



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.113.5

ПОЛНАЯ ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК  
ТРАНСДУЦИРУЮЩЕГО БАКТЕРИОФАГА  $\lambda$ рlac5

Шпаковский Г. В., Ахрем А. А., Берлин Ю. А.\*

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск;  
\*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР,  
Москва

Генетическая рекомбинация составляет одно из фундаментальных свойств живого. Важными объектами изучения молекулярных механизмов этого процесса являются трансдуцирующие бактериофаги, сконструированные методами молекулярной генетики *in vivo*. Широко известен бактериофаг  $\lambda$ рlac5, несущий в своем геноме фрагмент лактозного оперона *E. coli* (*lac5*-вставку) [1, 2]. Образование этого фага явилось в основном результатом двух независимых рекомбинационных событий: протяженной делеции, в результате которой бактериальный ген *lacI* оказался сочлененным с фаговой ДНК, и аномальной эксцизии профага, которая привела к еще одному соединению обеих ДНК. Ранее мы установили первичную структуру участков эксцизионной рекомбинации [3, 4]. Данная публикация посвящена выяснению нуклеотидной последовательности второго (правого, при стандартной ориентации фагового генома) сочленения фаговой и бактериальной ДНК ( $\lambda$  — *lacI*) в  $\lambda$ рlac5 и, таким образом, установлению полной первичной структуры ДНК этого трансдуцирующего бактериофага.

Мы исходили из ранее сконструированной нами плазмиды рGVS149 [4], которая содержит почти весь сегмент *lac5*, в том числе правое сочленение бактериальной и фаговой ДНК (рис. 1). В этой плазмиде, в отличие от изомерной ей рGVS249 с противоположной взаимной ориентацией векторной и клонируемой частей [4], интересующее нас сочленение и плазмидный участок *ori* находятся в одном и том же *PvuII*-фрагменте. Выделение этого фрагмента и его циклизация под действием ДНК-лигазы привели к плазмиде рGVS53, в которой сочленение расположено между единственным *PvuII*-сайтом и *XbaI*-сайтом, единственным не только в рGVS53, но и в геномах  $\lambda$  и  $\lambda$ рlac5. Далее мы проанализировали по Максаму — Гилберту ряд рестриктных фрагментов, в совокупности охватывающих участок *TaqI/PvuII* ДНК  $\lambda$ рlac5 длиной 720 н.п. (рис. 1). В результате была выяснена структура правого сочленения бактериальной и фаговой ДНК и тем самым завершено выяснение нуклеотидной последовательности ДНК  $\lambda$ рlac5. Оказалось, что эта ДНК содержит 48645 н.п., которые следующим образом распределены между двумя участками фаговой и участком бактериальной ДНК: 19368 ( $\lambda_L$  — левое плечо ДНК  $\lambda$ ) + 3924 (*lac5*; нуклеотиды 4409—486 лактозного оперона по нумерации [5]) + 25353 ( $\lambda_R$  — правое плечо ДНК  $\lambda$ ).

Мы показали, что правая часть ДНК  $\lambda$  в составе  $\lambda$ рlac5 начинается не с 23279-го звена (как ошибочно указывалось ранее [6]), а с 23150-го, т. е. сохранившаяся в составе трансдуцирующего фага часть ДНК  $\lambda$  в действительности на 129 н. п. длиннее. Именно эта часть фагового генома содержит промотор *p<sub>B</sub>L*, который в фагах  $\lambda$  и  $\lambda$ рlac5 может функционировать не

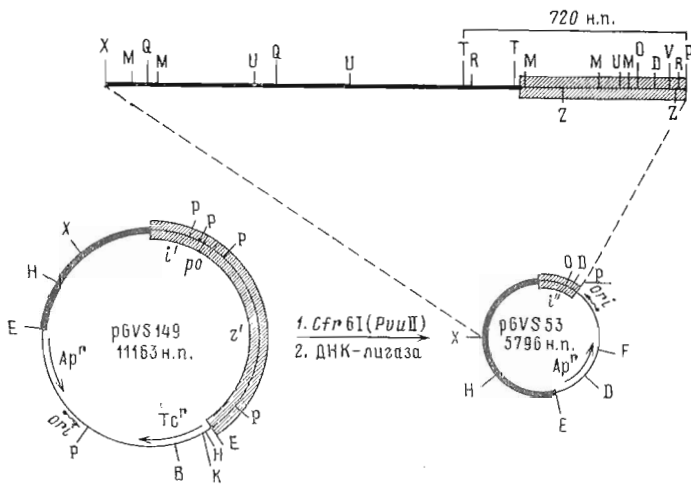
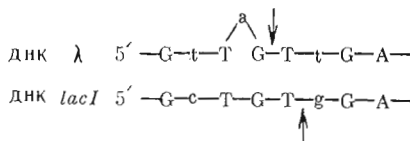


Рис. 1. Конструирование плазмиды pGVS53 и ее использование для локализации сочленения бактериальной и фаговой ДНК ( $\lambda$  — *lacI*) в трансдуцирующем бактериофаге  $\lambda$ plac5. Тонкая, полужирная и заштрихованная линии изображают соответственно участки плазмидной, фаговой и бактериальной ДНК. В — *Bam*III, D — *Hind*II, E — *Eco*RI, F — *Cfr*10I, H — *Hind*III, K — *Kpn*I, M — *Msp*I, O — *Eco*RV, P — *Pvu*II (*Cfr*6I), Q — *Sph*I (*Pae*I), R — *Eco*RII (*Mva*I), T — *Taq*I, U — *Sau*3AI, V — *Ava*II, X — *Xba*I, Z — *Hae*III (сайты O, D и F указаны только в составе pGVS53)

только *in vitro* [7], но, по-видимому, также *in vivo* [8]; наличие этого промотора в ДНК  $\lambda$ plac5 мы доказали прямым определением нуклеотидной последовательности. В соответствии с этими результатами установлено, что фаговый локус *Ea47*, в пределах которого расположено правое сочленение ( $\lambda$  — *lacI*), в составе  $\lambda$ plac5 содержит открытую рамку считывания, соответствующую 305 аминокислотным остаткам (вместо 410 в белке *Ea47* фага  $\lambda$  [9]), причем только 256 из них совпадают с последовательностью в фаге  $\lambda$ ; рамка завершается в гене *lacI* стоп-кодоном TAG, который дополнен рядом расположенным еще одним терминирующим кодоном TAA. Гораздо более длинным, чем предполагалось ранее [10], оказался сохранившийся в составе  $\lambda$ plac5 дистальный участок гена *lacI*, кодирующий 224 C-концевых аминокислотных остатка *lac*-репрессора из общего числа 360. Именно с этим связана способность  $\lambda$ plac5 комплементировать целый ряд мутаций (в том числе протяженных делеций) в дистальной части гена *lacI* [2, 11, 12].

Сопоставление выясненной нами структуры правого сочленения ( $\lambda$  — *lacI*) с первичными структурами соответствующих участков ДНК фага  $\lambda$  [9] и бактериального гена *lacI* [13] (рис. 2) показало, что кроссинговер является реципрокным, не сопровождаясь добавочными перестройками взаимодействующих геномов, и происходит в результате взаимодействия следующих участков, обладающих определенной степенью гомологии (стрелки указывают места разрывов родительских ДНК):



Участок кроссинговера в составе гена *lacI* содержит сегмент GCTGTGG, напоминающий по первичной структуре горячие точки рекомбинации Chi (GCTGGTGG) [14]. Более того, он фланкирован последовательностями, имеющими гомологию с непосредственным окружением присутствующего в фаге  $\lambda$ plac5 истинного Chi-сайта — *chi*<sup>+</sup>*lacZ* [15] (см. рис. 2). Chi-подобные структуры обнаружены нами также в других участках так называемых незаконных рекомбинаций, в частности при образовании делеций в гене *lacI* [16, 17], а также в участке аномальной эксци-

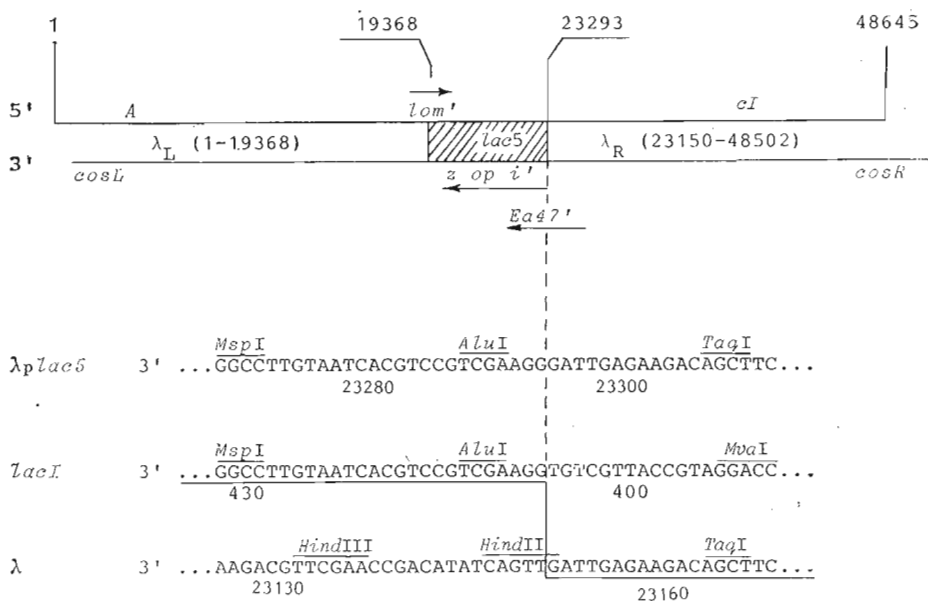


Рис. 2. Структура участков рекомбинации, приводящей к сочленению  $\lambda$  —  $lacI$  (изображены смысловая цепь бактериальной и гомологичные ей цепи фаговых ДНК) и схема генома  $\lambda_{plac5}$  (в верхнем ряду приведена нумерация нуклеотидов в ДНК  $\lambda_{plac5}$ ; границы  $\lambda_L$  и  $\lambda_R$  указаны в соответствии с нумерацией генома фага  $\lambda$  [9])

зии фага  $\lambda_{plac5}$  [4]. Постулированная нами ранее активность  $\text{Chi}$ -подобных структур в рекомбинации [4, 17] недавно подтверждена экспериментально: так, последовательность GCTaGTGG (ср. приведенную выше зону кроссинговера) проявляет 38% активности истинных  $\text{Chi}$ -сайтов [18].

Мы полагаем, что оба рекомбинационных события при образовании трансдуцирующего бактериофага  $\lambda_{plac5}$  осуществлялись RecBC-системой *E. coli* с участием  $\text{Chi}$ -сайтов и  $\text{Chi}$ -подобных структур. По-видимому, эту систему можно рассматривать как универсальный генератор протяженных делеций в бактериальной клетке (см. [4, 17]). Вместе с тем, сравнивая установленные нами структуры участков аномальной эксцизии, при которой выщеляется функционально значимая молекула — фаговая ДНК, и участков образования протяженной делеции, приводящей к сочленению  $\lambda$  —  $lacI$ , следует отметить, что аномальная эксцизия требует большей степени гомологии между взаимодействующими нуклеотидными последовательностями (т. е. более сайт-специфична), чем протяженная делеция. Насколько общим является это правило, покажут дальнейшие структурные исследования на трансдуцирующих бактериофагах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Shapiro J., MacHattie L., Eron L., Ihler G., Ippen K., Beckwith J. Nature, 1969, v. 224, № 5221, p. 768—774.
2. Ippen K., Shapiro J. A., Beckwith J. R. J. Bacteriol., 1971, v. 108, № 1, p. 5—9.
3. Шпаковский Г. В., Берлин Ю. А. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 5, с. 711—713.
4. Shpakovski G. V., Berlin Yu. A. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 17, p. 6779—6795.
5. Nucleotide Sequences 1984. Oxford: IRL Press, 1984, Part 2, p. BACT 43—45.
6. Daniels D. L., Schroeder J. L., Szybalski W., Sanger F., Coulson A. R., Hong G. F., Hill D. F., Petersen G. B., Blattner F. R. In: Lambda 11/Eds Hendrix R. W., Roberts J. W., Stahl F. W., Weisberg R. A. CSHL Press, 1983, p. 584.
7. Rosenfold E. C., Calva E., Burgess R. R., Szybalski W. Virology, 1980, v. 107, № 2, p. 476—487.
8. Luk K. C., Mark K. K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 89, № 1, p. 64—70.
9. Sanger F., Coulson A. R., Hong G. F., Hill D. F., Petersen G. B. J. Mol. Biol., 1982, v. 162, № 4, p. 729—773.
10. Dickson R. C., Abelson J., Barness W. M., Reznikoff W. S. Science, 1975, v. 187, № 4171, p. 27—35.
11. Miller J. H. In: The Operon /Eds Miller J. H., Reznikoff W. S. CSHL Press, 1978, p. 56, 57, 61.

12. Gronenborn B. *Molec. Gen. Genet.*, 1976, v. 148, № 3, p. 243—250.
13. Farabaugh P. J. *Nature*, 1978, v. 274, № 5673, p. 765—769.
14. Smith G. R., Kunes S. M., Schultz D. W., Taylor A., Triman K. L. *Cell*, 1981, v. 24, № 2, p. 429—436.
15. Triman K. L., Chatteraj D. K., Smith G. R. *J. Mol. Biol.*, 1982, v. 154, № 2, p. 393—398.
16. Albertini A. M., Hofer M., Calos M. P., Miller J. H. *Cell*, 1982, v. 29, № 2, p. 319—328.
17. Шпаковский Г. В. Структура и механизм образования трансдуцирующего бактериофага  $\lambda plac5$ . Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. М.: ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР, 1985, 24 с.
18. Cheng K. C., Smith G. R. *J. Mol. Biol.*, 1984, v. 180, № 2, p. 371—377.

Поступило в редакцию  
24.XII.1985

## THE TOTAL PRIMARY STRUCTURE OF THE TRANSDUCING BACTERIOPHAGE $\lambda plac5$ DNA

SHPAKOVSKI G. V., AKHREM A. A., BERLIN Yu. A.\*

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the  
Byelorussian SSR, Minsk; \*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic  
Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

In studying molecular mechanisms of specialized transduction, primary structure of the junction between the *E. coli* gene *lacI* and the  $\lambda$  phage locus *Ea47* in transducing bacteriophage  $\lambda plac5$  has been established. Along with the  $\lambda$  DNA and *E. coli lac* operon structures as well as with our earlier data on another phage-bacterial junction in  $\lambda plac5$ , it lead to the complete sequence of  $\lambda plac5$  DNA, including the *lac5* substitution, a well-known segment of lambdaoid cloning vehicles. The  $\lambda plac5$  DNA is shown to consist of 48645 b. p. distributed as follows: 19368 ( $\lambda$  left arm) + 3924 (*lac5* substitution) + 25353 ( $\lambda$  right arm). The presence of the phage  $p_{bL}$  promoter near to the right end of the *lac5* insert is shown. The *lacI* gene distal end in  $\lambda plac5$  proved to be considerably more long-stretched than it used to be believed, coding for 224 C-terminal amino-acid residues of lac repressor. The recombination studied in this paper, similarly to the abnormal prophage excision, occurred near to a Chi-like structure, which is partly homologous to the *chi<sup>+</sup>lacZ* site present in  $\lambda plac5$ . On the basis of the data obtained, a key role of the *E. coli* RecBC system and Chi sites in the formation of long-stretched deletions in the bacterial cell has been suggested.