

И. ФОДОР, А. С. СОЛОНИН, В. И. ТАНЯШИН,
академик А. А. БАЕВ

МЕХАНИЗМ УПАКОВКИ ДНК В ГОЛОВКУ БАКТЕРИОФАГА λ

Формирование внутриклеточной фаговой ДНК и ее упаковка в фаговую головку в настоящее время является важной проблемой морфогенеза и понимания биологии развития фага. Исследования последних лет показали, что этот процесс происходит как последовательная цепь специфических протеолитических и нуклеазных реакций при участии большинства белковых факторов, имеющих отношение к морфогенезу фага (^{1, 2}). Фаг λ оказался удобным объектом для изучения молекулярных механизмов созревания ДНК вследствие хорошей генетической изученности фага и возможности исследования упаковки ДНК в инфекционные фаговые частицы в системе *in vitro*.

Хромосома фага λ представляет собой двунитевую ДНК с молекулярным весом $31 \cdot 10^6$ дальтон с комплементарными 12-нуклеотидными однонитевыми участками (⁴). В цикле развития фага после заражения клетки фаговая ДНК из линейной формы превращается сначала в кольцевую, затем в полимерную ковалентно сшитую тандемную структуру (⁵). Предполагается, что репликация ДНК происходит по модели Гильберта и Дреслера (⁶). Мономерные формы образуются из полимерных структур на заключительной стадии цикла развития фага (⁷). Нарезание фаговой ДНК при сборке вириона принято называть тер-функцией (⁸), имея в виду специфическое эндонуклеазное расщепление конкатемерной ДНК с образованием мономерной ДНК с липкими концами.

Большой интерес представляет изучение данных процессов в системе *in vitro*. Тендемные полимерные (или конкатемерные) структуры ДНК, которые легко сшиваются полинуклеотидлигазой фага T4 (⁹), можно получить отжигом. Недавно была показана возможность созревания фага λ в бесклеточной системе, если экзогенная ДНК вводилась в форме полимерных агрегатных структур (³). Это дало возможность исследовать процесс нарезания мономерных ДНК и созревание фаговой частицы в системе *in vitro*.

В настоящей работе приведены экспериментальные данные о молекулярных механизмах нарезания и упаковки фаговой ДНК в головку фага с использованием системы бесклеточного экстракта (³) и конкатемерных ДНК, полученных *in vitro* (⁹).

Бесклеточный экстракт получали из *E. coli* HB 1100 (λ Cl857S7). Фаг индуцировали при 45°, и после переноса на 37° развитие фага прекращали на 40-й мин. Чтобы отличить частицы экстракта лизогенной культуры от фаговых частиц, созревших *in vitro*, экзогенную ДНК получали из фага λ i434ct68. Эффективность созревания фаговых частиц определяли на газоне *E. coli* C600 (λ^+). При титровании на перmissive штамме *E. coli* QD5003 титр фага в концентрированном экстракте составлял $9-10 \cdot 10^{10}$ бляшек/мл. Как правило, на перmissive штамме *E. coli* C600 (λ^+) образования негативных колоний фага λ Cl857S7 не наблюдалось, в отличие от гетероиммунного фага λ i434, который на этом штамме эффективно вытитровывался. Об эффективности нарезания ДНК и ее упаковки в головку фага, которые следует рассматривать как неразрывные процессы, судили по числу негативных колоний согласно (³).

Как ранее было показано (³), созревание фага *in vitro* наблюдалось в том случае, если экзогенную ДНК добавляли в виде tandemных форм, соединенных комплементарными парами липких концов. Линейные и циклические мономерные ДНК практически не созревали в инфекционный фаг.

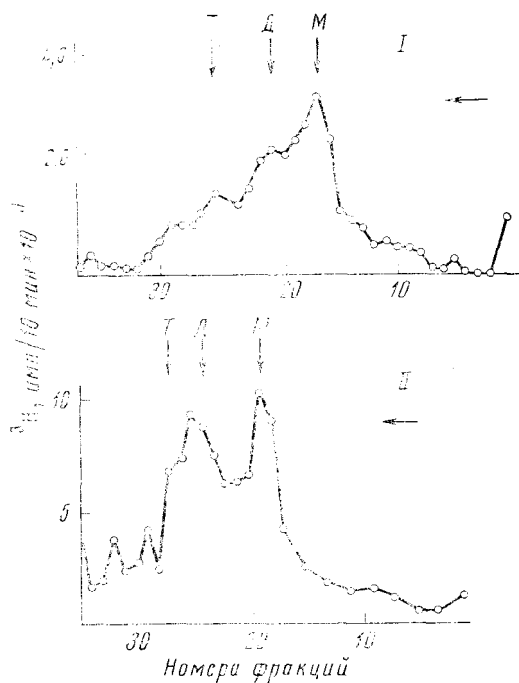


Рис. 1. Фракционирование ковалентно сшитых конкатемерных (I) и димерных (II) форм ДНК фага λ центрифугированием в нейтральном градиенте глицерина. Сбоку стрелкой указано направление седиментации. Для I: ротор CW27, 2500 об/мин, 11 час., 2°, «Spinco» L5-65. Нанесено 50 мкг ^3H -ДНК. Для II: ротор SW41, 3800 об/мин, 6 час., 10°, «Spinco» L5-65. Нанесено 15 мкг ^3H -ДНК. Вертикальными стрелками указано положение мономеров (M), димеров (D) и тримеров (T).

Проведенные нами опыты с конкатемерными формами ДНК, сшитыми и не сшитыми лигазой, показали несущественную разницу двух форм ДНК в их способности к упаковке. Об эффективности упаковки ДНК судили по образованию негативных колоний на 0,1 мкг ДНК. Для линейных мономеров эффективность упаковки была $2,2 \cdot 10^2$, для несшитых конкатемерных форм $1,1 \cdot 10^4$, для ковалентно сшитых конкатемерных форм $0,72 \cdot 10^4$. Эти данные свидетельствуют о том, что в данной системе тер-функция эффективна и с ковалентно сшитыми ДНК. К такому выводу пришел также Сиванен (¹⁰). Контроль за образованием фосфодиэфирных связей в тер-сайтах осуществляли прогреванием при 65°, быстрым охлаждением ДНК, при котором происходит диссоциация нековалентных связей, и последующим нейтральным градиентным центрифугированием. Эффективность лигазной обработки обычно составляла 50—70%.

Нам представлялось важным выяснить минимальную кратность конкатемерных форм ДНК как субстрата тер-функции. Ранее, на основе анализа первичной структуры тер-участка с его характерной поворотной симметрией второго порядка, была предложена модель фермент-субстратного взаимодействия при нарезании ДНК (¹¹). Согласно этой модели минимальным субстратом для нарезания ДНК должен быть tandemный тример. Данные генетических экспериментов подтверждают это предположение (^{12, 13}). Димерные кольцевые ДНК также вписываются в вышеприведенную модель, однако такая форма ДНК на заключительной стадии созревания фага не обнаружена (^{3, 14}).

Чтобы выяснить зависимость эффективности упаковки ДНК в фаг от кратности конкатемерной ДНК, ковалентно сшитые формы ДНК фракцио-

нировали нейтральным градиентным центрифугированием⁽⁹⁾. В результате разделения были получены обогащенные фракции мономеров, димеров, тримеров (рис. 1, I). Иногда удавалось получить ощутимые количества тетрамеров, а между пиком мономеров и димеров — кольцевые мономеры. Центральные фракции отдельных пиков концентрировали 2-пропанолом⁽¹⁵⁾ и ДНК после диализа использовали в опыт. Концентрация ДНК варьировала от 5 до 25 мкг/мл. Повторное центрифугирование отдельных фракций показало, что, как правило, в результате концентрирования профиль ДНК не нарушается и что отдельные пики представляют определенные фракции с примесями, не превышающими 40%. Данные экспериментов показали, что эффективность упаковки ДНК фага λ 434 *in vitro* с мономерами составляла 83 негативных колоний на 0,1 мкг ДНК, с димерами $6,25 \cdot 10^3$, с тримерами $1,44 \cdot 10^4$, с нефракционированной полимерной ДНК $2,75 \cdot 10^4$ и в контроле без ДНК равнялась 0.

Опыты повторяли несколько раз с препаратами ДНК различных разделений. В таблице приведены типичные результаты, полученные в течение дня. Из этих данных очевидно, что с увеличением кратности конкатемерной ДНК повышается эффективность нарезания мономеров (тер-функции). К сожалению, данным методом не представляется возможным получить абсолютные величины эффективности тер-функции отдельных фракций вследствие наличия примесей.

Существенным было выяснить эффективность димеров в данной системе, и с этой целью нами было проведено, полупрепаративное разделение конкатемерных форм, при котором удалось выделить димерные ДНК с относительно малым содержанием примеси соседних фракций (рис. 1, II). Две центральные фракции пика димеров концентрировали и брали в опыт. Сравнение измерений эффективности созревания фага *in vitro* с димерными ДНК данного разделения с измерением эффективности созревания фракции димеров, показанной на рис. 1, не обнаружило существенной разницы.

Таким образом, можно сделать вывод, что в системе *in vitro* минимальный субстрат для тер-функции — димер.

Тримерные формы ДНК, однако, более эффективны в данной системе. Однако и тримеры не давали максимальных величин, полученных с нефракционированными ковалентно спитыми конкатемерными ДНК. По предварительным данным, эффективность тетрамерных форм ДНК примерно равна максимальным величинам. Эффективность упаковки ДНК фага λ 434 *in vitro* с тримерами, тетрамерами и нефракционированной полимерной ДНК составляла $1,2 \cdot 10^4$, $2,0 \cdot 10^4$ негативных колоний на 0,1 мкг ДНК соответственно.

Высокие величины эффективности нефракционированной ДНК в данной системе *in vitro*, по-видимому, объясняются гидродинамическими воздействиями на ковалентно спитые ДНК в процессе градиентного центрифугирования, раскапывания, в результате чего может происходить фрагментация ДНК. Особо чувствительными при этом могут быть те тер-участки, в которых только одна из двух фосфодиэфирных связей была спита лигазой.

Исходя из наших данных, предполагается, что оптимальным субстратом для упаковки ДНК *in vitro* и, по-видимому, *in vivo* является тетрамерная структура ДНК с тремя двунитевыми тер-участками (рис. 2). Тер-

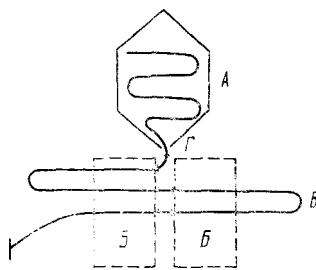


Рис. 2. Модель нарезания и упаковки ДНК в головку фага λ . А — головка фага с упакованной ДНК, Б — белковые факторы, участвующие в нарезании и упаковке ДНК. В — конкатемерная форма ДНК с тер-сайтами Г₁, по которым происходит нарезание

функция, по-видимому, осуществляется ферментом (или ферментами) в комплексе с белковыми факторами и предшественником головки фага.¹ Упаковка ДНК в фаговую головку и тер-функция заканчивается транслокацией ДНК, в результате которой следующий мономерный участок ДНК занимает положение предыдущего и т. д. Таким образом, процесс упаковки ДНК фага напоминает транслокационные процессы при синтезе полинуклеотидной цепи на рибосоме.

Зависимость эффективности тер-функции от кратности конкатемеров ДНК может быть связана с различной прочностью фермент-субстратного комплекса. По-видимому, из димера вообще не может получиться двух фаговых частиц, созревает лишь одна, причем на ее образование оказывает влияние полярность поступления ДНК в головку фага (рис. 2).

Авторы признательны Н. И. Матвиенко, Л. П. Тихомировой за обсуждение работы и О. Красниковой за помощь в экспериментах.

Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов
Академии наук СССР
Пущино Московской обл.

Поступило
26 V 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. Kaiser et al., J. Supr. Str., v. 2, 318 (1974). ² B. Hohn et al., J. Suppl. Str., v. 2, 302 (1974). ³ A. D. Kaiser, T. Masuda, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 260 (1973). ⁴ R. Wu., E. Taylor, J. Mol. Biol., v. 57, 491 (1971). ⁵ E. Young, R. Sinsheimer, J. Mol. Biol., v. 33, 49 (1968). ⁶ W. Gilbert, D. Dressler, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., v. 33, 473 (1968). ⁷ A. G. Mackinly, D. Kaiser, J. Mol. Biol., v. 39, 679 (1969). ⁸ S. Mousset, R. Thomas, Nature, v. 221, 242 (1969). ⁹ И. Фодор и др., Мол. биол., т. 9, 179 (1975). ¹⁰ M. Syvanen, J. Mol. Biol., v. 91, 165 (1975). ¹¹ J. C. Wang, D. P. Brezinski, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 2667 (1973). ¹² L. W. Enquist, A. Skalka, J. Mol. Biol., v. 75, 185 (1973). ¹³ D. Freifelder et al., J. Mol. Biol., v. 83, 503 (1974). ¹⁴ S. C. C. McClure et al., Virology, v. 54, 1 (1973). ¹⁵ D. W. Stafford, D. Bieber, Biochim. et biophys. acta, v. 378, 18 (1975).