

УДК 575.4.113+576.858.9

БИОХИМИЯ

Т. Н. КОПЫЛОВА-СВИРИДОВА, В. В. СУКОВАТИЦЫН, И. ФОДОР,
академик А. А. БАЕВ

ЗАВИСИМОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ДНК БАКТЕРИОФАГА λ ОТ СТРУКТУРЫ «ЛИПКИХ» КОНЦОВ

Известно, что бактериофаг λ , как и многие другие умеренные бактериофаги, имеет «липкие» концы (¹), которые позволяют ему в цикле развития превращаться в циклические и конкатемерные формы, необходимые для процессов репликации, рекомбинации, транскрипции. Целью данной работы было изучение влияния различной степени дифференцированной застройки «липких» концов при помощи ДНК-полимеразы I из *E. coli* на способность молекул ДНК образовывать конкатемерные формы и на их биологическую активность в двух системах инфекционности: трансфекции и трансформации, для которых характерны разные молекулярные механизмы. Исследование поведения молекул ДНК с разной структурой «липких» концов в двух системах биологической активности может дать дополнительные сведения об этих механизмах.

Известно (²), что ДНК-полимераза I из *E. coli* при наличии в реакционной смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и при температуре ниже 20° катализирует так называемый репарационный синтез, который ведет к застройке более коротких в нативной ДНК фага λ 3'-концов. Это приводит к полной или частичной ликвидации «липких» концов в зависимости от наличия в реакционной среде тех или иных дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (¹). ДНК-полимераза I была выделена по описанному методу (³). ДНК-полимеразную реакцию проводили согласно методике Р. Ву (⁴) при 5–7° в течение 5–5,5 час. при концентрации ДНК λ CI_{857} (в ряде опытов меченой по тритию с активностью 19 000 имп/мкг·мин) в пробах 20–30 мкг/мл. Реакцию останавливали охлаждением раствора до 0° и добавлением ЭДТА до 0,01 М. Для дальнейшей работы пробы диализовали в течение ночи против 0,05 М NaCl, 0,01 М трис, 0,001 М ЭДТА, pH 7,5 при 2°. При добавлении в реакционную среду всех четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ) идет полная застройка «липких» концов. Добавление в среду дЦТФ и дГТФ ведет к застройке восьми нуклеотидов правого конца, тогда как левый остается нетронутым. Если же в среде присутствует только дАТФ, то застраивается только один нуклеотид с левого конца и выщепляются два нуклеотида с 3'-конца правой половины (¹). При добавлении в реакционную среду дГТФ и дАТФ застраиваются три нуклеотида справа и три нуклеотида слева.

Вначале мы убедились, что ДНК-полимераза I из *E. coli* в условиях полной и частичной застройки «липких» концов не дает двунитевых разрывов на молекуле ДНК фага λ и не обнаруживает существенной никакой активности.

Агрегацию молекул ДНК проводили в 0,55 М NaCl. Пробы выдерживали 5 мин. при 75°, затем 25 мин. при 50° и сразу помещали в ледяную баню. Центрифугировали в нейтральном градиенте глицерина (⁵). При добавлении в реакционную среду всех четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов ДНК фага λ полностью утрачивает способность к агрегации (рис. 1б). При наличии в реакционной среде дЦТФ и дГТФ (рис. 1в) большая часть молекул ДНК фага λ утрачивает свою способность к агрегации, хотя часть из них способна давать циклические мономеры, димеры и более крупные

конкатемеры уже при таких низких концентрациях ДНК, в каких мы проводили агрегацию. Даже введение в левый «липкий» конец всего одного нуклеотида (рис. 1г) сильно нарушает способность молекул ДНК к агрегации, но не полностью исключает ее. Присутствие двух нуклеозидтрифосфатов (дГТФ и дАТФ) в реакционной среде ведет к еще более полной потере агрегирующей способности у молекул ДНК (рис. 1б). Инфекционную активность ДНК фага λ определяли в CaCl_2 -зависимой системе трансфекции, полученной по Манделю ⁽⁶⁾ и в CaCl_2 -зависимой системе, предварительно зараженной фагом-помощником, — системе трансформации, предложенной в нашей лаборатории ⁽⁷⁾.

Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что в системе трансфекции инфекционная активность ДНК фага λ очень чувствитель-

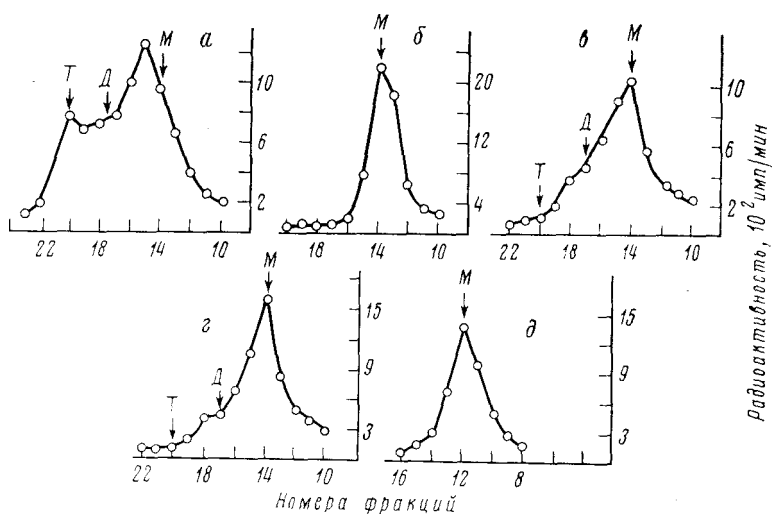


Рис. 1. Зависимость агрегирующей способности молекул ДНК³H фага λ от изменения структуры «липких» концов. а — нативная ДНК; б — в реакционной среде дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ; в — в реакционной среде дЦТФ и дГТФ; г — в реакционной среде дАТФ; д — в реакционной среде дАТФ и дГТФ. Нейтральное градиентное центрифугирование (10–30% глицерин). Ротор SW 50, 10°, 45000 об/мин. L 2-65K. а — г — 2 часа, д — 1 час 45 мин. Раскапывали на 30 фракций. Радиоактивность ³H измеряли в сцинтилляционном счетчике SL-30 Intertechnique. Стрелками указано положение отдельных форм: М — мономеров; Д — димеров, Т — тримеров. Их положение определяли, как указано ранее ⁽⁵⁾

на к изменению структуры «липких» концов. Наименее биологически активны молекулы с полностью застроенными «липкими» концами. Из всех других вариантов застройки наименьшая инфекционность у молекул ДНК, которые обладают наименьшей способностью к агрегации. Что касается системы трансформации, где инфекционность определялась по гену CI ⁽⁷⁾, то и здесь наименьшей трансформирующей активностью обладают молекулы с полностью застроенными «липкими» концами. Молекулы со всеми остальными вариантами застройки «липких» концов по эффективности инфекционности отличаются друг от друга незначительно, хотя их биологическая активность и не превышает 3–3,5% от биологической активности нативной ДНК.

Таким образом, изменение структуры «липких» концов влечет за собой изменение агрегирующей способности молекул ДНК фага λ , приводя к почти полной потере ее. Однако при разных вариантах застройки разное число молекул способно давать циклические и конкатемерные формы. По-видимому, когда частично застроен один «липкий конец», в определенной степени может происходить захлестывание одного конца на другой, несмотря на препятствие застроенного участка. В случае, когда застроены оба «липких» конца, комплементарное захлестывание исключено, что вле-

Таблица 1

Биологическая активность ДНК фага λ с разной структурой «липких» концов в CaCl_2 -зависимой системе инфекционности с фагом-помощником и без фага-помощника *

Дезоксинуклеозидтрифосфат	Без фага-помощника (эффективность инфекционности) **			Средний % эффективности, инфицион. от нативной ДНК	С фагом-помощником (эффективность инфекционности **)			Средний % эффективности, инфицион. от нативной ДНК
	1	2	3		1	2	3	
ДАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ	0	$0,2 \cdot 10^2$	$0,2 \cdot 10^2$	0,08	$1,2 \cdot 10^4$	$3,0 \cdot 10^3$	$7,3 \cdot 10^4$	0,33
дЦТФ, дГТФ	$4,7 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^2$		1,0	$1,6 \cdot 10^5$	$8,3 \cdot 10^4$		2,4
дГТФ, ДАТФ		$0,3 \cdot 10^2$		0,3		$12,3 \cdot 10^4$		3,2
ДАТФ		$3,2 \cdot 10^2$	$1,7 \cdot 10^2$	4,0		$11,6 \cdot 10^4$		3,0
Нативная ДНК ***	$4,3 \cdot 10^4$	$0,9 \cdot 10^4$	$3,7 \cdot 10^4$		$5,9 \cdot 10^6$	$3,9 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^7$	

* 1, 2, 3 — номера опытов.

** Число инфекционных центров на 1 мкг ДНК.

*** В инкубационную смесь не добавляли ДНК-полимеразу I.

чет за собой отсутствие способности к агрегации и циклизации молекул ДНК.

Так как в системе трансфекции биологическая активность молекул ДНК фага λ сильно зависит от их агрегирующей способности, то, по-видимому, развитие фага в этой системе требует сохранения способности к образованию циклических или конкатемерных форм ДНК. Можно предполагать, что остаточная биологическая активность частично застроенных ДНК получается за счет коррекции непрочных комплементарных «липких» концов. Этот процесс может происходить в клетке. В системе трансформации (табл. 1) эффективность инфекционности молекул ДНК с разными вариантами застройки «липких» концов по сравнению с молекулами нативной ДНК выше, чем в системе трансфекции, и мало зависит от того или иного нарушения структуры «липких» концов. Исключение составляют лишь молекулы, полностью лишённые «липких» концов. Это можно объяснить важной ролью рекомбинационных процессов, при которых может идти спасение маркеров дефектных ДНК. При сравнении данных, полученных в двух системах инфекционности (табл. 1), видно, что изменение биологической активности у нативных молекул ДНК и у молекул с полным нарушением структуры «липких» концов при переходе от одной системы к другой разное. Это, вероятно, свидетельствует о том, что путь повышения биологической активности у тех и у других молекул разный.

В системе трансформации трансформирующей активностью обладают фрагменты ДНК фага λ из внутренних участков молекулы, т. е. фрагменты, не обладающие «липкими» концами самой молекулы ДНК (?). Таким образом, молекулы ДНК с нарушенной структурой «липких» концов должны рекомбинировать с ДНК фага-помощника подобно фрагментам ДНК фага λ из внутренних участков молекулы (?). В поведении молекул ДНК полностью застроенными «липкими» концами много общего с поведением указанных фрагментов (?). Последние не инфекционны в системе трансфекции, первые имеют очень низкую биологическую активность. В системе с фагом-помощником наблюдается резкое повышение трансформирующей активности у обоих. Сравнение эффективности инфекционности молекул ДНК $^3\text{H}\lambda\text{Cl}_{857}$ с застроенными «липкими» концами и фрагмента ДНК, несущего область Cl в CaCl_2 -зависимой системе с фагом-помощником, показывает, что трансформирующая активность фрагмента, выраженная числом инфекционных центров на молекулу ДНК

($5,3 \times 10^{-7}$), ниже трансформирующей активности ДНК флага λ ($3,6 \times 10^{-6}$). Но необходимо учитывать, что длина молекулы ДНК флага λ (молекулярный вес 31 мегадальтон) в 6,6 раза больше длины фрагмента, используемого в работе (молекулярный вес 4,7 мегадальтон) ⁽⁸⁾, что должно способствовать более эффективной рекомбинации.

Авторы выражают признательность А. П. Чернову за предоставление фрагмента ДНК флага, Л. П. Тихомировой, Н. И. Матвиенко, В. И. Тяньшину — за обсуждение результатов работы, Г. П. Чупраковой и О. В. Красниковой — за техническую помощь.

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

Поступило
16 VI 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. Wu, E. Taylor, J. Mol. Biol., v. 57, 491 (1971). ² C. C. Richardson, R. B. Inman, A. Kornberg, J. Mol. Biol., v. 9, 46 (1964). ³ H. Schaller et al., Europ. J. Biochem., v. 26, 474 (1972). ⁴ R. Wu, J. Mol. Biol., v. 51, 501 (1970). ⁵ И. Фодор и др., Мол. биол., т. 9, 179 (1975). ⁶ M. Mandel, A. Higa, J. Mol. Biol., v. 53, 159 (1970). ⁷ Т. Н. Копылова-Свиридова и др., ДАН, т. 220, 707 (1975). ⁸ M. Thomas, R. Davis, J. Mol. Biol., v. 91, 315 (1975).