

УДК 575.23:576.858.9

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ТРАНСКРИПЦИИ У БАКТЕРИОФАГА T4

Дж. Б. БЕГЛАРЯН

В обзоре представлены имеющиеся в литературе данные о генетическом контроле транскрипции у бактериофага T4. Генетическая информация в молекуле ДНК реализуется дифференцированно во времени, разные гены функционируют последовательно при внутриклеточном развитии фага. Дается полная классификация иРНК, образованной в этом периоде.

T-четные фаги являются подходящим объектом для исследования разных уровней регуляции, поскольку эта простая форма жизни обладает высокоорганизованной схемой развития.

Вопрос в том, каким путем регулируется целесообразная последовательность генетической информации по времени и по объему. Известно, что процесс передачи генетической информации является двухступенчатым.

Первая стадия—это транскрипция, когда ДНК служит матрицей для синтеза иРНК, которая образуется путем спаривания оснований с «минус» (или антикодирующей) цепью ДНК. Образованная таким путем иРНК является точной копией «плюс» цепи ДНК.

Вторая стадия—это трансляция, когда иРНК является матрицей в процессе включения аминокислот в полипептидную цепь. Генетическая информация в молекуле ДНК реализуется дифференцированно во времени: на разных стадиях внутриклеточного развития фага образуются разные группы иРНК, которые комплементарно взаимодействуют с различными участками фаговой ДНК [1—4].

После фаговой инфекции бактериальная клетка начинает синтезировать «ранние» белки, затем их синтез тормозится, и на 7—8 мин начинается синтез «поздних» белков [5].

Можно сделать вывод, что синтезируются различные типы иРНК и что на «ранних» и «поздних» стадиях фагового развития активны различные гены. Итак, исследования показали, что имеется два класса фагокодированных РНК: первый класс образуется немедленно после инфекции («ранняя» РНК); второй—образуется на более поздних этапах инфекции и отсутствует ранее («поздняя» РНК) [2, 4, 6].

В дальнейшем выяснилось, что такая классификация на «раннюю» и «позднюю» РНК недостаточно точно отражает этапы реализации генетической информации у бактериофага T4.

Используя метод электрофореза, Хосод и Левинталь описали раз-

личные группы фаговых белков, синтез которых начинался немедленно после инфекции. Эта новая группа ранних белков контролировалась различными генами, не составляющими единой группы, и синтез этих белков начинался и прекращался в различные моменты инфекционного процесса. Из этого было ясно, что гены различаются по времени проявления и что некоторые ранние гены прекращают функционировать в процессе синтеза ДНК [7].

Другие исследователи [6, 8] также показали существование нескольких классов ранней РНК, появляющихся в различное время, а также, что некоторые ранние РНК продолжают функционировать и в поздний период фагового развития.

*Последовательность функционирования ранних генов.* Возникает вопрос, как происходит копирование—с обеих нитей двухспиральных ДНК (симметричное считывание) или только с одной (асимметричное считывание)?

Различными опытами по гибридизации РНК-ДНК у фагов Т4 показано, что каждая нить ДНК на отдельных участках может быть значащей (sense), а на других—незначащей (antesense). На противоположной комплементарной нити ДНК значащим участкам противостоят незначащие, и наоборот.

Результаты многочисленных опытов [9—13] свидетельствуют о том, что во время считывания генетической информации часть генов считывается справа налево с l-нити (левостороннее считывание), а другая—слева направо с г-нити (правостороннее считывание). Эксперименты по гибридизации ДНК-РНК с использованием отдельных нитей (l и г) ДНК позволяют исследовать регуляцию транскрипций генома бактериофага Т4.

Заражение клеток *E. coli* фагом Т4 приводит к резкому прекращению синтеза хозяйских белков и замещению его синтезом нескольких классов фаговых белков. Кодированные виды Т4-РНК, присутствующие на 5-й мин инфекции, можно разделить на два класса.

Первый класс—«непосредственно» ранние или «предранные» (immediate—early) РНК. В эту группу входят те виды РНК, которые являются первыми и транскрибируются даже в отсутствие синтеза фагового белка. «Предранняя» РНК зависит от функции хозяина, ее транскрипция начинается у ранних предшественников ДНК Т4, которые распознаются немодифицированной РНК-полимеразой хозяина, и заканчивается сигналом фага Т4. Активность этой РНК зависит от фактора хозяина, она транскрибируется против часовой стрелки с l-нити ДНК.

Второй класс—«задержанно» ранние (или просто «ранние») (delayed—early) РНК, появляющиеся после того, как «непосредственно» ранняя РНК уже транскрибирована. Гуха и Шибальски показали, что эта РНК тоже транскрибируется с l-нити ДНК, и транскрипция ее является продолжением транскрипции «непосредственно» ранней (или «предранней») РНК.

«Задержанно» ранние РНК были блокированы путем добавления

хлорамфеникола перед инфекцией, и было показано, что большая часть 5-минутной РНК из обоих классов—«непосредственно»-ранних (пред-ранних) и «задержанно» ранних (ранних) характеризуется «истинно» ранним поведением, т. е. уровень этих видов РНК резко падает в позднем периоде инфекционного процесса [14].

Позднее была выявлена еще одна ранняя разновидность РНК, которая известна как «квази-поздняя» (quasi—late) РНК.

Работа Сальсера с соавт. [15] доказывает, что РНК, присутствующая на 5-й мин, состоит минимум из 3-х классов: А, В, С.

Количество РНК классов А и В уменьшается в несколько раз в промежутке между 5-й и 20-й мин после заражения («истинно» ранние виды), количество РНК класса С увеличивается в несколько раз на 20-й мин, и на ее долю приходится большая часть 20-минутной РНК, конкурирующей с 5-минутной РНК при гибридизации с фаговой ДНК. Итак, первоначальное создание термина «почти поздняя» («квази-поздняя») РНК было связано с тем, что большое количество этой РНК транскрибируется при поздней, а не при ранней инфекции. «Квази-позднюю» РНК легко отличить от «истинно» поздней РНК, так как содержание «квази-поздней» увеличивается в 4—15 раз между 5-й и 20-й мин, а количество «истинно-поздней»—в том же периоде увеличивается более чем в 100 раз.

По мнению некоторых авторов, «квази-поздние» гены служат в качестве матрицы для синтеза ранних РНК до начала синтеза ДНК [16].

С целью исследования временной регуляции генов при заражении фагом Т4 был использован антибиотик рифампицин, который, как известно, связывается с  $\beta$ -субъединицей РНК-полимеразы и таким образом препятствует инициации транскрипции [17]. Авторы работы пытались выяснить, в какой промежуток времени после заражения транскрипция специфических цистронов становится нечувствительной к рифампицину. Проявление генов определялось путем анализа белков на акриламидном геле. В этих экспериментах трансляция использовалась для обнаружения специфических транскриптов.

В предрепликативной транскрипции выделяются два типа промоторов: ранние промоторы распознаются сразу после заражения, тогда как «квази-поздние»—с задержкой в 1,5 мин. К ранним РНК относятся большинство «непосредственно ранних» и «задержанно-ранних» РНК, к «квази-поздним»—специфические транскрипты, которые становятся резистентными к рифампицину через 1,5 мин после заражения. Некоторые из «квази-поздних» генов сначала контролируются ранними промоторами. Таким образом, распознавание новых промоторов служит для некоторых генов вторым механизмом транскрипции.

Подробное исследование белков, образующихся во временной последовательности [17], показало, что в течение 5—6 мин после заражения клетки фагом постоянно появляются новые виды белка. В описанном эксперименте синтез ДНК впервые обнаруживается через 7 мин

после заражения. Белки, появляющиеся до этого времени, являются продуктами предрепликативных генов. В интервале между началом репликации ДНК (через 7 мин после заражения) и началом поздней транскрипции (примерно через 12 мин после заражения) новые белки не появляются. В течение же первых двух минут после заражения образуется не менее 12 белков. Авторы считают, что эти белки кодируются генами, соседними с промоторами, распознающимися сразу после заражения, и являются продуктами действия непосредственно ранних РНК.

Если рифампицин добавляется через 1 мин после заражения, то синтезируются все виды предранних белков за немногим исключением, в том числе и «задержанно» ранние белки (например, цистрон гIIA).

Для выражения ранних генов в зараженной бактериальной клетке не требуется никаких компонентов, кроме фаговой ДНК. Следовательно, можно считать, что полное проявление ранних транскрипционных единиц происходит без участия транскрипционных или трансляционных факторов, измененных при заражении фагом T4 [18, 19].

Если инициации ранних промоторов возникают быстро, если средняя ранняя транскрипционная единица имеет длину не более 8000 пар оснований [20, 21] и скорость роста цепи РНК составляет 1000—1500 нуклеотидов в мин при 30° [22—24], то все ранние РНК должны появляться в течение первых 5 мин после инфекции [14, 16].

Пользуясь методом гибридизации—конкуренции РНК-ДНК, Гуха и соавт. [14] дали подробный анализ «квази-поздней» РНК. Не ясно было, как образуется РНК с «квази-поздним» поведением: из «предраннего» или из «раннего» классов, или из обоих вместе? Гуха считает, что «квази-поздние» РНК образуются из обоих классов («предранних» и «ранних»).

Экопериментом Гуха показано, что 97—100% 5-минутной РНК транскрибируется с 1-нити, следовательно, значительное большинство «предранних» и «ранних» классов РНК кодируется с 1-нити. Значит, «квази-поздняя» РНК, образующаяся из обоих этих классов, также имеет 1-ориентацию [14, 24].

Квази-поздние гены могут функционировать медленно, подобно ранним генам с переплицированной ДНК, и с большой скоростью, подобно поздним генам с реплицированной ДНК. Поэтому можно считать, что «квази-поздние» гены в основном являются поздними генами, и термин «квази-поздний» создан Сальсером именно исходя из этого обстоятельства [25].

Квази-поздняя РНК, которая транскрибируется с 1-нити, может образоваться даже при отсутствии синтеза ДНК (ДО), а также поздних функций (МД, maturation defective) [14].

При исследовании транскрипции и трансляции предрепликативных генов фага T4 *in vitro* [26] было показано, что небольшой класс предрепликативных белков плохо синтезировался в условиях *in vitro*. Это была группа квази-поздних белков. *In vivo* эти гены находятся под

контролем промоторов, распознаваемых, как уже указывалось, через 1,5 мин после заражения. Компоненты, необходимые для распознавания квази-поздних промоторов *in vitro*, по-видимому, отсутствуют или не функционируют в бесклеточных экстрактах.

Недавно подробно был изучен механизм регуляции фага T4 на уровне транскрипции фаговой ДНК, который приводит к прекращению синтеза ранних ферментов и ранних иРНК фага в промежутке между 10-й и 15-й минутами после инфекции бактерии [26, 27]. Этот механизм регуляции отсутствует у мутантов фага, не синтезирующих ДНК (мутанты с фенотипом ДО). 5-фторурацил частично восстанавливает синтез ДНК при развитии ДО-мутантов амбер-типа в бактериях. Однако восстановление синтеза ДНК тем меньше, чем позже добавлен 5-фторурацил. Добавление его на 12-й мин (когда в норме прекращается синтез ранних ферментов) не восстанавливает синтеза ДНК. Действие хлорамфеникола на разных этапах фагового развития позволило авторам сделать следующий вывод: подавление синтеза ранних иРНК у мутантов с фенотипом ДО при помощи хлорамфеникола блокирует образование раннего регуляторного белка, вызывающего синтез ранних иРНК. Синтез его начинается на 2—4-й мин после фаговой инфекции, и к 10-й мин количество синтезированного белка достигает уровня, достаточного для полного прекращения синтеза ранних иРНК.

С целью расшифровки возможного механизма регуляции ранних белков фага T4 и распределения генов по единицам транскрипции (скриптонам) был разработан оригинальный метод определения локализации промоторов фага T4 и идентификации совместно транскрибируемых генов [28], который заключается в изучении выражения генов с УФ-облученных ДНК-матриц и основывается на следующих фактах:

1. Повреждение ДНК УФ-лучами ведет к преждевременному окончанию транскрипции РНК в сайте повреждения.
2. РНК-полимераза не может вновь вызывать (реиницировать) транскрипцию между повреждением, вызванным УФ-облучением, и концом транскрипционной единицы [21].

Следовательно, у фага, облученного УФ-светом, функциональная выжимаемость промотор-проксимальных генов должна быть менее чувствительна к облучению, чем промотор-дистальных генов. Выжимаемость генов устанавливалась двумя способами: определялась способность фага T4 дикого типа, облученного УФ-ом, комплементировать с условно-летальными мутациями в разных генах фага T4; количество T4-специфических белков определялось путем разделения на полиакриламидном геле. Этот метод позволил установить, что ранние гены 43, 45 и гIIV—промотор-проксимальны. Поскольку гены 43 и гIIV классифицируются как «задержанно-ранние» («*delayed early*»), эти данные указывают на то, что для синтеза, возможно, требуется распознавание новых промоторов.

При определении позиции других генов [44—47, 55, 62] выяснилось, что они находятся на разных скриптонах—45—62, 55—46.

Таким образом, время синтеза Т4-специфических белков носит сложный характер. Некоторые ранние белки появляются сразу после заражения, а появление белков других генов задерживается на несколько минут. Позднее синтез многих ранних белков уменьшается, между тем как другие белки синтезируются в течение всего латентного периода развития фага. Прекращение синтеза некоторых ранних белков, вероятно, происходит на уровне пост-транскрипции, так как иРНК для ранних генов синтезируются в течение всего латентного периода [6, 29], тогда как синтез большинства ранних белков прекращается примерно через 10 мин [7].

Поздние белки фага Т4 появляются вскоре после начала репликации ДНК, и синтез их продолжается до лизиса бактериальной клетки. Регуляция относительных количеств поздних белков может происходить либо на уровне транскрипции, либо на уровне трансляции [28].

*Функционирование поздних генов.* Группой Энштейна еще в 1963 году было выявлено, что синтез ДНК начинается в результате функционирования ранних генов и только после этого остальные гены фага Т4 получают выражение. При отсутствии синтеза ДНК поздние гены не функционируют [30].

Та РНК, количество которой возрастает через 5 мин после инфекции и которая транскрибируется главным образом с г-нити ДНК, получила название «истинно»-поздней РНК (Сальсер) или г-РНК (Гуха). Транскрипция поздней РНК начинается с нити I и переходит на нить г. Таким образом, только те виды РНК, которые заново начинают функционировать в поздней инфекции обозначаются как поздние РНК [14].

Болле с соавт. показали, что мутации, влияющие на синтез ДНК фага Т4 и на функцию генов 55 и 33, приводят к угнетению синтеза поздней РНК [6, 29].

Однако по данным других исследователей, продолжение синтеза фаговой ДНК, по-видимому, не является необходимым условием для непрерывной функции поздних генов [6, 29, 31—33], хотя после прекращения синтеза фаговой ДНК скорость транскрипции поздних генов уменьшается [34, 35]. Таким образом, создается впечатление, что начало синтеза ДНК вызывает функционирование поздних генов. Дальнейшие исследования показали, что синтез фаговой ДНК, хотя и необходим, но недостаточен для функционирования поздних генов.

Исследованиями было выявлено, что при мутациях в генах 33 и 55 (охарактеризованных как мутанты с дефектным созреванием МД «maturation defective») нормально синтезируется ДНК, но отсутствует поздний генопродукт [6, 7, 29, 30].

Ген 55 может вызывать появление поздней РНК при отсутствии как синтеза ДНК, так и синтеза белка. В экспериментах *in vitro* показано, что для поздней транскрипции необходим генопродукт 55 гена [36].

Известно, что в клетках, инфицированных ts-мутантом по гену 55 в условиях непермиссивной температуры, синтез поздних РНК быстро

прекращается. Если те же клетки перенести в условия с перmissive температурой, то синтез поздних РНК сразу же восстанавливается. Такие *in vivo* эксперименты показывают, что продукт гена 55 контролирует включение поздних генов [33, 37].

При более подробном исследовании роли гена 55 оказалось, что 55-генопродукт необходим не только для выражения поздних генов, но также для ранних [25].

Синтез ранних РНК идет медленно, если фаг содержит мутацию в 55 или 33 гене. Следовательно, ген 55 участвует в транскрипционной регуляции ранней иРНК [38].

Показано [37, 39], что 55-генопродукт начинает появляться на 5—10-й мин фаговой инфекции при температуре 30° в то время, как репликация ДНК начинается на 6-й мин после инфекции. Это значит, что 55-генопродукт имеется в большом количестве уже на 10-й мин, когда фагоспецифической ДНК еще очень мало. Значит, для появления 55 генопродукта не требуется репликации ДНК, и появление его во время поздней транскрипции осуществляется также без репликации. 55-генопродукт необходим для координированного синтеза бактериофага в течение всего инфекционного процесса. Следовательно, 55 ген играет позитивную и длительную роль во время поздней инфекции [37].

При исследовании влияния функции гена 55 на регуляцию синтеза ранних ферментов и транскрипцию ранних генов фага Т4 выяснилось, что функция гена 55 необходима для нормальной регуляции синтеза ранних белков. При мутационном изменении этого гена увеличивается период синтеза ранних ферментов [26]. Существует несколько различных предположений относительно этого факта: продолжение синтеза ранних белков может быть обусловлено блокированием транскрипции поздних генов и отсутствием конкуренции за трансляцию между ранними и поздними иРНК; продолжение синтеза может быть вызвано увеличением стабильности ранних иРНК при условии транскрипции поздних генов; мутанты по гену 55 и мутанты с фенотипом ДО не синтезируют регуляторного фактора, переключающего трансляцию с ранних иРНК на поздние. Механизм действия продукта гена 55 не известен. Не выяснено, на каком уровне он действует. Не исключено, что продукт гена 55 является совершенно новой РНК-полимеразой. Тот факт, что продукт гена 55 важен не только для включения поздних генов, но и для регуляции синтеза ранних ферментов, позволяет предположить, что процессы включения поздних генов и выключения ранних генов сопряжены.

Таким образом, механизм транскрипционной регуляции РНК связан с генами 33 и 55. Аналогичную роль играет еще один фаговый ген — ген 49.

Т 4 ԲԱԿՏԵՐԻՈՆԱԴԻ ՏՐԱՆՍԿՐԻՊՑԻԱՅԻ  
ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԿՈՆՏՐՈՒԻ ՄԱՍԻՆ

Չ. Բ. ԲԵԴԼԱՐՅԱՆ

Ներկայացված են զրահանութայան մեջ եղած տվյալները T 4 բակտերիո-  
ֆագի արանսկրիպցիայի գենետիկական կոնտրոլի վերաբերյալ:

ԻնՆ-ի գենետիկական ինֆորմացիան իրացվում է դիֆերենցված ժամա-  
նակի մեջ, որ տարրեր գեներ գործում են հաշորդաբար ֆագի ներբջջային  
դարգացման ժամանակ:

Տրվում է լրիվ դասակարգում ինՆՆ, որը առաջանում է այդ ժամանակի  
ընթացքում:

Genetic control of transcription of T4 bacteriophage

J. B. Beglarian

The data in literature on the genetic control of T4 bacteriophage transcription are shown in the paper. Complete classification of iRNA formed during the intracellular development is given.

Л И Т Е Р А Т У Ր Ա

1. Хесин Р. Б. IX Междунар. конгр. по микробиол., симп., М., 1966.
2. Хесин Р. Б., Шелякин М. Ф., Биохимия, 27, 716, 1962.
3. Hall B., Spiegelman S. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 47, 137, 1961.
4. Hall B., Nygaard A. et al. J. Mol. Biol., 9, 143, 1964.
5. Edgar R., Epstein R. Scient. Amer., 212, 71, 1965.
6. Bolle A., Epstein R. et al. J. Mol. Biol., 31, 325, 1968.
7. Hosoda J., Levinthal C. Virology, 34, 709, 1968.
8. Kasal T., Hantz E. J. Biology, 41, 401, 1969.
9. Cohen S., Hurwitz L. J. Mol. Biol., 37, 387, 1968.
10. Karam J. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 37, 416, 1969.
11. Skalka A. Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., 55, 1190, 1966.
12. Skalka A., Butler B. Proc. Nat. Acad., Sci., U. S. A., 58, 576, 1967.
13. Teylor K. et al. Federation Proc., 26, 449, 1967.
14. Cuha A., Sxtbatski W. et al. J. Mol. Biol., 59, 329, 1971.
15. Salser W., Bolle A. J. Mol. Biol., 59, 329, 1971.
16. Salser W., Bolle A. et al. J. Mol., 49, 271, 1970.
17. O'Farrell Z., Gold M. J. Biol. Chem., 248, 5502, 1973.
18. Black W., Cold M. J. Mol. Biol., 60, 365, 1971.
19. O'Farrell Z., Gold M. J. Biol. Chem., 248, 512, 1973.
20. Rlcherdson C. Gold Spring Harbor Symp. Quant Biol., 35, 127, 1970.
21. Sauerbier W., Millette L. et al. Biochem. Biophys. Acta, 209, 368, 1970.
22. Bremer H., Yuan D. J. Mol. Biol., 34, 527, 1968.
23. Monor H., Coodman D. et al. J. Mol. Biol., 39, 1, 1969.
24. Schmidt A., Masattis J. et al. Nature, 225, 1012, 1970.
25. Burner R., Cape R. J. Mol. Biol., 53, 69, 1970.
26. Bolund Ch., Skold O. J. Virology, 12, 39, 1973.
27. Bolund Ch. J. Virology, 12, 49, 1973.
28. Hercules H., Sauerbier W. J. Virology, 12, 4, 872, 1973.

29. *Bolle A., Epstein R. et al.* J. Mol. Biol., 33, 339, 1968.
30. *Epstein R., Bolle A. et al.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 375, 1963.
31. *Алиханян С. И., Крылов В. И.* и др. Генетика, 2, 16, 1966.
32. *Mahler H., Baylor M.* Proc. Nat. Acad. Sci. Nash., 58, 256, 1967.
33. *Pulitzer J. J.* Mol., Biol., 49, 2, 473, 1970.
34. *Lemback K. et al.* Proc. Nat. Acad. Scen. Nash., 62, 446, 1969.
35. *Riva S., Geldushek E.* Federation Proc., 28, 660, 1969.
36. *Pulitzer J., Snyder L. et al.* Federation Proc., 27, 592, 1968.
37. *Pulitzer J., Geidusahek E. J.* Mol. Biol., 49, 2, 489, 1970.
38. *Scold O. J.* Mol. Biol., 53, 339, 1970.
39. *Haselkorn R., Baldi L. et al.* Biochemistry of virus replication, L.—N. Y., 79, 1968.