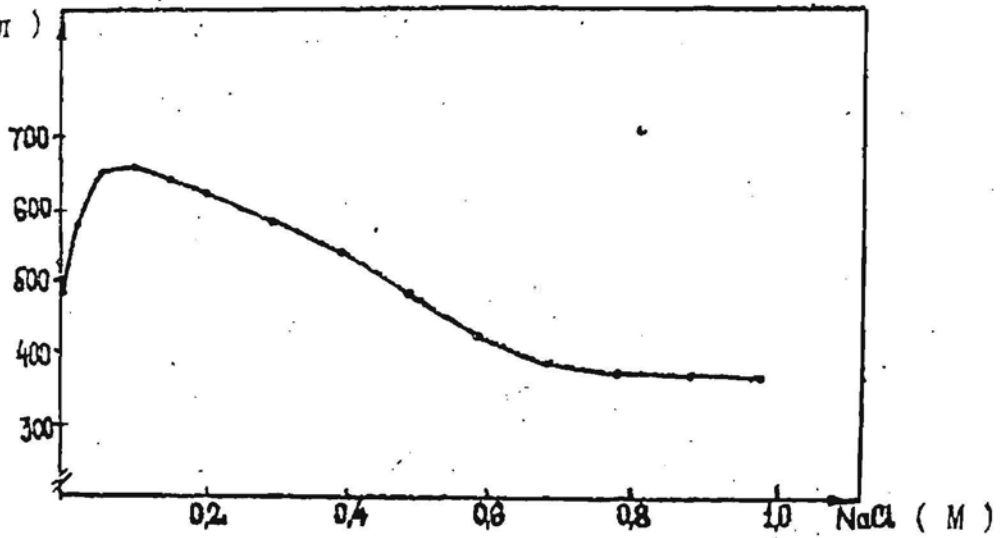


Рис.4. Зависимость активности аденилатдезаминазы *P. lainoso-viride* от концентрации NaCl

Таблица 2

Влияние катионов на активность аденилатдезаминазы
P. lanoso-viride

Катионы (4ммМ)	Аденилатдезаминазная активность	
	МЕ/мг	В % *
-	780	100
Li ⁺	780	100
Ba ²⁺	780	100
Ca ²⁺	780	100
K ⁺	780	100
Na ⁺	741	95
Cr ³⁺	710	91
Mg ²⁺	702	90
Ni ²⁺	664	88
NH ₄ ⁺	644	80
Mn ²⁺	608	78
Co ²⁺	608	78
Fe ²⁺	481	63
Zn ²⁺	296	38
Cu	296	38
Al ³⁺	101	13

* за 100% принята активность в 0,1 М калий-фосфатном буфере, рН 6,0.

Все известные дезаминазы производных аденина имеют оптимум активности при физиологически нормальных значениях рН, близких к нейтральным - обычно в пределах от 5,0 до 7,5 (2), за исключением АДФ - дезаминаз грибов рода *Aspergillus*, имеющих оптимум рН около 3,4 (II). Дезаминаза *P. lanoso-viride* сохраняет активность в интервале рН 3-9, а максимальную активность проявляет при рН 6,0 ± 0,3 (рис.5).

Работу с аденилатдезаминазой *P. lanoso-viride* облегчает её относительная стабильность при пониженной температуре (табл.3). Значительная инактивация наступает при выдерживании фермента при температуре 40°C и выше. Температурный оптимум каталитического действия фермента равен 37° ± 3°C (рис.6), что близко к оптималь-

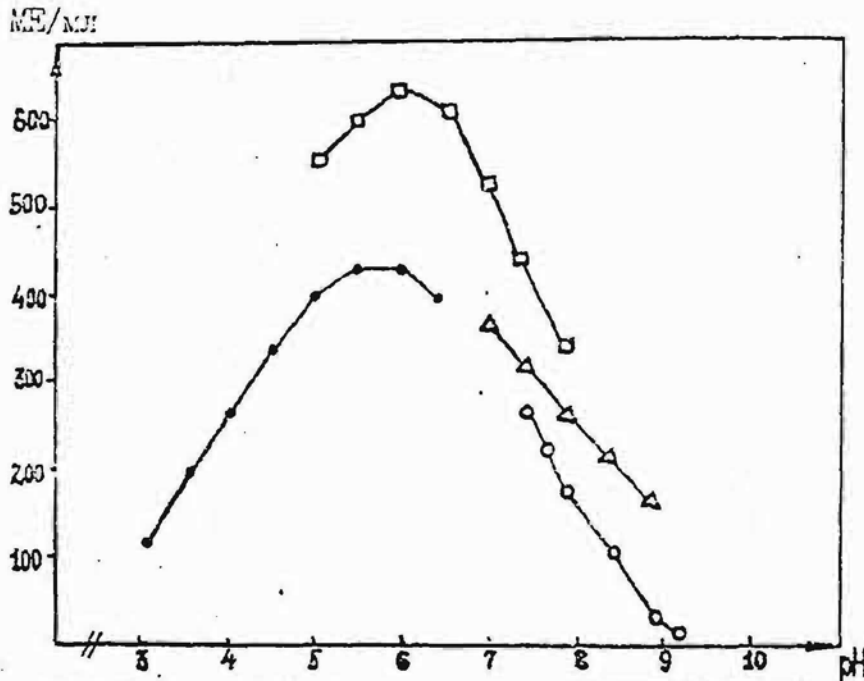


Рис. 5. Влияние pH на активность аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride*

- — калий-фосфатный буфер
- — цитратный буфер
- △ — трис-HCl буфер
- ◇ — боратный буфер

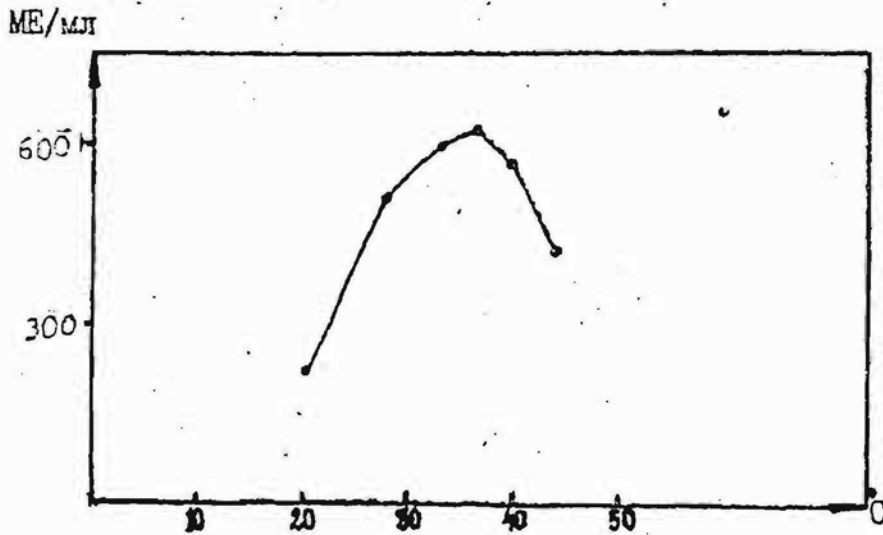


Рис. 6. Влияние температуры инкубационной смеси на активность аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride*

ным температурам дезаминаз других грибов (12,19).

Таблица 3

Термостабильность аденилатдезаминазы
F.lanoso-viride при pH 6,0

Температура, °C	Время выдержи- вания	Аденилатдезаминазная активность	
		МЕ / мл	% *
+ 2	7 дней	790	100
	2 месяца	727	92
+18	2 дня	727	92
	6 дней	16	2
+40	30 мин.	727	92
	60 мин.	55	7
+60	5 мин.	24	3
	10 мин.	0	0

* за 100% принята активность сразу после выделения и очистки.

Выводы

Аденилатдезаминаза *F.lanoso-viride* (КФ.3.5.4.6) дезаминарует в убывающей скорости реакции 5' - АМФ, 5'-АДФ, 5'-АТФ, аденозин, НАД, дезокси АМФ, дезоксиаденозин, НАДФ и 2',3'-цАМФ. Km для 5'-АМФ равняется $7,4 \cdot 10^{-3}$ М. Молекулярный вес фермента - 210 тыс.Д. Ингибиторами активности аденилатдезаминазы являются Al^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} . Максимальная активность проявляется в калий-фосфатном буфере при pH $6,0 \pm 0,3$, температуре 37°C и концентрации $NaCl$ 0,04 - 0,10 М. Фермент не требует присутствия диализуемых кофакторов.

Литература

1. Анохин И.И. - Биол.ж.Арм., 1977, 30, 49.
2. Zielke C.L., Suelter C.H. - In: The Enzymes, v.4. London-N.Y., 1971, 47.
3. Fujiwara T., Spencer B. - Biochem. J., 1962, 85, 127.
4. Gibbs K.L., Bishop S.H. - Biochem. J., 1977, 163, 511.
5. Yates M.G. - Biochem. Biophys. Acta, 1969, 171, 299.
6. Hiven D.F., Collins P.A., Knowles C.J. - J. Gen. Microbiol., 1977, 100, 5
7. Мансимова Л.С., Дедов С.С., Рубцова Т.Т. - Вopr. мед. хим., 1971, 20, 66.
8. Rosinova M., Zelinova E., Zelinka J. - Collect. Czech. Chem. Commun., 1978, 43, 2324.
9. Yoshino M., Murakami K., Tsushima K. - Biochim. Biophys. Acta, 1979, 1, 157.
10. Chung S.T., Aida K. - J. Biochem., 1967, 61, 1.
11. Chung S.T., Aida K., Nemura T. - J. Gen. Appl. Microbiol., 1967, 13, 335.
12. Mitchell H.K., McElroy W.D. - Anal. Biochem., 1946, 10, 251.
13. Mihato S., Tagowa T., Miyaki M., Shimizu B., Nakanishi K. - J. Biochem., 1966, 59, 265.
14. Wolfender R., Sharpless T.K., Allan R. - J. Biol. Chem., 1967, 242, 977.
15. Wolfender R., Tomozawa Y., Vamman B. - Biochemistry, 1968, 7, 3965.
16. Лафранский А.Б. В наст. сборнике. - Р., 1981.
17. Ревелиня Б.Р. В наст. сборнике. - Р., 1981.
18. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. - М., 1979.
19. Chung S.T., Hamane M., Aida K., Uemura T. - Agr. Biol. Chem., 1968, 32, 1278.

Нуклеазы. Биологическая роль и практическое использование: Сб. науч. тр. / Редкол.: Бердышев Г. Д., Хурсин Н. Е. (отв. ред.) и др.— Киев: Наук. думка, 1985.— 112 с.

Рассмотрены актуальные проблемы учения о нуклеазах, их роль в генетических процессах, практическое использование в медицине, микробиологической промышленности и сельском хозяйстве. Излагаются результаты экспериментальных исследований, молекулярных механизмов действия нуклеаз, их влияние на вирусы насекомых, животных и человека, изменение их активности при канцерогенезе с использованием в диагностике. Отдельные статьи посвящены методам получения нуклеаз, их модификации, иммобилизации и выделению в чистом виде.

Для биологов, медицинских работников, генетиков, биохимиков, преподавателей и студентов соответствующих специальностей.

Библиогр. в конце статей.

Редакционная коллегия

Г. Д. Бердышев, Н. Е. Хурсин (ответственные редакторы), И. Д. Батракча (ответственный секретарь), Н. Е. Кучеренко, И. Б. Лецинская, И. И. Ляшко, Н. И. Савченко, А. А. Созинов, С. Н. Храпунов, А. А. Янулайтис

Рецензенты

В. А. Барабой, В. Л. Зима

Редакция физиологической, биохимической и медицинской литературы

И 2001040000-027
М221(04)-85 294-55

© Издательство «Наукова думка», 1985

УДК 615.771.7 + 577.150.2

В. Р. ШКОЛАЕВА, И. О. МУШКНПЕКС

Латвийский государственный университет, Рига

**ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ И ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕЕ
ДЕЙСТВИЕ АДЕНИЛАТДЕЗАМИНАЗЫ
PENICILLIUM LANOSO-VIRIDE**

За последнее десятилетие установлено, что дезаминазы производных аденина участвуют в регуляции различных физиологических процессов у высших организмов — в обеспечении мышечного сокращения, кровообращения, нейротрансмиссии, липолиза и им-

мунного ответа. Изменение уровня активности аденозин-, АМФ-, АДФ-дезаминаз характеризует процессы опухолевого роста.

Показано влияние экзогенных аденозиндезаминаз животного происхождения на нейротравмиссию [1] и липолиз [2]. Установлено лечебное действие введения больным с тяжелой комплексной иммунонедостаточностью эритроцитов, содержащих аденозиндезаминазу [3]. Однако нами не были найдены никакие сведения о биологической активности деаминаз, продуцируемых микроорганизмами в тканях и клетках высших организмов. Предыдущие опыты показали, что проявление активности аденилатдезаминазы *Penicillium lanoso-viride* связано с развитием продуцента [4]. Мы предприняли попытки выяснить, влияет ли этот фермент и на процессы развития клеток человека и

Таблица 1. Стимуляция человеческих лимфоцитов митогенами

Вариант опыта	Включение ³ H-тимидина (нмг./мин) в клетки культур лейкоцитов
Контроль	3579,1 ± 604,1
ФГА	4737,2 ± 267,3
ФГА, аденозин	4794,4 ± 426,8
ФГА, аденозин, аденилатдезаминаза	4138,4 ± 382,5
ФГА, аденилатдезаминаза	5291,9 ± 866,0
Аденилатдезаминаза	5450,1 ± 881,6

экспериментальных животных. В качестве модели были выбраны бласттрансформация лимфоцитов и рост клеток асцитных опухолей.

Материал и методика. В работе использовали очищенную [5] аденилатдезаминазу с удельной активностью 20,5 МЕ на 1 мг белка. Препарат содержал 22 % углеводов.

Стимуляцию человеческих лимфоцитов определяли: 1) по включению ³H-тимидина (0,2 мкКи/2 · 10⁵ клеток; 10 мКи/мМ) в кислотонерастворимую фракцию клеток 48—72-часовых культур лейкоцитов [6]; 2) по данным морфологического учета бласттрансформации [7].

Влияние аденилатдезаминазы на синтез нуклеиновых кислот определяли *in vitro* по включению ¹⁴C-урацила (0,04 мкКи/мл инкубационной смеси; 40 мКи/мМ) в кислотонерастворимую фракцию клеток асцитных лимфолейкозов L5178Y, L1210, P388 и карциномы Эрлиха. Опыты *in vivo* проводили с самцами мышей BDF-1 с лимфолейкозом L5178Y. На 3-й по 7-й день после прививки асцитных клеток мышам внутрибрюшинно вводили по 50, 100, 200 и 300 МЕ аденилатдезаминазы на 1 кг массы животных. О действии фермента судили по времени жизни мышей с опухолями по сравнению с контролем. В качестве стандарта применяли препарат L-аспарагиназы (Рижский завод медпрепаратов ЦОС АН ЛатвССР).

Экспериментальная часть и обсуждение. Результаты, обобщенные в табл. 1, показывают, что аденилатдезаминаза *P. lanoso-viride* стимулирует лимфоциты практически здоровых людей. При добавлении 30 мкг/мл митогена фитогемагглютинина (ФГА) включение ³H-тимидина в клетки крови повышается на 32 %, при до-

бавлении 1.7 МЕ аденилатдезаминазы на 1 мл — на 52 %. Влияние аденозина в 0.1 мМ концентрации в присутствии ФГА является незначительным.

Методом морфологического учета результатов определили оптимальную дозу аденилатдезаминазы для достижения максимальной бласттрансформации лимфоцитов. Как показано на рис. 1, при добавлении 2.2 МЕ аденилатдезаминазы на 1 мл культуры стиму-

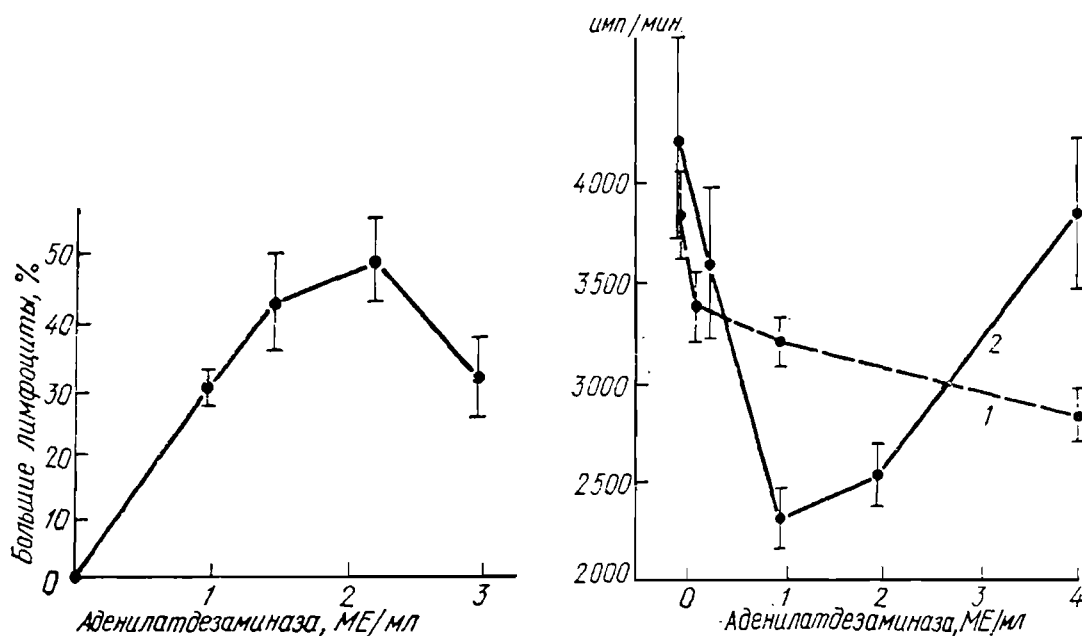


Рис. 1. Стимуляция лимфоцитов разными дозами аденилатдезаминазы.

Рис. 2. Включение ¹⁴С-урацила в асцитные клетки в зависимости от количества добавленной аденилатдезаминазы:

1 — культура клеток асцита Эрлиха; 2 — культура клеток лимфолейкоза L5178Y.

лированные бластклетки составляют примерно половину всех лимфоцитов. При повышении дозы фермента до 3,0 МЕ/мл эффект стимуляции несколько снижается.

Как видно из рис. 2, аденилатдезаминаза снижает уровень синтеза нуклеиновых кислот в клетках карциномы Эрлиха и лимфолейкоза L5178Y. Существенное снижение включения ¹⁴С-урацила по сравнению с контролем в клетки асцита Эрлиха наблюдается при 0.5 и 2,0 МЕ фермента/мл (при 0.05), а в клетки лимфолейкоза — при 0.5 и 1,0 МЕ/мл. В аналогичных опытах с клетками лимфоидного лейкоза L1210 и лимфоцитарного лейкоза P388 не были обнаружены существенные отличия в уровне синтеза нуклеиновых кислот при добавлении 0,1—2,0 МЕ фермента на 1 мл.

Опыты *in vivo* показывают (табл. 2), что относительно невысокие дозы (50 МЕ/кг) аденилатдезаминазы увеличивают среднюю продолжительность жизни мышей на 58,2 %, что составляет 55,7 % эффективности L-аспарагиназы в дозе 100 МЕ/кг. Более высокие дозы аденилатдезаминазы сокращают жизнь животных опытной

Таблица 2. Противоопухолевое действие аденилатдезаминазы в отношении лимфолейкоза L5178Y

Вариант опыта	Доза, МЕ/кг	Средняя продолжительность жизни животных, сутки	Продолжительность жизни животных опытных групп, % к контролю	Эффективность аденилатдезаминазы, % эффективности L-аспарагиназы 100 МЕ/кг
Аденилатдезаминаза	50	24,2	158,2	55,7
	100	15,5	101,3	1,2
	200	13,7	89,5	—
	300 *	7,3	47,7	—
L-аспарагиназа	50	29,8	194,8	
	100	31,3	204,5	
	200	25,8	168,6	
Контроль		15,3		

* Одноразовое введение.

группы. Но одноразовое введение аденилатдезаминазы не вызывает гибели интактных мышей даже при введении 1000—2000 МЕ/кг массы животного.

1. Michaelis M. L., Michaelis E. K., Myers S. L. Adenosine modulation of synaptosomal dopamine release.— *Life Sci.*, 1979, 24, N 22, p. 2083.
2. Fain J. N., Wieser P. B. Effects of adenosine deaminase on cyclic adenosine monophosphate accumulation, lipolysis and glucose metabolism of fat cells.— *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, N 3, p. 1027.
3. Enzyme replacement therapy for adenosine deaminase deficiency and severe combined immunodeficiency disease / S. H. Poimar, R. C. Stern, A. L. Schwartz et al.— *New Eng. J. Med.*, 1976, 295, N 24, p. 1337.
4. Ревелиня В. Р. Аденилатдезаминаза *Penicillium lanoso-viride*. Изменение активности в процессе роста и в зависимости от условий культивирования.— В кн.: Использование и трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами. Рига: Изд-во Латв. ун-та, 1981, с. 74.
5. Шафранский А. Б. Аденилатдезаминаза *Penicillium lanoso-viride*. Выделение и очистка фермента.— Там же, с. 86.
6. Waithe W. I., Hirschhorn K. The lymphocyte response to activators.— In: Handbook of experimental immunology. New York; London: Acad. press, 1973, vol. 2, ch. 25.
7. Голубева Н. Н. Метод определения лимфоцитстимулирующей активности фитогемагглютиниана.— В кн.: Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977, с. 257.

Новое в лабораториях ученых

УДК 575.2:576.851.48.094

Н. А. Матюшкова, И. О. Муйжнискс

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ВЫРАЖЕНИЕ ПЛАЗМИДНОГО МАРКЕРА ТЕТРАЦИКЛИНУСТОЙЧИВОСТИ

Рекомбинантные плазмиды, содержащие оперон тетрациклинустойчивости (Tc-оперон), широко используются в работах по генной инженерии в качестве векторных молекул.

Внедрение чужеродного генетического материала в Tc-оперон приводит к нарушению его структурной целостности и функциональной активности. В результате клетки, содержащие такие видоизмененные плазмиды, теряют маркер тетрациклинустойчивости.

В генетических и генно-инженерных работах тетрациклин (Tc)-чувствительные клетки из общей популяции плазмидосодержащих бактерий до сих пор выявлялись путем анализа клонов на средах с соответствующими антибиотиками.

Для повышения эффективности клонирования предложено несколько способов обогащения популяции Tc-чувствительными клетками. В *in vitro* можно предотвратить рециркуляцию векторной ДНК, обрабатывая ее фосфотазой перед лигированием [1]. Обработка цикloserином (100 мкг/мл) смешанной популяции бактерий, выращиваемой на среде с бактериостатическими концентрациями тетрациклина, приводит к преимущественной гибели делящихся, устойчивых клеток [2, 3]. Для обогащения популяции Tc^S-клетками возможно использование повышенной чувствительности Tc-устойчивых клеток к фусариевой кислоте [4] и фагу λ [5], а также повышенной устойчивости к кадмию [6].

Общим недостатком этих методов является отсутствие возможностей точной оценки Tc-чувствительных клеток в популяции бактерий до обработки селективирующими агентами, так как они частично воздействуют и на неделящиеся клетки. Если с такой неточностью можно справиться в генно-инженерном эксперименте, то она совершенно недопустима при изучении стабильности Tc-оперона в составе различных плазмид.

Аналогичная задача быстрого обнаружения ампициллин (Ap)-чувствительных клонов среди Ap-резистентных решена с помощью простых *in situ* колориметрических тестов активности фермента β-лактамазы, который обеспечивает расщепление антибиотика [8, 9].

В основе механизма устойчивости бактерий к тетрациклину лежит не модификация структуры антибиотика, а сложный процесс изменения его транспорта через клеточную мембрану [10]. Tc-оперон плазмид pMB9 и серии pBR кодирует синтез одного белка, который встраивается в клеточную мембрану [11]. Прямые биохимические методы выявления активности этого белка в литературе не описаны.

Цель настоящей работы — выяснить, не интегрируются ли молекулярные изменения состава мембран и перестройки в метаболизме Tc-устойчивых клеток в каком-нибудь легко детектируемом морфологическом признаке образуемых ими колоний.

Полученные результаты показывают, что тетрациклинустойчивость клеток, определяемая рекомбинантными плазмидами серии рВR, морфологически проявляется увеличением светопроницаемости колоний различных штаммов *E. coli*.

В работе использовали следующие штаммы *E. coli* К-12: НВ101 (гес А); RR1- гес А⁺ производное НВ101; НВ129 (гес А⁺), полученные из коллекции штаммов Э. М. Ледерберг (PRC, США) и IC5183 (гес BC sbc А) — из коллекции штаммов Института органического синтеза АН ЛатвССР. Плазмиды серии рВR: рВR313 и рВR322, несущие маркеры устойчивости к Тс и Аp (Тс^RАp^R), рВR325, несущая дополнительный маркер устойчивости к хлорамфениколу (Аp^RТсСm^R), получены от Э. М. Ледерберг. рВR313-6 (рВR313::IS1), производная рВR313, потерявшая маркер устойчивости к Тс в результате встраивания IS-1 элемента в промоторную область тетрациклинового оперона, была получена в нашей лаборатории. Плазмиды были введены в бактериальные клетки путем трансформации [12].

Субклоновую культуру бактерий выращивали в жидкой среде LB (13), содержащей для плазмидных штаммов 25 мкг/мл тетрациклина («Сигма»), на лабораторном встряхивателе (240 об/мин) при 37°C. В середине логарифмической фазы роста бактериальную культуру в соответствующих разведениях, для получения отдельных колоний, высевали на агаризованные среды LB, М9 [13] и питательный агар Дагестанского НИИ питательных сред (ПА). После 24—35-часового роста при 37°C сравнивалась морфология колоний плазмидных и бесплазмидных штаммов в боковом освещении, используя осветитель ОС-19, и в проходящем свете на приборе для счета колоний бактерий (поверхность агара с колониями бактерий была обращена к наблюдателю).

При боковом освещении, которое иногда рекомендуется для изучения морфологии колоний [14], нам не удалось выявить морфологических различий между клонами плазмидных и бесплазмидных штаммов.

При изучении клонов в проходящем свете было обнаружено, что на среде LB плазмидные клоны бактерий более светопроницаемы и выглядят светлее, чем бесплазмидные. На рис. 1 изображена характерная картина различий светопроницаемости плазмидных и бесплазмидных колоний на агаризованной LB при использовании в качестве примера штаммов RR1 и RR1-рВR313.

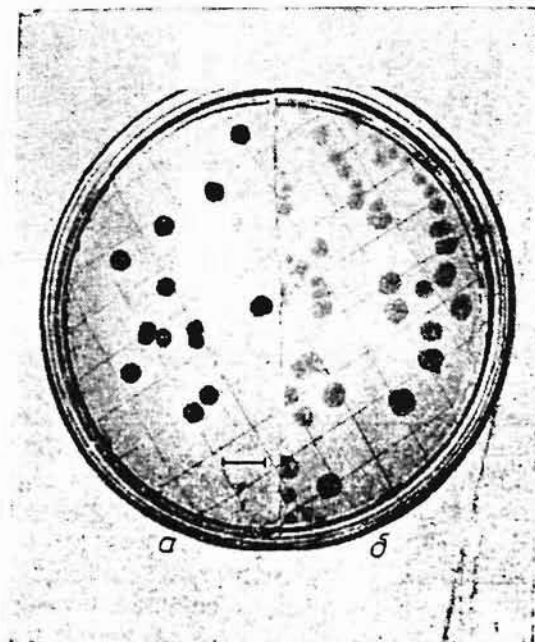


Рис. 1. Светопроницаемость клонов штаммов RR1 и RR1-рВR313. Штаммы выращивались на отдельных чашках Петри на LB-агаре толщиной 1,5 мм. Для удобства сравнения половина диска среды с колониями штамма RR1 (а) и половина — с колониями штамма RR1-рВR313 (б) помещены на одну чашку Петри. Фотография сделана на пленке «Микрат 300» через оранжевый фильтр. Масштабная линия соответствует 1 см

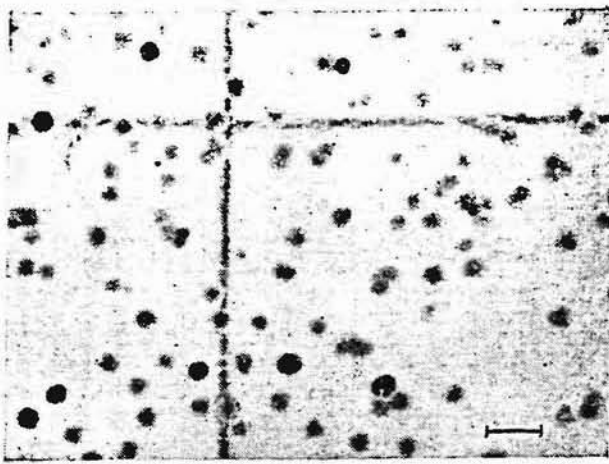


Рис. 2. Морфологическая гетерогенность штамма по светопрозрачности колоний: а — прозрачные и б — непрозрачные колонии. Масштабная линия соответствует 0,15 см

На средах М9 и ПА таких различий в светопрозрачности плазмидных, Тс-резистентность экспрессирующих, и бесплазмидных клонов выявить не удалось. При разведении среды LB физиологическим раствором в соотношениях 3:1, 1:1 и 1:3 выраженность морфологических различий между плазмидными и бесплазмидными клонами снижалась.

Наибольшие различия в светопрозрачности наблюдались после выращивания клонов на тонком (1,5—2,0 мм) слое агаризованной среды LB, подсушенном в течение 30 мин при 42°C перед высевом бактериальной суспензии. Увеличение светопрозрачности было отмечено у клонов всех изученных штаммов *E. coli*, содержащих плазмиды с функционально активным Тс-опероном.

Клоны штамма RR1-pBR313-6, содержащие плазмиду с инактивированным Тс-опероном, не отличались от бесплазмидных клонов штамма RR1. Таким образом, признак увеличенной светопрозрачности колоний не просто связан с наличием плазмид в бактериальных клетках, а обусловлен экспрессией их Тс-оперона. Не исключено, что изменения структуры колоний у плазмидных Тс-устойчивых клонов в конечном счете отражают те модификации, которые произошли в клеточной мембране при встройке в нее специфических белков, кодируемых Тс-опероном. Применимость метода измененной светопрозрачности для обнаружения Тс-чувствительности клеток в плазмидной популяции была проверена в опытах количественной характеристики процесса элиминации плазмид в селективных условиях [7]. Субклонированные в жидкой среде с тетрациклином плазмидные клоны различных штаммов высеивались в определенных разведениях на LB-агаре без антибиотиков. Большинство выросших колоний было прозрачными в проходящем свете. Однако наряду с ними легко обнаруживалось некоторое число темных клонов, количество которых варьировало в зависимости от изучаемого штамма бактерий и плазмиды (рис. 2).

Было проанализировано по меньшей мере 200 прозрачных клонов каждого из плазмидных штаммов и показано, что все они имеют $Ar^R Tc^R$ фенотип. Результаты анализа непрозрачных клонов представлены в табл. 1.

В большинстве случаев для всех исследованных штаммов непрозрачные колонии состоят из $Ar^S Tc^S$ клеток. В некоторых случаях непрозрачные колонии при последующем их анализе на селективных средах показывали $Ar^R Tc^R$ фенотип. Можно предположить, что последние содержали нестабильные инсерции, инактивирующие Тс-оперон и приводящие к изменению морфологии колоний подобно плазмиде pBR313-6. В результате сегрегации инсерции при последующем пересеве восстанавливался фенотип Тс-устойчивости. Наличие таких быстро сегрегирующих инсерций в составе плазмид серии pBR было показано нами и при изучении их стабильности в неселективных условиях [15].

Таблица 1

АНАЛИЗ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ НЕПРОЗРАЧНЫХ КОЛОНИЙ РАЗЛИЧНЫХ ПЛАЗМИДНЫХ ШТАММОВ

Плазмиды	Штамм	Количество колоний		
		Всего	Ap ^R Tc ^R	Ap ^S Tc ^S
pBR313	RRI	55	4	51
	RRI'	5	3	2
	HB129	12	2	10
pBR322	RRI'	3	1	2
	IC5183	6	0	6
pBR325	RRI'	28	11	17
	HB129	8	4	4
	HB101	17	0	17

В некоторых случаях размер темных клонов был меньше размера прозрачных (рис. 2). Следовательно, утрата экспрессии маркера тетрациклиноустойчивости не в обязательном порядке дает преимущества в скорости роста клеток, и один лишь сравнительный размер колоний в случае плазмид серии pBR не может быть использован в качестве морфологического критерия экспрессии маркера антибиотикоустойчивости.

Утрата плазмид отдельными клетками при образовании клонов на плотной среде приводит к морфологическим изменениям внутри колоний. На среде LB наряду с прозрачными и непрозрачными колониями были выявлены секторные колонии, а после хранения чашек в течение 3—5 суток при 20°C вторичные колонии — «бородавки». Результаты анализа антибиотикоустойчивости клеток, взятых бактериологической иглой из различных районов таких колоний, приведены в табл. 2.

В непрозрачных темных секторах и «бородавках» можно отметить значительное обогащение колоний Tc-чувствительными клетками, что, очевидно, и является причиной возникновения характерных морфологических структур и отражает процесс элиминации плазмид из клеток потомства бактерии, первоначально содержащей эту экстрахромосомальную ДНК.

В научной литературе описаны некоторые наблюдения влияния плазмидного генома на морфологию бактериальных колоний. Так, утрата плазмиды с мол. весом 2 Md приводит к изменению светопрозрачности от прозрачной к дымчатой у колоний патогенного штамма *Mycobacterium intracellulare* 16. Одновременно теряется вирулентность и устойчивость штамма к целому ряду антибиотиков. Предполагается, что плазмидный геном кодировал какой-то мембранный белок, участвующий в образовании антигенных детерминант и регулирующий проницаемость клеток. Недавно в Аргентине выделили исключительно активно растущий штамм *E. coli* RC424 с природной R-плазмидой, обуславливающей устойчивость клеток к 500 мкг/мл тетрациклина [17]. Элиминация этой плазмиды приводит к 10-кратному увеличению размеров клеток.

Таблица 2

ИЗУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК, СОДЕРЖАЩИХСЯ В СЕКТОРАХ И ВТОРИЧНЫХ КОЛОНИЯХ

Анализ клонов	Количество клонов на среде		
	неселективной	-Tc	-Ap
Прозрачная колония (контроль)	472	403	500
Сектор	1112	263	541
Вторичная колония	984	112	89

4-кратному увеличению диаметра колоний и к изменению их морфологии от гладкой к шероховатой. Данные о характерных изменениях морфологии бактериальных колоний в результате экспрессии эукариотического гена, кодирующего мембранно-связанный белок, получены в Институте органического синтеза АН ЛатвССР [18].

Наши данные впервые выявляют тесную взаимосвязь между функциональной активностью Тс-оперона рекомбинантных плазмид серии рВR и морфологической характеристикой светопрозрачности колоний ряда штаммов *E. coli* на агаризованной среде LB. Этот легко детектируемый признак колоний может быть использован для:

- 1) учета бесплазмидных клеток в популяции плазмидного штамма;
- 2) выделения клонов, несущих рекомбинантные плазмиды с инактивированным Тс-опероном;
- 3) изучения популяционных изменений в плазмидных клонах на плотной среде.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ullrich A., Shine G., Chirgwin I. et al. Rat insulin genes: construction of plasmid containing the coding sequences. — *Science*, 1977, vol. 196, N 4296, p. 1313—1319.
2. Bolivar F., Rodriguez R. L., Beatlach M. C., Boyer H. W. Construction and characterization of new cloning vehicle. I Ampicillin resistant derivatives of the plasmid pMB9. — *Gene*, 1977, vol. 2, N 1, p. 75—93.
3. Rosner A., Bactos R. I., Aviv H. Evaluation of several enrichment procedures for isolation of recombinant plasmid DNA. — *Molec. Biol. Rep.*, 1978, vol. 4, N 4, p. 253—256.
4. Bochner B. R., Huang H.-C., Schieven G. L., Ames B. N. Positive selection for loss of tetracycline resistance. — *J. Bacteriol.*, 1980, vol. 143, N 2, p. 926—933.
5. Craine B. L. Novel selection for tetracycline — or chloramphenicol-sensitive *Escherichia coli*. — *J. Bacteriol.*, 1982, vol. 151, N 1, p. 487—490.
6. Griffith J. K., Buckingham J. M., Hanners I. L. et al. Plasmid-conferred tetracycline resistance confers collateral cadmium sensitivity to *E. coli* cells. — *Plasmid*, 1982, vol. 8, N 1, p. 86—88.
7. Матюшкова Н. А., Калинина Л. Н. Изучение стабильности плазмид группы рВR в некоторых штаммах *Escherichia coli*. — В кн.: Использование и трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами. Р.: ЛГУ им. П. Стучки, 1981, с. 33—41.
8. Wolfson J. S., Hooper D. C., Swartz M. N., McHugh G. L. Antagonism of B subunit of DNA gyrase eliminates plasmid pBR22 and pMg 110 from *Escherichia coli*. — *J. Bacteriol.*, 1982, vol. 152, N 1, p. 338—344.
9. Wolfson J. S., Hooper D. C., Swartz M. N. et al. Rapid method for screening large numbers of *Escherichia coli* colonies for production of plasmid-mediated β -lactamases. — *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 1983, vol. 23, N 2, p. 308—312.
10. Гэйл Э., Кандлифф Э., Рейнолдс П. и др. — Молекулярные основы действия антибиотиков. М.: Мир, 1975. 500 с.
11. Peden K. W. C. Revised sequence of the tetracycline resistance gene of pBR322. — *Gene*, 1983, vol. 22, N 2, p. 277—280.
12. Dagert M., Ehrlich S. Prolonged incubation in calcium chloride improves competence of *E. coli* cells. — *Gene*, 1979, vol. 6, N 1, p. 23—28.
13. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 421 с.
14. Браун Б. Генетика бактерий. М.: Наука, 1968. 446 с.
15. Матюшкова Н. А. Сравнительная стабильность плазмид рВR313, рВR322 и рВR325 в различных штаммах *Escherichia coli*. — В кн.: Молекулярные механизмы изменения наследственной информации у микроорганизмов. Р.: ЛГУ им. П. Стучки, 1983, с. 3—17.
16. Mizuguchi Y., Fukunaga M., Taniguchi H. Plasmid deoxyribonucleic acid and translucent-to-opaque. — *J. Bacteriol.*, 1981, vol. 146, N 2, p. 656—659.
17. Rosas S. B., Calzolari A., La Torre I. L. et al. Involvement of a plasmid in *Escherichia coli* envelope alterations. — *J. Bacteriol.*, 1983, vol. 155, N 1, p. 402—406.
18. Козловская Т. М., Пумпяк П. П., Борисова Г. П. и др. Синтез полной аминокислотной последовательности поверхностного антигена вируса гепатита В в *Escherichia coli*. — *ДАН СССР*, 1984, т. 274, № 5, с. 1250—1253.

Латвийский ордена Трудового Красного Знамени
государственный университет им. П. Стучки

Дата поступления 17.05.84.

Katedra a ústav biofyziky a nukleární medicíny fakulty všeobecného lékařství
Univerzity Karlovy, Praha, ČSSR,
přednosta prof. MUDr. Z. Dienstbier, DrSc.
Lotyšská státní univerzita P. Stučki, Riga, SSSR.
Mikrobiologický ústav A. Kirchensteina Lotyšské akademie věd, Riga, SSSR

IMUNOSTIMULAČNÍ A PROTINÁDOROVÉ VLASTNOSTI PLÍSŇOVÉHO GLYKOPROTEINU A

Иммуностимулирующие и противоопухолевые свойства гликопротеина
а микроскопических грибов

Immunopotentiating and Anti-tumour Activity of the Mould Glycoprotein A.

M. Žák, F. Novák, I. O. Muižnieks, V. R. Nikolajeva,
A. A. Kamradze, H. A. Maurina, A. K. Ferdats

SOUHRN: V práci jsou uvedeny výsledky studia některých vlastností nového mikrobiálního biostimulátoru — glykoproteinu A, izolovaného z *Penicillium* sp. 8D (GPA). Bylo zjištěno, že jak nativní, tak i tepelně denaturovaná forma GPA mají stimulační účinek na mitotickou aktivitu lymfocytů lidské periferní krve. Po podání GPA se o 200—240% stimuluje tvorba myších splenocytů tvořících protilátky proti beraním erytrocytům. Protinádorová aktivita preparátu GPA je demonstrována in vitro na buňkách Ehrlichova ascitického lymfosarkomu a na buňkách L 5178y, in vivo na rozvoji fibrosarkomu MX-17 a lymfoleukémii L 5178y. Toxicita preparátu GPA nebyla prokázána. Je diskutován pravděpodobný mechanismus jeho působení.

Adresa autora: M. Ž., Katedra a ústav biofyziky a nukleární medicíny FVL UK,
120 00 Praha 2, Salmovská 3

ВЫВОДЫ: Работа отражает результаты исследования некоторых свойств нового биостимулятора микробного происхождения — гликопротеина А из клеток гриба *Penicillium* sp. 8D (ГПА). * Показано, что как нативная, так и термически денатурированная формы ГПА стимулируют митотическую активность лимфоцитов периферической крови человека. Под воздействием ГПА на 200—240% стимулируется активность клеток, продуцирующих антитела к эритроцитам барана в селезенке мышей. Противоопухолевая активность препарата и чужака in vitro, при инкубации как при асцитозе Эрлиха и L 5178y, а также in vivo, на примере развития асцита L 5178y и фибросаркомы MX-17 у мышей. Препарат ГПА малотоксичен. Обсуждается механизм его действия.

* Не использованы сокращения:

ГПА — гликопротеин А из клеток микроскопического гриба
АОК — антитела образующие клетки

Sborn. lek., 88, 1986, No. 4—5, s. 139—145

Адрес автора: М. Ж., Устав биофизики и ядерной медицины ФВЛ УЧ
120 00 Прага 2, Салмовска 3

SUMMARY: Some aspects of the activity of a new microbial biostimulator — glycoprotein A (GPA) from the mould *Penicillium* sp. 8D are discussed in the submitted paper. Both native and thermally denaturated forms of GPA stimulate mitogenic activity of human peripheral blood lymphocytes. The activity of cells producing antibodies towards sheep erythrocytes in mice spleen is increased by 200—240 % after GPA administration. Tumour restricting activity of the remedy is demonstrated in vivo on the models of lympholeucoma L5178y and fibrosarcoma MH-17, in vitro — with Ehrlich ascite and L5178y cells. Toxic effects by GPA administration were not observed.

Possible molecular basis of the action of the remedy is discussed.

Sborn. lék., 88, 1986, No. 4—5, p. 139—145

Author's address: M. Ž., Ústav biofyziky a nukleární medicíny FVL KU,
120 00 Praha 2, Salmovská 3

Nahodilé pokusy o využití imunoterapeutických metod při léčení zhoubných novotvarů se objevují už začátkem tohoto století, avšak systematické studium v této oblasti se datuje od 40.—50. let (10). V současnosti se preparáty mikrobiálního původu používají hlavně jako adjuvans v aktivní nespecifické stimulační imunoterapii. Nejrozšířenějším a nejmohutnějším nespecifickým imunostimulátorem používaným v lékařské praxi je BCG (6, 7). Na klinikách v SSSR se kromě BCG používají jako imunostimulátory také preparáty pyrogenal, prodigosan, salmasan (z celých buněk mikroorganismů) a zymosan (z buněčných stěn kvasinek) (2, 9). Obecně se přírodní imunostimulátory mikrobiálního původu vyznačují složitou chemickou a antigenní strukturou, která určuje polyvalentnost jejich působení na různé fáze imunitní odpovědi organismu. Může vyvolávat kaskádní jevy, autoimunitní reakce, i reakci hypercitlivosti, stejně tak může být i příčinou imunopatologie. Tyto nedostatky do značné míry ztěžují rozsáhlé zavedení a cílené použití přírodních imunostimulátorů v klinické praxi. Ve zprávě vědecké skupiny WHO o imunologických adjuvans se formou doporučení pro budoucí výzkumy upozorňuje na to, že místo komplexních struktur by bylo mnohem vhodnější použití fragmentů mikrobiálních antigenů, poskytujících spolehlivější záruky bezpečnosti a cíleného použití (7).

V této práci jsou uvedeny výsledky studia imunostimulační a protinádorové aktivity nové fyziologicky aktivní látky — glykoproteinu A mikroskopické plísně kmene *Penicillium*. Imunomodulační vlastnosti přečištěných preparátů glykoproteinu A byly studovány in vitro v reakcích blastické transformace a stimulace tvorby buněk produkujících protilátky ve slezině in vitro (podle N. K. Jerneho). Protinádorová aktivita preparátu byla zjištěna na modelech Ehrlichova ascitu, lymfatické leukémie L 5178y a fibrosarkomu MX-17, indukovaném metylecholantrenem, rovněž na bázi adheze slezinových buněk s buňkami nádorovými.

MATERIÁL A METODIKA

V mikroskopické plísní *Penicillium* sp. 8D v pozdním stadiu buněčné diferenciace se tvoří glykoprotein A, představující 1 % celkového množství cytoplazmatické bílkoviny. GPA je bílkovina rozpustná ve vodě, jeví hydrolázovou aktivitu, v nativní konformaci oktameru má molekulovou hmotnost přibližně 220 kilodaltonů. V pokusech byly použity purifikované preparáty GPA (95 % homogenita) o koncentracích 0,5—0,8 mg/ml fyziologického roztoku nebo 0,05 M K-fosfatového pufru pH 6,5. Preparát obsahoval 22 % sacharidů.

Stimulace lymfocytů v krvi dárců byla stanovována morfologicky na základě blastické transformace v krátkodobých, 24—72hodinových kulturách leukocytů v Eaglově mediu obsahujícího 20 % autologního séra a antibiotika (4). Počet buněk, tvořících protilátky — hemolyziny (BTP) ve slezině myších samců linie BALB/c byl stanovován metodou podle N. K. Jerneho a A. Nordina, modifikovanou L. Fontalinem (11), spočívající v lokální hemolytické reakci v agarovém gelu. V těchto pokusech byla použita zvířata 16—20 dnů stará.

Průběh rozvoje nádoru byl hodnocen na základě střední doby přežívání myši. Pokusy in vivo s fibrosarkomem MX-17, indukovaným metylcholantrenem, byly prováděny na myších samicích linie BALB/c starých 10—12 týdnů. Nádorový růst byl indukován aplikací suspenze, obsahující 1000 buněk fibrosarkomu, do svalu zadních končetin. Rozvoj nádoru byl posuzován podle nárůstu jeho průměru (8).

Vliv podání GPA na vytvoření cytotoxického potenciálu lymfocytů byl sledován pomocí adheze nádorových buněk MX-17 a slezinných buněk myši BALB/c, imunizovaných studovaným preparátem, které však nebyly nositeli nádorů. Slezinné i nádorové buňky byly suspendovány v mediu RPMI-1640 o koncentraci 20 000 buněk/ml. Suspenze byly slity v poměru 1 : 1, inkubovány 30 min. při 30 °C. Po centrifugaci byly buňky resuspendovány v 0,5 ml media. Adheze buněk byla vyhodnocována v komůrkách Gorjajeva a vyjádřena v % adherovaných buněk z celkové počtu.

Zkoušky na akutní toxicitu preparátu byly prováděny i.p. aplikací vysokých dávek GPA myším BALB/c.

V Ý S L E D K Y

Výsledky sledování mitogenní aktivity GPA v krátkodobých lymfocytárních kulturách byly získány ve 3—5 pokusných sériích se vzorky v triplicátech a jsou uvedeny v tabulce 1. Interval spolehlivosti odchylky průměru byl vyhodnocován standardní metodou statistického zpracování dat.

Přidání 10—60 $\mu\text{g/ml}$ GPA k inkubační směsi krátkodobých kultur leukocytů stimuluje tvorbu blastů lymfocytů u zdravých dárců. Optimální dávka pro dosažení maximální blastické transformace vlivem GPA je v rozsahu koncentrací 40—50 $\mu\text{g/ml}$. Při zvýšení dávky GPA na 60 $\mu\text{g/ml}$ stimulační účinek klesá. Aktivita preparátu jako mitogenního agens je podmíněna spíše jeho strukturou než hydrolytickou aktivitou. Svědčí o tom zvýšení účinnosti blastické transformace v přítomnosti GPA (20 $\mu\text{g/ml}$) zahřátého na 80 °C po dobu 20 min na rozdíl od jeho nativní formy. Po 48 hodinách inkubace s nativním GPA bylo nalezeno 125 % velkých lymfocytů proti 160 % s tepelně denaturovaným GPA. Takové zpracování úplně inaktivuje hydrolytickou aktivitu preparátu GPA.

Tab. 1. Vliv nativního preparátu GPA na blastickou transformaci lymfocytů

Koncentrace GPA v inkubační směsi ($\mu\text{g/ml}$)	Doba inkubace (hod)	Počet velkých lymfocytů (% z kontroly)
0	48	100
10	24	120 · 4
10	72	112 · 3
20	24	114 · 3
20	48	125 · 5
20	72	133 · 5
30	48	142 · 8
45	48	148 · 6
60	48	125 · 5

Tab. 2. Stimulace tvorby BTP ve slezině myši účinkem preparátu GPA

Dávka GPA μg/kg	Doba aplikace (dny před nebo po injekci antigenu)	Obsah BTP (% z kontroly)
0	—	100
1,0	-3	127 ± 15
1,0	-2	195 ± 13
1,0	-1	107 ± 12
1,0	0	109 ± 10
1,0	+1	230 ± 20
1,0	+2	127 ± 13
2,0	-2	209 ± 16
2,0	-1	120 ± 11
10,0	-7	145 ± 17
10,0	-3	237 ± 22
10,0	-1	119 ± 9

Silnější denaturace GPA při 96 °C během 5 min vede až ke ztrátě jeho mitogenních vlastností. Současně však porušení struktury sacharidové části molekuly oxidací jodistanem (16) nemění podstatně aktivitu preparátu při blastickotransformační reakci (údaje nejsou uvedeny). Použité dávky GPA v pokusech s blastickou transformací nevyvolávaly hemoaglutinaci erytrocytů krve dárců.

Pokusy se stimulací tvorby BTP v myši slezině jsou uvedeny v tabulce 2 a charakterizují adjuvantní vlastnosti GPA.

Stanovení BTP se provádělo 4.—5. den po aplikaci antigenu — beraních erytrocytů a charakterizuje produkci IgM karyocyty sleziny myši. Z našich pokusů vyplývá, že preparáty GPA se vyznačují výrazným adjuvantním účinkem v širokém rozmezí dávek — od 1,0 do 10,0 mg/kg. Tento účinek se projevuje, jestliže se GPA aplikuje v určité době — 2—3 dny před nebo jeden den po imunizaci beranými erytrocyty. Při současné aplikaci antigenu a GPA nebo při aplikaci GPA jeden den před imunizací nebyla pozorována významná stimulace aktivity tvorby BTP. Stimulace aktivity BTP není provázána signifikantně zvýšeným celkovým počtem karyocytů ve slezině.

Tab. 3. Protinádorový účinek GPA na lymfatickou leukémii L5178y

Varianta pokusu	Dávka preparátu mg/kg	Schéma aplikace	Doba života zvířat pokusných skupin (% vzhledem ke
GPA	1,0	-3, -7	158 ± 10
	2,0	-3, -7	101 ± 12
	4,0	-3, -7	90 ± 12
	6,0	-3, -7	48 ± 6
	1,0	-7, -2	320 ± 36
Leasparagináza	0,8	-3, -7	195 ± 24
	3,2	-3, -7	170 ± 18
Kontrola	—	—	100

Pro každou pokusnou variantu byly použity dvě skupiny šesti zvířat. Šestidenní doba života myši po naočkování nádorů v kontrolní skupině byla 15,3 dno. Schéma aplikace preparátu -3, -7 znamená, že zvířata dostávala preparát 1. p. třetí a sedmý den po naočkování nádorů. Schéma -7, -2, preparát byl aplikován týden před a dva dny po naočkování nádorů.

Výsledky in vivo experimentů s lymfatickou leukémií L5178y a preparátem GPA jsou uvedeny v tabulce 3.

Terapeutický účinek GPA vzhledem k rozvoji lymfatické leukémie L5178y se projevoval pouze při nízkých dávkách preparátu — 1 mg/kg. Známá enzymoterapeutická látka — bakteriální enzym, imunosupresor L-asparagináza v přibližně stejné dávce vyvolává téměř dvojnásobné prodloužení doby života myši pokusné skupiny. Zvýšení dávky enzymu nemá další vliv na prodloužení života myši s lymfatickou leukémií L5178y. Ve srovnání s tím podání 4–6 mg/kg GPA dokonce urychlovalo růst nádoru, ačkoliv samotný preparát je netoxický i při daleko vyšších dávkách (viz dále). Současné však profylaktické podání 1 mg/kg GPA před transplantací nádoru vyvolává prodloužení přežívání pokusných zvířat na více než 300% ve srovnání s kontrolou.

Jako model solidního nádoru pro studium působení GPA jsme zvolili metylcholantrenem indukovaný fibrosarkom MX-17, který se vyznačuje rezistentností vůči chemoterapeutickým látkám a malou imunogenností (13). Protinádorový účinek GPA na fibrosarkom MX-17 se projevuje pouze v pokusech s vícenásobným podáním preparátu před a po transplantaci nádoru, podobně jako u vakcíny proti neštovicím. Po profylaktickém podání GPA před inokulací nádoru lze pozorovat pokles procenta uchycení nádoru. Aplikace GPA mnohem účinněji omezuje růst fibrosarkomu MX-17, než vakcína proti neštovicím podle analogického schématu (12) viz tabulka 4.

Pro sledování primární etapy interakce slezinných buněk — lymfocytů s nádorovými buňkami, byl použit test adheze, který se doporučuje pro hodnocení aktivity přirozených killerů. Výsledky experimentu jsou uvedeny v tabulce 5. Nejvýraznější účinek na stimulaci adheze buněk fibrosarkomu MX-17 se slezinnými myšimi buňkami (BALB/c) má imunizace preparátem GPA. Dokonce po imunizaci homologními antigeny — nádorovými buňkami v raném stadiu nebo v pozdním stadiu růstu je tento účinek slabší, podobně jako u kontrolních nespecifických imunostimulátorů — viru vakcíny proti neštovicím a enteroviru ECHO-7.

Na rozdíl od většiny imunostimulátorů mikrobiálního původu byl GPA získán z nepatogenního kmene plísně *Penicillium* sp. 8D. Nízkou toxicitu má i samotný preparát GPA. V našich experimentech na zvířatech jsme nepozorovali vznik anafylaktických reakcí a hypercitlivosti vůči tomuto preparátu. Intralumbální podání GPA krysím mláďatům druhý den po narození v dávce

Tab. 4. Protinádorový účinek GPA na fibrosarkom MX-17

Varianta pokusu	Dávka preparátu	Schéma aplikace	Uchycení nádoru (%)	Střední průměr nádoru 30. den růstu (mm)
GPA	1 mg/kg	-38, 20, 10	90	17,1 ± 1,0
	1 mg/kg	- 2, 10, 20	100	17,8 ± 1,1
	1 mg/kg	-30, 20, 10	90	13,2 ± 1,0
		-2, 20, 10		
Virus neštov. vakcíny	10 ⁵ - 10 ⁶ CPD	-30, 20, 10	100	18,1 ± 0,7
		-2, 20, 10	100	15,5 ± 0,8
	10 ⁵ - 10 ⁶ CPD	-30, 20, 10	100	15,5 ± 0,8

Experiment byl prováděn na třech skupinách po deseti myších v každé pokusné variantě. Ve schématech aplikace preparátu je uvedeno, kolik dní před (-) nebo po (+) transplantací nádoru byl preparát aplikován. Před transplantací byl GPA aplikován rovněž — do nádoru. CPD = cytopatogenní dávka.

Tab. 5. Adheze buněk fibrosarkomu MX-17 a myších slezinných buněk

Pokusná varianta	Dávky imunizace	Adheze buněk (%)	
		28. den po imunizaci	35. den po imunizaci
Kontrola	Fyz. roztok	12,8 ± 1,0	13,0 ± 1,5
Nádor v pozdním stadiu	10 ³ buněk	17,6 ± 1,4	18,0 ± 0,8
Nádor v raném stadiu	10 ³ buněk	18,0 ± 1,2	18,3 ± 2,1
GPA	1 mg/kg	23,0 ± 1,7	22,5 ± 1,0
Virus neštov. vakcíny	10 ⁵ –10 ⁶ CPD	16,0 ± 1,1	17,0 ± 0,9
Virus ECHO-7	10 ⁵ –10 ⁶ CPD	17,3 ± 1,6	16,0 ± 0,7

Rané stadium růstu nádoru (průměr nádoru 0,5–1,0 cm).

Pozdní stadium růstu nádoru (průměr nádoru > 2,0 cm).

Použité virové preparáty byly získány v laboratoři viroterapie nádorů Mikrobiologického institutu A. Kirchenštejna AV Litevské SSR.

CPD – cytopatogenní dávka.

15 mg/kg nevyvolalo žádné pozorovatelné odchylky v jejich vývoji během tříměsíčního pozorování. Ani při i.p. aplikaci GPA myším linie BALB c v dávce 100 mg/kg, což je o dva řády vyšší než je optimální profylaktická dávka, nebyly pozorovány žádné vnější projevy intoxikace.

ROZPRAVA

Výsledky, uvedené v této práci, ukazují, že glykoprotein A. účastníci se procesu buněčné diferenciace v plisni *Penicillium* sp. 8D, může působit jako imunostimulátor i protinádorový preparát. Protinádorový účinek GPA je nejvýraznější při profylaktické aplikaci, což ukazuje na imunologicky podmíněnou povahu pozorovaného jevu. Mitogenní aktivita GPA nesouvisí s jeho hydrolytickou aktivitou, ale spíše se strukturou jeho bílkovinné části.

Podle spektra a účinnosti působení je GPA podoben různým jiným imunostimulátorům mikrobiálního původu. Např. GPA vyvolaná stimulace lymfocytů periferní krve je srovnatelná s působením bakteriálních lipopolysacharidů (1), ale stimulace BTP naopak — se zymosanem a BCG (3). Současně však GPA indukuje jak humorální, tak i buněčnou složku imunitní odpovědi. Lze předpokládat, že primární působení GPA se nachází v nejčasnější etapě regulace rozvětvených cest imunitní odpovědi, např. na úrovni stimulace syntézy interleukinu-1. Předběžné výsledky, získané v naší laboratoři, rovněž ukazují, že aplikace GPA neovlivňuje významně koncentraci IgG v krevním séru experimentálních zvířat, ale indukuje kvalitativní změny elektroforetického obrazu rozdělení sérových bílkovin — objevují se doplňkové zóny v oblasti migrace haptoglobulinu a nebo alfa makroglobulinů.

Uvedené vlastnosti ukazují na příbuznost mechanismu imunostimulačního účinku GPA s účinkem polysacharidu lentinanu, jehož aktivita je rovněž podmíněna indukcí syntézy interleukinu-1 (14). Byl vysloven názor, že imunostimulační účinek zymosanu je také založen na indukcii interleukinu-1 (5).

Přednosti GPA jako imunostimulátoru ve srovnání se známými analogy jsou patrné z následujícího:

- preparát je homogenní a rozpustný ve vodě, dá se snadno definovat a standardizovat fyzikálně-chemickými a biochemickými metodami,
- preparát je stabilní v rozpuštěné i lyofilizované formě,

- c) GPA je produkován nepatogenním mikroorganizmem v dostatečném množství a nevyvolává u zvířat toxické reakce, ani nežádoucí vedlejší reakce imunologického charakteru.

L I T E R A T U R A

1. **Ambrozius, Ch., Andreas, M., Baer, P., i dr.:** Immunologia. Spravočnik. Kiev, 1981, 479 s.
2. **Bass-Šadchan, Ch. F.:** Zimozan. Riga, 1970, 313 s.
3. **Veksler, I. G.:** Sravnitelnoe izučenie vlijanija nekotorych nespecifičeskich stimúljatorov na immunnij otvet organizma. Bjull. eksperim. biol. i med., 89, 1980, s. 64.
4. **Golubeva, N. N.:** Metod opredelenija limfocitstimulirujuščej aktivnosti fitogemaggljulina V kn.: Sovremennye metody v biochimii. Moskva, 1977, s. 257.
5. **Zakenfeld, G. K.:** Vozmožnyj immunologičeskij mehanizm dějstvija polisacharidov tipa zimozana. V kn.: Nespecifičeskije stimúljatory protivopucholevogo immuniteta. Riga, 1983, s. 58.
6. **Ikonopisov, R. L.:** Immunoterapia zlokačestvennoj melanomy. V kn. Immunologija opucholej. Riga, 1982, s. 193.
7. Immunologičeskije adjuvanty. Doklad naučnoj grupy VOZ. Moskva, 1978, s. 49.
8. **Muceniece, A. J., Bumbieris, J. V., Bruvere, R. Ž., i dr.:** Eksperimentalnaja i teoretičeskaja razrabotka immunologičeskich aspektov viroterapii zlokačestvennyh opucholej. V kn.: Immunologija opucholej. Riga, 1982, s. 217.
9. **Nikitin, A. V., Navašin, S. M.:** Immunostimúljatory prirodnovo proischožđenija. Antibiotiki, 28, 1983, s. 702.
10. **Pauls, R. L.:** Biologičeskij podchod k lečeniju bolnyh ostrym lejkozom. V kn.: Immunologičeskaja inženerija. Moskva, 1982, s. 15.
11. **Pevnickij, L. A., Solovev, V. V., Fontalin, L. N.:** Issledovanie dějstvija analogov osnovanij nukleinojbyh kislot na immunogenez metodom Jerne. Bjull. eksp. biol. i med., 60, 1985, s. 85.
12. **Rudzitis, M. F., Desjatnikova, I. P.:** Vlijanie virusa ospovakciny na rost opucholi, inducirovannoj 20-metilcholantrenom. V kn.: Virusi v terapii opucholej. Riga, 1978, s. 130.
13. **Ferdats, A. K., Bumbieris, J. V.:** Onkogennye, antigennye i imunogennye svojstva opucholi, inducirovannoj kancerogenom pri dliitelnyh pasažach. V kn.: Geterogenizacija opucholej. Riga, 1980, s. 73.
14. **Chihara, G., Taguchi, T.:** Lentinan — biological activities and possible clinical use. EOS Riv. Immunol. Immunopharmacol., 23, 1982, p. 93.
15. **RajBhandry, U. L.:** Studies on polynucleotides. LXXVII The labeling of end groups in polynucleotides: The selective modification of diol end groups in ribonucleic acid. J. Biol. Chem., 243, 1968, p. 556.

Došlo 13. 12. 1985

Katedra a ústav biofyziky a nukleární medicíny fakulty všeobecného lékařství
Univerzity Karlovy, Praha,
přednosta prof. MUDr. Z. Dienstbier, DrSc.
Lotyšská státní Univerzita P. Stučky, Riga, SSSR
Mikrobiologický ústav A. Kirichensteina Lotyšské akademie věd, Riga, SSSR

VLIV PLÍSŇOVÉHO GLYKOPROTEINU A NA RŮST NÁDORU A PŘEŽÍVÁNÍ MYŠÍ KMENE C3H SE SYNGENNÍM METYLCHOLANTRENOVÝM NÁDOREM

Влияние плесневого гликопротеина А на рост опухоли и выживания мышей рода С3Н
с сингенной метилхолантреновой опухолью

Influence of the Fungal Glycoprotein A on the Growth of Tumours and Survival
of Mice Strain C3H with a Syngenic Methylcholanthrene Tumour

M. Žák, F. Novák, I. O. Muižnieks, V. R. Nikolajeva, A. A. Kamaradze,
H. A. Maurina, A. K. Ferdats, J. Jirkovský

SOUHRN: V práci jsou uvedeny výsledky studia protinádorových vlastností mikrobiálního preparátu, glykoproteinu A, izolovaného z plísně *Penicillium* sp. 8 D (GPA). Elektroforetická pohyblivost byla stanovena v kontinuálním gradientu polyakrylamidového gelu.

Bylo vyzkoušeno sedm různých kombinací imunomodulační dávky GPA. Sledovalo se přežívání zvířat po nádorové transplantaci a růst transplantovaného solidního syngenního metylcholantrenového nádoru u inbredních myší C3H.

Žádné ze schémat podání GPA významně neovlivnilo dobu přežívání zvířat s transplantovanými nádory. Jednorázové podání testovaného preparátu ovlivnilo růst transplantovaných nádorů pouze nepatrně a nevýznamně. Při opakovaném podání GPA po nádorové transplantaci byla situace v růstu nádoru příznivější. Nejlepšího efektu na růst nádoru bylo dosaženo po kombinovaném podání před nádorovou transplantací a po opakovaném podání po ní.

Adresa autora: M. Ž., Ústav biofyziky a nukleární medicíny FVL UK,
Salmovská 3, CS 120 00 Praha 2

ВЫВОДЫ: В работе приведены результаты изучения противоопухолевых свойств микробного препарата, гликопротеина А, изолированного из плесневых грибов *Penicillium* sp. 8 D (GPA). Электрофоретическая подвижность определялась в непрерывном градиенте полиакриламидном геле.

Было проверено семь различных сочетаний иммуномодулирующей дозы GPA. Было исследовано выживание животных после опухолевой пересадки (трансплантации) и рост трансплантированной плотной (солидной) сингенной метилхолантреновой опухоли у инбредных мышей C3H.

Ни одна из схем введения GPA значительно не повлияла на срок выживания животных с трансплантированными опухолями. Одноразовое введение тестированного препарата влияло на рост трансплантированных опухолей только немного и невыразительно. При повторном введении GPA после опухолевой трансплантации было положительно в росте опухоли более благоприятное. Самый благоприятный эффект на рост опухоли

Был достигнут после сочетанного введения до опухолевой трансплантации и после повторного введения после нее. Б.

Sborn. lék., 90, 1988, No. 8—9, s. 252—259

Адрес автора: М. З., Ústav biofyziky a nukleární medicíny,
Salmovská 3, CS 120 00 Praha 2

SUMMARY: The authors present the results of an investigation of the anti-tumour properties of a microbial preparation, glycoprotein A isolated from fungus *Penicillium* sp. 8 D (GPA). The electrophoretic mobility was assessed in a continual polyacrylamide gel gradient.

Seven different combinations of immunomodulation GPA doses were tested. The survival of animals after tumour transplantation and the growth of the transplanted solid syngenic methylcholanthrene tumour in inbred mice strain C3H was investigated.

None of the patterns of GPA administration influenced in a significant way the survival period of the animals with transplanted tumours. A single dose of the tested preparation had only a slight and insignificant effect on the transplanted tumours. After repeated GPA administration following tumour transplantation the position of tumour growth was more favourable. The most favourable effect on tumour growth was achieved after combined administration before tumour transplantation and repeated administration after transplantation.

Sborn. lék., 90, 1988, No. 8—9, p. 252—259

Author's address: М. З., Ústav biofyziky a nukleární medicíny FVL UK,
Salmovská 3, CS 120 00 Praha 2

V profylaxi a terapii zhoubných nádorů se prověřuje řada metabolických produktů mikrobiálního původu, které působí jako imunomodulátory. Nejvíce byly používány celé buňky, jak je to ku příkladu u BCG vakcíny. Tyto preparáty mají velmi složitou antigenní strukturu, která vedle nespecifické imunostimulace může však být příčinou nežádoucích vedlejších reakcí.



Obr. 1. GPA — elektroforeogram na kontinuálním gradientu polyakrylamidového gelu.

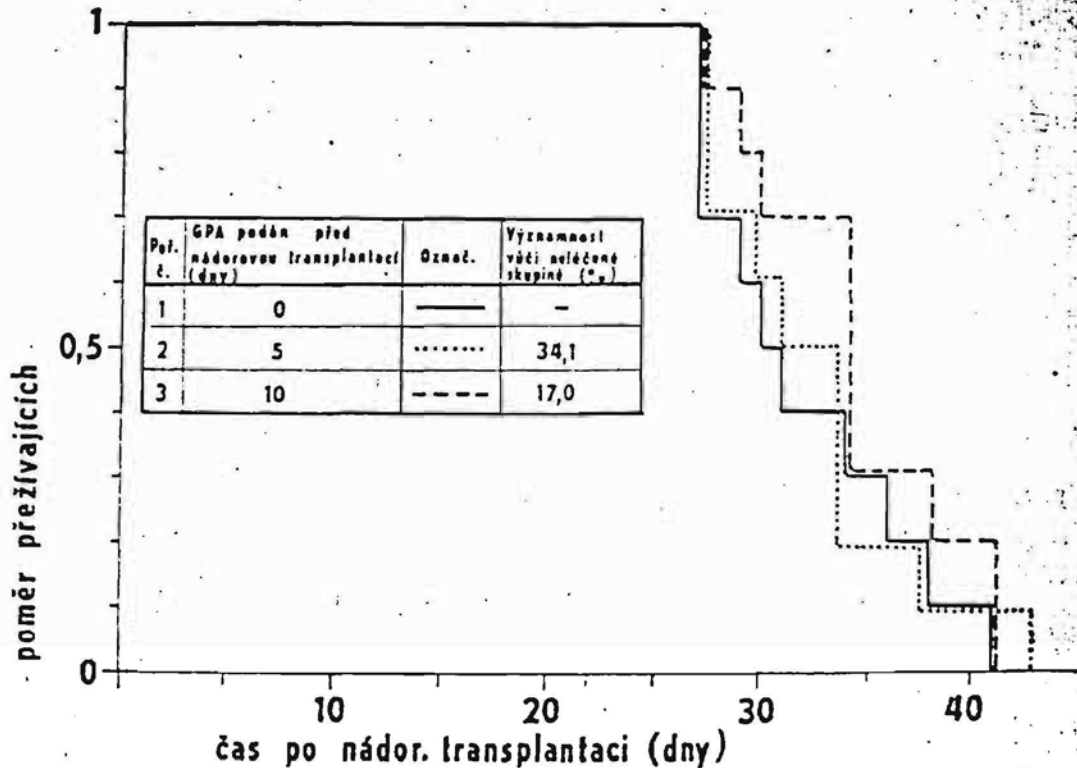
Proto další směry v imunoterapii vedou od používání komplexních bakteriálních a plísňových preparátů k chemicky definovaným selektivnějším preparátům. Jsou to například interferon, levamisol, isoprinosin, azimexon (4).

Jedním z dalších imunostimulátorů je i glykoprotein A izolovaný z plísňového kmene *Penicillium* sp. 8D (GPA). Některé charakteristiky tohoto purifikovaného mikrobiálního preparátu, jako stimulace mitotické aktivity lymfocytů lidské krve, stimulace myších splenocytů a další vlastnosti byly předmětem naší předchozí publikace (12).

V této práci jsou sledovány závislosti různých schémat podání stejné dávky GPA na přežívání a růst syngenních nádorů u inbredních myší kmene C3H.

METODIKA

K pokusům bylo použito inbredních myších samců kmene C3H o hmotnosti asi 20 g a přibližně stejného stáří. Zvířata byla krmena peletovanou dietou DOS ZB závodu Velaz a napájena vodou ad libitum. Před pokusem byla dva týdny aklimatizována a chována v umělohmotných chovných nádobách.



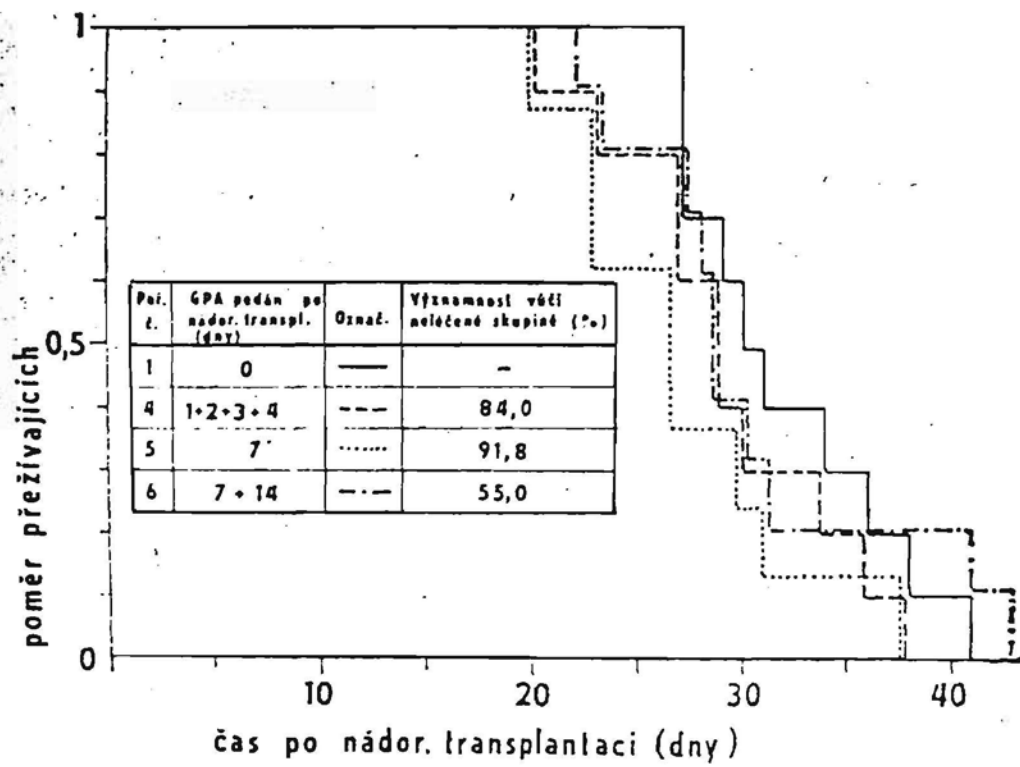
Graf 1. Poměr přežívajících zvířat s nádory po podání GPA před nádorovou transplantací.

K nádorové transplantaci byl použit syngenní metylcholantrenový nádor. Původně byl indukován na myších kmene C3H třikrát opakovaným podáním 3-metylcholantrenu SERVA v dávce 0,5 mg v 0,1 ml fyziologického roztoku do hlubokých stehenních svalů zadní končetiny v týdenních intervalech. Nádor byl třikrát přepasážován, po vypreparování homogenizován a po přidání dimetylsulfoxidu v poměru 1:9 byla tato suspenze zatavena do skleněných ampulí, zmrazena a uchovávána v tekutém dusíku.

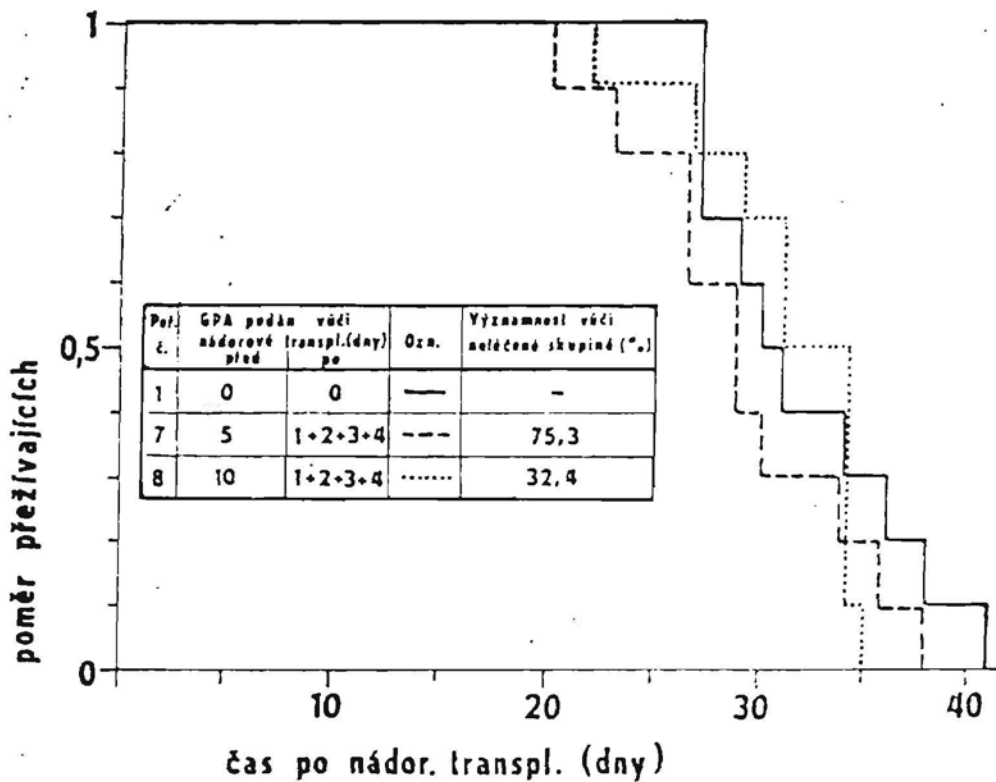
Před vlastním pokusem byla suspenze rozmrazena a injikována inbredním myším kmene C3H, do hlubokých svalů femorálních obou zadních končetin. Vzniklé nádory byly vypreparovány, homogenizovány a byla vyšetřena buněčnost společně s indexem vitality. Buněčnost se stanovovala obdobně jako počet leukocytů v Bürkerově komůrce a pro stanovení indexu vitality byl homogenát obarven trypanovou modří.

Pokusným zvířatům byly podány suspenze nádorových buněk o upravené buněčnosti 10^3 v 0,02 ml fyziologického roztoku do hlubokých stehenních svalů levé zadní končetiny.

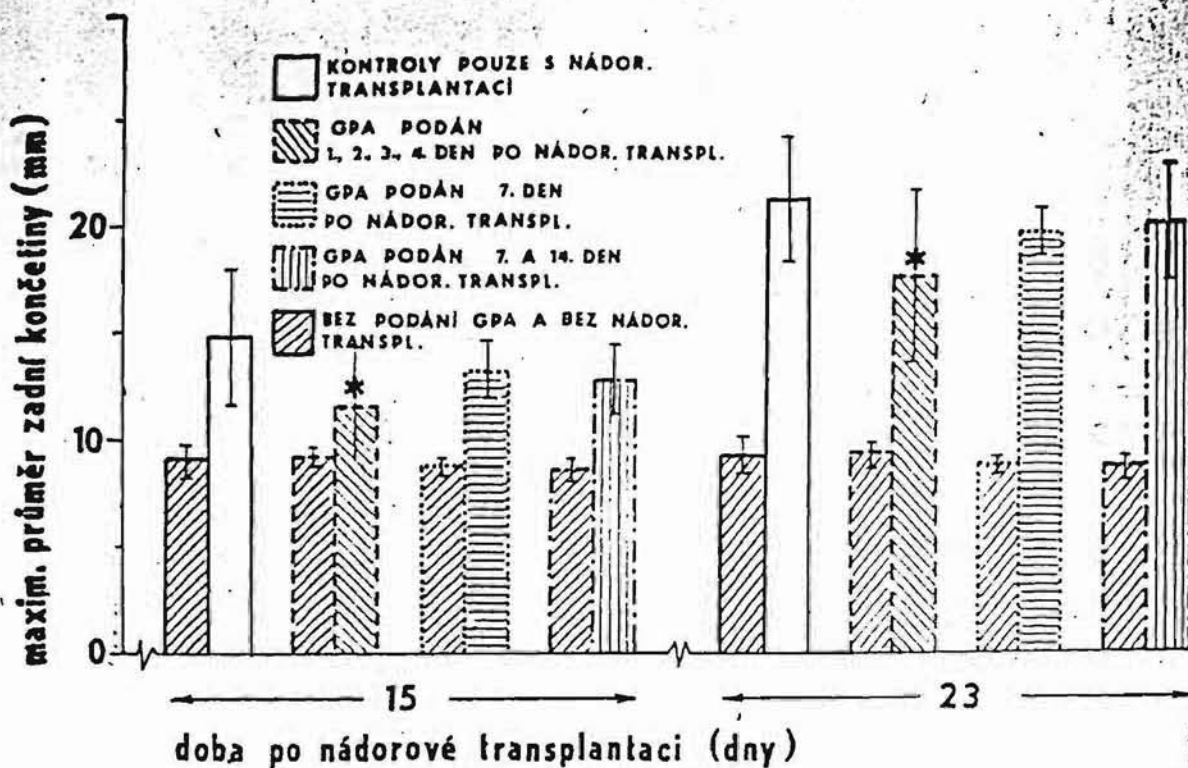
K ovlivnění růstu transplantovaných nádorů byl použit glykoprotein A extrahovaný a purifikovaný z půdního mikroorganismu *Penicillium* sp. 8D (12) v dávce 600 μ g na 1 kg živé hmotnosti zvířat. Preparát byl charakterizován pomocí elektro-



Graf 2. Poměr přežívajících zvířat s nádory po podání GPA po nádorové transplantaci.



Graf 3. Poměr přežívajících zvířat s nádory po kombinovaném podání GPA před a po nádorové transplantaci.



Graf 4. Maximální průměry zadních končetin po podání GPA před nádorovou transplantací.

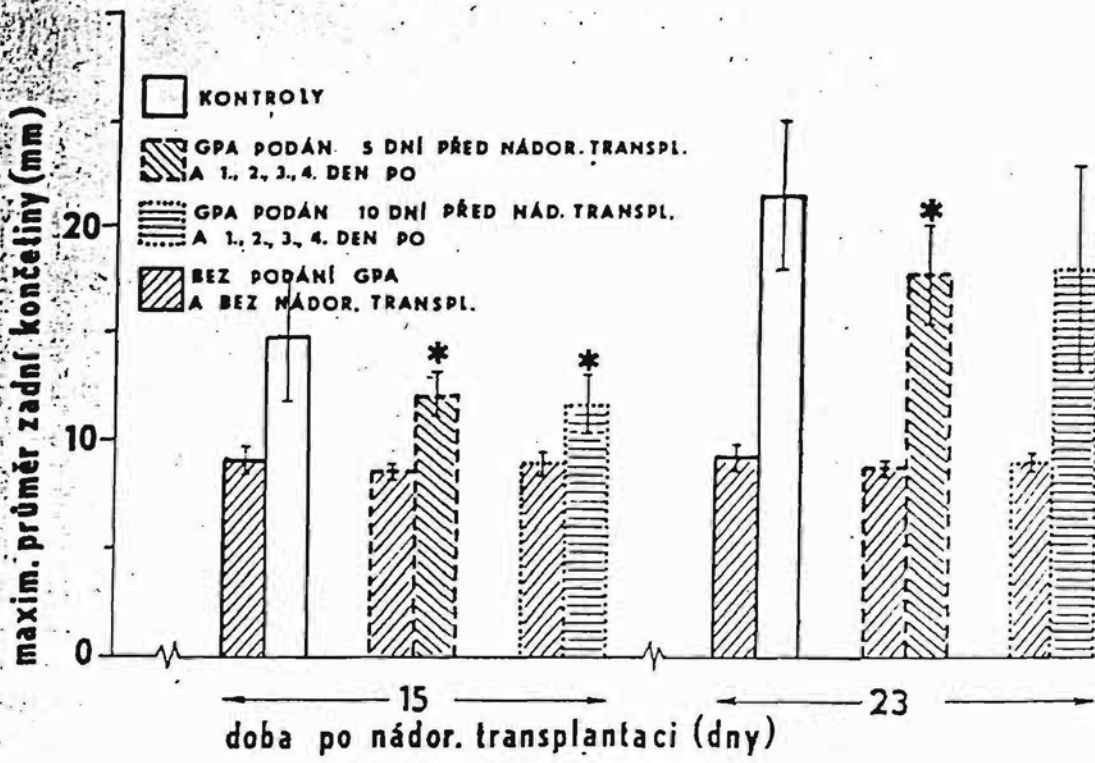
forézy v polyakrylamidovém gelu na přístroji podle Ogity a Markerta (8). Elektroforéza probíhala 60 minut při napětí 200 V a proudu 20–30 mA v kontinuálním gradientu 4–14% o pH 8,5. Z elektroforeogramu na obrázku 1 je patrné, že jde o vysokomolekulární látku, která částečně disociuje na podjednotky.

Růst nádoru byl sledován na osmi skupinách po deseti zvířatech s následujícím schématem pokusu.

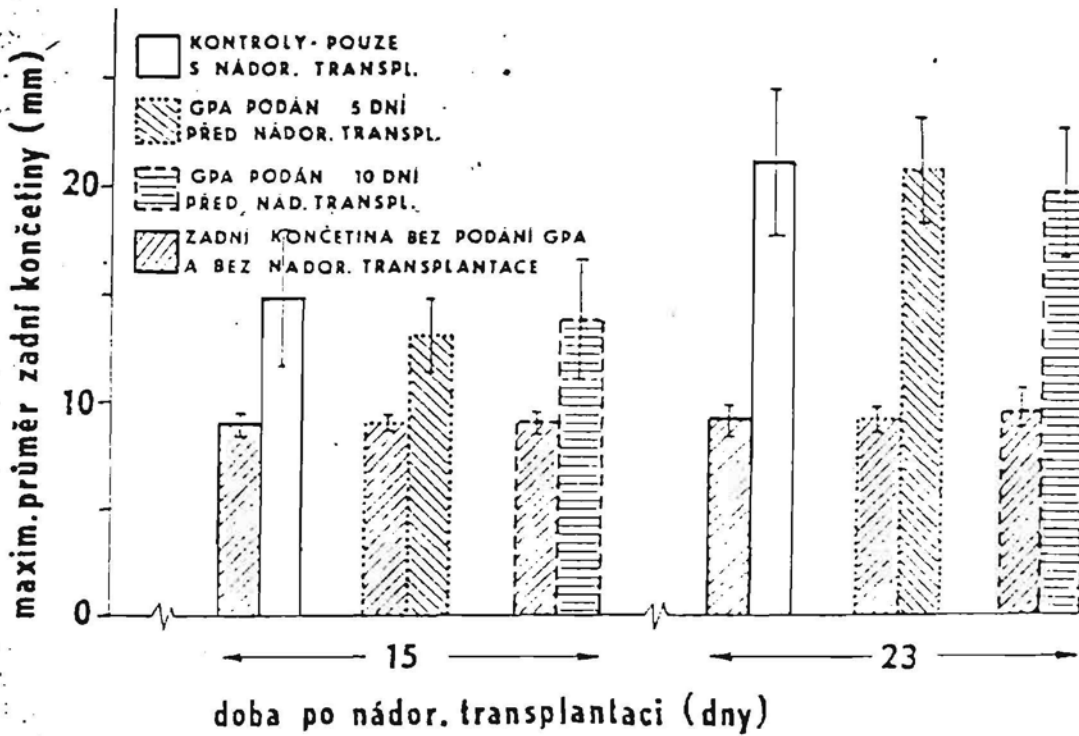
1. skupina — kontrolní, které byly pouze přetransplantovány nádorové buňky jako všem následujícím skupinám
2. skupina — glykoprotein A byl podán 5 dní před nádorovou transplantací
3. skupina — glykoprotein A byl podán 10 dní před nádorovou transplantací
4. skupina — glykoprotein A byl podáván opakovaně 1., 2., 3. a 4. den po nádorové transplantaci
5. skupina — glykoprotein A byl podán 7 dnů po nádorové transplantaci
6. skupina — glykoprotein A byl podán 7 a 14 dnů po nádorové transplantaci
7. skupina — glykoprotein A byl podán kombinovaně a to 5 dnů před a 1., 2., 3. 4. den po nádorové transplantaci
8. skupina — glykoprotein A byl podán kombinovaně a to 10 dnů před a 1., 2., 3. 4. den po nádorové transplantaci.

Velikost nádorů byla měřena cirkumferometrem, jako rozdíl maximálních průměrů zadních končetin s transplantovaným nádorem a druhých končetin bez nádoru. Cirkumferometr byl navržen a vyroben Výzkumným ústavem pro farmakologii a biochemii (5 a 11). Velikost nádoru byla měřena 15 a 23 dnů po nádorové transplantaci.

Rozdíly ve velikosti nádorů byly statisticky hodnoceny podle Snedecorova testu vůči kontrolním neovlivněným zvířatům (9). Statistické výpočty byly prováděny na počítači PDP 19/34 A firmy DEC USA podle programů sestavených pro účely této práce. Pětiprocentní významnost byla stanovena za hranici statistické signifikance a na grafech byla označována hvězdičkou.



Graf 5. Maximální průměry zadních končetin po podání GPA po nádorové transplantaci.



Graf 6. Maximální průměry zadních končetin po kombinovaném podání GPA před a po nádorové transplantaci.

Výsledky v přežívání jsou uvedeny jako poměr přežívajících k výchozímu počtu zvířat od doby nádorové transplantace. Statistické hodnocení bylo testováno v celém průběhu podle Gehana (2).

VÝSLEDKY

Výsledky v přežívání zvířat s transplantovanými nádory a po podání GPA jsou uvedeny na grafech 1, 2 a 3. Zvířata začínají hynout 20 dnů po nádorové transplantaci a přežívají 35 až 43 dnů, až na nepatrné rozdíly, které však nejsou statisticky významné. Dá se konstatovat, že GPA neovlivňuje přežívání zvířat po nádorové transplantaci.

Na grafech 4, 5 a 6 jsou znázorněny průměry zadních končetin s transplantovaným nádorem (velikosti nádoru) a po podání GPA v uvedených časových intervalech od doby nádorové transplantace.

Z grafu 4 je patrný vzestup hodnot po nádorové transplantaci. U zvířat ovlivněných GPA jsou sice hodnoty nižší, ale statisticky nevýznamné.

Na grafu 5 jsou uvedeny výsledky po opakovaném podání GPA. Nejvýraznější ovlivnění bylo dosaženo po opakované aplikaci preparátu 1, 2, 3 a 4 dny po nádorové transplantaci (tj. u skupiny zvířat 4), kdy jsou maximální průměry zadních končetin s nádorem 15 dnů po transplantaci o 18 % menší, než průměry kontrol. Ještě 23 dní po nádorové transplantaci přetrvával příznivý efekt podaného GPA a hodnoty byly v průměru o 17 % nižší oproti kontrolám. Tyto rozdíly jsou statisticky významné. U skupin pokusných zvířat 5 a 6 lze pozorovat určitý efekt, ale statisticky nevýznamný.

Na grafu 6 jsou uvedeny sledované hodnoty po kombinovaném podání GPA před nádorovou transplantací a po ní (skupiny zvířat 7 a 8). Podobně, jako v případě samotného opakovaného podání po transplantaci (skupina zvířat 4), byly průměry končetin s nádorem 15 dní po nádorové inokulaci o 20 % menší při obou kombinacích aplikace preparátu. Rozdíly jsou statisticky významné. Efekt přetrvával až do 23. dne, kdy byly vyšetřované hodnoty o 15 % menší oproti kontrolám. Hodnoty byly statisticky významné u skupiny ovlivněné 5 dní před nádorovou transplantací a 1, 2, 3 až 4 dny po ní. U skupiny zvířat rovněž s kombinovaným podáním, ale místo 5 dní předem bylo použito 10 dní, bylo zaznamenáno rovněž snížení sledovaných hodnot, ale v intervalu sledování 23 dnů po nádorové transplantaci byly hodnoty statisticky nevýznamné z důvodů větší směrodatné odchylky.

ROZPRAVA

Testovaný glykoprotein A byl izolován z plísně *Penicillium* sp. 8 D v pozdním stadiu buněčné diferenciaci, kdy tvoří až 1% celkového množství cytoplazmatické bílkoviny. GPA má konformaci oktameru s molekulovou hmotností asi 220 kilodaltonů. Obsahuje 22 % sacharidů a má hydrolázovou aktivitu. Mitogenní účinky GPA však nejsou vázány na přítomnost hydrolázové aktivity, jak bylo dokázáno s tepelně denaturovaným preparátem (12).

Protinádorový účinek byl sledován na přežívání zvířat s nádory a na růst nádoru, který byl průběžně sledován, takže každé zvíře bylo samo sobě kontrolou (1, 3).

Z výsledků přežívání zvířat s metylcholantrenem indukovaným nádorem je zřejmé, že GPA ani v jednom schématu z uspořádaného pokusu neovlivnil statisticky významně jeho průběh. Naproti tomu při kombinovaném podání GPA myším v dávce 1 mg na kg živé hmotnosti zvířat 7 dnů před inokulací lymfatické leukémie L5178 y a dva dny po, signifikantně prodloužilo dobu přežívání zvířat (12). Rozdíl v účinnosti je patrně dán typem zkoumaného nádoru, kmenem zvířat a dávkováním.

Pokud jde o ovlivnění růstu solidního syngenního metylcholantrenového nádoru u myši C3H, bylo z použitých schémat pokusu optimální opakované podání testovaného GPA a to jak po nádorové transplantaci, tak především kombinované, kdy byl GPA podán jednorázově před a opakovaně po nádorové transplantaci. Tento náález plně potvrzuje výsledky předchozí citované práce (12), kdy byl použit metylcholantrenem indukovaný fibrosarkom MX 17 v obdobném experimentálním uspořádání.

Z této práce je také zřejmé, že vedle určení optimální imunomodulační dávky zkoumaného preparátu je neméně důležité zvolit i optimální schéma podání (10).

LITERATURA

1. **Fichbuer, I., Arnold, W., Pehl, E.:** Biologische Parametr eines standardisierten Tumormodels für chemotherapeutische und toxikologische Untersuchungen. Arch. Geschwulstforsch. 49, 1979, č. 5, s. 391—407.
2. **Gehan, E. A.:** Statistical methods for survival time studies in cancer therapy prognostic factor and criteria of response. Staget M. J. Raven Press, (New York 1975.
3. **Gorodilovová, V. V., Mučenice, A. J.:** Immunologia opucholej. Zinatne, Riga, 1982, s. 42—158.
4. **Hadden, J. W.:** Immunomodulators in the immunotherapy of cancer and other diseases. Trends Pharmacol Sci. 3, 1982, č. 5, s. 191—194.
5. **Horáková, Z., Grimová, J.:** Naše zkušenosti s akutní fází chronického onemocnění u krys Freundovým adjuvans. Čs. fyziol. 17, 1971, s. 137—138.
6. **Hule, V., Hrubíško, M.:** Hematologie a krevní transfúze. Státní zdravotnické nakladatelství, Praha, 1969, s. 125—136.
7. **Chipens, G. I., Vegner, R. E.:** Immunological active stimulating the T- cell system. Ukrajinskij Bichemičeskij žurnal 58, 1986, č. 3, s. 91—103.
8. **Ogita, Z. I., Markert, G. L.:** A miniaturized system for electrophoresis polyacrylamide gels. Analytical biochemistry 99, 1979, s. 233—241.
9. **Rao, R. G.:** Linear statistical inference and its application. New York, John Wiley 1973.
10. **Talmadge, J. E.:** Biological response modifiers: Realizing their potential in cancer therapeutics. Trends in Pharmacological Sciences, 7, 1986, č. 7, s. 277—281.
11. **Zák, M., Dienstbier, Z., Foltýnová, V., Režný, Z.:** Vliv biostimulace Fibsem na Yoshidův sarkom a na některé hematologické ukazatele. Sborník Lékařský, 81, 1979, č. 8—9, s. 272—278.
12. **Zák, M., Novák, F., Muižnieks, I. O., Nikolejeva, V. R., Kamaradze, A. A., Maurina, H. A., Ferdats, A. K.:** Imunostimulační a protinádorové vlastnosti plišňového glykoproteinu A. Sborník lékařský, 88, 1986, č. 4—5, s. 139—145.

Došlo 3. 11. 1987



УДК 577.113.4

**КЛОНИРОВАНИЕ И НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
5'-ФЛАНКИРУЮЩЕЙ ОБЛАСТИ ГЕНА
ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ЧЕЛОВЕКА***Янкевич Э. Б., Макаренкова Г. И., Романчикова Н. В.*,
Муйжниец И. О., Циманис А. Ю.*, Грен Э. Я.***Латвийский государственный университет им. П. Стучки, Рига;*** Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига*

Клонирован хромосомный ген интерлейкина-2 человека и установлена нуклеотидная последовательность 5'-фланкирующей области (от -1940 до -936). Обнаружено несколько участков, имеющих значительную гомологию с промоторной областью этого гена.

Гуморальная регуляция иммунной системы наряду с циркулирующими антителами осуществляется с помощью растворимых медиаторов межклеточного взаимодействия — лимфокинов, группы веществ белковой природы с широким спектром биологической активности. Интерлейкин-2 (фактор роста Т-лимфоцитов) является ключевым лимфокином, участвующим в регуляции высококонсервативных процессов дифференцировки и пролиферации Т-клеток.

Недавно были клонированы кДНК [1, 2], хромосомные копии гена интерлейкина-2 человека из библиотеки лимфоцитарной ДНК в λ gt WES [3], из космидной библиотеки лимфоцитарной ДНК методом гомологичной рекомбинации *in vivo* [4], из библиотеки плацентарной ДНК в векторе Харона 4А [5]. Определена полная нуклеотидная последовательность гена, в том числе последовательность 5'- и 3'-фланкирующих районов гена [3, 6].

Изучение структуры клонированного хромосомного гена интерлейкина-2 позволило локализовать основные функционально важные элементы промотора, терминатора, энхансерную последовательность и индукцибельный гиперчувствительный к ДНКазе I район [7-9], а также *Kpn* I- и *Alu* I-повторы в очень отдаленных 5'- и 3'-фланкирующих областях [10].

Регуляторные области эукариотических генов могут располагаться на значительном расстоянии от точки инициации транскрипции, так что известная последовательность может оказаться недостаточно репрезентативной для полного выявления возможных регуляторных областей гена интерлейкина-2. Поэтому из библиотеки генов человека, полученной в векторе Харон 4А, мы извлекли клон, обозначенный X4A-ИЛ32 и содержащий полный ген интерлейкина-2 с 5'-фланкирующим районом. Сравнительный анализ рестрикционных карт позволяет сделать вывод, что ген интерлейкина-2 в клоне X4A-ИЛ32 имеет наибольшее сходство с геном интерлейкина-2, описанным в работах [3, 7]. Карта 5'-фланкирующего района сходна с физической картой, опубликованной Шиншо с соавт. [10], но популяция рекомбинантных фагов гетерогенна по числу *Xba*I-сайтов; кроме того, отсутствует *Bam*HI-сайт (рис. 1). Для более подробного картирования фрагмента 5'-фланкирующего района субклонировали в плазмиде рUC19.

В нашей работе приводятся новые данные о первичной структуре 5'-фланкирующего района гена интерлейкина-2 человека. В области инициации транскрипции по сравнению с последовательностью, опубликованной в работе [6], нами обнаружена вставка двух нуклеотидов, Т и С, в положении -14 и -15; кроме того, в районе от -1362 до -936 наблюдается еще 9 изменений: 4 делеции, 4 вставки и одна замена.

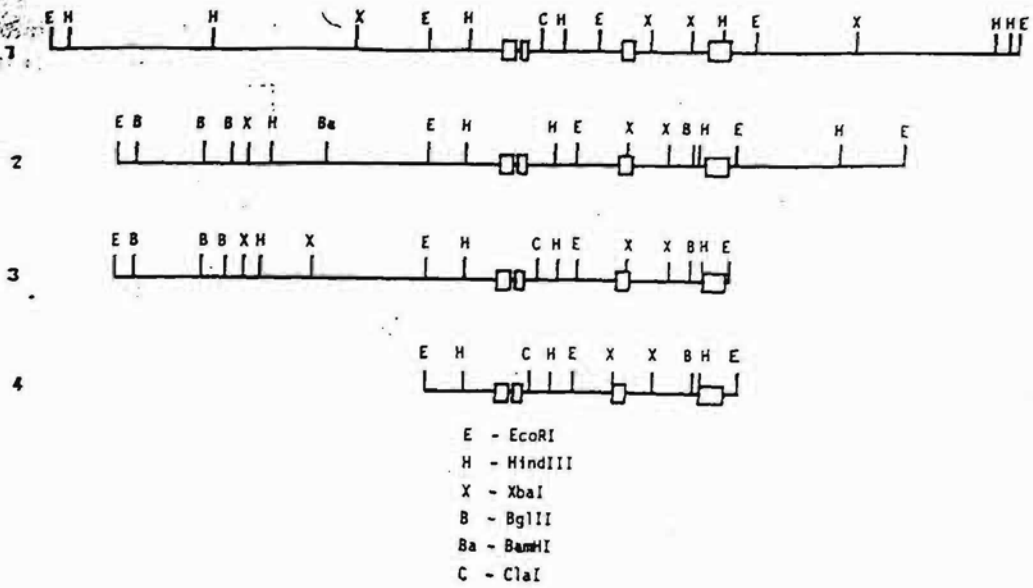


Рис. 1. Рестрикционные карты клонированных хромосомных генов интерлейкина-2 человека: 1 - Холбрук с соавт. [6]; 2 - Нишино с соавт. [10], 3 - данная работа, 4 - Фуджита с соавт. [3] и Линдмейер с соавт. [4]

```

-1940 TTCCATTCTG GAAGGGTAAA GGCCTGAGTG ATGATGCTGG GATTAGACAC
-1890 TGAAACTCTT TAGAGAAGCA AAACAAGTAT AATAAAGCTG TACTTTATTA
-1840 TATTAATAAA ATAACACACA GACTACCAAA TAGCCTGCC CTTATAACAG
-1790 CGTTAATGTG ATTTTGATCT GAAATGTATA GAGACATTTT GCATTTTTTC
-1740 GGTATAAAAA GTTCATGAGA TTTGGCCSTA ATCTGGACCT TTTCTTCATT
-1690 TTTTTTCTA CTTGAGGGAC TATAATCTTT ATTTTAAAT TTGTTTTATA
-1640 TTCTCCGAAC ATTACSTAAC GCATAGAAAA CTCTCTTGA ACCATTTTTC
-1590 TCTGTTCTTT GTAATAATT ACATTTGACT GTTCCTTGA CTGCTTTAAT
-1540 CATTCTGCC TATGCACCT CCAAAAATC CAGTTTAAAT TAATTGTTCC
-1490 TTATTCGAAG TTCCTTATAT CCACCTCCCT TGGGGCAGCA ATCACCTATC
-1440 ACCCAGGACT ACASTTGTGT ATGTACATAT CTTCCCTATT ACAAATCAGG
-1390 TTCTTTGAAA AAATACAAAT GGTAAGAGAG TGGATTTTTG GAGTCAGTAC
-1340 ATTCTCTTTT CAAATCCTTC TTCTGCCCTT TACTGGCAAT AAGGGCTGAG
-1290 TGACCTAGAG CAAATTAATT AACTTCTCTG AGCCTCAGTT TTCTAATCTG
-1240 CAAAATAGGA GCCATCACTT CACAAGTCTG TAAGACTTAT ATTAGACTAA
-1190 GTGCCTGCCT GTACACTGTT CTCTTTTCTC TCTTTCTATA TACCTGAAGG
-1140 CATTATAGGT GCTAGATGTC TGTTTAAAGA CCAGACAATA TTGTCTTAAA
-1090 AAAACAAACA AAAACACAGA CAATACCATC TTTAAAAAAA AAAAAGGTC
-1040 CAGGTAAGAA ATAAATAAGG CCATAGAATG GAAGCTTTAC AAGGACTCTC
-990 TGTGAGACAG GATCTCCTCA AGTGTCCCA GGTAAATTA GAAGTATATA
-940 TCCGT

```

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность 5'-фланкирующей области гена интерлейкина-2

На рис. 2 также приведена структура ранее неизвестного района 5'-фланкирующей области (от -1940 до -1363) гена длиной 578 нуклеотидов. Основной задачей машинного анализа этого района было выявление возможных регуляторных областей гена интерлейкина-2, в частности структур, ответственных за регуляцию транскрипции: промотора(ов), терминатора(ов) и энхансера.

Один из главных элементов терминаторов РНК-полимеразы II - сильно выраженная вторичная структура. При анализе инвертированных повторов было обнаружено несколько участков, способных образовывать шпильчатые структуры: от -1868 до -1840 ($\Delta G = -11,7$ ккал моль), от -1323 до -1293 ($\Delta G = -12,3$ ккал моль), от -158 до -131 ($\Delta G = -11,9$ ккал моль) и от -170 до -141 ($\Delta G = 10,1$ ккал моль), выполняющие функцию терминации РНК-полимеразы.

В анализируемой последовательности нами обнаружено несколько участков ДНК, имеющих весьма выраженную гомологию с промоторной

областью гена интерлейкина-2. На рис. 3 приведены четыре района, имеющие схожую последовательность. Все эти участки ДНК имеют близкую по сравнению с функциональными элементами промотора структуру: ТАТА-бокс, САТ-бокс и Сар-сайт. Несмотря на некоторые различия в расстоянии между теми или другими промоторными структурами, они расположены в теоретически допустимых для РНК-полимеразы пределах.

На рис. 4 приведены регуляторные области, как известные из литературных источников, так и предполагаемые нами, которые расположены в 5'-фланкирующем районе хромосомного гена интерлейкина-2.

Экспериментальная часть

Для создания геномной библиотеки человека использовали ДНК из лейкоцитов периферической крови человека, в качестве вектора — фаг Харрон 4А [11]. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК, выделение их из геля, клонирование и картирование рекомбинантных плазмид проводилось по методикам, описанным в книге [12].

Первичная структура клонированных фрагментов была определена методом Сенгера [13] на двухцепочечной матрице. Анализ нуклеотидной последовательности 5'-фланкирующей области проводился на вычислительной машине «Искра-226» с использованием программ для обработки ДНК, полученных из Института молекулярной генетики АН СССР.

Мы приносим искреннюю благодарность В. М. Берзнию за любезно предоставленный препарат лейкоцитарной ДНК человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Taniguchi T., Matsui H., Fujita T., Takaoka G., Kashima N., Yoshimoto R., Hamuro J. // *Nature*. 1983. V. 302. № 5906. P. 305–310.
2. Devos R., Plaetink G., Cheroutre H., Simons G., Degraeve W., Tavernier J., Remaut E., Fiers W. // *Nucl. Acids Res.* 1983. V. 11. № 13. P. 4307–4323.
3. Fujita T., Takaoka G., Matsui H., Taniguchi T. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1983. V. 80. № 24. P. 7437–7441.
4. Lindenmaier W., Dittmar K. E., Hauser H., Neckes A., Sebald W. // *Gene*. 1985. V. 39. № 1. P. 33–39.
5. Mita S., Maeda S., Obaru K., Nishino N., Shimada K., Hirano T., Onoue K., Ogawa T., Ogawa H. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1983. V. 117. № 1. P. 114–121.
6. Holbrook N. I., Smith K., Fornace A., Comeau C. M., Wiskocil R. L., Crabtree G. R. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1984. V. 81. № 6. P. 1634–1638.
7. Holbrook N., Lieber M., Crabtree G. // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. № 12. P. 5003–5013.
8. Durand D. B., Bush M. R., Morgan J. G., Weiss A., Crabtree G. R. // *J. Exp. Med.* 1987. V. 165. № 2. P. 395–407.
9. Fujita T., Shibuya H., Ohashi T., Yamanishi K., Taniguchi T. // *Cell*. 1986. V. 46. № 3. P. 401–407.
10. Nishino N., Obaru K., Maeda S., Shimada K., Onoue K. // *Biomed. Res.* 1985. V. 6. № 4. P. 197–205.
11. Sternberg N., Tiemeier D., Engvist L. // *Gene*. 1977. V. 1. № 3–4. P. 255–280.
12. Мануарис Т., Фриш Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
13. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1977. V. 74. № 12. P. 5463–5467.

Поступила в редакцию
28.III.1989

CLONING AND NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE 5'-FLANKING REGION OF THE HUMAN INTERLEUKIN-2 GENE

JANKEVICS E., MAKARENKOVA G., ROMANTCHIKOVA N.*, MUIZNIKS I.,
TSIMANIS A.*, GREN E.*

*Latvian State University, Riga; *Institute of Organic Synthesis,
Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga*

We have cloned human interleukin-2 gene and sequenced its 5' flanking region (–1950 to –936). The region contains promoter like structures having a high degree of homology with the real promoter.

УДК 6

А. А. Камрадзе, Д. И. Эзе, З. Э. Петрния,
В. Р. Николаева, И. О. Муйжниекс

РЕАКЦИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ НА ВВЕДЕНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРА — ГЛИКОПРОТЕИНА А

Гликопротеин А, препарат, выделенный и очищенный нами из роскопического гриба рода *Penicillium*, обладает иммуностимулирующими и противоопухолевыми свойствами [5]. Однако пока не изучено его влияние на различные звенья иммунного процесса и механизм действия. Целью данной работы явилось установление влияния введения в организм животных гликопротеина на тимус и селезенку, на количество клеток крови, а также изучение пирогенности препарата.

В качестве объектов исследования использовались кролики (1; 2,4 кг) и мыши линий СВА и С57В1 (18—20 г), полученные из питомника Рижского медицинского института.

Кроликам интравенозно вводили гликопротеин А по 0,25 и 3,5 каждому. Мышам интраперитонеально вводили вакцину БЦЖ (Талкентский НИИ вакцин и сывороток) — 2,5 мг/кг, декарис («Gede Richter» А. О. ВР) — 3,0 мг/кг, пропермил («Mil Laboratories», Италия) — 100 мг/кг, интерлейкин-2 (ИЛ-2, Экспериментальный завод Института органического синтеза АН ЛатвССР) — 500 000 ед./кг, бичий сывороточный альбумин (БСА, «Serva», ФРГ) — 8,75 мг/кг, гликопротеин А — 2,5, 8,75, 12,5 и 30,0 мг/кг. Кроме того, использовали инактивированный нагреванием (80 °С, 20 мин) гликопротеин А. Все контрольным животным вводили соответствующий объему препарат объем физиологического раствора.

Пирогенность гликопротеина А определяли на кроликах в соответствии с требованием Фармакопеи СССР [3].

До введения и через разные интервалы времени после введения препаратов брали кровь для подсчета форменных элементов крови.

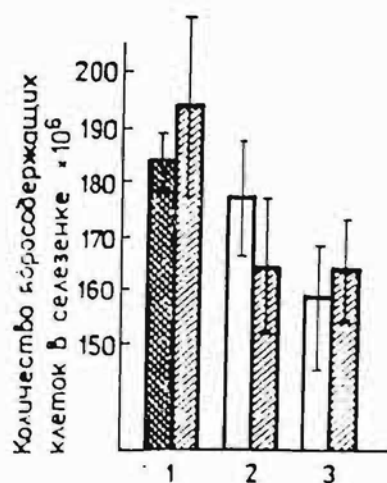


Рис. 1. Влияние гликопротеина А на число ядерсодержащих клеток в селезенке. 1 — 0,9%-ный NaCl 0,5 мл, 2 — БСА 0,5 мл, 8,75 мг/кг, 3 — гликопротеин А 0,5 мл, 8,75 мг/кг. — контрольный показатель интактных животных, — 12 ч после инъекции, — 24 ч после инъекции

СОДЕРЖАНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ И ЛЕЙКОЦИТОВ В КРОВИ МЫШЕЙ
ЧЕРЕЗ 24 Ч ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ

Препарат, доза	Кол-во клеток в 1, мкл крови			
	СВА		С57В1	
	Эр 10 ⁶	Лей 10 ³	Эр 10 ⁶	Лей 10 ³
1. 0,9%-ный NaCl	1,19—0,25	9,35—0,57	1,3—0,1	10,5—0,4
2. БСА, 8,75 мг/кг	—	—	0,9—0,1	9,0—0,5
3. Гликопротеин А, 8,75 мг/кг	—	—	0,9—0,1	7,9—0,5
4. Гликопротеин А, 12,5 мг/кг	1,24—0,07	9,67—1,42	—	—
5. Декарис, 3,0 мг/кг	1,14—0,06	15,80—1,75	—	—
6. Пропермил, 100 мг/кг	1,12—0,11	9,40—1,06	—	—
7. БЦЖ, 2,5 мг/кг	1,21—0,10	7,95—0,76	—	—
8. ИЛ-2, 500 000 ед./кг	1,38—0,01	6,35—0,30	—	—

лейкоцитарной формулы. Через 12 и 24 ч после введения мышам БСА и гликопротеина А определяли индексы тимуса и селезенки, а также количество ядросодержащих клеток в селезенке. Форменные элементы крови считали на «Picoscale (BP)».

Экспериментальную группу животных составляли 3 кролика и 6—10 мышей. Результаты обрабатывали статистически.

Полученные данные свидетельствуют, что гликопротеин А существенно не изменяет индексы селезенки и тимуса, но уменьшает количество ядросодержащих клеток в селезенке через 12 ч после введения препарата (рис. 1). Число ядросодержащих клеток уменьшается также после введения БСА. Как известно, убыль клеток в селезенке происходит в первые 24 ч в ответ на действие разнообразных раздражителей [1].

У мышей линии С57В1 после введения гликопротеина А уменьшается содержание в крови лейкоцитов и эритроцитов (табл. 1). Уменьшение количества лейкоцитов можно объяснить рекрутированием их в место инъекции чужеродного белка, а причину исчезновения эритроцитов надо еще исследовать.

Однако такие большие дозы гликопротеина А (8,75 и 12,5 мг/кг) в экспериментах обычно не использовались, а при введении доз, стимулирующих иммунный ответ, никаких побочных явлений не наблюдалось.

Уменьшение количества лейкоцитов наблюдается также у мышей линии СВА после введения БЦЖ и ИЛ-2, а количества эритроцитов — после введения декариса и пропермила. Декарис вызывает существенное увеличение количества лейкоцитов в крови.

В экспериментах на кроликах установлено, что гликопротеин А изменяет лейкоцитарную формулу крови (рис. 2) — уменьшает процентное содержание лимфоцитов и увеличивает содержание псевдоэозинофилов (или нейтрофилов) [2]. Самые большие изменения наблюдаются при введении 3,5 мг препарата в первые 6 ч после инъекции — псевдоэозинофилы составляют 60—65% от всех лейкоцитов. Эффект является дозозависимым — через 6 ч после введения 0,25 мг препарата псевдоэозинофилы составляют 35,5% от всех лейкоцитов. При этом изменения под влиянием нативного гликопротеина А более продолжительные, чем под влиянием инактивированного. После применения инактивированного препарата лейкоцитарная формула нормализуется за 12 ч, а нативного — только за 24—48 ч.

Аналогичный нейтрофильный лейкоцитоз, продолжающийся около 12 ч, причем со значительным ядерным сдвигом влево, в сторону молодых форм (палочкоядерные лейкоциты составляют около 30%), наблюдается у мышей после внутрибрюшинного введения гликопротеина А (табл. 2). Содержание нейтрофилов увеличивают также декарис, ИЛ-2, БЦЖ и в небольшой мере — пропермил. Соответственно пони-

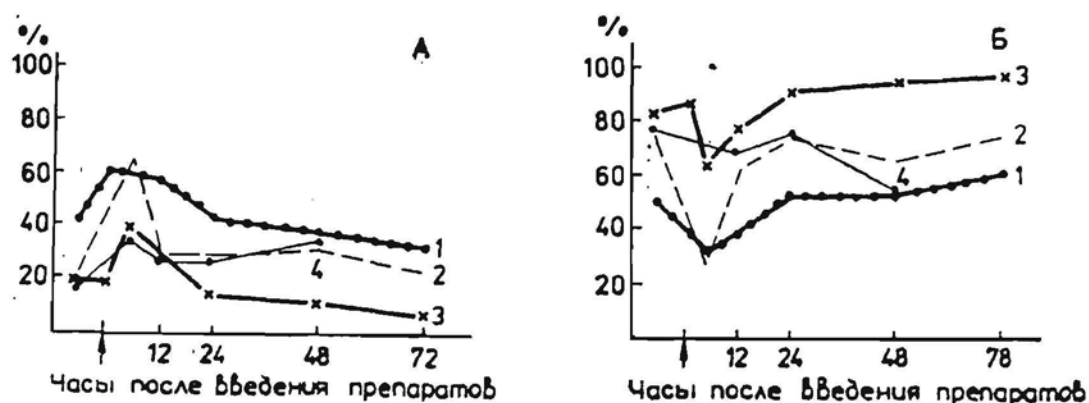


Рис. 2. Изменение процентного содержания псевдоэозинофилов (А) и лимфоцитов (Б) в крови кроликов после введения гликопротеина А. 1 — нативный гликопротеин А 3,5 мг; 2 — инактивированный гликопротеин А 3,5 мг; 3 — нативный гликопротеин А 0,25 мг; 4 — физиологический раствор

жается содержание лимфоцитов. Процентное содержание других лейкоцитов существенно не меняется.

Пероральное введение мышам линий СВА и С57В1 очищенного гликопротеина А и экстракта гриба, содержащего гликопротеин А, в дозах 5, 10, 15 и 35 мг/кг в течение 24 ч не вызывает существенных изменений в лейкоцитарной формуле крови.

Гликопротеин А, как нативный, так и инактивированный, обладает пирогенным действием (рис. 3), максимальное выражение которого наблюдается через 1,5—3 ч и заканчивается через 6 ч после введения препарата. Как известно, экзогенными пирогенами являются эндотоксины грамотрицательных бактерий, а эндогенные пирогены образуются и высвобождаются из нейтрофильных гранулоцитов и других клеток ретикулоэндотелиальной системы [4].

Можно предположить, что в ответ на действие гликопротеина А, так же как и на другие раздражители, вначале развиваются неспеди-

Таблица 2

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ НА ЛЕЙКОЦИТАРНУЮ ФОРМУЛУ КРОВИ МЫШЕЙ ЛИНИИ СВА*

Препарат	Ч после введ.	Нейтрофилы		Лимфоциты
		палочко-ядерные	сегменто-ядерные	
0,9%-ный NaCl	6	4,5—1,6	2,0—1,2	92,8—0,8
	12	11,0—3,3	6,8—2,7	80,0—5,4
	24	2,0—1,4	0,5—0,5	97,5—1,5
	48	10,0—2,4	2,0—0,7	88,0—2,7
Декарис	6	6,4—2,4	3,8—3,1	87,6—5,0
	12	12,5—3,1	11,8—1,4	75,3—1,7
	24	6,5—2,9	4,3—1,7	89,0—4,7
Пропермил	24	8,0—2,1	8,3—1,7	83,7—3,0
	48	4,3—0,9	0,7—0,7	95,0—1,5
Гликопротеин А	6	30,3—9,5	5,5—2,1	64,0—10,7
	12	9,3—1,4	6,2—2,1	81,8—1,8
	24	6,7—2,1	2,6—1,8	90,3—3,5
	48	4,7—1,4	2,3—1,1	92,5—1,8
БЦЖ	12	5,2—1,4	3,6—2,2	90,8—3,8
	24	16,0—4,0	1,5—1,5	82,5—2,5
	48	20,4—3,5	7,1—2,1	70,0—5,3
ЦП-2	6	20,6—6,6	5,0—3,1	74,4—9,6
	24	13,0—0,6	5,0—1,2	78,7—1,9
	48	16,3—2,6	6,3—2,3	78,5—5,1

* Не указаны содержание эозинофилов, базофилов и моноцитов.

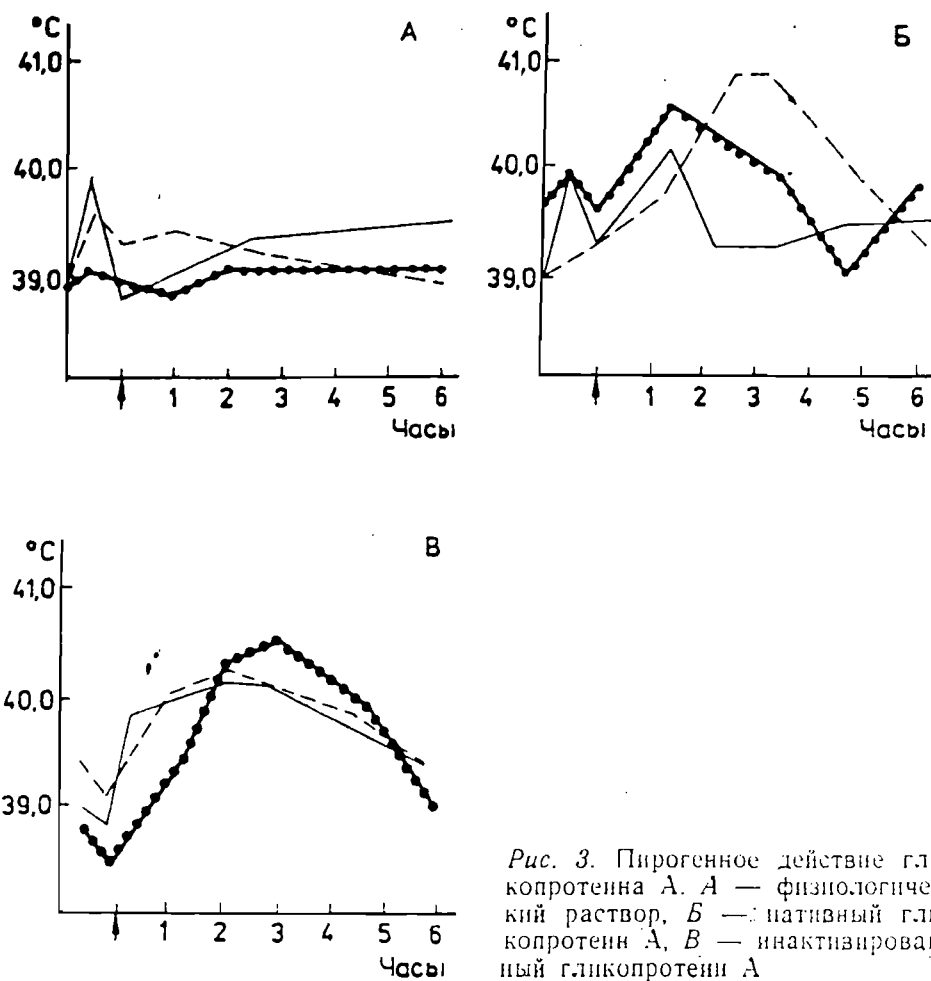


Рис. 3. Пирогенное действие гликопротеина А. А — физиологический раствор, Б — нативный гликопротеин А, В — инактивированный гликопротеин А

фические изменения, связанные с нейтрофильным лейкоцитозом и высвобождением из гранулоцитов пирогенов.

Известно, что большинство клеток и молекул, участвующих в защите организма, вовлекаются и в воспалительную реакцию, и в иммунный ответ. Система полиморфноядерных лейкоцитов начинает действовать уже на первой фазе ответа и обеспечивает тесную связь иммунитета с реакцией воспаления. Можно сделать заключение, что иммуномодулятор гликопротеина А вызывает изменения в системе крови аналогично другим препаратам, которые действуют в иммунных и воспалительных реакциях.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоусова О. И., Горизонтов П. Д., Хаитов Р. М. и др. Реакция системы крови на однократное введение полиакриловой кислоты // Пат. физиол. и эксперим. терапия. — 1983. — Вып. 4. — С. 38—43.
2. Гольдберг Д. Н., Гольдберг Е. Д., Шубин Н. Г. Гематология животных. — Томск: изд. ТГУ, 1973. — 182 с.
3. Государственная Фармакопея СССР. 10-е изд. — М., 1968. — С. 953.
4. Handbook of experimental pharmacology. Vol. 50/1. Inflammation / Ed. by J. R. Vane, S. H. Ferreira. — B.; Heidelberg; N. Y., 1978. — 784 p.
5. Zak M., Novak F., Muižnieks I. O. et al. Immunostimulační a protinadorové vlastnosti plisnového glykoproteínu A // Sborník lékařský. — 1986. — Sv. 88, č. 4-5. — S. 139—145.

Латвийский ордена Трудового Красного Знамени
государственный университет им. П. Стучки

Дата поступления 13.09.89.

Successive binding of *raf* repressor to adjacent *raf* operator sites in vitro

Charalampos Aslanidis*, Indrikis Muiznieks**, and Rüdiger Schmitt

Lehrstuhl für Genetik der Universität Regensburg, Universitätsstrasse 31, D-8400 Regensburg, Federal Republic of Germany

Received March 20, 1990

Summary. The *raf* repressor negatively regulates the transcription of the *raf* operon which encodes functions required for the uptake and hydrolysis of raffinose in *Escherichia coli*. Overexpression of the repressor gene under *lac* promoter control led to the formation of inclusion bodies. These were partially purified by centrifugation, solubilized in 0.1% SDS and reactivated by dilution. DNase I protection and gel retardation experiments demonstrated the specific binding of *raf* repressor to DNA fragments that contained the previously identified *raf* operator, an element comprising two 18 bp palindromic nucleotide sequences that flank the -35 *raf* promoter box. By using DNA fragments with one, two, or four copies of the 18 bp palindrome, these experiments revealed concentration dependent, successive occupation of all available binding sites by *raf* repressor. Melibiose released the repressor from the operator complexes, whereas raffinose and other α -galactosides did not, indicating that melibiose is the actual inducer in vivo. We suggest that successive occupation by repressor of two strategically located operator sites is a specific type of stepwise down-regulation of gene expression in response to repressor concentration.

Key words: *raf* operon – *raf* repressor – Gel retardation analysis – Footprinting – Multiple operator sites

Introduction

The efficiency of transcription regulation by repressor proteins is determined by at least three parameters: (1) the precise recognition of a particular operator DNA sequence; (2) the relative position of the operator within

the promoter sequence; and (3) the existence of secondary operator sites at some distance from the promoter.

The well-studied operator-repressor systems are based on specific interactions between a palindromic DNA sequence and an alpha-helix which recognizes details of the major groove of the symmetrical operator DNA. This recognition helix is part of a helix-turn-helix motif that was first identified in phage lambda Cro protein (Ohlendorf et al. 1982), but similar structures have since been found and implicated in the binding reactions of other repressors and related proteins (reviewed by Pabo and Sauer 1984).

Studies of various promoter operator combinations have shown that in addition to RNA polymerase-promoter interactions, the position of an operator within the promoter sequence dramatically affects the degree of occupancy of the operator by its repressor, which ultimately defines the efficiency of repression (Lanzer and Bujard 1988). Accordingly, an operator located between the -10 and -35 promoter boxes allows a much tighter control than operators located adjacent to, but either upstream or downstream of the promoter. In recent years, additional operator sequences at considerable distances from the promoter have been identified in various regulatory systems of *Escherichia coli* and found to be essential for the correct regulation of gene expression (Fritz et al. 1983; Irani et al. 1983; Dunn et al. 1984; Tuggle and Fuchs 1986; Valentin-Hansen et al. 1986). In the *lac* system, a second operator located within the coding region of the *lacZ* gene has been implicated in determining the degree of repression (Eismann et al. 1987). The tetrameric *lac* repressor is thought to bind to two operators, thereby inducing the intervening DNA to form a loop (Krämer et al. 1987).

The raffinose (*raf*) regulatory system may exploit several mechanisms to control gene expression. Three *raf* structural genes are under the negative control of a repressor, which exhibits an N-terminal helix-turn-helix motif in its derived primary structure (Aslanidis et al. 1989; Aslanidis and Schmitt 1990). The *raf* repressor has the potential to form tetramers in vitro, suggesting

Offprint requests to: R. Schmitt

* Present address: Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, Calif., USA

** Present address: Faculty of Biology, P. Stucka Latvian State University, Riga, Latvian SSR, USSR

that it may interact with two operators in vivo (Jaenicke et al. 1990). Cloning and repressor titration in vivo has confined the *raf* operator to two nearly identical 18 bp palindromic DNA sequences that flank the -35 box of the *raf* promoter (Aslanidis and Schmitt 1990). However, on the basis of these experiments it could not be decided whether the two adjacent operator sites (separated by only 3 bp) are occupied simultaneously or successively and whether bound repressor molecules interact with each other.

In this study we have, therefore, analyzed the binding of isolated, active *raf* repressor to operator DNA in vitro. Footprinting experiments confirmed the allocation of the 18 bp palindromes to operator sites and gel retardation revealed successive occupation of these sites by different repressor molecules.

Materials and methods

Chemicals and enzymes. [32 P]Deoxyribonucleotides (≤ 3000 Ci/mmol) were obtained from Amersham Buchler (Braunschweig, FRG), melibiose was obtained by sodium borohydride reduction of melibiose (French et al. 1953) and galactinol was a gift from L. Lehle (University of Regensburg). Restriction endonucleases and other enzymes were obtained from Boehringer (Mannheim, FRG), New England Biolabs (Beverly, USA) and Pharmacia (Freiburg, FRG) and were used as recommended by the manufacturers. A sequencing kit from DuPont de Nemours (Dreieich, FRG) was used for chemical DNA sequence analysis (Maxam and Gilbert 1980).

Bacterial strains and plasmids. *E. coli* JM109 *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ (lac pro) F' traD36 proAB lac^r lacZ Δ M15* (Yanisch-Perron et al. 1985) was used as host for the overexpression of *raf* repressor. Plasmids were constructed according to standard procedures (Maniatis et al. 1982). pRU647 carries the 13 kb *HindIII*-*ScaI* fragment that includes *rafR* (Fig. 1) inserted in pUC8 (Vieira and Messing 1982); pRU984 contains this segment as a 1.3 kb *HindIII*-*BamHI* fragment from pRU647 (Fig. 1) cloned in pUC13 (Yanisch-Perron et al. 1985). The two plasmids differ in the relative polarities of P_{lac} and *rafR*, which are in opposite orientations in pRU647 and tandemly arranged in pRU984 (Fig. 2). A set of plasmids containing different combinations of the operator sites, O_1 and O_2 , were obtained as follows (see Fig. 1). The 170 bp *PstI* fragment (O_1O_2 ; pRU645), the adjacent 182 bp *PstI* fragment (JO ; pRU646), the 44 bp *Sau3A* fragment (O_1O_2 ; pRU952) and two tandem *Sau3A* fragments ($O_1O_2O_1O_2$; pRU1316) were ligated into the *PstI* or *BamHI* sites of pUC8. O_1 and O_2 were separated by cloning the 108 bp *AsuI*-*HindIII* fragment (O_1 ; pRU1315) and the 91 bp *AsuI*-*EcoRI* fragment (O_2 ; pRU1314) of pRU645 into the *AccI* *HindIII* and *AccI* *EcoRI* sites, respectively, of pUC13.

Overproduction and isolation of the *raf* repressor. Cells of *E. coli* JM109(pRU984) were grown overnight at

37°C in Luria Broth without glucose, supplemented with ampicillin (100 μ g/ml) and IPTG (1 mM). Cells were harvested and either extracted by boiling for 10 min in buffer (50 mM TRIS-HCl pH 6.8, 1% SDS, 1% mercaptoethanol, 2 mM EDTA) for gel electrophoresis or resuspended in 25 mM TRIS-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA (approx. 3×10^{11} cells/ml) for repressor isolation as follows. Lysozyme was added to a final concentration of 0.25 mg/ml and, after 30 min on ice, the cells were disrupted using a French press. The lysate was adjusted to 2% Triton X100, 0.5 M NaCl, 40 mM TRIS-HCl pH 6.5, 8 mM EDTA, and was homogenized with an Ultra-Turrax dispersing tool T25 (IKA Labor-technik, Staufen, FRG). The homogenate was kept at 4°C with gentle shaking for 30 min. Inclusion bodies were sedimented (Sorvall centrifuge, 25000 $\times g$, 45 min), adjusted to the previous volume by the addition of 100 mM TRIS-HCl pH 6.5, 20 mM EDTA and homogenized again. The centrifugation-homogenization steps were repeated three times. The final sediment was homogenized in an equal volume of 25 mM TRIS-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS and was kept overnight at 4°C. After centrifugation (40000 $\times g$, 15 min), the supernatant containing the repressor was stored at 4°C. Solubilization in the presence of 0.1% SDS was repeated until the sediment was completely dissolved. Functional repressor was recovered from this solution (stored at 4°C) over a period of at least 3 months. The amino-terminal peptide sequence of the solubilized repressor protein was determined on an Applied Biosystems 470A gas-phase protein sequencer.

Fragments for retardation gels. Plasmids containing the operator sites were digested with *EcoRI*-*HindIII* and 3'-end-labelled with α [32 P]dATP and the Klenow fragment of DNA polymerase I. For DNase I protection experiments, the *EcoRI*-*PstI* *rafO*⁻ fragment from pRU984 was 3'-end-labelled as above and gel purified on 5%–10% polyacrylamide.

Gel electrophoresis. Gel retardation analyses were performed essentially as described by Fried and Crothers (1981) and by Garner and Revzin (1981). DNA fragments to be tested were 3'-end-labelled and were purified on polyacrylamide gels (Maniatis et al. 1982). Approximately 5 fmol of the DNA fragment of interest was incubated in binding buffer with one-tenth volume of *raf* repressor diluted from stock solution in 10 mM TRIS-HCl pH 8, 1 mM EDTA to tenfold the desired final concentration. A modified binding buffer (Riggs et al. 1970) containing 10 mM TRIS-HCl pH 8, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 50 μ g/ml BSA was used, unless stated otherwise. After 10 min at room temperature, 1 μ l of 50% glycerol in binding buffer with 0.06% bromophenol blue and 0.06% xylene cyanol was added. Polyacrylamide gels (7 \times 7 cm; 1 mm thick; 5% acrylamide:bisacrylamide, 38:2) in 45 mM TRIS-borate, 1.5 mM EDTA pH 8.3 were pre-run for 30 min at 70 V at room temperature. When the samples had been loaded, electrophoresis was performed under the same conditions, the duration depending on the lengths of

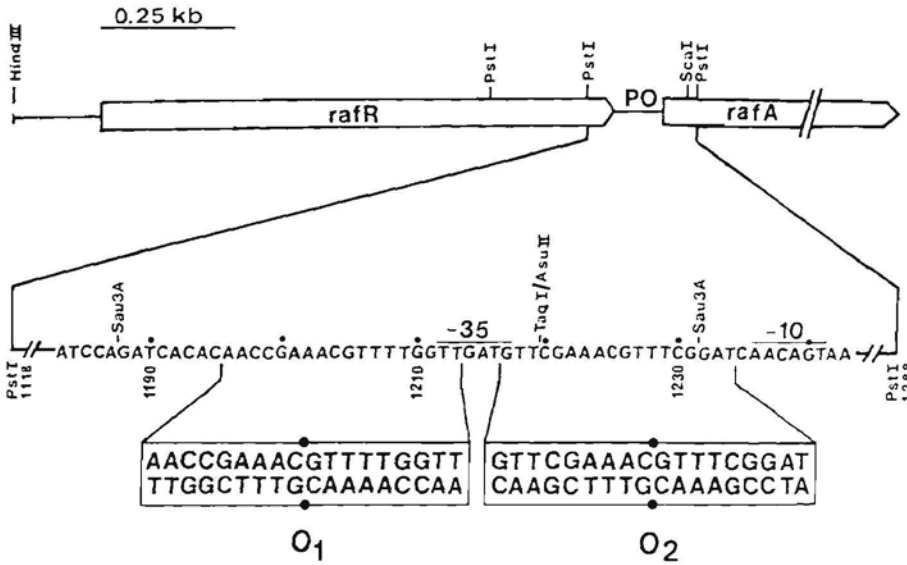


Fig. 1. Portion of the *raf* operon with repressor (*rafR*) and α -galactosidase (*rafA*) genes and the regulatory region containing the promoter (P) and operator (O). The promoter (-10, -35) and two putative operator sequences (O₁ and O₂; symmetry centres marked by dots) are shown on expanded scales. Sequence numbering according to Aslanidis and Schmitt (1990). Restriction sites delimiting fragments used for repressor binding are indicated

the respective fragments. After electrophoresis, the gel was covered with Saranwrap and autoradiographed at 4° C on Wicor XRP film.

DNase I protection experiments. The assay used for footprinting was a modification of published procedures (Craig and Nash 1984; Brown et al. 1988). For the binding reaction, the 3'-end-labelled DNA fragment (about 10 fmol) was dissolved in 20 μ l binding buffer and mixed with various amounts of *raf* repressor (0–300 ng). The mixtures were incubated at 20° C for 10 min. One microliter of DNase I solution (either 250 ng/ml or 750 ng/ml) was added to the appropriate mixtures and, after 5 and 2 min, respectively, digestion was stopped by addition of 20 μ l of 100 mM EDTA, 600 mM ammonium acetate and 20 μ g/ml sonicated herring sperm DNA. The DNA in the reaction mixtures was ethanol precipitated, washed in 70% ethanol, vacuum dried and redissolved in 5 μ l loading buffer (80% formamide, 1 mM EDTA, 0.1% xylene cyanol and bromphenol blue). After incubation at 90° C for 10 min, samples were analyzed by electrophoresis in a 6% polyacrylamide gel in 90 mM TRIS-borate pH 8.5, 2.5 mM EDTA, 7 M urea.

Results

Overexpression and re-activation of *raf* repressor

The *rafR* gene, on a 1.3 kb *Hind*III-*Sca*I fragment (Fig. 1), was cloned next to the *lac* promoter (*P*_{lac}) of pUC8 and pUC13 (Vieira and Messing 1982; Yanisch-Perron et al. 1985) in the "non-expression", head-to-head configuration (pRU647) and in the "high-expression", head-to-tail configuration (pRU984; Fig. 2A). When transformants of *E. coli* JM109 were grown in the presence of inducer (1 mM IPTG) and their cell extracts analyzed by SDS gel electrophoresis, a prominent new protein band of apparent *M*_r 40000 (and a minor

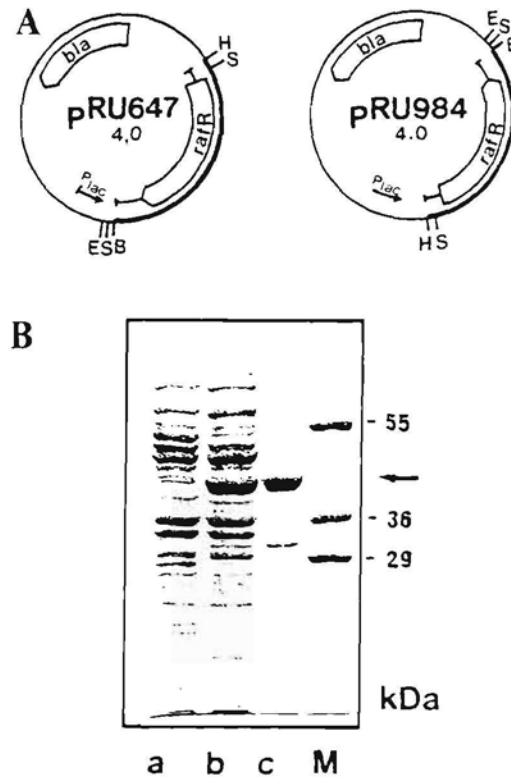


Fig. 2A and B. Overexpression of cloned *raf* repressor. **A** Recombinant plasmids pRU647 (non-productive control) and pRU984 used for the overproduction of repressor protein under *lac* promoter (*P*_{lac}) control. The location and polarity of *P*_{lac} and two genes (*rafR*, *raf*-repressor; *bla*, β -lactamase) are shown. Restriction sites: **B**. *B*amHI; *E*, *E*coRI; *H*, *H*indIII; *S*, *S*maI. **B** Determination by gel electrophoresis of *raf* repressor production, size and relative purity. Cells of *Escherichia coli* JM109 containing either pRU647 or pRU984 were grown and extracted. Samples (50 μ l) were analyzed on 0.1% SDS-10% polyacrylamide as follows. Lane a, crude extract of JM109(pRU647); lane b, crude extract of JM109(pRU984); lane c, isolated inclusion bodies from JM109(pRU984) solubilized in 0.1% SDS; lane d, molecular weight standards (in kilodaltons, kDa). Arrow indicates *raf* repressor (apparent *M*_r 40000).

band probably resulting from partial degradation of the protein) was seen in extracts of JM109/pRU984 (Fig. 2B, lane b) but not in extracts of JM109/pRU647 (Fig. 2B, lane a). The location of the new band was consistent with the expected M_r 36700 of monomeric *raf* repressor, derived from the nucleotide sequence (Aslanidis and Schmitt 1990). The overexpressed repressor protein, amounting to ca. 15% of total cell protein, accumulated as proteinaceous granules (inclusion bodies), visible by light and electron microscopy (not shown). After isolation and partial purification by repeated low speed centrifugation, these contained over 70% repressor protein as judged by electrophoresis (Fig. 2B, lane c). The N-terminal sequence of this protein, H₂N-ser-leu-lys-ala-ile-ala-thr-thr, conforms to that predicted from the DNA sequence (Aslanidis and Schmitt 1990), except that it lacks the first methionine residue. The removal of N-terminal methionine by post-translational processing (Sherman et al. 1984) obviously does not prevent the specific binding of repressor to operator DNA (see below), although the crucial helix-turn-helix motif is located at the amino-terminus (Aslanidis and Schmitt 1990).

Only one of the several methods tested led to reconstitution of active repressor from inclusion bodies. This involved solubilization of isolated inclusion bodies by homogenization in the presence of 0.1% SDS and subsequent dilution to 0.015% SDS or less. At this concentration the detergent no longer interfered with the specific binding of repressor to operator DNA (see below). On the other hand, solubilization in 0.3% SDS irreversibly inactivated the repressor protein.

Raf repressor binds successively to operator sites *in vitro*

Electrophoresis in dilute non-denaturing polyacrylamide gels (Fried and Crothers 1981; Garner and Revzin 1981) was used to study the interaction of *raf* repressor with linear DNA fragments carrying one, two, or four palindromic *raf* operator sites. Preliminary experiments indicated that bivalent cations, such as Mg²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺ or Mn²⁺, interfere with and DTT promotes the binding of *raf* repressor to operator DNA. Therefore, subsequent experiments were performed with a modified binding buffer (Riggs et al. 1970) containing 1 mM EDTA and 10 mM DTT, but no Mg²⁺ (Materials and methods).

Figure 3 shows the electrophoretic behavior of the 170 bp *Pst*I fragment of pRU645 containing the native operator (Fig. 1), in the presence (lanes b-d) and in the absence (lane a) of increasing amounts of *raf* repressor. Two retarded bands are observed, one of intermediate mobility at low repressor concentrations (lanes b, c) and the other of slower mobility at high repressor concentration (lane d). We suggest that this pattern results from the successive binding of two molecules of the *raf* repressor to two operator sites, O₁ and O₂. Two controls included in Fig. 3 confirm the specificity of the repressor operator interaction in the *in vitro* system used. First, the electrophoretic mobility of the "operator-free"

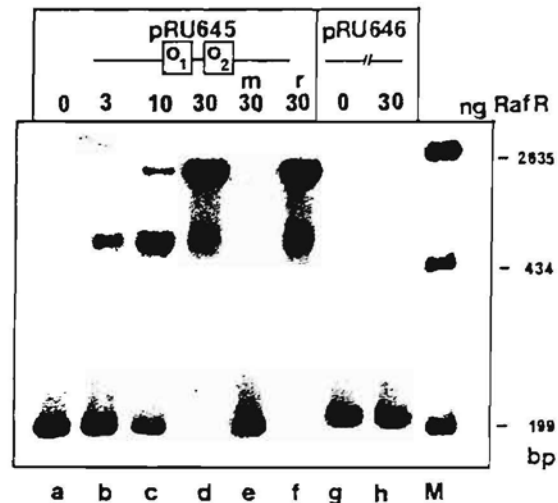


Fig. 3. Titration of DNA fragments containing the *raf* operator with *raf* repressor. The *raf*O₁O₂ fragment (199 bp) of pRU645 (lanes a-f) and the *Araf*O fragment (212 bp) of pRU646 (lanes g, h) were produced by digestion with *Eco*RI and *Hind*III. 3' end-labelled and gel purified. About 15 fmol of fragment DNA were incubated with the indicated amounts of the *raf* repressor. Lanes e and f, 5 mM melibiose (m) and 5 mM raffinose (r), respectively, were added to the incubation mixture before digestion. Lane M, size markers

182 bp *Pst*I fragment of pRU646 was not altered in the presence of *raf* repressor (Fig. 3, lanes g, h). Second, the addition of 5 mM melibiose (an *in vivo* inducer of the *raf* operon) to the binding reaction prevented the formation of a *raf* repressor-*raf* operator complex (Fig. 3, lane e). On the other hand, 5 mM raffinose (the other *in vivo* inducer) did not prevent complex formation (Fig. 3, lane f). These results imply a specific interaction between melibiose, but not raffinose, and *raf* repressor. This indicates that melibiose is the actual inducer of the *raf* operon, whereas raffinose must be processed *in vivo* prior to induction. Other α -galactosides, such as melibiose (glucitol-1,6- α -D-galactoside), galactinol (myoinositol- α -D-galactoside), and *p*-nitrophenyl- α -D-galactoside or D-galactose itself did not interfere with the binding of *raf* repressor to *raf* operator DNA (data not shown).

The successive binding of *raf* repressor to two operator sites present on one fragment (Fig. 3, lanes a-d) suggested that each palindromic sequence can independently bind one repressor molecule. We, therefore, analyzed the interaction of *raf* repressor with single operator sites, O₁ and O₂, located on separate fragments derived from pRU1314 and pRU1315. The observed retention of both these fragments upon incubation with *raf* repressor (Fig. 4, lanes a-f) confirmed our notion that one 18 bp palindrome is sufficient for stable repressor binding.

Finally, an artificial construct with four operator sites in tandem arrangement (pRU1316) was tested for *raf* repressor binding. The use of *Sau*3A sites (Fig. 1) for cloning resulted in almost equal spacing of the four 18 bp palindromes, which are separated by either three or four nucleotides. Figure 4 (lanes g-k) shows the titration experiment with increasing *raf* repressor. The electrophoresis pattern, with four bands of increasing retardation,

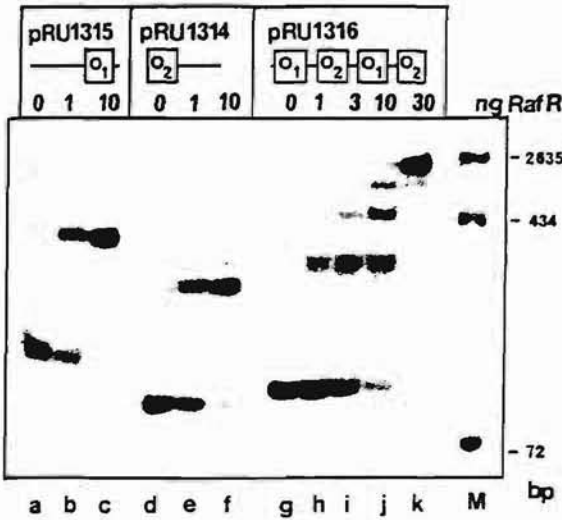


Fig. 4. Titration with repressor of fragments containing singlet or quadruplet *raf* operator sites. The *raf*O₁ fragment (145 bp) of pRU1315 (lanes a-c), the *raf*O₂ fragment (101 bp) of pRU1314 (lanes d-f) and the *raf*O₁O₂O₁O₂ fragment (118 bp) of pRU1316 (lanes g-k) were produced by *Eco*RI-*Hind*III double digestion; fragments were 3'-end-labelled and gel purified. Fragments from pRU1315 and pRU1316 (5 fmol) pRU1314 (7.5 fmol) were incubated with indicated amounts of *raf* repressor. Lane M, size markers

dation, clearly indicates that adjacent *raf* operator sites are distinctly and successively occupied by repressor molecules. However, from these experiments it could not be decided whether one site has a higher affinity for repressor than the other or whether binding involves interactions between bound repressor molecules.

Footprinting of operator sites

Protection of DNA from DNase I digestion by bound repressor was used to map the *raf* operator sites. Such experiments may also reveal possible interactions between repressor molecules binding to adjacent sites. Figure 5A shows the footprints produced after binding of *raf* repressor at different concentrations to a 198 bp *Eco*RI-*Pst*I fragment from pRU984 that contains the native *raf* operator (Fig. 1) and digesting the complex with DNase I at two concentrations. In comparison with the sequence pattern produced in the absence of repressor (Fig. 5, lanes 0), two discrete, protected regions become apparent in the presence of increasing amounts of repressor (Fig. 5, lanes 0.1-3 and lanes 0.3-3). Protection was abolished when inducer (5 mM melibiose) was added to the reaction (Fig. 5, lane m).

The footprints revealed two notable features. Firstly, the protected regions correspond to the palindromic operator sites: the centres of symmetry of O₁ and O₂ closely match the centres of the protected DNA sequences, whereas nucleotides involved in interactions with RNA polymerase (at -35 and -10) are not fully protected (Fig. 5A, B; arrows). At least one of the 3 bp intervening between O₁ and O₂ and one each at the "inner" edges

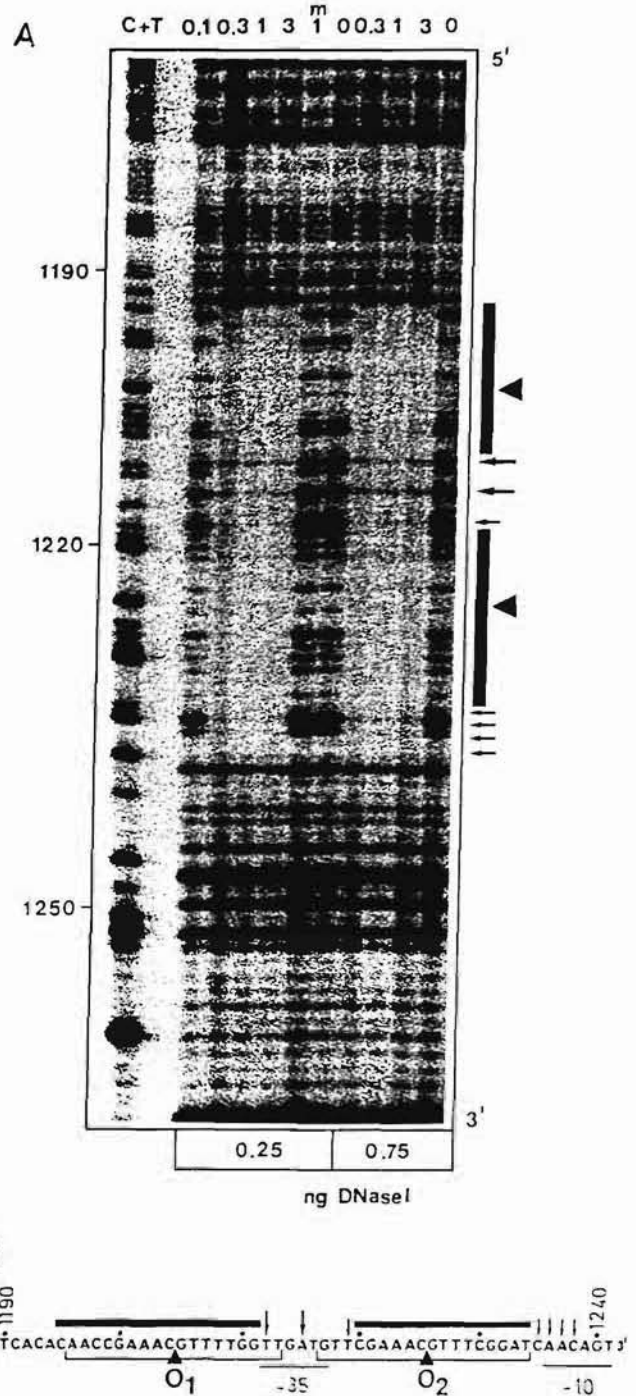


Fig. 5A and B. DNase I protection experiments. **A** The 198 bp *Eco*RI-*Pst*I fragment from pRU984 containing *raf* O₁O₂ was 3'-end-labelled and gel purified. Numbers on top indicate relative values of *raf* repressor concentrations, with 1 corresponding to 100 ng of repressor protein; m denotes the presence of 5 mM melibiose in the incubation mixture. The amounts of DNase I used are shown at the bottom. In order to localize the DNase I footprint, C-T specific degradation (Maxam and Gilbert 1980) of the DNA fragment was performed. Numbers on the left margin correspond to nucleotide numbering in Fig. 1. **B** The sequence of the 3' labelled strand is shown with the predicted operator sites O₁ and O₂, their symmetry centers (▲) and promoter sequences (-10, -35), as in Fig. 1. Regions of complete protection (—) and centers showing high (↑) or low (↓) DNase I sensitivity are marked. Corresponding portions of the gel have been marked accordingly (A, right margin)

of the protected region are susceptible to DNase I digestion, suggesting that two repressor molecules binding to neighboring operator sites do not compete for intervening base pairs. This does not, however, exclude the possibility of interactions between the repressor molecules bound to O_1 and O_2 . Secondly, within the limits of sensitivity of this method, the extent of protection provided to O_1 and O_2 seems to be equivalent at various repressor concentrations (see Fig. 5A, lanes 1 and 3) indicating that there is no preferential binding of repressor to O_1 vs O_2 ; minor differences in the two palindromic sequences (Fig. 5B) have no obvious effect on the affinity for the *raf* repressor.

Discussion

Requirements for reactivation and binding of *raf* repressor

The reactivation of *raf* repressor from inclusion bodies (Kane and Hartley 1988; Mitrarki and King 1989) involved solubilization in 0.1% SDS and refolding of the protein to its native and active form by five to tenfold dilution in buffer (Jaenicke 1987). None of the other detergents or denaturing agents tested nor variations in ionic strength, pH or counter ions gave the desired effect. At 0.1% SDS concentration, ca. 1 mg/ml of repressor protein was rendered soluble, corresponding to binding of about every third amino acid residue in the repressor to an SDS molecule. The presence of 50 μ g/ml bovine serum albumin in the binding assay detectably increased the reactivation rate of repressor at dilutions of the SDS extract of 1:10 to 1:50, but had no significant impact at lower detergent concentrations (not shown). This indicates that BSA may act as a detergent scavenger.

Unlike the case with *lac* repressor binding (Riggs et al. 1970), bivalent cations, such as Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} or Mn^{2+} , interfere with the binding of *raf* repressor to *raf* operator DNA. When added to the assay mixture after repressor, Mg^{2+} ions are not completely inhibitory (data not shown). It thus appears reasonable to assume that Mg^{2+} binding sites on operator DNA are protected by repressor. This observation may be useful in devising future experiments to study the kinetics of repressor-operator interactions. The reducing agent DTT both stimulates the solubilization of repressor protein by SDS and facilitates binding of repressor to DNA, suggesting that cysteine residues – there are three per monomer (Aslanidis and Schmitt 1990) – are essential for repressor activity.

Specificity of induction

In vitro binding experiments clearly demonstrated that melibiose was capable of preventing the formation of a repressor-operator complex (Fig. 3), but neither raffinose, nor any of the other α -galactosides tested affected repressor binding. Hence, melibiose must be the actual

O_1	1	AACCGAAAC:
	r	AACCAAAAC:
O_2	1	GTTCGAAAC:
	r	ATCCGAAAC:
consensus		<u>axcCGAAAC:</u>
		9 8 7 6 5 4 3 2 1

Fig. 6. Comparison between the four half-sites of *raf* operator sequences O_1 and O_2 (written as single-strand sequences). In the consensus sequence, capital letters indicate invariant positions, lower case letters 75% representation and x a position with either A or T. Numbering of nucleotides starts at the center of dyad symmetry

inducer of the *raf* operon in vivo. This specificity of induction is of interest, since it indicates that raffinose, the major substrate for the pathway, must be hydrolyzed by sucrose hydrolase (the product of the third gene, *rafD*, in the operon; Schmid and Schmitt 1976; Aslanidis et al. 1989) to form melibiose and fructose before induction can occur. The fact that sucrose hydrolase has a higher affinity for raffinose ($K_{m_{Raf}}$ is 4 mM) than does α -galactosidase ($K_{m_{Raf}}$ is 60 mM) and the translational coupling of *rafB* and *rafD* (Aslanidis et al. 1989) thus appear as logical consequences of the need for melibiose formation as the first step in induction.

Specific binding of repressor to adjacent binding sites

Footprinting experiments (Fig. 5) confirmed the two previously identified *raf* operator sites, O_1 and O_2 (Aslanidis and Schmitt 1990). The extent of protection of each 18 bp palindrome by bound repressor, summarized in Fig. 5B, reveals partial protection of the operator ends facing each other at the -35 promoter box. This may indicate mutual hindrance of bound molecules and/or that these terminal nucleotides are less important for the specific binding of repressor, an interpretation favored by comparative analysis of the operator half-sites.

The 18 bp operator sites exhibit dyad symmetry and thus can be considered as four half-sites. The consensus axcCGAAAC derived from the aligned half-sites (Fig. 6) reveals high conservation of six nucleotides closest to the center of symmetry and less preference for a particular base at the three peripheral positions. Studies in the *lac* operator repressor system have indicated specific interactions between central nucleotides and distinct amino acid residues in the recognition helix of the repressor (Lehming et al. 1987; Sartorius et al. 1989). Rules for protein-DNA recognition experimentally deduced from compensating point mutations (Lehming et al. 1990) implicate three residues in the recognition helix of the *raf* repressor, Val-14, Thr-15 and Arg-19 (Aslanidis and Schmitt 1990), in specific interaction with nucleotides A3, A4 and G5, respectively (Fig. 6). This interpretation is consistent with the observed protection pattern (Fig. 5), explains the conservation of nucleotides near

the symmetry axis, and suggests a basis for the observed specificity of *raf* repressor/operator complex formation.

Successive binding in vitro and gene regulation

Protection of the two operator sites at sub-saturating repressor concentrations (Fig. 5A, lanes 1 and 3) indicates that *raf* repressor has very similar affinities for O_1 and O_2 . Despite this apparent equivalence of O_1 and O_2 , gel retardation data indicate that binding to these two sites occurs in two discrete steps, with almost no complex of high retardation present until most molecules have been shifted from the unretarded form to the form of intermediate retardation (Fig. 3; pRU645).

We suggest that once one of the operator sites is occupied by repressor, affinity for the adjacent site is lowered (perhaps by simple steric hindrance). Therefore, formation of complexes containing repressor molecules bound to both O_1 and O_2 does not proceed to any significant extent until repressor concentration has been raised above the level required to bind one site on each target DNA molecule. Successive binding of repressor to four adjacent operator sites (Fig. 4; pRU1316) is consistent with this interpretation.

The sequential titration of *raf* repressor can be considered a prerequisite for down-regulation of gene expression in response to repressor concentration. Conceivably, RNA polymerase binding to the *raf* promoter is inversely related to the number of operator sites occupied. The unusual location of O_1 and O_2 immediately upstream and downstream of the -35 promoter site should permit highly efficient repression, as suggested by the studies Lanzer and Bujard (1988). Whether the differential effects of changing operator positions on transcription described by these authors also apply to the *raf* regulatory system must be elucidated by monitoring gene expression after mutagenic elimination of one or the other operator site.

Another level of transcriptional control is suggested by the recent discovery of the tetrameric structure of the *raf* repressor (Jaenicke et al. 1990), which is therefore potentially capable of simultaneously binding two distant operator sites, as has been shown with the tetrameric *lac* repressor (Eismann et al. 1987; Krämer et al. 1987). In fact, two potential candidates for distant *raf* operators have been detected within the *rafA* structural gene, 1201 bp (120 helical turns) and 1317 bp (131.7 helical turns) downstream of the original operator site. Both these sites contain two 18 bp (partial) palindromes separated by three nucleotides and display reasonable similarity with the consensus (about 60%). The possible significance of this observation can be tested by repressor binding and mutational alteration of the putative secondary operator sites.

Acknowledgements. We thank Johannes Buchner for technical advice, Rainer Deutzmann for peptide sequencing, Anneliese Mitterer for technical assistance and artwork, David Kirk for critical review and Andreas Lindauer and Edwin Pleier for typing the manuscript. This investigation was supported by the Deutsche Forschungsge-

meinschaft to R.S. and by a grant from the Deutscher Akademischer Austauschdienst to I.M.

References

- Aslanidis C, Schmitt R (1990) Regulatory elements of the raffinose operon: nucleotide sequence of operator and repressor genes. *J Bacteriol* 172:2178–2180
- Aslanidis C, Schmid K, Schmitt R (1989) Nucleotide sequences and operon structure of plasmid-borne genes mediating uptake and utilization of raffinose in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171:6753–6763
- Brown JW, Thomm M, Beckler GS, Frey G, Stetter KO, Reeve JN (1988) An archaeobacterial RNA polymerase binding site and transcription initiation of the *hisA* gene in *Methanococcus vannielii*. *Nucleic Acids Res* 16:135–150
- Craig NL, Nash HA (1984) *E. coli* integration host factor binds to specific sites in DNA. *Cell* 39:707–716
- Dunn TM, Hahn S, Ogden S, Schleif RF (1984) An operator at -280 base pairs that is required for repression of *araBAD* operon promoter: Addition of DNA helical turns between the operator and promoter cyclically hinders repression. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5017–5020
- Eismann E, v. Wilcken-Bergmann B, Müller-Hill B (1987) Specific destruction of the second *lac* operator decreases repression of the *lac* operon in *Escherichia coli* fivefold. *J Mol Biol* 195:949–952
- French D, Wild GM, Young B, James WJ (1953) Constitution of planteose. *J Am Chem Soc* 75:709–712
- Fried M, Crothers DM (1981) Equilibria and kinetics of *lac* repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 9:6505–6525
- Fritz H-J, Bicknäse H, Gleumes B, Heibach C, Rosahl S, Ehring R (1983) Characterization of two mutations in the *Escherichia coli galE* gene inactivating the second galactose operator and comparative studies of repressor binding. *EMBO J* 2:2129–2135
- Garner MM, Revzin A (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *E. coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* 9:3047–3060
- Irani MH, Orosz L, Adhya S (1983) A control element within a structural gene: the *gal* operon of *Escherichia coli*. *Cell* 32:783–788
- Jaenicke R (1987) Folding and association of proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 49:117–237
- Jaenicke R, Muiznieks I, Aslanidis C, Schmitt R (1990) Ultracentrifugal analysis of the quaternary structure of the *raf* repressor from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 260:233–235
- Kane JF, Hartley DL (1988) Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 6:95–101
- Krämer H, Niemöller M, Amouyal M, Revet B, v. Wilcken-Bergmann B, Müller-Hill B (1987) *lac* repressor forms loops with linear DNA carrying two suitably spaced *lac* operators. *EMBO J* 6:1481–1491
- Lanzer M, Bujard H (1988) Promoters largely determine the efficiency of repressor action. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8973–8977
- Lehming N, Sartorius J, Niemöller M, Genenger G, v. Wilcken-Bergmann B, Müller-Hill B (1987) The interaction of the recognition helix of *lac* repressor with *lac* operator. *EMBO J* 6:3145–3153
- Lehming N, Sartorius J, Kisters-Woike B, v. Wilcken-Bergmann B, Müller-Hill B (1990) Mutant *lac* repressors with new specificities hint at rules for protein-DNA-recognition. *EMBO J* 9:615–621
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

- Maxam A, Gilbert W (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol* 65:499-560
- Mitraki A, King J (1989) Protein folding intermediates and inclusion body formation. *Biotechnology* 7:690-697
- Ohlendorf DH, Anderson WF, Fisher RG, Takeda Y, Matthews BW (1982) The molecular basis of protein-DNA recognition inferred from the structure of *cro* repressor. *Nature* 298:718-723
- Pabo CO, Sauer RT (1984) Protein-DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 53:293-321
- Riggs AD, Bourgeois S, Cohn M (1970) The *lac* repressor-operator interaction III. Kinetic studies. *J Mol Biol* 53:401-417
- Sartorius J, Lehming N, Kisters B, v. Wilcken-Bergmann B, Müller-Hill B (1989) *lac* repressor mutants with double or triple exchanges in the recognition helix bind specifically to *lac* operator variants with multiple exchanges. *EMBO J* 8:1265-1270
- Schmid K, Schmitt R (1976) Raffinose metabolism in *Escherichia coli* K12. Purification and properties of a new α -galactosidase specified by a transmissible plasmid. *Eur J Biochem* 67:95-104
- Sherman F, Stewart JW, Tsunasawa S (1984) Methionine or not methionine at the beginning of a protein. *Bioessays* 3:27-31
- Tuggle CK, Fuchs JA (1986) Regulation of the operon encoding ribonucleotide reductase in *Escherichia coli*: evidence for both positive and negative control. *EMBO J* 5:1077-1085
- Valentin-Hansen P, Albrechtsen B, Love Larsen JE (1986) DNA-protein recognition: demonstration of three genetically separated operator-elements that are required for repression of the *Escherichia coli deoCABD* promoters by the DeoR repressor. *EMBO J* 5:2015-2021
- Vieira J, Messing J (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 33:259-268
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp8 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119

Communicated by J.W. Lengeler

Ultracentrifugal analysis of the quaternary structure of the *raf* repressor from *Escherichia coli*

Rainer Jaenicke, Indrikis Muiznieks*, Charalampos Aslanidis* and Rüdiger Schmitt*

Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie and *Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie, Universität Regensburg, D-8400 Regensburg, FRG

Received 13 November 1989

The *raf* repressor from *Escherichia coli* regulates the expression of the plasmid-borne *raf* operon by switching between active and inactive conformational states. Ultracentrifugal analysis of the largely purified repressor proves the DNA-free protein to undergo concentration-dependent dissociation-association. High-speed sedimentation equilibria show that the 72 kDa dimer prevails under meniscus depletion conditions. At intracellular concentrations the 144 kDa dimer-of-dimers is the dominating species. It is suggested that the tetrameric structure of the *raf* repressor is involved in the recognition of the 18-basepair operator DNA.

Analytical ultracentrifugation; Dissociation-association; Quaternary structure; Repressor, *raf*; Sedimentation analysis

1. INTRODUCTION

The *raf* repressor has been shown to regulate expression of the plasmid-borne *raf* operon, which encodes functions required for the uptake and hydrolysis of raffinose in *Escherichia coli* [1,2]. The repressor gene, *rafR*, has been sequenced, the deduced protein monomer M_r being 36 700 [2]. Overexpression of *rafR* resulted in inclusion bodies, from which active repressor was recovered by solubilization in 0.1% sodium dodecyl sulfate and subsequent dilution in buffer [3]. Gel-retardation analysis [4] revealed the specific binding of *raf* repressor to 18-bp palindromic *raf* operator DNA sequences preceding the structural genes. Molibiose, a specific inducer of the *raf* operon, released the repressor-operator complexes. This suggested an alternation of the repressor molecules between active and inactive conformational states, a property only exhibited by oligomeric proteins [5].

The quaternary structure of other known repressor molecules is either dimeric or tetrameric [6,7]. To determine the yet unknown quaternary structure of the *raf* repressor, a largely purified DNA-free preparation (capable of specifically binding to *raf* operator DNA) was analyzed by analytical ultracentrifugation. The results reported here indicate a concentration-dependent monomer-dimer-tetramer equilibrium with the tetramer (formed at typical intracellular concentrations) as the putative active configuration.

Correspondence address: R. Jaenicke, Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie, Universität Regensburg, Universitätsstraße 31, D-8400 Regensburg, FRG

Published by Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division)
00145793/90/\$3.50 © 1990 Federation of European Biochemical Societies

2. MATERIALS AND METHODS

Assay of *raf* repressor activity employed the gel-retardation procedure [4] using 3' labelled DNA fragments that contained either two or four palindromic *raf* operators for repressor binding, as has been described [3]. Protein concentrations during purification were determined according to Lowry et al. [8], using bovine serum albumin as a standard. The concentration of purified repressor was determined spectrophotometrically using an extinction coefficient $A_{280\text{nm}}^{1\%1\text{cm}} = 1.5$. The isolation of active *raf* repressor from purified inclusion bodies was performed as in [3]. For analytical ultracentrifugation, dialyzed repressor protein was diluted to 400 $\mu\text{g/ml}$ in binding buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM KCl, 1 mM EDTA) that contained different concentrations of dithiothreitol (0, 2, 4, 10 mM) or mercaptoethanol (100 mM).

Sedimentation experiments were performed in a Beckman Spinco model E analytical ultracentrifuge equipped with a high intensity light source and a UV scanning system. Double sector cells (12 mm pathlength) with sapphire windows were used in an AnG rotor. To detect possible concentration-dependent dissociation, heterogeneity and non-ideality, the meniscus depletion technique was applied over a wide range of protein concentrations (5 $\mu\text{g/ml}$ – 2 mg/ml), fill-heights and rotor speeds (8000–20 000 rpm); scanning wavelengths were 230 and 280 nm, respectively. The temperature in all ultracentrifuge experiments was 2 and $20 \pm 1^\circ\text{C}$, respectively. Sedimentation coefficients were determined at 44 000 rpm, plotting $\ln r$ vs t , and correcting for 20°C and water viscosity. Sedimentation equilibrium experiments with rotor speeds 16 000, 12 000 and 8000 rpm were evaluated from $\ln c$ vs r^2 plots making use of a computer program developed by G. Böhm, Regensburg. The partial specific volume was calculated from the amino acid composition [10].

3. RESULTS AND DISCUSSION

The molecular mass of the *raf* repressor from *Escherichia coli* differs, depending on the concentration of the protein and the amount of sodium dodecyl sulfate used as solubilizing agent. At 0.01% high

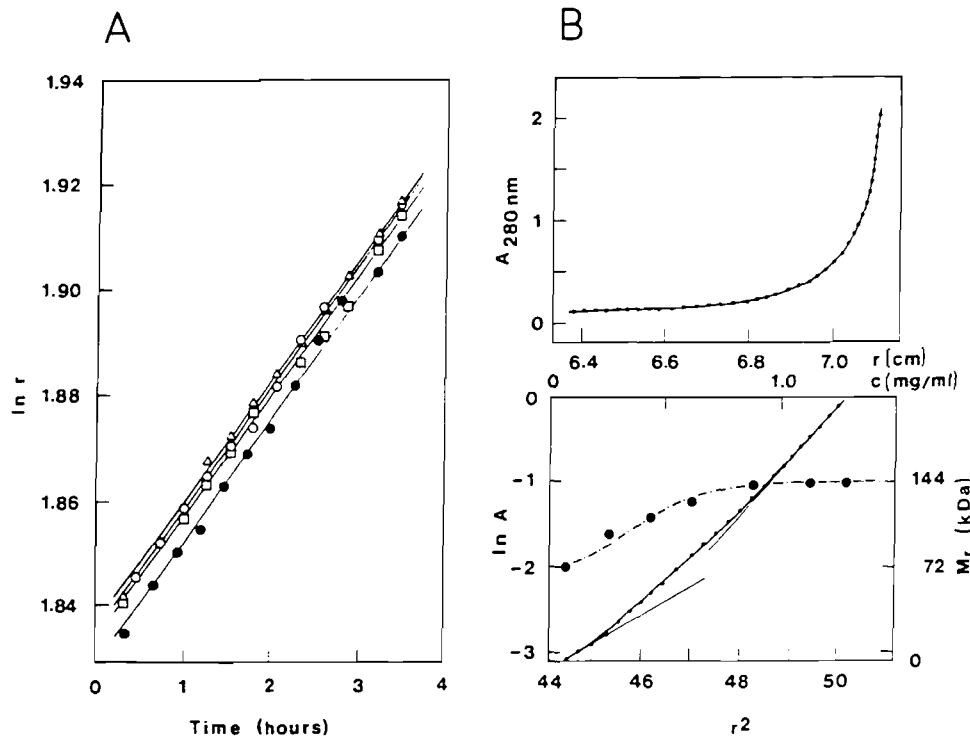


Fig. 1. Sedimentation velocity and sedimentation equilibrium of *raf* repressor. Experiments were performed at 2°C in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, plus 10 mM KCl and 1 mM EDTA. (A) Semilogarithmic plot ($\ln r$ vs t) of sedimentation velocity runs at 44 000 rpm. Scanning wavelength 280 nm. Protein concentration 0.4 mg/ml, in the absence of dithiothreitol (○), and in the presence of 2 mM (Δ), 4 mM (□) dithiothreitol, and 100 mM β-mercaptoethanol (●), respectively. (B) Tetramer-dimer dissociation equilibrium calculated for high-speed sedimentation equilibrium runs at 12 000 and 8000 rpm. Data refer to experiments with different filling heights and scanning wavelengths. Initial protein concentration 0.4 mg/ml in the presence of 4 mM dithiothreitol. (Upper frame) Equilibrium at 12 000 rpm, monitored at 280 nm. (Lower frame) Left-hand ordinate and lower abscissa, $\ln A$ vs r^2 linearization; righthand ordinate and upper abscissa (●), concentration dependence of the molecular mass.

molecular weight aggregates prevail: about 90% of the protein are present as high molecular weight aggregates, which sediment to the bottom of the ultracentrifuge cell during acceleration ($\leq 20\,000$ rpm). The remaining 10% migrate as a single species with a sedimentation coefficient $s_{20,w} = 3.5 \pm 0.1 \times 10^{-13}$ s. At concentrations below 0.05 mg/ml (monitored at 230 nm), the molecular mass is found to extrapolate to $36\,000 \pm 3400$ Da, corresponding to the calculated molecular weight of the polypeptide chain (correlation coefficient 0.9994).

After equilibrium dialysis of the 0.01% sodium dodecyl sulfate solution of the protein against excess buffer (residual sodium dodecyl sulfate concentration $\leq 0.001\%$), aggregation does not exceed 10%. The major fraction of the protein forms a well-defined sedimentation boundary. The sedimentation coefficient at $c = 0.5$ mg/ml is $s_{20,w} = 6.1 \pm 0.2 \times 10^{-13}$ s, independent of the amount of reducing agent present (fig. 1A). Obviously, the requirement of dithiothreitol for specific binding to operator DNA sequences [3] has no effect on

Table 1

Ultracentrifugal analysis of the <i>raf</i> repressor from <i>Escherichia coli</i>							
Conditions ^a				12 000 rpm		8000 rpm	
[SDS] (%)	[DTT] (mM)	<i>T</i> (°C)	$s_{20,w}$ (S)	M_{min} (kDa)	M_{max} (kDa)	M_{min} (kDa)	M_{max} (kDa)
0.01	0	24	3.54 ± 0.11	33.7	aggr.		
0.001	0	2	6.1 ± 0.1	80	136 ± 10	135	160 ± 10
0.001	2	2	6.1 ± 0.1	116	142 ± 6	129	146 ± 6
0.001	4	2	6.0 ± 0.1	106	149 ± 8	126	157 ± 8
0.001	100 ^b	2	6.1 ± 0.1	108	146 ± 6	130	175 ± 10

^a [SDS], residual sodium dodecyl sulfate concentration; [DTT], dithiothreitol concentration; *T*, temperature

^b β-Mercaptoethanol concentration

the quaternary structure of the protein. Assuming the hydrodynamic properties typical for globular proteins to be valid for the repressor molecule, the observed sedimentation coefficient allows a molecular mass of 130–150 kDa to be predicted. Fig. 1B and table 1 show that this value is confirmed by high-speed sedimentation equilibrium experiments using the meniscus depletion technique in a concentration range between 0.05 and 2 mg/ml. Thus, we may conclude that at sodium dodecyl sulfate concentrations below 0.001% the solubilized *raf* repressor in the absence of its target DNA is a tetramer. Homogeneity and stability of the protein are corroborated by the occurrence of a single sedimentation boundary and identical standard M_r moments at varying angular velocity. Only at high dilution (≤ 0.05 mg/ml) and high rotor speed, dissociation to dimers becomes detectable: a significant curvature in the $\ln c$ vs r^2 diagrams is observed with limiting weight average molecular masses of the order of 80 ± 8 kDa and 145.2 ± 2.5 kDa, respectively (fig. 1B). Under the conditions of the biological binding assay ($\leq 0.001\%$ sodium dodecyl sulfate, 0.05 mg/ml protein concentration), the tetramer is the predominant species. In the bottom region of the ultracentrifuge cell, and at low rotor speed (8000 rpm), the weight average molecular mass slightly exceeds the tetramer. However, even after long-term equilibration at room temperature, aggregation is below 10%.

4. CONCLUSIONS

Raf repressor exhibits concentration-dependent dissociation-association. The 36 kDa monomer is observed only in the presence of excess solubilizing agent. Under this condition, most of the protein forms aggregates. Obviously, the subunit interface of the dimer is strongly hydrophobic. At sodium dodecyl sulfate concentrations below 0.001%, the dimer is the final dissociation product, even at exceedingly low protein concentration. At typical cellular concentrations, the tetramer is the dominating species; it represents the stable state of association even at concentrations in the mg range. As in the case of other DNA binding proteins, pairwise binding may be assumed to play a role in the binding of the repressor to its operator DNA. Whereas most functional repressors studied assume dimeric conformations, the well-known *lac* repressor from *E. coli* is operative as a tetramer [6,7], a notion in line with our analysis of the *raf* repressor. The functional significance of this conformation is not known, since size and symmetry considerations and the detailed

structure analyses of other analogous repressor-operator systems [6,7] suggest that the helix-turn-helix motifs of only two protein subunits interact with the 18-bp palindromic *raf* operator DNA. The assumption that the two adjacent *raf* operators (separated by only 3 bp) are bound simultaneously by two surfaces of the tetrameric repressor were disproved by *in vitro* binding studies which demonstrated sequential binding of individual *raf* repressor molecules [3]. Two naturally separated binding sites in the *lac* system (the second located in the *lac* coding region) have been recently implicated in the cooperative repression of the *lac* promoter [11]; moreover, *in vitro* experiments with artificial constructs containing two operator sites at varying distances have demonstrated the formation of a DNA loop by binding one *lac* repressor tetramer to the two *lac* operators [12]. Since presently no structural information is available, no details with respect to the topology of the protein-DNA complex and the specific protein-DNA interactions can be given. However, the present data indicate that the dimer-of-dimers structure of the *raf* repressor serves as the preferred configuration interacting with the operator DNA.

Acknowledgements: This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft and the Fonds der Chemischen Industrie. Expert technical assistance of M. Kongsbak-Reim and A. Mitterer is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- [1] Aslanidis, C., Schmid, K. and Schmitt, R. (1989) *J. Bacteriol.* in press.
- [2] Aslanidis, C. and Schmitt, R. (1990) *J. Bacteriol.* in press.
- [3] Aslanidis, C., Muiznieks, I. and Schmitt, R. (1990) *EMBO J.* submitted.
- [4] Fried, M. and Crothers, D.M. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9, 6505–6525.
- [5] Monod, J., Changeux, J.P. and Jacob, F. (1963) *J. Mol. Biol.* 6, 306–325.
- [6] Pabo, C.O. and Sauer, R.T. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53, 293–321.
- [7] McKay, D.B., Pickover, C.A. and Steitz, T.A. (1982) *J. Mol. Biol.* 156, 175–189.
- [8] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- [9] Yphantis, D.A. (1964) *Biochemistry* 3, 297–317.
- [10] Cohn, E.J. and Edsall, J.T. (1943) in: *Proteins, Amino Acids and Peptides as Ions and Dipolar Ions* pp. 370–382, 428–431, Reinhold, New York.
- [11] Eismann, E., V. Wilcken-Bergmann, B. and Müller-Hill, B. (1987) *J. Mol. Biol.* 195, 949–952.
- [12] Krämer, H., Niemöller, M., Amouyal, M., Revet, B., V. Wilcken-Bergmann, B. and Müller-Hill, B. (1987) *EMBO J.* 6, 1481–1491.

Role of two operators in regulating the plasmid-borne *raf* operon of *Escherichia coli*

Indrikis Muiznieks¹, Rüdiger Schmitt²

¹ Faculty of Biology, University of Latvia, Riga, Latvian Republic

² Lehrstuhl für Genetik, Universität Regensburg, Universitätsstrasse 31, D-93040 Regensburg, Germany

Received: 19 May 1993 / Accepted: 7 July 1993

Abstract. The plasmid-borne *raf* operon encodes functions required for the inducible uptake and utilization of raffinose in *Escherichia coli* K12. The expression of three structural genes for α -galactosidase (*rafA*), Raf permease (*rafB*) and sucrose hydrolase (*rafD*) is negatively controlled by the binding of RafR repressor (*rafR*) to two operator sites, O_1 and O_2 , that flank the -35 sequence of the *raf* promoter, P_A . In vitro, O_1 and O_2 are occupied on increasing the concentration of RafR, without detectable preference for one site or the other or any indication of cooperative binding. Nucleotide substitutions at positions 3, 4 or 5 in an operator half-site prevented repressor binding, supporting a model that postulates specific interactions of these base pairs with the recognition helix of RafR. To study the role of each operator site, we have compared by gel shift analysis the binding of purified RafR repressor to DNA fragments containing the original O_1O_2 configuration or mutant O_1 or O_2 . When either one of the two operators was inactivated by site-directed mutagenesis, both O_1 and O_2 exhibited the same affinity for repressor and the same sensitivity to arrest of repressor binding by the natural inducer, melibiose. However, in the native O_1O_2 configuration, simultaneous binding of RafR to both operators was sterically hindered, leading to a 13-fold decrease in the intrinsic affinity of an operator site for repressor, once the other site had been occupied. To assess the role of each operator in vivo, *rafA* was used as a reporter gene. A 1200-fold repression (100%) was exerted by RafR binding to the native O_1O_2 configuration, whereas O_2 alone exerted 45% and O_1 alone 6% repression of *rafA* transcription. The differential effects of O_1 versus O_2 on transcription (despite matching affinities of O_1 and O_2 for repressor) suggest that positioning of the O_2 -repressor complex between the -35 and -10 signals is crucial for transcription control and that repressor binding to the upstream O_1 serves to enhance this effect.

Key words: *raf* operon – Dual operator control – Repressor-operator binding – Site-directed mutagenesis – Gel retardation

Introduction

The well-studied bacterial repressor-operator systems are based on specific interactions between a palindromic DNA sequence and a helix-turn-helix motif in the repressor protein, which recognizes the major groove of the symmetrical operator DNA (Pabo and Sauer 1984). Crucial parameters that determine the efficiency of transcription modulation are: (i) the precise recognition of a particular operator DNA sequence by repressor molecules; (ii) relative positions of the operator and promoter sequences; and (iii) participation of distantly located, secondary operator sites in repressor binding. Systematic studies of the Lac repressor-operator system using directed mutagenesis have convincingly demonstrated the discrete character of amino acid-base pair interaction in protein-DNA recognition (Sartorius et al. 1989; Lehming et al. 1987, 1990). Essential prerequisites for the efficient binding of repressor to cognate operator are preservation of the palindromic symmetry, and specific base pairs in the operator sequence that interact with particular amino acid residues in the recognition helix. These rules similarly apply to the *gal* regulatory system (Lehming et al. 1987, 1990; Weickert and Adhya 1992).

Studies of synthetic promoter-operator combinations have shown that the position of the operator sequence relative to the promoter elements dramatically affects RNA polymerase-repressor interactions, which ultimately define the efficiency of repression (Lanzer and Bujard 1988). Accordingly, an operator located between the -10 and -35 promoter boxes ensures much tighter control than an operator located adjacent to, but either upstream or downstream of, the promoter boxes. Secondary operator sequences at considerable distances from the promoter have been identified in the *lac*, *ara*,

Communicated by W. Goebel

Correspondence to: R. Schmitt

deo, and *gal* regulatory systems of *Escherichia coli* and were found to contribute remarkably to efficient and correct regulation of gene expression (Fritz et al. 1983; Irani et al. 1983; Dunn et al. 1984; Tuggle and Fuchs 1986; Valentin-Hansen et al. 1986; Eismann et al. 1987). Thus, the level of repression in the *lac* system is determined by the simultaneous interaction of tetrameric Lac repressor with primary and secondary operator sites, thereby inducing the bending of, and loop formation by intervening DNA (Krämer et al. 1987; Eismann and Müller-Hill 1990; Oehler et al. 1990).

An additional level of regulation is provided by the cAMP binding protein (CAP) and its cooperative interactions with RNA polymerase and Lac repressor at the *lac* promoter (Straney et al. 1989; Hudson and Fired 1990). Accordingly, the effect of Lac repressor on transcription results from a modification of the initial transcription complex preventing its progression beyond the promoter, rather than from competition between repressor and RNA polymerase for overlapping binding sites (Lee and Goldfarb 1991). Such a configuration facilitates a "ready-for-take-off" state of the promoter-RNA polymerase complex, which can be triggered to transcribe immediately on addition of the inducer.

The organization of genes and control elements in the plasmid-borne raffinose (*raf*) operon bears close resemblance to that of the *E. coli lac* operon. However, *lac* and *raf* controls are distinct in the structure and sequence of their controlling elements. In the *raf* system, these have been conserved in 25 *Raf* plasmids from quite different sources (Schmid et al. 1979; unpublished observations). Three structural genes, *rafA* for α -galactosidase (α -Gal), *rafB* for permease, and *rafD* for sucrose hydrolase, are under the negative control of the *RafR* repressor, which contains a helix-turn-helix motif at its N-terminus thought to interact specifically with the operator DNA (Aslanidis et al. 1989; Aslanidis and Schmitt 1990). Sequence analysis, in vivo titration and DNase footprinting experiments served to identify two 18 bp palindromic operator sites, O_1 and O_2 , flanking the -35 promoter box. Gel retardation assays revealed the successive occupation of the two operator sites by *Raf* repressor. Neither a preference for one site nor cooperative binding were detected in vitro (Aslanidis et al. 1990).

This study was initiated: (i) experimentally to test previously postulated interactions of particular base pairs in the operator with defined amino acid residues in the recognition helix of *RafR* (Aslanidis et al. 1990); (ii) to analyze the role of each of the two operator sites, O_1 and O_2 , in repressor binding in vitro; and (iii) to probe their function in regulating transcription in vivo. We report here that O_1 and O_2 bind the *RafR* repressor in vitro with equal affinities, yet O_2 (located between the -35 and -10 boxes) dominates over O_1 in regulating promoter activity in vivo. Hence, *RafR* bound to O_2 alone resulted in 45% repression of transcription, whereas *RafR* bound to O_1 led to only 6% repression. *RafR* bound to the native O_1O_2 configuration resulted in a notable 1200-fold repression.

Materials and methods

Chemicals and enzymes. [32 P]-deoxyribonucleotides (< 3000 Ci/mmol) were obtained from Amersham Buchler (Braunschweig, FRG). Restriction endonucleases and other enzymes were purchased from Boehringer (Mannheim, FRG), New England Biolabs (Beverly, Mass., USA) and Pharmacia (Freiburg, Germany) and were used as recommended by the manufacturers. Sequenase Version 2.0 from US Biochemicals (Cleveland, Ohio, USA) was used for sequencing single- and double-stranded templates. *Raf* repressor was overproduced and purified essentially as described by Aslanidis et al. (1990). Approximately 70% of the protein in preparations used for retardation assays corresponded to *RafR*, as estimated by densitometry of Coomassie Brilliant Blue R250-stained polyacrylamide gels. *RafR* concentrations were derived from total protein determined photometrically at 595 nm (Bradford 1976).

Bacterial strains and plasmids. *E. coli* JM109 [*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ (lac-pro) | F' traD36 proAB lac^r lacZ Δ M15*; Yanisch-Perron et al. 1985] containing plasmid pRU984 was grown overnight at 37°C in Luria broth without glucose for the overexpression of *RafR* protein (Aslanidis et al. 1990). *E. coli* TG1 [*hsdD5 supE44 relA1 Δ (lac-pro) | F' traD36 proAB lac^r lacZ Δ M15*] was used as a host for site-directed mutagenesis. Enzyme activities were determined in *E. coli* DH1 [*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*; Hanahan 1983] containing a functional Lac permease for melibiose transport. *E. coli* DS338-2 containing a chromosomal insertion of Δ *rafR rafO⁻A⁺* and expressing α -Gal constitutively (Schmitt et al. 1979) was used to test the expression of plasmid-encoded *RafR*.

Plasmids were constructed according to standard procedures (Maniatis et al. 1982). pRU991 carries a 3.7 kbp *EcoRI* fragment from P1Km*Raf* containing the P_{R-rafR} - P_A -*rafA* portion of the *raf* operon plus 5' adjacent sequence (Aslanidis 1987) inserted in pUC8 (Vieira and Messing 1982). *HindIII* digestion and religation eliminated the polylinker of pUC8 and part of the 5'-adjacent region resulting in pRU1322 (Fig. 1A). Recombinant pRU1307 carries the 168 bp *PstI* fragment from pRU645 with the *raf* promoter and operator sequences (Aslanidis and Schmitt 1990) and the 2175 bp *PstI*-*EcoRI* fragment from pUR991 containing *rafA* (Fig. 1A). The pRU1307- and pRU1322-borne *raf* genes were transcribed from their native promoters, the polarity of which is opposite to that of the vectors P_{lacZ} . Plasmids pRU1323-pRU1327 (Fig. 1C) carry altered operator sites generated by site-directed mutagenesis of pRU1322.

Site-directed mutagenesis. The Amersham oligonucleotide-directed mutagenesis system (version 2) was used with pBS(+)-derived single-stranded DNA containing the 723 bp *KpnI*-*SphI* fragment from pRU1322 (Fig. 1A) propagated in the presence of helper phage R408 in *E. coli* TG1 (Stratagene Cloning System, La Jolla, Calif., USA). The desired mutants were verified by sequencing, recovered as *KpnI*-*ScaI* fragments, and religated into the

parent plasmid, pRU1322 (Fig. 1A). The functional proficiency of *rafR* was verified by complementation using the Raf-constitutive *E. coli* strain DS338-2 (Aslanidis and Schmitt 1990), the function of *rafA* was confirmed by determining α -galactosidase activity in *E. coli* TG1. Recombinants were selected on $2 \times$ Tryptone yeast (TY) agar containing 100 μ g/ml ampicillin (Ap) and screened for expression of α -Gal in the presence and absence of 0.2% melibiose.

Gel shift assay. Plasmids containing the mutant or native *raf* operator regions were double-digested with *Bsu*36I [*Sau*I] + *Sca*I (285 bp) or *Bsu*36I + *Sph*I (340 bp) and labelled at their *Bsu*36I ends with α [32 P]dTTP using Klenow polymerase (Fig. 1B). Labelled fragments were gel-purified on 5% polyacrylamide and their relative amounts estimated by comparing the intensity of ethidium bromide-stained bands to the amount of incorporated radioactivity.

Gel shift assays were performed essentially as described by Fried and Crothers (1981) and by Garner and Revzin (1981) with previously described modifications (Aslanidis et al. 1990). Each binding reaction contained approximately 10 fmol of the DNA fragment and 1–100 ng of RafR protein dissolved in binding buffer (10 mM TRIS-HCl pH 8, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 50 g/ml BSA) diluted from stock (100 μ g RafR/ml in 25 mM TRIS-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS). Polyacrylamide gels (5%) in 45 mM TRIS-borate, 1.5 mM EDTA, pH 8.3 were pre-run for 30 min at 70 V at room temperature and electrophoresis of samples was performed under the same conditions. Subsequently, gels were covered with Saranwrap and autoradiographed at 4°C on Wicor XRP film. Relative intensities of retardation bands were determined densitometrically with a M Φ -2 Δ OMO densitometer (St. Petersburg, Russia), and relative repressor binding affinities were calculated according to Fried and Crothers (1981; Table 1). Duplicate photometric measurements of band intensities varied by less than 5%.

Determination of α -galactosidase activity. The α -Gal activity was determined in newly transformed *E. coli* DH1 cells. Cells were grown in $2 \times$ TY both containing 100 μ g/ml ampicillin and 0.2 mM IPTG to induce Lac permease needed for melibiose transport. In induction experiments, cultures at $OD_{600} = 0.2$ were divided into two and further incubated after the addition of either 0.2% melibiose (inducer) or 0.2% fructose (non-inducer). Aliquots were taken at 1–2 h intervals and α -Gal activity was determined in cells treated with toluene (Schmid and Schmitt 1976) using *P*-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside (α -PNPG) as a substrate. Enzyme activity is expressed as maximum increment of specific activity (units per h) during exponential and early stationary growth. One unit of α -Gal corresponds to a change of 0.01 OD_{420} (due to hydrolysis of α -PNPG) per min per OD_{600} . Relative plasmid contents in the analyzed cultures were determined according to Stueber and Bujard (1982).

Results

Binding of RafR repressor to native and mutant operator sites

Recombinant plasmids containing mutant *raf* operators obtained by site-directed mutagenesis (Fig. 1C) were used to study the requirements for repressor binding to operator DNA in vitro and to elucidate the role of each operator site in regulating *rafA* transcription in vivo. RafR binding to operator sequences was studied by gel shift analysis in non-denaturing 5% polyacrylamide gels (Fried and Crothers 1981; Garner and Revzin 1981). Figure 2 shows the electrophoretic behavior of free and complexed B fragments (Fig. 1B) from pRU1322 (O_1O_2) and its mutant derivatives (Fig. 1C). Depending on repressor concentration, the autoradiograph (Fig. 2) revealed up to four different retardation bands. The native operators were successively occupied by repressor: a diffuse double band of intermediate mobility (Fig. 2, lane f) corresponds to complexing of either O_1 or O_2 (Aslanidis et al. 1990), while at high RafR concentrations both operator sites were saturated, producing a discrete, low mobility band (Fig. 2, lane b).

Changes in operator structure that alter symmetry and/or specific base pairs significantly diminish or completely abolish the capacity to bind repressor. We have previously postulated the importance of nucleotide positions 3, 4 and 5 (marked by triangles in Fig. 1C) in both half-sites of the palindromic operator for specific interactions with the recognition helix of RafR (Aslanidis et al. 1990). In fact, substitutions, additions or deletions at one or more of these positions completely eliminate the binding capacity of an operator site in our assay. Even at high concentration of RafR (30 ng), only the non-mutagenized operator was capable of binding repressor, as demonstrated by the single retardation band (Fig. 2, lanes c, d). Accordingly, fragments A or B from the O_1O_2 double mutant pRU1328 (Fig. 1C) do not complex RafR at any concentration tested (not shown). The results demonstrate a strict dependence of the specific Raf repressor-operator interactions on operator sequence symmetry and on the nature of base pairs 3, 4 and 5 in each operator half-site.

The relative mobility of the complexed operator depends on its position in the fragment. Therefore, functional O_2 (Fig. 2, lanes c and g) was less retarded than functional O_1 in the binding assay (Fig. 2, lanes d, h and i), a difference also seen in the control mixture of O_1 and O_2 mutant fragments (Fig. 2, lane e). These latter retardation bands also define the mobility zone of the diffuse band formed on binding of a single RafR molecule to the native O_1O_2 configuration (Fig. 2, lane f). The "hazy" aspect is thought to reflect differential DNA bending mediated by RafR repressor that oscillates between the two operator sites.

Repressor binding to *raf* operator DNA was reversed by the addition of melibiose (inducer), as shown in Fig. 3. Increasing concentrations of melibiose gradually inhibit the binding of repressor to operator, seen as a stepwise reversal of retardation in the native O_1O_2 con-

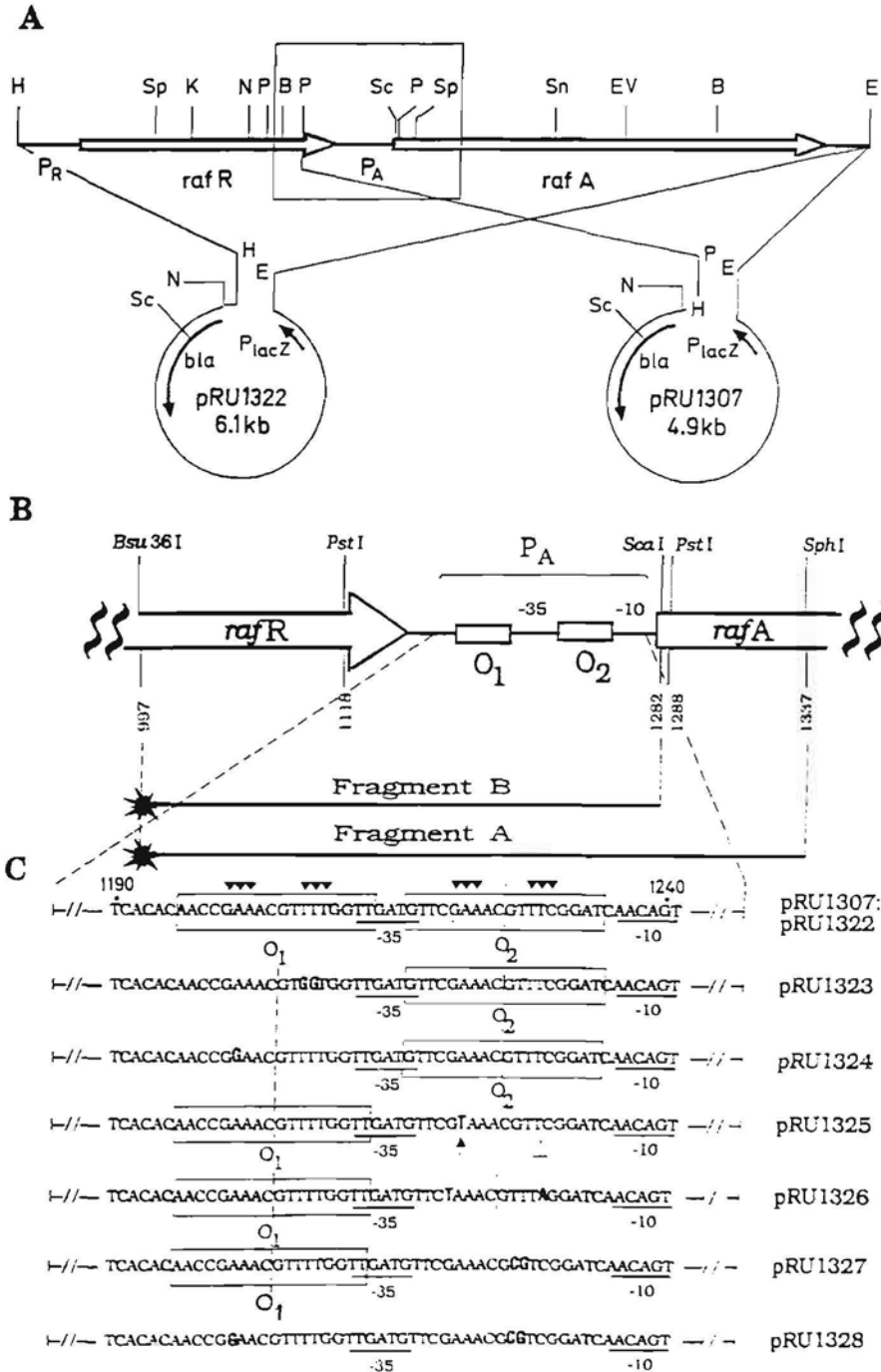


Fig. 1A–C. Portion of the *raf* operon, recombinant plasmids and operator mutants used for probing *rafA* regulation. **A** Two pUC8-derived recombinant plasmids, one (pRU1322) containing a 3462 bp insertion (top) comprising *rafR* (repressor gene) and *rafA* (*u*-galactosidase gene) and their promoters, P_R and P_A , and the other (pRU1307) bearing a 2344 bp insertion with the 3'-terminal 55 bp of *rafR*, the intercistronic region, and *rafA*. Positions and polarities of the *lac* promoter (P_{lacZ}) and the β -lactamase gene (*bla*) are indicated by arrows. Restriction sites: H, *Hind*III; Sp, *Sph*I; K, *Kpn*I; N, *Nar*I; P, *Pst*I; B, *Bsu*36I (*Sau*I); Sc, *Sca*I; Sn, *Sna*BI; EV, *Eco*RV; E, *Eco*RI. **B** P_A : operator (O_1O_2)-promoter (–35, –10) region with adjacent parts of *rafR* and *rafA* on expanded scale (boxed in A). Restriction coordinates are numbered according to Aslanidis et al. (1989). Fragments A (*Bsu*36I–*Sph*I, 340 bp) and B (*Bsu*36I–*Sca*I, 285 bp) used for gel shift assays are shown with their 32 P-labelled *Bsu*36I ends marked (*). **C** Nucleotide sequences of native (top line) and six mutant operator-promoter sites with their plasmid numbers marked (right margin); nucleotide numbering from Aslanidis and Schmitt (1990). The –35 and –10 promoter boxes are underlined, functional operator sites, O_1 and O_2 , are boxed, axes of palindromic symmetry marked by vertical lines, and nucleotides interacting with the recognition helix (Aslanidis et al. 1990) indicated by triangles. Nucleotides exchanged by directed mutagenesis are bold faced, an insertion (*) and a deletion (⊥) in pRU1325 are marked

figuration (Fig. 3, lanes e–b), as well as in mutants with either O_2 (Fig. 3, lanes i–f) or O_1 (Fig. 3, lanes m–j) intact.

In vitro repressor binding by one and two operators

Absolute binding affinities of RafR for operator DNA have not been determined in these experiments, since the concentration of free active protein in the binding reactions was unknown (owing to variation in the proportion of active RafR solubilized from inclusion bodies; Aslanidis et al. 1990). However, at low RafR concentrations

the relative intensities of shifted bands on autoradiographs reflect the probability of complex formation and relative affinities of binding (Fried and Crothers 1981). In this study, the availability of mutants with only one functional operator (Fig. 1C and Fig. 2) facilitated the calculation of relative affinities of repressor for single operators and comparisons of repressor binding to fragments containing mutant or native *raf* operator.

Competition experiments were carried out using three combinations of repressor-bearing fragments in varying ratios (Fig. 4), and relative binding affinities (K_1 , K_2) were calculated, as presented in Table 1. No preference for either O_1 or O_2 was found when these sequences were

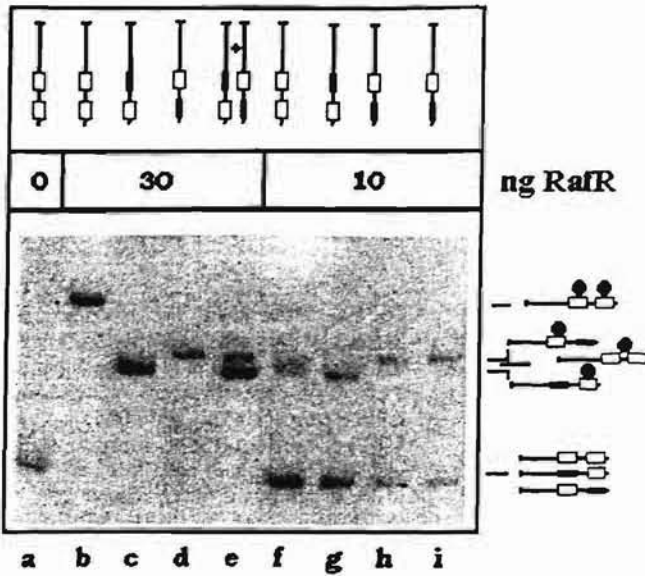


Fig. 2. Autoradiograph of gel retardation assay representing stepwise saturation of native and mutant *raf* operators with Raf repressor. Approximately 15 fmol of labelled and gel-purified B fragments from pRU1322-pRU1327 (Fig. 1) were incubated with the indicated amounts of Raf repressor (ng RafR). Binding buffer was modified by the addition of EDTA to 1 mM and DTT to 10 mM final concentrations; Mg^{2+} ions were omitted (Aslanidis et al. 1990). B fragments were used as follows: lanes a, b and f, pRU1322; lane c, RU1323; lane d, pRU1327; lane g, pRU1324; lane h, pRU1325; lane i, pRU1326. Lane e contains a 1:1 mixture from pRU1323 (O_1 mutant) and pRU1327 (O_2 mutant). The various operator configurations used are illustrated above each lane (open box, native operator; filled box, mutant operator, cross-bar, ^{32}P -label). Bands were assigned to the operator-repressor complexes as symbolized on the right-hand margin (●, bound repressor)

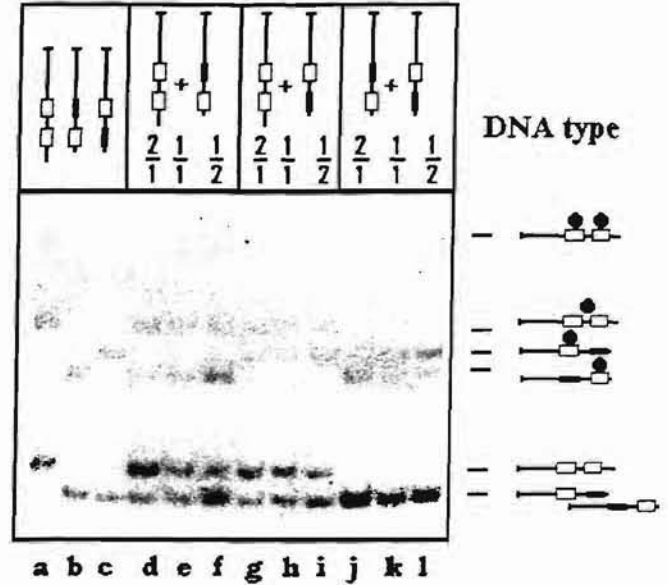


Fig. 4. Competition of native and mutant *raf* operators for binding Raf repressor. For distinguishing the competing operators, the larger fragment A from plasmid pRU1322 (O_2) was used together with smaller fragments B from pRU1324 (O_2) or pRU1327 (O_1), respectively (Fig. 1). Lanes a-c, 10 fmol of DNA and 5 ng *raf* repressor. Lanes d-l, operator-bearing fragments and their ratios, as specified above lanes: 20:10 fmol (2:1); 10:10 fmol (1:1); 10:20 fmol (1/2) using 8 or 12 ng of RafR in proportion to total DNA. Differences in specific activity of labelled fragments were balanced by dilution with corresponding non-labelled fragments. The mobility of operator-repressor complexes is specified at the margin as in Fig. 2

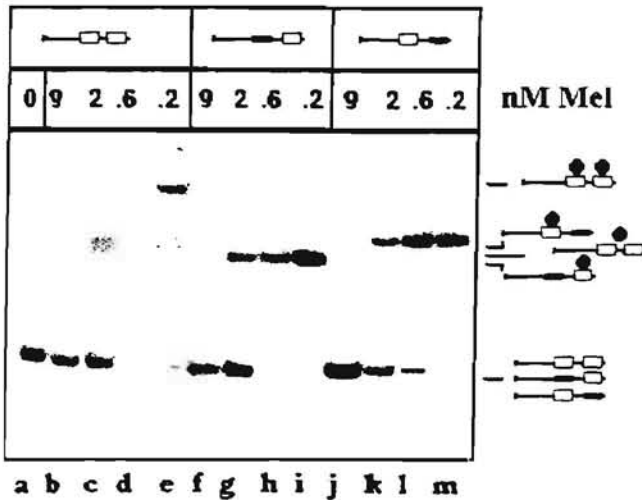


Fig. 3. Progressive inhibition of repressor binding to operator DNA by melibiose. Approximately 12 fmol of fragment B from pRU1322 (lanes a-e), pRU1323 (lanes f-i) and pRU1327 (lanes j-m) were mixed with the indicated amounts of melibiose (nM Mel) before the addition of 15 ng of RafR (lanes b-m). Lane a, no repressor added. Structures of operator DNAs (top) and operator-repressor complexes (margin) are represented as in Fig. 2. Complete inhibition of repressor binding is seen with 9 nM melibiose

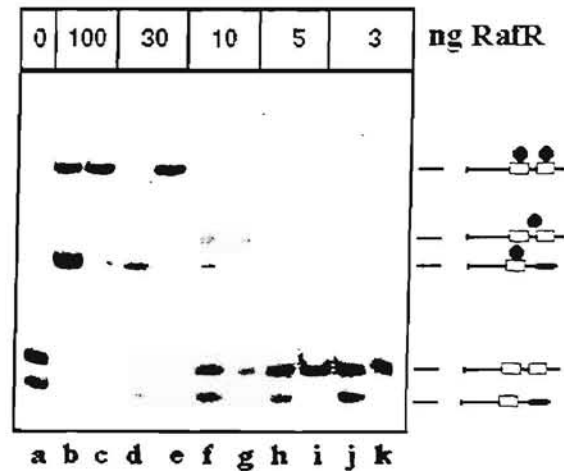


Fig. 5. Competition between native and mutant *raf* operator DNAs for decreasing amounts of Raf repressor. Amounts of Raf repressor (ng RafR) added are shown above lanes. Lanes c, e, g, i and k, 10 fmol of fragment A from pRU1322 (O_1 , O_2). Lanes b, d, f, h, j, 10 fmol of pRU1322 DNA (O_1 , O_2 fragment A) plus 10 fmol of pRU1327 DNA (O_1 , fragment B). Lane a, mixture of fragments A (pRU1322) and B (pRU1327) without repressor. Repressor-operator complexes correlating to retardation zones are symbolized as in Fig. 2

Table 1. Relative in vitro affinities of *raf* repressor binding to single and dual operator sites calculated from normalized intensities of retarded bands in Fig. 4

Number	r_1^*	r_2^*	DNA fragments used in assay ^a	Active operator sites	Normalized band intensities ($\times 10^{-2}$) ^b in retardation zones ^c						K_1/K_2^d
					0_A	0_B	1_{O_1}	1_{O_2}	$1_{O_{1,2}}$	$2_{O_{1,2}}$	
1	0.4	2	B(pRU1324) + B(pRU1327)	O_2 + O_1	–	–	35.8	64.2	–	–	1.12
2	0.4	1			–	–	52.0	48.0	–	–	1.08
3	0.4	0.5			–	–	68.3	31.7	–	–	1.08
4	1.0	–	A(pRU1322)	O_1O_2	51.5	–	–	–	45.5	3.0	13.4
5	0.7	–	B(pRU1322)	O_1O_2	–	69.0	–	–	30.0	1.0	13.0
6	0.4	–	A(pRU1322)	O_1O_2	79.0	–	–	–	20.6	0.4	13.4
7	0.4	2	A(pRU1322) + B(pRU1324)	O_1O_2 + O_2	68.0	22.7	–	2.3	6.8	–	1.01
8	0.4	1			47.6	43.5	–	4.1	4.9	–	0.92
9	0.4	0.5			19.7	72.1	–	6.5	1.6	–	1.11
10	0.4	2	A(pRU1322) + B(pRU1327)	O_1O_2 + O_2	63.8	28.3	2.6	5.3	–	–	1.11
11	0.4	1			47.0	42.0	4.7	5.9	–	–	0.89
12	0.4	0.5			25.6	61.5	9.0	3.8	–	–	0.99

* r_1 , repressor/DNA fragment ratio in assay (ng/fmol)

* r_2 , ratio of DNA fragments (fmol) used in retardation assay

^a Plasmids and fragments shown in Fig. 1

^b Normalized band intensities from Fig. 4 were calculated as a fraction of the total "density value" (100%) of each lane determined densitometrically

^c Zones formed on autoradiographs by (free or RafR-complexed) DNA fragments: 0_A , fragment A; 0_B , fragment B (Fig. 1B); 1_{O_1} , repressor-complexed fragment with functional O_1 ; 1_{O_2} , repressor-complexed fragment with functional O_2 ; $1_{O_{1,2}}$, native (O_1O_2) operator complexed with one repressor molecule; $2_{O_{1,2}}$, native operator complexed with two repressor molecules

^d K_1/K_2 , relative binding affinity of RafR for a particular operator combination. The intensity of a band at limiting repressor con-

centration corresponds to the probability of forming a retardation complex. Therefore, it defines the affinity of the repressor for a given operator site. K_1/K_2 is calculated according to equations adopted from Fried and Crothers (1981). For two operators located on different DNA fragments the relative binding affinity is given by: $K_1/K_2 = P(1_{O_1}) \times C(F_{O_2})/P(1_{O_2}) \times C(F_{O_1})$, where $P(x)$ is the relative band intensity and $C(F_x)$ is the input concentration of the DNA fragment bearing the operator site F_x . For non-complexed DNA fragments distinguishable by their electrophoretic mobility, the respective band intensities were used directly, instead of input fragment concentration according to: $K_1/K_2 = P(1_{O_1}) \times P(0_A) \times P(1_{O_{1,2}}) \times P(0_B)$. Alternatively, if the two operators are located on one DNA fragment we may write $K_1/K_2 = P(1_{O_{1,2}})^2 \times P(2_{O_{1,2}}) \times P(0_A)$

located on separate fragments (Table 1, lines 1–3). In each case, the calculated ratio K_1/K_2 of relative binding affinities was close to 1. This result confirms quantitatively the experimentally observed equivalence of the isolated O_1 and O_2 sites in binding RafR in vitro (Fig. 2).

A quite different result was obtained when the native O_1O_2 configuration was examined. Gel shift experiments at limiting RafR concentration revealed inefficient formation of complexes in which both operator sites are occupied by repressor (Fig. 2, lane f; Fig. 4, lane a; Fig. 5, lane g). Given the equivalence of the isolated O_1 and O_2 in repressor binding, a coefficient of "binding obstruction" between the two adjacent sites was calculated by treating them as two distinct operators located on one fragment (Fried and Crothers 1981). The calculated coefficients listed in Table 1 (lines 4–6) indicated that the apparent affinity of RafR for an operator site is lowered approximately 13-fold, if the adjacent site has already been occupied by RafR. This effect is thought to originate from steric hindrance between RafR dimers bound to O_1 and O_2 and separated by only 3 bp (Fig. 1C; Aslanidis et al. 1990). The close spacing and binding

equivalence of the two operators suggest that a single repressor molecule may oscillate between sites (yielding a hazy retardation band, e.g. Fig. 2, lane f) under non-saturating concentrations and that the stable occupation of both sites (at saturation) requires a change in DNA conformation. This view is supported by competition experiments that demonstrate steric hindrance of repressor binding to the second, non-occupied operator site. Although, the native O_1O_2 configuration contains twice the concentration of functional operator compared to single-site operator mutants (Fig. 1C), it does not display a higher requirement for repressor, either in competition for decreasing repressor concentrations (Fig. 5) or in mixtures of native and mutant fragments supplied at different ratios (Fig. 4; Table 1, lines 7–12). Rather, the native O_1O_2 arrangement behaved as if only one operator was functional. This is further supported by gel shift analyses in the presence of the inducer melibiose. The native O_1O_2 combination (Fig. 3, lanes b–d) and mutants with only one functional operator (Fig. 3, lanes f–m) were equally susceptible to arrest by melibiose, suggesting that only one site was occupied at a time.

Table 2. In vivo P_A promoter activity under wild-type and mutant operator-repressor controls

Plasmid ^a	Operator site ^b	α-Gal activity (units/h) ^c		E _r ^d	E _i ^e
		Fru	Mel		
pRU1322	O ₁ O ₂	1.5	390.8	1200	260.5
pRU1323	O ₂	3.5	450.2	514.3	128.6
pRU1324	O ₂	3.2	410.0	562.5	128.1
pRU1325	O ₁	20.3	340.5	88.7	16.8
pRU1326	O ₁	25.5	380.2	70.6	14.9
pRU1327	O ₁	27.1	360.4	66.4	13.3
pRU1328	–	1200	1000	1.5	0.8
pRU1329 (<i>rafR</i> *)	O ₁ O ₂	320	700	5.6	2.2
pRU1307 (Δ <i>rafR</i>)	O ₁ O ₂	1800	1400	1	0.8

^a α-Galactosidase (α-Gal) activities of wild-type (pRU1322) and mutant operators (pRU1323–1328) or mutant repressors (pRU1329, pRU1307) were determined upon transformation of *Escherichia coli* DH1. Plasmids carry the wild-type repressor gene, *rafR*, except for pRU1329 (*rafR**), which encodes a Thr₁₅ to Ala₁₅ substitution in the recognition helix, and pRU1307, which contains a deletion, Δ*rafR*.

^b Only the functional operator sites are listed.

^c α-Gal assay according to Schmid and Schmitt (1976). Values were averaged from five independent experiments. The estimated standard deviations is 20%. Fru, growth on 0.2% fructose (non-induced); Mel, growth on 0.2% melibiose (induced).

^d Efficiency of repression: ratio of constitutively expressed α-Gal activity (pRU1307) versus non-induced α-Gal activity.

^e Efficiency of induction: ratio of induced (Mel) versus non-induced (Fru) levels of α-Gal.

In vivo role of O₁ and O₂ sites as probed with operator mutants

The role of each operator in regulating *raf* transcription in vivo was studied by assessing α-Gal expression in *E. coli* DH1 transformed with recombinant plasmids bearing native and mutant operators (Fig. 1C). Preliminary tests confirmed the function of *rafA*, *rafR*, and their promoters, and revealed comparable plasmid copy numbers per cell under all the conditions used. Exponentially growing cultures were sampled at 2 h intervals and α-Gal activity was determined. Maximum activity increments of each culture are listed in Table 2.

The data imply three effects of repressor-operator interaction on transcription.

1. Repression is most efficient in the native O₁O₂ configuration, leading to a 1200-fold reduction in α-Gal (pRU1322) as compared to the repressor-deficient, constitutive pRU1307.
2. A differential role of the O₁ and O₂ operator sites is seen in controlling the *raf* operon in vivo. In non-induced cells, O₁ alone has little effect on *raf* transcription (pRU1325–pRU1327; Table 2). By contrast, O₂ alone exerts strong expression and melibiose induction raises the level of α-Gal almost 128-fold (pRU1323, pRU1324; Table 2).
3. The α-Gal levels of pRU1328-transformed cells that contain two non-functional *raf* operators approach those of the fully constitutive *rafR* deletion mutant, pRU1307, indicating that O₁ and O₂ are the primary sites of repressor action. The results demonstrate that in vivo – despite the in vitro equivalence of O₁ and O₂ in repressor binding – O₂ is dominant and its location between the –35 and –10 promoter boxes is crucial for controlling transcrip-

tion initiation by RNA polymerase, whereas O₁ has an accessory function.

In all operator configurations, melibiose induction leads to similar α-Gal levels in the presence of the wild-type repressor (360–450 units/h). These maximum activities were attained during the first hour after addition of inducer. Nevertheless, these α-Gal activities approached only one-third of the constitutive level exhibited by the repressorless pRU1307 (Table 2). Conceivably, this deviation from maximum α-Gal activity upon induction was a consequence of catabolite repression exerted by glucose, the immediate metabolite of melibiose. Accordingly, α-Gal levels displayed by the constitutive mutants pRU1307 and pRU1328 were reduced by about 20% upon the addition of 0.2% melibiose (Table 2).

It has been postulated that residues Val₁₄, Thr₁₅ and Arg₁₉ in the recognition helix of RafR are essential for repressor binding to specific base pairs in the major groove of the operator DNA (Aslanidis et al. 1990). This view is supported by the 213-fold lower repression or *rafA* transcription in pRU1329 compared to pRU1322 (Table 2) as a consequence of a Thr₁₅ to Ala₁₅ substitution (in RafR*) known to preserve the overall α-helix structure, but incapable of specific hydrogen bonding. As seen in Table 2, the constitutive level of α-Gal expressed by pRU1329 (RafR*) amounts to 18% of the fully constitutive Δ*rafR* mutant pRU1307, and induction with melibiose raises this level only twofold as a result of partial constitutivity.

Discussion

A special feature of *raf* operon control are two closely spaced, nearly identical operator sequences, O₁ and O₂,

that flank the -35 promoter box (Aslanidis and Schmitt 1990; Aslanidis et al. 1990). We have studied the role of each operator site in repressor binding *in vitro* and in *raf* transcription *in vivo* by selectively inactivating O_1 , O_2 , or both. Gel shift analysis revealed equivalence of isolated O_1 and O_2 in binding RafR, but indicated a 13-fold lower affinity for the second RafR dimer in the native O_1O_2 configuration, once the first dimer had been bound. The deduced negative interference of two RafR dimers bound to O_1 and O_2 *in cis* is consistent with observations at limiting repressor or inducer concentrations *in vitro* (Figs. 2 and 3) indicating "oscillation" of one repressor molecule between the two neighboring operators. By contrast, analyses of *raf* transcription control *in vivo* indicated that both O_1 and O_2 are simultaneously occupied by RafR in the repressed state and that O_2 is the dominating site, controlling *raf* repression 17 times more efficiently than O_1 (Table 2).

Gel shift analysis of mutant operator-repressor complexes

Substitutions of single base pairs in the 18 bp palindromic operator sequences, O_1 and O_2 , that either shifted the symmetry axis or led to an exchange at positions 3, 4 or 5 (counting from the axis; Aslanidis et al. 1990), eliminated the capacity of that operator to bind RafR repressor *in vitro* (Fig. 2). On the other hand, a Thr-15 to Ala-15 exchange in the recognition helix of RafR led to a 140-fold relaxation of *in vivo* transcription repression, thus indicating the importance of this residue in the specific repressor-operator interaction. In line with rules for protein-DNA recognition experimentally derived from compensating point mutations by Lehming et al. (1990), we have previously implicated residues Val-14, Thr-15 and Arg-19 in the RafR recognition helix in specifically interacting with nucleotides A3, A4 and G5, respectively, in the *raf* operator half-sites (Aslanidis and Schmitt 1990; Aslanidis et al. 1990). Although we have not screened all possible permutations of operator sequence, the single-site operator mutants (Fig. 1C) tested *in vitro* and *in vivo* support a concept that stresses the importance of the axis-proximal, conserved nucleotides in an operator half-site consensus $A_4W_3C_2C_6G_5A_4A_3A_2C_1$ (Aslanidis et al. 1990). In the *raf* system, gel shift competition experiments revealed equal affinities of O_1 and O_2 for RafR (Fig. 4, lanes j-l; Table 1, lines 1-3). It may be noted that the O_1 operator sequence diverges from the ideal *raf* operator by a C_5 to T_5 transition in the right-hand half-site. This asymmetry is reminiscent of wild-type *lac* operator which varies in two positions from complete symmetry, but appears to bind Lac repressor as efficiently as a synthetic 18 bp ideal *lac* operator (Lehming et al. 1987). Whether the alteration at position 5 of O_1 has an influence on transcription control by RafR has still to be tested with an ideal O_1 palindrome constructed by *in vitro* mutagenesis.

The 285 bp fragments B containing either native O_1 or O_2 sequences (Fig. 1B, C) were readily distinguishable in gel shift experiments when complexed with RafR

(Fig. 4, lanes g-i). Despite identical fragment sizes and protein/DNA ratios, complexed O_1 exhibited a slower electrophoretic mobility than complexed O_2 (Fig. 2, lanes c-e), indicating differences in DNA bending by bound repressor. Increased bending at O_1 may reflect: (i) the location of O_1 , which is closer than O_2 to the center of the 285 bp fragment B (68 bp versus 89 bp distance); and (ii) the coherence of bending at O_1 with intrinsic DNA curvature upstream of *rafA* (unpublished data). The different mobilities of complexed O_1 and O_2 made it possible to analyze the binding of a single RafR to the native O_1O_2 configuration. The diffuse (hazy) retardation band seen in these experiments (Fig. 2, lane f; Fig. 3, lanes c-e) suggests that RafR oscillates in an association/dissociation equilibrium between the spatially condensed operator sites, which may even continue within the gel matrix (Fried and Crothers 1981). Most probably, the bent DNA fragment facilitating this dynamic equilibrium of one RafR molecule with the two operators needs to change its conformation dramatically in order to bind a second repressor molecule (Fig. 2, lane b), an aspect further discussed below.

Relative binding affinities

Relative affinities of O_1 and O_2 operator sites for RafR were obtained by using normalized band intensities from competition experiments under limiting RafR concentration (Fig. 4). Calculated K_1/K_2 ratios reveal that within experimental error ($\pm 15\%$) both operators bind repressor with equal affinity when the operators are located on separate DNA fragments and only one operator site is functional per fragment (Table 1, lines 1-3). If, however, both operators are functional, binding of the first RafR molecule is normal, whereas the second RafR is bound with apparently 13-fold lower affinity (Table 1, lines 4-6). We assume that this low binding coefficient reflects the fact that distortion of the DNA is needed to accommodate the two closely spaced repressor molecules. Even though the binding of RafR to a (linear) DNA fragment *in vitro* does not give a complete picture of RafR binding to supercoiled plasmid DNA *in vivo*, the above results clearly suggest competitive rather than cooperative interactions between two RafR molecules bound to wild type O_1O_2 .

No "sandwich" complexes with two DNA fragments binding a single RafR molecule have been observed. This indicates that in gel shift assays the active form of RafR is a dimer, a notion conforming to a recent study by Weickert and Adhya (1992) that attributes tetramerization (as in LacI) to a C-terminal leucine minizipper not seen in the RafR protein. On the other hand, high-speed sedimentation equilibrium analysis of purified RafR revealed tetrameric repressor at high concentrations (Jaenicke et al. 1990) which, however, may not prevail in the experiments described here.

In vivo control of *raf* transcription by O_1 and O_2

The *in vivo* transcription system used here as a correlate to gel shift assays is well suited to monitoring quan-

tatively the effects of *raf* operator and repressor mutants. The main disadvantage of the pUC8-based multi-copy plasmid system employed is its instability, which may result in variable enzyme activities. This deficiency was largely compensated by determining α -Gal activities only in cultures derived from newly transformed cells, monitoring the amount of plasmid DNA after each experiment, and averaging values from five independent analyses.

The specific α -Gal activities obtained with different operator mutants depend on promoter strength and mRNA stability under the given conditions. The use of repression efficiencies, defined as ratios of α -Gal activities in the absence (pRU1307) and presence (pRU1322-pRU1329) of RafR (Table 2), largely eliminates these differences. Therefore, the relative repression factors determined for wild type, two repressor and six operator mutants may be considered a sensitive measure for assessing the functions of O_1 and O_2 in transcription control and the influence of certain *rafR* mutations on the affinity of RafR for operator.

The data listed in Table 2 reveal several interesting aspects of the dual *raf* operator/repressor control on α -Gal expression.

1. A partial deletion of *rafR* (pRU1307) renders the system fully constitutive, whereas a substitution of Thr-15, the second amino acid residue in the recognition helix of RafR (pRU1329), results in about 200-fold reduced repression, indicating lowered affinity of RafR* for operator DNA.

2. A 1200-fold repression was observed in the native O_1O_2 configuration (pRU1322), demonstrating very efficient control by two operators that flank the -35 promoter box.

3. If both operators contain a point mutation (pRU1328), repression was only 1.5-fold, implying only residual binding of repressor to the mutant operators. This dramatic effect of nucleotide substitutions in one operator half-site suggested that in each variant (Fig. 1C) the contribution of the mutant operator to repression may be neglected for the sake of assessing the role of the intact operator site.

4. By applying this criterion to the operator variants pRU1323-pRU1327, a difference between controls exerted by an intact O_1 and O_2 , respectively, became obvious (Table 2): RafR bound to O_2 to 45% of maximum repression, whereas RafR bound to O_1 resulted in merely 6% repression.

These differential effects on *rafA* transcription by the nearly identical operators, O_1 and O_2 , must be a consequence of their position relative to the promoter elements. According to Lanzer and Bujard (1988), RNA polymerase holoenzyme does not bind to a preformed operator-repressor complex located between the -10 and -35 boxes, while binding may take place in the presence of an upstream or downstream operator-repressor complex. Accordingly, RafR-complexed O_2 should repress transcription of *rafA* much more efficiently than RafR-complexed O_1 . It is rather unlikely that mutual displacement of repressor bound to O_2 and RNA polymerase binding to promoter sequences is alone re-

sponsible for the observed effect, as the transcription initiation complex overlapping sequences upstream and downstream of the promoter elements would similarly interfere with complexed O_1 .

Superimposed on polymerase displacement, a mechanism of repression may be operative at O_2 that involves repressor-induced twisting of operator DNA, leading to a distortion of the DNA double helix. This displaces the -10 and -35 boxes to different sides of the helix, where they cannot be recognized by RNA polymerase, as has been deduced for transcription control by MerR/Hg-MerR bound to an operator located between the -10 and -35 boxes of the *mer* operon (Ansari et al. 1992). In this model, binding of a second RafR to O_1 should enforce and even increase helix distortion owing to strain generated by two RafR dimers bound in close proximity. Thus, the combination of a dominating O_2 and an accessory O_1 site results in a very effective scheme for controlling transcription.

Acknowledgements. This investigation was supported by grant No.929 from the Latvian Science Council and a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Schm 68 17-4).

References

- Ansari AZ, Chael ML, O'Halloran TV (1992) Allosteric underwinding of DNA is a critical step in positive control of transcription by Hg-MerR. *Nature* 355:87-89
- Aslanidis C (1987) Totalsequenz des *raf* Operons: Struktur, Funktionen und Regulation. PhD thesis. University of Regensburg, FRG
- Aslanidis C, Schmitt R (1990) Regulatory elements of the raffinose operon: nucleotide sequences of operator and repressor genes. *J Bacteriol* 172:2178-2180
- Aslanidis C, Schmid K, Schmitt R (1989) Nucleotide sequences and operon structure of plasmid-borne genes mediating uptake and utilization of raffinose in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171:6753-6763
- Aslanidis C, Muiznieks I, Schmitt R (1990) Successive binding of *raf* repressor to adjacent *raf* operator sites in vitro. *Mol Gen Genet* 223:297-304
- Bradford M (1976) A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Dunn TM, Hahn S, Ogden S, Schleif RF (1984) An operator at -280 base pairs that is required for repression of *araBAD* operon promoter: addition of DNA helical turns between the operator and promoter cyclically hinders repression. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5017-5020
- Eismann E, Müller-Hill B (1990) *lac* repressor forms stable loops *in vitro* with supercoiled wild type *lac* DNA containing all three natural *lac* operators. *J Mol Biol* 213:763-775
- Eismann E, von Wilcken-Bergmann B, Müller-Hill B (1987) Specific destruction of the second *lac* operator decreases the repression of *lac* operon in *Escherichia coli* fivefold. *J Mol Biol* 195:949-952
- Fried M, Crothers DM (1981) Equilibria and kinetics of *lac* repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 9:6505-6525
- Fritz H-J, Bicknäse H, Gleumes B, Heibach C, Roshahl S, Ehring R (1983) Characterization of two mutations in *Escherichia coli galE* gene inactivating the second galactose operator and comparative studies of repressor binding. *EMBO J* 2:2129-2135
- Garner MM, Revzin A (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions:

- applications to *E. coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* 9:3047–3060
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557–568
- Hudson JM, Fried M (1990) Cooperative interactions between the catabolite repressor gene activator protein and the *lac* repressor at the lactose promoter. *J Mol Biol* 214:381–396
- Irani MH, Orosz L, Adhya S (1983) A control element within a structural gene: the *gal* operon of *Escherichia coli*. *Cell* 32:783–787
- Jaenicke R, Muiznieks I, Aslanidis C, Schmitt R (1990) Ultracentrifugal analysis of the quaternary structure of *raf* repressor from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 260:233–235
- Krämer H, Niemöller M, Amouyal M, Revet B, von Wilcken-Bergmann B, Müller-Hill B (1987) *lac* repressor forms loops with linear DNA carrying two suitably spaced *lac* operators. *EMBO J* 6:1481–1491
- Lanzer M, Bujard H (1988) Promoters largely determine the efficiency of repressor action. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8973–8977
- Lee J, Goldfarb A (1991) *lac* repressor acts by modifying the initial transcribing complex so that it cannot leave the promoter. *Cell* 66:793–798
- Lehming N, Sartorius J, Niemöller M, Genenger G, von Wilcken-Bergmann B, Müller-Hill B (1987) The interactions of the recognition helix of *lac* repressor with *lac* operator. *EMBO J* 6:3145–3153
- Lehming N, Sartorius J, Kisters-Woike B, von Wilcken-Bergmann B, Müller-Hill B (1990) Mutant *lac* repressors with new specificities hint at rules for protein-DNA recognition. *EMBO J* 9:615–621
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York
- Oehler S, Eismann E, Krämer H, Müller-Hill B (1990) The three operators of the *lac* operon cooperate in repression. *EMBO J* 9:973–981
- Pabo CO, Sauer RT (1984) Protein-DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 53:293–321
- Sartorius J, Lehming N, Kisters B, von Wickeln-Bergmann B, Müller-Hill B (1989) *lac* repressor mutants with double or triple exchanges in the recognition helix bind specifically to *lac* operator variants with multiple exchanges. *EMBO J* 8:1265–1270
- Schmid K, Schmitt R (1976) Raffinose metabolism in *Escherichia coli* K12. Purification and properties of a new α -galactosidase specified by a transmissible plasmid. *Eur J Biochem* 67:95–104
- Schmid K, Ritschewald S, Schmitt R (1979) Relationships among raffinose plasmids determined by the immunochemical cross-reaction of their α -galactosidases. *J Gen Microbiol* 114:477–481
- Schmitt R, Mattes R, Schmid K, Altenbuchner J (1979) *Raf* plasmids in strains of *Escherichia coli* and their possible role in enteropathogeny. In: Timmis KN, Pühler A (eds) *Plasmids of medical, environmental and commercial interest*. Elsevier North Holland Biomedical Press. Amsterdam, pp 199–210
- Straney DC, Straney SB, Crothers DM (1989) Synergy between *Escherichia coli* CAP protein and RNA polymerase in *lac* promoter open complexes. *J Mol Biol* 206:41–57
- Stueber D, Bujard H (1982) Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes. *EMBO J* 1:1399–1404
- Tuggle CK, Fuchs JA (1986) Regulation of the operon encoding ribonucleotide reductase in *Escherichia coli*: evidence for both positive and negative control. *EMBO J* 5:1077–1081
- Valentin-Hansen P, Albrechtsen B, Love Larsen JE (1986) DNA-protein recognition: demonstration of three genetically separated operator elements that are required for repression of *Escherichia coli deoCABD* promoters by DeoR repressor. *EMBO J* 5:2015–2021
- Vieira J, Messing J (1982) The pUC plasmids. An M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic primers. *Gene* 33:259–268
- Weickert MJ, Adhya S (1992) A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *J Biol Chem* 267:15869–15874
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp8 and pCU19 vectors. *Gene* 33:103–119

The topology of the promoter of RNA polymerase II- and III-transcribed genes is modified by the methylation of 5'-CG-3' dinucleotides

Indrikis Muiznieks⁺ and Walter Doerfler^{*}

Institute of Genetics, University of Cologne, D-50931 Cologne, Germany

Received March 29, 1994; Revised and Accepted June 1, 1994

ABSTRACT

In eukaryotic cells, RNA polymerase II- and III-transcribed promoters can be inactivated by sequence-specific methylation. For some promoter motifs, the introduction of 5-methyldeoxycytidine (5-mC) residues has been shown to alter specific promoter motif-protein interactions. To what extent does the presence of 5-mC in promoter or regulatory DNA sequences affect the structure of DNA itself. We have investigated changes in DNA bending in three naturally occurring DNA elements, the late E2A promoter of adenovirus type 2 (Ad2) DNA, one of our main model systems, the VAI (virus-associated) RNA gene of Ad2 DNA, and an Alu element associated with the human angiogenin gene. Alterations in electrophoretic mobility of differently permuted promoter segments in non-denaturing polyacrylamide gels have been used as assay system. In the late E2A promoter of Ad2 DNA, a major and possibly some minor DNA bending motifs exist which cause deviations in electrophoretic mobility in comparison to coelectrophoresed marker DNA fragments devoid of DNA bending motifs. DNA elements have been specifically *in vitro* methylated by the HpaII (5'-CCGG-3'), the FnuDII (5'-CGCG-3'), or the CpG DNA methyltransferase from *Spiroplasma species* (M-Sssl; 5'-CG-3'). Methylation by one of these DNA methyltransferases influences the electrophoretic mobility of the three tested promoter elements very strikingly, though to different extents. It cannot be predicted whether sequence-specific promoter methylation increases or decreases electrophoretic mobility; these changes have to be experimentally determined. Methylation of the *E.coli* dcm (5'-CCA/TGG-3') sites in some of the DNA constructs does not make a contribution to mobility changes. It is concluded that sequence-specific methylations in promoter or regulatory DNA elements can alter the bending of DNA very markedly. This parameter may contribute significantly to the silencing of promoters, probably via altering spatial relationships among DNA-bound transcription factors.

INTRODUCTION

The frequent observation of inverse correlations between eukaryotic promoter activity and extent of promoter methylation (for reviews 1, 2) has stimulated experiments to methylate promoter constructs *in vitro* and subsequently to assess the loss of their functionality upon microinjection, transfection or in cell-free transcription systems (3–19). In this laboratory, we have used viral or human cellular promoters to demonstrate that their sequence-specific methylation leads to inactivation in different biological systems (for review, 20).

In a functional DNA sequence, the introduction of 5-methyldeoxycytidine residues (5-mC) will or will not modulate DNA-protein interactions depending on the position of 5-mC in the promoter (for review, 21). There are mammalian proteins which specifically bind to methylated DNA sequences (22, 23).

The relative mobility of synthetic oligodeoxyribonucleotides in polyacrylamide gels (24, 25), or of actual promoters (26) is strikingly altered by sequence-specific methylation. Methylation-induced bending of the 359 bp H-ras promoter sequence has been described when 60–70% of its 57 5'-CG-3' dinucleotides are modified by human placenta DNA methyltransferase, but not when only HpaII or HhaI sites are methylated (26). It is also conceivable that helix stability in polynucleotide duplexes or plasmids is affected by methylation (27–30).

In the quest to analyze the molecular mechanism, by which sequence-specific promoter methylation interferes with transcription, we have performed model experiments on the late E2A promoter of adenovirus type 2 (Ad2) DNA. The *in vitro* methylation of this promoter segment does not noticeably affect its interaction with cellular proteins (31). However, when a 50 nuc promoter sequence is *in vitro* methylated at the two 5'-CCGG-3' sequences, its binding to cellular proteins has been strikingly altered (32, 33).

In this report, we present evidence that the late E2A promoter of Ad2 DNA carries intrinsic, sequence-dependent curvatures in the vicinity of its TACA signal. The introduction of 5-mC in specific 5'-CG-3' dinucleotide sequences can elicit detectable changes in the curvature of the promoter sequence. Similar findings have been documented for two control regions of the polymerase III-transcribed regions, the VAI (virus-associated RNAI) segment of Ad2 DNA and an angiogenin gene-associated

^{*}To whom correspondence should be addressed

⁺Present address: Faculty of Biology, University of Latvia, Kronvalda Blvd. 4, LV-1587 Riga, Latvia

Alu element in human DNA. The impact of 5-mC on DNA curvature is sequence-specific, does not correlate to the number of 5-mC residues, and 5-mC can augment or diminish bending.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and plasmids

E. coli XL1-Blue MR (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USA) was used for most experiments involving cloning and DNA preparation. The strain GM2163 (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) was employed to obtain *dcm*⁻ and *dam*⁻ non-methylated DNA preparations. The plasmid pAd2E2AL-CAT (10) carries the late E2A gene promoter from Ad2 DNA (Ad2 nucleotides 25,886–26,369; ref. 34) and the prokaryotic gene for chloramphenicol acetyltransferase (CAT). The plasmid pVAI+II (35) contains the VAI and VAII regions of Ad2 DNA (nucleotides 10,579–11,338); the plasmid pAngio-2 (36) the promoter region and the 5'-flanking Alu element from the human angiogenin gene (nucleotides 1–1686, in the sequence of Kurachi *et al.*, ref. 37). Tandem dimers of the studied DNA fragments were obtained by standard cloning techniques. The formation of tandem dimer constructs was facilitated by increasing the fragment:vector ratio in ligation reactions to about 20:1 and by performing the reaction in a total volume of 10 μ l for 20 min at 37°C with 2 units of T4 DNA ligase. Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP)-treated vector input in these ligation reactions was 5 ng.

Restriction enzymes used in the cloning and permutation analyses were obtained from New England Biolabs, Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany), Amersham-USB (Cleveland, Ohio USA) and MBI-Fermentas (Vilnius, Lithuania). CIAP was from New England Biolabs, T4 DNA ligase from Stratagene or MBI-Fermentas. Plasmid DNAs were purified by using Qiagen (Hilden, Germany) Mini- and Midiprep systems.

The *in vitro* methylation of DNA

Supercoiled or linearized plasmid DNAs were methylated *in vitro* by the bacterial M-HpaII (MBI-Fermentas) or the M-FnuDII (New England Biolabs or Amersham-USB) DNA methyltransferases or by the M-SssI (CpG) DNA methyltransferase from *Spiroplasma species* (38) (New England Biolabs or Amersham-SUB). NEB buffer Nr. 2 containing 160 μ M S-adenosylmethionine (SAM) was used in all methylation reactions which proceeded for 2 to 4 h at 37°C using 2 units of enzyme per μ g of DNA in a volume of 10 μ l. In mock-methylation reactions, SAM was omitted. At the end of the methylation or mock-methylation experiments, DNA was reextracted by phenol-chloroform and ether, ethanol precipitated, washed with 70% ethanol and resuspended at a final concentration of 1 μ g in 10 μ l of 0.01 M Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA (TE). The completeness of methylation was proven by the failure to be cleaved with HpaII or SacII or by determination of the nucleotide sequence. In the pAd2E2AL-CAT construct, two M-FnuDII recognition sequences in the E2AL promoter are included in SacII sites. SacII is inhibited by M-FnuDII methylation.

Polyacrylamide gel electrophoresis of DNA

The electrophoretic mobility of DNA fragments was assessed in 5–10% polyacrylamide (acrylamide:Bis 39:1) gels (250–400 \times 130 \times 1 mm). Gels were run for 12–18 h at 25–30 mA at 4°C. In gel electrophoresis, 40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA (TAE) buffer was used with constant buffer

recycling to prevent its exhaustion during separation. The DNA in gels was stained for 10 min in 1 μ g of ethidium bromide per ml solution in TAE, destained for 20–30 min in water and photographed on an UV-transilluminator by using an orange filter and Polaroid 665 positive-negative film. In parallel, computer images of gels were taken with a Cybertech CA-1 videocamera. Even slight anomalies in DNA structure could be readily documented by changes in mobility under the conditions chosen for gel electrophoresis. Apparent fragment lengths were estimated using a CAM program for computer images of gels (Cybertech, Germany). For calibration, DNA fragments with normal electrophoretic mobility in polyacrylamide gels corresponding to their actual sequence lengths were used. These size standards were produced from the coding part of the tetracycline-resistance gene of pBR322-group plasmids (39) and the presumably uncurved parts of the bacterial insertion sequence IS5 and *rafR* gene (40). The following fragments yielded a straight calibration plot of distance migrated in gel versus length (lg) in base pairs (bp): the 929, 383 and 121 BstNI fragments of pBR322 DNA, the 597 bp BamHI/NruI fragment of pBR322 DNA, the 475, 292, and 238 bp BstNI fragments of pBR329::IS5 DNA, and the 188 bp PstI fragment of pRU984 DNA (41).

RESULTS AND DISCUSSION

The promoter of the late E2A gene of Ad2 DNA contains a sequence-dependent bend

The late E2A promoter of Ad2 DNA has served as one of our main models for investigations on the effect of sequence-specific DNA methylation on promoter activity. We have now performed more detailed studies on methylation-dependent structural alterations of this sequence. Even subtle structural differences between different DNA molecules can be documented by changes in the electrophoretic mobility in non-denaturing polyacrylamide gels (42, 43). Such minor structural differences in the curvature of DNA may be enhanced by methylation and hence more easily detectable. The altered mobility of curved DNA fragments has been attributed to their reduced end-to-end distance and increased effective diameter (44, 45). Diameter changes presumably are more striking when the curvature is located close to the midpoint of the molecule.

The late E2A promoter fragment of Ad2 DNA (Ad2E2AL) was cloned as tandem dimer and was cleaved with different restriction endonucleases, that cut once per monomer, thus generating a set of differently permuted promoter sequences. The bent part of the DNA was then located in different parts of the linear molecule (44). In the evaluation of the results adduced by gel electrophoresis experiments, the coefficient R_L was calculated as M_a/M_r , i.e. the apparent versus the real (sequence) length of the molecule.

The map of the 490 bp late E2A (E2AL) promoter fragment of Ad2 DNA from plasmid pAd2E2AL-CAT (10) (nucleotides 25,886–26,369 plus seven nucleotides from the vector; ref. 34) is shown in Fig. 1a. This DNA sequence contains 34 5'-CG-3' dinucleotides, which can be *in vitro* methylated by the CpG DNA methyltransferase (M-SssI; ref. 38), 3 recognition sequences each for the HpaII (5'-CCGG-3') and the *dcm* (5'-CC(A/T)GG-3') DNA methyltransferases, and 2 sites for the FnuDII (5'-CGCG-3') DNA methyltransferase. Tandem dimers of the E2AL promoter sequence were generated by cloning this 490 bp HindIII fragment, its 364 bp PstI subfragment, or its 220 bp MspI subfragment into suitable sites in the vector plasmid

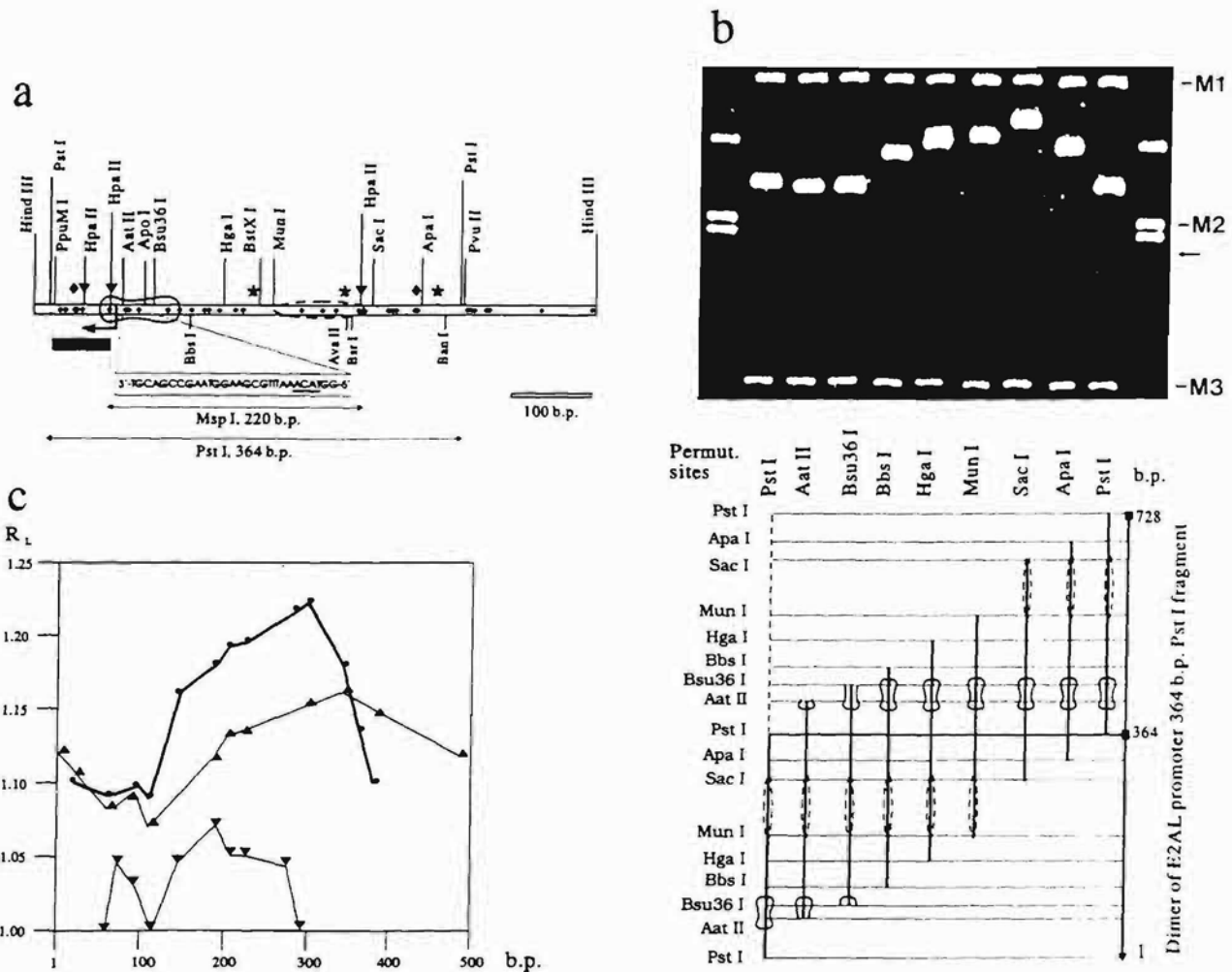


Figure 1. Localization of sequence-dependent bending motifs in the E2AL promoter of Ad2 DNA. (a) Structure of the 490 bp HindIII fragment carrying the E2AL promoter in the pAd2E2AL-CAT construct (10). The restriction sites used in the cloning of subfragments and in the permutation analyses are indicated above the promoter symbol. Additional sites used in the permutation analyses of the 364 bp PstI or the 220 bp MspI subfragments are indicated below the promoter symbol. Locations of the MspI and PstI subfragments are designated by thin lines. The sequence part deleted in pΔ46-CAT by a solid bar. Explanation of other symbols: ♦, recognition sequence for M-SssI; ▼, M-HpaII; ◆, M-FnuDII; ★, dcm methylase; ←, cap site of E2AL promoter. The sequence part included in the doughnut-shaped symbol carries the sequence-dependent bend: the dashed oval refers to a minor putative bending motif. The numbering of nucleotides starts with the first A in the HindIII recognition sequence. (b) The electrophoretic mobility of the permuted sequences from the tandem dimer 364 bp PstI E2AL promoter subfragment in a non-denaturing 8% polyacrylamide gel. Identical lengths marker fragments were coelectrophoresed as internal standards in each lane. Restriction enzymes used to create permuted sequences were indicated beneath the ethidium-bromide stained gel. A scheme of their distribution in the tandem dimer of the 364 bp PstI fragment, with the DNA bending motifs in the doughnut-shaped symbol or in the dashed oval were also presented. Marker fragments migrating in the polyacrylamide gel according to their actual sequence lengths were indicated on the right: M1—475 bp; M2—383 bp; M3—292 bp. Arrow denotes the virtual position in the gel of the unbent 364 bp fragment. (c) R_L curves for the 490 bp HindIII (▲-▲-), 364 bp PstI (●-●-), or the 220 bp MspI (▼-▼-) tandem dimer fragments. The apparent lengths of these molecules were estimated by electrophoresis in 8% polyacrylamide gels run at 4°C. The deviation bars in these measurements were = 0.02 to maximally = 0.03.

pBS(+). The ensuing constructs were termed pdH490, pdP364 or pdM220, respectively. When these tandem dimer constructs were cleaved once by single site-cutting restrictases, unit length fragments with permuted nucleotide sequences were produced (graphic scheme in Fig. 1b). These fragments migrate identically in 1% agarose gels or in 8% polyacrylamide gels electrophoresed at 65°C (data not shown).

However, at 4°C the permuted E2AL promoter fragments excised from the pdP364 construct migrated in an 8% polyacrylamide gel with velocities corresponding to apparent molecular lengths between 395 and 445 bp (photograph of ethidium bromide-stained gel in Fig. 1b). The fastest migrating

fragments were created upon cleavage with AatII or Bsu36I. Hence, the major sequence motif responsible for DNA bending appeared to be located in a region between these sites which contains the TACA sequence of the E2AL promoter. These deviations in gel migration could be reproduced in more than 15 different experiments. The R_L values thus determined for a number of different E2AL promoter fragments were graphically summarized in Fig. 1c. Gel concentrations between 5 and 10% yielded very similar results, with the R_L values decreasing at lower concentrations. The TAE buffer yielded more distinct bands in electrophoresis experiments than other buffer systems (data not shown; see Materials and Methods for buffer concentration).

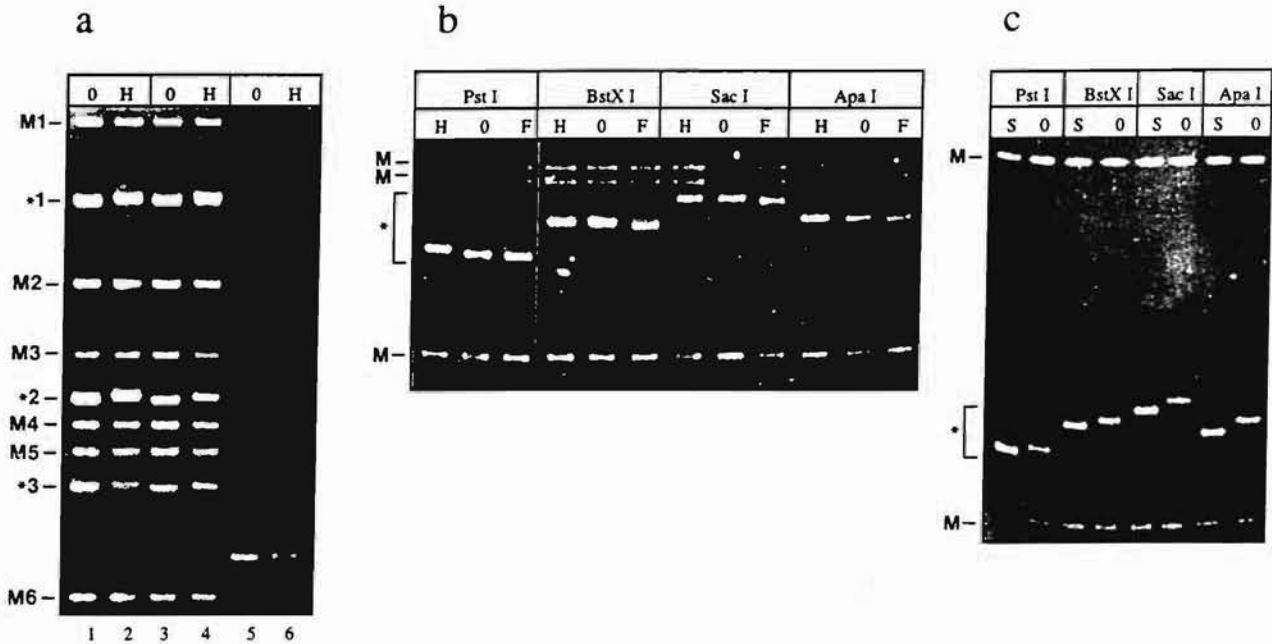


Figure 2. Methylation of 5'-CpG-3' dinucleotides modifies bending of the E2AL promoter DNA. (a) Influence of HpaII (5'-CCGG-3') and dcm (5'-CC(A/T)GG-3') methylation on the topology of the E2AL non-permuted promoter fragment. In lanes 1-4, the 490 bp HindIII or the 364 bp PstI E2AL promoter fragment of the pAd2E2AL-CAT construct or the 325 bp PstI fragment from pΔ46-CAT (marked with *1 to *3 on the left margin) was mixed and coelectrophoresed with 6 marker fragments (M), the restriction products of plasmids pBR322 and pBR329::IS5. The marker fragments M₁ (597 bp), M₂ (475 bp), M₃ (383 bp), and M₆ (292 bp) migrate in polyacrylamide gels strictly according to their actual lengths. The E2AL promoter DNAs in lanes 1 and 2 were isolated from dcm⁻, in lanes 3 and 4 from dcm⁺ *E. coli* strains. Plasmid DNAs in lanes 2 and 4 were *in vitro* methylated with M-HpaII (H) before cleavage with HindIII or PstI. Plasmid DNAs in lanes 1 and 3 were mock-methylated (O). Lanes 5 and 6: The 364 bp PstI fragments (*2), as used in lanes 3 and 4 were further cleaved with SacI. (b) Sequence permutations affect the impact of methylation-induced changes in E2AL promoter fragment topology, as determined by mobility assays in a polyacrylamide gel. Sequence-specific DNA methyltransferases used for the *in vitro* modification of the pdP364 DNA were denoted above the figure: H—M-HpaII, O—mock-methylation with HpaII, F—M-FnuDII. Restriction enzymes used to generate the fragments were listed above the lanes of corresponding fragments (*). Marker fragments (M) were included in each lane to assess the quality of separation. (c) Changes in electrophoretic mobility of permuted sequences of the 364 bp PstI fragment of the E2AL promoter imposed by M-SssI methylation of all 5'-CpG-3' dinucleotides. Lanes containing M-SssI treated DNA were marked with S, lanes containing M-SssI mock-methylated DNA with O.

The finding of abnormal migration behavior of subfragments in the E2AL promoter corroborated the location of the major DNA bending motif in the TACA region. Fluctuations in the apparent lengths of dimers of the E2AL promoter fragment permuted with Bsu36I, ApoI or AatII indicate that the bend in the TACA box region is actually formed by two distinct motifs located close to each other (Fig. 2c). The plateau region in the R_L curve preceding the ApaI permuted site of construct pdH490, the SacI site of pdP364, and following the HgaI site of pdM220 suggests the existence of another minor curvature motif between the MunI and SacI sites. Since the R_L values for fragments derived from the pdH490 or the pdP364 constructs are strikingly higher than for those derived from the shorter pdM220 construct, the major DNA bending motif appears to overlap the termini of the latter fragment. The abnormal migration of DNA fragments in polyacrylamide gel electrophoresis is maximal when a bent segment is flanked on both sides by stretches of about 150 bp. Shorter flanking sequences decrease anomalies in migration rates. For the pdM220 construct, therefore, the anomaly is reduced compared to the longer constructs.

Assigning the complex curvature of the E2AL promoter segment to one major bending motif close to the center of the most slowly migrating fragments, the equation $M_r/M_s = \cos \alpha/2$ (46) can be tentatively applied to quantitate the curvature. Different subfragments of the E2AL promoter might deviate from linearity by angles between 40° and 70°. The fluctuations around

an estimated value suggest that additional sequence motifs might contribute to the bend topology.

Impact of sequence-specific methylation on the topology of the E2AL promoter

The plasmid constructs pdP364 and pdH490 were *in vitro* methylated with the HpaII (5'-C⁺CGG-3'), or the FnuDII (5'-⁺CG⁻CG-3'), or the SssI (5'-⁺CG-3') DNA methyltransferase to assess the role of sequence-specific methylation on the topology of this E2AL promoter segment. The methylated plasmids were used only when appropriate restriction analyses confirmed complete methylation at the modified sites.

For some of the experiments, a plasmid devoid of the 5'-CCGG-3' sites at positions +6 and +24 relative to the +1 site of transcriptional initiation in the E2AL promoter was constructed. The XbaI-BstXI fragment from the pdM220 construct was blunt-ended with Klenow polymerase and ligated into the PpuMI-BsXI equally blunt-ended pAd2E2AL-CAT plasmid. The XbaI site in the pdM220 construct was derived from the pBS(+) plasmid vector. In the thus generated E2AL promoter construct (pΔ46-CAT), the segment between nucleotides +7 to +52 was replaced by the 5'-CTAGAGT-3' sequence from the pBS(+) plasmid (see Fig. 1a). This construct had only the one 5'-CCGG-3' site left at nucleotide -215.

The E2AL promoter contains three 5'-CC(A/T)GG-3' (dcm) sequences which are modified by the dcm DNA methyltransferase

CONCLUSION

The data presented for transcriptionally active DNA fragments, the RNA polymerase II-transcribed E2AL promoter of Ad2 DNA, the polymerase III-transcribed VAI segment of Ad2 DNA and a human Alu element associated with the 5'-end of the angiogenin gene, demonstrate that a few 5-mC residues in 5'-CG-3' dinucleotides can elicit reproducible changes in DNA topology. Mobility assays in non-denaturing polyacrylamide gels have been successfully exploited to document topological changes and altered gel mobility. The direction of the mobility changes, increases or decreases, cannot be predicted but have to be experimentally determined. Our data for the three DNA segments investigated have been summarized in Table 1.

The bending motifs observed in the DNA segments investigated are not as effective in influencing the migration rate of the DNA segment as, e.g., the one present on the 5'-terminus of the IS5 element (48) which elicits a R_L value of > 2.0 .

At present, we surmise that the modulation of E2AL promoter topology effected by 5'-CCGG-3' methylation can influence the fine tuning of protein-DNA and protein-protein interactions in the transcription apparatus thus that transcriptional inactivation ensues. It appears reasonable to suggest that the 5'-AAATTT-3' sequence, that is located immediately 5' adjacent to the TACA motif of the E2AL promoter, represents the crucial element in the DNA bending motif (cf. Fig. 1a). The TATA-binding protein and the transcription factor TFIIID bend DNA upon binding (49-51). Hence, it will be interesting to investigate how the methylation-induced changes in bending of promoter DNA will influence the topology of a complex between the E2AL promoter and the TATA-binding protein.

The data presented support the interpretation that the migration rate of 5'-CCGG-3' methylated DNA fragments is the more strikingly affected, the closer the modified sequence lies to the center of the molecule (Fig. 2b, lanes 3-6; Fig. 3b, lanes 2, 5, 8). When the methylated sequence is shifted towards the terminus by permutation of the dimer construct, the effect on migration in general decreases. It is conceivable that the methylation-induced topology changes are associated with minor kinking of the DNA structure. The data indicate that 5'-CG-3' methylation does not elicit cumulative effects on DNA topology. Minor structural alterations due to kinks at different sites in the helix may neutralize each other in their impact on the overall structure of the molecule. These kinks can, however, facilitate bending or interfere with existing structural motifs in a phasing dependent manner. The twist angle of base pair stacking may not be significantly influenced by 5'-CG-3' methylation.

Since presence or absence of 5-mC residues in the 5'-CC(A/T)GG-3' (dcm) sequence does not have any effect on the mobility of the investigated DNA fragments, DNA bending effects appear to be restricted to methylated 5'-CG-3' sequences. On the other hand, introduction of a N⁶-methyldeoxyadenosine residue in the 5'-GATC-3' sequence by the dam DNA methyltransferase affects bending very strikingly (data not presented). The methylation of C residues in 5'-CG-3', 5'-GCGC-3' or 5'-CCGG-3' sequences induces similar DNase I-hypersensitive sites immediately 5' to the methylated nucleotide (16, 31, 52). We have observed that FnuDII-created hemimethylated patterns in DNA can also lead to an enhancement of DNase I sensitivity of immediately upstream located phosphodiester bonds (data not shown). Thus, similar deflections of the local DNA axis at methylated 5'-CG-3', 5'-GCGC-3' or

5'-CCGG-3' sequences may be involved in more extensive modulations of DNA topology in larger genome segments. Complex effects of methylation patterns on the bending of native DNA fragments are determined by the mutual phasing of methyl groups and their phasing to intrinsically curved DNA motifs.

ACKNOWLEDGEMENTS

Indrikis Muiznieks was the recipient of a fellowship from the Alexander-von-Humboldt Stiftung, Bonn, Germany. This research was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft through SFB274-A1.

REFERENCES

- Doerfler, W. (1981) *J. Gen. Virol.*, 57, 1-20.
- Doerfler, W. (1983) *Annu. Rev. Biochem.*, 52, 93-124.
- Vardimon, L., Kuhlmann, I., Doerfler, W., and Cedar, H. (1981) *Eur. J. Cell Biol.*, 25, 13-15.
- Vardimon, L., Kressmann, A., Cedar, H., Maechler, M., and Doerfler, W. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1073-1077.
- Stein, R., Razin, A., and Cedar, H. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3418-3422.
- Busslinger, M., Hurst, J., and Flavell, R.A. (1983) *Cell*, 34, 197-206.
- Kruczek, I., and Doerfler, W. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 7586-7590.
- Graessmann, M., Graessmann, A., Wagner, H., Werner, E., and Simon, D. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 6470-6474.
- Langner, K.-D., Vardimon, L., Renz, D., and Doerfler, W. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 2950-2954.
- Langner, K.-D., Weyer, U., and Doerfler, W. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 1598-1602.
- Knebel, D., Lübbert, H., and Doerfler, W. (1985) *EMBO J.*, 4, 1301-1306.
- Müller, U., and Doerfler, W. (1987) *J. Virol.*, 61, 3710-3720.
- Murray, E.J., and Grosveld, F. (1987) *EMBO J.*, 6, 2329-2335.
- Dobrzanski, P., Hoeweler, A., and Doerfler, W. (1988) *J. Virol.*, 62, 3941-3946.
- Weisshaar, B., Langner, K.-D., Jüttermann, R., Mäller, U., Zock, C., Klimkait, T., and Doerfler, W. (1988) *J. Mol. Biol.*, 202, 255-270.
- Watt, F., and Molloy, P.L. (1988) *Genes Devel.*, 2, 1136-1143.
- Comb, M., and Goodman, H.M. (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18, 3975-3982.
- Boyse, J., and Bird, A.P. (1991) *Cell*, 64, 1123-1134.
- Lettmann, C., Schmitz, B., and Doerfler, W. (1991) *Nucleic Acids Res.*, 19, 7131-7137.
- Doerfler, W. (1993) In Jost, J.P., and Saluz, H.P. (eds.), *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 262-299.
- Ehrlich, M., and Ehrlich, K.C. (1993) In Jost, J.P., and Saluz, H.P. (eds.), *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 145-168.
- Wang, R.-H., Zhang, Y.-Y., Khan, R., Zhou, Y., Huang, L.-H., and Ehrlich, M. (1986) *Nucleic Acids Res.*, 14, 9843-9860.
- Meehan, R.R., Lewis, J.D., McKay, S., Kleiner, E.L., and Bird, A.P. (1989) *Cell*, 58, 499-507.
- Diekmann, S. (1987) *EMBO J.*, 6, 4213-4217.
- Hagermann, P.J. (1990a) *Biochemistry*, 29, 1980-1983.
- Rachal, M.J., Holton, P., and Lapeyre, J.N. (1993) In Jost, J.P., and Saluz, H.P. (eds.), *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 330-342.
- Behe, M., and Felsenfeld, G. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1619-1623.
- Zacharias, W., O'Connor, T.R., and Larson, J.E. (1988) *Biochemistry*, 27, 2970-2978.
- Zacharias, W., Jaworski, A., and Wells, R.D. (1990) *J. Bacteriol.*, 172, 3278-3283.
- Murchie, A.I.H., and Lilley, D.M.J. (1989) *J. Mol. Biol.*, 205, 593-602.
- Hoeweler, A., and Doerfler, W. (1987) *DNA*, 6, 449-460.
- Hermann, R., Hoeweler, A., and Doerfler, W. (1989) *J. Mol. Biol.*, 210, 411-415.
- Hermann, R., and Doerfler, W. (1991) *FEBS Letters*, 281, 191-195.
- Roberts, R.J., Akusjärvi, G., Alestrom, P., Gelinis, R.E., Gingeras, T.R., Sciaky, D., and Pettersson, U. (1986) *Devel. Mol. Virol.*, 8, 1-51.

35. Jüttermann, R., Hosokawa, K., Kochanek, S., and Doerfler, W. (1991) *J. Virol.*, 65, 1735–1742.
36. Kochanek, S., Renz, D., and Doerfler, W. (1993) *EMBO J.*, 12, 1141–1151.
37. Kurachi, K., Davie, E.W., Strydom, D.J., Riordan, J.F., and Vallee, B.L. (1985) *Biochemistry*, 24, 5494–5499.
38. Renbaum, P., Abrahamove, D., Fainsod, A., Wilson, G.G., Rottem, S., and Razin, A. (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18, 1145–1152.
39. Stellwagen, N.C. (1983) *Biochemistry*, 22, 6186–6193.
40. Muiznieks, I., unpublished results.
41. Aslanidis, C., Muiznieks, I., and Schmitt, R. (1990) *Mol. Gen. Genet.*, 214, 433–438.
42. Diekmann, S. (1989) *Electrophoresis*, 10, 354–359.
43. Hagermann, P.J. (1990b) *Annu. Rev. Biochem.*, 59, 755–781.
44. Wu, H.-M., and Crothers, D.M. (1984) *Nature*, 308, 509–513.
45. Lumpkin, O.J., DeJardin, P., and Zimm, B.H. (1985) *Biopolymers*, 24, 1573–1593.
46. Thompson, J.F., and Landy, A. (1988) *Nucleic Acids Res.*, 16, 9687–9705.
47. Muiznieks, I., and Doerfler, W. (1994) *FEBS Letters*, in press.
48. Muramatsu, S., Kato, M., Kohara, Y., and Mizuno, T. (1988) *Mol. Gen. Genet.*, 214, 433–438.
49. Horikoshi, M., Bertuccioli, C., Takada, R., Wang, J., Yamamoto, R., and Roeder, R. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1060–1064.
50. Kim, J.L., Nikolov, D.B., and Burley, S.K. (1993a) *Nature*, 365, 520–527.
51. Kim, Y., Geiger, J.H., and Hahn, S. (1993b) *Nature*, 365, 512–519.
52. Kochanek, S., Renz, D., and Doerfler, W. (1993) *Nucleic Acids Res.*, 21, 5843–5845.

The impact of 5'-CG-3' methylation on the activity of different eukaryotic promoters: a comparative study

Indrikis Muiznieks**, Walter Doerfler*

Institut für Genetik, Universität zu Köln, D-50931 Köln, Germany

Received 31 March 1994; revised version received 7 April 1994

Abstract

The inhibiting or inactivating effects of position-specific promoter methylation in different viral or human cellular promoters Ad2 E2AL, SV40, LTR-MMTV, HSV-tk, TNF α) have been compared by in vitro 5'-CCGG-3' methylation by M-HpaII or the M-SssI DNA-methyltransferase, respectively. In most promoters, 5'-CG-3' methylation reduces activity to a few percent of that of mock-methylated controls. The number of 5'-CG-3' dinucleotides in a promoter does not strictly correlate with the extent of methylation inhibition. The LTR-MMTV promoter, which lacks 5'-CG-3' dinucleotides, is not affected by methylation. The late E2A promoter of Ad2 DNA cannot be inactivated by 5'-CCGG-3' methylation when the construct carries the strong cytomegalovirus enhancer devoid of this sequence. In contrast, 5'-CG-3' methylation shuts this promoter off even in the presence of this enhancer.

Key words: Sequence-specific DNA methylation; DNA-methyltransferase; Viral promoter; Human TNF α gene promoter; Chloramphenicol acetyltransferase or luciferase reporter gene; DNA transfection

1. Introduction

Through studies on many different eukaryotic promoters the concept that sequence-specific DNA methylation can lead to the inactivation of promoters [1] has gained acceptance (see references in [2]). The methylation-sensitive site(s) in a given promoter cannot be predicted but must be experimentally determined. It is likely that promoter methylation interferes with transcription factor binding [3–6] or promotes the binding of methyl group-dependent factors to promoter motifs [7]. This interpretation could explain why the methylation of different promoter motifs is associated with gene inactivation.

We have shown previously that sequence-specific promoter methylation inactivates the RNA polymerase II-transcribed late E2A promoter of adenovirus type 2 (Ad2) DNA [8–11], the E1A promoter of Ad12 DNA [12], the major late promoter of Ad2 DNA [13] or even the p10 gene promoter of the insect virus, *Autographa californica*, nuclear polyhedrosis virus DNA in insect cells [14]. The RNA polymerase III-transcribed elements for VA (virus associated) RNA of Ad2 DNA [15] and Alu elements from the human genome [16] are also tran-

scriptionally inhibited by the sequence-specific methylation of control sequences in these elements.

Here, we report on the results of a comparative study testing the effects of 5'-CG-3' methylation on the activities of the late E2A promoter of Ad2 DNA, the early SV40 promoter, the LTR (long terminal repeat)-located promoter of mouse mammary tumor virus (MMTV), the thymidine kinase promoter from herpes simplex virus (HSV), and of the promoter of the human tumor necrosis factor (TNF) α gene. With the exception of the early SV40 promoter, which is strongly inhibited, 5'-CG-3' methylation practically inactivates all the other promoters tested.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines used in transfection experiments

Human HeLa cells (ATCC CCL 2), a cervical carcinoma cell line, the human PA-1 cell line derived from an ovarian teratocarcinoma (ATCC CRL 1572) [17], and the Ad5-transformed human cell line, 293 [18], were propagated in Dulbecco's medium enriched with 10% fetal calf serum.

2.2. Plasmids employed in this study

Table 1 presents an overview of all plasmid constructs used, the promoters and the reporter genes, and lists the derivation of these constructs.

2.3. Newly made plasmid constructs

2.3.1. *pAd2-E2AL-LUC*. The 490 bp HindIII fragment carrying the late E2A promoter of Ad2 DNA was re-cloned into the HindIII site of the plasmid, pGB-Basic (Promega).

2.3.2. *pTNF α EN-CAT₃-LUC*. The 632 bp SmaI-EcoNI (-615 to +17) fragment from the human TNF α gene promoter [26] was

*Corresponding author. Fax: (49) (221) 470 5163.
E-mail: doerfler@scan.genetik.uni-koeln.de.

**Present address: Faculty of Biology, University of Latvia, Kronvalda Blvd. 4, LV-1587 Riga, Latvia.

treated with Klenow polymerase [27] and cloned into the *Sma*I site of pBS⁺ (Stratagene, LaJolla, CA, USA). From this construct, the TNF α promoter was re-cloned into the pSV0-CAT plasmid as a *Hind*III–*Nde*I fragment or into the pGL-Basic plasmid as a *Hind*III–*Kpn*I fragment.

2.3.3. pTNF α HP-CAT(-LUX). The 795 bp *Hpa*II fragment (–592 to +203) of the human TNF α gene promoter was cloned first into the *Acl*I site of the pBS⁺ vector and then re-cloned into the pSV0-CAT plasmid as a *Hind*III–*Nde*I fragment or into the pGL-Basic plasmid as a *Hind*III–*Kpn*I fragment.

Plasmid constructs were prepared using standard cloning techniques. Plasmid DNAs were purified by using Qiagen (Diagen, Hilden, Germany) Midi- and Maxiprep systems.

2.4. The *in vitro* methylation of DNA

Plasmid DNAs were methylated *in vitro* by the bacterial M-*Hpa*II (MBI-Fermentas, Vilnius, Lithuania) or by the M-*Sss*I (CpG) [28] DNA-methyltransferase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA, or Amersham-USB, Cleveland, OH, USA). NEB buffer No. 2 was made 160 μ M *S*-adenosylmethionine (SAM) and used in all methylation reactions which proceeded for 2–4 h at 37°C using 2 U of enzyme per μ g of DNA in a volume of 10 μ l. In mock-methylation reactions, SAM was omitted. At the end of the methylation or mock-methylation reaction, DNA was re-extracted by phenol–chloroform and ether, ethanol precipitated, washed with 70% ethanol and resuspended at a final DNA concentration of 1 μ g in 10 μ l of 0.01 M Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA (TE). Complete methylation was assessed by restricting DNA with *Hpa*II or by determining the nucleotide sequence. In addition, changes in plasmid topoisomer distributions were tested by electrophoresis of uncut DNA in 0.8% agarose gels. All enzyme preparations used produced remarkable relaxation of the supercoiled form of plasmid DNA both in mock- and methylation reactions. Plasmid preparations with an excess of relaxed plasmid topoisomers were not used in transfection experiments.

2.5. Transfection and reporter gene activity assays

Human cell lines were transfected 24 h after re-plating with promoter-reporter gene constructs by the calcium phosphate precipitation technique [29]. Amounts of 2–5 μ g of plasmid DNA were used per 5 cm diameter dish of HeLa or 293 cells, and 0.5–1.0 μ g for PA-1 cells. The published protocol was applied with the following modifications: the HEPES buffer solution was pH 6.96; the glycerol shock step was omitted; medium was first changed 24 h after the addition of the DNA-Ca²⁺ precipitates; the cells were harvested 48 h after transfection.

CAT activity was determined according to standard procedures

[12,19] and expressed as percent conversion of chloramphenicol (CAM) to acetylated CAM forms during a 1 h incubation. Activity of β -galactosidase was determined according to Hall et al. [21] and expressed in arbitrary units. LUX activity was determined using the Promega assay system and a Lumat LB9501 luminometer (Berthold, Bad Wildbad, Germany). LUX activity was expressed in relative light units. Reporter gene activities were normalized relative to the amounts of cellular protein in culture lysates. Protein concentration was determined according to [30]. The data presented in the tables were typical values derived from at least 3, but in most cases from 10–12 independent transfection experiments.

3. Results and discussion

3.1. Aim of project

We have previously shown that the late E2A promoter of Ad2 DNA can be inhibited or inactivated by *in vitro* methylation at the 5'-CCGG-3' sequences [9,11]. We have now compared this promoter activity upon methylation at the three 5'-CCGG-3' sequences at +6, +24, and –215 relative to the cap site at +1 with its activity when all 5'-CG-3' sequences were methylated by different DNA-methyltransferases and upon transfection of these methylated constructs into different human cell lines. We have also demonstrated that the 13S E1A function of Ad2 or of Ad5 DNA can overcome, at least partly, the inhibitory effect of methylation in this promoter [11,23]. Similarly, presence of the strong early enhancer from human cytomegalovirus (HCMV) counteracts the inactivating function of 5'-CCGG-3' methylation in the late E2A promoter [24].

It has been the second aim of this study to compare the effects of 5'-CCGG-3' with those of 5'-CG-3' methylation on a series of viral and mammalian cellular promoter constructs to underline the fact that results derived

Table 1
Plasmid constructs used in transcription experiments^a

Plasmid	Promoter	Reporter gene	Reference
pSV2-CAT	SV40 early	CAT	[19]
pSV0-CAT	none	CAT	[19]
pBLCAT2	HSV tk	CAT	[20]
pCH110	SV40 early	β -Gal	[21]
pMTV	MMTV-LTR	β -Gal	[22]
pAd2E2AL-CAT	E2AL	CAT	[23]
pAd2E2AL-HCMV-CAT	E2AL+HCMV	CAT	[24]
pAd2E2AL-HCMV (Bam-CAT)	E2AL-HCMV	CAT	[24]
pGL-Control	SV40 early	LUX	Promega, Madison, WI, USA
pGB-Basic	none	LUX	Promega
pAd2E2AL-LUX	E2AL	LUX	This work
pTNF α -EN-CAT	P-TNF α	CAT	This work
pTNF α -HP-CAT	P-TNF α	CAT	This work
pTNF α -EN-LUX	P-TNF α	LUX	This work
pTNF α -HP-LUX	P-TNF α	LUX	This work
pE2AL-J46-CAT	E2A-J46	CAT	[25]

Promoters: SV40 early, Simian virus 40 early region of transcription; HSV tk, Herpes simplex virus thymidylate kinase; E2AL, adenovirus type 2 late E2A gene promoter; pTNF α , human tumor necrosis factor α gene promoter; MMTV-LTR, mouse mammary tumor virus long terminal repeat; HCMV, human cytomegalovirus immediate early enhancer; Reporter genes: CAT, chloramphenicol acetyltransferase; LUX, firefly luciferase; β -Gal, bacterial β -galactosidase.

Table 2
5'-CpG-3' methylated E2A late gene promoter is inactivated

Plasmid construct	Methylation by DNA-methyltransferase from	Cell line used for transfection (% activity) ^a		
		HeLa	PA-1	293
pAd2-E2AL-CAT	M- <i>Hpa</i> II	20	25	100
	M- <i>Sss</i> I	< 1	2	1
pAd2-E2AL-HCMV-CAT	M- <i>Hpa</i> II	100	100	ND ^b
	M- <i>Sss</i> I	< 1	3	ND
pAd2-E2AL-HCMV(Bam)-CAT	M- <i>Hpa</i> II	100	100	ND
	M- <i>Sss</i> I	2	3	ND

^aActivities of promoter constructs were expressed as percent activity of mock-methylated promoter, which was arbitrarily set at 100%.

^bND = not determined.

from viral promoter systems are valid for human cell promoters as well.

3.2. The methylation of 5'-CG-3' sequences inactivates the late E2A promoter of Ad2 DNA

The data in Table 2 document that 5'-CG-3' methylation of the late E2A promoter of Ad2 DNA by the M-*Sss*I DNA-methyltransferase from *Spiroplasma* spp. inactivates this promoter, even in the presence of the HCMV enhancer. As described earlier [24] and reconfirmed by some of the results in Table 2, 5'-CCGG-3' methylation by the M-*Hpa*II DNA-methyltransferase does not even slightly affect the activity of late E2A promoter-CAT gene constructs which contain the strong HCMV enhancer. These data can probably be explained by the fact that the HCMV enhancer [31] does not carry a single *Hpa*II site, but seventeen 5'-CG-3' dinucleotides which render it susceptible to M-*Sss*I methylation. The silencing of the late E2A promoter of Ad2 DNA by complete 5'-CG-3' methylation cannot be overcome either by the E1A adenovirus functions which are constitutively expressed in the human cell line, 293 (Table 2). In contrast, the inhibitory effect of 5'-CCGG-3' methylation of the late E2A promoter by the M-*Hpa*II DNA-methyltransferase is counteracted by the E1A functions present in 293 cells. The transactivating effect of the E1A 13S gene product on the late E2A promoter [11] is obviously compromised when all 5'-CG-3' dinucleotides are methylated.

It should be mentioned that the absolute strength of the three promoter constructs presented in Table 2 differ and is highest in the human PA-1 teratocarcinoma cell line. The presence of the HCMV enhancer in two of the unmethylated constructs raises their absolute activities by a factor of about ten (data not shown).

3.3. Different promoters differ in activity upon transfection into human HeLa cells

Prior to determining the effect of 5'-CG-3' methylation on different viral and human cell promoters, the relative activities of these promoters were assessed in combination with three different indicator genes upon transfection into human HeLa cells. The relative values are juxtaposed in Table 3 and demonstrate the following: (i) With the exception of the early SV40 and possibly the HSV-tk promoters, all other promoter-reporter gene constructs have about comparable relative activities independent of the indicator genes used (CAT, β -Gal. or LUX). The early SV40 and the HSV tk promoters have higher activities with the CAT reporter gene. (ii) Two slightly differently designed human TNF α gene promoter constructs exhibit appreciable activities, similar in conjunction both with the CAT and LUX gene reporters.

3.4. The human TNF α gene promoter is expressed in human epithelial cell lines and is completely inactivated by 5'-CG-3' methylation

In both human HeLa (Table 3) and PA-1 cells, the TNF α gene promoter activates the CAT and LUX reporter genes. This activity is unaffected by TNF α inducers, such as phorbol ester or bacterial lipopolysaccharides (data not shown). As shown by the results of 5'-CG-3' methylation experiments in Table 4, the human TNF α promoter is almost completely inactivated by this modification.

3.5. Promoter inactivation by 5'-CG-3' methylation: a comparative study

The presentation of data in Table 4 correlates the

Table 3
Relative activities in HeLa cells of different promoters with the same reporter gene

Promoter ^a	Number of 5'-CG-3' dinucleotides ^b	Relative strength of promoters in HeLa cells with different reporter genes		
		CAT	β -Gal	LUX
E2AL	11	1	ND ^d	1
E2AL-J46 ^c	11	0.5	ND	ND
TNF α -EN	4	2	ND	3
TNF α -HP	4	0.5	ND	5
SV40 early	7	300	3	10
MMTV	0	ND	1	ND
HSV tk	16	10	ND	ND

^aRelative strength of promoters was compared in constructs carrying different promoters but the same reporter gene.

^bNumber of 5'-CG-3' nucleotides in 120 nucleotides upstream from the cap site.

^cIn this promoter construct, the nucleotide + 7 to + 52 sequence relative to the + 1 cap site in the late E2A promoter encompassing the + 6 and + 24 5'-CCGG-3' site was deleted [25].

^dND = not determined.

Table 4
A comparison of the sensitivities of different viral and human cellular promoters to inactivation by 5'-CG-3' methylation

Promoter ^a	Number of 5'-CG-3' dinucleotides ^b	Reporter gene		
		CAT	β -Gal	LUX
E2AL	11	< 1	ND ^c	< 1
E2AL-446 ^d	11	< 1	ND	ND
TNF α -EN	4	< 1	ND	< 1
TNF α -HP	4	< 1	ND	5
SV40 early	7	40	50	20
MMTV	0	ND	100	ND
HSV tk	16	2	ND	ND

^aActivity of CpG methylated promoters was expressed as percent of the mock-methylated counterparts.

^bNumber of 5'-CG-3' dinucleotides in 120 nucleotides upstream from the cap site.

^cND = not determined.

^dIn this promoter construct, the + 7 to + 52 nucleotide sequence in the late E2A promoter was deleted [25].

number of 5'-CG-3' dinucleotides in the different promoters and their sensitivities to inactivation by 5'-CG-3' methylation in test constructs. Even low numbers of 5'-CG-3' dinucleotides, e.g. four in the human TNF α promoter, suffice to elicit complete inactivation. In contrast, the activity of the early SV40 promoter with seven 5'-CG-3' dinucleotides is only moderately sensitive to 5'-CG-3' methylation. Lastly, the LTR-MMTV promoter, which is devoid of 5'-CG-3' dinucleotides, does not respond to 5'-CG-3' methylation; its activity remains unaltered.

It is plausible to suggest that the sensitivity of a promoter to 5'-CG-3' methylation depends crucially on the position of these sequences relative to essential protein-binding sites and less on the absolute number of these sites. It would be premature to speculate on the possible sites affected by 5'-CG-3' methylation in each of the promoter constructs investigated. This comparative study demonstrates that viral and cellular promoters are similarly affected in their activities by sequence position-specific DNA methylation.

Acknowledgements: I.M. was a fellow of the Alexander-von-Humboldt Stiftung in Bonn, Germany. We thank R. Büttner, Regensburg, for the human PA-1 cell line, and Petra Böhm for excellent editorial assistance. This research was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft through SFB274-A1 and by the Fritz-Thyssen-Stiftung, Köln.

References

- [1] Doerfler, W. (1983) *Annu. Rev. Biochem.* 52, 93–124.
- [2] Jost, J.P. and Saluz, H.P. (eds.) (1993) *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*. Birkhäuser, Basel.
- [3] Höller, M., Westin, G., Jiricny, J. and Schaffner, W. (1988) *Genes Dev.* 2, 1127–1135.
- [4] Watt, F. and Molloy, P.L. (1988) *Genes Dev.* 2, 1136–1143.
- [5] Comb, M., and Goodman, H.M. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18, 3975–3982.
- [6] Hermann, R., Hoeveler, A. and Doerfler, W. (1989) *J. Mol. Biol.* 411–415.
- [7] Meehan, R.R., Lewis, J.D., McKay, S., Kleiner, E.L. and Bird, A.P. (1989) *Cell* 58, 499–507.
- [8] Vardimon, L., Kressman, A., Cedar, H., Maechler, M. and Doerfler, W. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1073–1077.
- [9] Langner, K.-D., Vardimon, L., Renz, D. and Doerfler, W. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2950–2954.
- [10] Müller, U. and Doerfler, W. (1987) *J. Virol.* 61, 3710–3720.
- [11] Weisshaar, B., Langner, K.-D., Jüttermann, R., Müller, U., Zock, C., Klimkait, T. and Doerfler, W. (1988) *J. Mol. Biol.* 202, 255–270.
- [12] Kruczek, I. and Doerfler, W. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7586–7590.
- [13] Dobrzanski, P., Hoeveler, A. and Doerfler, W. (1988) *J. Virol.* 62, 3941–3946.
- [14] Knebel, D., Lübbert, H. and Doerfler, W. (1985) *EMBO J.* 4, 1301–1306.
- [15] Jüttermann, R., Hosokawa, K., Kochanek, S. and Doerfler, W. (1991) *J. Virol.* 65, 1735–1742.
- [16] Kochanek, S., Renz, D. and Doerfler, W. (1993) *EMBO J.* 12, 1141–1151.
- [17] Zeuthen, J., Norgaard, J.O.R., Avner, P., Fellous, M., Wartiovaara, J., Vaheri, A., Rosen, A. and Giovanella, B.C. (1980) *Int. J. Cancer* 25, 19–32.
- [18] Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (1977) *J. Gen. Virol.* 36, 59–72.
- [19] Gorman, C.M., Moffat, L.F. and Howard, B.H. (1982) *Mol. Cell. Biol.* 2, 1044–1051.
- [20] Luckow, B. and Schütz, G. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 5490.
- [21] Hall, C.V., Jacob, E.P., Ringold, G.M. and Lee, F. (1983) *J. Mol. Appl. Gen.* 2, 101–109.
- [22] Lee, F., Hall, C.V., Ringold, G.M., Dobson, D.E., Luh, J. and Jacob, P.E. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 4191–4206.
- [23] Langner, K.-D., Weyer, U. and Doerfler, W. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1598–1602.
- [24] Knebel-Mörsdorf, D., Achten, S., Langner, K.-D., Rüger, R., Fleckenstein, B. and Doerfler, W. (1988) *Virology* 166, 166–174.
- [25] Muiznieks, I. and Doerfler, W. (1994) submitted.
- [26] Nedwin, G.E., Naylor, S.L., Sakaguchi, A.Y., Smith, D., Jarrett-Nedwin, J., Pennica, D., Goeddel, D.V. and Gray, P.W. (1985) *Nucleic Acids Res.* 13, 6361–6373.
- [27] Klenow, H., Overgaard-Hansen, K. and Patkar, S.A. (1971) *Eur. J. Biochem.* 22, 371–381.
- [28] Renbaum, P., Abrahamove, D., Fainsod, A., Wilson, G.G., Rottem, S. and Razin, A. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18, 1145–1152.
- [29] Graham, F.L. and van der Eb, A.J. (1973) *Virology* 54, 536–539.
- [30] Bradford, M.A. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- [31] Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Häsler, K., Fleckenstein, B. and Schaffner, W. (1985) *Cell* 41, 521–530.

Protective effect of adenylate deaminase (from *Penicillium lanoso-viride*) against acute infections in mice

Vizma Nikolajeva^{a,*}, Daina Eze^a, Antra Kamradze^a, Muza Indulena^b, Indriķis Muiznieks^a

^a Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Latvia, 4. Kronvalda boulv., 1586-Riga, Latvia

^b Institute of Microbiology, Riga, Latvia

Accepted 28 May 1996

Abstract

We examined the effects of the immunomodulator-adenylate deaminase (E.C. 3.5.4.6) from *Penicillium lanoso-viride* on experimental mice infections. Prophylactic intraperitoneal administration of adenylate deaminase (ADA) increased survival time and numbers of survivors after infection with *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* and influenza A (H3N2) virus. Protection against influenza virus after intranasal ADA application was also observed. The influence of ADA was time and dose dependent. The most pronounced protection was obtained by administration of 3 U ADA/mice 24 h prior to infection. ADA had no antibiotic effect against these bacterial strains. Protective effects of ADA were studied in immunosuppressed mice under different regimes of treatment including cyclosporin A and trypan blue. The results indicated, that the protective effect of ADA is of a complex nature and probably depends on both T-cell and macrophage components.

Keywords: Adenylate deaminase; Immunomodulation; Infections

1. Introduction

Activation of host defense mechanisms by natural immunostimulating agents is an attractive alternative to established methods of treating of infectious diseases. Particular attention has been given to stimulation of resistance in cases of microbial infections and tumours. Potential pathogens used in integrated models are non-toxicogenic bacteria, viruses, parasites and fungi (Azuma and Jolles, 1987).

Non-specific adenylate deaminase (E.C. 3.5.4.6) is a glycoprotein produced by microscopic fungus

Penicillium lanoso-viride during a particular phase of growth, i.e., conidia spore formation. A highly productive strain was selected and methods of isolation and purification were elaborated in our laboratory (Revelina et al., 1981; Nikolajeva, 1982).

In vivo studies on experimental animals have demonstrated that purified adenylate deaminase (ADA) has immunomodulating properties. Both cell-mediated and humoral immunity reactions were affected by ADA administration (Zak et al., 1980; Nikolajeva and Muiznieks, 1985).

The present article describes ADA-enhanced host resistance to selected infectious agents. Examples of acute experimental mice infections involved *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*

* Corresponding author. Tel.: +371-7-322914, Fax: +371-7-830291.

and influenza virus A.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Conventional female inbred CBA and outbred ICR mice weighing 18 to 20 g (Grindex, Latvia) were used. Mice were fed a balanced mouse pellet food (Grindex) and water *ad libitum*.

2.2. Infectious agents

Salmonella typhimurium (Soeffler, 1892; Castellani and Chalmers, 1919) strain LT-2 was received from Dr. B. Rak University of Freiburg (Germany); *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter, 1872; Kligler, 1960) from the Collection of the Department of Microbiology University of Latvia; *influenza virus* A/Aichi (H3N2) was obtained from the Institute of Microbiology Latvian Academy of Sciences.

2.3. Drugs

ADA (adenylate deaminase) was isolated from cell extracts of conidia forming cultures of *Penicillium lanoso-viride*. Cell extracts were fractionated with ammonium sulphate and further purified by chromatography on Sephadex G-200 and DE-52 (Nikolajeva, 1982). One unit (1 U) of enzyme activity is determined as the quantity of ADA which deaminates 1.0 μmol of 5'-AMP to 5'-IMP per min at 37°C, pH 6.0. Electrophoretically homogeneous enzyme preparations with specific activity 50 U per mg protein were freeze-dried. Prior to application the enzyme preparations were re-dissolved in 0.9% saline. Apyrogenic ADA preparations were obtained using prepacked columns of Detoxi-gel™ endotoxin removing (Pierce) and non-pyrogenic Minisart® NML (Sartorius) single use filters.

Cyclosporin A (cyclosporin or Sandimmun, Sandoz, Basel, Switzerland) concentrate for intravenous infusion containing 50 mg cyclosporin per 1 ml, 650 mg polyoxyethylated castor oil, 33% alcohol by volume. Trypan blue (Sigma) was dissolved in water.

2.4. Treatment of animals

S. typhimurium was administered intraperitoneally 1.0×10^8 CFU (colony forming units) per mouse, *P. aeruginosa* 1.7×10^7 CFU per mouse. The pathogenicity of strains (LD_{50}) was previously determined. Influenza virus A (H3N2) was given by intranasal application 5 $\text{LD}_{50}/0.05$ ml per mouse. Virus infectivity was assayed by determining the LD_{50} . In experiments with *S. typhimurium* and *P. aeruginosa* female CBA mice were used, but in experiments with influenza virus-female outbred mice were used.

Non-pyrogenic ADA was filter-sterilized and injected intraperitoneally in the dose of 10, 50, 150, 250 U per kg weight in a volume of 0.10–0.25 ml. In the case of intranasal administration, ADA was used in doses of 50 or 250 U per kg in a volume of 50 μl . Trypan blue was given subcutaneously: the first dose was 4 mg per mouse and subsequently 1 mg per mouse was given twice a week during the course of experiment. Cyclosporin A was administered subcutaneously in a dose of 50 mg/kg per day during the course of experiment.

2.5. Statistics

Significant differences between control groups and treated groups were calculated by the Student *t*-test and χ^2 test.

3. Results

3.1. Protection against *S. typhimurium* infection by ADA

When ADA was administered 24 h prior to *S. typhimurium* infection, all doses (10, 50 and 250 U/kg) protected the experimental mice against infection. The effect was dose dependent (Fig. 1). Survival in the control groups were 40%, 60% in the group with 10 U/kg ADA and 80% in groups with 50 and 250 U/kg.

Survival in the groups which received 50 and 250 U/kg of ADA was similar, therefore we used the dose of 150 U/kg in subsequent experiments. The optimal timing for prophylactic application of ADA

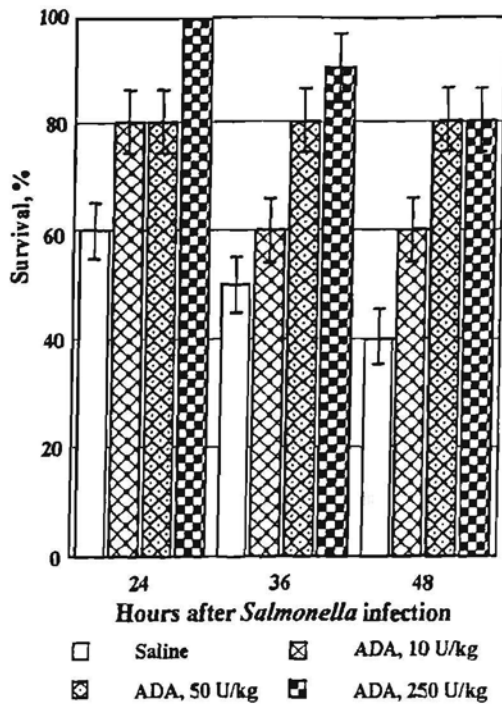


Fig. 1. Dose-dependent effect of ADA treatment on survival of CBA mice 24, 36 and 48 h after *S. typhimurium* infection. A 10, 50 or 250 U/kg dose of ADA was administered intraperitoneally 24 h before *S. typhimurium* infection. *S. typhimurium* was given intraperitoneally 1.0×10^8 CFU per mouse. Results represent the means of two experiments. Each group consisted of 10 animals.

was elucidated. The most effective protection was observed when ADA was provided 24 h prior to introduction of infectious agent (Fig. 2). In this case, 90% of the experimental mice survived, compared to 20% in the control group. When injected 3 days prior or simultaneously with the infectious agent, ADA does not significantly increase survival of the treated mice in comparison to the control group. Here the average life time is prolonged or the acute mortality rate is decreased (Fig. 2).

3.2. The protective effect of ADA against *P. aeruginosa* infection

In the experiments with *P. aeruginosa* (ip. infection) the dose 150 U/kg of ADA was used 1 day prior to giving the infective agent. The observations were carried out for 3 weeks (Table 1). Lethal cases were observed during the first 10 days. In the control

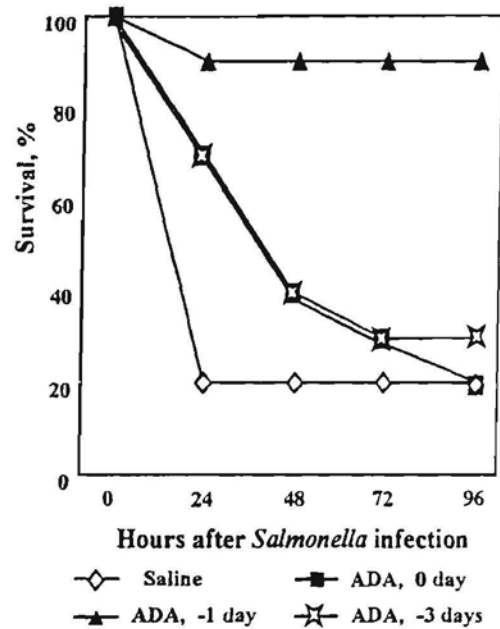


Fig. 2. Dependence of survival of CBA mice on ADA administration after *S. typhimurium* infection. A dose of 150 U/kg or 3 U/mice ADA was intraperitoneally administered 72 h (day -3) and 24 h (day -1) prior to or simultaneously (day 0) with *S. typhimurium* infection. *S. typhimurium* was given intraperitoneally 1.0×10^8 CFU per mouse. Data are from one representative experiment out of two. Each group consisted of 10 animals.

group, survival was 10%, while 67% of ADA-treated mice survived.

3.3. The effect of cyclosporin and trypan blue on *S. typhimurium* infection

ADA was administered to infected mice in combination with cyclosporin and trypan blue, prior to *S. typhimurium* infection. Cyclosporin was injected beginning on the day of infection (day 0) or beginning 2 days prior to infection (day -2). The survival rate in experiments without cyclosporin was 50%, but with cyclosporin and ADA beginning on the day of infection, survival was 25% (Table 1). If treatment with cyclosporin was started 2 days prior to giving the infectious agent, the average life time was not diminished in comparison to the control group receiving saline (days 1.8 and 2.0, respectively). Protective effects of ADA application were only partially abrogated by cyclosporin. Average life time in

groups receiving both drugs before the infection was 4.8 days.

Trypan blue treatment also begun 2 days prior or on the same day as infection. The average life time of the control group was 1.4 days. In experiments where a solution of trypan blue was injected beginning the 2nd day prior to infection, the average life time was 1.2 days, whereas in the case of injection beginning with day 0, mice lived for 3.2 days. Administration of ADA in a prophylactic scheme prolonged the average life time. All the mice in groups receiving trypan blue succumbed within 10 days. In the group which was treated with ADA alone 83% of mice survived.

3.4. The effect of cyclosporin and trypan blue on *P. aeruginosa* infection

The experimental scheme was similar to that with

S. typhimurium. 10% of control mice receiving 0.9% saline, survived (Table 1). All mice treated with trypan blue succumbed, and so did 83% in both groups treated with cyclosporin alone. 83% (cyclosporin day 0) of the mice were protected by ADA. ADA protected 33% of the animals (in both groups treated with trypan blue), while all the mice treated only with trypan blue died. The use of ADA extended the average life times by 2.2–3.6 times in comparison to the corresponding control groups.

3.5. Protective activity of ADA against influenza virus infection

We tested the impact of ADA upon the survival of mice after intranasal infection with 5 LD₅₀ influenza virus. The ADA preparation was administered before and after virus infection following 3 schemes: (1) –72 h; –24 h; +4 h; +96 h; (2)

Table 1
Survival of CBA mice treated with ADA and immunosuppressors at different times of *S. typhimurium* and *P. aeruginosa* infection

No. Groups	Survival (day 21)					
	<i>P. aeruginosa</i> infection			<i>S. typhimurium</i> infection		
	Number ^b	%	P ^c (%)	Number ^b	%	P ^c (%)
1 Saline	3/30	10	–	0/24	0	–
2 ADA	12/18	67	< 0.01	12/24	50	< 0.01
3 Cyclosporin 0 ^a	3/18	17	> 0.1	0/24	0	–
4 Cyclosporin –2 ^a	3/18	17	> 0.1	0/24	0	–
5 Saline	3/30	10	–	3/30	10	–
6 ADA	12/18	67	< 0.01	15/18	83	< 0.01
7 Trypan blue 0 ^a	0/18	0	0.1	0/18	0	0.1
8 Trypan blue –2 ^a	0/18	0	0.1	0/18	0	0.1
9 Cyclosporin 0 ^a , saline	3/18	17	–	0/24	0	–
10 Cyclosporin 0 ^a , ADA	15/18	83	< 0.01	6/24	25	< 0.01
11 Cyclosporin –2 ^a , saline	3/18	17	–	0/24	0	–
12 Cyclosporin –2 ^a , ADA	3/18	17	–	0/24	0	–
13 Trypan blue 0 ^a , saline	0/18	0	–	0/18	0	–
14 Trypan blue 0 ^a , ADA	6/18	33	< 0.01	0/18	0	–
15 Trypan blue –2 ^a , saline	0/18	0	–	0/18	0	–
16 Trypan blue –2 ^a , ADA	6/18	33	< 0.01	0/18	0	–

^a Beginning of treatment.

^b Total survivors/mice challenged.

^c χ^2 test.

– not applicable.

Significance of the differences was calculated between control groups (row 1) and test groups (row 2–4) as well as taking matching groups of suppressed control and suppressed/ADA treated groups.

–24 h; +4 h; +96 h; (3) –24 h; –0.5 h; +24 h. The best protection was observed when ADA was applied 24 and 0.5 h before and again 24 h after the viral infection (the 3rd scheme). Further experiments were carried out using this scheme.

In all cases—intraperitoneal or intranasal routes of administration using doses of 50 and 250 U/kg increased mouse survival by 30–50% (Table 2). Dose-dependent effects were observed only in the intranasal, but not intraperitoneal route of administration.

3.6. Estimation of the antibiotic effect of ADA on *S. typhimurium* and *P. aeruginosa*

Filter discs were soaked with 0.05 ml ADA solution 2 mg/ml (100 U/ml) and placed on Mueller–Hinton agar on which *S. typhimurium* or *P. aeruginosa* was plated. Chloramphenicol served as a control substance for effective inhibition of salmonella, as well as pseudomonas growth. After 24 h of incubation, no inhibition zone was observed around ADA discs, indicating that the drug exhibits no direct antibacterial effect. Distinct inhibition zones were recorded around the antibiotic discs.

4. Discussion

The use of non-specific immunomodulators is well known in therapy of bacterial and viral infections (Vogels and Van der Meer, 1992; Morahan and Pinto, 1992). Different infectious agents elicit different protective mechanisms. In general, humoral antibodies (immunoglobulins) are effective against extracellular infectious agents, whereas cell-mediated

immunity (delayed hypersensitivity and granulomatous reactions) control the intracellular parasites. Both, humoral and cell immunity provide protection against viral infections (Sell, 1987).

A number of immunomodulators exhibit a wide range of antiinfective activity. Muramyl dipeptide and its analogs have been shown to control infections caused by *Klebsiella pneumonia* (Chedid et al., 1977), *Trypanosoma cruzi* (Kierzenbaum and Ferraresi, 1979), *Toxoplasma gondii* (Krahenbuhl et al., 1981), *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Listeria monocytogenes* (Fraser-Smith and Matthews, 1981). Glucan sulphate used in prophylactic applications relieves experimental infections caused by *E. coli*, *C. albicans* and mouse hepatitis virus. Glucan sulphate is also used to stimulate wound healing and prevent septic complications after surgical manipulations (Williams et al., 1991).

In contrast, some immunomodulators may even exacerbate the course of infections, like application of tilorone in experimental bacterial infections, where resistance is mediated mostly by cellular immunity (Collins, 1980).

We discovered and partially characterized immunomodulating properties of ADA. In our experiments, both *in vivo* and *in vitro* immunogenic and mitogenic properties of ADA were elucidated. ADA induces both specific and non-specific immunostimulation (Nikolajeva, 1982). The influence of ADA on antibody formation and the delayed hypersensitivity reactions also was investigated (Aleksjenko et al., 1989). The level and mechanism of ADA modulation were dose and time dependent. The short term changes in blood/serum elements (neutrophil leucocytosis, concentration of bilirubin, as well as the activity of aminotransferases) were caused by the

Table 2
Protective effect of ADA in mice challenged with influenza virus A

Form of injection	ADA (U/kg)	Number of animals	Surviva (%)		P values
			Saline	ADA	
intraperitoneal	250	10	20	60	< 0.01
intraperitoneal	50	10	20	60	< 0.01
intranasal	50	10	20	50	< 0.01
intranasal	250	10	50	100	< 0.01

The intranasal infectious dose of virus was 5 LD₅₀/0.05 ml.

ADA injections (Kamradze et al., 1990; Polivkova et al., 1989). We have observed that ADA decreases the 5'-nucleotidase activity of mice peritoneal macrophages, which infers an activation of macrophages. Cytotoxic activity of ADA-activated macrophages was increased, as judged by 5-³H-uridine release during marked ascitic leukaemia P388 cell lysis (Nikolajeva and Kerimov, 1989). Inhibition of growth and the development of some ascitic and solid tumours was observed in in vivo and in vitro experiments (Nikolajeva and Muiznieks, 1985; Zak et al., 1986, 1988). The anti-infective properties of ADA were not studied till now.

We studied *in vivo* effects of ADA in experimental infections of immunologically competent and suppressed mice. *Salmonella typhimurium*, which is controlled mainly by cell-mediated immunity, and *Pseudomonas aeruginosa*, which is controlled mainly by humoral immunity, were chosen for bacterial infection models. Influenza virus A was used to model *in vivo* viral infection.

The data clearly demonstrate that ADA administration significantly enhances long-term survival in a murine model of *S. typhimurium* and *P. aeruginosa* infection. The greatest protective effect was observed with prophylactic treatment of ADA by giving 250 units per kg at 24 h before infection (Figs. 1 and 2).

Antiviral resistance was significantly enhanced both by intraperitoneal and intranasal application of ADA. Similar effects are found with bacterial ribonuclease (Indulen et al., 1989). Intranasal RNase application is recommended to combat viral infection, since bioavailability of the enzyme is increased more than 2 times in comparison with intravenous administration (Shneider et al., 1990).

Lack of antibiotic activity, the wide range and prophylactic mode of the observed effects suggest that protective activity of ADA is mediated by complex immune reactions of the host organism.

The action of ADA in immunosuppressed organisms was investigated on trypan blue- and cyclosporin A-treated mice models (Table 1). Trypan blue eliminates macrophages (Kraus, 1987), but cyclosporin A suppresses lymphocytes (Dos Reus and Shevach, 1982) through blockage of T-cell activation and production of IL-2. Tentatively, cyclosporin A can switch the immune response induced by antigen from humoral to a cell-mediated mode (Bretscher

and Havele, 1992).

ADA compromised the cyclosporin A-induced immunosuppression and showed a protective effect when added simultaneously at the beginning of treatment with the drug (Table 1). When cyclosporin A was administered prior to ADA, enhanced survival was not observed, although the average survival times of succumbed animals increases 2.7 times in case of *Salmonella* infection and 3.5 times in case of *Pseudomonas* infection, respectively.

In trypan blue-treated mice the effects of ADA on survival did not depend on the application before treatment with the drug. ADA relieved the trypan blue-induced suppression in *P. aeruginosa* infected mice judging by survival rate and average life time of the animals. In case of trypan blue-treated and *S. typhimurium*-infected mice the effect of ADA administration led only to a prolonged life time, but not to survival of the animals.

These observations indicate that, although ADA exerts strong macrophage-directed effects, its protective activity *in vivo* probably relies on a strong T-cell mediated component. A definite augmentation of antibacterial resistance by ADA is observed in all types of immunosuppressed mice.

Further studies are needed to elaborate the mode of action and effective ways to apply ADA in therapy of infectious diseases.

Acknowledgements

This work was supported by research grant No. 93.356 from the Latvian Council of Science and by the TAIHO Foundation of Latvia.

References

- Aleksejenko, I., Kamradze, A. and Eze, D., 1989. Effect of glycoprotein A on antibody production and reaction of the delayed hypersensitivity in mice. In: Microbial nucleases and their practical application. Latvian University Press, Riga, p. 69.
- Azuma, J. and Jolles, G., eds. Immunostimulants: Now and Tomorrow. Tokyo, Berlin: Japan Sci. Soc. Press, Springer-Verlag, 1987.
- Bretscher, P.A. and Havele, C., 1992. Cyclosporin A can switch immune response induced by antigen from a humoral to a



СОЮЗ СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ
АВТОРСКОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО

№ 764385

На основании полномочий, предоставленных Правительством СССР, Государственный комитет СССР по делам изобретений и открытий выдал настоящее авторское свидетельство на изобретение:
"Способ получения производных гипоксантина"

Автор (авторы): Муйжниекс Индрикис Оскарович, Ревелиня Визма Робертовна, Шафранский Александр Борисович и Мауриня Хелена Антоновна

Заявитель: ЛАТВИЙСКИЙ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. П. СТУЧКИ

Заявка № 2770203 Приоритет изобретения 21 марта 1979г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений СССР

22 мая 1980г.

Действие авторского свидетельства распространяется на всю территорию Союза ССР.

Председатель Комитета

Начальник отдела

Не подлежит опубликованию в открытой печати.

Союз Советских
Социалистических
Республик



Государственный комитет
Совета Министров СССР
по изобретениям
и открытиям

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(11) 764385

20
1
Публикованное в
открытой печати
ЗАПРЕЩЕНО

- (61) Дополнительное к авт. свид-ву № —
- (22) Заявлено 21.03.79 (21) 2770203/28-13 с присоединением заявки № —
- (23) Приоритет —
- (43) Опубликовано — Бюллетень № —
- (45) Дата опубликования описания —

(51) М. Кл. ²
C12D 13/06
(53) УДК 663.15
(088.8)

- 72) Авторы изобретения
- 71) Заявитель.

И.О. Физикин, В.Р. Ревелиня, А.Б. Шафранский и
Х.А. Мауриня
Латвийский ордена Трудового Красного Знамени государственный
университет им. П.Стучки

(54)

Способ получения производных гипоксантина.

Изобретение относится к микробиологической промышленности, в частности к производству инозина и инозиловых производных путем микробиологического дезаминирования соответствующих производных аденина.

Дезаминированные производные аденина могут быть использованы для синтеза отдельных фармакологических препаратов и исследований в области биохимии и молекулярной биологии, генетики, физиологии, фармакологии, терапии.

Инозиловые нуклеотиды из адениловых в настоящее время получают в основном путем химического дезаминирования последних азотистой кислотой, что связано с частичным дефосфорилированием продуктов реакции, необходимостью фракционировать смесь продуктов колонной хроматографией и выделением продуктов в виде труднорастворимых осадков, непригодных для медицины и биологии.

Подписная группа № _____

Известен способ дезаминирования аденозина и адениловых нуклеотидов в соответствующие производные гипоксантина неочищенными ферментными растворами, полученными из среды культивирования или клеток микроскопических грибов родов *Aspergillus* и *Penicillium*, выращенных в течение 4-10 суток на естественных средах, содержащих минеральные соли и богатые многокомпонентные питательные вещества — пептон, дробленное зерно ячменя [1].

Дезаминирование производных аденина в этом случае осуществляется в присутствии ингибиторов фосфатов-ионов молибдата или вольфрамата.

Известен также способ получения производных гипоксантина путем микробиологического дезаминирования аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) культурой *Actinomyces antibioticus* 4 в течение четырех суток роста на питательной среде, содержащей минеральные соли, глицерин, янтарную кислоту и АТФ в качестве единственного источника азотного питания [2].

Микробиологические способы получения инозинфосфата связаны с продолжительным присутствием дезаминируемого субстрата в среде питания микроорганизма, что неизбежно приводит к антиважным ферментам, деградирующим эти соединения и снижающим общий выход дезаминированных продуктов.

Целью изобретения является улучшение способа, повышение эффективности процесса микробиологического дезаминирования и повышение выхода целевого продукта.

Поставленная цель достигается тем, что способом производства аденина осуществляют клетки микроскопического гриба *Penicillium italicum* 3Д, при этом в качестве питательной среды при его выращивании используют смесь пептона, смоченную 1,5-2 об. воды.

В процессе инкубации целесообразно в смесь вводить в качестве нейтрального носителя кусочки парафина или гранулы пуроаста, или стеклянные шарики.

Сущность способа заключается в том, что штамм ЭД микроскопического гриба вида *Penicillium lanoso-oxide* культивируют на смоченных 1,5 объемами краевой воды отрубях пшеницы при температуре 28°C в течение 3 суток, выращенный слой плесени механически отделяют от поверхности среды, после чего массой леток обрабатывают растворы соответствующих производных аденина и получают производные гипоксантина.

Предлагаемый штамм выделен из почвы и хранится в коллекции фондов физиологии растений и микробиологии Биологического факультета ЛГУ им. П. Стучки. Штамм имеет следующую характеристику:

Культуральные признаки.

Среда Чапека. Колонии ограниченно растущие, пушистые, в начале белые, затем серо-зеленые, с возрастом зеленовато-оливковые, листовидные, не имеющие тенденции к образованию тизей, на обратной стороне не окрашенные. Запах сильный, напоминает запах ртутьевой корки. Экссудат отсутствует.

Сусло-агар. Колонии ограниченно-растущие, пушистые, в начале белые, затем серо-зеленые и зеленовато-оливковые.

На синтетических средах растет в виде пленки с поверхностью зеленоватого цвета или при постоянном встряхивании в виде крупинок или овальных комков диаметром 0,5-3,0 см. Среда приобретает желтоватую окраску.

Морфологические признаки.

Апотеции обычно трехлучевые, состоят из веточек, метуль и

териям, не симметричные, с конидиальными цепочками, 30–80 мкм длин. Конидиеносцы шероховатые, очень изменчивые по длине, спле-тающиеся, 100–600 x 3 мкм. Веточки 14–18 x 3 мкм. Метули образуются на разных узлах кисточки по 2–3, около 10 x 2,5 мкм. Конидии шаровидные, 3–5 мкм в диаметре, гладкие, слегка окрашенные в массу.

Физиологические признаки.

Ассимилирует глюкозу, галактозу, ксилозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, арабинозу, фруктозу, крахмал, глицерин, маннит.

Усваивает минеральный азот в аммонийной и нитратной форме.

Нитраты восстанавливает. Целлюлозу не разлагает. Молоко не свертывает.

Штамм дезаминирует аденозин, аденозиндифосфат и -трифосфат, дезоксиаденозин, дезоксиАМФ, 2,3-циклоАМФ, адениловый остаток в составе коферментов НАД и НАДФ.

Предлагаемый способ осуществляется следующим способом.

Пример I. Сеют по 0,5 мл споровой конидий недельной культуры *Penicillium lanoso-viride* SD на чашки Петри со средой следующего состава: отруб пшеничный – 2 г, вода краповая – 3 мл.

Выращивают культуру в термостате в течение 3-х суток при температуре 28 °C. Затем отделяют тонкий слой образовавшегося мицелия от поверхности среды и механически растирают в ступке в течение 2–3 минут. Биомассу клеток перемешивают с 5 мл 0,2 М водного раствора аденозиндифосфата (АДФ) и инкубируют при температуре 35 °C в течение 10 мин. Затем смесь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин.

И не сульфидоводорода получают целевой продукт (инсулин) и т.д. Так и инсулиновой кислоты составляет около 70%. Продукты выделяют из реакционной смеси выпариванием в вакууме при 30 °C. Отцентрифугированную биомассу можно повторно использовать для дезаминирования, суспендируя ее в растворе промывочного агента.

иомасса гриба проявляет дезаминазную способность без
 существенных спадов активности в течение 10-15 циклов работы. Полу-
 ение других производных аденина в эквивалентных количествах осу-
 ествляется аналогичным способом, меняя только время инкубации

табл. I)

Таблица I.

Время инкубирования биомассы с различными
 производными аденина и выход целевых продуктов.

Субстрат	Целевой продукт	Время инкубации (в мин)	Выход целе- вого про- дукта (%)
1	2	3	4
Аденозин-5-моно- фосфат	Инозин-5-монофос- фат	10	70
Аденозин-5-ди- фосфат	Инозин-5-дифосфат	10	70
Аденозин-5-три- фосфат	Инозин-5-трифосфат	11	85
Аденозин	Инозин	12	100
Бикотинамидаде- зиндинуклеотид	Бикотинамид-гипо- ксантидинуклеотид	20	85
Дезоксиаденозин- монофосфат	Дезоксиинозин-5- монофосфат	45	80
Дезоксиаденозин	Дезоксиинозин	47	100
Котинамидаденин- динуклеотид фосфат	И. котинамидениноксан- тиндинуклеотид фосфат	50	75
3-циклоаденозин- монофосфат	3-циклоинозин-5-мо- нофосфат	52	90

Пример 2. Выращивание гриба и получение биомассы аналогично примеру I, но биомассу перемешивают с равным объемом нейтрального носителя—кусочками поролонa (2x2мм) и помещают в колонку размером 2,2x0,8 см, через которую пропускают раствор дезаминируемого субстрата. Выход целевых продуктов такой же как и в примере I.

Пример 3. Способ получения инозитовых производных, отличающийся от приведенного в примере 2, но с той разницей, что в качестве наполнителя для колонки используется гранулированный пенопласт.

Пример 4. Способ получения инозитовых производных, аналогичный примеру 2, но с той разницей, что вместо поролонa в качестве наполнителя для колонки используют мелкие стеклянные парикл.

Пример 5. Способ получения инозитовых нуклеотидов аналогичный способам, приведенным в примерах I—4, но отличающийся тем, что с целью повышения выхода целевого продукта, в качестве раствора субстрата используется 0,2 М раствор соответствующих адениловых нуклеотидов, содержащий 0,005 М вольфрамовой кислоты. Выход целевых продуктов при равном времени инкубации 100%.

Эффективность предлагаемого способа по сравнению с известными выражается в сокращении времени процесса дезаминирования, в возможности неоднократно использовать активный продукт дезаминации, в повышении выхода целевого продукта благодаря отсутствию ингибиторных катаболических ферментов в процессе роста культуры и в экономии электроэнергии, необходимой для работы насосов, на которых выращивается АМ-дезаминирующая культура. В предлагаемом способе нет необходимости применять последующую очистку с помощью ионнообменных смол на колонне или в химическом методе

получения нуклеотидов или для сорбции фермента как в
 способе дезаминирования адениловых нуклеотидов иммобилизованным фе-
 нтолом.

При микробиологическом производстве 1 тонны производных
 гипоксантина из производных аденина предложенным методом
 сравнений с известными без учета эффекта от сокращения времени
 культивирования, экономии электроэнергии и химреактивов, ожидаемый
 экономический эффект составляет около 20-100 тыс. рублей в зависи-
 мости от дезаминируемого субстрата.

Формула изобретения.

1. Способ получения производных гипоксантина путем обработки
 производных аденина ферментным препаратом микроорганизма,
 выращенного на питательной среде, содержащей основные источники пи-
 тания, инкубации полученной смеси и выделения целевых продуктов,
 отличающийся тем, что, с целью упрощения способа и повышения выхода
 целевых продуктов, обработку производных аденина осуществляют клет-
 ками микроскопического гриба *Penicillium canoso-ruide* 88,
 при этом в качестве питательной среды при его выращивании исполь-
 зуют отрубя шпелли, смоченные 1,5-2, об. воды.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в процессе
 инкубации в смесь вводят в качестве нейтрального носителя
 кусочки перлола или гранулы нексипланта или стамениные шарики.

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе.

1. Патент Японии № 43-11759, кл. B6 (2) I, 1971.
2. Авторское свидетельство СССР № 373410, кл. C12H 16/06,

871.

Вяз. отделом

Секретариатом

Сидорова

В. Конас

Н. Корина

104

PATENTS N^o. 5057

HIPOKSANTĪNA ATVASINĀJUMU IEGŪŠANAS PAŅĒMIENS

IESNIEGUMA N ^o .	P - 92 - 246
IZSNIEGŠANAS DATUMS	02.12.92
PRIORITĀTE	21.03.79
Starptautiskās klasifikācijas indekss:	C12D 13/06
PAMATOJUMS	PSRS autorapliecība N ^o . 764385

PATENTA TURĒTĀJS:	LATVIJAS UNIVERSITĀTE
AUTORI:	I.Muižnieks V.Reveliņa A.Šafranskis H.Mauriņa

ANOTĀCIJA

Izgudrojums attiecas uz mikrobioloģisko rūpniecību - uz inozīna un inozīna atvasinājumu iegūšanu, mikrobioloģiski dezaminējot attiecīgos adenīna atvasinājumus. Adenīna atvasinājumus apstrādā ar mikroskopiskās sēnes *Penicillium lanoso-viride* 8D šūnām. Izstrādātais paņēmiens atšķirās no zināmajiem ar vienkāršību un palielinātu galaprodukta iznākumu.



СОЮЗ СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ
АВТОРСКОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО

№ 782392

На основании полномочий, предоставленных Правительством СССР,
Государственный комитет СССР по делам изобретений и открытий

выдал настоящее авторское свидетельство на изобретение:
"Штамм *Penicillium landsouyi* var. *8* д-продукцент
аденилатдезаминазы"

Автор (авторы): Муйжниекс Индриекс Оскарович, Ревелиня
Визма Робертовна и Шафранский Александр Борисович

Заявитель: ЛАТВИЙСКИЙ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. П. СТУЧКИ

Заявка № 2783648 Приоритет изобретения 18 ИЮНЯ 1979г.

Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений СССР

25 ИЮЛЯ 1980г.

Действие авторского свидетельства распро-
страняется на всю территорию Союза ССР.

Председатель Комитета

Инициальный оттиск

Союз Советских
Социалистических
Республик



Государственный комитет
СССР

по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(11) 782392

- (61) Дополнительное к авт. свид-ву № —
- (22) Заявлено 18.06.76(21) 2723648/28-13
с присоединением заявки № —
- (23) Приоритет
- (43) Опубликовано Бюллетень №
- (45) Дата опубликования описания

(51) М. Кл.
C 12 N 9/80
//A 61 K 31/00
(C 12 N 9/80
C 12 R 1/80)

(53) УДК
662.52. / 001.8/

(72) Авторы
изобретения

А.С.Нуженикис, В.Р.Резелиня и А.Б.Лагранский

(71) Заявитель

Латвийский отдел Государственного Красного Знамени
государственный университет им.И.Стучки

(54)

Штамм *Penicillium lanosporide*

8 Д - продуцент аденилатдезаминазы

Изобретение относится к области медицины, а именно к микробиологии.

Штамм *Penicillium lanosporide* 8 Д известен из патентной и научно-технической литературы в виде культуры.

Теперь изобретения является получение штамма *Penicillium lanosporide* 8 Д - продуцента аденилатдезаминазы.

Штамм *Penicillium lanosporide* выделен из почвы Латвии с последующим клонированием.

Штамм *Penicillium lanosporide* 8 Д - продуцент аденилатдезаминазы хранится в коллекции культур микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института антибиотиков под номером 204 А и характеризуется следующими культурально-морфологическими и физиологическими признаками.

Культурально-морфологические признаки.

Среда Чапека. Колонии ограниченно растущие, пушистые, вначале беззатем бледно-серо-зелёные, с возрастом зеленовато-оливковые, толстовоидные, не имеющие тенденции к образованию тяжёлой, на обратной стороне неплотные. Запах сильный, напоминает запах картофельной корки. Экссудат отсутствует.

Сусло-агар. Колонии ограниченно растущие, пушистые, вначале белые, затем серо-зелёные и зеленовато-оливковые.

ПЛЕНКИ

Жидкие органические среды. Растёт в виде с поверхности зеленовато-оливковой или при постоянном взбалтывании в виде мутной или белой плесени. Высота плесени до 1,5 см. Среда принимает конгозатую окраску.

Кисточки обычно трёхветвистые, состоят из веточек, метул и стеригм, симметрические, с конидиальными цепочками 30-80 мкм длины. Конидиеносороковатые, очень изменчивые по длине, сплетающиеся, 100-600 x 3 мкм. Метулы образуются на разных уровнях кисточки по 2-3, 10 x 2,5 мкм. Конидии шаровидные, 3-5 мкм в диаметре, гладкие, слабоокрашенные в масле.

Биологико-биохимические признаки.

Усваивает глюкозу, галактозу, ксилит, сахарозу, лактозу, мальтозу, инозиту, фруктозу, крахмал, глицерин, маннит. Усваивает минеральные соли в аммонийной и нитратной формах. Нитраты не восстанавливает. Желатин не гидролизует. Молоко не свёртывает.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример I. 0,5 мл суспензии конидий культуры *Penicillium lanosoides*, 8D, выращенной на сусло-агаре, посея в колбу Эрленмейера, объёмом 100 мл среды следующего состава (г/л): глицерин - 5,0, янтарная кислота - 1,0, $K_2H_2PO_4$ - 3,0, KCl - 2,5, $MgSO_4$ - 0,1, смесь микроэлементов - 1 мл, 5-АМВ - 0,5. Состав смеси микроэлементов в г/л: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 1,0, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,8, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,15, B_2O_3 - 0,1, молоко-пептон - 0,05, pH среды - 5,0. Культивировать в течение 14 суток на

при 100 - 120 ^{об/мин} при 28°C. По окончании культивирования биомассу отфильтровывают от среды. Среда культивирования содержит 1,5 МЕ аде-
ндезаминазы на мл среды.

Пример 2. 0,3 мл суспензии, выращенной на сусло-агаре недельной ^{конидий}

от *Penicillium lanosobicide* 8 D

от на чашку Петри с агаризованной средой следующего состава (г/л):
3,0, K_2HPO_4 - 1,0, $MgSO_4$ - 0,15, KCl - 0,5, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,01, сахароза
агар - 20,0, pH среды - 6,0. Культуру выращивают в термостате при
в течение 7 суток. После этого мицелий и верхний слой агаризованно
отделяют и экстрагируют двукратным объемом 0,1 M калийфосфатного бу-
ферного раствора (pH - 6,0). Активность аденилатдезаминазы в экстракте
1,8 МЕ в пересчете на мл среды.

Пример 3. Посев культуры проводят на чашки Петри с сусло-агаром
точно по примеру 2. Культивируют в термостате при 28°C в течение 3 суток.
Аденилатдезаминазу экстрагируют и определяют аналогично примеру 2. Актив-
ность фермента составляет 2,5 МЕ на мл среды.

Пример 4. Посев культуры осуществляют аналогично примеру 2 на чашки
содержащие 2 г отрубей, смоченных 2-3 мл водопроводной воды. Грибы
выращивают в термостате в течение 3 суток при 28°C. Затем снимают
верхний слой образовавшегося мицелия, обмывают его 15 мл холодной воды
и экстрагируют дезинтегрируя в буферном растворе аналогично примеру 1.
Из каждой чашки Петри содержат по 80-100 мл МЕ активности
аденилатдезаминазы, что соответствует 40-50 МЕ на 1 г отрубей.

Использование изобретения позволит ^{который может быть} увеличить выход фермента, ^{исполь-}
для лечения врожденной комплексной иммунонедостаточности и других

Формула изобретения.

заболеваний человека

от *Penicillium lanosobicide* 8 D -

фермент аденилатдезаминаза, культивируемый в жидкой среде при 28°C

ВЕ ЗОСОВАННОГО НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬНОГО ИНСТИТУТА АНТИБИОТИКОВ ПОД
РОМ 294 А.

Предложенный штамм новый и в патентной и научно-технической лите-
ре не описан.

В.М. Лонас
Зав. отделом *В.М. ЛОНАС*
Составитель

ОПИСАНИЯ *В.А. ДРЕНК*
В

Редактор *У.А. Мамедович*

исано к печати *3.11.80*

Зак. № *8434/77* Тираж *8* экз.

изводственно-полиграфическое предприятие "Петент", Бережковская, наб. 24

PATENTS N^o. 5056***PENICILLIUM LANOSO-VIRIDE* 8D CELMS - ADENILĀTDEZAMINĀZES
PRODUCENTS**

IESNIEGUMA N ^o .	P - 92 - 245
IZSNIEGŠANAS DATUMS	02.12.92
PRIORITĀTE	18.06.79
Starptautiskās klasifikācijas indekss:	C12N 9/80 A61K 31/00 C12R 1/80
PAMATOJUMS	PSRS autorapliecība N ^o . 782329

PATENTA TURĒTĀJS:	LATVIJAS UNIVERSITĀTE
AUTORI:	I.Muižnieks V.Reveliņa A.Šafranskis

ANOTĀCIJA

Izgdrojums attiecas uz medicīnu un mikrobioloģiju. Iegūts jauns mikroskopiskās sēnes *Penicillium lanoso-viride* 8D celms - adenilātdezamināzes producents. Celms glabājas Vissavienības Antibiotiku zinātniski pētnieciskā institūta Mikroorganismu kultūru kolekcijā ar numuru 294 A.



СОЮЗ СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ
АВТОРСКОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО

№ 1064500

На основании полномочий, предоставленных Правительством СССР,
Государственный комитет СССР по делам изобретений и открытий
выдал настоящее авторское свидетельство на изобретение:
"Способ получения кормовой биомассы"

Автор (авторы): **Межиня Гунтара Рудольфовна, Муижниекс
Индрикис Оскарович, Ревелиня Визма Робертовна, Мауриня
Хелена Антоновна, Бекер Валентина Францевна и Упит
Андрис Арнольдович**

Заявитель: **ЛАТВИЙСКИЙ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. ПЕТРА СТУЧКИ**

Заявка № **3366045** Приоритет изобретения **10 декабря 1981 г.**
Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений СССР

1 сентября 1983 г.
Действие авторского свидетельства распро-
страняется на всю территорию Союза ССР.

Председатель Комитета

A stylized, handwritten signature in black ink, likely belonging to the Chairman of the State Committee for Inventions and Discoveries.

Начальник отдела

A stylized, handwritten signature in black ink, likely belonging to the head of the department.

проект

Т НЕ ПОДЛЕЖИТ ОПУБЛИКОВАНИЮ
В ОТКРЫТОЙ ПЕЧАТИ



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) I064500 A

(51) A 23 K I/I65

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

И АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 3366045/30-15

(22) 10.12.81

(71) Латвийский ордена Трудового Красного Знамени государствен-
ный университет им. Петра Стучки

(72) Г.Р.Мекина, И.О.Муижниекс, В.Р.Ревелиня, Х.А.Мауриня,
В.Ф.Бекер и А.А.Упит

(53) 663.143.4 (088.8)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОРМОВОЙ БИОМАССЫ

(19) SU (11) I064500 A

Изобретение относится к микробиологической промышленности, а именно к способам получения кормовой биомассы, содержащей ферменты и другие биологически активные вещества, на основе переработки непищевых растительных отходов.

Одной из важнейших проблем кормопроизводства является переработка малоценного несбалансированного растительного сырья в кормовые добавки, содержащие не только энергетические компоненты, но и биологически активные вещества [1].

Высокоактивными продуцентами белка и биологически активных веществ являются микроскопические грибы.

Известен способ получения биомассы для кормовых целей путем глубинного культивирования грибного штамма *Penicillium digitatum* 24 П в питательной среде, содержащей отходы картофелеперерабатывающей промышленности [2]. Однако грибной мицелий, получаемый при выращивании штамма, не содержит достаточного количества биологически активных веществ, так штамм *P. digitatum* 24 П является только продуцентом белка, а при своей жизнедеятельности он продуцирует столь незначительное количество гидролитических ферментов, что возможно лишь обнаружить их следы в биомассе, но весьма трудно выделить и определить их. Поэтому биомасса, полученная согласно известному способу, характеризуется низким содержанием биологически активных веществ. Кроме того, ферментационная среда в конце процесса культивирования содержит только 16-18 г/л биомассы *Penicillium digitatum* 24 П с содержанием 60 % белка, т.е. 1 % белка в среде.

Применение в способе глубинного метода культивирования требует больших расходов электроэнергии и тепла, сложной аппаратуры, высокого уровня механизации и автоматизации для поддержания оптимальных условий культивирования, высококвалифицированного обслуживающего персонала, а также сложных, дорогостоящих сооружений для очистки сточных вод.

Известен способ получения аденилатдезаминазы с использованием *Penicillium lanoso-vizide* S.D., включающий в себя культивирование его поверхностным способом на отрубях пшеницы, смоченных 1,5-2,0 объемами воды, в течение трех суток, выделение целевого продукта путем отделения мицелия от поверхности среды, его дезинтегрирование, экстрагирование фермента буферным раствором с последующей обработкой экстракта активированным углем [3].

Однако в известном способе целенаправленно используется только фермент аденилатдезаминаза, а целый ряд ценных компонентов грибного мицелия (таких как белки, ферменты глюкоамлазы и протеазы, витамины и другие биологически активные вещества) становится отходами производства. Кроме того, рационально не используются остатки питательной среды - пшеничные отруби.

Целью изобретения является повышение кормовой ценности биомассы путем повышения количества биологически активных веществ.

Для достижения поставленной цели в способе получения кормовой биомассы, включающем культивирование микроскопического гриба из рода *Penicillium* на растительной питательной среде и последующее высушивание продукта, в качестве микроскопического гриба используют штамм *Penicillium lanoso-vizide* S.D.

Сущность изобретения заключается в следующем.

На отходах сельскохозяйственной и пищевой промышленности (пшеничных отрубях, соке растений и сеяной муке) культивируют

микроскопический гриб *Penicillium lanoso-ovide* S.P., который при своей жизнедеятельности продуцирует комплекс биологически активных веществ, включающих аденилатдезаминазу, глюкоамилазу и протеазу.

Как известно, аденилатдезаминазы осуществляют гидролитическое отделение аминогруппы от адениловых нуклеотидов и аденозина, а дезаминирование адениловых производных является первым шагом на пути их катаболизма, что весьма важно для оптимального протекания энергетических процессов в клетках. Наряду с этим у многих животных аденилатдезаминаза выполняет регуляторные функции на органическом уровне, трансформируя биологически активные аденилаты в менее активные и менее токсичные инозиловые производные. Глюкоамилазы способствуют гидролизу крахмала до глюкозы, а протеазы гидролизуют высокомолекулярные белковые вещества до аминокислот.

Комплекс биологически активных веществ вырабатывается микроскопическим грибом в процессе ферментации, после завершения этого процесса ферментационную массу высушивают до влажности 10% при температуре ниже 50°C, при необходимости размельчают. В результате получают кормовую добавку, содержащую белок до 27% и имеющую аденилатдезаминазную активность до 60 МЕ/г, глюкоамилазную активность до 50 МЕ/г и протеазную активность до 0,1 МЕ/г.

Кормовая добавка может быть использована для включения в кормовой рацион крупного рогатого скота, а также домашних птиц, в частности цыплят.

Пример I.

Выращивают посевную культуру, для этого 0,3 мл суспензии конидий, выращенных на сусло-агаре недельной культуры *Penicillium lanoso-ovide* S.P., высевает в чашку Петри, содержащую 2 г отрубей, смоченных 3 мл крапной воды, затем посевную культуру помещают

в термостат и выращивают гриб при $28 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 5 сут .

Затем готовят основную питательную среду. Для этого в 400 г пшеничных отрубей добавляют 600 г коричневого сока люцерны, полученного путем отделения кормовой хлоропластной фракции белка от зеленого сока люцерны. Полученную смесь отрубей и сока люцерны подвергают стерилизации при 1,2 ати в течение 1 ч и после охлаждения засевают посевной культурой. В полученной таким образом ферментационной массе осуществляют процесс ферментации, который проводят поверхностным способом в термокамере при $28 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 5 сут при влажности 55–70 %. После завершения процесса ферментации ферментационную массу высушивают при температуре $(30-50)^\circ\text{C}$ и влажности до 10 %.

Готовый препарат характеризуется содержанием белка 27 %, аденилатдезаминазной активностью 160 МЕ/г, глюкоамлиазной активностью 50 МЕ/г, протеолитической активностью 0,10 МЕ/г.

Пример 2.

Биологический опыт проводился на цыплятах породы белый леггорн в возрасте 1–30 дней. Цыплята содержались в батарейных клетках при свободном доступе к воде и корму. В качестве основного рациона использовалась кормовая смесь, содержащая компоненты, %: кукуруза 46; ячмень 13,0; пшеница 12,0; подсолнечниковый шрот 10,2; соевый шрот 7,7; рыбная мука 7,6; костная мука 1,5; мел 1,5; соль 0,5. Кроме того, в рацион введены витамины и микроэлементы согласно существующим нормам.

Содержание протеина в данном рационе составляло 20,5%, липидна – 1,03%, метионина + цистина – 0,75%, триптофана – 0,2%, кальция – 1,3%, фосфора – 0,8%, т.е. основной рацион сбалансирован по основным питательным веществам.

До 7 ^{го} дня жизни цыплята получали полноценный рацион. Затем

пыльца были разделены на группы по принципу аналогов и переведены на экспериментальные рационы.

Результаты биологической оценки кормовых добавок представлены в таблице.

При применении исследуемого препарата для обогащения рациона не обнаружено отклонений в росте и развитии пчел и биохимических показателей организма.

Биологическая оценка кормовых препаратов, полученных путем культивирования грибов *P. canoso-ovoides* 8D и *P. digitatum* 24П

Показатель	Рацион с 21% протеела		
	Без добавок	+5% препарата, полученного из <i>P. canoso-ovoides</i> 8D	+3% препарата "дигитатина", полученного из <i>P. digitatum</i> 24П
Средний прирост живой массы за период опыта, %	100,0	105,0	100,0
Расход корма на 1 г прироста живой массы, %	100,0	96,8	100,0

Предлагаемый способ позволит переработать отходы сельскохозяйственной и пищевой промышленности в комплексный препарат с высоким содержанием биологически активных веществ, белков и витаминов. Кроме того, новый способ более прост, дешевле и доступен.

Формула изобретения

Способ получения кормовой биомассы, включающий культивирование микроскопического гриба из рода *Penicillium* на растительной питательной среде и последующее высушивание продукта, отличающийся тем, что, с целью повышения кормовой ценности биомассы путем повышения количества биологически активных веществ в качестве микроскопического гриба используют штамм *Penicillium lanoso-ovoides* S.D.

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе

1. Попова Т.Е. Микробиологический слитез белка. Изв. АН СССР сер. Биологическая, 1980, № 4, с. 595-610.

2. Авторское свидетельство СССР № 502020, 1974, кл. C12A1/14 (прототип).

3. Авторское свидетельство СССР по заявке № 2005614/04 с приор. от 18.06.79, кл. C12D 13/06.

PATENTS N^o. 5055

LOPBARĪBAS BIOMASAS IEGŪŠANAS PAŅĒMIENS

IESNIEGUMA N ^o .	P - 92 - 244
IZSNIEGŠANAS DATUMS	02.12.92
PRIORITĀTE	10.12.81
Starptautiskās klasifikācijas indekss:	A23K 1/165
PAMATOJUMS	PSRS autorapliecība N ^o . 1064500

PATENTA TURĒTĀJS: LATVIJAS UNIVERSITĀTE

AUTORI:
G.Mežiņa
I.Muižnieks
V.Reveliņa
H.Mauriņa
V.Beķere
A.Upītis

ANOTĀCIJA

Izgdrojums attiecas uz mikrobioloģisko rūpniecību - uz fermentu un citu bioloģiski aktīvu savienojumu saturošas lopbarības biomasas iegūšanu. Izstrādātais paņēmiens atšķiras no zināmajiem ar palielinātu biomasas barības vērtību un bioloģiski aktīvo vielu daudzumu. Lopbarības biomasu iegūst kultivējot mikroskopiskās sēnes *Penicillium lanoso-viride* SD celmu augu valsts barotnē un produktu izžāvējot.



СОЮЗ СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

АВТОРСКОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО

№ 1082011

На основании полномочий, предоставленных Правительством СССР, Государственный комитет СССР по делам изобретений и открытий выдал настоящее авторское свидетельство на изобретение:
"Способ получения аденилатдезаминазы"

Автор (авторы): **Муйжнискс Индрикис Оскарович, Ревелиня Визма Робертовна и Шафранский Александр Борисович**

Заявитель: **ЛАТВИЙСКИЙ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. П. СТУЧКИ**

Заявка № **2805614** Приоритет изобретения **18 июня 1979г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений СССР

22 ноября 1983г.

Действие авторского свидетельства распространяется на всю территорию Союза ССР.

Председатель Комитета

Начальник отдела

Союз Советских
Социалистических
Республик



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

(11) IO82011

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(61) Дополнительное к авт. свид-ву	-	
(22) Заявлено	18.06.79. (21) 2905614/23-04	(51) М. Кл. ³
	с присоединением заявки	-
		G12 N 9/78
		G12 R 1/80
(23) Приоритет	-	// # 61 K 37/48
(43) Опубликовано	-	Бюллетень - (53) УДК
(45) Дата опубликования описания	-	577.15.07./088.8/

(72) Авторы
изобретения

И.О.Муйжнискс, В.Р.Ревелиня и А.Б.Шафранский

(71) Заявитель

Латвийский ордена Трудового Красного Знамени государственный университет им.П.Стучки

(54) Способ получения аденилатдезаминазы

Изобретение относится к микробиологической промышленности и касается получения ферментов микроорганизмов.

Аденилатдезаминазы микроорганизмов осуществляют гидролитическое дезаминирование 5 - аденозинмонофосфата, аденозина и его производных. Фермент может быть применен в биохимической промышленности для получения инозина, в перспективе может быть использован в медицине для лечения врожденной комплексной иммунонедостаточности и в качестве сосудосуживающего средства.

Известен способ получения аденилатдезаминазы путем глубоководного культивирования продуцента - *Aspergillus soja* IFO 4252 на синтетической жидкой питательной среде, содержащей

минеральные соли, пептон и эфиры жирных кислот и пропиленгликоля, в течение 4 суток [1].

Аденилатдезаминазу выделяют из культуральной жидкости с активностью 1040 ед/мл, что составляет менее 1 МЕ/мл./Международная Единица/. Описание методики выделения фермента отсутствует.

Недостатками известного способа являются низкая активность получаемого фермента, использование труднодоступных и дорогостоящих компонентов питательной среды - пептона и эфиров жирных кислот, а также продолжительность культивирования, что также снижает экономичность процесса.

Целью изобретения является повышение активности целевого продукта и экономичности процесса его получения.

Указанная цель достигается описываемым способом получения аденилатдезаминазы, который, согласно изобретению, заключается в следующем.

Продуцент аденилатдезаминазы, в качестве которого используют *Penicillium lamoso-viride* ШД, культивируют поверхностным способом на питательной среде - отрубях пшеницы, смоченных 1,5-2,0 объемами воды, в течение трех суток, затем выделяют фермент путем отделения мицелия от поверхности среды, его дезактивирования, экстрагирования фермента буферным раствором с последующей обработкой экстракта активированным углем, сорбцией экстракта на ионообменной смоле и десорбцией целевого продукта буферным раствором, содержащим 0,8-0,8 М NaCl.

Существенными отличиями способа являются использование в качестве продуцента *Penicillium lamoso-viride* ШД, осуществление культивирования поверхностным способом, условия куль-

тивирования /продолжительность и состав питательной среды/, а также выделение аденилатдезаминазы в результате отделения мицелия от поверхности среды, его дезинтегрирования, экстрагирования фермента буферным раствором с последующей обработкой экстракта активированным углем, сорбцией экстракта на ионообменной смоле и десорбцией фермента буферным раствором, содержащим: *0,8-0,81 M NaCl.*

Обычно в качестве ионообменной смолы используют диэтиламиноэтилцеллюлозу или продукт поликонденсации полиэтиленаминаминов с эпихлоргидрином /смола марки ЭДЭ-107/.

С целью повышения степени извлечения целевого продукта из мицелия отработанный мицелий/после экстракции/ подвергают повторной экстракции буферным раствором, содержащим детергент тритон X - 100, а полученный экстракт объединяют с ранее полученным.

Данная дополнительная стадия позволяет увеличить степень извлечения фермента из мицелия и повысить конечную активность целевого продукта на 10%.

Описываемый способ является высокоэкономичным и позволяет получать фермент аденилатдезаминазу с активностью до 50 ME на 1 г стружкой выращивания продуцента (ME активности фермента - количество фермента, превращающее 1 мкм субстрата или накапливающее 1 мкм продукта за 1 мин реакции при заданной температуре).

Применяемый штамм выделен из почвы и хранится в коллекции кафедры физиологии растений и микробиологии Биологического факультета ИГУ им. Л.Стучки.

Пример 1.

Сеют по 0,5 мл суспензии конидий недельной культуры *Penicillium lanoso-viride* 8D на чашки Петри со средой следующего состава: отруби пшеничные - 2,0 г, вода крановая - 3 мл. Выращивают культуру в термостате в течение 3 суток при температуре 28°C. Затем пинцетом отделяют плотный слой образовавшегося мицелия от поверхности среды. Дальнейшие операции получения целевого продукта проводят при 0-4°C. Мицелий механически растирают в ступке в двойном объеме 0,1 М калийфосфатного буфера pH 6,0 в течение 20-30 мин. Затем к растертому мицелию добавляют активированный уголь марки AP-3 из расчета 10 мг/мл и перемешивают смесь в течение 10 мин на магнитной мешалке, дают ей отстояться в течение 20 мин. Смесь центрифугируют при 6000 об/мин в течение 40 мин. В полученный экстракт добавляют 0,5 объема промывной активированной смолы ДЭАЕ-целлюлозы ("Реаким", Олайне). Смесь перемешивают на магнитной мешалке 20 мин, дают отстояться 30 мин и центрифугируют при 6000 об/мин в течение 15 мин, супернатант отбрасывают и аденилатдезаминазу экстрагируют из смолы перемешиванием на магнитной мешалке с равным объемом 0,1 М калийфосфатного буферного раствора pH 6,0, содержащего 0,8 М $MgCl_2$, затем смесь центрифугируют при 6000 об/мин в течение 15 мин. Из мицелия, выращенного на одной чашке Петри, получают примерно 15 мл супернатанта, содержащего 5,5-6,0 международных единиц активности аденилатдезаминазы в мл. Это значит, что из выращенного на 1 г отрубей мицелия *Penicillium*

Canoso-viride

8Д получено 42-45 ME активности целевого продукта.

Пример 2.

Способ получения аденилатдезаминазы аналогичен способу в примере 1, но для дезинтеграции мицелия гриба - продуцента *Penicillium*

Canoso-viride 8Д вместо механического растирания используют обработку ультразвуком / частота 22 КГц, 5 раз по 2 мин с двухминутным интервалом/. Выход целевого продукта на грамм отрубей эквивалентен данным в примере 1.

Пример 3.

Выращивают и разрушают биомассу продуцента аденилатдезаминазы гриба *P. Canoso-viride* 8Д так же, как в примере 1. После центрифугирования дезинтегрированного и обработанного активированным углем мицелия продуцента центрифугат дополнительно экстрагируется в течение 30 мин на магнитной мешалке двойным объемом 0,1 М калийфосфатного буферного раствора pH 6,0, содержащего 0,01% тритона X-100. Затем дополнительно обработанный разрушенный мицелий центрифугируют при 6000 об/мин 40 мин и полученный супернатант объединяют с первым супернатантом. Далее выделение целевого продукта проходит, как описано в примере 1. Выход аденилатдезаминазы, рассчитывая на 1 г использованных для выращивания продуцента отрубей, достигает 50 ME, что примерно на 10% выше выхода получаемого по примеру 1.

Пример 4.

Севт по 0,5 мл суспензии кондий недельной культуры

P. Canoso

viride

8Д на чашки Петри со средой следующего состава: отруби пшеничные - 2,0 г, вода крановая - 4,0 мл. Далее культивирование продуцента и получение целевого продукта проводят

аналогично примеру 1. Выход аденилатдезаминазы в расчете на грамм использованных отрубей составляет 90-95% выхода по примеру 1.

Пример 5.

Выращивание продуцента аденилатдезаминазы *P. Canoso-vizide* ЭД осуществляется аналогично примеру 1. Мицелий гриба экстрагируют после механического растирания 0,1 М буферным раствором Трис - гидрохлорида / "Реакхим", Олайне/ pH - 6,5. Дальнейшая обработка экстракта аналогична примеру 1. Выход целевого продукта эквивалентен выходу по примеру 1.

Пример 6.

Выращивание продуцента аденилатдезаминазы *P. Canoso-vizide* ЭД осуществляется аналогично примеру 1. Мицелий гриба экстрагируется после механического растирания 0,15 М раствором NaCl. Дальнейшая обработка экстракта аналогична примеру 1. Выход целевого продукта составляет 90-95% выхода по примеру 1.

Пример 7.

Выращивание продуцента и получение целевого продукта проводится так же, как описано в примере 1, с той разницей, что поваренная соль ДЭАЕ - целлюлоза / "Реакхим", Олайне/ заменена смолой ЭДЭ-10П / "Реакхим", Олайне/. Это изменение не влияет на выход аденилатдезаминазы, но позволяет снизить скорость и время центрифугирования при сорбции и десорбции целевого продукта смолой на 3000 об/ мин в течение 10 мин.

Аминогидролазную активность фермента, выделенного из мицелия гриба *Penicillium canoso vizide* ЭД, определяют следующим способом.

0,1 мл препарата, выделенного из мицелия, разбавляют в 100 раз 0,1 М калийфосфатным буфером pH 6,0. Из разбавленного препарата 0,1 мл добавляют в инкубационную смесь, содержащую 0,1 мкМ аденозина или аденозин - 5 - монофосфата в 2 мл 0,1 М калийфосфатного буфера pH 6,0 и инкубируют при 25°C в течение 10 мин в термостате. Реакцию прекращают добавлением 0,5 мл 20% HClO₄. Затем смесь выдерживают на льду 10 мин, центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин и определяют экстракцию в УФ при длине волны 240 и 265 нм, рассчитывая соотношение E 265/240, на калибровочной кривой находят количество дезаминированного субстрата и определяют активность препарата по формуле:

$$\text{Активность / ME/} = \frac{\text{мкМ дезамин. субстрата} \times \text{разбавл. прел.}}{\text{время инкубации / мин /}}$$

Формула изобретения

1. Способ получения аденилатдезаминазы путем культивирования продуцента на питательной среде, содержащей основную источник питания с последующим выделением целевого продукта, отличающийся тем, что, с целью повышения активности целевого продукта и экономичности процесса его получения, в качестве продуцента используют *Penicillium canisporoides* 8Д, культивирование его осуществляют поверхностным способом на отрубях пшеницы, смоченных 1,5 - 2,0 объемами воды в течение трех суток, а выделение целевого продукта осуществляют путем отделения мицелия от поверхности среды, его дезинтегрирования, экстрагирования фермента буферным раствором с последующей обработкой экстракта активированным углем, сорбцией экстракта на

PATENTS N^o. 5059

ADAENILĀTDEZAMINĀZES IEGŪŠANAS PAŅĒMIENS

IESNIEGUMA N ^o .	P - 92 - 248
IZSNIEGŠANAS DATUMS	02.12.92
PRIORITĀTE	18.06.79
Starptautiskās klasifikācijas indekss:	C12N 9/78 C12R 1/80 A61K 37/48
PAMATOJUMS	PSRS autorapliecība N ^o . 1082011
PATENTA TURĒTĀJS:	LATVIJAS UNIVERSITĀTE
AUTORI:	I.Muižnieks V.Reveliņa A.Šafranskis

ANOTĀCIJA

Izgudrojums attiecas uz mikroorganismu fermentu iegūšanu mikrobioloģiskajā rūpniecībā. Izstrādāts adenilātdezamināzes iegūšanas paņēmiens no *Penicillium lanoso-viride* 8D, audzējot to 3 diennaktis virsmas kultūrā uz kviešu klijām, kas samitrinātas ar 1.5 - 2.0 tilpumiem ūdens. Galaproduktu izdala, micēliju atdalot no barotnes virsmas, dezintegrējot, fermentu ekstrahējot ar buferšķīdumu, apstrādājot ar aktīvo ogli, ekstraktu sorbējot uz jonapmaiņas sveķiem un galaproduktu desorbējot ar 0.80 - 0.81 M NaCl saturošu buferšķīdumu.

ионообменной смоле и десорбцией целевого продукта буферным раствором, содержащим 0,8-0,81 M NaCl.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве ионообменной смолы используют диэтиламиноэтилцеллюлозу или продукт поликвденсации полиэтиленполиаминов с эпихлоргидрином / ЭДЭ-10П/.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что, с целью повышения степени извлечения целевого продукта из мицелля, отработанный мицелль подвергают повторной экстракции буферным раствором, содержащим детергент тритон X -100, и полученный экстракт объединяют с ранее полученным.

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе

1. Патент Японии 52-31632, сер. 2/4, № 6 / 254 / /прототип/.

25

Подписано к печати 21.12.83. Редактор *Сейкина* Зл. № 128 Тираж 6 экз.

Производственно-полиграфическое предприятие "Патент", Березковская наб. 2-4



СОЮЗ СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

АВТОРСКОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО

№ 1124033

На основании полномочий, предоставленных Правительством СССР, Государственный комитет СССР по делам изобретений и открытий выдал настоящее авторское свидетельство на изобретение:
"Способ получения плазмидной ДНК"

Автор (авторы): Зилбере Айна Мартыновна, Шафранский Александр Борисович, Хартмане Янина Яновна, Ансберга Скайдрите Эрнестовна, Муйжниекс Индрижис Оскарлович и Камрадзе Антра Альбертовна

Заявитель:

Заявка № 3555304

Приоритет изобретения 16 февраля 1983 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений СССР

15 июля 1984 г.

Действие авторского свидетельства распространяется на всю территорию Союза ССР.

Председатель Комитета

Начальник отдела



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(SU) 1124033 A

з (SU) С 12 N 15/00; С 07 Н 21/04

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 3555304/28-13

(22) 16.02.83

(46) 15.11.84. Бюл. № 42

(72) А.М.Зилбере, А.Б.Шафранский,
Я.Я.Хартмане, С.Э.Ансберга,
И.О.Муйжниекс и А.А.Камрадзе

(53) 575.113(088.8)

(56) 1. Clevell D.V. and Helinski D.R.
"Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 1969,
62, 1159-1166.

2. Birnboim H.C. and Doly J. "Nuc-
leic Acids Res.", 1979, 7, № 6,
p. 1513-1523.

(54)(57) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПЛАЗМИДНОЙ
ДНК из микробной биомассы, включающий
лизис клеток, центрифугирование, осаж-
дение целевого продукта из надосадоч-
ной жидкости спиртом, очистку от
примесей РНК с помощью РНКазы, о т-
л и ч а ю щ и й с я тем, что, с
целью увеличения выхода целевого про-
дукта, лизис клеток проводят щелочным
раствором додецилсульфата натрия при
соотношении биомасса : буферный раст-
вор : щелочной раствор додецилсуль-
фата натрия 1 : 19 : (37-45), а очист-
ку от РНК осуществляют РНКазой в
присутствии 1,0-3,0 мМ ЭПА.

(SU) 1124033 A

Изобретение относится к биохимии и может быть использовано для решения научно-исследовательских и прикладных задач при выделении и очистке плазмидной ДНК в упомянутой области, а также в микробиологии, медицине, генной инженерии.

Плазмидная ДНК является объектом, используемым в генной инженерии в качестве векторных молекул, а также как субстрат для многих ферментов, в том числе эндонуклеаз рестрикции, как тест-ДНК.

Известен способ получения плазмидной ДНК из бактериальных клеток. Клетки суспендировали в буфере, разрушали лизоцимом, балластные белки отделяли с помощью додецилсульфата натрия. Для очистки препарата использовали хлороформ, изоамиловый спирт и фенол. Получаемый препарат ДНК содержит много примесей хромосомальной ДНК и РНК [1].

Наиболее близким к изобретению по технической сущности и достигаемому результату является способ получения ковалентно-замкнутой кольцевой плазмидной ДНК, включающий следующие стадии: суспендирование бактериальных клеток в трис-буфере содержащем глюкозу, лизоцим, инкубирование при 0°, лизис щелочным раствором додецилсульфата натрия, нейтрализацию смеси ацетатом натрия и центрифугирование. Плазмидную ДНК дважды пересаждают спиртом и инкубируют с РНКазой [2].

Однако для известного способа характерен недостаточно высокий выход целевого продукта.

Целью изобретения является увеличение выхода плазмидной ДНК.

Поставленная цель достигается тем, что согласно способу получения плазмидной ДНК из микробной биомассы, включающему лизис клеток, центрифугирование, осаждение целевого продукта из надосадочной жидкости спиртом, очистку от примесей РНК с помощью РНКазы, лизис клеток проводят щелочным раствором додецилсульфата натрия при соотношении биомасса : буферный раствор : щелочной раствор додецилсульфата натрия 1:19(37-45), а очистку от РНК осуществляют РНКазой в присутствии 1,0-2,0 мМ ЭДТА.

Способ осуществляют следующим образом.

Повышение выхода обеспечивается за счет сохранения суперспиральной

структуры ДНК в процессе лизиса. Понижение количества додецилсульфата натрия и натра едкого, которые в среду вводятся в определенных соотношениях, т.е. в количествах, определяющих возможность регулирования лизиса с целью сохранения ковалентно связанной кольцевой плазмидной ДНК, а условия инкубации обеспечивают разделение ковалентно-замкнутой кольцевой плазмидной ДНК от балластных веществ. Условия лизиса и инкубации предотвращают релаксацию ковалентно-замкнутой кольцевой плазмидной ДНК в линейную и открытую кольцевую ДНК.

Предлагаемый способ обеспечивает накопление ковалентно-замкнутой кольцевой плазмидной ДНК 95-96%. Процесс очистки от РНК проводят ферментом РНКазой (0,8-0,81 мкг на 1 мг суммарных рибонуклеиновых кислот) в присутствии 1,0-3,0 мМ ЭДТА (динатриевая соль этилендиамина N - N - N' - N' - тетрауксусной кислоты).

Введение ЭДТА подавляет активность нуклеаз, так как нуклеазы являются металлозависимыми ферментами. ЭДТА связывает ионы металла и ферментный центр инактивируется.

В предлагаемых условиях присутствие ЭДТА активирует каталитическую способность РНКазы, так как РНКазы не являются металлозависимым ферментом. Присутствие ЭДТА напротив повышает ее активность.

Предлагаемый способ направлен на сохранение структуры плазмидной ДНК, конфигурации ее цепи, на предотвращение раскручивания цепи.

Цепи удерживаются вместе благодаря образованию трех водородных связей между гуанином (G) и цитозином (Ц) и двух водородных связей между аденином (A) и тиминном (T). Однако стабильно двойной спирали в основном определяется взаимодействием параллельно-π-электронных систем оснований.

Пример 1. 40 г биомассы *Escherichia coli* HB 101 ресуспендируют в 750 г буфера, состоящего из мМ: ЭДТА 10, глюкоза 50, трис-НО 25, рН 8,0.

Добавляют 1,5 кг 0,8%-ного додецилсульфата натрия в 0,1 н : NaOH и перемешивают в течение 5 мин при комнатной температуре. Смесь нейтрализуют добавлением 1,075 кг 3М ацетата натрия рН 4,8. Оставляют при 0 - +4°C в течение 1 ч. Осадок отделяют центрифуги

рованием. Супернатант, содержащий плазмидную ДНК, дважды переосаждают охлажденным этанолом (6,65 кг). Полученный осадок после центрифугирования ресуспендируют в 50 мл буфера, состоящего из мМ: трис-НС₂ 10, рН 7,6, NaCl 10, ЭДТА 10, добавляют активированную РНКазу из расчета 50 мкг на 700 мл суммарных рибонуклеиновых кислот и инкубируют 30 мин при 37°C. Инкубат дважды переосаждают охлажденным этанолом. Осадок ресуспендируют в 20 мл буфера, состоящего из, мМ: трис-НС₂ 10, рН 7,6, NaCl 10, ЭДТА 10.

Концентрацию ДНК плазмиды определяют по формуле

$$C = A_{260} \cdot a \cdot 50,$$

где C - концентрация плазмидной ДНК, мкг/мл;

A_{260} - оптическая плотность при длине волны 260 нм;

a - кратность разбавления;

50 - коэффициент, соответствующий 1 оптической единице при длине волны 260 нм, мкг/мл;

$$C = 0,76 \cdot 40 \cdot 50 = 1520 \text{ мкг/мл} = 1,52 \text{ мг/мл}.$$

Общий выход ДНК плазмиды 30,4 мг при объеме 20 мл 0,076%. Содержание ковалентно-замкнутой кольцевой ДНК 95%.

Пример 2. 40 г биомассы *Eicherichia coli* HB 101 ресуспендируют в 750 г буфера, состоящего из, мМ: ЭДТА 10, глюкоза 50, трис-НС₂ 25, рН 8,0. Добавляют 1,7 кг 0,8%-ного

додецилсульфата натрия в 0,1 н. NaOH и перемешивают в течение 5 мин при комнатной температуре. Смесь нейтрализуют добавлением 1,2 кг 3М ацетата натрия, рН 4,8.

Далее процесс проводят по примеру 1, но в буфере для инкубации с РНКазой концентрацию ЭДТА доводят до 2,0 мМ.

Концентрацию ДНК определяют по формуле

$$C = A_{260} \cdot a \cdot 50 = 0,68 \cdot 40 \cdot 50 = 1360 \text{ мкг/мл} = 1,36 \text{ мг/мл}.$$

Общий выход ДНК плазмиды 28 мг при объеме 20,6 мл 0,07%. Содержание ковалентно-замкнутой кольцевой ДНК 95,5%.

Пример 3. 40 г биомассы *Eicherichia coli* HB 101 ресуспендируют в 750 г буфера, состоящего из, мМ: ЭДТА 10, глюкоза 50, трис-НС₂ 25, рН 8,0. Добавляют 1,82 кг 0,8%-ного додецилсульфата натрия в 0,1 н. NaOH и перемешивают в течение 5 мин при комнатной температуре. Смесь нейтрализуют добавлением 1,3 кг 3М ацетата натрия, рН 4,8.

Далее процесс проводят по примеру 1, но в буфере для инкубации с РНКазой концентрацию ЭДТА доводят до 3,0 мМ.

Концентрацию ДНК плазмиды в мкг/мл определяют по формуле

$$C = A_{260} \cdot a \cdot 50 = 0,65 \cdot 40 \cdot 50 = 1300 \text{ мкг/мл} = 1,3 \text{ мг/мл}.$$

Общий выход ДНК плазмиды 27,3 мг при объеме 21,0 мл 0,068%. Содержание ковалентно-замкнутой кольцевой ДНК 96%.

Составитель В. Кузьмичев

Редактор М. Дылын Техред С. Мигунова

Корректор А. Зимокосов

Заказ 8208/24

Тираж 521

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент". г. Ужгород, ул. Проектная, 4

PATENTS N^o. 5058

ADENILĀTDEZAMINĀZES IEGŪŠANAS PAŅĒMIENS

IESNIEGUMA N ^o .	P - 92 - 247
IZSNIEGŠANAS DATUMS	02.12.92
PRIORITĀTE	05.04.84
Starptautiskās klasifikācijas indekss:	C12N 9/78 C12R 1/80
PAMATOJUMS	PSRS autorapliecība N ^o . 1218679
PATENTA TURĒTĀJS:	LATVIJAS UNIVERSITĀTE
AUTORI:	V.Nikolajeva I.Muižnieks

ANOTĀCIJA

Izgudrojums attiecas uz mikrobioloģisko rūpniecību un konkrēti - uz *Penicillium lanoso-viride* 8D adenilātdezamināzes, fermenta, kam piemīt imūnstimulējoša iedarbība, iegūšanu. Izgudrojuma mērķis - *Penicillium lanoso-viride* 8D adenilātdezamināzes imūnstimulējošās aktivitātes palielināšana. Izstrādātais paņēmiens paredz fermenta šķīduma karsēšanu 20 - 40 min. 60 - 90°C. Karsēšanas rezultātā adenilātdezamināze inaktivējas, vienlaicīgi palielinās tās imūnstimulējošā aktivitāte.



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

ДЛЯ СЛУЖЕБНОГО ПОЛЬЗОВАНИЯ ЭКЗ. №

(19) SU (11) 1277748 A

(5D) 4 G 01 N 33/48, C 12 N 1/06

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 3891440/28-14

(22) 29.04.85

(71) Латвийский ордена Трудового
Красного Знамени государственный уни-
верситет им. П.Стучки

(72) А.Б.Шафранский, И.О.Муйжниекс,
Г.И.Макаренкова, А.М.Зилбере
и С.Э.Ансберга

(53) 577.2(048)(088.8)

(56) Ishimoto K.R., m.a. Bruce. Viro-
logy, 40, 734-744, 1970.

(54)(57) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ДЕЗОКСИРИ-
БОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ фага Харон-4А
и рекомбинантов на его основе, вклю-
чающий размножение фага в культуре

Ecoli K802 с последующим лизировани-
ем клеток, удаление клеточных остат-
ков, концентрацию фаговых частиц,
очистку их суспензии и депротеиниза-
цию, о т л и ч а ю щ и й с я тем,
что, с целью ускорения способа, пе-
ред удалением клеточных остатков, фа-
голизат подвергают термообработке
при 55-65°C 10-15 мин, фаговые части-
цы концентрируют и инактивируют 3М
ацетатом натрия, pH 5,0-5,5 в объем-
ных соотношениях фаголизат : 3М аце-
тат натрия = 1:0,01-0,015, суспензию
очищают обработкой ДНК-азой и РНК-азой
в объемных соотношениях суспензия :
ДНК-аза : РНК-аза = (18-22):1:1.

(19) SU (11) 1277748 A

Изобретение относится к молекулярной биологии и генноинженерной биотехнологии, а именно к получению ДНК фагов ЕК-2 группы на основе Δ , несущие амбер-мутации и не способные к лизогенному типу развития, например фага Харон 4А (Ch4A), рекомбинантов на его основе.

Целью изобретения является ускорение и повышение биологической безопасности способа.

Способ осуществляется следующим образом.

Размножают фаг в культуре *E. coli* K802 с последующим лизированием клеток, удаляют клеточные остатки, далее концентрируют фаговые частицы, очищают их суспензию и депротенизируют, перед удалением клеточных остатков фаголизат подвергают термообработке при 55-65°C 10-15 мин, фаговые частицы концентрируют и инактивируют 3М ацетатом натрия, рН 5,0-5,5 в объемных соотношениях фаголизат : 3М ацетат натрия = 1:0,01-0,015, суспензию очищают обработкой РНК-азой и ДНК-азой в объемных соотношениях суспензия : РНК-аза : ДНК-аза = 18-22:1:1.

Предлагаемый способ сокращает продолжительность процесса и упрощает способ получения концентрированных и очищенных препаратов частиц Ch4A для выделения ДНК. Продолжительность процесса сокращается в 10 раз.

Цель упрощения процесса осуществляется комбинированной обработкой фаголизата при повышенной температуре (+55-65°C).

Концентрирование фаговых частиц может осуществляться их преципитацией при рН, близких к изоэлектрической точке. Наиболее пригоден для этой цели ацетат натрия, оттитрованный уксусной кислотой до рН 5,0-5,5 так как является веществом с выраженными буферными свойствами. Ацетат натрия способствует наиболее полному осаждению ДНК.

Изменение соотношения суспензия фагов : 3М ацетат натрия предлагаемыми пределами приводит либо к низкому выходу целевого продукта (при пониженной концентрации 3М ацетата натрия), либо к необратимой денатурации и агрегации фаговых частиц и в конечном итоге - к деградации целевого продукта ДНК Ch4A при повышенном содержании ацетата натрия.

Получаемые предложенным способом фаговые частицы неинфицированы, что повышает биологическую безопасность работы с ними.

Пример 1. 10 л лизата *E. coli* K802 встряхивают с 100 мл хлороформа и подвергают термообработке при 55°C в течение 10 мин. Смесь центрифугируют 20 мин при 6000 об/мин и 4°C. К супернатанту (10 л) добавляют 100 мл 3М ацетата натрия, рН 5, быстро перемешивают и оставляют на 15-20 мин при комнатной температуре. Центрифугируют 20 мин при 6000 об/мин и 4°C. Слегка подсушенный осадок суспендируют в 288 мл трис-НСl буфере (10 мМ трис-НСl, 10 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА), рН 7,6. Суспензию обрабатывают ДНК-азой 16 мл (концентрацией мг/мл) и РНК-азой 16 мл (концентрация мг/мл) при 37°C в течение 45 мин.

Для разрушения фаговых частиц суспензию обрабатывают лизирующей смесью (15 мл 0,3М ЭДТА+10 мл 10%-го додецилсульфата натрия) и выдерживают 15 мин при комнатной температуре.

Просветленную суспензию смешивают с равным объемом водонасыщенного фенола, рН 8,0 и центрифугируют 20 мин при 4000 об/мин.

В водной фазе с добавлением 2 объемов охлажденного этанола осаждают фаговую ДНК. Нити ДНК дважды промывают охлажденным этанолом (70°C). Просушивают и ресуспендируют 10 мл трис-буфера.

Выход: 18 мг фаговой ДНК, свободной от хромосомальной ДНК. Примеси РНК отсутствуют. Продолжительность процесса 2,5 ч.

Пример 2. 10 л лизата *E. coli* K802 встряхивают с 100 мл хлороформа и подвергают термообработке при 60°C в течение 12 мин. Смесь центрифугируют 20 мин при 6000 об/мин и 4°C. К супернатанту (10 л) добавляют 120 мл 3М ацетата натрия, рН 5,2, быстро перемешивают и оставляют на 15-20 мин при комнатной температуре. Центрифугируют 20 мин при 6000 об/мин и 4°C. Слегка подсушенный осадок суспендируют в 300 мл трис-НСl буфере (10 мМ трис-НСl, 10 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА), рН 7,6. Суспензию обрабатывают ДНК-азой 15 мл (концентрация мг/мл) и РНК-азой 15 мл (концентрация мг/мл) при 37°C в течение 45 мин. Разрушение фаговых частиц и очистку фаговой ДНК проводят так же, как в примере 1.

Выход: 190 мг фаговой ДНК. Продолжительность процесса 2,5 ч.

Пример 3. 10 л лизата *E. coli* K802 встряхивают с 100 мл хлороформа и подвергают термообработке при 65°C в течение 15 мин. Смесь центрифугируют 20 мин при 6000 об/мин и 4°C. К супернатанту (10 л) добавляют 150 мл 3М ацетата натрия, pH 5,5, быстро перемешивают и оставляют на 15-20 мин при комнатной температуре. Центрифугируют 20 мин при 6000 об/мин и 4°C. Слегка подсушенный осадок суспендируют в 352 мл трис-НС1 буфере (10 мМ трис-НС1, 10 мМ аС1, 1 мМ ЭДТА), pH 7,6. Суспензию обрабатывают ДНК-азой 16 мл (концентрация мг/мл) и 16 мл РНК-азой (концентрация мг/мл) при 37°C в течение 45 мин.

Разрушение фаговых частиц и очистку фаговой ДНК проводят так же, как в примере 1.

Выход: 18,5 мг фаговой ДНК. Продолжительность процесса 2,5 ч.

Пример 4. 10 л лизата *E. coli* K802 встряхивают с 100 мл хлороформа и подвергают термообработке при 70°C в течение 20 мин. Смесь центрифугируют 15 мин при 6000 об/мин и 4°C. К супернатанту (10 л) добавляют 160 мл 3М ацетата натрия, pH 5,6, быстро перемешивают и оставляют на 15-20 мин при комнатной температуре. Центрифугируют 20 мин при 6000 об/мин и 4°C. Слегка подсушенный осадок суспендируют в 400 мл трис-буфере (10 мМ трис-НС1, 10 мМ NaCl, 1 мМ

ЭДТА), pH 7,6. Суспензию обрабатывают ДНК-азой 17 мл (концентрация мг/мл) и 17 мл РНК-азой (концентрация мг/мл) при 37°C в течение 45 мин.

Разрушение фаговых частиц и очистку фаговой ДНК проводят так же, как в примере 1.

Выход: 5,7 мг фаговой ДНК. Продолжительность процесса 2,5 ч.

Пример 5. 10 л лизата *E. coli* H802 встряхивают с 100 мл хлороформа и подвергают термообработке при 50°C в течение 8 мин. Смесь центрифугируют 20 мин при 6000 об/мин и 4°C. К супернатанту добавляют 75 мл 3М ацетата натрия, pH 4,8, быстро перемешивают и оставляют на 15-20 мин при комнатной температуре. Центрифугируют 20 мин при 6000 об/мин и 4°C. Слегка подсушенный осадок суспендируют в 250 мл трис-НС1 буфере (10 мМ трис-НС1, 10 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА), pH 7,6. Суспензию обрабатывают ДНК-азой 14 мл (концентрация мг/мл) и 14 мл РНК-азой (концентрация мг/мл) при 37°C в течение 45 мин.

Разрушение фаговых частиц и очистку фаговой ДНК проводят так же, как в примере 1.

Выход: 4,8 мг фаговой ДНК. Продолжительность процесса 2,5 ч.

Эффект способа заключается в сокращении продолжительности процесса в 10 раз и упрощении способа получения концентрированных и очищенных препаратов частиц Ch4A для выделения ДНК.

Составитель Н. Кузенкова

Редактор С. Рекова

Техред Л. Олейник

Корректор Е. Рошко

Заказ 1334/ДСП

Тираж 869

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4



СОЮЗ СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

АВТОРСКОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО

№ 1499919

На основании полномочий, предоставленных Правительством СССР, Государственный комитет СССР по делам изобретений и открытий выдал настоящее авторское свидетельство на изобретение:
"Штамм микроскопического гриба *Penicillium lanoso-viride* продуцент аденилатдезаминазы"

Автор (авторы): Иващенко Майя Ефимовна, Мужниекс Индрикис Оскарович, Николаева Визма Робертовна и Камрадзе Антра Албертовна

Заявитель: ЛАТВИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. П. СЛУЧКИ

Заявка № 4389108 Приоритет изобретения 30 декабря 1987г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений СССР

8 апреля 1989г.

Действие авторского свидетельства распространяется на всю территорию Союза ССР.

Председатель Комитета

Начальник отдела

Иващенко Майя Ефимовна
Муижниекс Индрикис Оскарович
Николаева Визма Робертовна
Камрадзе Антра Албертовна

С 12 Д 13/10

Штамм *Penicillium lanoso-viride* В - продуцент аденилат-дезаминазы.

Изобретение относится к микробиологической промышленности, в частности к производству ферментов и представляет собой новый штамм *Penicillium lanoso-viride* В, который может быть использован для производства аденилатдезаминазы.

Известны штаммы, обладающие аденилатдезаминазной активностью, - *Aspergillus tamari* (1), *A. sojae* (2), *Penicillium brenneo-stoloniferum* (3).

Описан штамм *Penicillium lanoso-viride* 8Д - наиболее активный из известных продуцентов аденилатдезаминазы. (4). Этот штамм имеет следующую характеристику. Культуральные признаки: колонии на среде Чапека ограниченно-растущие, пушистые, в начале белые, затем бледно-серо-зеленые, с возрастом зеленовато-сизые, не имеющие тенденции к образованию тяжей, на обратной стороне не окрашенные. Запах сильный, напоминает запах картофельной корки. Экссудат отсутствует. Морфологические признаки: кисточки обычно трехъярусные, состоят из веточек, метул и стеригм, несимметрические, с конидиальными цепочками 30 - 80 мкм длины. Конидиеносцы шероховатые, очень изменчивые по длине, сплетающиеся, 100 - 600 x 3 мкм. Веточки 14 - 18 x 3 мкм. Метулы образуются на разных углах кисточки по 2-3, около 10 x 2,5 мкм. Конидии шаровидные, 3-5 мкм в диаметре, гладкие, слегка окрашенные в массу. Физиологические признаки: ассимилирует глюкозу, галактозу, ксилозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, арабинозу, фруктозу, крахмал, глицерин, маннит. Усваивает минеральный азот в аммонийной и нитратной форме. Нитраты восстанавливает. Желатину не разжижает. Молоко не свертывает.

Однако аденилатдезаминазная активность известных продуцентов недостаточно высокая. Кроме того, из-за низкой активности ферментов целлюлазного комплекса этот продуцент (прототип) способен расти только на ограниченном числе крахмал-содержащих субстратов и обладает некоторой, хотя и сравнительно низкой патогенностью при внутрибрюшинном введении его спорами.

Цель изобретения – получение нового высокоактивного штамма *Penicillium lanoso-viride* Б – продуцента аденилатдезаминазы.

Штамм получен из исходного штамма *Penicillium lanoso-viride* 8Д путем ультрафиолетового мутагенеза и отобран по измененным культуральным признакам и повышенной аденилатдезаминазной активности (Табл. I).

Таблица I

Сравнительная характеристика аденилатдезаминазной активности у исходного и мутантных штаммов *Penicillium lanoso-viride*.

Название штамма	Культуральные признаки	Активность АДА МЕ/мл среды ⁺
<i>P. lanoso-viride</i> 8Д	Серо-зеленая окраска колоний	0,80
<i>P. lanoso-viride</i> МС	Более светлая окраска колоний, споруляция замедлена	-
<i>P. lanoso-viride</i> Т	Окраска колоний темнее, чем у исходного штамма.	0,02
<i>P. lanoso-viride</i> Б	Белая окраска колоний	1,32

+ – аденилатдезаминазная активность определялась модифицированным спектрофотометрическим методом по изменению абсорбции в процессе дезаминирования производных аденина при 240 и 265 нм длины волны (5).

За единицу активности (МЕ) принимается количество фермента, дезаминирующего 1 мкМ субстрата за 1 мин. при 37°C в 0,05 М фосфатном буфере pH 6,0.

Определение активности проводилось на 3-и сутки роста грибов на сусло-агаре.

Штамм *Penicillium lanoso-viride* Б хранится в коллекции музея культур на кафедре физиологии растений и микробиологии биологического ф-та ЛГУ им. П. Стучки.

Предлагаемый штамм имеет следующую характеристику.

Культуральные признаки: В среде Чапека колонии ограниченно растущие, пушистые, белого цвета на протяжении всего периода вегетации. При постоянном встряхивании в жидкой среде гриб растет в виде овальных или круглых шариков различной величины (от 2–3 мм до 1,0 см) или тяжей (вблизи стенок сосуда для выращивания). При стационарном росте на жидких средах образует белую пленку на поверхности среды.

Морфологические признаки: Кисточки обычно трехъярусные, состоят из веточек, метул и стеригм, несимметрические с конидиальными цепочками 30–80 мкм длиной. Конидиеносцы шероховатые, изменчивые по длине, иногда сплетающиеся, 100х600х3 мкм; веточки 14–18х3 мкм; метулы образуются на различных углах веточки по 2–3, 10хх2,5 мкм. Конидии шаровидные, 3–5 мкм в диаметре, гладкие.

Физиологические признаки: Ассимилирует глюкозу, галактозу, ксилозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, арабинозу, крахмал, глицерин, маннит, усваивает минеральный азот в нитратной и аммонийной формах, восстанавливает нитриты, свертывает молоко, обесцвечивает фотопленку, разрушая желатиназный слой. При выращивании на жидких и плотных питательных средах продуцирует аденилатдезаминазу, ферменты целлюлазного комплекса, а также рибонуклеазы.

Пример 1. 0,3 мл суспензии конидий недельной культуры, выращенной на сусло-агаре засеивается в среду следующего состава: (в г/л): NaNO_3 – 3,0; K_2HPO_4 – 1,0; MgSO_4 – 0,15; KCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 8,8; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,4; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,15; бура – 0,1; молибдат аммония – 0,05; pH среды – 5,0. Гриб выращивается на чашках Петри с объемом среды – 10 мл в течение 7 суток. Активность определяется в мицелии и выражается в МЕ на 1 мл среды. Для этого мицелий и верхний слой агаризованной среды отделяется и экстрагируется двойным объемом 0,1 М фосфатного буфера, pH 6,0. Активность аденилатдезаминазы у предлагаемого штамма *Penicillium lanoso-viride* Б на 8% выше, чем активность штамма прототипа.

Пример 2. 0,3 мл суспензии конидий, приготовленной по примеру 1 высевается на чашки Петри с сусло-агаром. Гриб выращивается в термостате при 28°C в течение 3–4 суток, после че-

го мицелий отделяется от среды и экстрагируется как описано в примере I. Активность аденилатдезаминазы определяется в экстракте мицелия. Уровень активности фермента у предлагаемого штамма на 3-и сутки роста на 45% превышает уровень активности прототипного штамма, а на 4-е сутки - на 29,4%.

Пример 3. 0,3 мл суспензии конидий аналогично предыдущим примерам засевают в чашки Петри, содержащие 2 г пшеничных отрубей, смоченных 3-мя мл водопроводной воды. Культура выращивается 3-4 суток при 28°C. Плотный слой образовавшегося мицелия отделяется от среды, промывается 150 мл холодного 0,1 М фосфатного буфера, pH 6,0 и экстрагируется дезинтеграцией в том же буфере. Активность определяется в экстракте мицелия. На 3-и сутки роста уровень активности аденилатдезаминазы штамма *Penicillium lanoso-viride* В превышает активность исходного штамма *Penicillium lanoso-viride* 8Д на 42,9%, а на 4-е сутки роста - на 79%.

Кроме того предлагаемый штамм в описанных условиях обладает уровнем активности ферментов целлюлазного комплекса в 6 раз превышающим таковой у исходного штамма, что открывает перспективу комплексного использования штамма. Активность целлюлаз определяется по методу Мандельс-Вебера (6) с последующей регистрацией восстанавливающих сахаров динитросалициловым реагентом (7).

Предлагаемый штамм характеризуется также более высоким уровнем активности рибонуклеаз, чем у исходного штамма. Активность рибонуклеаз определяется спектрофотометрически по приросту поглощения при 280 нм в кислоторастворимой фракции инкубационной смеси (8).

Таблица 2.

Сравнительная активность гидролитических ферментов штаммов *Penicillium lanoso-viride*.*

Ферменты	ШТАММЫ	
	8Д	В
Аденилатдезаминаза	21,0	100,0
Целлюлазы	16,8	100,0
Протеазы	100,0	14,6
РНКазаы	89,4	100,0

* - Активности ферментов выражены в % от максимальной.

Для проверки вирулентности предлагаемого и прототипного штаммов суспензия спор различной концентрации ($10^5 - 10^{10}$ спор/мл) вводится экспериментальным лабораторным мышам и крысам внутрижелудочно (в/ж) и внутрибрюшинно (в/б), после чего устанавливается средневирulentная доза ($ДВ_{50}$) по результатам гибели животных в течение 15 суток наблюдения (Табл.3)

Таблица 3.

Средневирulentные дозы ($ДВ_{50}$) штаммов *Penicillium lanoso-viride*.

Способ введения	ШТАММЫ	
	<i>P. lanoso-viride</i> 8д	<i>P. lanoso-viride</i> В
Мышам в/ж	$4 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^8$
Мышам в/б	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^8$
Крысам в/ж и в/б	Ед. сл. гибели	$> 10^{10}$

Из приведенных данных следует, что вирулентность предлагаемого штамма на порядок ниже, чем у исходного.

Источники информации, указанные в заявке:

1. Japan 43 - 24478
2. Japan 52 - 31948
3. Japan 52 - 31032
4. А.С. СССР № 782392
5. Ревелиня В. Р. В сб: Использование и трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами. Рига, 1981, с. 74
6. Mandels M.; Weber J. in: Cellulases and Their Application (Coold R. F. ed.). Adv. Chem. Series, Washington, v.95, p. 391, 1969
7. Bottle R., Gilbert G. Analyst, v. 83, № 988, p. 403, 1958
8. Anfinsen C., Redfred R. et al. J. Biol. Chem., v. 207, 201, 1954