



УДК 577.21 : 578.81

© 1990 г.

А. А. Раудоникене, Р. Г. Нивинскас

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ НАЛИЧИЯ ТЕРМИНАТОРА ТРАНСКРИПЦИИ
В УЧАСТКЕ ДНК ЗА ГЕНОМ 31 БАКТЕРИОФАГА Т4

Институт биохимии АН ЛитССР, Вильнюс

В опытах *in vitro* с использованием немодифицированной РНК-полимеразы *E. coli* и рестриктных фрагментов ДНК бактериофага Т4 на генетической карте фага были локализованы 31 сильный ранний промотор фага и 14 р-независимых терминаторов транскрипции [1, 2]. Одной из таких ранних областей генома является участок с геном 31 (рис. 1), содержащий промоторы в положении 134,4 и 131,7 т. п. о. карты фага, с которых индуцированные *in vitro* транскрипты терминируются за геном 31 в положении 128,6 т. п. о. [2]. Наличие раннего промотора как перед геном *alc* в положении 134,4 т. п. о. [3], так и за геном *pseT* в положении 131,4 т. п. о. [4] было подтверждено при секвенировании этих генов. В то же время экспрессия генов данной области генома *in vivo* более сложна, поскольку даже при неполном секвенировании этого участка наряду с упомянутыми промоторами были обнаружены ранний промотор фага перед геном *pseT* [4], средний промотор перед геном 31 [5, 6] и даже поздний промотор непосредственно за геном 31 [5]. По-видимому, все эти транскрипты терминируются в том же участке за геном 31, что, естественно, повышает интерес к структуре этого участка терминации транскрипции.

В настоящей работе мы определили нуклеотидную последовательность *BglII/PstI*-фрагмента ДНК фага Т4 методом Сенгера [7]. Стратегия секвенирования изображена на рис. 1. Приведенная на рис. 2 нуклеотидная последовательность содержит, в частности, 75-звенную последовательность между началом *BglII/PstI*-фрагмента и терминирующим кодоном гена 31, определенную нами ранее при секвенировании гена 31 [5].

В установленной последовательности обнаруживаются две короткие открытые рамки считывания ORF 31.-1 и ORF 31.-2 (рис. 2); кодируемые

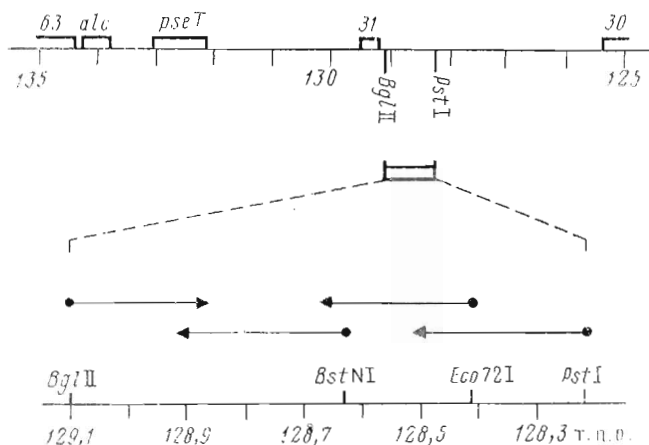


Рис. 1. Локализация *BglII/PstI*-фрагмента ДНК на генетической карте фага Т4 и стратегия его секвенирования

60

P_L
TATAAATAATAATATGAATT GGGTGTCCGGAATAATAAGTT AACCGAACAAATTCATGTGG*

HpaI

120

BglIII
TAGTCTACAAC TGAGAGATC TGTCGAAAGAAGATGAAATT CAGAAGAACGTGACTACCGA*

174

SD ORF 31.-1 \

GTTTTAATCTCTAACGAGAAATTTTAA ATG ATT AAA CAA TTA CAA CAC GCT CTT*
Met Ile Lys Gln Leu Gln His Ala Leu
222

GAA CTG CAA CGA AAC GCA TGG AAT AAT GGT CAC GAA AAC TAT GGC GCA*
Glu Leu Gln Arg Asn Ala Trp Asn Asn Gly His Glu Asn Tyr Gly Ala
270

TCT ATT GAT GTT GAA GCC GAA GCT CTT GAA ATC CTG CGT TAT TTC AAA*
Ser Ile Asp Val Glu Ala Glu Ala Leu Glu Ile Leu Arg Tyr Phe Lys
318

CAT CTG AAT CCT GCT CAA ACT GCA TTA GCT GCT GAG CTT CAG GAA AAA*
His Leu Asn Pro Ala Gln Thr Ala Leu Ala Ala Glu Leu Gln Glu Lys
366

GAT GAA CTT AAA TAT GCT AAG CCT CTG GCT TCT GCT GCA CGA AAA GCA*
Asp Glu Leu Lys Tyr Ala Lys Pro Leu Ala Ser Ala Ala Arg Lys Ala
418

GTT CGT CAC TTT GTG GTA ACA CTG AAG TAA TTTATTGGAGATTCACTGCCTT*
Val Arg His Phe Val Val Thr Leu Lys ---

478

AGTGTGAGCTAAATCGAGGA GCCGTGCAACTGTCTGATTA ATGATTTGCGAATCATTATA*

538

GTTTTAAGACCCCGACAGTT TTACGGTGTACCTCTTGAAT GTGAATGATGACGGGTTTAT*

598

BstNI SD

GGTTATCCTGGTGGTAAAT ATCCAAAAACCTATGTTCCG CTTGAGGGCTTGCCGAGGCA*

ORF 31.-2 \

646

ATG CCA ATA AGT CCT GCA TTT TCA TTT AAA AGA GAA TTT ATA ATG GCA*
Met Pro Ile Ser Pro Ala Phe Ser Phe Lys Arg Glu Phe Ile Met Ala
694

AAA CAA GCT AAA GCA AAG AAA GCA GTT GAA AAG AAA GTT GGT GAT TCT*
Lys Gln Ala Lys Ala Lys Lys Ala Val Glu Lys Lys Val Gly Asp Ser
742

AAA CGC GCT GGC TAC AAG CGT GGG TCG AAC TCT CGT ATC AAT CAA ACT*
Lys Arg Ala Gly Tyr Lys Arg Gly Ser Asn Ser Arg Ile Asn Gln Thr
790

Eco72I

GTT GAG AAG ATC ATG CGC CGA GCA CGT GCG GTT CTT CGA GAT GAT GCT*
Val Glu Lys Ile Met Arg Arg Ala Arg Ala Val Leu Arg Asp Asp Ala
843

TCT CGT TTT GGT AAG CAG AAA GCA TAA GTTGAGGACTCCTTCGGGAGTCCTTT*
Ser Arg Phe Gly Lys Gln Lys Ala ---

903

-35 P_E -10

TTTATTTTCCAAAGATTGCA CAAAGTTGTTTACAGTATAG TTCCTTTGTGATAGTATTA*

955

SD PstI

CTTACACAAACAAGGAGAAATAAA ATG AAA ACG ATT AAT CTG AAC GCT GCA G*

G

Met Lys Thr Ile Asn Leu Asn Ala Ala

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность участка ДНК фага Т4 между терминирующим кодоном гена 31 и PstI-сайтом. Подчеркнуты некоторые рестриктивные сайты и последовательности Шайн—Далга рю (SD). Обведены специфические последовательности раннего и позднего промоторов фага. Стрелками отмечены инвертированные повторы терминатора транскрипции

ими полипептиды содержат 82 и 72 аминокислотных остатка и имеют молекулярную массу 9,31 и 8,15 кДа соответственно. Экспрессия этих двух выявленных генов на поздних стадиях размножения фага, по-видимому, происходит с инициацией транскрипции с позднего промотора (P_L), локализованного за геном 31. За геном ORF 31.-2 локализованный участок имеет структуру, типичную для ρ -независимых терминаторов транскрипции [8], а именно: протяженные инвертированные повторы формируют шпильку в мРНК, за которой следует сегмент олиго-U. Вычисленное значение свободной энергии $\Delta G = -44,0$ кДж/моль [9] указывает на высокую стабильность этой вторичной структуры мРНК. За терминатором транскрипции локализован довольно типичный ранний промотор (P_E) фага, с которого, по-видимому, и иницируется синтез полицистронной мРНК, терминирующийся за геном 30 [2].

Обращает на себя внимание тот факт, что петля обнаруженной шпильки состоит из нуклеотидной последовательности UUCG, которая, как было недавно показано [10], придает необычайно высокую стабильность шпилькам, имеющим структуру $(x)_2\text{-}_8\text{CUUCG}(y)_{2\text{-}8}$. До настоящего времени при анализе известных нуклеотидных последовательностей общей длиной в 55 т. п. о., составляющих треть генома фага T4, выявлено 12 таких шпилек, причем в большинстве случаев они локализованы в межцистронных участках мРНК [10]. И хотя как в случае фага T4, так и в случае ряда других организмов эти шпильки могут выполнять различные функции [10], некоторые из них, по крайней мере шпильки, локализованные за геном 23 [11] и геном *soc* [12] фага T4, играют роль терминаторов транскрипции. При этом наиболее интересным представляется наличие существенного структурно-функционального сходства между терминатором за геном *soc* и выявленным нами терминатором за геном ORF 31.-2. В обоих случаях происходит терминация нескольких ранних и одного позднего транскрипта фага, т. е. терминируется транскрипция, проводимая как немодифицированной, так и модифицированной РНК-полимеразой *E. coli*. Непосредственно за терминатором локализован ранний промотор фага, поэтому терминация транскрипции должна быть достаточно строгой, чтобы поздние транскрипты не переходили в область ранних генов. Следует подчеркнуть, что нуклеотидные последовательности этих двух терминаторов практически совпадают: они различаются лишь первым нуклеотидом из 22, формирующих структуру шпильки. Таким образом, приведенные данные позволяют высказать предположение о существовании специфических нуклеотидных последовательностей, характерных для определенного типа терминаторов транскрипции бактериофага T4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kutter E., Ruger W. // Bacteriophage T4 / Eds Mathews C. K., Kutter E. M., Mo-
sig G., Berger P. B. Washington, D. C.: Amer. Soc. Microbiol., 1983. P. 277—290.
2. Gram H., Liebig H.-D., Hack A., Niggemann E., Ruger W. // Molec. Gen. Genet.
1984. V. 194. № 1/2. P. 232—240.
3. Kutter E., Drivdahl R., Rand K. // Genetics. 1984. V. 108. № 2. P. 291—304.
4. Midgley C. A., Murray N. E. // EMBO J. 1985. V. 4. № 10. P. 2695—2703.
5. Нивинская Р. Г., Блэк Л. У. // Молекулярн. биология. 1988. Т. 22. № 6.
С. 1507—1516.
6. Нивинская Р. Г., Раудоникене А. А., Гилд И. // Молекулярн. биология. 1989.
Т. 23. № 3. С. 739—749.
7. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74.
№ 12. P. 5463—5467.
8. Rosenberg M., Court D. // Ann. Rev. Genet. 1979. V. 13. P. 319—353.
9. Freier S. M., Kierzek R., Jaeger J. A., Sugimoto N., Caruthers M. H., Neilson T.,
Turner D. H. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 24. P. 9373—9377.
10. Tuerk C., Gauss P., Thernes C., Groebe D. R., Gayle M., Guild N., Stormo G., d'Au-
benton-Carafa Y., Uhlenbeck O. C., Tinoko I., Brody E. N., Gold L. // Proc. Nat.
Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 5. P. 1364—1368.
11. Parker M. L., Christensen A. C., Boosman A., Stockard J., Young E. T., Doer-
mann A. H. // J. Mol. Biol. 1984. V. 180. № 3. P. 399—416.
12. Macdonald P. M., Kutter E., Mosig G. // Genetics. 1984. V. 106. № 1. P. 17—27.

Поступило в редакцию
24.IX.1989

A. A. RAUDONIKIENE, R. H. NIVINSKAS

CONFIRMATION OF TRANSCRIPTION TERMINATION SITE
DOWNSTREAM FROM GENE 31 OF BACTERIOPHAGE T4

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Lithuanian SSR, Vilnius

Two open reading frames followed by a ρ -independent transcription terminator and early promoter were established in a sequenced region downstream from gene 31 of T4 phage. The mRNA hairpin suggested by the terminator sequence has the structure $(x)_s\text{CUUCGG}(y)_s$, the loop sequence UUCG having been shown [10] to significantly stabilize RNA hairpins.