



УДК 547.963.32

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ρ НА
ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ БАКТЕРИОФАГА ϕ X174 IN VITRO.
ДВА КЛАССА ГЕНОВ БАКТЕРИОФАГА ϕ X174

Иатрушев Л. И., Капица Е. Л., Стукачева Е. А.,
Шемякин М. Ф.

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

Колифаг ϕ X174 принадлежит к группе мелких изометрических фагов, хромосома которого представляет собой одноцепочечную, ковалентно замкнутую кольцевую ДНК с молекулярным весом около $1,6 \cdot 10^6$ [1]. После проникновения вирусной ДНК внутрь бактериальной клетки на ней синтезируется комплементарная минус-цепь. В результате образуется репликативная форма I (РФ-I) ДНК, служащая непосредственной матрицей для транскрипции [1]. Первичная структура ϕ X174-ДНК установлена, и основные гены бактериофага строго локализованы на его хромосоме [2, 3].

На рис. 1 можно видеть, что гены фага сгруппированы по функциональному признаку. Первая группа состоит из генов А-Г, белковые продукты которых участвуют в основном в репликации фаговой ДНК, а вторая — из генов F, G и H, кодирующих структурные белки вириона. Представление о функциональном значении кластеризации генов фага ϕ X174 усиливается существованием ρ -зависимого терминатора (T_ρ), препятствующего транскрипции кластера генов структурных белков, инициированной на главных промоторах P_A , P_B и P_D [4-7].

Настоящее исследование предпринято с целью понять, имеют ли указанная кластеризация генов фага ϕ X174 и его терминатор T_ρ значение для экспрессии генов этого вируса. Поскольку корректный анализ процессов транскрипции и трансляции у фага ϕ X174 in vivo сильно затруднен из-за отсутствия выключения синтеза макромолекул бактерии-хозяина, для изучения экспрессии фаговых генов мы использовали в качестве модели ДНК-зависимую бесклеточную систему сопряженной транскрипции и трансляции.

Разработанная нами бесклеточная система протеосинтеза представляет собой модификацию описанных систем [8, 9]. Для получения S30-экстрактов мы использовали 4 штамма *E. coli* K-12: изогенные пары W3110 (дикий тип) и *psu4* (мутант по ρ -фактору) [10], а также SA1030 (дикий тип) и AD1600 (*ts*-мутант с измененным ρ -фактором) [11]. После инкубации S30-экстрактов в присутствии необходимых кофакторов и субстратов (4 аминокислоты были ^{14}C -мечеными) с РФ-I- ϕ X174-ДНК в качестве матрицы мы анализировали синтезированные при 37° С белки с помощью

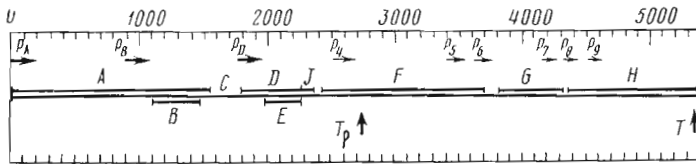


Рис. 1. Схема расположения генов на хромосоме фага ØX174. P_A, P_B и P_D — главные промоторы, T — терминатор (р-независимый), T_p — р-зависимый терминатор, P₁-P₉ — дополнительные промоторы. Шкала обозначает нумерацию нуклеотидов от P_A

SDS-электрофореза в пластинках 12% полиакриламидного геля с последующей автордиографией [12]. Белковые продукты трансляции *in vitro* были идентифицированы путем сравнения их с белками, которые образуются в облученных ультрафиолетом клетках *E. coli*, зараженных фагами ØX174 с амбер-мутациями в определенных генах. Продукты генов C и E нам не удалось в настоящее время достоверно идентифицировать.

Результаты одного из таких опытов представлены на рис. 2. Видно, что все S30-экстракты практически полностью свободны от эндогенных матриц (рис. 2, колонки а, б, в, г). В бесклеточных системах, где использованы S30-экстракты клеток *E. coli*, мутантных по р-фактору, образуются фаговые белки, кодируемые обеими группами генов, а именно А, В, D и F, G, H (рис. 2, колонки ж, з). В отличие от этого при использовании S30-экстрактов клеток дикого типа образование капсидных белков (гены F, G и H) резко снижено или даже не происходит вообще (рис. 2, колонки е, е). Такая же картина наблюдается при добавлении очищенного до гомогенности р-фактора в реакционную смесь с S30-экстрактом из мутантного штамма *psu4* (рис. 2, колонка д). В то же время в S30-экстрактах клеток дикого типа на матрице T7-ДНК образуется нормальный спектр белков, характерных для фага T7. Следовательно, обнаруженный нами эффект, обусловленный нехваткой функционально активного р-фактора в S30-экстрактах мутантных клеток *E. coli*, специфичен в отношении генома фага ØX174. Отсутствие или резкое снижение синтеза капсидных белков F, G и H в бесклеточных системах с S30-экстрактами клеток дикого типа можно объяснить терминацией транскрипции на T_p под действием эндогенного р-фактора и отсутствием реинициации транскрипции за терминатором, который расположен, по-видимому, в левой части гена F [6, 13].

Если T_p таким же образом функционирует и *in vivo*, возникает вопрос о транскрипции генов капсидных белков F, G и H в процессе фаговой инфекции. Можно предполагать, что в этой ситуации белковый продукт одного из фаговых генов, расположенных между промотором P_A и терминатором T_p (назовем их генами 1-го класса), может выполнять функцию антитерминатора, в присутствии которого РНК-полимераза не прекращает синтез РНК на терминаторе T_p и, начав транскрипцию с одного из промоторов генов 1-го класса, транскрибирует гены капсидных белков F, G и H (назовем их генами 2-го класса). Алогичный механизм переключения работы разных групп генов известен для фага λ, где N-белок выступает в роли антитерминатора [14]. Альтернативно один из белков генов 1-го класса может модифицировать РНК-полимеразу, в результате чего фермент начинает узнавать новую группу промоторов, расположенных перед генами 2-го класса. Существование дополнительных промоторов в этой области генома было показано нами ранее [6]. Такой механизм регуляции экспрессии генов характерен, например, для четных T-фагов [15].

Полученные нами данные позволяют предполагать, что общий план функциональной организации генома с «ранними» и «поздними» генами,

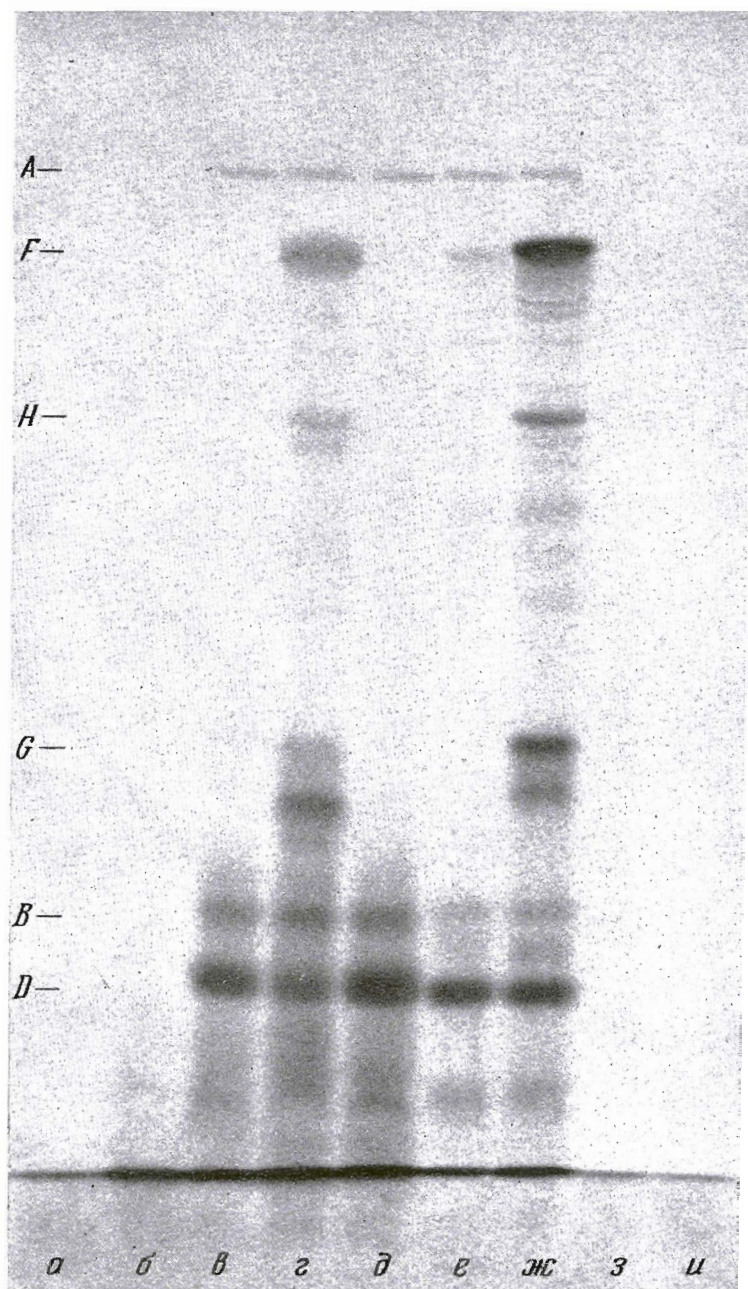


Рис. 2. Электрофорез белков фага ϕ X174, синтезируемых в S30-экстрактах из разных штаммов *E. coli*. *a, e* - W3110; *б, г, д* - *psu4*; *e, з* - SA1030; *ж, и* - AD1600. В пробу (*д*) перед инкубацией добавлен р-фактор до конечной концентрации 5 мкг/мл. *a, б, з, и* - контроли без ϕ X174-ДНК. Слева указано положение белковых продуктов генов

характерный для большинства ДНК-содержащих вирусов, может распространяться и на группу мелких изометрических фагов, к которым принадлежит бактериофаг ϕ X174.

Авторы благодарят Ч. Яновского за любезно предоставленные штаммы *E. coli*, П. Вайсбика — за мутанты фага ϕ X174.

ЛИТЕРАТУРА

1. Denhardt D. T. (1975) *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, **4**, 161–222.
2. Sanger F., Air G. M., Barrell B. G., Brown N. L., Coulson A. R., Fiddes J. C., Hutchison C. A., III, Slocombe P. M., Smith M. (1977) *Nature*, **265**, 687–695.
3. Sanger F., Coulson A. R., Friedmann T., Air G. M., Barrell B. G., Brown N. L., Fiddes J. C., Hutchison C. A., III, Slocombe P. M., Smith M. (1978) *J. Mol. Biol.*, **125**, 225–246.
4. Стукачева Е. А., Капитца Е. Л., Шемьякин М. Ф. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 891–902.
5. Kapitza E. L., Stukacheva E. A., Shemyakin M. F. (1976) *FEBS Lett.*, **64**, 81–84.
6. Kapitza E. L., Stukacheva E. A., Shemyakin M. F. (1979) *FEBS Lett.*, **98**, 123–127.
7. Axelrod N. (1976) *J. Mol. Biol.*, **108**, 771–779.
8. Zubay G., Chambers D. A., Cheong L. C. (1970) in: *The Lactose Operon* (Beckwith J. R., Zipsor D., eds), pp. 375–391, Cold Spring Harbor Lab., N. Y.
9. Gold L. M., Schweiger M. (1971) *Methods Enzymol.*, **30**, ptC, 537–542.
10. Corn L. J., Yanofsky C. (1976) *J. Mol. Biol.*, **106**, 231–241.
11. Das A., Court D., Adhya S. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 1959–1963.
12. Studier F. W. (1973) *J. Mol. Biol.*, **79**, 237–248.
13. Axelrod N. (1976) *J. Mol. Biol.*, **108**, 753–770.
14. Adhya S., Gottesman M. (1978) *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 967–996.
15. Никифоров В. Г., Зограф Ю. Н. (1977) в сб.: *Итоги науки и техники. Молекулярная биология*, т. 13, с. 150–165, М., ВИНТИ.

Поступило в редакцию
2.XI.1979

THE EFFECT OF TRANSCRIPTION TERMINATION FACTOR ρ ON THE IN VITRO BACTERIOPHAGE ϕ X174 GENE EXPRESSION. TWO CLASSES OF THE BACTERIOPHAGE ϕ X174 GENES

PATRUSHEV L. I., KAPITZA E. L., STUKACHEVA E. A., SHEMYAKIN M. F.

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

ϕ X174 bacteriophage gene expression was investigated in DNA-dependent cell-free systems of coupled transcription-translation. S30 extracts were prepared from two isogenic pairs of *E. coli* K12: *E. coli* W3110 (wild type) and *E. coli* *psu4* (ρ mutant), and another — *E. coli* SA1030 (wild type) and AD1600 (ρ *ts* mutant). It was shown that in vitro all phage proteins were synthesized only in the absence of active ρ factor. When ρ was present in the cell-free system, i. e. if S30 extracts were obtained from wild type strains or if exogenic factor ρ was added to the S30 extracts from ρ mutant strains, the formation of capsid phage proteins did not occur. At the same time proteins with catalytical functions in phage DNA replication and morphogenesis corresponded to genes A–D were synthesized in the presence of ρ . Two gene classes with different control mechanisms are concluded to exist in ϕ X174 bacteriophage genome. A possible mechanisms that switch on the synthesis of phage capsid proteins are discussed.