



УДК 577.113.5

СТРУКТУРА ЗОНЫ РЕКОМБИНАЦИИ ПРИ АНОМАЛЬНОМ  
ИСКЛЮЧЕНИИ ТРАНСДУЦИРУЮЩЕГО БАКТЕРИОФАГА  $\lambda$ plac9

Шпаковский Г. В., Хижина М. П.\*, Берлин Ю. А.\*

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

Среди множества незаконных рекомбинаций, происходящих между разнородными участками ДНК [1, 2], важное место занимают делеции. Иногда исключаемый фрагмент ДНК представляет собой самостоятельную функциональную единицу, как, например, при аномальном исключении трансдуцирующих бактериофагов (ТБФ) из лизогенных бактерий. О структурных особенностях этого процесса до недавнего времени почти ничего не было известно (см., например, [2]). В рамках работ по изучению молекулярных механизмов образования ТБФ мы изучали бактериофаги серии  $\lambda$ plac, сконструированные К. Иппен и др. [3]. Ранее мы установили структурные закономерности эксцизионных рекомбинаций для ТБФ  $\lambda$ plac5 [4—7] и  $\lambda$ plac10 [8, 9]. Настоящая работа посвящена структурному изучению еще одного родственного ТБФ —  $\lambda$ plac9.

Физическое картирование ДНК  $\lambda$ plac9 редкощепящими рестриктазами показало, что она содержит оба *KpnI*-сайта фаговой ДНК (координаты 17 057 и 18 560 по Сенгеру и др. [10]), а также ближайшие к левому концу ДНК фаговые сайты *NcoI* (19 389) и *XmaI* (19 397). Это свидетельствует

Рис. 1. Электрофореграмма продуктов расщепления фаговых ДНК рестриктазой *NcoI* (0,7% агарозный гель): 1 —  $\lambda$ plac10, 2 —  $\lambda$ plac9, 3 —  $\lambda$ plac5, 4 —  $\lambda$ . Сопоставление третьих снизу *NcoI*-фрагментов (дорожки 2—4; ДНК  $\lambda$ plac10 не дает аналогичного фрагмента из-за отсутствия *NcoI*-сайта) иллюстрирует разницу в размерах вставок *lac9* и *lac5*



о том, что левое плечо ДНК  $\lambda$ plac9 длиннее, чем у фагов  $\lambda$ plac10 (*NcoI*-сайт отсутствует) и  $\lambda$ plac5 (сохранен *NcoI*-сайт, но отсутствует *XmaI*-сайт) (рис. 1). В то же время  $\lambda$ plac9 (подобно  $\lambda$ plac5 и  $\lambda$ plac10) содержит бактериальный *EcoRI*-сайт, расположенный в дистальной части гена *lacZ* *lac*-оперона (координата 4302 [11]). Таким образом, сочленение бактериальной и фаговой ДНК, возникшее в результате аномального исключения  $\lambda$ plac9, расположено между этим *EcoRI*- и фаговым *XmaI*-сайтом. Поэтому ДНК  $\lambda$ plac9 мы расщепляли рестриктазой *Cfr9I* (*XmaI*), вводили метку по выступающему 5'-концу CCGG с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) и, наконец, расщепляли *EcoRI*. Полученный *Cfr9I*/*EcoRI*-фрагмент длиной ~950 п. о. (вместо аналогичного фрагмента длиной 1830 п. о. из ДНК фага  $\lambda$ ) (рис. 2) расщепляется рестриктазой *AvaI* на два фрагмента — *Cfr9I*/*AvaI* (~630 п. о.) и *AvaI*/*EcoRI* (~320 п. о.). Это означает, что ДНК  $\lambda$ plac9 содержит *AvaI*-сайт гена *lacY* *lac*-оперона

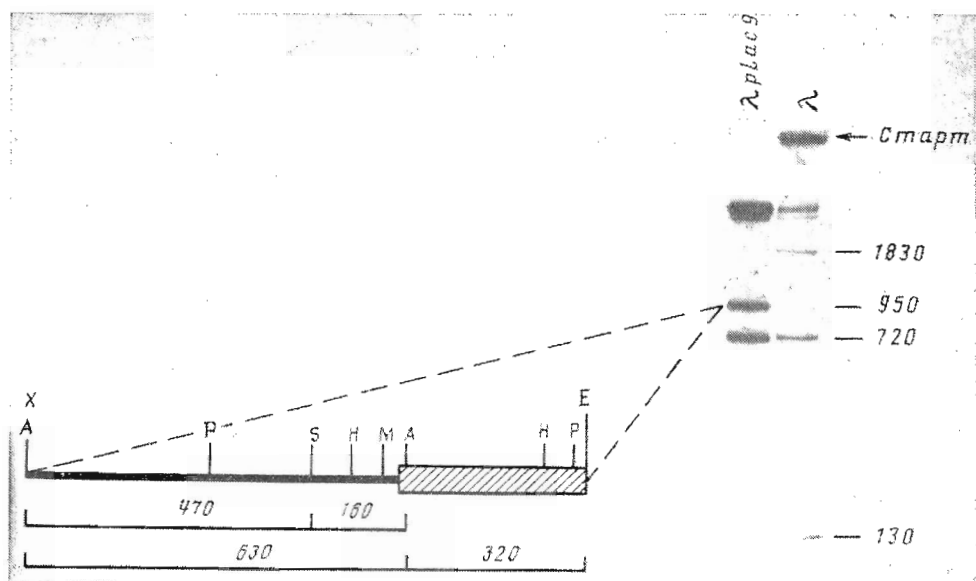


Рис. 2. Локализация зоны аномальной эксцизии в составе ДНК бактериофага  $\lambda$ plac9. Электрофорез в 7% ПААГ *Cfr9I*(*XmaI*) / *EcoRI*-фрагментов ДНК фагов  $\lambda$  и  $\lambda$ plac9 (метка введена по *XmaI*-концу с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) и смеси  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  и  $\text{dGTP}$ ); справа указаны длины образующихся фрагментов (п. о.). Приведена физическая карта *XmaI/EcoRI*-фрагмента ( $\sim 950$  п. о.) ДНК  $\lambda$ plac9, содержащего зону аномальной эксцизии: А — *AvaI*, Е — *EcoRI*, Н — *HaeIII*, М — *MluI*, Р — *PvuII*, S — *Cfr13I* (*AsuI*), X — *Cfr9I* (*XmaI*). Сплошной линией обозначена ДНК фага  $\lambda$ , заштрихованным прямоугольником — ДНК *E. coli*

*E. coli*, так что место сочленения фаговой и бактериальной ДНК не должно находиться в *EcoRI/AvaI*-фрагменте. Далее для структурного анализа места сочленения мы расщепляли ДНК  $\lambda$ plac9 рестриктазой *AvaI*, метили лишние концы полимеразной достройкой с помощью  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$ ,  $\text{dGTP}$  и из 5% ПААГ по методу [12] выделяли *AvaI*-фрагмент длиной  $\sim 630$  п. о., отвечающий упомянутому выше *Cfr9I/AvaI*-фрагменту такой же длины (в случае *XmaI*-сайта рестриктазы *Cfr9I* и *AvaI* являются изошизомерами). При действии на этот фрагмент эндонуклеазой *Cfr13I* (*AsuI*) образуются два фрагмента — длиной 470 и 160 п. о. (рис. 2). Поскольку первый из них образуется также после аналогичных превращений  $\lambda$  ДНК, именно второй, более короткий фрагмент должен содержать интересующую нас зону рекомбинации. Это было доказано секвенированием фрагмента длиной 160 п. о. по Максаму — Гилберту (рис. 3).

Сравнение первичной структуры ДНК  $\lambda$ plac9 в районе перехода фаговой ДНК в бактериальную с соответствующими структурами ДНК фага  $\lambda$  и *E. coli* (см. рис. 3) показывает, что кроссинговер, приведший к образованию  $\lambda$ plac9, не сопровождался какими-либо нарушениями нуклеотидных последовательностей. Необходимо подчеркнуть, что степень структурной гомологии партнеров при эксцизии этого фага существенно ниже, чем для фагов  $\lambda$ plac5 и  $\lambda$ plac10, исключение которых проходило по сходным друг с другом региоселективным механизмам [8, 9]. В самом деле, в случае  $\lambda$ plac9 непосредственно в месте кроссинговера имеются лишь две идентичные в обеих взаимодействующих ДНК пары оснований: (CG)·(GC). Однако этим гомология рекомбинирующих последовательностей, как видно из рис. 3, не ограничивается. Зона кроссинговера включает 24 нуклеотида *lac*-оперона и 23 нуклеотида ДНК фага  $\lambda$ . При оптимальном наложении цепей в левой части зоны из 14 нуклеотидов совпадает 10 (72% гомологии), а в правой части из 10 нуклеотидов совпадает 8 (80% гомологии). В середине зоны в составе бактериальной ДНК содержатся четыре дополнительных звена СААА. Хотя точка перекреста при эксцизии  $\lambda$ plac9 в принципе может находиться в любом из трех положений (на рис. 3 указаны стрелками), мы полагаем, что, вероятнее всего, переход осуществляется рядом

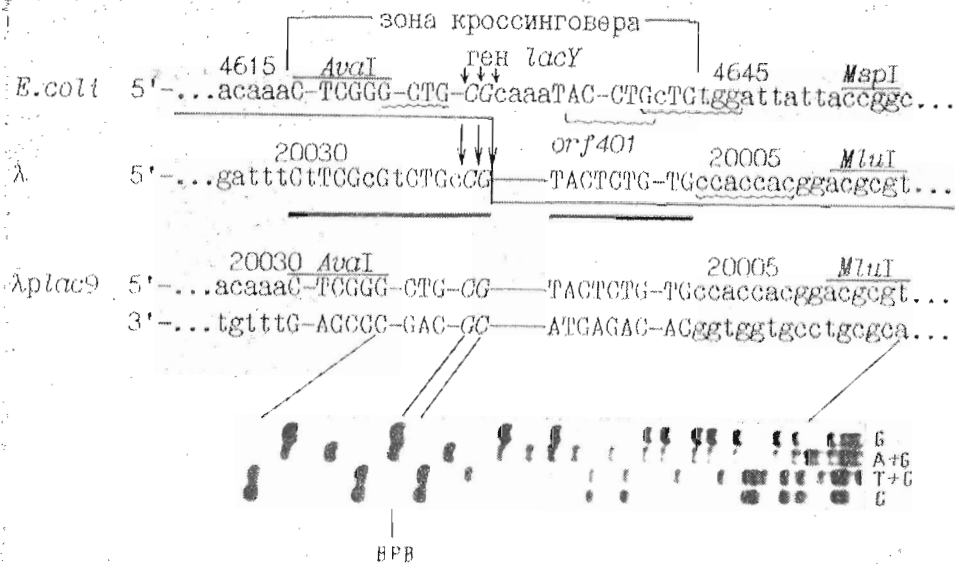


Рис. 3. Первичная структура рекомбинированных партнеров (ДНК  $\lambda$  [10] и ДНК *E. coli* [11]) и продукта эксцизионной рекомбинации (ДНК  $\lambda$ plac9) в районе сочленения бактериальной и фаговой ДНК. Отмечено положение зоны кроссинговера; строчными буквами изображены негомологичные участки ДНК *E. coli* и  $\lambda$ ; курсивом выделен динуклеотид CG, по которому происходит переход бактериальной последовательности в фаговую; стрелки указывают возможные положения точки кроссинговера. Волнистой линией подчеркнуты Chi-подобные последовательности в непосредственной близости к месту кроссинговера. Приведена нумерация нуклеотидов в *lac*-опероне [11], ДНК  $\lambda$  [10] и ДНК  $\lambda$ plac9 (данные настоящей работы). Жирным линиям соответствуют упомянутые в тексте участки гомологии в левой и правой частях зоны кроссинговера. Нуклеотидная последовательность этой зоны получена анализом по методу Максама — Гилберта [12] *AvaI*/*Cir131*-субфрагмента (~160 п.о.) ДНК  $\lambda$ plac9, меченого полимеразной достройкой по *AvaI*-концу смесью  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP, dATP и dGTP (электрофорез в 20% денатурирующем ПААГ; BPB — положение красителя бром-фенолового синего)

с экстразвеньями СААА (в бактериальной ДНК) или экстразвеном С (в фаговой ДНК) (крайние стрелки) в соответствии с представлениями об инициации кроссинговера рядом с экстрапарой оснований в ДНК одного из партнеров и последующей подгонке гетеродуплексов, что было сформулировано на примере эксцизии трансдуцирующего бактериофага  $\lambda$ plac5 [4, 5].

Из схемы конструирования бактериофагов серии  $\lambda$ plac [3] и полученных нами данных сравнительного рестриктоного анализа ДНК фагов  $\lambda$ plac9 и  $\lambda$ plac5 вытекает, что второе сочленение бактериальной и фаговой ДНК (результат делеции NX196 [3]) в составе  $\lambda$ plac9 такое же, как в ДНК  $\lambda$ plac5 [6, 7]. Это означает, что данная работа завершает выяснение первичной структуры ДНК фага  $\lambda$ plac9 (размер генома 49 514 п. о., левое плечо 20 019 п. о., бактериальная вставка *lac9* 4142 п. о., правое плечо 25 353 п. о.).

Относительно ферментов, участвующих в процессе образования лямбдоидных ТВФ, следует отметить, что случай  $\lambda$ plac9 согласуется с предположением об участии в этом процессе системы *RecBCD* [7, 13]. Действительно, в непосредственной близости к точке кроссинговера в обеих взаимодействующих ДНК содержатся участки, несомненно сходные с Chi-сайтом (GCTGGTGG; см. [14]): GaGTGG\*, GGTGG, GTGGTGG (в  $\lambda$  ДНК) и GCTG, GCTGTGG, GtTaGTGa, GtTGGTGG (в ДНК *E. coli*). Кроме того, в гене *lacY* до акта рекомбинации на расстоянии ~ 770 п. о. от точки рекомбинации находился истинный Chi-сайт (координаты 5396—5403 [11]). Этот сайт, не сохранившийся в продукте рекомбинации, т. е. в ДНК  $\lambda$ plac9, мог инициировать соответствующее рекомбинационное событие.

\* Строчными буквами обозначены негомологичные звенья.

Необходимо также отметить наличие в районе кроссинговера ряда последовательностей GTGG, с присутствием которых предположительно связывалось протекание делеционных рекомбинаций [15], хотя ферментативный аспект этого явления остается неясным (см. также [7]).

Наконец, нельзя исключить возможную роль бактериальной топоизомеразы I. Известно [16], что она расщепляет последовательности, содержащие блок (TTT)·(AAA) (именно он находится в непосредственной близости к точке кроссинговера в бактериальном партнере, см. рис. 3), хотя о специфичности такого расщепления пока трудно сказать что-либо определенное.

Полученные нами в этой и предыдущих работах данные о первичной структуре участков сочленения бактериальной и фаговой ДНК свидетельствуют о том, что определенная структурная гомология является существенной предпосылкой делеций, приводящих к образованию ТБФ, хотя структурные особенности этого процесса могут варьировать.

Авторы благодарны д-ру Дж. Беквиту (Бостон) за предоставление культур бактериофагов  $\lambda$ plac9 и  $\lambda$ plac10.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Franklin N. // Genetics. 1967. V. 55. № 4. P. 699—707.
2. Anderson P. // Genetics. 1987. V. 115. № 4. P. 581—584.
3. Ippen K., Shapiro J. A., Beckwith J. R. // J. Bacteriol. 1971. V. 108. № 1. P. 5—9.
4. Шпаковский Г. В., Берлин Ю. А. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 5. С. 711—713.
5. Shpakovski G. V., Berlin Yu. A. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 17. P. 6779—6795.
6. Шпаковский Г. В., Ахрем А. А., Берлин Ю. А. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 5. С. 695—698.
7. Shpakovski G. V., Akhrem A. A., Berlin Yu. A. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 21. P. 10199—10212.
8. Shpakovski G. V., Khimina M. P., Berlin Yu. A. // Abstracts of 14th International Congress of Biochemistry. Prague. 1988. V. 5. P. 116.
9. Shpakovski G. V., Khimina M. P., Berlin Yu. A. // Abstracts of Meeting «Interferon and Biotechnology 89». Havana, 1989.
10. Sanger F., Coulson A. R., Hong G. F., Hill D. F., Petersen G. B. // J. Mol. Biol. 1982. V. 162. № 4. P. 729—773.
11. Nucleotide Sequences 1985. Oxford: IRL Press, 1985. V. III. P. BACT 57—58.
12. Maxam A., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560—564.
13. Шпаковский Г. В. Структура и механизм образования трансдуцирующего бактериофага  $\lambda$ plac5. Автореф. дис. ...канд. биол. наук. М.: ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР. 1985. 24 С.
14. Smith G. R., Kunes S. M., Schultz D. W., Taylor A., Triman K. L. // Cell. 1981. V. 24. № 2. P. 429—436.
15. Fix D. F., Burns P. A., Glickman B. W. // Molec. Gen. Genet. 1987. V. 207. № 2/3. P. 267—272.
16. Kirkegaard K., Pflugfelder G., Wang J. C. // Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. 1984. V. 49. P. 411—419.

Поступило в редакцию  
27.II.1989

#### PRIMARY STRUCTURE OF THE TRANSDUCING BACTERIOPHAGE

##### $\lambda$ plac9 DNA REGION OF ABNORMAL EXCISION

SHPAKOVSKI G. V., KHEMINA M. P.\*, 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

Investigating molecular mechanism of illegitimate recombinations in prokaryote we study transducing bacteriophages of the  $\lambda$ lac series. We have carried out physical mapping of bacteriophage  $\lambda$ plac9 DNA and, by comparing the obtained results with the data on the structure of  $\lambda$  DNA and lac operon of *E. coli*, located the phage-bacterial junction corresponding to the  $\lambda$ -lac9 abnormal excision and elucidated the nucleotide sequence around the junction. It led to the primary structure of phage and bacterial segments in the lysogenic bacterium which took part in the recombinational act leading to the abnormal excision and  $\lambda$ plac9 formation. Structural homology of the partners in the  $\lambda$ plac9 excision proved to be lower than in case of the earlier studied  $\lambda$ plac5 and  $\lambda$ plac10, whose excision proceeded regioselectively. Various aspects of the crossover area, including the crossover point's probable position and enzymic systems participating in the abnormal excision, are discussed.