



УДК 547.963.32.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ФРАГМЕНТА ДНК  
БАКТЕРИОФАГА 434, СОДЕРЖАЩЕГО ПРОМОТОРЫ  $P_R$  И  $P_{gm}$   
ОПЕРАТОР  $O_R$  И N-КОНЦЕВЫЕ ЧАСТИ ГЕНОВ  
РЕПРЕССОРОВ  $CI$  И  $cro$

Баев А. А., Захарьев В. М., Краев А. С., Скрыбин К. Г.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

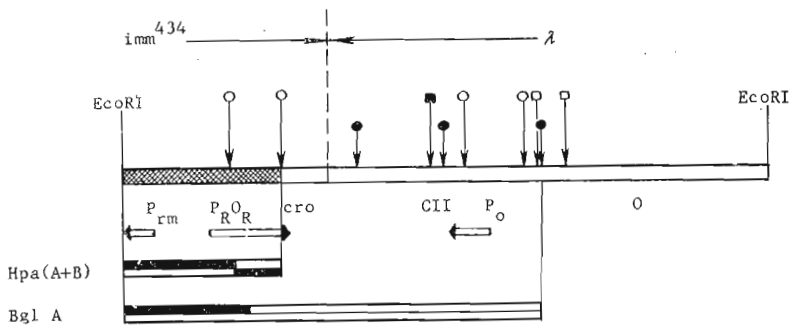
Монастырская Г. С., Свердлов Е. Д., Овчинников Ю. А.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Значительный вклад в современные представления о путях регуляции транскрипции внесли исследования умеренного бактериофага  $\lambda$  [1]. ДНК этого фага содержит гены двух репрессорных белков. Один из них, продукт гена  $CI$ , необходим при лизогенном способе существования фага. Другой репрессор, кодируемый геном  $cro$ , напротив, необходим для литического развития фага. Оба репрессора выполняют свои функции, связываясь с  $O_L$ - и  $O_R$ -операторами. При действии репрессора  $CI$  блокируются два ранних промотора  $P_L$  и  $P_R$ , каждый из которых частично перекрывается с соответствующим оператором. Транскрипция гена  $CI$  в лизогенном состоянии инициируется промотором  $P_{gm}$  и регулируется  $CI$ -репрессором.

Сейчас уже установлены первичные структуры промоторов и операторов [2—8] и структуры репрессоров  $CI$  и  $cro$  фага  $\lambda$  [7, 9—11]. Значительная информация получена также о функциональной структуре регуляторных участков ДНК фага  $\lambda$  и о способах их взаимодействия с соответствующими белками [6—8, 12, 13]. Ближайшим родственником фага  $\lambda$  является лямбдоидный фаг 434 [1], развитие которого, по-видимому, феноменологически не отличается от развития фага  $\lambda$ . Для ответа на вопрос, соответствует ли тесному функциональному родству столь же тесная структурная аналогия, нами предпринято исследование структуры регуляторных областей фага 434.

В данной статье публикуется структура участка ДНК из области иммунности фага 434, длиной 310 пар оснований, который содержит  $O_R$ -оператор,  $P_R$ - и  $P_{gm}$ -промоторы и N-концевые части генов репрессоров  $CI$  и  $cro$ . Ранее мы сообщали о выделении фрагмента ДНК гибридного фага  $\lambda imm^{434}$ , содержащего  $P_O$ -промотор и образующегося в результате расщепления целой ДНК рестрикционной эндонуклеазой *EcoRI* [14]. Часть этого фрагмента содержит правую часть области иммунности фага 434, другая часть — гены  $CI$ ,  $oor$ -РНК и N-концевую часть гена  $O$  фага  $\lambda$ .



Физическая карта фрагмента ДНК  $\lambda imm^{434}$  [14], содержащего правую часть области иммуности фага 434. Стрелками указаны точки расщепления различными рестриктазами:  $\circ$  — *HpaII*,  $\bullet$  — *TaqI*,  $\square$  — *BglII*,  $\blacksquare$  — *HindII*. CII, O и *cro* — гены, P — промоторы,  $O_R$  — оператор. Широкие стрелки указывают направление транскрипции с соответствующих промоторов. Выделен участок, последовательность которого приведена на схеме. Фрагменты, использованные для определения последовательности, даны отдельно, как разделенные вдоль прямоугольники. Их верхние части соответствуют *l*-цепи, нижние — *r*-цепи ДНК. Затемнены те части цепей, последовательности которых установлены

AATCTTTTGGTTTTTACCCTGGAAGAAATACATCATAAGCCACCTCTGTTATTTACCCCAAATCTTCACA-  
 TTAACA AAAACGAAAAATGGGACSTTTTATGCACTATTCCGTGGAGACAATAAATCGCGGTTAGAAAGTGT-  
 IleArgLysSerLysValArgSerSerIleSerFMet \*\*\*\*\*

-AGAAAACTGTATTGACAAACAGATACATTGTATCAAAATACAAAGAACTTTGTTGATGGAGCGGATA-  
 -TCTTTTTCAGATAAACTGTTTGTCTATGTAACATATTTTATGTCTTTCAAAACAACCTACCTCCGCTAT-

FMetGlnThrLeuSerGluArgLeuLysLysArgArgIleAlaLeuLysMetThrGlnThrGluLeuAlaThr-  
 -TCAAACTCTTTCTCAACCGCTCAAGAAAGAGCGAATTCCGTTAAAGATGACGCAACCGCAACTGGCAAC-  
 -ACGTTTGAGAAAGACTTGGCGGATTCTTCTCCGCTAACGCAATTTTACTCGCTTTGGCTTGACCGTGT-

-LysAlaGlyValLysGlnGlnSerIleGlnLeuIleGluAlaGlyValThrLysArgProArgPheLeu-  
 -CAAACCGCTGTAAACAGCAATCAATTCAACTGATTGAAGCTGGACTAACCAACCGACCGCCTCTCTTG-  
 -CTTTCGGGCACAATTTCTGTTAGTTAAGTTGACTAAGTTCGACCTCATTGGTCTGGCGCGCAAGAAC-  
 HpaII

-PheGluIleAlaMetAlaLeuAsnCys  
 -TTTGAGATTGCTATGGCGCTAACTGT  
 -AAACTTAACGATACCCGCAATTGACA

#### Последовательность выделенного на рисунке участка

Верхняя цепь соответствует *l*-, а нижняя — *r*-цепям ДНК. Зигзагом указано место расщепления рестриктазой *HpaII*. Подчеркнуты инициаторные кодоны. Звездочками отмечены нуклеотиды в последовательностях, комплементарных 3'-концевому участку 16S-рибосомальной РНК. Стрелкой указано начало и направление транскрипции с промотора  $P_R$ . В рамки взяты последовательности, обладающие осью симметрии второго порядка. FMet — N-формилметионин

На рисунке приведена карта его расщепления различными рестриктазами.

Для определения последовательности использованы левый концевой фрагмент *BglA*\* и полученный при ограниченном расщеплении рестриктазой *HpaII* фрагмент *Hpa(A+B)*. Концевые группы исходного *EcoRI*-фрагмента метили  $^{32}P$  с помощью полинуклеотидкиназы, фрагмент расщепляли *BglII* и выделяли левый концевой меченый участок. Последовательность 5'-концевой части его *l*-цепи определяли методом Максама и Гилберта [15] с рядом модификаций [13], используя для определения по-

\* Для удобства фрагменты обозначаются заглавными буквами в порядке удаления от левого конца *EcoRI*-фрагмента.

ложения пуриновых звеньев частичную апуринизацию муравьиной кислотой [17, 18]. Фрагмент *Hpa*(A + B) содержал [<sup>32</sup>P]фосфатную группу у 5'-концов обеих цепей. Его расщепляли рестриктазой *Hpa*II полностью и полученные фрагменты *Hpa*A и *Hpa*B разделяли. У фрагмента *Hpa*A меченой была *l*-цепь, тогда как фрагмент *Hpa*B оказывался меченым по *r*-цепи. Последовательности этих цепей определяли тем же методом.

Полученная последовательность приведена на схеме. Гипотетические аминокислотные последовательности, соответствующие репрессорам *CI* и *cro* фага 434 выведены, исходя из нуклеотидной последовательности. Критерием для выбора места начала трансляции служило наличие инициаторного кодона АТГ и последовательности, комплементарной 3'-концевой части 16S-рибосомальной РНК [19, 20] вблизи этого кодона. Два таких участка найдены в разных цепях фрагмента. Точка начала транскрипции с промотора  $P_R$  определяется на основании последовательности 5'-концевого участка соответствующей РНК. Подробное обсуждение особенностей структуры участка, расположенного между генами белков *CI* и *cro* и, очевидно, содержащего промоторы  $P_R$  и  $P_{gm}$  и оператор  $O_R$ , будет предметом полного сообщения. Здесь следует отметить, что в отличие от фага  $\lambda$  [3, 4, 7, 8] правая промоторно-операторная область фага 434 не содержит чередующихся G + C- и A + T-богатых участков. Хотя можно выделить несколько участков частичной поворотной симметрии, они не имеют близких последовательностей с соответствующими участками ДНК фага  $\lambda$ . Не наблюдается также выраженных последовательностей Прибно-ва [21], которые, как сейчас предполагается, определяют прочное связывание РНК-полимеразы с промоторами. N-Концевые последовательности белков *CI* и *cro* этих двух фагов заметно различаются. Таким образом, промоторы и операторы фагов 434 и  $\lambda$  имеют сильно различающиеся последовательности, хотя и выполняют одни и те же функции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Herskowitz I. (1973) Annual Rev. Genetics, 7, 289—324.
2. Maniatis T., Ptashne M., Backman K., Kleid D., Flashman S., Jeffrey A., Maurer R. (1975) Cell, 5, 109—113.
3. Walz A., Pirrotta V. (1975) Nature, 254, 118—121.
4. Pirrotta V. (1975) Nature, 254, 114—118.
5. Maniatis T., Jeffrey A., Kleid D. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 1184—1188.
6. Smith G., Eisen H., Reichard L., Hedgpeth J. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 712—716.
7. Ptashne M., Backman K., Humayun M., Jeffrey A., Maurer R., Meyer B., Sauer R. (1975) Science, 194, 156—161.
8. Humayun M. Z., Jeffrey A., Ptashne M. (1977) J. Mol. Biol., 112, 265—277.
9. Roberts T. M., Shimatake H., Brady C., Rosenberg M. (1977) Nature, 270, 274—275.
10. Hsiang M. H., Cole R. D., Takeda Y., Echols H. (1977) Nature, 270, 275—277.
11. Takeda Y., Folkmanis A., Echols H. (1977) J. Biol. Chem., 252, 6177—6183.
12. Humayun M. Z., Kleid D., Ptashne M. (1977) Nucleic Acids Res., 4, 1595—1607.
13. Johnson A., Meyer B., Ptashne M. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 1783—1787.
14. Сverdlov E. D., Монастырская Г. С., Ростаншов В. М. (1978) Биооргани. химия, 4, 894—900.
15. Maxam A., Gilbert W. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 560—564.
16. Скрыбин К. Г., Захарьев В. М., Баев А. А. (1978) Докл. АН СССР, 241, 488—490.
17. Sverdlov E. D., Monastyrskaya G. S., Chestukhin A. V., Budowsky E. I. (1973) FEBS Lett., 33, 15—17.
18. Роробко В. Г., Грачев С. А. (1977) Биооргани. химия, 3, 1419—1422.
19. Shine J., Dalgarno L. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 1342—1346.
20. Steitz J. A., Jakes K. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 4734—4738.
21. Pribnow D. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 784—788.

Поступило в редакцию  
3. VIII.1978

NUCLEOTIDE SEQUENCE OF BACTERIOPHAGE 434 DNA FRAGMENT  
CONTAINING PROMOTERS  $P_R$  AND  $P_{rim}$  OPERATOR  $O_R$  AND N-TERMINAL  
PARTS OF REPRESSOR  $CI$  AND *cro* GENES

BAYEV A. A., ZAHARYEV V. M., KRAYEV A. S., SKRYABIN K. G.,  
MONASTYRSKAYA G. S., SVERDLOV E. D., OVCHINNIKOV Yu. A.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;*  
*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences*  
*of the USSR, Moscow*

The nucleotide sequence of 310 base pairs of bacteriophage 434 DNA has been determined. The sequence includes control elements for the transcription and translation of the genes  $CI$  and *cro*: promoters  $P_R$  and  $P_{rim}$  and operator  $O_R$  together with the ribosome binding sites and N-terminal parts of the genes. There are no similarities in the sequences of this area and corresponding part of phage  $\lambda$  DNA.

---